

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

**PERFIL BIOTECNOLÓGICO DE MICRORGANISMOS TOLERANTES A METAIS
POTENCIALMENTE TÓXICOS, CAPAZES DE PROMOVER CRESCIMENTO VEGETAL
E REMEDIAR RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

ELANE CRISTINA LOURENÇO DOS SANTOS
ORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª Ana Maria Queijeiro López

Maceió, Estado de Alagoas

Julho, 2019

ELANE CRISTINA LOURENÇO DOS SANTOS

**PERFIL BIOTECNOLÓGICO DE MICRORGANISMOS TOLERANTES A
METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS, CAPAZES DE PROMOVER
CRESCIMENTO VEGETAL E REMEDIAR RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia, do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência.

Orientador (a): Profa. Dra. Ana Maria Queijeiro López

Maceió, Estado de Alagoas

Julho, 2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

S237i Santos, Elane Cristina Lourenço dos.

Perfil biotecnológico de microorganismos tolerantes a metais potencialmente tóxicos, capazes de promover crescimento vegetal e remediar resíduos agroindustriais / Elane Cristina Lourenço dos Santos. – 2019.

116. : il

Orientadora: Ana Maria Queijeiro López.

Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em química e Biotecnologia. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 91-108.

Apêndices: f. 110-116.

1. Fertilizantes biológicos. 2. Hormônios vegetais. 3. Fertirrigação.
I. Título.

CDU: 631.8



FOLHA DE APROVAÇÃO

ELANE CRISTINA LOURENÇO DOS SANTOS

”Perfil biotecnológico de microrganismos tolerantes a metais potencialmente tóxicos, capazes de promover crescimento vegetal e remediar resíduos agroindustriais”

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Tese aprovada em 24 de julho de 2019.

COMISSÃO JULGADORA:

Profa. Dra. Ana Maria Queijeiro Lopez
(Orientadora - PPGQB/IQB/UFAL)

Luiz Fernando Romanholo Ferreira
Prof. Dr. Luiz Fernando Romanholo Ferreira
(PPGEP-IPT/UNIT Aracajú)

Alysson Wagner F. Duarte
Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte
(PPGMCM/FAMED/UFAL)

Dimas José da Paz Lima
Prof. Dr. Dimas José da Paz Lima
(PPGQB/IQB/UFAL)

Francis Soares Gomes
Prof. Dr. Francis Soares Gomes
(PPGQB/IQB/UFAL)

Dedicatória

Aos meus pais, **Maria José** (*in memoriam*) e **José Amaro** (*in memoriam*), pelo amor oferecido, por me acompanharem sempre e mostrarem meus erros para que eu pudesse crescer, ensinando-me dignamente o caminho da honestidade e persistência.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Alagoas (UFAL), pela oportunidade de realização do Curso de pós-graduação, e a coordenação do curso de pós-graduação em Química e Biotecnologia, na pessoa do coordenador Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti, e a todos os demais professores, pelos ensinamentos.

A Capes, (Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior) pela bolsa de doutorado concedida, e a S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, pela parceria e financiamento do projeto.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Ana Maria Queijeiro López, pela orientação, pela paciência, pela dedicação, por ter acreditado em mim, pela oportunidade do trabalho, pelos seus ensinamentos profissionais e principalmente pela amizade durante todo o processo.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental (LBPMA) Jéssica Guerra e Everton Martins, pela convivência, ensinamentos, paciência e crescimento dentro da vida acadêmica.

A minha amiga Amanda Lys, dos Santos Silva, pela cumplicidade, torcida, pela força, disposição em ajudar em todas as horas e, principalmente, por também ser uma das minhas incentivadoras.

Aos meus irmãos, Edneide L. da Silva, Evaneide V. L. dos Santos e Emerson L. dos Santos, que apostaram e acreditaram em mim, sonharam comigo e, de uma maneira ou de outra, me deram suporte para continuar.

A José Abelardo da Rocha, pelo amor, pela paciência, incentivo e companheirismo.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente me deram apoio ao longo desses anos.

RESUMO

A preocupação com uma produção agrícola o mais sustentável possível, e com a minimização ou reciclagem de resíduos gerados nos diferentes processos agroindustriais, entre eles os do setor sucroalcooleiro brasileiro, tem aumentado nas últimas duas décadas. No tocante a tais resíduos, comumente apresentam elevados níveis de compostos orgânicos e, dependendo dos processos industriais, inclusive com alguns metais potencialmente tóxicos, devendo passar por tratamento antes de serem dispensados. Assim, a busca de formas de microbiolização do solo e/ou mudas para aumento da produtividade no campo, bem como a biorremediação de resíduos, têm sido alternativas ecoeficientes visadas. Neste trabalho, bactérias tolerantes a alto gradiente osmótico e diferentes concentrações de sais de metais potencialmente tóxicos (CuSO_4 , $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, PbCl_2 , $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, CrO_4 e HgCl_2), foram isoladas e avaliadas quanto a seu perfil de atividades enzimáticas (na presença e ausência dos sais de metais estudados), tolerância a altas temperatura e concentrações de NaCl , sensibilidade a antibióticos (Amicacina, Norfloxacina e Tetraciclina), tipo de simbiose, e, finalmente, identificadas bioquímica e molecularmente. Além disso, verificou-se se as estirpes mais eficientes podiam promover o crescimento vegetal (germinação de *Lactuca sativa*), secretar biossurfactantes/bioemulsificantes e biorremediar resíduos (lodo e efluente) sucroalcooleiros. Por fim, testou-se uma formulação de baixo custo que tornasse viável a aplicação do consórcio microbiano *in vitro* e/ou em condições de campo. Cinco bactérias tolerantes a gradiente osmótico e a altas concentrações dos sais de metais testados foram selecionadas e mostraram-se capazes de produzir enzimas de interesse biotecnológico. Nos testes de tipo de simbiose, comprovou-se que os cinco isolados selecionados podem coexistir, ou seja, compor um consórcio microbiano sem antagonizarem-se. Estes foram identificados bioquimicamente e molecularmente como *Pseudomonas aeruginosa* - EFI, *Bacillus atrophaeus* - EFII, *B. cereus* - EFIII, *Lysinibacillus macroides* - LOII e *B. thuringiensis* - LOIII. Com exceção do isolado *P. aeruginosa* - EFI, todos os demais são termófilos facultativos e sensíveis aos antibióticos testados. O cultivo em sais de metais potencialmente tóxicos não afetou a atividade da catalase, mas em altas concentrações afetou a citocromo-oxidase em *L. macroides* - LOII, e a da nitrato-redutase em *P. aeruginosa* - EFI, *L. macroides* - LOII e *B. thuringiensis* - LOIII. Apenas *B. atrophaeus* - EFII apresentou ambas as capacidades biossurfactante e bioemulsificante nas condições estudadas, e foi o único que não solubilizou fosfato em meio líquido. Todos os isolados fixaram nitrogênio e produziram AIA *in vitro*. A inoculação de sementes de alface com o consórcio também proporcionou alta taxa de germinação (97%) das mesmas. As cinco estirpes foram capazes de modificar *in vitro* os efluentes (sintético e agroindustrial) e o lodo estudados, sugerindo sua posterior aplicação em fertirrigação e biossólido para o solo, respectivamente. Em condições de campo, o consórcio foi utilizado no tratamento do efluente de uma indústria suco-alcooleira, e sua eficiência durante uma safra também foi comprovada (monitoramento de diferentes parâmetros físico-químicos), com taxa média de remoção de Demanda Química de Oxigênio (DQO) de 72,50%. Portanto, com relação aos aspectos estudados, as 5 bactérias isoladas e selecionadas apresentam potencial de aplicação biotecnológica, em especial como suplemento para a promoção do crescimento vegetal e na biorremediação de resíduos agroindustriais.

Palavras-chave: Fertilizantes biológicos; hormônios vegetais; fertirrigação.

ABSTRACT

The concern with the most possible sustainable agricultural production, and with the minimization or recycling of residues generated in the different agroindustrial processes, including those of the Brazilian sugar and alcohol sector, has increased in the last two decades. Regarding such residues, they usually have high levels of organic compounds and, according to industrial processes, even some potentially toxic metals, and must undergo treatment before being dispensed. Thus, the search for forms of soil and/or seedlings microbiolization to increase productivity in the field, as well as waste bioremediation, have been targeted ecoefficient alternatives. In this work, high osmotic gradient tolerant bacteria and different concentrations of potentially toxic metal salts (CuSO_4 , $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, PbCl_2 , $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, K_2CrO_4 , and HgCl_2), were isolated and evaluated for their enzymatic activity profile (in the presence and absence of the studied metal salts), high temperature tolerance and NaCl concentrations, sensitivity antibiotics (Amikacin, Norfloxacin and Tetracycline), symbiosis type, and finally identified biochemically and molecularly. In addition, it was verified whether the most efficient strains could promote plant growth/germination (*Lactuca sativa*), secrete biosurfactants / bioemulsifiers and bioremediate sugarcane residues (sludge and effluent). Finally, a low cost formulation was tested to make it possible to apply the microbial pool in vitro and / or under field conditions. Five bacteria tolerant to osmotic gradient and high concentrations of the tested metal salts were selected and they were able to produce enzymes of biotechnological interest. In symbiosis tests, it was shown that the five selected strains can coexist, that is, compose a microbial consortium without antagonizing each other. These were identified biochemically and molecularly as *Pseudomonas aeruginosa* - EFI, *Bacillus atrophaeus* - EFII, *B. cereus* - EFIII, *Lysinibacillus macroides* - LOII and *B. thuringiensis* - LOIII. Except for the *P. aeruginosa* - EFI isolate, all others are facultative thermophiles and sensitive to the tested antibiotics. Potentially toxic metal salt cultivation did not affect catalase activity, but at high concentrations it affected cytochrome oxidase in *L. macroides* - LOII, and nitrate reductase in *P. aeruginosa* - EFI, *L. macroides* - LOII and *B. thuringiensis* - LOIII. Only *B. atrophaeus* - EFII presented both biosurfactant and bioemulsifying capacities under the studied conditions, and was the only one that did not solubilize phosphate in liquid medium. All isolates fixed nitrogen and produced IAA *in vitro*. Inoculation of lettuce seeds with the consortium also provided high germination rate (97%). The five strains were able to modify in vitro the effluents (synthetic and agroindustrial) and the studied sludge, suggesting their subsequent application in fertigation and soil biosolid, respectively. Under field conditions, the consortium was used to treat effluent from a sugar and alcohol industry, and its efficiency during a harvest-season was also proven (monitoring of different physicochemical parameters), with an average rate of removal of chemical oxygen demand (COD) of 72.50%. Therefore, regarding the studied aspects, the five selected bacteria have potential of biotechnological applications, especially as a supplement for the promotion of plant growth and in the bioremediation of agroindustrial residues.

Keywords: Biological fertilizer; plant hormones; fertirrigation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural de alguns compostos biodegradáveis. A) hidrocarbonetos derivados do petróleo; B) agroquímicos (inseticida e herbicidas).....	26
Figura 2. Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) da Usina Coruripe (Coruripe-AL)	32
Figura 3. Árvore filogenética das sequências 16S rDNA das bactérias isoladas de resíduos (efluentes e lodo) de uma agroindústria sucroalcooleira brasileira em comparação (% identidade) com outras obtidos do GenBank (NCBI: Centro Nacional de Informações Biotecnológicas)	59
Figura 4. Concentração de fosfato solúvel (A) e pH (B) em culturas de isolados bacterianos em meio líquido NBRIP, após 7 dias (30 ± 1 ° C, 120 rpm, escuro).....	60
Figura 5. Concentração de Ácido Indol Acético (AIA) em culturas de diferentes isolados bacterianos em meio líquido TSA a 10% contendo triptofano, após 24 horas de incubação sob agitação (30 ± 1 ° C, 120 rpm, escuro).....	61
Figura 6. Taxa de germinação (%) de sementes de alface (<i>L. sativa</i> L.) inoculadas - individualmente ou em consórcio - em culturas de diferentes isolados bacterianos. As médias seguidas por letras distintas na barra diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Controle = sem inoculação	61
Figura 7. pH final (A) e Concentração de glicídios redutores totais (B) dos sobrenadantes livres de células das bactérias, em meio contendo glicose 2% como única fonte carbono (Costa, 2010), após 48 h de incubação	67
Figura 8. Crescimento fúngico: A) (<i>Phanerochaete chrysosporium</i> - PC), B) <i>Mucor</i> sp-2A), após 24, 48, 72 e 96 h de incubação no meio sintético e no de baixo custo (30 ± 1 ° C, no escuro, com aeração de 140 rpm)	81
Figura 9. Crescimento bacteriano: A) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - EFI; B) <i>Bacillus atrophaeus</i> - EFII; C) <i>Bacillus cereus</i> -EFIII e D) <i>Lysinibacillus macroides</i> LOII, após 24, 48, 72 e 96 h de incubação no meio sintético e no de baixo custo (30 ± 1 ° C, no escuro, com aeração de 140 rpm)	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes tipos de tratamento de resíduos industriais.....	23
Tabela 2. Microrganismos usados em biorremediação de diferentes tipos de resíduos.....	24
Tabela 3. Tipos de biorremediação e suas principais características	25
Tabela 4. Caracterização físico-química do efluente agroindustrial (EA) coletado na primeira lagoa de sedimentação da ETE da “S.A Usina Coruripe Açúcar e Álcool”, no início da safra 2016/2017	40
Tabela 5. Caracterização físico-química do lodo coletado na primeira lagoa de sedimentação da ETE da “S.A Usina Coruripe Açúcar e Álcool”, no início da safra 2016/2017.....	43
Tabela 6. Concentração máxima de metais potencialmente tóxicos tolerada por isolados bacterianos de resíduos industriais (efluentes e lodo) de uma agroindústria sucroalcooleira (safra de cana-de-açúcar 2015/2016).....	50
Tabela 7. Aspectos morfo-bioquímicos dos cinco isolados obtidos a partir de resíduos industriais (efluentes e lodo) de uma agroindústria sucroalcooleira brasileira (safra de cana-de-açúcar 2015/2016). (+) = reação positiva; (-) = reação negativa	53
Tabela 8. Reações bioquímicas realizadas com tiras API [®] ZYM (BioMerieux, Inc., França) para caracterização dos cinco isolados obtidos de resíduos industriais (efluentes e lodo) de uma agroindústria sucroalcooleira brasileira (safra de cana-de-açúcar 2015/2016), (+) = reação positiva;(-) = reação negativa.....	54
Tabela 9. Susceptibilidade (diâmetro em mm da zona de inibição) dos isolados de efluentes (EF) e lodo (LO) da estação de tratamento (lagoa de sedimentação A) de uma agroindústria sucroalcooleira brasileira para diferentes antibióticos.....	56
Tabela 10. Alinhamento múltiplo de sequências nucleotídicas da região 16S rDNA dos isolados bacterianas de efluentes (EF) e lodo (LO) da estação de tratamento (lagoa de sedimentação A) de uma agroindústria sucroalcooleira brasileira (safra de cana-de-açúcar 2015/2016), (NCBI: Centro Nacional de Informações Biotecnológicas)	58
Tabela 11. Resistência ao estresse salino de cinco isolados tolerantes a sais de metais potencialmente tóxicos isoladas em resíduos de agroindústria. (+) = crescimento positivo, (-) = ausência de crescimento	59

Tabela 12. Testes realizados para quantificar a capacidade surfactante e emulsificante dos sobrenadantes livres de células das bactérias, em meio contendo glicose 2% como única fonte carbono (Costa, 2010), após 48 h de incubação.....	66
Tabela 13. Parâmetros físico-químicos avaliados em efluente sintético inoculado por diferentes bactérias ou seu consórcio (exceto controle), após 96 h de incubação (30 ± 1 °C, escuro, 120 rpm de agitação). Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.....	69
Tabela 14. Parâmetros físico-químicos avaliados em efluente sintético inoculado por diferentes bactérias ou seu consórcio (exceto controle), após 96 h de incubação (30 ± 1 °C, escuro, sem agitação). Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.	70
Tabela 15. Parâmetros físico-químicos avaliados em efluente agroindustrial inoculado por diferentes bactérias ou seu consórcio (exceto controle), após 96 h de incubação (30 ± 1 °C, escuro, 120 rpm de agitação). Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.....	72
Tabela 16. Parâmetros físico-químicos avaliados em efluente agroindustrial inoculado por diferentes bactérias ou seu consórcio (exceto controle), após 96 h de incubação (30 ± 1 °C, escuro, sem agitação). Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.....	73
Tabela 17. Parâmetros físico-químicos avaliados na compostagem de solo + lodo (proveniente da primeira lagoa de sedimentação da ETE de uma agroindústria sucroalcooleira), 15, 45 e 75 dias após a inoculação por diferentes bactérias ou seu consórcio, em condição de casa-de-vegetação. Médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.....	78
Tabela 18. Temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, pH, alcalinidade total, condutividade elétrica, sólidos totais sedimentáveis, sólidos totais dissolvidos e turbidez das amostras coletadas nas lagoas A e G da ETE da agroindústria estudada (Coruripe-AL), no período de 09/10/2018 a 16/04/2019.....	85
Tabela 19. Demanda Química de Oxigênio, concentrações de fosfato, de amônio, nitrito, nitrato, ácidos voláteis e cloretos coletadas nas lagoas A e G da ETE da agroindústria estudada (Coruripe-AL), no período de 09/10/2018 a 16/04/2019.....	86

LISTA DE ACRÔNIMOS, SIGLAS, FÓRMULAS E SÍMBOLOS

BOD	Incubadora para Demanda Bioquímica de Oxigênio
FASTA	Alinhamento Rápido
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
ACCD	1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
H₃PO₄	Ácido fosfórico
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
AIA	Ácido-indol-acético
AN	Agar Nutriente
TSA	Ágar-Triptona de Soja
BSA	Albumina de soro bovino
Al	Alumínio
As (III)	Arsênio III
As (V)	Arsênio V
Cd	Cádmio
CN	Caldo nutriente
CaCO₃	Carbonato de cálcio
C	Carbono
COT	Carbono Orgânico Total
Pb	Chumbo
CaCl₂	Cloreto de cálcio
PbCl₂	Cloreto de chumbo
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MgCl₂.6 H₂O	Cloreto de magnésio hexahidratado
KCl	Cloreto de potássio
NaCl	Cloreto de sódio
Co	Cobalto
Cu	Cobre
CETESB	Companhia ambiental do estado de são paulo
CONAB	Companhia nacional de abastecimento
CIM	Concentração inibitória mínima

CMT	Concentração Máxima Tolerada
CNRH	Conselho Nacional de Recursos Hídricos
CONAMA	Conselho nacional do meio ambiente
K₂CrO₄	Cromato de potássio
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
Cr	Cromo
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
K₂Cr₂O₇	Dicromato de potássio
USEPA	Environment Protection Agency
ETE	Estação de Tratamento de Efluentes
Fe	Ferro
CaHPO₄	Fosfato bicálcio
AlPO₄	Fosfato de alumínio
Ca₃(PO₄)₂	Fosfato de cálcio
Fe₃PO₄	Fosfato de ferro
K₂HPO₄	Fosfato dipotássio
P	Fósforo
NaOH	Hidróxido de sódio
IPDC	Indolpiruvato descarboxilase
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IQB	Instituto de Química e Biotecnologia
LBPMA	Laboratório de Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental
Mn	Manganês
MO	Matéria orgânica
Hg	Mercúrio
MPCV	Microrganismos Promotores de Crescimento Vegetal
Na₂MoO₄	Molibdato de sódio
NBRIP	<i>National Botanical Research Institute's phosphate growth medium</i>
NCBI	National Center for Biotechnological Information
Ni	Níquel
Pb (NO₃)	Nitrato de chumbo

N	Nitrogênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de base
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
K	Potássio
pH	Potencialhidrogeniônico
PCV	Promoção de crescimento vegetal
Kg	Quilograma
RDP	Ribosomal Database Project
RPCP	Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas
rpm	Rotações por minutos
C₁₂H₂₂O₁₁	Sacarose
SEMARH	Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos
Na	Sódio
(NH₄)₂SO₄	Sulfato de amônio
CdSO₄.8/3H₂O	Sulfato de cádmio octahidratado
CoSO₄.7H₂O	Sulfato de cobalto heptahidratado
CuSO₄	Sulfato de cobre
FeSO₄	Sulfato de ferro
MgSO₄	Sulfato de magnésio
MgSO₄.7H₂O	Sulfato de magnésio heptahidratado
MnSO₄. H₂O	Sulfato de manganês hidratado
NiSO₄. 6H₂O	Sulfato de níquel hexahidratado
ZnSO₄.7H₂O	Sulfato de zinco heptahidratado
Taq	<i>Taq</i> polimerase
Trp	Triptofano
TBE	Tris-Borato-EDTA
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UNEP	United Nations Environment Programme
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
WEF	<i>Water Environment Federation</i>
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Agroindústria de cana-de-açúcar	21
2.2 Tratamentos de resíduos industriais e importância de enzimas microbianas	22
2.3 Reúso de resíduos agroindustriais	28
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Amostragem	32
4.2 Isolamento de bactérias tolerantes a sacarose.....	32
4.3 Seleção de bactérias tolerantes a sais de metais potencialmente tóxicos	33
4.4 Caracterização morfo-cultural e bioquímica dos isolados selecionados	33
4.5 Teste de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados selecionados.....	34
4.6 Efeito dos sais de metais potencialmente tóxicos na atividade da catalase, da citocromo-oxidase e da nitrato-redutase.....	34
4.7 Interação (antagonismo ou não) entre os isolados selecionados	34
4.8 Identificação molecular dos isolados selecionados	35
4.9 Bactérias halotolerantes	35
4.10 Bactérias promotoras de crescimento vegetal	36
4.10.1 Solubilização de CaHPO_4 <i>in vitro</i>	36
4.10.2 Determinação do pH.....	36
4.10.3 Determinação da fixação de nitrogênio	36
4.10.4 Produção de Ácido Indol Acético (AIA).....	37
4.10.5 Efeito dos isolados bacterianos sob germinação de <i>Lactuca sativa in vitro</i>	37
4.11 Avaliação da secreção de biossurfactantes/bioemulsificantes	38
4.11.1 Determinação de glicídios redutores totais.....	38
4.11.2 Determinação da capacidade emulsificante.....	39
4.11.3 Determinação da capacidade surfactante.....	39
4.12 Ação dos iolados sobre efluentes: sintético (ES) e agroindustrial (EA).....	39

4.12.1	Caracterização física do efluente agroindustrial (EA).....	41
4.12.2	Caracterização química do efluente agroindustrial (EA)	41
4.12.2.1	Determinação da concentração de nitritos (NO_2^-)	41
4.12.2.2	Determinação da concentração de nitratos (NO_3^-)	41
4.12.2.3	Determinação da concentração de amônia	42
4.12.2.4	Determinação da concentração de fosfato	42
4.12.2.5	Determinação de Oxigênio Dissolvido (DQO)	42
4.12.2.6	Determinação da concentração de proteínas totais e glicídios redutores totais.	42
4.12.2.7	Determinação da concentração de fenóis totais.....	43
4.13	Caracterização físico-química do lodo e ensaio de compostagem	43
4.13.1	Coleta do lodo.....	43
4.13.2	Preparo da amostra de lodo	44
4.13.3	Caracterização físico-química do lodo	44
4.13.3.1	pH e Condutividade elétrica	44
4.13.3.2	Umidade 60-65 °C	44
4.13.3.3	Umidade 100-110 °C	44
4.13.3.4	Matéria orgânica total (MO).....	45
4.13.3.5	Concentração de carbono orgânico total (COT), nitritos, nitratos e fosfatos	45
4.13.4	Ensaio de compostagem	45
4.13.4.1	Parâmetros analisados no ensaio de compostagem	46
4.13.4.2	Crescimento celular (UFC).....	46
4.13.4.3	Fosfatase alcalina.....	46
4.14	Definição do consócio microbiano e preparo de formulação de baixo custo	46
4.14.1	Consócio microbiano e preparo do inóculo.....	46
4.14.2	Inoculação do meio para uso em biorremediação de lagoa e monitoramento físico-químico das águas residuárias	47

4.14.2.1 Alcalinidade.....	48
4.14.2.2 Ácidos voláteis	48
4.14.2.3 Cloretos.....	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 Isolamento de bactérias tolerantes a sacarose e seleção de tolerantes a metais potencialmente tóxicos	50
5.2 Caracterização morfo-cultural e bioquímica dos isolados selecionados	51
5.3 Teste de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados selecionados	55
5.4 Efeito dos sais de metais potencialmente tóxicos na atividade da catalase, da citocromo-oxidase e da nitrato-redutase.....	56
5.5 Interação (antagônica ou não) entre os isolados selecionados	57
5.6 Identificação molecular dos isolados selecionados	58
5.7 Bactérias halotolerantes	59
5.8 Bactérias promotoras de crescimento vegetal	60
5.9 Produção de biossurfactantes e bioemulsificantes pelos isolados selecionados	65
5.10 Ação dos isolados selecionados sobre efluentes: sintético (ES) e agroindustrial (EA)	68
5.11 Ação dos isolados selecionados sobre lodo em ensaio de compostagem.....	75
5.12 Definição do consórcio microbiano e crescimento dos microrganismos em meios sintético e de baixo custo.....	79
5.13 Monitoramento da biorremediação de efluentes da estação de Tratamento (ETE) da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, Matriz	83
6 CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS	91
APÊNDICE	110

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma grande extensão territorial, o que facilitou a expansão agroindustrial ao longo dos anos. Por outro lado, esse importante setor empregatício tem superado muitos desafios nos últimos anos, como a adequação da produção de alimentos para o mercado internacional e a redução dos impactos ambientais do processo produtivo, que muitas vezes explora recursos naturais e causa a redução e poluição deste, como nas águas superficiais, subterrâneas e no solo (BARCELLOS, 2009).

A obtenção de açúcar e álcool, por exemplo, envolve a lavagem de muitas toneladas de cana, equipamentos / máquinas e solo, gerando grandes volumes de efluentes ricos em matéria orgânica vegetal, mas também contendo hidrocarbonetos e alguns metais potencialmente tóxicos sobre o ambiente (PEROVANO FILHO et al., 2016).

Metais são elementos que sob determinadas condições biológicas apresentam tendência em existir como cátions, agindo assim como os ácidos de Lewis. Quando encontrados em baixas concentrações, são chamados de traços, sendo alguns essenciais, quando requeridos para completar o ciclo de vida dos organismos, e outros não essenciais, e, por isso, potencialmente tóxicos. O termo antigo “metais pesados” refer-se àqueles que possuem massa atômica maior que 40 (ou número atômico maior que 20), mas esses não necessariamente são tóxicos. Cobre (Cu), zinco (Zn), cobalto (Co) e ferro (Fe), por exemplo, são metais “pesados”, mas são necessários para maioria dos organismos por toda a vida, sendo danosos apenas se suas concentrações excederem (WASEEM et al., 2014). Outros, como cádmio (Cd), mercúrio (Hg) e chumbo (Pb), e o metaloide arsênio (As), causam mudanças indesejáveis na qualidade e equilíbrio dos ecossistemas, e, finalmente, danos aos seres humanos através da cadeia alimentar (CHANAMÉ et al., 2017).

Por outro lado, bioquimicamente, o mecanismo da ação tóxica de um metal deriva principalmente da forte afinidade pelo enxofre do grupo sulfidrila (-SH) das enzimas, e que controlam a velocidade das reações metabólicas, afetando a homeostase dos organismos e podendo, inclusive, ser fatal. Isso é muito comum diante das formas catiônicas (Hg^{2+} , Cr^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} e Cd^{2+}) ou ligadas a cadeias carbônicas curtas. Com seu acúmulo nos organismos, eles podem se acumular (bioacumulação) e até atingir toda a cadeia trófica (biomagnificação), uma vez que não possuem papel biológico e que podem ser mutagênicos e carcinogênicos (TAMÁS et al., 2014).

Os efluentes industriais não tratados, e eventualmente contendo compostos recalcitrantes e/ou metais potencialmente tóxicos, podem ser lançados nos corpos receptores próximos e causar poluição severa das águas subterrâneas e superficiais (JANBANDHU, 2011). Além disso, sob aplicação indiscriminada, fertilizantes químicos utilizados para aumentar a produtividade na agricultura, podem também contaminar tais águas e deteriorar o solo (KHAN, 2000). Assim, é relevante a busca por estratégias que reduzam o impacto ambiental e o uso de fertilizantes químicos, mas que favoreçam a produtividade agrícola.

Muitos métodos de tratamento de efluentes podem ser utilizados, mas as técnicas físico-químicas clássicas apresentam desvantagens em relação ao tipo de efluente gerado pelas agroindústrias, que são muito rico em matéria orgânica e eventualmente contém metais potencialmente tóxicos. A maioria dos métodos de tratamento físico-químicos (adsorção, oxidação química e coagulação/floculação) *per si* não são recomendados para resíduos agrícolas há algum tempo, pois, as taxas de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) /Demanda Química de Oxigênio (DQO) nos mesmos são altas, não garantindo a remoção completa dos contaminantes, além de apresentarem alto custo (HARDMAN; MCELDOWNEY; WAITE, 1993). Nesse caso, o tratamento biológico ou a combinação dele com o físico-químico, têm maior eficiência, transformando os compostos presentes em produtos químicos menos tóxicos (ASHOKA; GEETHA; SULLIA, 2002).

A biorremediação de resíduos da agroindústria é uma alternativa biocompatível, menos onerosa e de fácil adaptação (JOSHI; JAIN; DIXIT, 2017). Com relação aos microrganismos utilizados nessa técnica, Hooda; Bhardwaj; Singh (2015) afirmam que muitos estudos se concentram na aplicação de fungos. Queissada et al. (2013), por exemplo, utilizaram os fungos autóctones *Epicoccum nigrum* e *Cladosporium* sp. em biorreator AIR-LIFIT para tratamento de efluentes de processamento de metais, e compararam com o tratamento utilizando o fungo *Aspergillus niger* como referência, e constataram que *E. nigrum* foi o mais eficiente na redução de DQO (26 %), enquanto o *Cladosporium* sp. foi mais eficiente na descoloração. Por outro lado, Hooda; Bhardwaj; Singh (2015) afirmam que fungos crescem lentamente em efluentes com pH elevado, baixas concentrações de oxigênio e elevados teores de lignina. Já a eficiência bacteriana em degradar poluentes de efluentes diversos tem sido mais explorada com sucesso (KANMANI; ARAVIND; KUMARESAN, 2016; AWASTHI et al. 2015; ZHOU; HAIREN; XIAOWEI, 2014). Assim, o isolamento de microrganismos autóctones

potencialmente degradadores e/ou adsorvedores de distintas moléculas de resíduos industriais, é o primeiro passo para implantar um dos dois tipos de sistemas de biorremediação (bioaumentação ou bioestimulação).

Os microrganismos são os componentes vivos mais antigos do planeta, favorecendo o ciclo de nutrientes dos ecossistemas, incluindo os derivados da urbanização e industrialização, devido à sua grande adaptação a condições desfavoráveis (JIANG et al. 2015). Além disso, podem ter várias interações ecológicas com a microbiota terrestre, podendo colonizar distintas partes das plantas e desempenhar funções específicas (MENDES; GARBEVA; RAAIJIMAKERS, 2013; SILLEN et al. 2015), melhorando a absorção de nutrientes e/ou produzindo substâncias promotoras do crescimento vegetal, como fixação de nitrogênio (KUKLINSKY-SOBRAL et al. 2004), solubilização de fósforo (VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001) e biossíntese de fitohormônio (LUCANGELI; BOTTINI, 1997). São os chamados “Microrganismos Promotores de Crescimento de Plantas” (PGPM) (MISHRA; SUNDARI, 2013).

Esta pesquisa visou isolar e selecionar, em resíduos de uma agroindústria sucroalcooleira, bactérias tolerantes a diferentes concentrações de metais potencialmente tóxicos, gradientes osmóticos e temperaturas, e com habilidade de produzir enzimas degradadoras de glicídios poliméricos, proteínas, lipídios e peróxido, além de interagirem entre si, promoverem o crescimento vegetal e tratarem os efluentes e lodo da lagoa de sedimentação da Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) da agroindústria em estudo, propondo-se um consórcio microbiano com tais isolados identificados molerculamente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Agroindústria de cana-de-açúcar

Devido a importância econômica dos produtos e subprodutos da cana-de-açúcar (*Sacharum sativus* L.), essa cultura destaca-se na agricultura mundial, e considerando-se o crescente interesse por fontes alternativas de combustíveis provenientes de fontes renováveis, como o etanol, aliado às grandes áreas cultiváveis e condições climáticas favoráveis a essa cultura, o Brasil é um país muito promissor para a exportação de tal mercadoria (CONAB, 2017). Dados da safra 2018/2019 evidenciam que para uma área de plantio de 9.049,2 mil hectares, a colheita brasileira foi de 635,51 milhões de toneladas, apresentando um decréscimo de 1,3% em relação à safra anterior, porém, com uma produção de açúcar e etanol respectivamente de 34,25 milhões de toneladas e 19,70 bilhões de litros (MAPA, 2019).

A produção comercial brasileira de cana-de-açúcar iniciou-se em 1533, basicamente visando a extração de açúcar, estendendo-se da região nordeste (Zona da Mata nordestina, especialmente nos Estados de Pernambuco, Alagoas e Bahia) para as demais regiões brasileiras (principalmente no Sudeste, como em São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro), dando origem a agroindústria (FIGUEIREDO, 2008). Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor ficando atrás apenas dos Estados Unidos. Em termos regionais, existem dois períodos distintos de safra da cana-de-açúcar no país - para as regiões Norte/Nordeste, esta ocorre de setembro a março, e para as regiões Centro-Sul a safra vai de abril a novembro, permitindo a produção de açúcar e etanol praticamente o ano inteiro. E apesar da região Nordeste contar a mais tempo com o cultivo de cana-de-açúcar, sua produção sempre foi mais dependente de incentivos dos Estados, em face da aridez da região.

O Estado de Alagoas, por exemplo, apesar de ser o segundo menor em extensão territorial no Brasil, tem sua história atrelada à atividade canavieira - os primeiros engenhos foram fundados em meados do século XVI e a partir daí surgiu o setor industrial sucro-alcooleiro que ampliaria a produção, sendo atualmente o maior produtor regional, apesar da redução na área plantada, visto as sérias dificuldades financeiras dos plantadores (CONAB, 2017). No entanto, este setor também é conhecido pela geração de grandes volumes de resíduos e, independente da sua importância econômica, vem sendo objeto de críticas relacionadas a tais impactos ambientais (REBELATO; MADALENO; RODRIGUES, 2013).

Na produção do etanol e do açúcar são gerados resíduos como a vinhaça, o bagaço, a torta de filtro, efluentes de lavagem de cana, de pisos e equipamentos, os quais podem causar danos irreversíveis ao meio ambiente. Além disso, o processo produtivo utiliza volumes abundantes de água como matéria-prima. Dessa forma, em bacias hidrográficas onde a disponibilidade hídrica é baixa, pode acontecer uma competição por esse recurso, principalmente em regiões em que a cana necessita de irrigação (ANA, 2017). Elia Neto (2009) relata que a etapa que utiliza mais água no processo industrial, e que por isso gera mais resíduo líquido (efluente), com alto potencial poluidor, é a da lavagem da cana (27% de toda a água da usina). Segundo Elia Neto; Shintaku (2009), a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) desse resíduo varia entre 180 e 500 mg.L⁻¹, com uma alta concentração de sólidos suspensos, provenientes da terra que é agregada na hora da colheita, pH entre 5 e 6 e Demanda Química de Oxigênio (DQO) entre 280 e 700 mg.L⁻¹. Por outro lado, o efluente oriundo das colunas barométricas apresenta pH entre 6 e 7, DBO entre 10 e 40 mg.L⁻¹ e uma DQO entre 20 e 80 mg.L⁻¹. O tratamento para esse efluente é a decantação em lagoas de estabilização, as quais geram lodo, caracterizado por altas concentrações de matéria orgânica e sólidos.

Segundo Jendiroba (2006), a indústria canavieira necessita desenvolver métodos que retirem os resíduos gerados das unidades industriais, pois não teria como armazená-los, principalmente nos períodos de produção. Além disso, se esses resíduos não são bem gerenciados, os ricos ambientais são bem maiores. Por outro lado, quando bem utilizados, os custos de produção diminuem e o conceito da empresa melhora significativamente, o que favorece a implantação de um sistema de gestão ambiental (VILAÇA, 2012). Por isso, é de extrema importância a busca por alternativas que visem tratar esses resíduos, para que os mesmos possam ser lançados no ambiente sem causar danos.

2.2 Tratamentos de resíduos industriais e importância de enzimas microbianas

Atualmente, toda indústria geradora de água residuária deve, por força inclusive da lei, adotar um sistema de tratamento a fim de proteger o ambiente. Para que seja possível escolher o sistema ideal de tratamento, o qual depende da composição, concentração e do escoamento do efluente, é preciso caracterizar esses resíduos (GUARATINI; ZANONI, 2000; NUNES, 2004). Dentre os tipos de tratamento disponíveis estão os físicos, químicos e biológicos (**Tabela 1**).

Tabela 1- Diferentes tipos de tratamento de resíduos industriais. Fonte: Autor, 2018.

Métodos físico-químicos			
Tratamento Aplicado	Resíduo industrial	Eficiência	Referências
Floculação	Efluente da fabricação de batata frita	A redução no tamanho dos flocos foi alcançada	LOURENÇO et al. 2018
Eletro-fento e lodo ativado	Efluente farmacêutico sintético e industrial	A biodegradabilidade foi melhorada	MANSOUR et al. 2015
Enzimático	Efluente com corante têxtil	Remoção 50% DQO	PAZ et al. 2017
Pirólise	Lodo de ETE de polpa e papelaria	Redução dos metais potencialmente tóxicos presentes	DEVI; SAROHA, 2014
Tratamento com ultrassom, e oxidação por K_2FeO_4 e $KMnO_4$	Lodo de esgoto doméstico	Ultra-som deteriorou a desidratação do lodo, enquanto a oxidação com K_2FeO_4 e $KMnO_4$ melhorou a desidratação	JIN; ZHANG; ZHENG, 2015
Fenton com biofiltração	Águas residuais de adegas	Remoção 90% DQO	PIPOLO et al. 2017
Métodos Biológicos			
Lodo ativado	Efluente de curtume	Remoção 80% DQO	HAYDAR; AZIZ; AHMAD, 2007
<i>Wetland</i>	Efluente da suinocultura	Remoção 98,4% DQO	SANTOS et al. 2016
Reator UASB	Efluente de aves e suinocultura	Remoção 97,6% DQO	SANTOS et al. 2017
Reator UASB	Efluente da produção de castanha doce	Remoção 82% DQO	MARTINS; BOAVENTURA; PAULISTA, 2017
Leitos de secagem	Lodo de esgoto doméstico	Níveis aceitáveis de nutrientes, metais potencialmente tóxicos e relação C/N	SANTOS et al. 2016
Compostagem	Lodo de esgoto	A fertilidade do solo aumentou.	GUERRINI et al. 2017
Compostagem	Resíduo sólido de frigorífico	A estabilização do material ocorreu	COSTA et al. 2009
Reator UASB	Águas residuais da destilaria de etanol	Remoção 79% DQO	FITO et al. 2018

Métodos físico-químicos removem muitos poluentes orgânicos recalcitrantes, de degradação difícil por métodos biológicos convencionais, porém, o custo com reagentes é alto, a eficiência na remoção da DBO/DQO dissolvidas é baixa (MELLO, 2007), e, devido à geração de subprodutos, podem causar danos ao meio ambiente. Por sua vez, a biorremediação remove boa parte da matéria orgânica (**Tabela 2**) e até inorgânica, podendo ocorrer por aerobiose, anaerobiose ou ambas (FARRUGIA, 2012), e é indicada quando a relação DQO/DBO for $\leq 2,5$ (VON SPERLING, 1996). É promissora e conta com o estímulo a microrganismos autóctones ou introdução de novos (HAKEEM, 2015).

Tabela 2- Microrganismos usados em biorremediação de diferentes resíduos industriais. Fonte: Autor, 2018.

Resíduos	Microrganismos	Eficiência	Referências
Água residuais da indústria papelreira	<i>Bacillus stratosphericus</i>	Redução de cor (47%), DQO (73%) e lignina (33%).	JOSHI; JAIN; DIXIT, 2017.
Água residuais da indústria de mineração	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Capacidade de acumular metais.	EL-AZIZ; EL-SAYED; EL-GHANY, 2016.
Águas residuais petroquímicas contendo BTEX	<i>Comamonas</i> sp.	Maior atividade de biodegradação.	JIANG et al. 2015.
Água residuais da indústria têxtil	<i>Actinomyces</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Stenotrophomonas</i> sp. e <i>Staphylococcus</i> sp.	Degradação completa de corante têxtil.	RAJENDRAN et al. 2015.
Águas residuais contaminadas com DPA	<i>P. putida</i>	Diminui níveis de DPA com formação transitória de anilina e catecol.	PERRUCHON et al. 2015.
Águas residuais de esgoto municipal	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>P. putida</i> , <i>Bacillus cereus</i>	Removeu NO ₃ (29,4%), NH ₃ (4,2%) e PO ₄ (8,4%).	GÓMEZ-GUZMÁN et al. 2017.
Lodo contaminado com hidrocarbonetos	<i>Stenotrophomonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bordetella</i> , <i>Brucella</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Ochrobactrum</i> , <i>Advenella</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pusillimonas</i> e <i>Raoultella</i>	Eficiência na degradação de 2,6-diclorofenol-indofenol.	OBI; ATAGANA; ADELEKE, 2016.
Solo contaminado com hidrocarbonetos	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. cibi</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>B. cereus</i> .	Degradação de TPH presente em lodo.	CERQUEIRA et al. 2014.

A biorremediação consiste, portanto, na transformação (conversão) ou eliminação dos poluentes orgânicos por ação catabólica dos microrganismos, isto é, as substâncias potencialmente tóxicas ao ambiente atuam como fontes de carbono, nitrogênio, oxigênio, enxofre e fósforo. É um processo simples, passível de realização *in situ* (no local original da contaminação) ou *ex situ* (fora do local contaminado) (**Tabela 3**), de custo relativamente baixo e que conduz à total mineralização (metabolismo e co-metabolismo), sendo eficiente em meios homogêneos e de textura arenosa, além de poder ser associado a outros métodos de tratamento (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010; MACHADO, 2006; SEABRA, 2008).

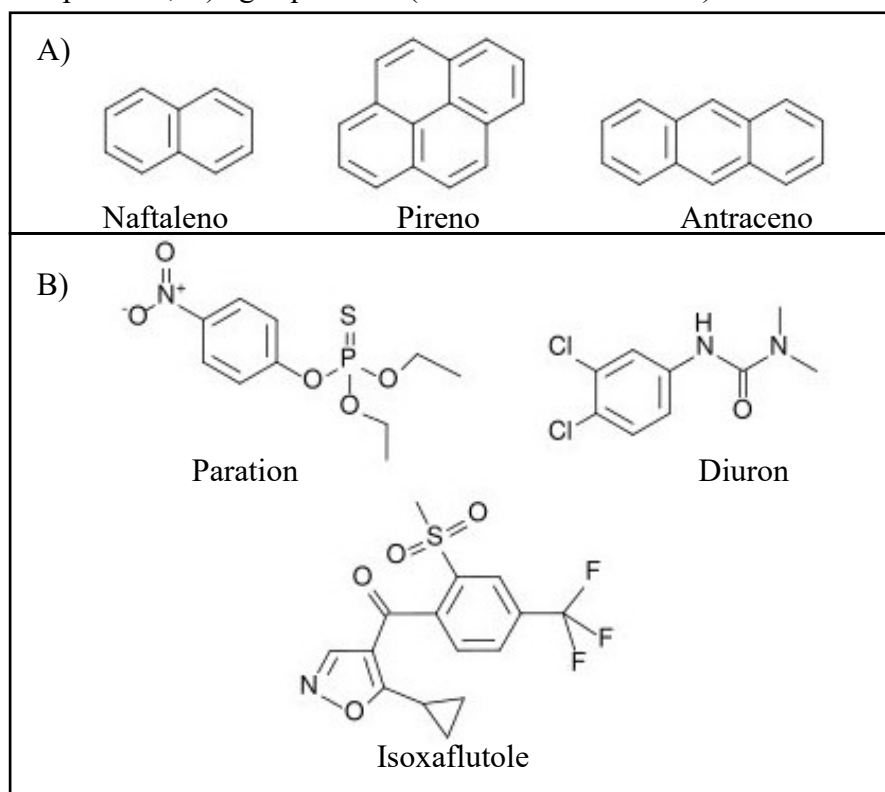
Tabela 3- Tipos de biorremediação e suas principais características. Fonte: Autor, 2018.

Tipos	Aplicação	Características	Referências
Atenuação natural	<i>In situ</i>	Diluição, dispersão, degradação química e biológica dos contaminantes do solo e água subterrânea. Limita o deslocamento do contaminante e, minimiza a contaminação do meio ambiente.	PEREIRA et al. 2012
Bioaugmentação	<i>In situ</i>	Inoculação de microrganismos com alto potencial em degradar um material contaminado.	MARIANO, 2006
Bioestimulação	<i>In situ</i>	Suplementação com nutrientes orgânicos e inorgânicos para estimular a atividade microbiana autóctone para degradar poluente.	JACQUES et al. 2007
Fitorremediação	<i>In situ</i>	Utilização de plantas capazes de absorver elementos com teores excessivos de metais e outros elementos potencialmente tóxicos, para descontaminação.	SOUZA et al. 2011
<i>Landfarming</i>	<i>In situ</i>	Remoção biológica dos resíduos contaminados. Geralmente utiliza oxigênio do ar, para estimular o crescimento bacteriano.	MAILA; CLOETE, 2004
Compostagem	<i>Ex situ</i>	Processo de decomposição controlada por ação dos microrganismos, com oxidação e oxigenação de matéria orgânica no estado sólido e úmido.	KIEHL, 2012
Biorreatores	<i>Ex situ</i>	Produção de reações químicas com biocatalisadores para aumentar a disponibilidade dos contaminantes aos microrganismos degradadores.	SCHMIDEL; FACCIOTTI, 2001

Considerando-se que em um ambiente contaminado existem diferentes poluentes, é interessante estudar a biorremediação não somente pelo viés metabólico de um único

microrganismo, mas na ação de um consórcio deles. Para isso, a escolha destes depende da natureza química dos contaminantes que, uma vez tratados, podem ser descartados ou reutilizados (THAPA, 2012). São vários os compostos biodegradáveis, como hidrocarbonetos derivados de petróleo, preservantes de madeira, solventes halogenados e agroquímicos ou “defensivos agrícolas” (**Figura 1**) (DEON et al. 2012). Contudo, o período de operação de métodos biológicos diante de compostos extremamente recalcitrantes ou inibitórios aos microrganismos pode ser estendido (em geral, mais tempo do que nos métodos físico-químicos) (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010; MACHADO, 2006).

Figura 1- Fórmula estrutural de alguns compostos biodegradáveis. A) hidrocarbonetos derivados do petróleo; B) agroquímicos (inseticida e herbicidas).



Fonte: DEON et al. 2012

Dentre os tipos de biorremediação com uso de microrganismos, a bioaugmentação e a compostagem são alternativas promissoras para melhorar a eficiência de remoção de resíduos em estações de tratamento de efluentes. Se microrganismos nativos são utilizados, pode ocorrer aumento de sua resistência e atividade (GENTRY; RENSING; PEPPER, 2004; TYAGI; FONSECA; CARVALHO, 2011), sendo uma estratégia vantajosa em relação a outras técnicas de biorremediação, pois a remoção dos

contaminantes começa assim que eles forem re-introduzidos ou estimulados a se multiplicarem (PEROVANO FILHO et al., 2016; RUFFINI et al. 2016). Por outro lado, microrganismos exógenos podem ser inibidos por condições específicas (temperatura, pH, etc.), dificultando o processo de biorremediação.

A compostagem, por outro lado, resulta da decomposição biológica aeróbica e da estabilização dos substratos orgânicos, em condições de temperaturas termofílicas, afim de obter um substrato final estabilizado e isento de agentes patogênicos, antes de sua aplicação (BERTRAN et al. 2004). Devido às suas características, é um dos métodos mais aplicados na gestão de resíduos orgânicos, especialmente em lodo de esgoto (WU et al. 2015), o qual é caracterizado por baixo teor de carbono, o que diminui o metabolismo microbiano (NEUGEBAUER et al. 2016).

Vários gêneros de microrganismos, portanto, estão adaptados ao crescimento e sobrevivência em solos, serrapilheiras e efluentes contaminados com xenobióticos, participando, em geral, nos processos de acumulação ou degradação dos mesmos por metabolismo ou co-metabolismo (PEROVANO FILHO; SILVA, LÓPEZ, 2011a,2011b; SILVA et al., 2014).

Uma compreensão mais abrangente das rotas degradativas requer estudos aprofundados, visto que a maioria visa apenas a remoção de um composto particular, negligenciando os metabólitos oriundos deste e o seu destino no ambiente (PORTO et al. 2011; PEROVANO FILHO et al., 2016), bem como sua relação com este (AISLABIE e LLOYD-JONES 1995). Em outras palavras, a biodegradação/biomineralização é frequentemente complexa e envolve uma série de compostos secretados, como biosurfactantes (SILVA et al., 2016), e reações bioquímicas, e, portanto, várias enzimas e genes responsáveis pela transcrição das mesmas (SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2016; LÓPEZ; SILVA; SANTOS, 2017). Muitos desses já foram identificados e caracterizados em diferentes microrganismos, que atualmente podem inclusive ser transformados geneticamente em laboratório para aumentar a expressão de tais enzimas que passaram a ter, cada vez mais, utilização em processos biotecnológicos de diferentes setores, seja por produção em batelada, por imobilização de células ou até por imobilização das próprias enzimas em nanopartículas, nas indústrias de alimentos, bebidas e fármacos, às de produção de sondas para diagnóstico, têxteis, de detergentes, tintas, rações animais e até para emprego direto no meio ambiente (CABERA e BLAMEY, 2018; ANSARI e AL-SHAERI, 2019). Portanto, as enzimas secretadas pelos

microrganismos isolados podem atuar em uma série de processos, principalmente aqueles de desprendimento das moléculas recalcitrantes das partículas do solo, de lodo, de efluentes, e, então de sua decomposição.

Além disso, alguns aspectos fisiológicos, ecológicos, bioquímicos e moleculares desempenham um papel importante na transformação microbiana dos poluentes (IRANZO et al. 2001; VISCHETTI et al. 2002), que é executada pela necessidade energética ou de detoxificação, ou pelo cometabolismo (PAUL et al. 2005). Esses caminhos dependem tanto da acessibilidade quanto da disponibilidade dos mesmos aos microrganismos (RAMAKRISHNAN et al. 2011).

2.3 Reúso de resíduos agroindustriais

O reúso de efluentes implica em reciclar ou recuperar águas servidas e com grau de tratamento variado (AZOV; JUANICO; SHELEF, 1992). Há relatos de que em meados do século XIX, na Inglaterra, já existiam fazendas com esgotos estocados para tratar o solo (FOLEGATTI, 1999). Segundo Bernardi (2003), mesmo sendo uma prática antiga, o reúso de águas residuais ainda sofre muita resistência da população. As modalidades de reúso são: urbano, industrial, paisagístico, agrícola, doméstico, recreacional, recarga de aquíferos e reúso na aquicultura e pesca (BERTONCINI et al. 2008).

Segundo Castanho Filho; Campos; Olivette (2015), ainda que a agricultura represente um dos setores que mais consome água, também apresenta grande capacidade de reúso de efluentes, embora deva investir em tecnologia. O reúso de efluente com altas concentrações de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK), por exemplo, apresenta vantagens não só por diminuir o uso direto de recursos hídricos, mas por contribuir na nutrição do solo, melhorando sua fertilidade e reduzindo o custo com adubação (SOUZA et al. 2012; PEROVANO FILHO et al., 2016; LÓPEZ; SILVA; SANTOS, 2017). Dados do IBGE (2012) mostram que a quantidade de fertilizantes por área plantada no Brasil tem aumentado. Em 1992 era de 70 kg.ha⁻¹, já em 2010 passou para 150 kg.ha⁻¹ (IBGE, 2012). Porém, Lima et al. (2012) alertam que diferentes efluentes possuem características que podem prejudicar a fertilidade do solo, de modo que o devido tratamento para cada tipo de esgoto e resíduos sólidos é requerido.

O lodo é um resíduo sólido gerado no tratamento primário de efluentes e apresenta diferentes características e composições (conforme o tipo e quantidade de resíduo líquido

original); necessita, portanto, de tratamento igualmente específico para reúso ou disposição final (MATTA, 2011). A destinação final do lodo pode ser para a incineração, disposição em aterro sanitário, recuperação de áreas degradadas, *landfarming*, disposição oceânica, conversão em óleo combustível e uso agrícola do lodo de esgoto.

A disposição de esgotos na agricultura é uma atividade antiga, praticada em países como a China, Inglaterra (1800) e Rússia (desde 1560). De acordo com Bettiol; Camargo; Berton (2015), a utilização do lodo de esgoto em solos favorece a incorporação de macronutrientes (nitrogênio e fósforo) e micronutrientes (zinco, cobre, ferro, manganês e molibdênio), mas no Brasil esta atividade ainda é pouco utilizada devido a estudos da variabilidade de efeitos e nutrientes ainda se fazerem requeridos.

Segundo Guedes et al. (2006), ao se utilizar o lodo como biofertilizante o produtor obtém ganhos, pois a produtividade das culturas aumenta e a redução do uso de fertilizantes minerais diminui. Mesmo apresentando algumas desvantagens, a aplicação de lodo de esgoto na agricultura mostra vários benefícios, tais como a redução de custos, a conservação do ambiente e das características físico-químicas do solo (QUINTANA; CARMO; MELO, 2011). Portanto, é necessária uma rigorosa regulamentação para a aplicação desse resíduo, além de estudos que determinem quais riscos ambientais podem ocasionar a curto e longo prazos considerando os metais potencialmente tóxicos que eventualmente possam estar presentes.

No Brasil, a resolução que trata dos parâmetros para lançamento de efluentes é a Resolução CONAMA 357/2005, complementada e alterada pela resolução CONAMA 430/2011 (BRASIL, 2011), que estabelece limites de parâmetros físicos e químicos de lançamento de efluentes e que os mesmos não devem causar ou possuir efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor. Assim, os testes de ecotoxicidade devem utilizar organismos aquáticos, sendo que os critérios para tais devem ser estabelecidos pelos órgãos estaduais competentes (BRASIL, 2011). No entanto, a disposição de efluentes no solo, mesmo tratados, não está sujeita aos parâmetros e padrões de lançamento dispostos nesta Resolução, não podendo, todavia, causar poluição ou contaminação das águas superficiais e subterrâneas. Em 2003, por meio do Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH), a legislação brasileira elaborou minuta de resolução similar às recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS), a qual incentivava a utilização da água de reúso e os padrões de qualidade de acordo com cada modalidade, mas tal resolução não entrou em vigor. No ano de 2005 o CNRH lançou a

Resolução nº 54, a qual incentiva a prática de reúso, mas não estabelece parâmetros específicos para sua utilização (BRASIL, 2005). Em 2010, o mesmo CNRH criou a Resolução nº 121, que trata das diretrizes e critérios para a prática de reúso direto não potável de água na modalidade agrícola e florestal. Essas águas devem atender padrões estabelecidos pelas legislações pertinentes, no tocante a saúde pública e aos valores de prevenção de contaminação do solo e das águas subterrâneas (BRASIL, 2010). Portanto, no Brasil, e em vários outros países, não existe legislação específica que estabeleça padrões de controle da qualidade da água de reúso. Pesquisas que evidenciem os valores seguros de aplicação, para cada cultura e quais os danos que os contaminantes poderiam causar no solo, água e na planta são necessárias. Atualmente os critérios adotados são os estabelecidos pela *United State Environment Protection Agency* (USEPA) e pela OMS, que em parceria com a *United Nations Environment Programme* (UNEP), lançou a IV edição da “Guia de Uso de Águas Residuárias na Agricultura”.

O Estado de Alagoas, por meio da Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos (SEMARH), não estabelece parâmetros para o reúso e nem lançamento de efluentes. Assim, os parâmetros adotados são aqueles estabelecidos pela resolução CONAMA 430/2011.

Com relação ao lodo de esgoto, a regulamentação para aplicação agrícola existe em vários países. Nos Estados Unidos, o órgão responsável pelo controle de impactos ambientais, é a USEPA, que desenvolveu normas regulamentando o uso e disposição segura desse lodo, incluindo o uso agrícola. No Brasil, a aplicação desse resíduo em solo agrícola é regulamentada pela Resolução CONAMA nº 375/06, a qual define critérios e procedimentos para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Isolar e selecionar em efluentes e lodo de lagoa de sedimentação da Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) da agroindústria, bactérias tolerantes a gradiente osmótico, sais de metais potencialmente tóxicos, temperaturas e com potencial para produzir enzimas degradadoras de glicídios poliméricos, proteínas, lipídios e peróxido, além de interagirem entre si, promoverem o crescimento vegetal e tratarem resíduos agroindustriais.

3.2 Objetivos específicos

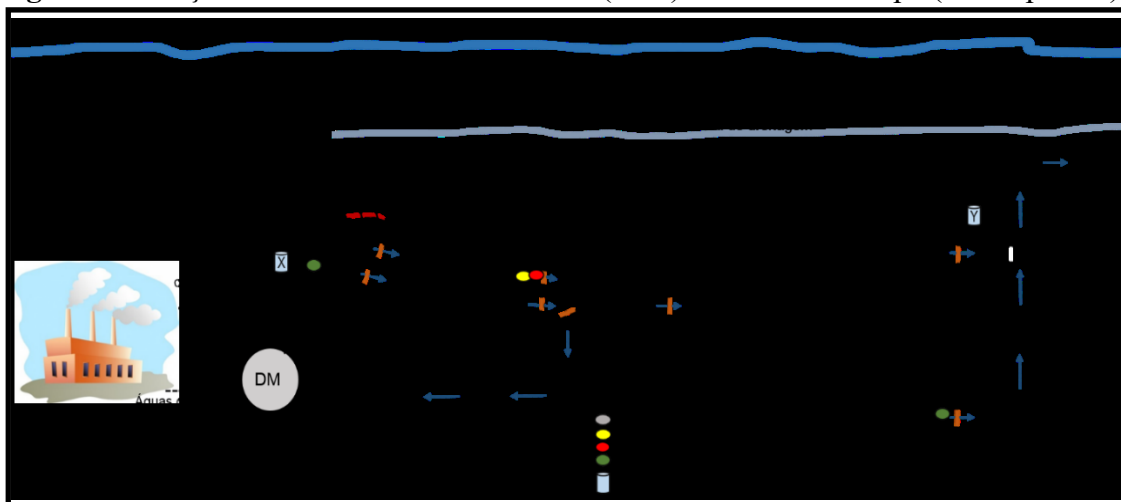
- Isolar microrganismos saprofiticos de efluente e lodo da lagoa de sedimentação da ETE tolerantes a sacarose.
- Selecionar bactérias tolerantes a alguns sais de metais potencialmente tóxicos (Cu, Ni, Cd, Zn, Pb, Co, Mn, Cr e Hg), determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) desses metais.
- Realizar a caracterização morfo-cultural, bioquímica e molecular das bactérias selecionadas.
- Avaliar a susceptibilidade antimicrobiana das bactérias selecionadas.
- Avaliar o efeito dos sais de metais potencialmente tóxicos na atividade da catalase, citrato-oxidase e nitrato-redutase dos isolados tolerantes a eles.
- Verificar *in vitro* se as bactérias selecionadas toleram diferentes concentrações de NaCl.
- Verificar *in vitro* se as bactérias selecionadas são promotoras de crescimento vegetal.
- Verificar se as bactérias selecionadas têm potencial para secretarem biossurfactantes.
- Caracterizar (físico-quimicamente) o efluente e o lodo residual da lagoa de sedimentação da ETE da agroindústria em estudo.
- Realizar o biotratamento em escala piloto e avaliar o seu efeito através de testes ecotoxicológicos.
- Propor uma formulação de baixo custo que vise estender a aplicação do consórcio microbiano em condições de campo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

A amostragem ocorreu em dezembro/2015 na entrada da lagoa de sedimentação A da Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) (Figura 2) da S. A. “Usina Coruripe Açúcar e Álcool”, uma agroindústria sediada no Nordeste do Brasil. Para coleta de efluente (1 L) e lodo (500 g), foram utilizados amostradores descartáveis. Os resíduos foram transferidos para frascos de polietileno (previamente esterilizados), etiquetados e transferidos sob refrigeração para o Laboratório de Bioquímica de Parasitismo e Microbiologia Ambiental (LBPMA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL, Maceió, Alagoas).

Figura 2- Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) da Usina Coruripe (Coruripe-AL).



Fonte: Autor, 2016.

4.2 Isolamento de bactérias tolerantes a sacarose

Amostras de efluente (1 mL) e lodo (1 g) da lagoa de sedimentação A foram diluídas/suspensas em frascos contendo 99 mL de água destilada estéril (SILVA, 1996) e submetidas à agitação orbital (160 rpm, 30 ± 1 °C em incubadora ShellLab, modelo SSI3-2) por 15 min. As diluições em série (de 10^{-1} a 10^{-4}) foram realizadas usando água destilada estéril. Para cada diluição, alíquotas de 100 μ L foram coletadas para inoculação em placa de Petri contendo meio ágar caldo de cana 25% (sacarose = $6,25 \text{ g.L}^{-1}$) e incubadas por 24 h (30 ± 1 °C, escuro). As colônias bacterianas, com aspecto distinto, foram transferidas para de ágar nutriente (AN) e incubadas por 24 h (30 ± 1 °C, escuro), e cada uma recebeu uma codificação baseada no tipo de resíduo de origem (“EF” do efluente ou “LO” do lodo). A cada 60 dias, foram realizados novos cultivos para a

adequada manutenção bacteriana, os quais foram armazenados em geladeira a 4 °C. As colônias bacterianas isoladas foram submetidas ao teste de tolerância a metais potencialmente tóxicos.

4.3 Seleção de bactérias tolerantes a sais de metais potencialmente tóxicos

Este teste foi adaptado de Malik; Jaiswal (2000), onde foram utilizados nove sais de metais potencialmente tóxicos nas seguintes concentrações (mM): CuSO₄ (0,020, 0,313, 1,253, 2,506, 5,012, 10,04, 20,049); NiSO₄ 6H₂O (0,012, 0,023, 0,046, 0,095, 0,190) CdSO₄. 8/3H₂O (0,004, 0,032, 0,065, 0,130, 0,520); ZnSO₄.7H₂O (0,003, 0,010, 0,022, 0,044, 0,087); PbCl₂ (0,012, 0,022, 0,043, 0,090, 1,438, 5,753, 11,507); CoSO₄.7H₂O (0,021, 0,077, 1,290, 2,590, 5,161, 7,742) MnSO₄. H₂O (0,021, 0,079, 0,166, 2,649, 5,298, 10,596); K₂CrO₄ (0,016, 0,257, 0,515, 2,060, 4,120, 8,239) e HgCl₂ (0,012, 0,022, 0,044, 0,092, 0,184). As culturas em placas de Petri foram incubadas durante 24 h (30 ± 1 °C, escuro), e o perfil de tolerância de cada bactéria nas diferentes concentrações individuais de sais de metais potencialmente tóxicos foi avaliado. Bactérias que toleraram maiores concentrações foram submetidas à caracterização bioquímica, interação antagônica, sensibilidade aos antibióticos, efeito dos metais na atividade enzimática e identificação molecular.

4.4 Caracterização morfo-cultural e bioquímica das bactérias selecionadas

Os isolados bacterianos foram caracterizados pela observação da morfologia de suas colônias (forma, elevação, cor, estrutura e brilho), coloração de Gram (forma celular e composição da parede), coloração de Verde-Malaquita (para detecção de esporos) e tolerância a NaCl (3 %). Também foram verificadas suas respostas às análises bioquímicas Três Glicídios-Ferro (TSI) e Oxidação-fermentação (OF); além dos testes de produção das enzimas catalase, oxidase e nitrato redutase (SILVA, 1996). Também foram realizadas diferentes provas bioquímicas utilizando sistema de galeria API[®] ZYM (de acordo com as instruções do fabricante BioMerieux, Inc., França). A atividade de enzimas extracelulares como lipase (SLIFINK, 2000), xilanase (FERREIRA et al. 2002) amilase (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975) e protease (KJOLLER; STRUWE, 1979) também foram investigadas para degradação de ésteres, carboidratos poliméricos e proteínas. Para verificar a capacidade de crescimento dos microrganismos sob altas temperaturas, estes foram transferidos para placas de Petri contendo AN e incubados a (55 e 85 ± 1 °C, escuro) durante 48 h. As cepas foram identificadas como descrito no *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (BERGEY; HOLT, 2000).

4.5 Teste de susceptibilidade antimicrobiana das bactérias selecionadas

Os isolados selecionados foram testados quanto à susceptibilidade a agentes antimicrobianos pelo método de difusão em disco (PEREZ; PAULI; BAZEVIQUE, 1990). Os antibióticos utilizados foram a amicacina (liga-se às subunidades ribossômicas 30S bacterianas e interfere na ligação de mRNA e sítios receptores tRNA, interferindo no crescimento bacteriano), norfloxacin (inibe a síntese de ácido desoxirribonucleico bacteriano e é bactericida) e tetraciclina (inibe a síntese proteica impedindo a ligação de aminoacil-tRNA ao ribossomo). Os isolados selecionados foram cultivados em AN a 35 ± 1 °C por 24 h antes da detecção da atividade antimicrobiana. Após este período, suspensões foram preparadas (10^6 células.mL⁻¹) e inoculadas pelo método *pourplate* em ágar Mueller-Hinton em placas de Petri. Discos de agentes antimicrobianos de amplo espectro (30 µg de amicacina, 10 µg de norfloxacin e 30 µg de tetraciclina) foram colocados assepticamente no meio ágar. Após incubação das placas a 30 ± 1 °C por 24 h, o diâmetro (em mm) das zonas transparentes resultantes, se houver, foi registrado.

4.6. Efeito dos sais de metais potencialmente tóxicos na atividade da catalase, citocromo-oxidase e da nitrato-redutase

A interferência de metais na expressão de algumas enzimas dos isolados tolerantes a sais de metais foi avaliada qualitativamente pelos testes de catalase, citocromo-oxidase e nitrato-redutase (SILVA, 1996). Para isso, a maior concentração tolerada pelos isolados individualmente a cada sal de metal testado foi utilizada para suplementar o meio de cultivo em AN. Como controle, as linhagens foram cultivadas em AN na ausência do sal de metal. As culturas foram incubadas a 30 ± 1 °C por 24 h, sendo os testes realizados em triplicata.

4.7 Interação (antagonismo ou não) entre as bactérias selecionadas

Os isolados selecionados foram testados quanto ao antagonismo com base no método de BAUER et al. (1966) para verificar a ocorrência de antibiose. Para isso, alíquotas de 100 µL dos cultivos de 24 h (1×10^6 células.mL⁻¹) foram inoculadas separadamente em meio AN estéril, numa temperatura de 30 °C e vertidos em placa de petri estéril de 9 cm de diâmetro. As placas foram incubadas em refrigerador (4 ± 2 °C, por 24 h). Em seguida, blocos de ágar ($\varnothing = 5$ mm), contendo cada isolado já crescido a ser testado, foram transferidos para as placas dos microrganismos teste e dispostos invertidos em posições equidistantes. As placas foram incubadas a 30 ± 1 °C, por 24 h. Após o período de incubação foi verificada a ocorrência ou não da formação de halos de

inibição em torno de cada bloco, indicando ocorrência ou não de antagonismo. A tetraciclina foi usada como um antibiótico de controle positivo.

4.8 Identificação molecular das bactérias selecionadas

Para uma identificação mais precisa, a extração de DNA dos isolados selecionados foi realizada utilizando culturas de 24h (30 ± 2 °C, 150 rpm) em Caldo Nutriente (CN). O *kit* de extração de DNA genômico bacteriano (Norgen Biotek®) foi usado de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada utilizando os *primers* desenhados por WINSLEY et al. (2012) 356F (ACWCCTACGGGWGGCWGC) e 1064R (AYCTCACGRCACGAGCTGAC). A mistura para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) continha os seguintes componentes (volume final de 25 µL): 100 µg de DNA genômico, 10 pmol de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 0,8 mM dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, 10× tampão de reação (25 µL), 5 µg de BSA e 1 µL de Taq polimerase. As condições de PCR foram: desnaturação inicial por 5 min a 95 °C e depois 35 ciclos de 30s a 95 °C para desnaturação, 30s a 60 °C para anelamento, 1 min a 72 °C para extensão e 5 min a 72 °C para extensão final. O DNA amplificado foi visualizado com o auxílio do transiluminador Spectroline®. A radiação ultravioleta (UV) foi emitida diretamente em gel de agarose a 2% em tampão TBE (Tris-Borate-EDTA) corado com brometo de etídio (0,5 µg.mL⁻¹). Uma escala de 100 pb (Amresco®) foi usada para comparação. Os *amplicons* foram sequenciados utilizando-se a Plataforma de Sequenciamento de DNA da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil), através do método Sanger em Genetic Analyzer da Applied Biosystems® ABI 3500 × L (Life Technologies). As condições para a reação de sequenciamento foram: 95 °C (10s), 51 °C (5s) e 60 °C (4 min). As sequências foram editadas, convertidas para o formato FASTA e comparadas com outras presentes no NCBI (Centro Nacional de Informações Biotecnológicas) e no RDP (*Ribosomal Database Project*). Os alinhamentos foram realizados usando o *software* MUSCLE (EDGAR, 2004), sendo o dendrograma criado usando o *software* Tree Dyn (CHEVENET et al. 2006) e em seguida as sequências foram depositadas no GenBank (NCBI).

4.9 Bactérias halotolerantes

Os isolados selecionados e identificados foram avaliados quanto à concentração máxima tolerada (CMT) de cloreto de sódio. A concentração foi determinada após o cultivo das bactérias em placas de Petri contendo AN com diferentes concentrações de

NaCl (3%, 5%, 10%, 15% e 30%). Após 48h ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, escuro), foi analisado se as bactérias cresceram (+) ou não (-) nesses meios.

4.10 Bactérias promotoras de crescimento vegetal

4.10.1 Solubilização de CaHPO_4 *in vitro*

Cinco isolados bacterianos, selecionados e identificados, foram avaliados quanto à capacidade de solubilizar fósforo de acordo com a metodologia de Nautyal (1999) com modificações, em meio desenvolvido no Instituto Nacional de Pesquisas Botânicas (NBRIP), com a seguinte composição (g ou mL.L^{-1}): glicose, 10,0; $\text{MgCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$, 5,0; $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$, 0,25; KCl, 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1; solução aquosa de K_2HPO_4 (10%), 50; solução aquosa de CaCl_2 (10%), 100; ágar, 15 e água destilada, 850. Após esterilização (120, 1 atm, 15 min), o meio foi vertido em placas de Petri, solidificado e inoculado utilizando 10 μl de suspensão bacteriana contendo 1×10^6 células. mL^{-1} . As culturas foram incubadas por 7 dias ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro) e os isolados que produziram um halo claro ao redor da colônia foram considerados capazes de solubilizar a forma de fosfato (o precipitado era fosfato de cálcio, CaHPO_4).

Para o ensaio quantitativo, alíquotas (100 μl) das suspensões bacterianas ($1,5 \times 10^8$ células. mL^{-1}) foram inoculadas em meio caldo Nautyal (NBRIP) (50 mL), que exceto pela ausência de ágar contém a mesma composição do NBRIP sólido. A estimativa quantitativa da solubilização de fosfato (que permaneceu em solução após a precipitação de CaHPO_4), foi realizada em triplicata, utilizando o *kit* comercial Labtest®, conforme instruído pelo fabricante. O teste consiste na reação dos íons fosfato com o molibdênio em meio ácido, formando um complexo amarelo, que com a ação de um tampão alcalino é reduzido a azul-molibdênio, cuja absorvância é medida espectrofotometricamente a 650nm. O pH do meio foi monitorado após 7 dias de incubação ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, 120 rpm).

4.10.2 Determinação do pH

As amostras das culturas foram centrifugadas (20 min, $9000 \times g$ a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, em centrífuga Sigma, 2K15) e seus sobrenadantes tiveram os valores de pH medidos por meio de pHmetro previamente calibrado com soluções-tampão.

4.10.3 Determinação da fixação de nitrogênio

A possível fixação de nitrogênio pelos isolados selecionados (culturas de 24 h em AN) foi avaliada pelo método descrito por Jensen (1942). Para isso, os isolados foram inoculados em meio sólido Jensen esterilizado composto por (g.L^{-1}): $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, 20,0; K_2HPO_4 , 1,0; MgSO_4 , 0,5; NaCl, 0,5; FeSO_4 , 0,1; Na_2MoO_4 , 0,005; CaCO_3 , 2,0; ágar,

15; e água destilada. O teste foi positivo quando houve crescimento após 8 dias de incubação (30 ± 1 °C, escuro).

4.10.4 Produção de Ácido Indol Acético (AIA)

A técnica *in vitro* de produção de AIA fornece uma base para o teste de Promoção de Crescimento Vegetal por Microrganismos (PGPM) e pode ser usada para testes futuros em condições naturais. Essa produção foi avaliada por métodos qualitativos e quantitativos. Para o primeiro, o meio esterilizado TSA (triptona soja ágar) a 10% contendo triptofano ($1,021 \text{ g.L}^{-1}$), em placas de Petri, foi inoculado individualmente com os isolados bacterianos selecionados, cobertas com membrana de nitrocelulose estéril e incubado por 24 h (30 ± 1 °C, escuro), conforme descrito por (BRIC; BOSTOCK; SILVERSTONE 1991). As membranas foram então removidas, saturadas com a solução de Salkowski (GORDON; WEBER, 1951) e incubadas por até 2 h a temperatura ambiente. Essa reação é baseada na oxidação de compostos indólicos por sais férricos (Mayer, 1958), e a solução de Salkowski torna a determinação do AIA fácil, rápida, sensível e de baixo custo (STEENHOUD; VANDERLEYDEN, 2000). Se no período de 30 min a 2 h de reação as membranas apresentaram coloração amarela, as culturas originais foram consideradas negativas para produção de AIA, mas aquelas que apresentaram coloração rosa avermelhada foram consideradas positivas para esta produção de auxinas. Para o método quantitativo, o mesmo meio, mas sem ágar, foi inoculado e incubado nas mesmas condições. Após 24 h, os sobrenadantes das culturas foram submetidos à mesma reação e a sua absorção medida pelo espectrofotômetro ajustado a 530 nm. O padrão AIA em diferentes concentrações (1, 5, 8 e $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi usado para a curva padrão.

4.10.5 Efeito dos isolados bacterianos sob germinação de *Lactuca sativa in vitro*

As sementes de alface veneranda (*L. sativa* var. *crespa*) (99,9 % de pureza, safra 2015, sementes Feltrin®) foram previamente submetidas à assepsia (1 min em álcool 70 %, 2 min em hipoclorito de sódio 2,5 % e cinco lavagens de 30s em água destilada esterilizada) e depois inoculados com suspensões bacterianas preparadas como mencionado no item 3.5. Para isso, 30 sementes foram imersas em tubos de ensaio Falcon (50 mL) contendo 30 mL de cada suspensão bacteriana (1×10^8 células. mL^{-1}) ou água destilada estéril (controle) e incubadas por 24 h (30 ± 1 °C, no escuro). As sementes tratadas de cada tubo foram então dispostas na superfície úmida (usando 15 mL de água destilada estéril) de duas folhas de papel de filtro esterilizadas dentro de 5 placas de Petri

($\theta \cong 9$ cm, 6 sementes distribuídas uniformemente), também previamente esterilizadas ($120\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 atm, 15 min). As placas fechadas foram incubadas por 7 dias em câmara de germinação ($25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, no escuro). Após esse período, as médias de germinação foram medidas e submetidas à análise de variância utilizando o teste de Tukey com 5% de significância. Então, as cepas com melhor desempenho foram escolhidas para formar um consórcio microbiano e o teste foi realizado novamente.

Os isolados (EFI, EFII, EFIII, LOII e LOIII) de efluente e lodo identificados e previamente caracterizadas como osmotolerantes, resistentes a metais potencialmente tóxicos, produtoras de enzimas lignolíticas, promotoras de crescimento vegetal e capazes de formar um consórcio microbiano, foram testadas quanto à produção extracelular de biosurfactante/bioemulsificante e sua ação na modificação de parâmetros físico-químicos de efluentes e no lodo acumulado em lagoa de sedimentação da referida ETE.

4.11 Teste para produção de biosurfactante e bioemulsificante extracelular

Os isolados cultivados individualmente em placas de Petri com meio AN, por 24 h ($30 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), foram transferidos para o CN e mantidos sob agitação (120 rpm, $30 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 24 h. Após centrifugação (9000 g, $4 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min), o sobrenadante foi descartado e as células sedimentadas ressuspensas em água estéril. Aliquotas (10^6 células.mL⁻¹) de suspensões aquosas de cada microrganismo foram inoculadas no meio de produção de biosurfactante descrito por Costa (2010). As culturas (50 mL em frascos Erlenmeyer de 125 mL) foram incubadas por 48 h ($30 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, no escuro) sob agitação orbital constante (180 rpm) e, em seguida, foram centrifugadas (20 min, 9000 g, $4 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Os respectivos sobrenadantes livres de células foram coletados e armazenados como amostras para as determinações analíticas do: pH final do meio, conteúdo de glicídios redutores totais, capacidade emulsificante (índice de emulsificação) e surfactante (colapso da gota). O pH foi determinado conforme metodologia descrita no item 4.10.2.

4.11.1 Determinação de glicídios redutores totais

A curva padrão utilizada foi de glicose, variando-se as concentrações (0,2 a 4 mg.mL⁻¹). Os glicídios redutores foram quantificados de acordo com a metodologia modificada do método do ácido 3,5- dinitrosalícílico (DNSA), onde 200 μL de solução aquosa do reagente (0,25 g DNSA, 75 g de tartarato de sódio e potássio, 50 mL de hidróxido de sódio 2M, 250 mL de água destilada) foi acrescentado a 200 μL das amostras (sobrenadante) ou das soluções do padrão. Após aquecimento ($100\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 5 min.),

acrescentou-se 5 mL de água destilada. As absorvâncias foram determinadas a temperatura ambiente em espectrofotômetro Femto 800xi a 540 nm (MILLER, 1959).

4.11.2 Determinação da capacidade emulsificante

A presença de biossurfactantes no sobrenadante livre de células foi determinada indiretamente a partir da metodologia descrita por Chen; Baker; Darton (2007), com algumas modificações. Para isso, foram utilizados tubos de rosca, em triplicata, contendo 3 mL de sobrenadante e 3 mL dos hidrocarbonetos (querosene ou tolueno). Após homogeneização sob agitação (2 min, temperatura ambiente), os tubos foram incubados (24 h, temperatura ambiente). A leitura foi realizada através das medidas da altura da emulsão formada após 24 horas, e foi calculado pela da equação abaixo, sendo que E_{24} = Índice de emulsificação após 24 h, He = Altura da emulsão e Ht = Altura total do líquido.

$$E_{24} = \frac{He}{Ht} \times 100$$

4.11.3 Determinação da capacidade surfactante

Para a determinação da capacidade surfactante dos sobrenadantes livres de células, foi utilizado o teste do colapso da gota. Para isso, 50 μ L das amostras (sobrenadante) foram depositados sobre superfície hidrofóbica (*Parafilm*®M), verificando-se o seu comportamento. Quando a gota se apresentou dispersa na superfície hidrofóbica, a amostra foi caracterizada como portadora de capacidade surfactante. Como controle negativo, utilizou-se o meio de cultura não inoculado (KUIPER et al. 2004).

4.12 Ação dos isolados sobre efluente sintético (ES) e agroindustrial (EA)

Inicialmente, preparou-se um efluente sintético (ES) com composição definida e condições próximas daquele proveniente de indústria sucroalcooleira. Para tanto, a composição do ES que se assemelha a esgoto doméstico (preconizada pela *European Commission*, 1967), foi modificada, pois apresenta aproximadamente 50 % da Demanda Química de Oxigênio (DQO) do efluente imediato da lavagem de cana-de-açúcar de uma agroindústria sucroalcooleira (cerca de 5700 mg.L⁻¹). Portanto, o meio foi constituído por (g.L⁻¹): 16,0 peptona; 11,0 extrato de malte; 3,0 ureia; 0,7 cloreto de sódio; 0,4 cloreto de cálcio dihidratado; 0,2 sulfato de magnésio heptahidratado; 1,0 Fosfato de potássio dibásico; 500 sacarose; 0,1 sulfato de cobre; 0,1 sulfato de zinco heptahidratado e 0,1 cromato de potássio. Já o efluente agroindustrial (EA) foi coletado na primeira lagoa de

sedimentação da ETE da agroindústria em estudo, no início da safra 2016/2017, e transportado sob refrigeração para o laboratório LBPMA/UFAL. Após a caracterização físico-química (**Tabela 4**), esse material foi esterilizado (121 °C, 1 atm, 15 min.) e armazenado em freezer (- 20°C) até a utilização nos experimentos seguintes.

Tabela 4- Caracterização físico-química do efluente agroindustrial (EA) coletado na primeira lagoa de sedimentação da ETE da “S.A Usina Coruripe Açúcar e Álcool”, no início da safra 2016/2017.

CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE AGROINDUSTRIAL BRUTO	
Parâmetros	Resultados
pH	4,76 ± 0,04
Condutividade Elétrica ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)	737,67 ± 2,52
Oxigênio Dissolvido (mg.L^{-1})	0,59 ± 0,01
Temperatura (°C)	40,67 ± 0,57
Sólidos Sedimentares (mg.L^{-1})	1,97 ± 0,00
Sólidos totais (mg.L^{-1})	0,26 ± 0,00
Sólidos suspensos totais (mg.L^{-1})	0,20 ± 0,00
Turbidez (NTU)	390,67 ± 20,53
Nitrito (mg.L^{-1})	2,98 ± 0,01
Nitrato (mg.L^{-1})	18,34 ± 0,00
Amônia (mg.L^{-1})	51,39 ± 0,01
Fosfato (mg.L^{-1})	1,08 ± 0,03
Demanda Química de Oxigênio (mg.L^{-1})	610,25 ± 26,50
Glicídios Redutores totais (mg.L^{-1})	0,58 ± 0,00
Proteína (mg.L^{-1})	46,23 ± 1,89
Fenóis (mg.L^{-1})	39,14 ± 0,37

Para avaliar a ação dos isolados bacterianos sobre o ES e o EA, volumes de 50 mL dos mesmos (erlenmeyer de 125 mL) foram autoclavados (121 °C, 1 atm, 15 min.) e inoculados com suspensões das bactérias individuais (ou seu consórcio), gerando concentração final de 1×10^8 células.mL⁻¹. O delineamento experimental foi totalmente casualizado, com 3 repetições e 3 réplicas por tratamento (meio inoculado e o meio controle não inoculado), com aeração (agitação constante a 120 rpm, $30 \pm 2^\circ\text{C}$, 96 h) e sem aeração ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, 96 h). Após o período de incubação (96 h), cada amostra inoculada foi coletada, centrifugada (centrífuga SIGMA 2K15) por 10 min a 4000 g (30°C). Enquanto o precipitado foi utilizado para determinação da densidade ótica (DO), por espectrometria UV/VIS (600 nm), as alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para a determinação do pH, Demanda Química de Oxigênio (DQO), fosfato total, nitritos, nitratos e amônia. Todas as determinações analíticas foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e comparados pelo teste de Tukey com 5 % de significância.

4.12.1 Caracterização física do efluente agroindustrial (EA)

Os valores de pH, Oxigênio Dissolvido (OD), Condutividade Elétrica (CE) e temperatura foram determinadas *in situ*. A determinação do pH seguiu metodologia descrita no item 4.10.2. A concentração de OD e a temperatura da amostra foram determinadas utilizando um oxímetro digital (InstruthermTM, modelo MO-880) calibrado, e a concentração de sais (CE) foi determinada com o auxílio de um condutivímetro (INSTRUTHERM CD-880) calibrado. Já a turbidez foi determinada no laboratório num turbidímetro (Poli Control, modelo AP2000). Para a determinação das séries de sólidos, sólidos totais (ST), sólidos dissolvidos totais (SDT) e sólidos suspensos totais (SST), seguiu-se a metodologia adaptada descrita por APHA (1998).

4.12.2 Caracterização química do efluente agroindustrial (EA)

Para a determinação da DQO, fosfato, nitrito, nitrato, amônia, glicídios redutores totais, proteína e fenóis, as amostras foram filtradas em membrana com 0,45 µm de porosidade.

4.12.2.1 Determinação da concentração de nitritos (NO_2^-)

A concentração de nitritos foi determinada conforme APHA (1998). Para isso, 9 mL das amostras foram depositadas em tubos de ensaio (12 mL), em seguida adicionado 200 µL de uma solução de sulfalinamida, agitadas e deixadas em repouso por 5 min. Após este período, adicionou-se imediatamente 200 µL de uma solução de bicloridrato de n(1-naftil) etilenodiamina, e após agitação, mensurou-se a absorvância a 543nm em espectrofotômetro Femto 800XI. O padrão utilizado foi o nitrito de sódio.

4.12.2.2 Determinação da concentração de nitratos (NO_3^-)

A concentração de nitratos presentes foi determinada a partir de alíquotas de 9 mL das amostras, as quais foram depositadas em tubos de ensaio (12 mL), em seguida adicionados 180 µL de uma solução de HCl diluído (1:4) e 180 µL de uma solução de ácido sulfanílico. Após homogeneização, adicionou-se 100 mg da mistura de zinco com NaCl (1:1). As amostras foram agitadas, e adicionaram-se 100 µL do reagente bicloridrato de n(1-naftil) etilenodiamina e 100 µL de acetato de sódio 2M, aguardando-se 5 min para o desenvolvimento da cor. Amostra do “branco” e de diferentes concentrações do padrão de nitrato de potássio receberam o mesmo tratamento e as absorvâncias foram medidas a 550nm em espectrofotômetro Femto 800XI (ONDRUS, 2006).

4.12.2.3 Determinação da concentração de amônia

A determinação da amônia foi realizada segundo o método de Nessler, descrito por VOGEL (1981). Para tanto, foi adicionado 1 mL do reagente de Nessler (Iodeto de mercúrio (II) e Iodeto de potássio) para 50 mL de cada amostra. Após 10 min, as absorvâncias (525nm) das misturas de reação (amostras e diluições de solução de cloreto de amônio) foram realizadas em espectrofotômetro Femto 800XI.

4.12.2.4 Determinação da concentração de fosfato

Para a realização da curva padrão foi utilizado o fosfato monobásico de potássio. A cada 20 mL da amostra (ou da solução do padrão de fosfato), adicionou-se 2 mL de solução saturada de persulfato de potássio, sendo a água destilada utilizada como “branco”. As amostras foram vedadas e colocadas em autoclave (121 °C, 1 atm, 1 h) e após resfriamento em temperatura ambiente, foi adicionado 2 mL do reagente misto (10 mL de uma solução de tartarato de potássio e amônio; 20 mL de uma solução de ácido ascórbico; 20 mL de molibdato de antimônio e 50 mL de uma solução de ácido sulfúrico) e homogeneizadas em agitador vórtex. As absorvâncias a 882 nm foram realizadas em espectrofotômetro Femto 800XI (APHA, 1998).

4.12.2.5 Determinação de Oxigênio Dissolvido (DQO)

Para a determinação da curva padrão, foi preparada uma solução de hidrogenoftalato de potássio com uma DQO teórica de 10.000 mg.L⁻¹.

A concentração de DQO foi determinada adicionando 2,0 mL de cada amostra ou da solução padrão, sendo a água destilada utilizada como branco. A esse volume, adicionou-se 1,5 mL de solução de digestão e 3,5 mL de solução de sulfato de prata-ácido sulfúrico em tubos de ensaio rosqueados (10 mL). Os tubos foram cuidadosamente agitados para homogeneização e em seguida submetidos à digestão a (150 °C, por 2 h). Após o período de digestão, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente, sob o abrigo da luz, e as leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro Femto 800XI com um comprimento de onda de 620 nm (APHA, 1998).

4.12.2.6 Determinação da concentração de proteínas e glicídios redutores totais

Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para a determinação de proteínas totais pelo método espectrofotométrico de Lowry et al. (1951), utilizando uma curva padrão de albumina de soro bovina (BSA). A mistura reacional consistiu de 0,5 mL da amostra centrifugada (sobrenadante) e 2 mL do reagente A. Após 10 min, acrescentou-se 200 µL do reagente B e a mistura permaneceu em repouso por 30 min (temperatura ambiente, no

escuro) antes da medida da absorvância (660nm) em espectrofotômetro Femto 800XI. Com relação a glicídios redutores totais, estes foram determinados conforme metodologia do item 4.11.1.

4.12.2.7 Determinação da concentração de fenóis totais

Inicialmente, diluiu-se seriadamente uma solução de ácido gálico em água destilada para o preparo da curva padrão de fenóis totais. Sob agitação, alíquotas de 150 µL dos sobrenadantes das culturas e dessas diluições do padrão foram adicionados a tubos contendo 3 mL de Na₂CO₃ 2% (m/v), que depois receberam 150 µL do reativo de Folin-Ciocalteu 2N (FOLIN; CIOCALTEU, 1927) diluído (1:1 v/v). Os tubos permaneceram ao abrigo da luz por 30 min, e depois as misturas foram submetidas a medida das absorvâncias (750nm) a temperatura ambiente em espectrofotômetro Femto 800XI.

4.13 Caracterização físico-química do lodo e ensaio de compostagem

4.13.1 Coleta do lodo

O lodo utilizado no ensaio de compostagem foi coletado na primeira lagoa de sedimentação da ETE da agroindústria previamente citada, no início da safra 2016/2017, e transportado sob refrigeração para o LBPMA/UFAL, onde as amostras foram preparadas e submetidas as análises para a caracterização físico-química (**Tabela 5**).

Tabela 5- Caracterização físico-química do lodo coletado na primeira lagoa de sedimentação da ETE da “S.A Usina Coruripe Açúcar e Álcool”, no início da safra 2016/2017.

CARACTERIZAÇÃO DO LODO	
Parâmetros	Resultados
pH	7,99 ± 0,00
Condutividade Elétrica (µS.cm ⁻¹)	100 ± 14,14
Umidade 60-65 °C (%)	59,78 ± 0,55
Umidade 100-110 °C (%)	59,67 ± 0,32
Matéria Orgânica (%)	78,53 ± 0,55
Carbono Orgânico (%)	5,10 ± 0,11
Nitrito (mg.kg ⁻¹)	0,56 ± 0,12
Nitrato (mg.kg ⁻¹)	5,37 ± 0,26
Fosfato (mg.kg ⁻¹)	0,75 ± 0,02

4.13.2 Preparo da amostra de lodo

Para a realização da caracterização físico-químicas 10 g do lodo da ETE *in natura* foi adicionado a um bcker (50 mL). Em seguida 25 ml de água destilada estéril foram acrescentados e a mistura agitada com o auxílio de um bastão de vidro, e deixada em repouso por 1 h. Para as determinações de pH e CE, a amostra foi agitada novamente antes das leituras. Já para as análises de fosfato, nitrato e nitrito a amostra foi filtrada em membrana de 0,45 µm de porosidade e obtido o sobrenadante, o qual foi submetido a tais análises.

4.13.3 Caracterização físico-química do lodo

4.13.3.1 pH e Condutividade elétrica

Após o preparo da amostra conforme o item 4.13.2, o pH e a CE foram determinados. Para a realização das leituras do pH e CE as metodologias adotadas foram as mesmas descritas nos itens 4.10.2 e 4.12.1.

4.13.3.2 Umidade 60-65 °C

Para a determinação da umidade (60-65 °C) 5g da amostra de lodo recém coletada foi pesada em balança analítica e colocada em cadinho previamente identificado e pesado, obtendo-se assim o peso do cadinho sem a amostra e o peso do cadinho com a amostra natural. Em seguida a amostra foi levada à estufa a temperatura na faixa de 60 a 65 °C por um período de 16 horas. Após a retirada da amostra da estufa, deixou-se esfriar em dessecador e posteriormente foi pesada, obtendo assim o peso cadinho com a amostra seca a 60 - 65 °C (KIEHL, 1985).

Através da equação abaixo é possível determinar a umidade das amostras. Onde: P1= Peso da amostra natural (Peso do cadinho sem amostra - Peso do cadinho com amostra natural) e P2= Peso da Amostra seca (Peso do cadinho com amostra seca a 60 - 65 °C - Peso do cadinho sem amostra).

$$\%umidade(60 - 65^{\circ}C) = (100 \times (P1 - P2))/P1$$

4.13.3.3 Umidade 100-110 °C

A partir da amostra recém coletada pesou-se 5 g do lodo em balança analítica e colocou-se em cadinho previamente seco, identificado e pesado, obtendo-se assim o peso do cadinho sem a amostra e o peso do cadinho com a amostra natural. Em seguida a amostra foi submetida durante 3 h à estufa numa temperatura de 100-110 °C. Após a retirada da amostra da estufa, deixou-se esfriar em dessecador e posteriormente foi

pesada, obtendo assim o peso do cadinho com a amostra seca a 100-110 °C (KIEHL, 1985). O percentual de umidade 100-110 °C foi obtido utilizando os resultados da secagem do material 60-65°C e a 100-110 °C. Onde: a= % de umidade a 60 - 65°C, b= umidade perdida a 100 - 110°C e c= Massa de amostra úmida a 60 - 65°C.

$$\%umidade (100 - 110 \text{ } ^\circ\text{C}) = [(100 - a) \times b]/c$$

4.13.3.4 Matéria orgânica total (MO)

A metodologia empregada para a determinação da matéria orgânica total consistiu na calcinação ou perda “por ignição”. A amostra foi previamente seca a 105 °C em estufa e 5 g da mesma foram pesadas, e em seguida submetidas a aquecimento por 5 h a 250 °C. Após o tempo de aquecimento a amostra foi resfriada em dessecador, e determinada o seu peso. A diferença entre o peso inicial e o peso final correspondeu ao teor de matéria orgânica total (DAVIES, 1974 *apud* SILVA et al. 1999).

4.13.3.5 Concentração de carbono orgânico total (COT), nitrito, nitrato e fosfato

O conteúdo de COT foi determinado através do método descrito por Yeomans; Bremner (1988) com as seguintes adaptações: no tubo de digestão, acrescentou-se 0,1g do lodo, 5 mL de $K_2Cr_2O_7$ 0,167 mol.L⁻¹ e 10 mL de H_2SO_4 concentrado. O tubo foi levado a bloco digestor e submetido a 170 °C por 30 min. Após resfriamento, a amostra digerida foi transferida para erlenmeyer (250 mL), adicionada de 5 mL de H_3PO_4 , visando facilitar a visualização do ponto de viragem da titulação, e então, três gotas do indicador difenilamina 1% foram acrescentadas, sendo as amostras tituladas com sulfato ferroso amoniacal 0,4 mol.L⁻¹. O COT foi determinado utilizando-se os fundamentos e a equação matemática descritos por (CANTARELLA et al. 2001).

A determinação de nitrito, nitrato e fosfato foram realizadas segundo as metodologias descritas nos itens 4.12.2.1, 4.12.2.2 e 4.12.2.4 respectivamente.

4.13.4 Ensaio de compostagem

Depois de caracterizado o lodo foi esterilizado (121 °C, 1 atm, 15 min.), distribuído em recipientes plásticos (36 cm de diâmetro x 12 cm de profundidade), formando pilhas de aproximadamente 1 kg. O experimento de compostagem foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao LBPMA/UFAL. O lodo esterilizado foi inoculado com suspensões das bactérias individuais (ou seu consórcio), gerando concentração final de 2×10^8 células.mL⁻¹, sendo 74 mL de suspensão por 1 kg de lodo. O ensaio realizado em triplicata para cada tratamento, incluindo o controle sem inoculação,

sendo repetido também três vezes, ao longo de 75 dias. Em intervalos específicos (15, 45 e 75 dias), monitorou-se a temperatura, a aeração e a umidade de 3 em 3 dias.

4.13.4.1 Parâmetros analisados no ensaio de compostagem

A determinação da temperatura foi realizada em *in situ* com o auxílio de termômetro digital. Para as demais análises as amostras foram preparadas, conforme o item 4.13.2.

O pH e a CE foram determinadas conforme descrito nos itens 4.10.2 e 4.12.1. A determinação da umidade 60-65 °C, umidade 100-110 °C, matéria orgânica total, carbono orgânico, nitrito, nitrato e fosfato, seguiram as metodologias descritas nos itens 4.13.3.2; 4.13.3.3; 4.13.3.4; 4.13.3.5; 4.12.2.1, 4.12.2.2 e 4.12.2.4 respectivamente. No monitoramento do ensaio de compostagem além das análises anteriormente citadas, também foram determinados o crescimento celular e a fosfatase alcalina.

4.13.4.2 Crescimento celular (UFC)

Para a determinação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) amostra de 1 g do material em compostagem coletado, foram diluídas em 10 mL de água destilada estéril e homogeneizadas em vortex. Após esse procedimento alíquotas de 100 µL dessas amostras com o auxílio da alça de Drigalski foram inoculadas em placa de petri de 9 cm de diâmetro contendo meio AN. As placas foram incubadas ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro, por 24 horas), depois do período de incubação o número de UFC foram expressos em $\text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$.

4.13.4.3 Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina foi determinada através de um *kit* comercial Labtest[®], conforme instruções descritas pelo fabricante. A análise consiste na hidrólise da timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína, que tem cor azul em meio alcalino. A cor formada, diretamente proporcional à atividade enzimática, é medida a 590 nm em espectrofotômetro. O produto da reação se constitui de uma mistura das cores azul e da cor própria do substrato a ser analisado.

4.14 Definição do consórcio microbiano e preparo da formulação de baixo custo

4.14.1 Consórcio microbiano e preparo do inóculo

Para verificar se os isolados selecionados poderiam compor um consórcio microbiano, foi realizado o teste de antagonismo entre as bactérias selecionadas e os fungos obtidos da micoteca do LBPMA/UFAL, seguindo a metodologia descrita no item 4.7. Para isso, utilizaram-se 5 bactérias previamente isoladas codificadas como EFI, EFII, EFIII, LOII e LOIII – que cresceram em sacarose, toleraram sais de metais

potencialmente tóxicos, exibiram diferentes atividades enzimáticas extracelulares, produziram fitohormônios, biosurfactante/bioemulsificante e foram eficientes na biorremediação de resíduos agroindustriais – e 2 fungos: *Phanerochaete chrysosporium* (PC) e *Mucor* sp. (2A), obtidos da micoteca do LBPMA/UFAL e previamente estudados por serem eficientes em biorremediação (FILHO, 2007). As culturas bacterianas foram cultivadas em AN ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro, por 24 horas) e os fungos em ágar extrato de malte ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro, por 120 horas). Suspensões aquosas de células e conídios foram preparadas utilizando água destilada estéril. Alíquotas de 100 μL de cada suspensão foram utilizadas para contagem em câmara de Neubauer.

Para a inoculação de cada microrganismo, foram preparados 12 erlenmeyers (250 mL), sendo 6 contendo 100 mL de meio sintético (4 caldos nutriente e 2 caldos extrato de malte) e 6 contendo 100 mL de meio de baixo custo. O meio sintético apresentou a seguinte composição para bactérias (g.L^{-1}): 5,0 peptona; 3,0 extrato de carne; 1,0, cloreto de sódio; enquanto para fungos a composição foi a seguinte (g.L^{-1}): 20,0 extrato de malte; 1,0, peptona; 20,0 dextrose. Por sua vez, o meio de baixo custo a partir de matéria prima agrícola previamente analisada (utilizado tanto para as bactérias como para os fungos) apresentou a seguinte composição (mg.L^{-1}): 20000, sacarose; 600, proteínas totais; 3600, lipídios totais; 20, cálcio; 6, fósforo; 1,5, ferro; 0,2, cobre; 0,3, magnésio; 0,6, zinco; 0,012, iodo; 0,0022, selênio; 2,4, α -tocoferol; 2, ácido ascórbico; 0,44, tiamina; 0,14, riboflavina; 0,1, piridoxina; 0,88, cianocobalamina; 0,044, ácido fólico; 0,02, ácido pantotênico; 0,96, ácido nicotínico; 46, colina; 2,7, biotina. Após autoclavagem (121°C , 1 atm, 15 min), os meios foram inoculados com 10^6 células. mL^{-1} para bactérias e 10^6 conídios. mL^{-1} para fungos, e levados a incubação por 96 h ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro). A cada 24 h, amostras foram retiradas de todas as culturas para contagem das células e dos conídios em câmara de Neubauer.

4.14.2 Inoculação do meio para aplicação em biorremediação de lagoa e monitoramento físico-químico das águas residuárias

Durante a safra 2018/2019 da moagem de cana-de-açúcar do estado de Alagoas, foram quinzenalmente preparadas 168 embalagens contendo 150 g de meio de cultura, sendo 28 embalagens para cada microrganismo. Depois de preparadas, tais embalagens foram armazenadas em freezer (18°C) para aplicação diária.

O meio contido nas embalagens tinha a mesma composição descrita no item 4.14.1 acrescidos de hemicelulose, sendo inoculado com 300 mL de cada cultura, previamente

cultivadas em 9 L de meio líquido com a mesma composição descrita no item 4.14.1. Após preparação dessas embalagens, o consórcio de microrganismos foi fornecido para a empresa para serem aplicados em bioaumentação (lagoa facultativa D) da referida ETE em estudo, as quais eram armazenadas imediatamente em freezer (18 °C) após o recebimento. Diariamente, 2 embalagens de cada microrganismo eram retiradas desse freezer e aplicadas na lagoa D da ETE. A referida lagoa, entretanto, era tratada com NaOH (75kg/aplicação), a fim de aumentar o pH do efluente local, no mínimo 1 hora antes da aplicação do consórcio microbiano.

Para verificar a eficiência do tratamento durante a safra 2018/2019, foram efetuadas coletas quinzenais de amostras de efluentes na entrada da lagoa de decantação (A), onde não havia nenhum tipo de tratamento, e na saída da lagoa facultativa (G), pós tratamento. Para as amostras coletadas, foram avaliados os parâmetros físico-químicos: pH, temperatura, CE, OD, SDT, resíduos sedimentáveis (RS), turbidez, nitritos, nitratos, amônia, fosfatos, DQO, alcalinidade, ácidos voláteis e cloretos.

Os parâmetros físicos pH, Temperatura, CE, OD, turbidez e STD foram determinados conforme metodologias descritas nos itens 4.10.2. e 4.12.1, os resíduos sedimentáveis pela metodologia de gravimetria, utilizando o cone de Imhoff. Os parâmetros nitritos, nitratos, amônia, fosfatos e DQO foram determinados de acordo com os itens 4.12.2.1, 4.12.2.2, 4.12.2.3, 4.12.2.4, 4.12.2.5.

4.14.2.1 Alcalinidade

A alcalinidade foi determinada por titulometria, onde foi estabelecido o pH final da titulação potenciométrica (APHA, 1998). Para isso, 50 mL de cada amostra foi colocado em Becker de 100 mL e seu pH inicial era medido com o eletrodo do phmetro. Se o pH fosse superior a 5,75, a amostra era titulada com a solução de ácido sulfúrico padronizada até pH 5,75 e o volume gasto anotado. Para pH inferior a 5,75, procedeu-se da mesma maneira acima até pH final de 4,3 e o volume gasto anotado. O cálculo da alcalinidade foi determinado pela expressão abaixo, sendo: V o volume (mL) de ácido gasto na titulação até pH pré-determinado, N a normalidade do ácido empregado, V_a o volume da amostra (50 mL)

$$\text{mg.L}^{-1} \text{ de CaCO}_3 = [V \times N \times 50.000] \times V_{\text{amostra}}^{-1}$$

4.14.2.2 Ácidos voláteis

Os ácidos voláteis foram determinados por método titulométrico (APHA, 1998). A amostra foi filtrada em membrana de 0,45 µm de porosidade para remoção de sólidos

em suspensão. 50 mL da amostra foi colocado em Becker de 100 mL, o eletrodo do phmetro introduzido no Becker contendo a amostra e o pH inicial medido. Em caso de $\text{pH} > 3,0$, uma solução de hidróxido de sódio padronizada era adicionada para destruir os íons bicarbonatos presentes, e o volume gasto era desprezado. Após fervura de 3 minutos (remoção de ácido carbônico), e posterior resfriamento, o pH era aferido até 4,0 com hidróxido de sódio padronizado. Em seguida, titulava-se com hidróxido de sódio de pH 4,0 até pH 7,0, anotando-se o volume gasto (a titulação até 7,0 inclui os ácidos orgânicos e outros íons menores presentes). O cálculo da concentração de ácidos voláteis foi determinado pela equação abaixo, sendo: V o volume gasto de NaOH de pH 4,0 até 7,0; N a normalidade do NaOH; V_a o volume da amostra, 50 mL.

$$\text{mg.L}^{-1} \text{ de HAc} = [V \times N \times 50.000] \times V_{\text{amostra}}^{-1}$$

4.14.2.3 Cloretos

Para determinação de cloretos, seguiu-se a metodologia de Macêdo (2001): 100 mL de amostra foram colocados num erlenmeyer de 250 mL, juntou-se 0,1 g de bicarbonato de cálcio e 5 gotas de cromato de potássio 5%. Paralelamente foi feita uma prova em branco, para auxiliar na visualização do ponto final da titulação, por comparação. A titulação foi realizada com uma solução de nitrato de prata (0,01 N) até o aparecimento de uma cor parda clara (tijolo discreto ou avermelhada) persistente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento de bactérias tolerantes a sacarose e seleção de tolerantes a metais potencialmente tóxicos

Foram obtidos 36 isolados tolerantes a alta concentração de sacarose (6,25 mg. mL⁻¹) do lodo e efluente do sistema de tratamento de uma indústria sucroalcooleira no Estado de Alagoas, Nordeste do Brasil. No que diz respeito à concentração máxima testada para os sais individuais de metais potencialmente tóxicos, foram selecionados 5 isolados bacterianos (EFI, EFII, EFIII, LOII e LOIII) com base na sua melhor resistência (Tabela 6).

Tabela 6- Concentração máxima de metais potencialmente tóxicos tolerada por isolados bacterianos de resíduos industriais (efluentes e lodo) de uma agroindústria sucroalcooleira (safra de cana-de-açúcar 2015/2016).

Concentração máxima tolerada de sais de metais testados (mM)					
Isolados Sais de metais	EFI	EFII	EFIII	LOII	LOIII
CuSO ₄	10,024	5,012	5,012	5,012	5,012
NiSO ₄ . 6H ₂ O	0,095	0,095	0,095	0,012	0,095
CdSO ₄ . 8/3H ₂ O	0,004	0,130	0,004	0,130	0,032
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,003	0,022	0,010	0,022	0,010
PbCl ₂	5,753	1,438	0,090	0,043	0,022
CoSO ₄ .7H ₂ O	0,021	5,161	0,077	2,590	0,021
MnSO ₄ . H ₂ O	0,166	2,649	5,298	0,166	0,079
K ₂ CrO ₄	0,257	4,120	0,515	4,120	0,515
HgCl ₂	0,022	0,022	0,092	0,022	0,022

De acordo com a legislação brasileira vigente, a Resolução 430/2011 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), as concentrações máximas admissíveis de metais potencialmente tóxicos em efluentes são (mg.L⁻¹): 0,2 total de cádmio (Cd), 0,5 total de chumbo (Pb), 1,0 de cobre dissolvido (Cu), 1,0 cromo trivalente (Cr³⁺), 1,0 de manganês dissolvido (Mn), 0,01 de mercúrio total (Hg), 2,0 níqueis total (Ni), 5,0 zínco total (Zn). Por outro lado, em relação ao sólido lodo, de acordo com a Resolução 375/2006 do CONAMA, as concentrações máximas admissíveis de substâncias inorgânicas são (mg.kg⁻¹): 39 Cd, 300 Pb, 1500 Cu, 1000 Cr, 17 Hg, 420 Ni e 2800 Zn.

As bactérias podem ter habilidades de ligação de metal e exibir tolerância ou capacidade de desintoxicar metais (TOMOVA et al. 2015). Neste trabalho, 5 isolados bacterianos selecionados expressaram um grau diferente de tolerância a uma determinada concentração dos sais de metais potencialmente tóxicos testados individualmente, e podem desempenhar um papel importante em consórcios microbianos para biorremediação de poluentes orgânicos em efluentes ricos em metais desse tipo, ou seja, suas enzimas podem tolerar ou resistir a eles até certas concentrações. Sowmya et al. (2014), trabalhando com diferentes gêneros de bactérias, entre 35 cepas halofílicas isoladas de sedimento, evidenciaram eficiência na remoção de cádmio (37%) e chumbo (99%), e a concentração máxima de chumbo (Pb) tolerada para as cepas foi 12 mM.

Rodríguez-Sánchez et al. (2017) também avaliaram a tolerância de sete cepas bacterianas isoladas de um ambiente contaminado por chumbo, e observaram concentração máxima de Pb (NO₃)₂ tolerada de 4,5 a 7,0 mM em meio sólido, e de 1,0 a 4,0 mM em meio líquido, para as estirpes de *Staphylococcus* e *Bacillus*. Essas concentrações foram próximas que as suportadas pelo isolado EFI no presente estudo. Biswas et al. (2017) isolaram uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de Kalyani capaz de tolerar múltiplos metais potencialmente tóxicos como As (III) (50 mM), As (V) (800 mM), Cd (8 mM), Co (18 mM), Cu (7 mM), Cr (5 mM), Ni (3 mM) e Zn (14 mM). Por outro lado, segundo Dash; Mangwani; Das (2014), uma cepa bacteriana identificada como *B.thuringiensis* PW-05, da costa de Odisha, tolerou 0,18 mM de Hg como HgCl₂, bem como maiores concentrações de CdCl₂ (1,45 mM), ZnSO₄ (5 mM), PbNO₃ (0,003 mM) e Na₂HAsO₄ (1,25 mM). No presente estudo, utilizando o PbCl₂, o isolado LOIII pode tolerar até 0,022 mM deste metal.

Oladipo et al. (2018) também avaliaram a capacidade das cepas bacterianas em tolerar sais de metais potencialmente tóxicos, e entre as estirpes com maior tolerância encontraram *Lysinibacillus macroides* e *Bacillus cereus*, mas estas não toleraram sais de cobre e mercúrio nas concentrações de 0,63 mM e 0,92 mM, respectivamente. No presente trabalho, os isolados LOII e EFIII toleram maiores valores de Pb (5,012 mM) do que a linhagem obtida por Oladipo et al. (2018). No entanto, as concentrações de mercúrio toleradas foram de 0,022 mM e 0,092 mM para LOII e EFIII, respectivamente.

5.2 Caracterização morfo-cultural e bioquímica dos isolados selecionados

Como pode ser visto nas **Tabelas 7 e 8**, todos os isolados secretam amilase, xilanase, lipase e catalase. Com base na caracterização morfológica e bioquímica, um dos

isolados era Gram negativo pertence ao gênero *Pseudomonas* (EFI) e os demais foram Gram-positivos (EFII, EFIII e LOIII: *Bacillus* spp. E LOII: *Lysinibacillus* sp.). Todos os isolados puderam tolerar ágar nutriente com 3% de NaCl. Com exceção do isolado EFI, os demais foram capazes de crescer a 55 °C, e apenas os isolados EFI e LOIII não conseguiram crescer a 85°C.

Em relação à temperatura, exceto para o isolado *Pseudomonas* sp - EFI, todos os isolados do presente estudo foram classificados como termófilos facultativos, pois foram cresceram a 55 °C, embora foram primeiramente isolados em meio de crescimento incubado a 30 °C. Dentre estes, *Bacillus* sp - EFII, *Bacillus* sp- EFIII e *Lysinibacillus* sp- LOII foram classificados como termófilos extremos, pois apresentaram crescimento a 85 °C. Altas temperaturas dificultam a viabilidade dos seres, especialmente por inativação de moléculas orgânicas como os ácidos desoxirribonucleico (DNA) e ribonucleico (RNA) e das proteínas, que apresentam muitas interações intramoleculares sensíveis a temperatura. Microrganismos termofílicos sobrevivem em condições extremas de temperatura pois podem, entre outras estratégias, produzir compostos de baixo peso molecular que se ligam às cadeias laterais de aminoácidos dos polímeros protéicos e evitam sua desnaturação e degradação. A presença de DNA girase reversa também aumenta o ponto de fusão do DNA, produzindo um dobramento sobreposto (JAMROZE et al. 2014). Além disso, no caso dos hipertermófilos, há mecanismos de reparo eficientes para danos ao DNA, mRNA e rRNA. No que diz respeito às proteínas/enzimas globulares, elas podem ser termoestabilizadas por pontes salinas entre pares de resíduos carregados, especialmente na superfície da proteína, reduzindo a constante dielétrica da água e, ou melhorando o empacotamento de sua estrutura e otimizando a hidrofobia interna e interações eletrostática. Além disso, a estrutura da proteína termotolerante pode ser estabilizada por uma ligação covalente cruzada em termos de ligação dissulfeto (LENG et al. 2017). Os termófilos, predominantemente *Bacillus*, possuem potencial para a degradação de poluentes ambientais (MARGESIN; SCHINNER; 2001) além de potencial utilização em processos biotecnológicos industriais que demandam altas temperaturas, como nos aditivos de detergentes para a lavagem de roupas a quente, por exemplo (BANERJEE et al. 1999).

Tabela 7- Aspectos morfo-bioquímicos dos cinco isolados obtidos a partir de resíduos industriais (efluentes e lodo) de uma agroindústria sucroalcooleira brasileira (safra de cana-de-açúcar 2015/2016). (+) = reação positiva; (-) = reação negativa.

Isolados	EFI	EFII	EFIII	LOII	LOIII
Características					
Forma da colônia	Irregular	Rizóide	Irregular	Irregular	Irregular
Elevação da colônia	Convexa	Plana	Achatada	Ondulada	Irregular
Borda da colônia	Ondulada	Ondulada	Lobadas	Ondulada	Lobadas
Estrutura da colônia	Lisa	Lisa	Rugosa	Granulosa	Granulosa
Brilho da colônia	Opaca	Brilhante	Opaca	Translúcida	Opaca
Cor da colônia	Pigmentada	Marrom	Pigmentada	Pigmentada	Pigmentada
Coloração de Gram	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Verde Malaquita	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Forma das células	Bastonete	Variada	Bastonete	Bastonete	Bastonete
TSI	+glicose e peptona	+ glicose e peptona	+ glicose e peptona	+ peptona	+ glicose e peptona
Meio OF	Aeróbio	Anaeróbio facultativo	Anaeróbio facultativo	Aeróbio	Anaeróbio facultativo
Citocromo-Oxidase	+	+	+	+	+
Nitrato redutase	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Lipase	+	+	+	+	+
Xilanase	+	+	+	+	+
Amilase	+	+	+	+	+
Protease	-	+	+	-	+
NaCl 3%	+	+	+	+	+
Crescimento (55°C)	-	+	+	+	+
Crescimento (85°C)	-	+	+	+	-

Tabela 8- Reações bioquímicas realizadas com tiras API[®] ZYM (BioMerieux, Inc., França) para caracterização dos cinco isolados obtidos de resíduos industriais (efluentes e lodo) de uma agroindústria sucroalcooleira brasileira (safra de cana-de-açúcar 2015/2016), (+) = reação positiva;(-) = reação negativa.

Enzimas	Isolados				
	EFI	EFII	EFIII	LOII	LOIII
Fosfatase alcalina	+	+	+	+	+
Esterase (C 4)	+	+	+	+	+
Esterase lipase (C 8)	+	+	+	+	+
Lipase (C 14)	+	-	-	-	-
Leucinearilamidase	+	-	+	-	+
Valinearilamidase	-	-	-	-	-
Cystinearilamidase	-	-	-	-	-
Tripsina	-	-	-	-	-
α -quimotripsina	-	-	-	+	-
Fosfatase ácida	+	+	+	+	+
Naftol-AS-BI-fosfohidrolase	+	+	+	+	+
α - galactosidase	-	-	-	-	-
β - galactosidase	-	-	-	-	-
β - glucuronidase	-	-	-	-	-
α - glucosidase	-	-	+	-	+
β - glucosidase	-	-	-	-	+
N-acetil- β - glucosaminidase	-	-	-	-	-
α - manosidase	-	-	-	-	-
α - fucosidase	-	-	-	-	-

As enzimas secretadas por microrganismos também podem auxiliar sua subsistência em um ambiente específico, facilitando a absorção de pequenas moléculas ou a desintoxicação de outras, e esse conhecimento amplia sua importância biotecnológica. Neste trabalho, as linhagens dos gêneros *Pseudomonas* sp - EFI e *Lysinibacillus* sp - LOII não apresentaram produção sensível de peptidases ou proteases extracelulares, mas todos os isolados estudados apresentaram atividade de citocromo-oxidase e catalase, bem como pronunciados amilolíticos, xilanolíticos e atividades lipolíticas. Com exceção da *Pseudomonas* sp - EFI, todas as cepas foram positivas para a enzima nitrato redutase.

O rastreamento das atividades da citocromo-oxidase e da catalase, por exemplo, ajuda a definir o tipo de metabolismo primário durante o processo de identificação microbiana, mas também permite compreender o tipo de material que pode ser degradado total ou parcialmente pelas cepas (SILVA, 1996). Por outro lado, as proteases e peptidases, também são de grande interesse biotecnológico devido à grande diversidade microbiana e às condições em que vivem e produzem essas enzimas ativas. As amilases estão entre as classes mais importantes de enzimas e podem ser derivadas de uma variedade de fontes, mas aquelas de origem microbiana são geralmente as mais procuradas pelas indústrias. Existem vários parâmetros que levam à sua produção, como as condições de crescimento microbiano e os substratos a serem utilizados como fonte de carbono no meio de cultura. Esses substratos podem ser substituídos por produtos de menor valor (substratos agrícolas de baixo custo, por exemplo), permitindo que o processo de produção dessa enzima seja mais econômico (SILVA, 2016). A xilanase também é produzida por uma variedade de microrganismos e é responsável pela degradação do polissacarídeo xilana, que é o principal componente do conjunto hemicelulósico da parede das células das plantas (BIELY, 1985). Em relação às lipases de bactérias, leveduras e fungos filamentosos, elas também desempenham um papel significativo nas indústrias (GUPTA et al. 2003), como descrito por Bhattacharya et al. (2016), Veerapagu et al., (2013) e Safadari et al. (2017).

5.3 Teste de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados selecionados

Analisando a susceptibilidade a cada agente antimicrobiano testado, apenas o isolado *Pseudomonas* sp. - EFI foi resistente à tetraciclina (**Tabela 9**).

Tabela 9- Susceptibilidade (diâmetro em mm da zona de inibição) dos isolados de efluentes (EF) e lodo (LO) da estação de tratamento (lagoa de sedimentação A) de uma agroindústria sucroalcooleira brasileira para diferentes antibióticos.

Isolados tolerantes	Agente antimicrobiano		
	Amicacina (30 µg)	Norfloxacina (10 µg)	Tetraciclina (30 µg)
<i>Pseudomonas</i> sp - EFI	24	32	14
<i>Bacillus</i> sp - EFII	24	39	30
<i>Bacillus</i> sp- EFIII	21	24	24
<i>Lysinibacillus</i> sp - LOII	21	19	29
<i>Bacillus</i> sp - LOIII	15	26	31

Wireman et al. (1997) reportaram que os genes que codificam a resistência a antibióticos e a resistência ao mercúrio são frequentemente transportados nos mesmos plasmídeos, o que favorece a ocorrência de processos co-seletivos na presença deste metal ou de drogas antimicrobianas. No entanto, no presente estudo, todos os isolados foram sensíveis a três antibióticos (amicacina, norfloxacina e tetraciclina), mas não é possível excluir a possibilidade de sua resistência a outros antibióticos. Geralmente, a resistência a metais potencialmente tóxicos em bactérias é associada a plasmídeos que também codificam resistência a antibióticos (SMARRELLI; CAMPBELL, 1983).

5.4 Efeito dos sais de metais potencialmente tóxicos na atividade de catalase, citocromo-oxidase e nitrato-redutase

Todos os isolados foram capazes de expressar a enzima catalase na presença de todos os sais de metais potencialmente tóxicos. No teste da oxidase, apenas *Lysinibacillus* sp - LOII apresentou alteração quando cultivada em 0,043 mM de PbCl₂. Em relação à redução de nitrato, o comportamento dos isolados *Pseudomonas* sp - EFI, *Lysinibacillus* sp - LOII e *Bacillus* sp - LOIII variaram sob a ação da maior concentração tolerada dos sais de metais potencialmente tóxicos estudados, presumida pela ausência de cor vermelha no teste, mesmo após a adição de pó de zinco. Isso não ocorreu no meio de controle.

Algumas enzimas podem ser afetadas pela presença de metais, sem qualquer prejuízo no crescimento bacteriano. Para determinar se os sais de metais potencialmente tóxicos poderiam induzir modificações na fisiologia de bactérias selecionadas, foram analisadas a expressão enzimática de catalase, oxidase e nitrato redutase. Os metais potencialmente tóxicos podem ser submetidos à auto-oxidação ou oxidação enzimática (resultando na formação de espécies reativas de oxigênio) (SMARRELLI; CAMPBELL,

1983), podendo causar a inativação de alguns componentes da cadeia respiratória e afetar o fluxo de elétrons que inibe a redutase do nitrato (SHARMA et al. 2012).

A catalase é uma enzima antioxidante que pode ser usada para monitorar biologicamente a poluição por metais potencialmente tóxicos (HUSSEIN; JOO, 2013) porque esta enzima está envolvida como um dos mecanismos usados para proteger as células contra os danos causados por espécies reativas de oxigênio a componentes celulares (incluindo ácidos nucleicos, lipídios e proteínas).

No estudo realizado por Hussein; Joo (2013), os autores isolaram cepas bacterianas tolerantes a metais potencialmente tóxicos e investigaram o efeito de sais de metais potencialmente tóxicos na atividade da catalase dessas cepas resistentes. Após o cultivo de *Pseudomonas putida* KNU5, *Pseudomonas putida* KNU8 e *Bacillus subtilis* Kh, sob estresse de Zn^{2+} e Pb^{2+} , registraram que a atividade de tal enzima não foi inibida.

A expressão da oxidase não foi afetada pela presença de sais de metais potencialmente tóxicos em todas as linhagens selecionadas, com exceção de *Lysinibacillus* sp - LOII na presença de 0,04 mM de Pb. Provavelmente esta cepa pode ter um componente alternativo, adicional ao citocromo c, na porção final da cadeia respiratória, que não é inativada pelo metal e não determina a oxidação do reagente utilizado no teste (SILVA et al. 2012). Os isolados *Pseudomonas* sp - EFI, *Lysinibacillus* sp - LOII e *Bacillus* sp - LOIII, na presença de sais de metais potencialmente tóxicos, foram capazes de reduzir o nitrato a produtos como amônia, nitrogênio molecular, óxido nítrico, óxido nitroso e hidroxilamina (SILVA et al. 2012).

5.5 Interação (antagônica ou não) entre os isolados selecionados

Em relação à interação entre os isolados, o teste de antagonismo comprovou que esses 5 isolados podem coexistir, uma vez que não ocorreu produção de metabólitos antimicrobianos entre elas, ou seja, não ocorreu a formação de halos.

Microrganismos com perfil enzimático são interessantes para serem usados individualmente ou em consórcio em processos biotecnológicos. Segundo Alvarez (2007), o teste de interação antagônica é importante porque permite propor um consórcio microbiano, no qual os microrganismos podem crescer e funcionar sinergicamente. Neste trabalho, as bactérias selecionadas mostraram capacidade de coexistência, de modo que têm potencial para fazer parte de um consórcio microbiano para estratégias tecnológicas ambientais.

5.6 Identificação molecular dos isolados selecionados

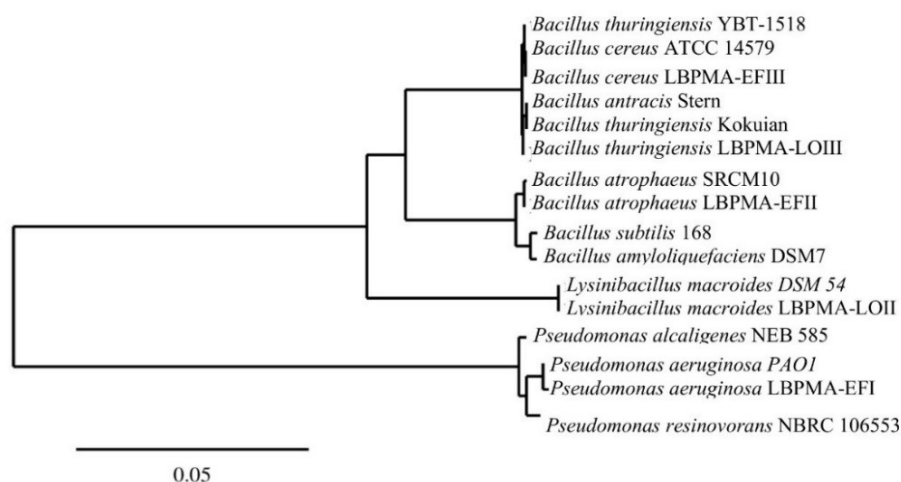
A análise do alinhamento múltiplo de sequências nucleotídicas detectou que a região 16S do rDNA de todos os isolados sequenciados apresentou identidade superior a 99% (**Tabela 10**).

A árvore filogenética dos isolados bacterianos identificados é apresentada na **Figura 3**. As espécies bacterianas isoladas foram mais precisamente identificadas como: *Pseudomonas aeruginosa* - EFI, *Bacillus atrophaeus* - EFII, *Bacillus cereus* - EFIII, *Lysinibacillus macroides* - LOII e *Bacillus thuringiensis* – LOIII (**Apêndice 1**). Entre elas, *B. atrophaeus* tem sido relatado como produtor de policetídeos antimicrobianos, um indicador biológico de esterilização ou desinfecção em processos industriais (SELLA; VANDENBERGHE, 2014) e produtor de biosurfactante (ZHANG et al. 2016).

Tabela 10- Alinhamento múltiplo de sequências nucleotídicas da região 16S rDNA dos isolados bacterianas de efluentes (EF) e lodo (LO) da estação de tratamento (lagoa de sedimentação A) de uma agroindústria sucroalcooleira brasileira (safra de cana-de-açúcar 2015/2016), (NCBI: Centro Nacional de Informações Biotecnológicas).

Estirpes	Acesso ao número NCBI	Comprimento do fragmento (pb)	Gaps	Identidade (%)
EFI	MH107766	613	0	99,51% <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (NC_002516.2)
EFII	MH107104	709	0	99,58% <i>Bacillus atrophaeus</i> strain SRCM101359 (NZ_CP021500.1)
EFIII	MH108122	693	1	99,89% <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (NC_004722.1)
LOII	MH108121	667	0	99,85% <i>Lysinibacillus macroides</i> DSM 54 (NZ_LGCI01000008.1)
LOIII	MH107283	717	0	99,58% <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar konkukian 97-27 (NC_005957.1)

Figura 3- Árvore filogenética das sequências 16S rDNA das bactérias isoladas de resíduos (efluentes e lodo) de uma agroindústria sucroalcooleira brasileira em comparação (% identidade) com outras obtidos do GenBank (NCBI: Centro Nacional de Informações Biotecnológicas).



Neste trabalho, a cepa *B. atrophaeus* - EFII não apresentou atividade antagônica contra os demais isolados testados. Jouzani et al. (2017) também relatam que *B. thuringiensis* é um inseticida microbiológico de sucesso para diferentes espécies de pragas na agricultura, mas tem potencial na biorremediação de diferentes metais potencialmente tóxicos e outros poluentes, além da biossíntese de nanopartículas metálicas, produção de biopolímero de poli-hidroxi-alcanoato e atividades anticancerígenas (devido a parasporinas).

5.7 Bactérias halotolerantes

Apenas o isolado *Lysinibacillus macroides* - LOII foi incapaz de crescer na concentração de 5% de NaCl (**Tabela 11**). Para todas, nenhum crescimento foi observado a 15% de NaCl, e quanto maior a concentração de NaCl, menor foi o crescimento obtido. **Tabela 11-** Resistência ao estresse salino de cinco isolados tolerantes a sais de metais potencialmente tóxicos isoladas em resíduos de agroindústria. (+) = crescimento positivo, (-) = ausência de crescimento.

Estirpes selecionadas	Concentrações de NaCl (%)					
	3	5	9	15	20	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - EFI	+	+	+	-	-	-
<i>Bacillus atrophaeus</i> - EFII	+	+	+	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> - EFIII	+	+	-	-	-	-
<i>Lysinibacillus macroides</i> - LOII	+	-	-	-	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i> - LOIII	+	+	+	-	-	-

Um solo é classificado como salino quando apresenta uma condutividade elétrica de $4,0 \text{ dS.m}^{-1}$ (RIBEIRO, 2010), o que limita o desenvolvimento de algumas culturas. Esse fato pode ocorrer devido a causas naturais do meio ambiente, ou mesmo por interferência de atividades antropogênicas (MUNNS, 2017). Além disso, a aplicação intensiva de fertilizantes com alta concentração de sal também prejudica a germinação das sementes e o desenvolvimento das plantas (WANDERLEY, 2009). A cana-de-açúcar, por exemplo, é moderadamente sensível à salinidade, e a diminuição na produtividade pode chegar a 50% em solos com condutividade elétrica de $10,4 \text{ dS.m}^{-1}$ (PEDROTTI et al. 2015).

5.8 Bactérias promotoras de crescimento vegetal

Dois linhagens (*Pseudomonas aeruginosa* - EFI e *Bacillus cereus* - EFIII) foram capazes de solubilizar fosfato bicálcio no meio sólido. Por outro lado, no meio líquido NBRIP, todos os isolados testados, exceto o *B. atrophaeus* - EFII, demonstraram a capacidade de solubilizar o CaHPO_4 presente (Figura 4A) com redução do valor do pH (Figura 4B). Verificou-se também que todos os isolados foram capazes de fixar biologicamente o nitrogênio e produzir AIA *in vitro* (Figura 5). Por outro lado, *B. atrophaeus* - EFII também fixou nitrogênio e, respectivamente, produziu AIA, mas este isolado não foi capaz de solubilizar o fosfato bicálcio. Assim, estes cinco isolados foram submetidos, para o teste *in vitro*, da avaliação da promoção da germinação de *L. sativa*. Os resultados mostraram que, com exceção de *L. macroides* - LOII, todas os outros quatro isolados inoculados proporcionaram um aumento na taxa de germinação das sementes de *L. sativa*. Então, essa cepa não estava presente no consórcio. De outro modo, o consórcio de bactérias foi o melhor promotor (cerca de 97%) de germinação (Figura 6).

Figura 4- Concentração de fosfato solúvel (A) e pH (B) em culturas de isolados bacterianos em meio líquido NBRIP, após 7 dias ($30 \pm 1^\circ \text{C}$, 120 rpm, escuro).

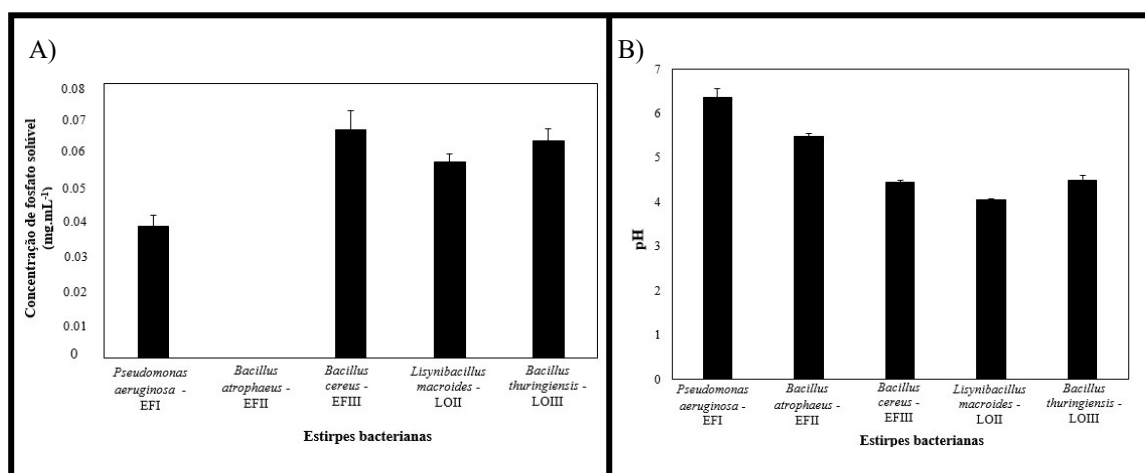


Figura 5- Concentração de Ácido Indol Acético (AIA) em culturas de diferentes isolados bacterianos em meio líquido TSA a 10% contendo triptofano, após 24 horas de incubação sob agitação (30 ± 1 ° C, 120 rpm, escuro).

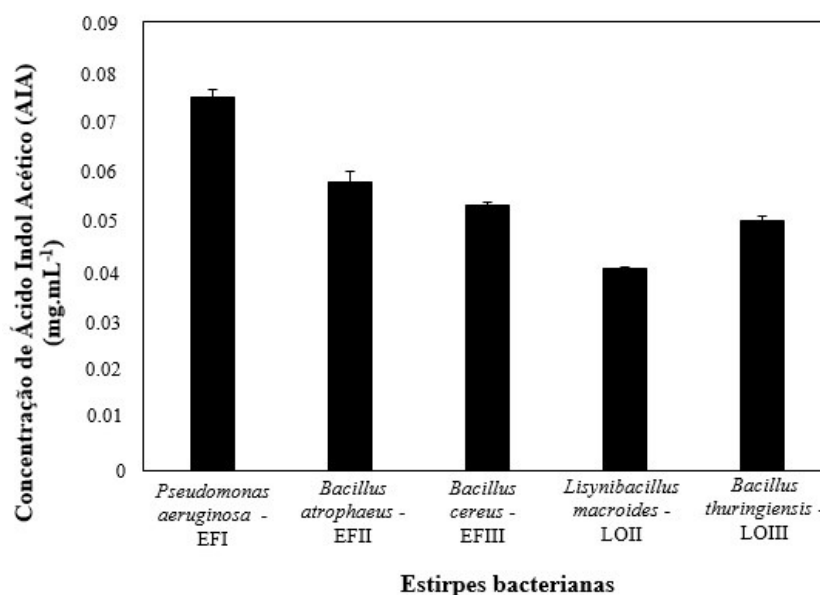
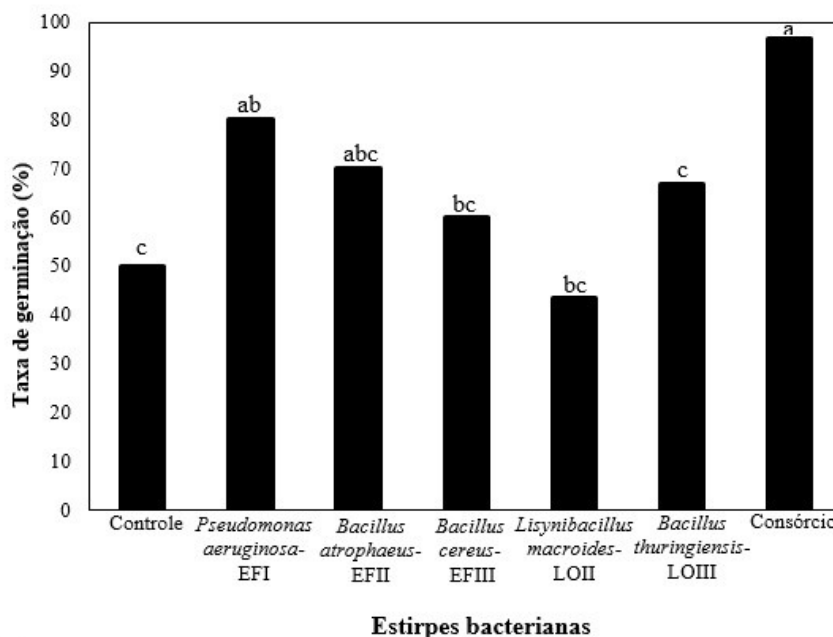


Figura 6- Taxa de germinação (%) de sementes de alface (*L. sativa* L.) inoculadas - individualmente ou em consórcio - em culturas de diferentes isolados bacterianos. As médias seguidas por letras distintas na barra diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Controle = sem inoculação.



Em relação à solubilização de fosfato, Nautyal (1999), comparando o comportamento de diferentes linhagens bacterianas após 7 dias de crescimento em meio

sólido e líquido contendo fosfato, verificou que muitas das culturas sólidas não apresentaram halos de solubilização ao redor das colônias, mas o fosfato solubilizado meio líquido, como foi visto no presente trabalho. Souchie et al. (2005) avaliaram a capacidade e eficiência de bactérias e fungos em solubilizar CaHPO_4 , AlPO_4 e apatita de Araxá em meio sólido, e AlPO_4 e apatita de Araxá em meio líquido. Esses autores constataram que em meio sólido todas as bactérias testadas foram capazes de solubilizar o CaHPO_4 , mas nenhuma solubilizou a apatita de Araxá e apenas um isolado fúngico solubilizou o AlPO_4 , enquanto em meio líquido todos os microrganismos solubilizaram AlPO_4 e apatita de Araxá.

Segundo Chai et al. (2011), os microrganismos solubilizam o fósforo na forma de fosfato de rochas levemente solúveis e os mecanismos que são atribuídos a esses solubilizantes incluem reações de acidificação, quelação e troca de cátions. Matos et al. (2017) verificaram a capacidade de 40 microrganismos, isolados da raiz de bananeira, solubilizarem fosfato, e após 15 dias de incubação em meio de cultura sólido suplementado com duas fontes inorgânicas [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$] e uma fonte de fósforo orgânico (lectina de soja), os pesquisadores descobriram que 67,5% dos microrganismos solubilizaram fosfato bicálcico, 7,5% de lectina de soja, mas nenhum solubilizou o fosfato de ferro.

No presente trabalho, verificou-se uma redução do pH no meio líquido NBRIP ao longo do tempo de incubação, indicando que a maioria dos isolados estudados utilizou o mecanismo de secreção de ácidos orgânicos para solubilizar o fosfato. O principal mecanismo associado à solubilização de fosfato é a redução do pH do meio através da liberação de ácidos orgânicos pelos microrganismos (CHUNGET al. 2005; BARROSO; NAHAS, 2008; GULATI et al. 2010). Como nas pesquisas de Nautyal (1999), foi concluído que a triagem de solubilizadores de fosfato deve ser feita em meio líquido NBRIP. Este meio é amplamente utilizado na seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato. Kelel et al. (2013), por exemplo, isolaram bactérias do solo e estas colônias foram cultivadas neste meio seletivo com 0,5% de fosfato tricálcico. Mardad; Serrano; Soukri (2013) avaliaram a capacidade de três bactérias de uma rocha fosfática para solubilizar fosfato por 7 dias, sob agitação contínua, em meio NBRIP suplementado com fosfato tricálcico, e constatou que o pH caiu de 7,0 para 3,5. No trabalho de Yothi et al. (2013), os autores isolaram uma linhagem bacteriana (*Pseudomonas* sp) do solo rizosférico e analisaram a solubilização de fosfato nos meios NBRIP e Pikovskayis, e o meio mais favorável para a solubilização de fosfato foi o NBRIP. Behera et al. (2017) também

utilizaram o meio NBRIP contendo este composto para avaliar a capacidade de solubilização de fosfato de uma bactéria isolada do manguezal, identificada fenotipicamente e molecularmente como *Serratia* sp. A atividade máxima de solubilização de fosfato foi acompanhada de queda de pH, e a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) detectou a formação de ácidos málico, láctico e acético.

Por outro lado, é de grande importância para a intensificação da agricultura sustentável a redução dos fertilizantes nitrogenados (WEEKLEY; GABBARD; NOWAK, 2012). Para tanto, o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio (ROESCH et al., 2008), associado a outros processos permeados por microrganismos, pode ser essencial para o sucesso da promoção das culturas, principalmente em ambientes extremos. Um desses processos é a produção de AIA, a principal e mais amplamente auxina estudada, e tem aplicação prática na promoção do crescimento de plantas (CHAGAS; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2010; RADWAN; MOHAMED; REIS, 2005). Muangthong; Youpensuk; Rerkasem (2015), por exemplo, isolaram 89 bactérias endofíticas obtidas de folhas, caules e raízes de cana-de-açúcar em meio ágar sem nitrogênio, com o objetivo de selecionar aquelas com capacidade de fixação de nitrogênio, e descobriram que todas as linhagens obtidas tinham essa capacidade. Rodrigues et al. (2016) isolaram bactérias da folha, caule, raiz e rizosfera de uma variedade comercial de cana-de-açúcar (RB 867515) e as caracterizaram antes de realizarem os experimentos de promoção do crescimento vegetal. Entre os isolados, 47% solubilizaram fosfato, 26% fixaram nitrogênio e 57% produziram AIA. Peña-Yam et al. (2017) isolaram e identificaram 9 isolados bacterianos pertencentes a cinco espécies de *Bacillus*, que foram capazes de produzir AIA, solubilizar fosfato e promover o crescimento da pimenta (*Capsicum annuum* L. cv. Jalapeño). Por sua vez, Florentino et al. (2017) avaliaram não apenas a produção *in vitro* de AIA por 19 bactérias diazotróficas cultivadas na presença e ausência de triptofano, assim como o efeito da inoculação dessa linhagem em sementes de *L. sativa* L. Esses autores verificaram que o Trp contribui para a maior produção de AIA, e o excesso produzido por seis cepas cultivadas na presença de Trp interferiu positivamente na germinação e desenvolvimento de plântulas de alface quando comparado ao controle. De acordo com Radhakrishnan; Lee (2016), a qualidade nutricional dos vegetais de folhas verdes pode ser melhorada pela aplicação de microrganismos. Os autores isolaram uma linhagem bacteriana da comida e a identificaram como *B. methylotrophicus*; o efeito benéfico desta bactéria em plantas foi confirmado pelo aumento na taxa de germinação de sementes de *L. sativa* L., *Cucumis melo* L., *Glycine max* L. e *Brassica juncea* L.

Aka; Babalola (2015) verificaram a influência da inoculação bacteriana no crescimento da *Brassicajuncea* e no acúmulo de metais potencialmente tóxicos. Para tal estudo, eles usaram um consórcio (*P. aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis* e *B. subtilis*) tolerante aos metais Ni, Cr e Cd. Seus resultados mostram que a inoculação dessas linhagens bacterianas melhorou a taxa de germinação de sementes e estes isolados no solo aumentam significativamente a quantidade de metais potencialmente tóxicos solúveis. A *Brassica juncea* cultivada em solo com metais potencialmente tóxicos revelou que a inoculação com bactérias tolerantes ao metal não apenas protegia a planta contra os efeitos tóxicos dos metais, mas também aumentava significativamente o crescimento e o acúmulo de metal nas plantas.

Kapilan; Thavaranjit (2015) avaliaram o efeito da inoculação de *Pseudomonas* sp., *B. coagulans*, *Serratia* sp., *Klebsiella* sp., *Bacillus* sp. e *Escherichia coli* na germinação de *Phaseolus vulgaris*, *Vigna sinensis*, *Hibiscus esculentus* e *Beta vulgaris*, e mostraram que apenas *Serratia* sp., *Klebsiella* sp., *B. coagulans* e *E. coli* não tiveram efeito sobre a germinação de sementes. Egamberdieva (2017) relata que o gênero *Bacillus* é encontrado em muitos ambientes e muitas de suas espécies melhoram o crescimento das plantas e a absorção de nutrientes, o que reduz a incidência de doenças de plantas. Além disso, aumentam a resistência das plantas a estresses ambientais adversos, como seca, salinidade, metais potencialmente tóxicos e deficiência de nutrientes. O autor discutiu desenvolvimentos sobre o potencial de espécies de *Bacillus* como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) e agentes de biocontrole para melhorar o crescimento de plantas, a absorção de nutrientes e a tolerância de estresses de plantas a estresses ambientais. Dezesesseis cepas de *B. thuringiensis* pertencentes a diferentes subespécies, por exemplo, foram avaliadas por Raddadi et al. (2008) em relação ao seu potencial para promoção de crescimento de plantas. Estes pesquisadores analisaram vários fatores genéticos (presença de genes que codificam fosfatase ácida, fitase, proteína biossíntese de sideróforos) pela reação em cadeia da polimerase, mas seus fenótipos foram investigados como a produção de AIA, 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase (ACCD) e indolpiruvato descarboxilase (IPDC) e a capacidade de solubilizar o fosfato mineral. Os resultados mostraram que *B. thuringiensis* abriga e expressa vários determinantes do PGP que podem ser muito interessantes em aplicações de campo para aumentar o crescimento das plantas.

No trabalho de Maza et al. (2017), o potencial de linhagens de *Pseudomonas tolaasii* IEXb e *B. atrophaeus* CN4 para promover a produção de biomassa forrageira e

raízes de *Chlorisgayana* cv foram evidenciados. Armada et al. (2015) avaliaram a eficácia individual de *B. thuringiensis*, um consórcio de fungos micorrízicos arbusculares e a combinação de ambos na melhoria do crescimento e fisiologia de plantas de *Zea mays* sob estresse hídrico, compartimentando os resultados com os de plantas não tratadas, todos os quais foram cultivadas em condições de boa irrigação ou sob estresse hídrico. Entre os parâmetros fisiológicos analisados, destacaram-se crescimento, eficiência fotossintética e teor de nutrientes. Sob condições de seca, por exemplo, a inoculação com *B. thuringiensis* aumentou significativamente o acúmulo de nutrientes. Por sua vez, a inoculação com os fungos melhorou a tolerância ao estresse hídrico. A inoculação combinada de ambos os microorganismos diminuiu o dano oxidativo aos lipídios e o acúmulo de prolina induzida pela seca. Assim, o uso desta bactéria é útil para proteger não apenas as plantas nativas contra a seca, mas também uma planta agronomicamente importante, como o milho.

Shabanamol et al. (2018) isolaram e caracterizaram isolados endofíticos diazotróficos com potencial para promoção do crescimento de plantas, biocontrole de amostras de folhas, raízes e caules de várias cultivares de arroz. Entre 18 isolados obtidos capazes de fixar nitrogênio, *L. sphaericus* L1, *Klebsiella pneumoniae* S2 e *B. cereus* R2 produziram importantes hormônios vegetais, além de aumentarem a germinação de sementes e a atividade da planta.

5.9 Produção de biosurfactante e bioemulsificante extracelular

Dos 5 isolados bacterianos testados (*P. aeruginosa* - EFI, *B. atrophaeus* - EFII, *B. cereus* - EFIII, *L. macroides* - LOII e *B. thuringiensis* - LOIII), apenas as amostras livres de células de *B. atrophaeus* - EFII, *B. cereus* - EFIII e *B. thuringiensis* - LOIII foram capazes de colapsar a gota na superfície hidrofóbica. O teste do colapso da gota foi desenvolvido por Jain et al. (1991) para visualização direta da produção do biosurfactante e tem a vantagem de ser sensível e utilizar pequena quantidade de amostra. Além disso, é rápido, fácil de realizar e não usa equipamentos. Viramontes-Ramos et al. (2010) utilizaram o teste do colapso da gota para selecionar microrganismos produtores de biosurfactante isolados de um ambiente contaminado com hidrocarbonetos, e de um total de 324 estirpes analisadas, 17 foram positivas para o teste, sendo a maioria pertencente ao gênero *Pseudomonas*. Já Shoeb et al. (2015), avaliaram diferentes métodos para verificar a produção de biosurfactantes por bactérias isoladas de amostras de água do mar, constatando a eficiência do teste do colapso da gota pois 84% dos isolados apresentaram tal atividade.

A capacidade de formar e estabilizar uma emulsão são indicações de que o microrganismo está produzindo biosurfactante. No presente estudo, a capacidade emulsificante (E₂₄) foi detectada nos isolados *P. aeruginosa* - EFI (tolueno) e *B. atrophaeus* - EFII (tolueno e querosene), enquanto *B. cereus* - EFIII, *L. macroides* - LOII e *B. thuringiensis* - LOIII não foram capazes de emulsificar nenhum dos hidrocarbonetos testados (**Tabela 12**).

Tabela 12-Testes realizados para quantificar a capacidade surfactante e emulsificante dos sobrenadantes livres de células das bactérias, em meio contendo glicose 2% como única fonte carbono (Costa, 2010), após 48 h de incubação.

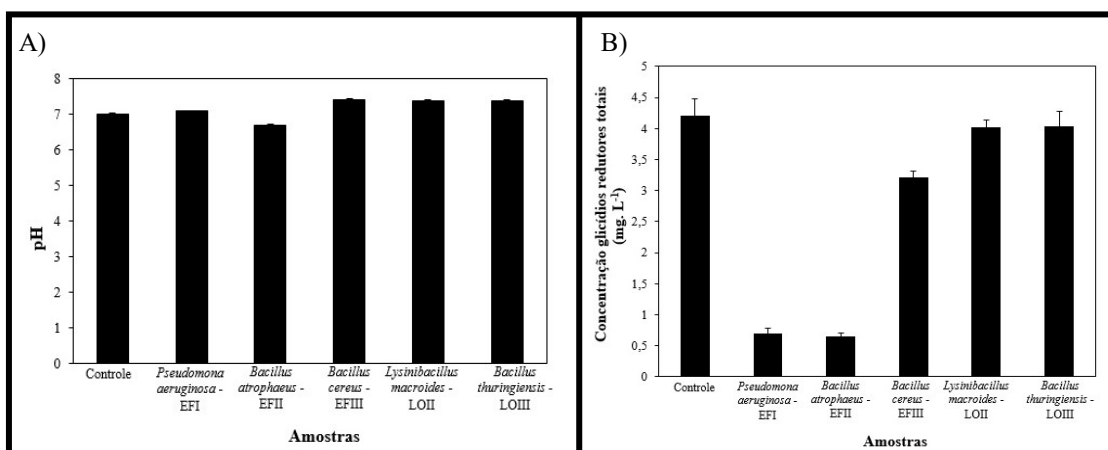
CAPACIDADE SURFACTANTE E EMULSIFICANTE			
Bactérias	PARÂMETROS		
	CAPACIDADE SURFACTANTE	CAPACIDADE EMULSIFICANTE	
	Colapso da Gota	Tolueno	Querosene
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - EFI	-	+	-
<i>Bacillus atrophaeus</i> - EFII	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i> - EFIII	+	-	-
<i>Lysinibacillus macrolides</i> - LOII	-	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i> - LOIII	+	-	-

A capacidade emulsificante na presença de petróleo bruto e querosene foi um dos métodos empregados por Peele; Ch; Kodali (2016) para avaliar a produção de biosurfactante por isolados de *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. provenientes de sedimento contaminado com petróleo, sendo que *Pseudomonas* sp. apresentou uma maior taxa de emulsificação para o querosene. Suryanti et al. (2017), ao realizarem o teste de capacidade emulsificante com uma estirpe de *P. fluorescens* cultivada num meio contendo soro de leite como substrato, obtiveram uma emulsão estável após 30 dias de cultivo, com E₂₄ 59% para o tolueno. Segundo Youssef et al. (2004) os agentes emulsificantes não têm a obrigatoriedade de serem biosurfactantes. Por sua vez, a redução da tensão superficial é um critério bastante utilizado na identificação de biosurfactantes. Sapture et al. (2010) relataram a necessidade da identificação e do tamanho das frações hidrofílicas e hidrofóbicas das moléculas, pois essas são características importantes a serem estudadas para avaliar quais das atividades (biosurfactante ou bioemulsificante) serão mais significativas.

De acordo com Neves et al. (2007), estirpes de *B. atrophaeus* não são patogênicas e são fontes adequadas de biossurfactantes, entre os quais a surfactina. Os autores estimularam a produção de biossurfactante por *B. atrophaeus* ATCC 9372 através de meio de cultivo contendo glicose e /ou caseína. A capacidade da linhagem *B. atrophaeus* de adaptar seu próprio metabolismo para utilizar diversos nutrientes como fontes de energia e preservar altos níveis de biossurfactantes no meio durante a fase estacionária é uma característica promissora para sua possível aplicação em tratamentos biológicos.

O tipo, a qualidade e a quantidade de biossurfactante são influenciados pela natureza da fonte de carbono e nitrogênio, assim como pelas condições operacionais (MULLIGAN; WANG, 2004). Com relação aos valores de pH dos sobrenadantes isentos de células, estes se apresentaram próximos da neutralidade para as amostras de todos os isolados (**Figura 7A**). Souza et al. (2017) estudaram, dentre outros fatores, o controle do pH na produção dessa biomolécula. Os autores observaram que quando o pH não foi controlado na síntese de biossurfactante, ocorreu uma maior redução da tensão superficial. No tocante ao consumo de glicose no meio de produção de biossurfactante, esta foi maior para os isolados *P. aeruginosa*- EFI que apresentou capacidade emulsificante e *B. atrophaeus*- EFII, que apresentou capacidade surfactante e emulsificante (**Figura 7B**).

Figura 7- pH final (A) e Concentração de glicídios redutores totais (B) dos sobrenadantes livres de células das bactérias, em meio contendo glicose 2% como única fonte carbono (Costa, 2010), após 48 h de incubação.



Estudos como os de Duvnjak; Kosaric (1985), Robert et al. (1989); Makkar; Cameotra (1999) demonstraram que a fonte de carbono utilizada para o crescimento bacteriano influencia a produção de diferentes tipos de biossurfactantes. No trabalho de Elazzazy; Abdelmoneim; Almaghrabi (2015), os autores avaliaram a produção de

biosurfactante por bactérias isoladas de amostra de água e do solo do mar em diferentes valores de pH (5, 7, 9, 11 e 12), e tendo a glicose (2 %) como a fonte de carbono, constatando que a produção de biosurfactante aumentou com o aumento do pH até cerca de 11, diminuindo a partir de então, com máxima produção em pH 9. Auhim; Mohamed (2013), por sua vez, haviam verificado que a produção de biosurfactante por uma estirpe bacteriana isolada do solo, identificada como *Azotobacter chroococcum*, em diferentes valores de pH (3, 5, 7 e 9) num meio com diferentes fontes de carbono (óleo 40, óleo 60, óleo 150, azeite, óleo de girassol e óleo de milho) e nitrogênio [extrato de carne, peptona, extrato de levedura, NaNO₃, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄], fora maior em pH 7 (E₂₄% de 68%) e com óleo de girassol e óleo 150 pesado (respectivamente E₂₄% de 76,6 e 74,1%) como fontes de carbono.

O isolado *L. macroides* - LOII pode ter produzido pouca quantidade de surfactante, uma vez que o sobrenadante de sua cultura não foi capaz de colapsar a gota ou emulsificar qualquer dos hidrocarbonetos testados.

5.10 Ação das bactérias selecionadas sobre efluentes: sintético (ES) e agroindustrial (EA)

As Tabelas 13 e 14 mostram os resultados do monitoramento físico-químico do ES após a inoculação com os isolados bacterianos (e consórcio) e incubação (com e sem aeração). Os valores de pH nos tratamentos utilizando as estirpes *P. aeruginosa* - EFI e *B. thuringiensis* - LOIII não apresentaram diferença significativa do controle nas duas situações testadas (com e sem aeração). Já os tratamentos aerados envolvendo os isolados *B. atrophaeus* - EFII, *B. cereus* - EFIII, *L. macroides* - LOII, além do consórcio, apresentaram um decaimento nesse parâmetro. O isolado *L. macroides* - LOII destacou-se, pois na condição de aeração sua população cresceu mais, conforme observado pela D.O. e houve maior redução do pH, corroborando com o fato desse isolado ser aeróbio. O ES inoculado com o consórcio de bactérias apresentou média final de pH de 6,0. No presente estudo, todos os isolados testados apresentaram pH final dentro da faixa de sobrevivência de muitas das bactérias responsáveis pelo tratamento de resíduo líquido, com pH de 4,0 a 9,5 (MANSOR, 1998). Metcalf; AmpEddy (1991) relatam que a faixa ótima de pH para crescimento bacteriano é próximo da neutralidade (entre 6,5 e 7,5).

Tabela 13- Parâmetros físico-químicos avaliados em efluente sintético inoculado por diferentes bactérias ou seu consórcio (exceto controle), após 96 h de incubação (30 ± 1 °C, escuro, 120 rpm de agitação). Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

AERADO							
Bactérias	Controle	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -EFI	<i>Bacillus atrophaeus</i> – EFII	<i>Bacillus cereus</i> - EFIII	<i>Lysinibacillus</i> <i>Macroides</i> - LOII	<i>Bacillus thurigiensis</i> - LOIII	Consórcio
Parâmetros							
D.O. (600 nm)	$0,00 \pm 0,00^d$	$0,34 \pm 0,03^{ab}$	$0,38 \pm 0,02^c$	$0,24 \pm 0,04^{bc}$	$0,37 \pm 0,04^{bc}$	$0,40 \pm 0,00^a$	$0,31 \pm 0,04^{bc}$
pH	$7,11 \pm 0,05^a$	$6,95 \pm 0,05^a$	$6,20 \pm 0,01^b$	$5,99 \pm 0,02^b$	$5,36 \pm 0,16^c$	$7,17 \pm 0,04^a$	$6,03 \pm 0,09^b$
DQO (mg.L⁻¹)	$17.166,60 \pm 3,33^a$	$10.650,00 \pm 1315,86^d$	$14.200,00 \pm 133,33^c$	$13.533,33 \pm 133,33^c$	$10.500,00 \pm 366,67^d$	$15.833,33 \pm 33,33^b$	$13.666,67 \pm 6,67^c$
Nitrato (mg.L⁻¹)	$142,33 \pm 7,20^d$	$565,67 \pm 146,68^c$	$564,00 \pm 18,33^b$	$670,67 \pm 48,33^a$	$651,22 \pm 15,00^a$	$557,33 \pm 1,67^b$	$470,67 \pm 15,00^c$
Nitrito (mg.L⁻¹)	$6,64 \pm 1,25^d$	$8,55 \pm 0,21^d$	$58,26 \pm 3,34^{bc}$	$86,14 \pm 10,38^a$	$65,78 \pm 4,16^b$	$42,92 \pm 4,97^c$	$55,61 \pm 6,07^{bc}$
Amônia (mg.L⁻¹)	$650,25 \pm 1,41^a$	$640,25 \pm 0,00^b$	$646,22 \pm 0,70^b$	$560,69 \pm 9,15^d$	$592,04 \pm 19,05^c$	$642,25 \pm 0,00^b$	$642,71 \pm 5,76^b$
Fosfato (mg.L⁻¹)	$10,47 \pm 1,32^a$	$9,11 \pm 0,19^a$	$9,05 \pm 0,01^a$	$8,74 \pm 0,26^a$	$9,38 \pm 0,64^a$	$9,38 \pm 0,16^a$	$8,44 \pm 0,59^a$

Tabela 14- Parâmetros físico-químicos avaliados em efluente sintético inoculado por diferentes bactérias ou seu consórcio (exceto controle), após 96 h de incubação (30 ± 1 °C, escuro, sem agitação). Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

NÃO AERADO							
Bactérias	Controle	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -EFI	<i>Bacillus atropheus</i> – EFII	<i>Bacillus cereus</i> - EFIII	<i>Lysinibacillus Macroides</i> - LOII	<i>Bacillus thurigiensis</i> - LOIII	Consórcio
Parâmetros							
D.O. (600 nm)	$0,00 \pm 0,00^c$	$0,36 \pm 0,01^{ab}$	$0,25 \pm 0,04^a$	$0,29 \pm 0,01^b$	$0,28 \pm 0,02^a$	$0,41 \pm 0,01^a$	$0,27 \pm 0,04^{ab}$
pH	$7,09 \pm 0,04^a$	$7,13 \pm 0,01^a$	$6,34 \pm 0,01^d$	$6,23 \pm 0,04^e$	$6,87 \pm 0,02^b$	$7,12 \pm 0,04^a$	$6,49 \pm 0,01^c$
DQO (mg.L⁻¹)	$18.333,33 \pm 66,67^a$	$14.000,00 \pm 425,14^d$	$15.933,33 \pm 282,84^b$	$14.800,00 \pm 524,94^c$	$15.800,00 \pm 66,67^{cd}$	$14.466,67 \pm 219,98^{cd}$	$15.733,33 \pm 133,33^d$
Nitrato (mg.L⁻¹)	$135,67 \pm 4,71^{cd}$	$64,55 \pm 1,57^d$	$236,78 \pm 4,16^{bc}$	$440,11 \pm 22,82^a$	$412,33 \pm 24,19^a$	$333,44 \pm 53,70^{ab}$	$389,00 \pm 63,33^a$
Nitrito (mg.L⁻¹)	$8,11 \pm 0,42^c$	$22,71 \pm 2,21^b$	$48,67 \pm 0,72^a$	$43,21 \pm 0,91^a$	$52,65 \pm 4,17^a$	$9,29 \pm 0,95^{bc}$	$52,80 \pm 9,94^a$
Amônia (mg.L⁻¹)	$672,14 \pm 3,06^a$	$664,92 \pm 0,76^{ab}$	$646,96 \pm 11,05^b$	$659,20 \pm 0,70^b$	$662,68 \pm 2,11^{ab}$	$660,19 \pm 0,70^{ab}$	$624,87 \pm 4,92^c$
Fosfato (mg.L⁻¹)	$9,05 \pm 0,28^a$	$8,84 \pm 0,51^a$	$7,89 \pm 0,09^a$	$8,51 \pm 1,11^a$	$8,01 \pm 0,12^a$	$9,08 \pm 0,36^a$	$8,59 \pm 0,35^a$

A amônia, quando não absorvida, é oxidada em nitrito pela ação de bactérias nitrosas, as quais utilizam a energia liberada nessa oxidação para produzir compostos orgânicos. No experimento com ES, observou-se que os isolados que reduziram a concentração de amônia aumentaram a concentração de nitrito e posteriormente de nitrato no meio; tal fato é denominado de processo de nitrificação realizado por bactérias nitrificantes. Por sua vez, a estirpe *P. aeruginosa* - EFI apresenta um processo diferente denominado de desnitrificação, observando-se que o nitrato e a amônia foram transformados em nitrito na condição sem aeração. Esse isolado é aeróbio e utiliza o nitrato para extrair o oxigênio para sobreviver, além de aumentar o pH consumindo o nitrato, o que corrobora com os resultados encontrados nesse trabalho. Com relação aos valores de fósforo totais das amostras, verificou-se que não houve diferença estatística nas duas condições estudadas.

As Tabelas 15 e 16, por sua vez, apresentam os resultados do monitoramento físico-químico do EA após a inoculação com os isolados bacterianos (e consórcio) e incubação (com e sem aeração).

Na condição de incubação sob aeração, os isolados *P. aeruginosa* - EFI e *L. macroides* - LOII apresentaram os maiores crescimentos, conforme a D.O. em EA. Esse fato já era esperado, uma vez que esses são microrganismos aeróbios, e ainda sob essa condição, todos os isolados apresentaram comportamentos estatisticamente semelhantes. Com relação aos valores de pH do meio EA, verificou-se diferença significativa entre os tratamentos aerado e não aerado, embora todos mantivessem o pH na faixa recomendada pela resolução CONAMA 357/2005 (6,0-9,0) para uso em irrigação. O isolado *B. atrophaeus* - EFII foi o que promoveu maior decaimento da concentração de pH, enquanto o consórcio bacteriano proporcionou uma média de pH em torno de 6,0 nas duas condições estudadas. Segundo Piveli (2005), baixos valores de pH podem solubilizar e liberar metais adsorvidos nos sedimentos, influenciando as concentrações de fósforo e nitrogênio, além de decompor a matéria orgânica carbonácea. O valor de pH, conforme tal autor, tem uma relação direta com o processo de manutenção da vida aquática, seja pelo processo de respiração aeróbia ou para a manutenção de um ambiente que possibilite a realização de reações químicas relevantes para a vida.

Exceto no tratamento com o isolado *B. atrophaeus* - EFII (em condição não aerada), todos os demais foram capazes de reduzir a DQO do EA testado. A maior redução foi obtida com aeração, onde o consórcio de microrganismo removeu 14% de matéria orgânica. Os valores altos de DQO podem ser explicados pelo intervalo de adaptação dos isolados bacterianos ao meio, tempo este em que as bactérias sintetizam o complexo enzimático necessário para as reações bioquímicas e as liberam.

Tabela 15- Parâmetros físico-químicos avaliados em efluente agroindustrial inoculado por diferentes bactérias ou seu consórcio (exceto controle), após 96 h de incubação (30 ± 1 °C, escuro, 120 rpm de agitação). Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

AERADO							
Bactérias	Controle	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -EFI	<i>Bacillus atrophaeus</i> -EFII	<i>Bacillus cereus</i> -EFIII	<i>Lysinibacillus macroides</i> -LOII	<i>Bacillus thurigiensis</i> -LOIII	Consórcio
Parâmetros							
D.O. (600 nm)	$0,00 \pm 0,00^f$	$0,40 \pm 0,00^a$	$0,22 \pm 0,00^c$	$0,08 \pm 0,00^c$	$0,41 \pm 0,00^a$	$0,18 \pm 0,00^d$	$0,29 \pm 0,00^b$
pH	$7,01 \pm 0,00^a$	$6,12 \pm 0,09^c$	$5,40 \pm 0,03^c$	$5,81 \pm 0,05^d$	$6,36 \pm 0,03^b$	$6,08 \pm 0,05^c$	$6,02 \pm 0,05^{cd}$
DQO (mg.L⁻¹)	$603,33 \pm 5,77^a$	$568,33 \pm 3,33^{bc}$	$540,00 \pm 0,43^{cd}$	$563,33 \pm 9,42^{bc}$	$566,67 \pm 5,77^{bc}$	$586,67 \pm 32,99^{ab}$	$523,33 \pm 4,71^d$
Nitrato (mg.L⁻¹)	$19,40 \pm 1,65^c$	$19,79 \pm 0,69^c$	$26,73 \pm 0,24^a$	$18,57 \pm 0,10^c$	$25,67 \pm 0,94^a$	$20,46 \pm 0,19^c$	$23,73 \pm 0,71^b$
Nitrito (mg.L⁻¹)	$2,65 \pm 0,12^c$	$3,13 \pm 0,04^{cd}$	$4,29 \pm 0,06^a$	$2,92 \pm 0,06^{de}$	$3,87 \pm 0,03^b$	$3,45 \pm 0,18^c$	$3,36 \pm 0,13^c$
Amônia (mg.L⁻¹)	$65,53 \pm 2,96^a$	$58,16 \pm 1,89^{bcd}$	$58,95 \pm 3,17^{abc}$	$56,72 \pm 3,44^{cd}$	$58,76 \pm 10,60^d$	$59,20 \pm 2,84^{abc}$	$59,90 \pm 7,03^{ab}$
Fosfato (mg.L⁻¹)	$1,03 \pm 0,01^a$	$1,00 \pm 0,01^a$	$1,02 \pm 0,00^a$	$1,04 \pm 0,01^a$	$1,03 \pm 0,01^a$	$1,01 \pm 0,00^a$	$0,99 \pm 0,00^a$

Tabela 16- Parâmetros físico-químicos avaliados em efluente agroindustrial inoculado por diferentes bactérias ou seu consórcio (exceto controle), após 96 h de incubação (30 ± 1 °C, escuro, sem agitação). Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

NÃO AERADO							
Bactérias	Controle	<i>Pseudomonasa eruginosa</i> -EFI	<i>Bacillus atrophaeus</i> -EFII	<i>Bacillus cereus</i> - EFIII	<i>Lysinibacillusm acroides</i> -LOII	<i>Bacillus thurigiensis</i> - LOIII	Consórcio
Parâmetros							
D.O. (600 nm)	$0,00 \pm 0,00^c$	$0,18 \pm 0,01^b$	$0,34 \pm 0,00^a$	$0,35 \pm 0,00^a$	$0,22 \pm 0,02^b$	$0,40 \pm 0,01^a$	$0,42 \pm 0,00^a$
pH	$7,00 \pm 0,00^a$	$6,95 \pm 0,02^c$	$5,85 \pm 0,11^d$	$6,44 \pm 0,03^{bc}$	$6,63 \pm 0,05^b$	$5,97 \pm 0,05^d$	$6,01 \pm 0,00^d$
DQO (mg.L⁻¹)	$607,78 \pm 1,57^a$	$548,33 \pm 1,67^b$	$592,22 \pm 1,57^a$	$550,00 \pm 3,33^b$	$521,67 \pm 5,00^c$	$566,67 \pm 4,71^b$	$558,89 \pm 1,57^b$
Nitrato (mg.L⁻¹)	$18,40 \pm 0,17^b$	$15,73 \pm 0,17^{ab}$	$18,57 \pm 1,00^b$	$20,57 \pm 0,33^a$	$15,79 \pm 2,58^{ab}$	$19,90 \pm 0,33^a$	$17,57 \pm 1,55^{ab}$
Nitrito (mg.L⁻¹)	$2,87 \pm 0,04^{ab}$	$3,94 \pm 0,15^a$	$2,51 \pm 0,53^c$	$3,03 \pm 0,28^b$	$2,68 \pm 0,15^c$	$3,17 \pm 0,27^b$	$2,84 \pm 0,18^{ab}$
Amônia (mg.L⁻¹)	$51,94 \pm 0,63^c$	$52,23 \pm 1,05^c$	$60,97 \pm 1,16^a$	$57,54 \pm 1,37^{ab}$	$56,27 \pm 0,42^b$	$58,06 \pm 0,63^{ab}$	$47,38 \pm 1,16^d$
Fosfato (mg.L⁻¹)	$0,97 \pm 0,01^a$	$0,82 \pm 0,01^b$	$0,78 \pm 0,02^b$	$0,81 \pm 0,01^b$	$0,83 \pm 0,02^b$	$0,81 \pm 0,02^b$	$0,84 \pm 0,01^b$

Shen; Jingqing; Linshuai; (2017) utilizaram um sistema simbiótico microalga-bactéria (*Chlorella vulgaris*-*P.putida*) na remoção de nutrientes no tratamento de águas residuais. O tratamento aplicado mostrou maior remoção de nutrientes e DQO quando comparado com o tratamento individual. Ajao; Adebayo; Yakubu (2011) utilizaram duas estirpes bacterianas (*P. aeruginosa* e *B. subtilis*) imobilizadas para avaliar a capacidade de degradação do efluente de indústria têxtil em bioreator, e verificaram redução de 83% da DQO. Por outro lado, Oljira; Muleta; Jida (2018) relataram isolamento de 40 bactérias de efluentes de cervejaria, com seleção das três estirpes com melhores desempenhos *in vitro* para degradação individualizada ou em consórcio de resíduos (*Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp.), visando biorremediação.

Após 12 dias de incubação sob agitação no efluente de origem em escala de laboratório, a eficiência de remoção para DBO e DQO variou de 73,55% a 94,85% e de 76,78% a 93,25%, respectivamente. A remoção total de nitrogênio e fósforo ficou na faixa de 54,43% a 77,21% e 41,80% a 78,18%, respectivamente. O total de sólidos suspensos, sólidos totais e remoção total de sólidos dissolvidos variou de 66,74% a 90,3%, 54,69% a 88,5% e 53,02% a 88,2%, respectivamente. Os valores de pH e condutividade elétrica variaram de 6,81 a 8,65 e 3,31 mS.cm⁻¹ a 3,67 mS.cm⁻¹, respectivamente. O efluente tratado aumentou a germinação de sementes de *Beta vulgaris* de 80% para 100%, com tempo médio de germinação de 3,1 a 5,2 dias e comprimento de plântulas de 2,3 cm a 6,3 cm. Portanto, o estudo demonstrou ser eficiente para o tratamento de resíduos de cervejarias.

No presente estudo, a aeração favoreceu os isolados na degradação das substâncias orgânicas nitrogenadas presentes no EA, oxidando a amônia. O mesmo não foi observado em condição sem agitação. Segundo Schmidell et al. (2007), a eliminação do nitrogênio de uma água residuária pode ser realizada em duas etapas, isto é, a nitrificação, em que a amônia é convertida em nitrato na presença de oxigênio; e a desnitrificação, a qual ocorre na ausência de oxigênio ou em baixas concentrações de oxigênio dissolvido, reduzindo nitrato no gás N₂, tendo o óxido nítrico e o óxido nitroso como possíveis intermediários lançados na atmosfera em concentrações normalmente baixas.

Tanto no ES como no EA, o isolado *P. aeruginosa* - EFI apresentou as mesmas características em que a amônia e o nitrato foram transformados em nitrito, e o pH do meio aumentou na condição sem aeração. Karimniaae-hamedaan; Kanda; Kato (2004) isolaram uma estirpe bacteriana osmotolerante a 10% de NaCl identificada como *Pseudomonas* sp. com capacidade de remoção de nitrato no cultivo estacionário, sem acumular nitrito como um agente intermediário, o que se assemelha aos resultados obtidos no presente trabalho para o isolado

P.aeruginosa- EFI. Shiet al. (2013) verificaram a capacidade de desnitrificação aeróbica e nitrificação heterotrófica, com pouca acumulação de produtos intermediários da estirpe *Paracoccus versutus* isolada de sedimentos marinhos.

O fósforo e o nitrogênio estimulam o crescimento e a multiplicação de algas e de outros vegetais aquáticos, o que gera a diminuição do oxigênio e a mortalidade acentuada de peixes (RAST; THORNTON, 1996). Em ETEs é comum a detecção de fósforo e de nitrogênio remanescente, este na forma de amônio ou nitrato. As amostras de efluente apresentaram valores de fosfato total (em média $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) acima do aceitável para água doce de classe III (até $0,15 \text{ mg P.L}^{-1}$, CONAMA 357/2005), não ocorrendo diferença estatisticamente significativa do controle nas condições aeradas. Por sua vez, sem aeração as amostras tiveram uma redução na concentração de fosfato total quando comparadas ao controle. Kouraa et al. (2002), no entanto, utilizaram efluente tratado para irrigar batatinha e alface, sendo o valor médio de fósforo total de $2,77 \text{ mg.L}^{-1}$, e ao final da colheita os autores observaram que não ocorreu diferença significativa nos parâmetros físico-químicos do solo após a irrigação.

No trabalho de Du et al. (2017), a remoção biológica de fósforo no tratamento de efluente sintético foi constatada, identificando-se o gênero *Pseudomonas* como o principal participante na adsorção biológica aeróbica de fósforo. Guo et al. (2017) avaliaram a comunidade microbiana existente bem como a atividade simultânea de remoção de nitrogênio e fósforo no lodo ativado de uma ETE que trata esgoto doméstico municipal. Os resultados indicaram a presença de *Proteobacteria*, *Nitrospira*, *Bacteroidetes*, *Actinobactérias* e *Firmicutes*. Dentre eles, foram verificados quais os principais organismos envolvidos na remoção de nitrogênio e fósforo. As bactérias de oxidação aeróbica dominaram as bactérias oxidantes de amônia e anaeróbica. Além disso, foi verificada uma grande quantidade de bactérias com capacidade de acumular polifosfato (4,89 % da população). Kanget al. (2017) isolaram algumas estirpes de lodo ativado de reator biológico de remoção de fósforo. Foi obtida uma estirpe com alta eficiência na remoção de fósforo, a qual foi identificada como *Pseudomonas* sp.

5.11 Ação das bactérias selecionadas sobre lodo em ensaio de compostagem

Os resultados do teste de compostagem são apresentados na **Tabela 17**. Com relação ao crescimento microbiano, observou-se que o número de células recuperadas do substrato compostado diminuiu ao longo do período analisado, tal fato pode ser atribuído a estabilização do processo de compostagem. Neste experimento, verificou-se que não foram atingidas temperaturas termofílicas. A temperatura tem papel fundamental no crescimento dos microrganismos, o qual é influenciado por reações químicas, e que por sua vez são alteradas

por esse parâmetro. Por outro lado, o pH das amostras não variou nos tempos analisados, sendo em geral alcalino. No entanto, os valores de pH do material compostado aumentaram quando comparados com o do lodo bruto, provavelmente devido ao estado da compostagem dos resíduos orgânicos. Jimenez; Garcia (1989), relataram que durante as primeiras horas de seus experimentos de compostagem, o pH decresceu para a faixa de 5, aumentando com a evolução do processo e estabilização do produto em pH 7-8. Valores de pH baixos são indicativos de falta de maturação devido à curta duração do processo ou à ocorrência de processos anaeróbios no interior da pilha de compostagem. Correia (2009) relata que, em caso de acidez do lodo é necessário corrigir o pH para favorecer a decomposição orgânica. Costa et al. (2013) encontraram um pH 7,9 para o lodo proveniente de ETE, a qual opera com duas etapas: digestão aeróbia e estabilização anaeróbia em lagoas de decantação, sendo o lodo utilizado para aplicação agrícola. Portanto, os valores de pH encontrados no ensaio de compostagem de lodo deste trabalho estão de acordo com aqueles favoráveis ao processo.

No tocante à CE, esta não ultrapassou $200 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ em todos os tratamentos. No intervalo de 15 dias todas as amostras, com exceção do consórcio, apresentaram CE menor, quando comparadas ao lodo bruto destacando-se o isolado *B. thuringiensis* - LOIII, o qual apresentou uma redução de 20% na CE. Brady; Weil (2013) relatam que valores de $\text{CE} \geq 4.000 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ são altos, contudo, algumas culturas são sensíveis a CE próximas de $1.000 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Segundo Freire; Freire (2007) a presença de sais em excesso pode prejudicar o crescimento das plantas devido os efeitos diretos, causados pelos íons tóxicos presentes em elevadas concentrações.

A umidade das amostras variou para alguns tratamentos e aos 45 dias do processo observaram-se as menores reduções de umidade, ressaltando que no mesmo intervalo foram obtidas as menores temperaturas e pH. Valores elevados de umidade podem desfavorecer a utilização desse resíduo na agricultura, e segundo Prosab (1999), valores altos de umidade no lodo acarretam elevados custos de transporte até o local de destino.

As maiores concentrações de CO foram detectadas aos 45 dias em todos os tratamentos, sendo o maior valor de CO alcançado nos tratamentos com *P. aeruginosa* - EFI e *B. atrophaeus* - EFII, onde o teor foi aumentado em 42 % quando comparado ao teor encontrado no lodo bruto. Por outro lado, aos 75 dias de tratamento a diminuição do teor de carbono orgânico foi evidenciada (Tabela 17), o que revela a decomposição e estabilização da matéria orgânica promovida pelos microrganismos. Inicialmente, a diminuição do carbono orgânico pode não parecer ser vantajosa, visto que ao final do processo haverá menos quantidade no material. Devido à presença de nutrientes minerais solúveis dos vegetais, ao fim do processo de compostagem haverá nutrientes e húmus, essenciais para beneficiar o solo. As substâncias

húmicas e a matéria orgânica em elevado estágio de degradação apresentam grupos funcionais em sua estrutura molecular que lhes conferem excelente resposta na complexação de metais. Já a capacidade de agregação de ácidos húmicos e fúlvicos deve-se ao alto teor de grupos funcionais contendo oxigênio, tais como carboxilas, hidroxilas fenólicas e carbonilas de vários tipos (JORDÃO et al. 1993). A manutenção de níveis mínimos de MO no solo é importante, pois controla a erosão, mantém a produtividade e auxilia na recuperação de áreas e solos degradados. Além disso, no processo de decomposição da matéria orgânica, a aeração é um fator fundamental, uma vez que favorece o metabolismo dos microrganismos aeróbios (KIEHL, 1998).

Os valores de nitratos das amostras variaram com os tratamentos durante todo o período estudado. Segundo Ferreira; Andreoli (1999) os teores de nitrogênio no biossólido deve ser determinado quando esse produto é destinado a utilização agrícola, devido a alta mobilidade no deslocamento do nitrato para a zona radicular das culturas agrícolas, podendo acarretar em impactos ambientais, tais como a qualidade da água subterrânea. No entanto, o substrato utilizado não é rico em nitrogênio, o que acarreta numa alta relação C:N, o que dificulta o processo de compostagem como um todo e aumenta a metabolização aeróbica do nitrogênio orgânico, convertendo-o em amoniacal. Assim, com o transcorrer da decomposição, pode ser transformado a nitratos (nitrificação), fenômeno este acidificante que contribui para que o composto maturado seja mais ácido. Durante a compostagem deve ocorrer a estabilização dos resíduos orgânicos devido ao aumento das bactérias nitrificantes. No entanto, em condições de anaerobiose, o nitrato pode ser perdido por desnitrificação, um fenômeno com efeito alcalinizante (OLIVEIRA; DANTAS, 1995). No presente trabalho, 45 dias após o início da compostagem, observou-se a maior concentração de nitratos para o tratamento com o isolado *B. thurigiensis*- LOIII. Os valores de nitritos não foram detectados em intervalos ≤ 15 dias exceto para o consórcio; e nas demais amostragens estes valores foram baixos, provavelmente devido à conversão aeróbica a nitratos, anaeróbica em nitrogênio e em seguida a amônia.

Tabela 17- Parâmetros físico-químicos avaliados na compostagem de solo + lodo (proveniente da primeira lagoa de sedimentação da ETE de uma agroindústria sucroalcooleira), 15, 45 e 75 dias após a inoculação por diferentes bactérias ou seu consórcio, em condição de casa-de-vegetação. Médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Isolados Bacterianos	Di as	UFC (cel.g ⁻¹)	T (°C)	pH	C. E. (µc.cm ⁻¹)	Umidade % 60-65 °C	Umidade % 100-105 °C	C.O. (%)	Nitrato (mg.kg ⁻¹)	Nitrito (mg.kg ⁻¹)	Fosfato Total (mg.kg ⁻¹)	Fosfatase Alcalina (U.L ⁻¹)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EFI	15	5,46 ± 0,04 ^a	31,00 ± 0,00 ^a	7,80 ± 0,06 ^a	85,00 ± 7,07 ^b	16,66 ± 0,26 ^b	17,45 ± 1,96 ^b	5,28 ± 0,00 ^b	2,71 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	2,28 ± 0,02 ^b	13,78 ± 0,90 ^b
	45	4,93 ± 0,03 ^a	26,00 ± 0,00 ^b	7,96 ± 0,04 ^a	95,00 ± 7,07 ^b	29,90 ± 1,79 ^a	27,92 ± 2,25 ^a	7,32 ± 0,34 ^a	4,61 ± 0,00 ^a	0,40 ± 0,02 ^a	2,33 ± 0,06 ^b	13,78 ± 4,48 ^a
	75	3,73 ± 0,03 ^b	31,00 ± 0,00 ^a	7,57 ± 0,02 ^a	135,00 ± 21,2 ^a	7,80 ± 0,34 ^c	11,50 ± 0,71 ^c	3,72 ± 1,02 ^c	2,95 ± 0,22 ^b	0,47 ± 0,05 ^a	2,77 ± 0,04 ^a	59,27 ± 0,00 ^a
<i>Bacillus atrophaeus</i> EFII	15	5,61 ± 0,14 ^a	31,67 ± 0,47 ^a	7,82 ± 0,80 ^a	85,00 ± 7,07 ^c	19,36 ± 0,24 ^b	20,07 ± 2,31 ^b	4,92 ± 0,17 ^b	2,53 ± 0,44 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	2,36 ± 0,11 ^b	6,89 ± 0,00 ^c
	45	4,36 ± 0,14 ^b	26,00 ± 0,00 ^b	8,17 ± 0,03 ^a	120,00 ± 0,00 ^b	36,73 ± 0,88 ^a	33,47 ± 4,12 ^a	7,32 ± 0,34 ^a	4,61 ± 1,08 ^a	0,47 ± 0,05 ^a	2,20 ± 0,09 ^b	12,40 ± 0,00 ^b
	75	3,96 ± 0,03 ^b	30,67 ± 0,00 ^a	7,74 ± 0,04 ^a	180,00 ± 14,14 ^a	8,53 ± 0,47 ^c	6,80 ± 0,28 ^c	3,24 ± 0,34 ^c	4,61 ± 1,08 ^a	0,45 ± 0,07 ^a	2,83 ± 0,05 ^a	44,11 ± 0,00 ^a
<i>Bacillus cereus</i> EFII	15	5,17 ± 0,14 ^a	31,00 ± 0,47 ^a	7,86 ± 0,03 ^a	100,00 ± 0,00 ^c	17,80 ± 1,07 ^b	21,87 ± 6,23 ^a	5,64 ± 0,34 ^a	0,98 ± 0,17 ^b	0,00 ± 0,00 ^c	2,34 ± 0,08 ^b	8,27 ± 0,00 ^b
	45	4,82 ± 0,14 ^a	26,00 ± 0,00 ^b	8,01 ± 0,08 ^a	135,00 ± 0,00 ^b	34,37 ± 0,95 ^a	36,25 ± 2,13 ^b	5,76 ± 0,00 ^a	1,15 ± 0,00 ^b	0,29 ± 0,03 ^b	2,26 ± 0,09 ^b	0,00 ± 0,00 ^c
	75	4,30 ± 0,04 ^b	31,00 ± 0,00 ^a	7,78 ± 0,02 ^a	160,00 ± 0,00 ^a	8,87 ± 3,63 ^c	10,13 ± 1,42 ^c	5,58 ± 0,08 ^a	3,85 ± 0,00 ^a	0,37 ± 0,00 ^a	2,72 ± 0,01 ^a	41,35 ± 0,00 ^a
<i>Lysinibacillus macroides</i> LOII	15	5,66 ± 0,07 ^a	32,00 ± 0,47 ^a	8,02 ± 0,03 ^a	80,00 ± 0,00 ^c	19,00 ± 1,04 ^b	21,62 ± 2,08 ^b	5,40 ± 0,00 ^b	0,86 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^c	2,29 ± 0,08 ^b	13,78 ± 0,00 ^b
	45	5,46 ± 0,14 ^a	26,67 ± 0,17 ^b	8,05 ± 0,01 ^a	140,00 ± 0,00 ^b	39,35 ± 1,94 ^a	41,28 ± 1,95 ^a	6,54 ± 0,08 ^a	1,03 ± 0,22 ^b	0,28 ± 0,06 ^b	2,34 ± 0,07 ^b	8,27 ± 1,95 ^c
	75	3,71 ± 0,07 ^b	31,00 ± 0,00 ^a	7,61 ± 0,03 ^a	195,00 ± 0,00 ^a	10,33 ± 0,92 ^c	6,68 ± 0,84 ^c	3,66 ± 0,08 ^c	2,69 ± 0,00 ^a	0,35 ± 0,03 ^a	2,67 ± 0,09 ^a	35,84 ± 1,95 ^a
<i>Bacillus thurigiensis</i> -LOIII	15	5,11 ± 0,62 ^a	31,33 ± 0,47 ^a	7,83 ± 0,03 ^a	80,00 ± 0,00 ^c	20,48 ± 1,18 ^b	22,50 ± 4,57 ^b	6,00 ± 0,00 ^a	2,35 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	2,40 ± 0,12 ^b	8,27 ± 0,00 ^c
	45	4,65 ± 0,17 ^b	26,00 ± 0,00 ^b	8,13 ± 0,01 ^a	110,00 ± 0,00 ^b	35,87 ± 5,91 ^a	35,65 ± 8,60 ^a	6,24 ± 0,34 ^a	10,96 ± 0,82 ^a	0,42 ± 0,09 ^b	2,46 ± 0,17 ^b	13,78 ± 0,97 ^b
	75	3,16 ± 0,03 ^c	32,00 ± 0,00 ^a	7,63 ± 0,02 ^a	200,00 ± 0,00 ^a	13,73 ± 1,92 ^c	10,80 ± 2,55 ^c	2,52 ± 0,00 ^b	4,48 ± 0,44 ^b	0,48 ± 0,06 ^a	2,91 ± 0,07 ^a	38,59 ± 0,00 ^a
Consórcio	15	5,42 ± 0,06 ^a	32,00 ± 0,00 ^a	7,85 ± 0,06 ^a	125,00 ± 7,07 ^b	20,48 ± 2,20 ^b	18,74 ± 2,06 ^b	5,52 ± 0,00 ^b	2,22 ± 0,00 ^b	0,56 ± 0,06 ^a	2,76 ± 0,20 ^a	22,06 ± 0,00 ^b
	45	4,49 ± 0,23 ^b	27,00 ± 0,00 ^b	8,16 ± 0,09 ^a	127,00 ± 7,07 ^b	35,88 ± 0,59 ^a	29,91 ± 1,15 ^a	6,00 ± 0,17 ^a	1,67 ± 0,44 ^c	0,28 ± 0,03 ^c	2,29 ± 0,12 ^b	4,13 ± 0,00 ^c
	75	3,80 ± 0,12 ^c	32,00 ± 0,00 ^a	7,53 ± 0,01 ^a	165,00 ± 7,07 ^a	13,73 ± 2,65 ^c	8,50 ± 0,98 ^c	3,84 ± 0,60 ^c	2,93 ± 0,22 ^a	0,35 ± 0,03 ^b	2,71 ± 0,08 ^a	46,87 ± 0,00 ^a

Ainda com relação aos ensaios de compostagem, aos 75 dias a concentração de fosfatos aumentou em todos os tratamentos, e tal resultado corrobora os da atividade da enzima fosfatase alcalina. Para Mendes et al. (2001), as atividades enzimáticas refletem as propriedades bioquímicas do solo, cujos resíduos orgânicos são metabolizados por elas. Isso determina a estrutura do solo e a ciclagem de nutrientes para plantas, etc., destacando-se as fosfatases (ácida e alcalina) que atuam no ciclo do fósforo. Essas enzimas são secretadas pelas raízes das plantas e pelos microrganismos presentes no solo (NAHAS et al. 1994) e são responsáveis pela hidrólise de ésteres de fosfatos, transformando o fósforo orgânico em solúvel. Os lodos típicos de esgoto são ricos em MO, contém nitrogênio (4%), fósforo (2%), potássio (0,3%) e outros macros e micronutrientes, os quais fornecem quantidades necessárias exigida para cada tipo de planta, sendo que o uso indiscriminado pode causar efeito tóxico (Pessoa, 2011).

5. 12 Definição do consórcio microbiano e crescimento dos microrganismos em meios sintético e de baixo custo

Para os ensaios de bioaugmentação das lagoas da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, foram selecionadas 4 bactérias previamente isoladas (*Pseudomonas aeruginosa* – EFI, *Bacillus atrophaeus* – EFII, *Bacillus cereus* – EFIII e *Lysinibacillus macroides* – LOII) e 2 fungos (*Phanerochaete chrysosporium* – PC e *Mucor* sp – 2A). Tais microrganismos foram selecionados devido às suas características metabólicas e fisiológicas, além de não apresentarem interação antagônica.

A biorremediação de efluente industrial com alta carga orgânica pode ser realizada por meio de consórcios microbianos. Por exemplo, Divya et al. (2016), testaram um consórcio de isolados preparados com 50% de *Bacillus* e 50% de *Aeromonas* (isolados de amostras de águas residuais) e observaram 67,51% de remoção de amônia de efluentes de processamento de frutos do mar. Chowdhury et al. (2011), os autores desenvolveram um consórcio microbiano composto por microrganismos isolados de local de reciclagem de lixo da cidade de Calcutá, na Índia, e que recebe alta concentração diária de metais potencialmente tóxicos, visando o tratamento de águas residuais com esse tipo de material. O estudo de biorremediação em escala de laboratório indicou eficiência do consórcio, uma vez que em 48 h foi removido 83,68% de chumbo da água destilada e 94,4% da água Bheri suplementada com 5 mM de sal nitrato de chumbo.

Gaikwad et al. (2014) isolaram 5 espécies microbianas de diferentes fontes e avaliaram o seu potencial de degradação individual e associado em reatores, monitorando-se alguns parâmetros físico-químicos. O consórcio microbiano foi composto por *Pseudomonas* sp., *Actinomycetes* sp., *Bacillus* spp., *Streptomyces* sp. e *Staphylococcus* sp. e, nas condições

testadas, apresentou redução de DQO e DBO de até 90,17% e 94,02%, respectivamente, sendo esta redução menor quando se utilizou as espécies microbianas individuais, a qual variou de 42,11 a 59,76% para DQO e 58,55 a 77,31% para DBO.

Al-Wasify et al. (2017) também isolaram 5 espécies bacterianas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus hira*) e 3 cepas fúngicas (*Alternaria* sp., *Fusarium* sp. e *Aspergillus* sp.) de local contendo poluentes orgânicos e outros, a fim de utilizá-los no processo de biodegradação de efluentes de laticínios. Os consórcios bacterianos e fúngicos foram preparados separadamente antes de serem testados, mas os resultados foram promissores na remoção de orgânicos (78,7% e 74,7% para bactérias e fungos, respectivamente) e de sólidos totais em suspensão (99 % de eficiência para bactérias e fungos). A biodegradação de águas residuais lácteas, dependendo dos microrganismos locais, é uma tecnologia eficaz, barata e ecológica.

A espécie *Bacillus cereus*, uma das bactérias isoladas e selecionadas para compor o consórcio, é eficiente na biorremediação de efluentes de origem industrial. Banerjee; Ghoshal (2016) utilizaram duas linhagens de *B. cereus* a fim de avaliar a eficiência dessas cepas na degradação de fenol em efluente de uma indústria petrolífera. Os autores registraram uma remoção de DQO de 95% em experimento realizado em biorreator. Gawai; Mogha; Prajapati (2017) também utilizaram estirpes de *B. cereus* no tratamento de efluente lácteo em escala piloto. Os autores obtiveram excelentes resultados nos parâmetros avaliados, apresentando redução de 50,68% de DQO, 44,07% de DBO, aumento no valor de pH de 6,7 para 8,54 e aumento de 44,06% de STD.

A utilização de *Lysinibacillus* sp. na biorremediação também já é reportada na literatura. Saratale et al. (2013) avaliaram a capacidade de descoloração e de degradação de efluente têxtil por esse gênero bacteriano e obtiveram eficiência de até 87% de descoloração e de 69% de degradação no tratamento desse efluente. Apesar do tratamento de efluentes utilizando bactérias ser bastante evidenciado, devido à degradação de compostos de carbono e de nitrogênio presentes, os fungos têm demonstrado potencial para serem aplicados nesse tipo de tratamento. Bhanja et al. (2014), por exemplo, utilizaram fungos individualmente (*Mucor circinelloides* MTCC1297 e *Trichoderma reesei* NCIM992) que foram eficientes na remoção de DQO (88,72% e 86,75%, respectivamente) de efluente industrial. Por outro lado, consórcios fúngicos também têm se mostrado eficientes na biorremediação, como reportado por Djelal; Amrane (2013). Para isso, os autores utilizaram *Aspergillus niger*, *Mucor hiemalis* e *Galactomyces geotrichum* na bioaugmentação de efluente lácteo em escala-piloto, e obtiveram remoção de até 75% de DQO. Pakshirajan; Kheria (2012) utilizaram *Phanerochaete chrysosporium* para tratar

efluente de indústria têxtil em reator biológico. A eficiência da remoção de DQO foi comprovada, bem como a descoloração do efluente estudado.

A utilização de consórcios microbianos também é reportada na literatura, uma vez que a relação entre bactérias e fungos contribui para a estabilização da matéria orgânica dissolvida (ZHAO et al. 2019). Song et al. (2018) utilizaram um consórcio microbiano para melhorar a eficiência da compostagem de resíduos alimentares. Os resultados desses autores revelaram que o consórcio microbiano acelerou a degradação de compostos proteicos e a formação de materiais complexos semelhantes a húmicos.

Os isolados fúngicos (*Phanerochaete chrysosporium* – PC e *Mucor* sp – 2A) e os bacterianos (*Pseudomonas aeruginosa* – EFI, *Bacillus atrophaeus* – EFII, *Bacillus cereus* – EFIII e *Lysinibacillus macroides* – LOII) deste estudo foram capazes de crescer no meio de baixo custo. A produção de células já aumentara após 24 h de cultivo, exceto para *Bacillus atrophaeus* – EFII (Figuras 8 e 9), mas após 96 h de incubação o meio de baixo custo continuou apresentando maior crescimento populacional em comparação com o meio sintético (caldo nutriente ou extrato de malte).

Figura 8- Crescimento fúngico: A) (*Phanerochaete chrysosporium* - PC), B) *Mucor* sp–2A), após 24, 48, 72 e 96 h de incubação no meio sintético e no de baixo custo (30 ± 1 °C, no escuro, com aeração de 140 rpm).

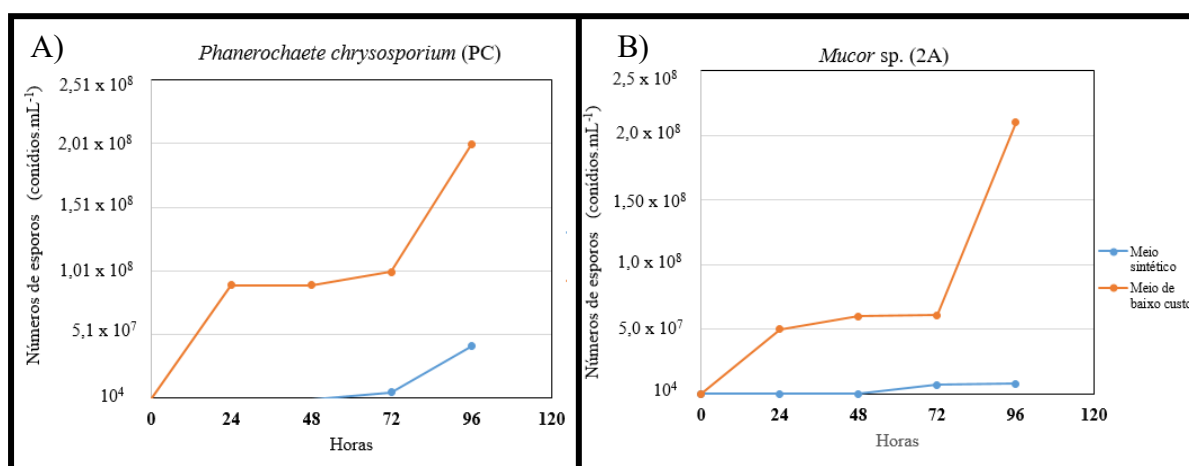
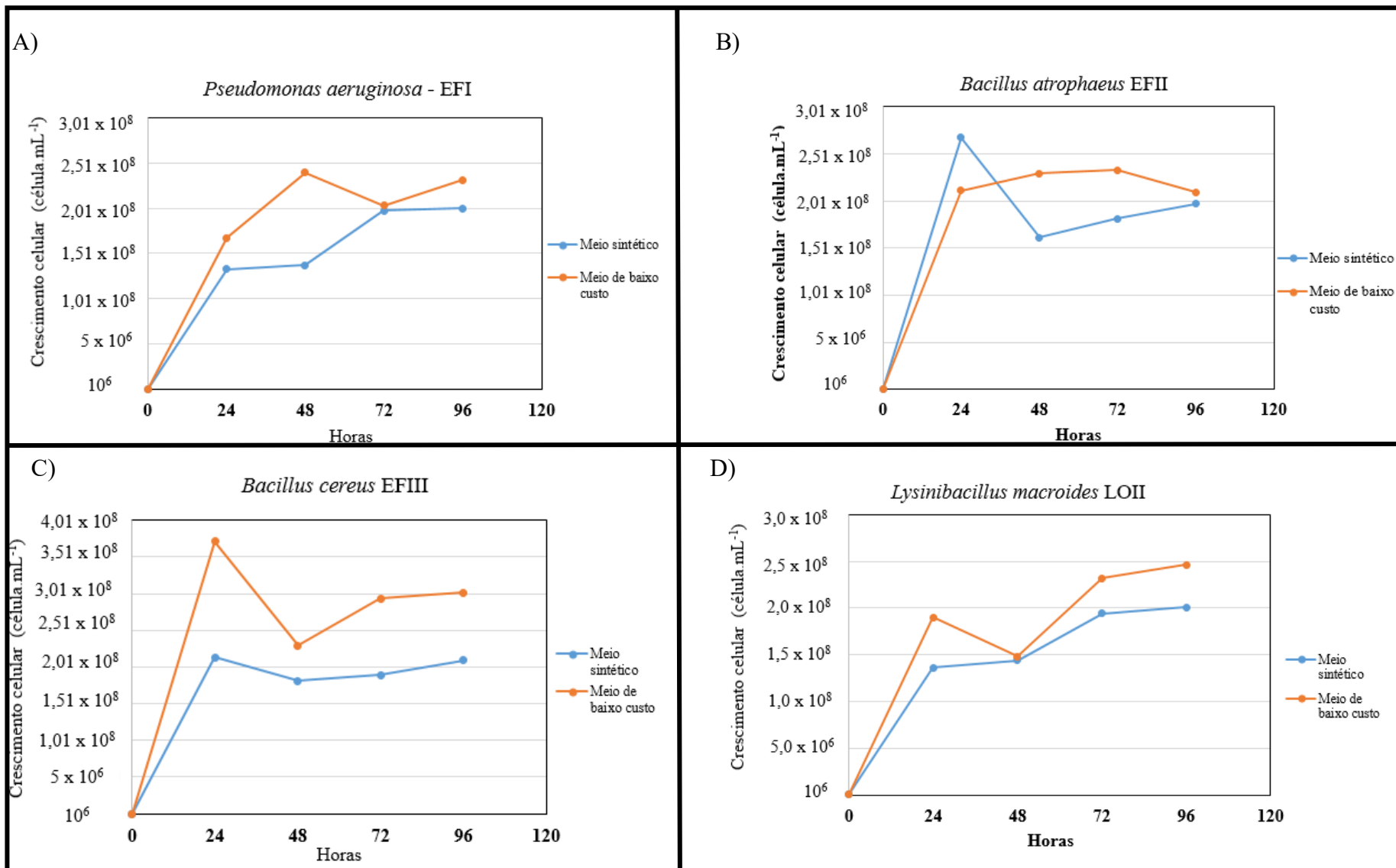


Figura 9- Crescimento bacteriano: A) *Pseudomonas aeruginosa*- EFI; B) *Bacillus atrophaeus*- EFII; C) *Bacillus cereus*-EFIII e D) *Lysinibacillus macroides* LOII, após 24, 48, 72 e 96 h de incubação no meio sintético e no de baixo custo (30 ± 1 °C, no escuro, com aeração de 140 rpm).



Verificou-se, no presente trabalho, que o meio de baixo custo contendo ração animal com elevado teor de proteína, e resíduos agroindustriais, é uma alternativa eficiente para o crescimento de microrganismos (bactérias e fungos) em comparação aos meios sintéticos e já bastante empregados no cultivo de tais microrganismos, além de ser economicamente viável (**Apêndice 2**).

A utilização de substratos agroindustriais renováveis de baixo custo (tais como como sacarose, amido, amido hidrolisado, xarope de milho e melaços residuais) é interessante para o desenvolvimento de qualquer processo biotecnológico. Além de agregar valor aos subprodutos gerados, a contribuição para minimizar os problemas ambientais é compensadora em relação aos custos de produção de meios de cultura sintéticos. É importante salientar que para minimizar os custos com biorremediação em ETEs, alguns critérios devem ser adotados. Entre eles, está a seleção adequada dos microrganismos e as condições de manutenção dos mesmos para que seja viável a sua aplicação em grande escala e em condições de campo.

5.13 Monitoramento da biorremediação de efluentes da estação de Tratamento (ETE) da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, Matriz Alagoas

O tratamento por bioaugmentação foi avaliado durante a safra 2018/2019. Nesse período, a Lagoa A (receptora de águas de lavagem de cana e caldeiras) apresentou as temperaturas mais elevadas, atingindo valores acima de 40 °C, e os menores valores de OD (0,80 mg O₂. L⁻¹) (Tabela 18). Tais valores de temperatura são decorrentes de despejos de origem industrial e resultam na redução do oxigênio dissolvido, devido à dificuldade de difusão do oxigênio atmosférico e ao estímulo às atividades biológicas locais, caracterizando outros parâmetros como a densidade, viscosidade e pressão de vapor do meio líquido (SANTOS, 2009; VON SPERLING, 2005). Apesar de essencial à vida aeróbica, o oxigênio é fator significativo na corrosão de tubulações de ferro e aço, e varia em função da temperatura da água e pressão atmosférica. Reduções significativas nos teores de oxigênio dissolvido são provocadas por despejos principalmente de origem orgânica (CREPALLI, 2007; VON SPERLING, 2005). Por outro lado, o ponto de pós-tratamento (Lagoa G), apresentou temperatura máxima de 33,85 °C e as maiores concentrações de OD (de 1,20 a 2,80 mg O₂.L⁻¹), adequando-se para fins de irrigação, embora não para consumo animal e humano.

Os valores mais ácidos de pH detectados na Lagoa A (Tabela 18), devem-se, entre outros compostos, à presença de óleos lubrificantes e ácidos orgânicos provenientes do processamento de caldo de cana e bagacilho no ponto amostrado, já que é um despejo de origem agroindustrial. A maioria das amostragens da Lagoa G, por outro lado, apresentaram valores de pH entre 5 e

6, e considerando-se que o cultivo de cana-de-açúcar em latossolo argiloso amarelo requer pH de 4 - 8,5, as águas dessa lagoa mostraram-se adequadas para a irrigação dessa cultura nesse solo. De acordo com Libânio (2005), os valores de pH estão diretamente relacionados ao grau de solubilidade de diversas substâncias e à distribuição nas formas livres e ionizadas de diversos compostos químicos, o que também define o potencial de toxicidade de alguns elementos. As amostras da Lagoa G apresentaram as maiores médias mensais de alcalinidade a bicarbonato no período avaliado (**Tabela 18**), cujos valores são suficientes para a manutenção do pH próximo da neutralidade. Elevados valores de alcalinidade nos corpos hídricos representam os processos de decomposição da matéria orgânica, a atividade respiratória dos microrganismos e o lançamento de efluentes industriais (LIBÂNIO, 2005).

No período avaliado, os maiores valores de DQO – acima do valor recomendado (150 mg.L⁻¹ para águas de classe III), isto é, para lançamento direto em cursos de água para abastecimento – (**Tabela 19**), como esperado, estavam na Lagoa A (receptora de águas de lavagem de cana e caldeiras), principalmente em outubro de 2018 (média mensal de 632,22 mg O₂.L⁻¹), por conta de todo o conteúdo do efluente agroindustrial, em especial bagacilho. Por sua vez, foi constatada a redução de matéria orgânica (72,50 %) da Lagoa A para a Lagoa G (pós-tratamento biológico). Poi et al. (2017) estabeleceram um consórcio composto por 22 culturas puras, sendo a maioria delas cepas de *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp., que, juntas, formam um biofilme com capacidade de degradar efluentes contaminados com fenol. Os resultados mostraram que os consórcios microbianos testados reduziram a toxicidade fenólica das águas residuais, uma vez que diminuíram o valor da concentração de DQO presente. Por sua vez, Venkateswar et al. (2018) utilizaram bactérias celulolíticas isoladas de amostras de solo poluído com efluentes de fábricas de papel e celulose, para desenvolver um consórcio microbiano eficiente na redução de DBO, DQO, fosfato e compostos nitrogenados nas lagoas de aquicultura. Os resultados indicaram que o consórcio de microrganismos foi eficiente na redução das concentrações dos parâmetros analisados nas lagoas sob estudo, demonstrando que foram fundamentais para melhorar a qualidade da água dos tanques de aquicultura.

Tabela 18- Temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, pH, alcalinidade total, condutividade elétrica, sólidos totais sedimentáveis, sólidos totais dissolvidos e turbidez das amostras coletadas nas lagoas A e G da ETE da agroindústria estudada (Coruripe-AL), no período de 09/10/2018 a 16/04/2019.

Parâmetros	Lagoas	2018				2019			
		Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril
Temperatura (°C)	A	40,50±0,21	39,33±1,15	40,80±2,12	37,65±2,19	44,90±1,70	37,75±4,31	41,10±0,28	39,10±1,80
	G	30,70±0,50	30,70±0,60	32,65±0,21	33,80±1,56	33,60±0,80	32,75±1,06	33,85±0,24	33,40±0,70
Oxigênio Dissolvido (mg O ₂ .L ⁻¹)	A	0,90±0,01	0,80±0,00	0,92±0,00	0,86±0,02	0,90±0,01	0,85±0,00	1,05±0,03	1,80±0,03
	G	2,80±0,01	1,20±0,01	1,50±0,00	1,70±0,00	1,60±0,20	1,30±0,03	1,85±0,10	1,70±0,02
pH (Uph)	A	4,11±0,39	4,53±0,45	4,30 ± 0,56	4,72±0,80	4,51±0,71	4,68±0,78	4,44±0,65	4,61±0,56
	G	4,81±0,21	4,81±0,17	5,50±0,17	5,97±0,70	6,22±0,22	6,16±0,12	6,34±0,27	6,07±0,10
Alcalinidade Total (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	A	0,00±0,00	9,70±1,67	53,35±7,54	77,60±5,48	29,10±1,71	72,75±6,86	63,05±4,29	48,50±1,78
	G	9,70±1,68	109,93±40,38	140,65±48,01	130,95±6,86	145,50±5,87	135,80±27,44	164,90±41,15	48,50±0,97
Condutividade Elétrica (µS.cm ⁻¹)	A	1100,00±27,83	1223,33±27,73	1100,00±28,28	895,00±7,07	1200,00±9,77	965,00±7,87	900,00±5,72	630,00±1,67
	G	890,00±32,35	1173,33±37,60	1060,00±47,10	920,00±28,28	700,00±1,26	825,00±5,39	825,00±4,81	370,00±1,52
Sólidos Totais Sedimentáveis (mg.L ⁻¹)	A	2,40±0,50	0,70±0,01	3,00±0,30	7,00±0,51	2,00±0,05	1,50±0,20	5,50±0,80	9,00±0,70
	G	0,00±0,00	0,03±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Sólidos Totais Dissolvidos (mg.L ⁻¹)	A	825,00±0,02	917,50±0,21	825,00±0,02	671,25±0,01	900,00±0,01	723,75±0,01	675,00±0,01	472,50±0,06
	G	670,00±0,05	880,00±0,08	795,00±0,06	690,00±0,06	525,00±0,07	618,75±1,20	618,75±0,06	277,50±0,08
Turbidez (NTU)	A	337,67±17,91	347,89±24,49	312,83±38,83	213,83±54,92	333,67±18,97	230,83±28,99	327,00±15,79	399,67±27,80
	G	104,00±15,79	140,43±33,25	299,17±47,38	97,00±18,86	201,67±20,30	60,17±7,45	74,08±14,87	118,00±17,40

Tabela 19- Demanda Química de Oxigênio, concentrações de fosfato, de amônio, nitrito, nitrato, ácidos voláteis e cloretos coletadas nas lagoas A e G da ETE da agroindústria estudada (Coruripe-AL), no período de 09/10/2018 a 16/04/2019.

Parâmetros	Lagoas	2018				2019			
		Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril
Demanda Química de Oxigênio (mg O₂.L⁻¹)	A	253,75±15,64	632,22±89,32	351,67±34,06	555,83±31,82	386,67±18,39	620,83±8,89	385,83±74,25	473,33±54,36
	G	160,00±12,35	442,22±51,03	125,83±17,68	54,17±4,12	83,33±4,85	120,83±26,40	44,17±8,40	75,00±5,82
Fosfato (mg P.L⁻¹)	A	2,04±0,51	5,30±1,36	4,76±1,84	6,78±0,77	3,13±0,50	6,10±0,36	4,34±0,38	6,52±0,82
	G	3,78±0,48	5,69±0,82	6,22±0,93	6,08±1,46	5,33±1,01	4,54±0,97	5,12±1,02	3,69±0,52
Amônio (mg NH₄⁺ N.L⁻¹)	A	2,33±0,01	229,02±66,02	144,78±9,56	168,41±0,35	57,71±1,32	108,46±2,51	109,70±4,26	71,14±12,30
	G	0,92±0,03	56,55±18,57	51,74±0,70	29,60±0,09	29,85±0,54	8,46±0,49	48,01±3,16	2,49±0,08
Nitrito (mg NO₂⁻ N.L⁻¹)	A	0,05±0,01	2,35±0,51	16,59±0,52	0,36±0,07	0,27±0,01	5,03±0,67	1,05±0,02	2,63±0,03
	G	0,10±0,05	0,68±0,02	2,04±0,04	0,52±0,02	0,68±0,01	0,61±0,03	1,44±0,06	0,75±0,02
Nitrato (mg NO₃⁻ N.L⁻¹)	A	0,13±0,02	33,62±2,10	5,21±2,80	1,67±0,06	29,70±1,82	13,67±1,50	36,67±1,20	33,62±0,92
	G	0,21±0,01	6,68±0,54	2,54±0,70	4,67±0,02	7,12±0,07	17,09±2,87	9,17±0,90	6,68±0,08
Ácidos Voláteis (mg.L⁻¹)	A	400,50±1,76	192,83±33,89	218,05±37,33	120,15±8,81	231,40±2,34	253,65±2,93	142,40±0,60	311,50±2,15
	G	320,40±0,05	234,37±31,26	106,80±0,00	178,00±15,04	160,20±0,82	151,30±8,16	80,10±3,76	89,00±0,07
Cloretos (mg. L⁻¹)	A	205,19±0,80	198,33±4,27	158,69±2,69	112,54±1,95	132,77±1,86	675,68±6,78	2024,75±86,20	2687,80±67,32
	G	155,49±0,51	226,25±3,75	190,99±8,15	142,00±4,01	183,18±0,92	969,71±15,87	2345,15±76,10	1958,00±52,35

Por outro lado, é necessário avaliar fosfatos totais nas águas, uma vez que seus altos níveis associados a altas concentrações de nitratos e nitritos podem levar a um efeito de eutrofização (OGUNFOWOKAN et al. 2005). De acordo com a Resolução CONAMA 357/2005, as concentrações máximas, para águas de classe III, são: 0,15 mg P.L⁻¹ para fosfato, 10 mg NO₃⁻ N.L⁻¹ para nitrato e 1 mg NO₂⁻ N.L⁻¹ para nitrito. Segundo Metcalf; Eddy (2003), o fósforo é um elemento indispensável a todas as formas de vida, já que ele participa dos processos de respiração, fotossíntese e reprodução celular. Além de ser de extrema importância para o crescimento dos microrganismos, que agem na estabilização da matéria orgânica presente na água.

Neste estudo, mesmo com os altos níveis de fosfato presentes na lagoa G durante a safra estudada (**Tabela 19**), o risco de eutrofização foi baixo, pois a água dessa lagoa apresentou concentrações baixas de nitratos / nitritos (SCHINDLER et al. 2008). Salgado et al. (2017) projetou um consórcio bacteriano com quatro cepas de rizobactérias para verificar o desempenho de sistemas de tratamento de áreas úmidas construídos para a remoção de poluentes das águas residuais domésticas. Tal consórcio, composto por microrganismos autóctones (*Acinetobacter*, *Pseudomonas* e dois *Bacillus*) permitiu a remoção de 55% de fosfato, quando inoculado em efluente sintético com 10 mg L⁻¹ de fósforo total após 30 dias de operação do reator. Delgadillo-Mirqueza et al. (2016) investigaram o efeito de um consórcio de microalgas-bactérias autóctones na remoção de poluentes por 8 dias. Eles verificaram que o fosfato foi totalmente removido do meio (águas residuais municipais) após 100-150 h em culturas de lotes. Os autores enfatizam que essa eficiência pode ser atraente para o tratamento de efluentes secundários onde há pouco carbono orgânico disponível.

Como observado na **Tabela 19**, também as maiores concentrações de íons amônio foram encontradas na Lagoa A, sendo o valor máximo permitido (para águas de classe III) de 5,0 mg NH₄⁺ N.L⁻¹. Geralmente, a utilização de fertilizantes e lançamento anterior de efluentes orgânicos em processo de decomposição pode explicar concentrações tão elevadas desses parâmetros.

Em estudo recente, Vijayaraj; Mohandass; Joshi (2019) avaliaram o potencial de microrremediação de nove bactérias marinhas produtoras de sideróforos no tratamento de efluentes bruto de curtume. Os autores verificaram que as concentrações da maioria dos poluentes detectados foram diminuídas após o processo de biorremediação, entre eles, o nitrato, que apresentou redução de 57%. He et al. (2019) isolaram uma nova bactéria, identificada como *Pseudomonas mendocina* TJPU04, que foi capaz de remover amônia, nitrato e nitrito, mantendo

alta eficiência de remoção em condições estéreis (98%, 93% e 100%, respectivamente) e em águas residuais reais (91%, 52% e 75%, respectivamente).

A remoção de fósforo e nitrogênio é indispensável quando um efluente é lançado em corpos hídricos (SANTOS; BASTOS; AISSE, 2006). No entanto, se esse efluente for utilizado para irrigação, o fósforo pode ser um elemento indispensável para o desenvolvimento das culturas. De acordo com Metcalf; Eddy (2003) o nitrogênio é um importante elemento na síntese de proteínas; logo, a concentração desse na água permite a avaliação da eficiência de um efluente tratado por processos biológicos. Observou-se que, no período estudo, os valores de nitrito e nitrato variaram. Esse fato se deve a interferências ocorridas especialmente nos meses de outubro, janeiro, março e abril, onde o tratamento foi prejudicado por falhas de manutenção da ETE, tais como interrupção do funcionamento do decantador mecânico, falta de energia elétrica nas casas de bomba (afetando assim, o tempo de residência hidráulica). Tais incidentes levaram a alterações ocorridas nos procedimentos a serem adotados para o tratamento do efluente.

Durante o período avaliado, a concentração de ácidos voláteis (AV) foi menor nas amostras da lagoa G (**Tabela 19**). Tal fato era esperado, uma vez que esse ponto de amostragem é de pós-tratamento biológico, indicando a eficiência do processo. Dentre os contaminantes presentes nos efluentes estão nutrientes como o nitrogênio inorgânico e o fósforo, cuja remoção é influenciada pela presença de AV (como acético, propiônico, n-butírico, iso-butírico, ácido fórmico e muitos outros), dependendo do tipo de tratamento na ETE. O acúmulo de AV indica desequilíbrio entre o consumo de matéria orgânica por diferentes tipos de bactérias anaeróbias responsáveis pelo tratamento biológico do efluente. Supõe-se que os AV atuem como fonte de carbono em águas residuais para o funcionamento de bactérias desnitrificantes e nitrificantes, por exemplo, e forneça a energia necessária para realizar sua função (ELEFSINIOTIS et al. 2004; PUIG et al. 2008). Quando a concentração de AV excede cerca de 500 mg.L^{-1} , ou melhor, quando não há mais tamponamento devido à ausência de alcalinidade ao bicarbonato, há sérios problemas com o sistema de tratamento devido à diminuição do pH (SAWYER; MC CARTY; PARKIN 1994). As menores concentrações de cloretos foram obtidas nas amostragens da Lagoa A (**Tabela 19**). O cloreto na forma iônica Cl^- é um dos principais ânions inorgânicos presentes em efluentes, sendo suas concentrações mais altas em águas residuárias do que em esgotos domésticos. Para as águas de classe III (CONAMA 357/2005), o limite máximo para esse parâmetro deve ser de 250 mg.L^{-1} . Segundo Menéndez; Marrero (2001) o aumento da concentração do íon cloreto em sistema de lodos ativados por exemplo, acarreta diminuição da produção de biomassa microbiana. Sabe-se que o cloreto também interfere no tratamento

anaeróbico de efluentes industriais, podendo chegar a provocar corrosão em tubulações (Ribeiro, Sandri; Boêno, 2013).

O monitoramento da qualidade do efluente de ETE através de alguns parâmetros de qualidade mostraram que, apesar das variáveis encontradas no experimento em escala de campo, o tratamento utilizado (biaumentação) foi considerado promissor, visto que alguns dos parâmetros analisados melhoraram pós-tratamento, revelando-se economicamente viável e ecoeficiente. Vale ressaltar que alguns dos parâmetros apresentados não se adequam para que esses efluentes possam ser lançados em rios, por exemplo. Isso pode ser explicado principalmente por vazões não controladas e tempo de residência hidráulico encurtado por isso e pelo excesso de resíduos acumulados de outras safras nas lagoas da ETE, diminuindo a capacidade volumétrica das lagoas e formando colóides com ácidos húmicos e fúlvicos. No biênio estudado, o tempo de retenção hidráulica nas lagoas foi de 24h, de modo que da lagoa que recebeu o tratamento até a lagoa G o tempo de retenção hidráulica entre as lagoas foi de cerca de 24 h apenas.

6 CONCLUSÕES

A destinação final adequada do efluente e de lodo gerados em Estações de Tratamento de Esgoto é fator crucial para que não ocorra contaminação ambiental. Para isso, a irrigação com água de reuso é uma técnica favorável, bem como o uso agrícola é uma forma ambientalmente sustentável de destinação do lodo. Entretanto, existem algumas limitações para alguns tipos de culturas, as quais não podem receber tais resíduos sem o devido tratamento, assegurando assim a sua qualidade. Partindo-se de resíduos sólidos ou líquidos de uma agroindústria canvieira, foram isoladas neste estudo bactérias com alta tolerância a gradiente osmótico (6,25 mg.mL⁻¹ de sacarose). Das estirpes obtidas, oito apresentaram alta tolerância a diferentes sais de metais potencialmente tóxicos, e destas, as cinco que apresentaram resistência múltipla a seis ou mais desses sais de metais, tolerando até 10,024 mM de alguns deles, foram selecionadas e submetidas a diferentes ensaios, sendo identificadas molecularmente como *Pseudomonas aeruginosa* - EFI, *Bacillus atrophaeus* - EFII, *B. cereus* - EFIII, *Lysinibacillus macroides*- LOII e *B. thuringiensis* -LOIII).

Com exceção de *L. macroides* - LOII e *B. cereus* - EFIII, que suportaram respectivamente até 3% e 5% de NaCl, as outras três bactérias toleraram *in vitro* até 9% desse sal. Os isolados *P.aeruginosa*-EFI, *B. cereus*- EFIII e *B. thuringiensis* -LOIII solubilizam fosfato, fixam nitrogênio e produzem AIA *in vitro*. Todas as 5 estirpes foram capazes de secretar lipase e amilase e outras enzimas de interesse biotecnológico, além de crescer em temperatura de até 85 °C e não apresentarem antagonismo entre si.

A combinação dos aspectos metabólicos e fisiológicos estudados nos cinco isolados autóctones selecionados revelaram grande potencial dos mesmos para utilização como suplemento para a promoção do crescimento vegetal. Da mesma forma, quando inoculadas individualmente ou na forma de consórcio em resíduos suco-alcooleiros (efluente industrial e lodo) *in vitro*, essas estirpes apresentaram potencial para degradá-los, adequando vários dos parâmetros de qualidade ao limite de aplicação segura desses resíduos na fertirrigação do solo sem prejuízos ao meio ambiente. Tais resultados permitiram a proposição de um consórcio bacteriano capaz de tolerar metais potencialmente tóxicos, alta salinidade/temperatura e potencialmente capaz de uso na biorremediação de resíduos agroindustriais em escala de campo. Exceto para *Bacillus atrophaeus* - EFII, o crescimento celular dos microrganismos foi maior após 24 horas de cultivo em meio de baixo custo. Desta forma, é possível afirmar que o meio proposto no presente trabalho, como alternativa ao meio sintético, foi eficiente para o cultivo de bactérias e fungos em condições laboratoriais e também na manutenção do consórcio microbiano em grande escala para aplicação em campo.

7 REFERÊNCIAS

- AISLABIE, J.; LLOYD-JONES, G. A review of bacterial-degradation of pesticides. **Australian J. of Soil Res.**, v.33, n. 6, p. 925-942, 1995. <https://doi.org/10.1071/SR9950925>.
- AJAO, A. T.; ADEBAYO, G. B.; YAKUBU, S. E. Bioremediation of Textile Industrial Effluent using mixed culture of *Pseudomonasaeruginosa* and *Bacillussubtilis* immobilized on agar-agar in a bioreactor. **J. Microbiol. Biotechnol. Res.**, v.1, n. 3, p. 50-56, 2011. ISSN: 2231-3168.
- AKA, R. J. N.; BABALOLA, O. O. Effect of bacterial inoculation of strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis* and *Bacillus subtilis* on germination, growth and heavy metal (Cd, Cr, and Ni) uptake of *Brassica juncea*. **Int. J. Phytorem.**, v. 18, n. 2, p. 200-209. 2015. <https://doi.org/10.1080/15226514.2015.1073671>
- ALVAREZ, V. M. **Bioprospeção da população bacteriana halotolerante e biodegradadora de óleo presente em solo impactado na região de Panelas, SE.** 2007. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2007.
- AL-WASIFY, R. S.; ALI, M. N.; S. R. Biodegradation of dairy wastewater using bacterial and fungal local isolates. **Water Sci. Technol.**, v. 76, n. 11, p. 3094-3100, 2017. <https://doi.org/10.2166/wst.2017.481>
- ANA- Agência Nacional de Águas. Disponível em http://www3.ana.gov.br/portal/ANA/noticias/estudo-da-ana-aponta-em-45-potencial-de-expansao-da-irrigacao-no-brasil-ate-2030/ana_atlasirrigacao. Acesso em: 17 jan. 2018.
- ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclét. Química**, v. 35, n. 3, p. 17-43. 2010. <https://doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v35.3.2010.p17-43>.
- ANSARI, S. A.; AL-SHAERI, M. Biotechnological application of surface modified cerium oxide nanoparticles. **Braz. J. Chem. Eng.** [online]. v.36, n.1, p.109-115, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20190361s20180135>.
- APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, twentieth ed. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environmental Federation, Washington; 1998.
- ARMADA, E.; AZCON, R.; LOPEZ-CASTILLO, O. M.; et al. Autochthonous arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus thuringiensis* from a degraded Mediterranean area can be used to improve physiological traits and performance of a plant of agronomic interest under drought conditions. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 90, p. 64-74. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.03.004>.
- ASHOKA, C.; GEETHA, M.S.; SULLIA, S. B. Bioleaching of composite textile-dye effluent using bacterial consortia. **Asian J. Microbial Biotech. Environ. Sci.**, v. 4, n. 1, p. 65-68. 2002. ISSN: 0972-3005
- AUHIM, H. S.; MOHAMED, A. I. Effect of Different Environmental and Nutritional Factors on Biosurfactant Production from *Azotobacter chroococcum*. **Int. J. Adv. Pham. Biol. Chem.**, v. 2, n. 3, 477-481. 2013. ISSN: 2277 – 4688.

AWASTHI, G.; CHESTER, A.; CHATURVEDI, R.; et al. Study on Role of *Pseudomonas aeruginosa* on Heavy Metal Bioremediation. **Int. J. Pure Appl. Biosci.**, v.3, n. 4, p. 92-100. 2015. ISSN: 2320 – 7051.

AZOV, Y.; JUANICO, M.; SHELEF, G. Monitoring large scale wastewater reclamation systems – Policy and experience. **Water Sci. Technol.**, v.26, n.7-8, p.1545- 1553, 1992.

BANERJEE, A.; GHOSHAL, A. K. Biodegradation of real petroleum wastewater by immobilized hyper phenol-tolerant strains of *Bacillus cereus* in a fluidized bed bioreactor. **3 Biotech.**, v. 6, n. 2, p. 137-140, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0447-1>.

BANERJEE, U. C.; SANI, R. K.; AZMI, W.; et al. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. **Process. Biochemistry**, v. 35, n. 1-2, p. 213-19. 1999. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00053-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00053-9).

BARCELLOS, F. C.; OLIVEIRA, J. C.; CARVALHO, P. G. M. Investimento ambiental em indústrias sujas e intensivas em recursos naturais e energia. **Rev. Iberoam. Econ. Ecol.**, v.12, p. 33-50. 2009.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, v. 43, n. 4, p. 529-535. 2008. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2008000400012>

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 45, n. 4, p. 493-96. 1966. https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493.

BEHERA, B. C.; YADAV, H.; SINGH, S. K.; et al. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. **J. Genet. Eng. Biotechnol.**, v. 15, n. 1, p. 169-178. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.01.003>.

BERGEY, D. H.; HOLT, J. G. **BERGEY'S manual of determinative bacteriology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.

BERNARDI, C.C. Reuso de água para irrigação. 2003. 52f. Monografia (Pós-Graduação MBA) – Gestão Sustentável da Agricultura Irrigada – Planejamento Estratégico), ISEAFGV/ EcobusinessSchool, Brasília, DF, 2003.

BERTONCINI, E.I.; MARANGON, R.C.; AREVALO, R.A.; et al. Moringa oleifera Lam Tratamento de água e efluentes. In: 2º Seminários do Programa Estratégico da APTA Sustentabilidade Ambiental. Barra Bonita, SP, 13 e 14 de março de 2008. CDROM.

BERTRAN, E.; SORT, X.; SOLVIA, M.; Trillas, I. “Composting Winery Waste: Sludges and Grape Stakes”, **Biorseour. Technol.**, v. 95, p. 203-208, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.biorstech.2003.07.012>.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. **Lodo de esgoto: impactos ambientais na agricultura**. Jaguariúna, ed. Embrapa Meio Ambiente, 394p. 2006.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A.; BERTON, R.S. Utilização de lodo de esgoto na agricultura. **Rev. Bras. Gestão Ambiental**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2015. <http://dx.doi.org/10.18378/rbga.v9i1.3167>

BHANJA, A.; MINDE, G.; MAGDUM, S.; KALYANRAMAN, V. Comparative Studies of Oleaginous Fungal Strains (*Mucor circinelloides* and *Trichoderma reesei*) for Effective

Wastewater Treatment and Bio-Oil Production. **Biotechnol. Res. Int.**, v. 2014, p. 1-7, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/479370>.

BHATTACHARYA, C.; PANDEY, B.; SARKAR, A. K. Study of Lipase Producing Bacterial Strains from Oil Contaminated Soil. **J. Basic. Appl. Res.** v. 2, n. 4, p. 512-15. 2016. ISSN 0973-2691.

BISWAS, J. K.; MONDAL, M.; RINKLEBE, J.; et al. Multi-metal resistance and plant growth promotion potential of a wastewater bacterium *Pseudomonas aeruginosa* and its synergistic benefits. **Environ. Geochem. Health.**, v. 39, n. 6, p.1583-93. 2017. <https://doi.org/10.1007/s10653-017-9950-5>.

BRADY, N. C.; WEIL, R. R. **Elementos da natureza e propriedades dos solos**, third ed. Bookmam Companhia LTDA, Porto Alegre. 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Conselho Nacional do Meio Ambiente. RESOLUÇÃO Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras. Brasília/DF: MMA, 2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>. Acesso em: 20 dez. 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Conselho Nacional do Meio Ambiente. RESOLUÇÃO Nº. 430, DE 13 DE MAIO DE 2011: Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>. Acesso em: 20 dez. 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Conselho Nacional do Meio Ambiente. RESOLUÇÃO Nº. 121, DE 16 DE DEZEMBRO DE 2010: Estabelece diretrizes e critérios para a prática de reúso direto não potável de água na modalidade agrícola e florestal, definida na Resolução CNRH no 54, de 28 de novembro de 2005. Disponível em: http://www.cnrh.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=14. Acesso em: 20 dez. 2017.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. E. Rapid *in situ* assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 52, n. 2, p. 535-538. 1991.

CABRERA, M.Á., BLAMEY, J.M. Biotechnological applications of archaeal enzymes from extreme environments. **Biol. Res.**, v. 51, n. 37. 2018. <https://doi.org/10.1186/s40659-018-0186-3>.

CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.; RAIJ, A.; VAN, B. **Determinação de matéria orgânica**, in: Raij, A., Van, B., Andrade, J.C., Cantarella, H., Quaggio, J.A. (Eds.), *Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais*. Campinas, IAC, pp. 173-180. 2001.

CASSINI, S. T.; PINTO, M. T.; VAZOLLER, R. F. Introdução. In: CASSINI, S. T. **Digestão anaeróbia de resíduos sólidos orgânicos e aproveitamento do biogás**. Rio de Janeiro: ABES, RiMa, 2003. 1-10 p. Projeto PROSAB. Disponível em: <https://www.tratamentodeagua.com.br/artigo/digestao-de-residuos-solidos-organicos-e-aproveitamento-do-biogas/>. Acesso em: 15 abr. 2017.

CASTANHO FILHO, E. P.; CAMPOS, A. D. C.; OLIVETTE, M. P. A. Água e Uso pela Agropecuária: neomalthusianismo hídrico. **Análise e Indicadores do Agronegócio**, v. 10, n. 3, p.1-12, 2015.

CERQUEIRA, V. S.; PERALBA, M. C. R.; FLAVIO A.O. et al. Comparison of bioremediation strategies for soil impacted with petrochemical oily sludge. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, v. 95, p. 338-345, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.08.015>.

CHAGAS JR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Caracterização fenotípica de rizóbios nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta. Sci. Agronomy**, v. 32, n. 1, 161-169. 2010. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v32i1.900>.

CHAI, B.; WU, Y.; LIU, P.; et al. Isolation and phosphate-solubilizing ability of a fungus, *Penicillium* sp. From soil of an alum mine. **J. Basic. Microbiol.**, Jena, Alemanha, v. 51, n. 11, p. 5-14. 2011. <https://doi.org/10.1002/jobm.201000192>

CHANAMÉ, F.; CUSTODIO, M.; PANTOJA, R.; et al. Bioaccumulation of heavy metals in *Oncorhynchus mykiss* for export at production centers in the Peruvian Central Highlands. **Revista Ambiente & Agua**, v. 12, n. 4, p. 527–542, 2017. <http://dx.doi.org/10.4136/ambiente-agua.2100>.

CHEN, C.Y.; BAKER, S.C.; DARTON, R.C. The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. **J. Microbiol. Methods.**, v. 70, n. 3, p. 503-510. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.06.006>.

CHEVENET, F.; BRUN, C.; BAÑULS, A. L.; et al. TreeDyn: Towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 7, p.439-47. 2006. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-439>.

CHOWDHURY, S.; THAKUR, A.; CHAUDHURI, S. R. Novel microbial consortium for laboratory scale lead removal from city effluent. **J. Environ. Sci. Technol.**, v. 4, n. 1, p. 41-54, 2011. <https://doi.org/10.3923/jest.2011.41.54>

CHUNG, H.; PARK, M.; MADHAIYAN, M.; et al. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. **Soil. Biol. Biochem.**, v. 37, n. 10, p. 1970-1974. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.02.025>.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253>. Acesso em: 10 dez. 2017.

CORREIA, J. E. 2009. Caracterização físico-química e microbiológica do lodo gerado na Estação de Tratamento de Esgoto Contorno. Feira de Santana, BA. Disponível em <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp119464.pdf>. Acesso em: 03 fev. 2018.

COSTA, M.S.S.M.; COSTA, L.A.M.; DECARLI, L.D.; PELÁ, A.; SILVA, C.J.; MATTER, U.F.; OLIBONE, D. Compostagem de resíduos sólidos de frigorífico. **Rev. Bras. Eng. Agric. Ambiental**, v.13, n.1, p.100–107, 2009. <https://doi.org/10.1590/s1415-43662009000100015>

COSTA, S. G. V. A. 2010. Estudo da produção de metabólitos por *Pseudomonas aeruginosa*: ramnolipídeos e polihidroxicarboxilatos (PHAs). Disponível em <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/103958?show=full>. Acesso em: 05 nov. 2017.

COSTA, V. L.; MARIA, I. C.; CAMARGO, O. A.; et al. Distribuição espacial de fósforo em latossolo tratado com lodo de esgoto e adubação mineral. **Rev. Bras. Eng. Agric. Ambiental.**, v. 8, n. 3, p. 287-293. 2013. <https://doi.org/10.1590/s1415-43662014000300007>.

CREPALLI, M. S. **Qualidade da água do Rio Cascavel**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR.

DELGADILLO-MIRQUEZA, L.; LOPES, F.; TAIDIC, B.; PAREAU, D. Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. **Biotech. Rep.**, v. 11, p. 18-26, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.04.003>

DEON, M. C.; Rossi, A.; DAL'MAGRO, C.; et al. Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através de bioaugmentação e atenuação natural. **Semina: Cienc. Exatas Technol.**, v. 33, n. 1, p. 73-82, 2012. <https://doi.org/10.5433/1679-0375.2012v33n1p73>

DEVI, P.; SAROHA, A.K. Risk analysis of pyrolyzed biochar made from paper mill effluent treatment plant sludge for bioavailability and eco-toxicity of heavy metals. **Bioresour. Technol.**, v. 162, p.308-315, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.093>.

DIVYA, M.; AANAND, S.; SRINIVASAN, A.; et al. Efficiency of indigenous mixed microbial consortium in bioremediation of seafood processing plant effluent. **Biochem. Cell. Arch.**, v. 16, n. 2, p. 1-8, 2016.

DJELAL, H.; AMRANE, A. Biodegradation by bioaugmentation of dairy wastewater by fungal consortium on a bioreactor lab-scale and on a pilot-scale. **J. Environ. Sci.**, v. 25, n. 9, p. 1906-1912, 2013.

DU, L.; CHEN, Q.; LIU, P.; et al. Phosphorus removal performance and biological dephosphorization process in treating reclaimed water by integrated vertical-flow constructed wetlands. **Bioresour. Technol.**, v. 243, p. 204-211. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.092>.

DUVNJAK, Z.; KOSARIC, N. Production and release of surfactants by *Corynebacterium lepus* in hydrocarbon and glucose media. **Biotechnol. Lett.**, v. 7, n. 11, p. 793-796. 1985. <https://doi.org/10.1007/bf01025556>.

EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research.**, v. 32, n. 5, p. 1792-97. 2004. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.

EGAMBERDIEVA, D. **Bacillus spp.: A Potential Plant Growth Stimulator and Biocontrol Agent Under Hostile Environmental Conditions**. In: Jha C, Islam T, Rahman M, Pandey P, Aeron A. Bacilli and Agrobiotechnology, pp. 91-111; 2017.

El-Aziz, Z. K. A.; El-Sayed, M. H.; El-Ghany, A. A. A. Microbial Bioremediation of Lead by Lead-Resistant *Pseudomonas chlororaphis* Strain Hel-KE`-14 Isolated from Industrial Wastewater. **Int. J. Pharm. Res. Allied Sci.**, v. 5, n. 4, p. 95-107, 2016. ISSN: 2277-3657.

ELAZZAZY, A. M.; ABDELMONEIM, T. S.; ALMAGHRABI, O. A. Isolation and characterization of biosurfactant production under extreme environmental conditions by alkali-halo-thermophilic bacteria from Saudi Arabia. **Saudi. J. Biol. Sci.** v. 22, n. 4, p. 466-475. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.11.018>.

ELEFSINIOTIS, P.; WAREHAM, D.G.; SMITH, M.O. Use of volatile fatty acids from an acid-phase digester for denitrification. **J. Biotech.**, v. 114, n. 3, p. 289-297, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.02.016>

ELIA NETO, A. **Manual de Conservação e reúso de água na Agroindústria Sucroenergética**. Agência Nacional de Águas, Ministério do Meio Ambiente. Brasília, 2009. p.176.

ELIA NETO, A.; SHITAKU. Usos e reúsos de água e geração de efluentes. In: Manual de conservação e reuso de água na agroindústria Sucoenergética. Agência Nacional de Águas Federação das indústrias do estado de São Paulo; União da Indústria da cana de açúcar; Centro de tecnologia canavieira. Brasília, 2009. p. 69-176.

FARRUGIA, (2012). Disponível em <http://www.revistatae.com.br/3671-noticias>. Acesso em: 05 fev. 2018.

FERREIRA, A. C.; ANDREOLI, C. V. **Riscos associados ao uso de lodo de esgoto**, in: Andreoli, C.V. (Coord.), *Uso e manejo do lodo de esgoto na agricultura*, Rio de Janeiro. 1999.

FERREIRA, L. F. R.; PEREIRA, D. S. T.; TEIXEIRA, A. P. S.; et al. Eventos iniciais na interação de *Annonas quamosa* – *Colletotrichum gloeosporioides*. **Rev. Fitopatol. Bras.**, v. 256, p. 109-110. 2002.

FILHO, P.N. **Hidrolases e fenoloxidades de microrganismos como marcadores para seleção de biosuplementadores e avaliação do tratamento sobre efluentes sucroalcooleiros**. 2007. 170 f. Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, 2007.

FITO, J.; TEFERA, N.; KLOOS, H.; VAN HULLE, S.W.H. Anaerobic treatment of blended sugar industry and ethanol distillery wastewater through biphasic high rate reactor. **J. Environ. Sci. Health A Tox Hazard Subst. Environ. Eng.**, v.1, p. 1-10, 2018. <https://doi.org/10.1080/10934529.2018.1438826>.

FLORENTINO, L. A.; SILVA, A. B.; LANDGRAF, P. R. C.; et al. Inoculação de bactérias produtoras de ácido 3-indol acético em plantas de alface (*Lactuca sativa* L.). **Rev. Colomb. Cie. Hort.**, v. 11, n. 1, p. 89-96. 2017. <https://doi.org/10.17584/rcch.2017v11i1.5780>.

FOLEGATTI, M. V. *Fertirrigação: citrus, flores, hortaliças*. Guaíba: Agropecuária, 1999. 460p.
FRANCO, D. V. *Tratamento redutivo de solo e água subterrânea contaminados com cromo hexavalente*. 2008. 183 f. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química – UNICAMP, Campinas, 2008.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. **J. Biologic. Chem.**, v. 73, n. 2, p. 627-650. 1927.

FREIRE, M. B. G. S.; FREIRE, F. J. **Fertilidade do solo e seu manejo em solos afetados por sais**, in: Novais, R.F. (ed.), *Fertilidade do solo*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa. 2007.

GAWAI, K.; MOGHA, K.; PRAJAPATI, J. Evaluation of *B. cereus* MTCC 25641 for the Treatment of Dairy Waste Effluent. **Water Environ. Res.**, v. 89, n. 5, p. 466-471, 2017. <https://doi.org/10.2175/106143017X14839994523587>.

GENTRY, T.J.; RENSING, C.; PEPPER, I. L. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. **Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.**, v.34, p. 447-494, 2004. <https://doi.org/10.1080/10643380490452362>.

GHYANDEEP, L.; GAIKWAD, S. R.; WATE, D. S.; et al. Development of microbial consortia for the effective treatment of complex wastewater. **J. Bioremed. Biodeg.**, v. 5, n. 4, p. 1-10, 2014. DOI: 10.4172/2155-6199.1000227

GLEBER, L. *Redução de riscos de impacto ambiental na produção integrada das maçãs*. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/55144/1/cir038.pdf> Acesso em: 06 jun. 2019.

GÓMEZ-GUZMÁN, A.; JIMÉNEZ-MAGAÑA, S.; GUERRA-RENTERÍA, A.S.; et al. Evaluation of nutrients removal (NO⁻-N, NH⁻-N and PO⁻-P) with *Chlorella vulgaris*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus cereus* and a consortium of these microorganisms in the treatment of wastewater effluents. **Water Sci. Technol.**, v. 76, n. 1, p. 49-56, 2017. <https://doi.org/10.2166/wst.2017.175>

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M.V. B. Corantes Têxteis. **Quím. Nova**, v. 23, n. 1, p. 71-78, 1999.

GUEDES, M. C.; ANDRADE, C.A.; POGGIANI, F.; et al. Propriedades químicas do solo e nutrição do eucalipto em função da aplicação de lodo de esgoto. **Rev. Bras. Cienc. Solo**, v. 30, p. 267-280, 2006. <https://doi.org/10.1590/s0100-06832006000200008>.

GUERRINI, I. A.; CROCE, C.G.G.; BUENO, O.C.; et al. Composted sewage sludge and steel mill slag as potential amendments for urban soils involved in afforestation programs. **Urban Forestry & Urban Greening**, v. 22, p. 93-104, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2017.01.015>.

GULATI, A.; VYAS, P.; RAHI, P.; et al. Plant growth promoting and rhizosphere competent *Acinetobacter* rhizosphere strain BIHB 723 from the cold desert of Himalayas. **Curr. Microbiol.**, v. 58, n. 4, p. 371-377. 2009. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9339-x>.

GUO, J.; NI, B.; HAN, X.; et al. Unraveling microbial structure and diversity of activated sludge in a full-scale simultaneous nitrogen and phosphorus removal plant using metagenomic sequencing. **Enzyme Microbial. Technol.**, v. 102, p. 16-25. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.03.009>.

GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; et al. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process. Biochem.**, v. 38, n. 11, p. 1599-616. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00053-0).

HAKEEM, K.; SABIR, M.; OZTURK, M.; et al. **Soil Remediation and Plants: Prospects and Challenges**. Elsevier, 2015. ISBN: 9780127999371.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607. 1975. <https://doi.org/10.2307/3758395>.

HARDMAN, D.J.; MCELDFOWNEY, S.; Waite S. 1993. **Pollution ecology and Biotreatment Long Scientific and Technical Publishers**. Singapore, pp. 1056-1059.

HAYDAR, S.; AZIZ, J.A.; AHMAD, M.S. Biological Treatment of Tannery Wastewater Using Activated Sludge Process. **Pak. J. Eng. Appl. Sci.**, v. 1, p. 61-67, 2007.

HE, X.; SUN, Q., XU, T.; DAI, M., WEI, D. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a novel halotolerant bacterium *Pseudomonas mendocina* TJPU04. **Biop. Biosyst. Eng.**, v. 42, n. 5, p. 853-866, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02088-8>.

HOODA, R.; BHARDWAJ, N. K.; SINGH, P. Screening and identification of ligninolytic bacteria for the treatment of pulp and paper mill effluent. **Water Air Soil Pollut.**, v. 226, p. 1-11. 2015. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2535-y>.

HUSSEIN, K. A.; JOO, J. H. Heavy metal resistance of bacteria and its impact on the production of antioxidant enzymes. **Afr. J. Microbiol. Res.**, v. 7, n. 20, p. 2288-96. 2013. <http://dx.doi.org/10.5897/AJMR12.1764>.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/.../lspa/lspa_201301.pdf. Acesso em: 25 nov. 2017.

IRANZO, M. R.; BOLUDA, R.; SAINZ-PARDO, I.; et al. The use of microorganisms in environmental remediation. **Annals of Microbiol.**, v. 51, p. 135-143, 2001. ISSN: 1869-2044.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; et al. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Cienc. Rural**, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782007000400049>.

JAIN, D. K.; COLLINS-THOMPSON, D. L.; LEE, H.; et al. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. **J. Microbiol. Methods.**, v. 13, n. 4, p. 271-279. 1991. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90064-w](https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90064-w).

JAMROZE, A.; PERUGINO, G.; VALENTI, A.; et al. The reverse gyrase form *Pyrobaculum calidifontis*, a novel extremely thermophilic DNA topoisomerase endowed with DNA unwinding and annealing activities. **J. Biol. Chem.**, v. 289, n. 6, p. 3231-43. 2014. <https://dx.doi.org/10.1074%2Fjbc.M113.517649>.

JANBANDHU, A.; FULEKAR, M. H. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated, environment. **J. Hazard. Mater.**, v. 187, n.1-3, p. 1333-1340. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.01.034>.

JENDIROBA, E. Questões ambientais no manejo da agroindústria canavieira. In: SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J.C.M. (Ed.). Atualização em produção de cana de açúcar. Piracicaba, 2006.

JENSEN, H. L. Nitrogen fixation in leguminous plants. I. General characters of root-nodule bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia. Proc. Linn. Soc. New South Wales. v. 67, p. 98-108. 1942.

JIANG, B.; ZHOU, Z.; DONG, Y.; et al. Bioremediation of Petrochemical Wastewater Containing BTEX Compounds by a New Immobilized Bacterium *Comamonas* sp. JB in Magnetic Gellan Gum. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 176, n. 2, p. 572-581. 2015.

JIMENEZ, E. I.; GARCIA, V. P. Evaluation of City Refuse Compost Maturity: A Review. **Biol. Wastes**, v. 27, n. 2, p. 115-142. 1989. [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(89\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0269-7483(89)90039-6).

JIN, L.; ZHANG, G.; ZHENG, X. Effects of different sludge disintegration methods on sludge moisture distribution and dewatering performance. **J. Environ. Sci.**, v. 28, p. 22-28, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.06.040>.

JORDÃO, C. P.; COSTA, E. D.; BRUNE, W.; GOURLART, A. T. Adsorção de cátions metálicos em ácidos húmicos de Latossolo. **Quim. Nova**, v.16, n. 6, p. 517-520. 1993.

JOSHI, N.; JAIN, R. K.; DIXIT, A. K. Bioremediation of pulp and paper mill effluent using isolated *Bacillus* strain and its impact on the pH of effluent. **Asian J. Environ. Sci.**, v. 12, n. 2, p. 104-106. 2017. <https://doi.org/10.15740/has/ajes/12.2/104-106>.

JOUZANI, G. S.; VALIJANIAN, E.; SHARAFI, R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 101, n. 7, 2691-711. 2017. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8175-y>.

KANG, H.; JIAO, Y.; LI, W.; et al. Study on Isolation of a Phosphate Removal Organism and Influencing Factors of Phosphate Removal Efficiency. In: 2nd **International Conference on Environmental Science and Engineering (ESE)**, 2017. <http://dx.doi.org/10.12783/dteees/ese2017/14331>.

KANMANI, P.; ARAVIND, J.; KUMARESAN, K. Hydrolytic enzyme profiling of *Bacillus subtilis* COM6B and its application in the bioremediation of groundnut oil mill effluent. In: Prashanthi, M.; Sundaram, R. **Integrated Waste Management**, 2016, p. 179-189.

KAPILAN, R.; THAVARANJIT, A.C. Promotion of vegetable seed germination by soil borne bacteria. **Arch. Appl. Sci. Res.**, v. 7, n. 8, p. 17-20. 2015. ISSN 0975-508X.

KARIMINIAAE-HAMEDAANI, H.; KANDA, K.; KATO, F. Denitrification Activity of the Bacterium *Pseudomonas* sp. ASM-2-3 Isolated from the Ariake Sea Tideland. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 97, n. 1, p. 39-44. 2004. <https://doi.org/10.1263/jbb.97.39>.

KELEL, M.; ABERA, G.; YISMA, A.; et al. Isolation of phosphate solubilizing bacteria from acacia tree rhizosphere soil. **J. Microbiol. Biotechnol. Res.**, v. 4, p. 9-13. 2014. ISSN 2231-3168.

KHAN, M. Effect of Metals Contamination on Soil Microbial Diversity, Enzymatic Activity, Organic Matter Decomposition and Nitrogen Mineralisation (A Review). **Pak. J. Bio. Sci.**, v. 3, n.11, p. 1950-1956. 2000. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2000.1950.1956>.

KIEHL, E. J. **Fertilizantes orgânicos**, Editora Agronômica: Ceres Ltda, Piracicaba, 1985.

KIEHL, E. J. **Manual de Compostagem: maturação e qualidade do composto**. Piracicaba, 2012.

KIEHL, E.J. **Manual de Compostagem: maturação e qualidade do composto**. Piracicaba, 1998.

KOURAA, A.; FETHI, F.; LAHLOU, A.; et al. Reuse of urban wastewater by combined stabilization pond system en Benslimane (Marocco). **Urban Water**, v. 4, n. 4, p. 373-378. 2002. [https://doi.org/10.1016/s1462-0758\(01\)00067-x](https://doi.org/10.1016/s1462-0758(01)00067-x).

KUIPER, I.; LAGENDIJK, E. L.; PICKFORD, R.; et al. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptidebiosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. **Mol. Microbiol.**, v. 51, n. 1, p. 97-113. 2004. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03751.x>.

LENG, F.; XU, C.; XIA, X.; et al. Establishing knowledge on the sequence arrangement pattern of nucleated protein folding. **PLoS ONE**, v.12, n. 3, p. 1-12. 2017. ISSN 1932-6203.

LIBÂNIO, M. **Fundamentos de qualidade e tratamento de água**. Campinas: Editora Átomo, 2005.

LIMA, D. C.; CHAVES, M.; LIMA, A. C.; LIMA, D. L. Reuso de água para a irrigação: uma abordagem reflexiva. In: II Colóquio Sociedade, Políticas Públicas, Cultura e Desenvolvimento, 2012.

LÓPEZ, A.M.Q.; SILVA, A.L.S.; SANTOS, E.C.L. The fungal ability for biobleaching/biopulping/bioremediation of lignin-like compounds of agro-industrial raw material. **Química Nova** (online), v. 40, p. 916-931, 2017. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170067>.

LOURENÇO, A.; ARNOLD, J.; CAYRE, O. J.; et al. Flocculation Treatment of an Industrial Effluent: Performance Assessment by Laser Diffraction Spectroscopy. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 57, n. 7, p. 2628–2637, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b04521>.

LUCANGELI, C.; BOTTINI, R. Effects of *Azospirillum* spp. on endogenous gibberellin content and growth of maize (*Zea mays* L.) treated with uniconazole. **Symbiosis**, v. 23, n. 1, p. 63-72. 1997.

MACÊDO, J. A. B. **Águas & Águas: Métodos laboratoriais de análises físico-químicas & microbiológicas**. Juiz de Fora- MG, 2001.

MACHADO, A. A. O local e o global na estrutura da Política Ambiental Internacional: a construção social do acidente químico ampliado de Bhopal e da convenção da OIT. **Contexto Int.**, v. 28, n. 1, p. 8-51, 2006. <https://doi.org/10.1590/s0102-85292006000100007>.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. **J. Surfactants. Deterg.**, v.2, n. 2, p. 237-241. 1999. <https://doi.org/10.1007/s11743-999-0078-3>.

MALIK, A.; JAISWAL, R. Metal resistance in *Pseudomonas* strains isolated from soil treated with industrial wastewater. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v.16, n. 2, p.177- 182. 2000.

MANSOR, M. T. C. 1998. **Uso de leitos de macrófitas no tratamento de águas residuárias**. 1998. 106 f. Dissertação (mestrado em engenharia agrícola) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1998.

MANSOUR, D.; FOURCADE, F.; SOUTREL, I.; et al. Mineralization of synthetic and industrial pharmaceutical effluent containing trimethoprim by combining electro-Fenton and activated sludge treatment. **J. Taiwan Instit. Chem. Eng.**, v. 53, p. 58-67, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.02.022>.

MAPA- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/agroenergia/arquivos-producao/perfil-do-setor-sucroalcooleiro-2008-2009-conab.pdf/view>. Acesso em: 10 dez. 2017

MARDAD, I.; SERRANO, A.; SOUKRI, A. Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit. **Afr. J. Microbiol. Res.**, v. 7, n. 8, p. 626-635. 2013. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1431>.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 56, n. 5-6, p. 650-63. 2001. <https://doi.org/10.1007/s002530100701>.

MARIANO, A. P. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. 147 f. 2006. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) – Programa de Pós-Graduação em Geociências e Meio Ambiente, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

MARTINS, R.; BOAVENTURA, R.; PAULISTA, L. Treatment and Energy Valorisation of an Agro-Industrial Effluent in Upflow Anaerobic Sludge Reactor (UASB). **IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science**, 2017. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/95/4/042045>.

MATOS, A. D. M.; GOMES, I. C. P.; NIETSCHKE, S.; et al. Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 89, n. 4, p. 2945-2954. 2017. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160111>.

MATTA, M.E.M. Índice de perigo para subsidiar a aplicação de lodo de esgoto em solo agrícola. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011, 113 p.

MAYER, A. M. Determination of indole acetic acid by the Salkowsky reaction. **Nature**, v. 162, p. 1670-1671. 1985. <https://doi.org/10.1038/1821670a0>.

MAZA, M.; BANEGAS, N. R.; PARELLADA, E. A.; et al. Bioinoculación de *Chlorisgayana* cv. Finecut con *Pseudomonas tolaasii* IEXb y *Bacillus atrophaeus* CN4: estudio preliminar en la Llanura Deprimida Salina de Tucumán, Argentina. **Rev. Agron. Noroeste Argent.**, v. 37, n 1, p. 39-44. 2017. ISSN 0080-2069.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJIMAKERS, J. M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 37, p. 634-663. 2013. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>.

METCALF, A. M. P.; EDDY. **Wastewater engineering - treatment, disposal and reuse**, fourth ed. McGraw Hill, New York, 1991.

MILLER, G. L. Use of de dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem.**, v. 31, n. 3, p. 426-428. 1959. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.

MISHRA, N.; SUNDARI, K. S. Native PGPMs as bioinoculants to promote plant growth: response to PGPM inoculation in principal grain and pulse crops. **Int. J. Agric. Food Sci. Technol.**, v. 4, n. 10, p.1055-1064. 2013. ISSN 2249-3050.

MULLIGAN, C.; WANG, S. An evaluation of surfactant foam technology in remediation of contaminated soil. **Chemosphere**, v. 57, n. 9, p. 1079-1089. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.08.019>.

MUNNS, R. **The impact of salinity stress**. Plant stress. Virtual article. Disponível em: http://www.plantstress.com/Articles/salinity_i/salinity_i.htm. Acesso em: 13 dez. 2017.

NAUTYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphorus solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 170, n. 1, p. 265-270. 1999. [https://doi.org/10.1016/s0378-1097\(98\)00555-2](https://doi.org/10.1016/s0378-1097(98)00555-2).

NEUGEBAUER, M.; NALEPA, K.; CZEKAŁA, W.; et al. Energy efficiency of composting sewage sludge with the addition of maize straw. In: International Multidisciplinary Scientific Geo Conference SGEM, 16th, 2016, Viena. <https://doi.org/10.5593/SGEM2016/HB43/S11.034>.

NEVES, L. C. M.; OLIVEIRA, K. S.; KOBAYASHI, M. J.; et al. Biosurfactant Production by Cultivation of *Bacillus atrophaeus* AICC 9372 in Semidefined Glucose/Casein-Based Media. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 136, p. 539-554. 2007. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-9078-7>.

NUNES, J. A. **Tratamento físico-químico de águas residuárias industriais**. 5ed.Gráfica Editorial J Andrade. Aracaju, 2004.

OBI, L.U.; ATAGANA, H. I.; ADELEKE, R. A. Isolation and characterisation of crude oil sludge degrading bacteria. **Springer Plus**, v. 5, n.1, p. 1-13, 2016. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3617-z>.

OLADIPO, O. G.; EZEOKOLI, O. T.; MABOETA, M. S.; et al. Tolerance and growth kinetics of bacteria isolated from gold and gemstone mining sites in response to heavy metal

concentrations. **J. Environ. Manage.**, v.15, n. 15, p. 357-66. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.01.038>.

OLJIRA, T.; MULETA, D.; JIDA, M. Potential applications of some indigenous bacteria isolated from polluted areas in the treatment of brewery effluents. **Biotechnol. Res. Internat.**, v. 2018, p. 1-13, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9745198>.

PAKSHIRAJAN, K.; KHERIA, S. Continuous treatment of coloured industry wastewater using immobilized *Phanerochaete chrysosporium* in a rotating biological contactor reactor. **J. Environ. Manage.**, v. 30, n. 101, p. 118-123, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.02.008>.

PAUL, D.; PANDEY, G.; PANDEY, J.; et al. Accessig microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. **Trends in Biotechnoogy**, v. 23, n. 3, p. 135–142, 1995. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.01.001>.

PAZ, A.; CARBALLO, J.; PÉREZ, M. J.; et al. Biological treatment of model dyes and textile wastewaters. **Chemosphere**, v. 181, p. 168-177, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.046>.

PEDROTTI, A.; CHAGAS, R. M.; RAMOS, V. C.; et al. Causas e consequências do processo de salinização dos solos. **Rev. Eletronica Gestão Educação Tecnol. Ambiental**, v. 19, n. 2, p. 1308-1324. 2015. <https://doi.org/10.5902/2236117016544>.

PEELE, K. A.; CH, V. R. T.; KODALI, V. P. Emulsifying activity of a biosurfactant produced by a marine bacterium. **Biotechcnol.**, v. 6, n. 2, p. 1-6. 2016. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0494-7>.

PENÃ-YAM, L. P.; RUÍZ-SÁNCHEZ, E.; BARBOZA-CORONA, J. E.; et al. Isolation of Mexican *Bacillus* species and their effects in promoting growth of chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv Jalapenõ). **Indian J. Microbiol.**, v. 56, n. 3, p. 375-378. 2016. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0582-8>.

PEREIRA, A. R. B.; FREITAS, D. A. F. Uso de microrganismos para a biorremediação de ambientes impactados. **Rev. Eletrônica Gestão, educação Tecnol. Ambiental**, v. 6, n. 6, p. 975-1006, 2012. <https://doi.org/10.5902/223611704818>.

PEREZ, C.; PAULI, M.; BAZEQUE, P. An antibiotic assay by the agar well diffusion method. **Acta. Biol. Med. Exp.** v. 15, p.113-15. 1990.

PEROVANO FILHO, N.; SILVA, K. F. S.; LÓPEZ, A. M. Q. Decomposição fúngica de ácido tânico e de outros compostos em efluente agroindustrial. **Acta Scient. Techn.** (Impresso), v. 33, n.2, p. 145-153, 2011a. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v33i2.10117>

PEROVANO FILHO, N.; SILVA, K. F. S.; LÓPEZ, A. M. Q. Ação de micoflora de efluentes agroindustriais sobre diferentes corantes e substratos lignocelulósicos. **Acta Scient. Biol. Sci.** (Impresso), v. 33 (4), p. 427-435, 2011b. DOI: 10.4025/actascibiolsci.v33i4.6187

PEROVANO FILHO, N.; SILVA, K. F. S.; SANTOS, E. C. L.; QUEISSADA, D.D.; LÓPEZ, A. M. Q. Physicochemical monitoring of wastewater from a sugar and ethanol industry after bioaugmentation, with a proposal for reuse. **Acta Scientiarum. Technology** (Impresso), v. 38, p. 383, 2016. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v38i4.27795>

PERRUCHON, C.; BATIANIS, C.; ZOUBORLIS, S.; et al. Isolation of a diphenylamine-degrading bacterium and characterization of its metabolic capacities, bioremediation and bioaugmentation potential. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 22, p.1985-19496, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5132-0>.

PIPOLO, M.; MARTINS, R.C.; QUINTA-FERREIRA, R.M.; et al. Integrating the Fenton's Process with Biofiltration by to Reduce Chemical Oxygen Demand of Winery Effluents. **J. Environ. Qual.**, v.46, n.2, p. 436-442, 2017. <https://doi.org/10.2134/jeq2016.09.0338>.

PIVELE, R. P. **Qualidade da água e poluição: aspectos físico-químicos/RP**, ABES, São Paulo, 2005.

POI, G.; ABURTO-MEDINA, A.; MOK, P. C. Bioremediation of phenol-contaminated industrial wastewater using a bacterial consortium—from laboratory to field. **Water Air Soil Pollut.**, v. 228, n. 3, p. 228-289 2017. <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3273-0>

PORTO, A.L.M.; KASEMODEL, M.C.; MELGAR, G.Z. et al. Biodegradation of pesticides, In: **Pesticides in modern world-pesticides use and management**. STOYTICHEVA, M. (ed.), Chapter 20, 2011. DOI: 10.5772/950.

QUEISSADA, D. D.; SILVA, F.T.; PENIDO, J.S.; et al. *Epicoccum nigrum* and *Cladosporium* sp. for the treatment of oily effluent in an air-lift reactor. **Braz. J. Microbiol.**, v. 44, n. 2, 607-612. 2013. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822013000200041>.

QUINTANA, N.R.G.; CARMO, M.S.; MELO, W.J. Lodo de esgoto como fertilizante: produtividade agrícola e rentabilidade econômica. **Nucleus**, v. 8, n.1, 2011. <https://doi.org/10.3738/1982.2278.527>.

RADDADI, N.; CHERIF, A.; BOUDABOUS, A.; DAFFONCHIO, D. Screening of plant growth promoting traits of *Bacillus thuringiensis*. **Ann Microbiol.**, v. 58, n. 1, 47-52. 2008. <https://doi.org/10.1007/bf03179444>.

RADHAKRISHNAN, R.; LEE, I. Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 109, n p. 181-189. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.018>.

RADWAN, T. S. D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol-acético por bactérias diazotróficas. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, v. 40, n. 10, p. 997-1004. 2005. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2005001000008>.

RAJENDRAN, R.; PRABHAVATHI, P.; KARTHIKSUNDARAM, S.; et al. Biodecolorization and Bioremediation of Denim Industrial Wastewater by Adapted Bacterial Consortium Immobilized on Inert Polyurethane Foam (PUF) Matrix: A First Approach with Biobarrier Model. Polish. **J. Microbiol.**, v. 64, n. 4, p. 329-338, 2015. <https://doi.org/10.5604/17331331.1185230>.

RAMAKRISHNAN, B.; MEGHARAJ, M.; VENKATESWARLU, K.; et al. Mixtures of Environmental Pollutants: Effects on microorganisms and their activities in soils. **Reviews of Environmental and Contamination Toxicology**, v. 211, p. 63-120, 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-8011-33>.

RAST, W.; THORNTON, J. A. Trends in eutrophication research and control. **Hydrol Process.**, v. 10, p. 295-313. 1996. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1085\(199602\)10:2%3C295::aid-hyp360%3E3.3.co;2-6](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1085(199602)10:2%3C295::aid-hyp360%3E3.3.co;2-6).

REBELATO, M.G.; MADALENO, L. L.; RODRIGUES, A. M. Ponderação do impacto ambiental dos resíduos e subprodutos da produção industrial sucroenergética. **Rev. Gestão Ind.**, v. 09, n.2, p. 392-415, 2013.

RESOLUÇÃO Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras. Brasília/DF: MMA, 2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>. Acesso em: 20 dez. 2017.

RIBEIRO, M. R. **Origem e Classificação dos Solos Afetados por Sais**, pp. 11-19. In GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. (eds.), *Manejo da Salinidade na Agricultura: Estudos Básicos e Aplicados*. INCTSal, Fortaleza; 2010.

ROBERT, M.; MERCADE, M. E.; BOSCH, M. P.; et al. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T. **Biotechnol. Lett.**, v. 11, n. 12, p. 871-874. 1989.

RODRIGUES, A. A.; FORZANI, M. V.; SOARES, R. S.; et al. Isolation and selection of plant growth promoting bacteria associated with sugarcane. **Pesqui. Agropecu. Trop.**, v. 46, n.2, p. 1-10. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632016v4639526>.

RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, V.; GUZMÁN-MORENO, J.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, V.; et al. Biosorption of lead phosphates by lead-tolerant bacteria as a mechanism for lead immobilization. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 33, n. 150, p. 1-11. 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-017-2314-6>.

RUFFINI, C.M.; GIORGETTI, L.; BECARELLI, S.; et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soils: bioaugmentation of autochthonous bacteria and toxicological assessment of the bioremediation process by means of *Vicia faba* L. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 23, n. 8, p. 7930-7941, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6049-y>.

SAFADARI, M. S.; KARIMINIA, H. R.; NEJAD, Z. G.; et al. Study Potential of indigenous *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in Bioremediation of Diesel-Contaminated Water. **Water Air Soil Pollut.**, v. 228, p. 228-37. 2017. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3220-5>.

SALGADO, I.; CÁRCAMO, H.; CARBALLO, M. E.; CRUZ, M.; DURÁN, M. C. Domestic wastewater treatment by constructed wetlands enhanced with bioremediating rhizobacteria. **Environ. Sci. Poll. Res.**, v. 25, n. 21, p. 20391-20398, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9505-4>.

SANTOS, A. B.; ROSO, G. R.; MENEZES, C. R.; et al. The bioeconomy of microalgal heterotrophic bioreactors applied to agroindustrial wastewater treatment. **Desalin. Water Treatment.**, v. 64, p. 12-20, 2017. <https://doi.org/10.5004/dwt.2017.20279>.

SANTOS, B.S.; COSTA, P.F.; EYNG, E.; et al. Avaliação da Eficiência de Um Sistema de Tratamento por Wetland Construído Aplicado ao Efluente de um Frigorífico de Suínos. **Cienc. Exatas Tecnol.**, v. 37, n. 2, p. 13-22, 2016. <https://doi.org/10.5433/1679-0375.2016v37n2p13>.

SANTOS, D.S.; TESHIMA, E.; DIAS, S.M.F.; et al. Efeito da secagem em leito nas características físico-químicas e microbiológicas de lodo de reator anaeróbio de fluxo ascendente usado no tratamento de esgoto sanitário. **Rev. Eng. Sanit. Ambiental**, v. 22, n. 2, p. 341-349, 2017. <https://doi.org/10.1590/s1413-41522016100531>.

SANTOS, M. L. F.; BASTOS, R. K. X.; AISSE, M. M. **Tratamento e utilização de esgotos sanitários**. Rio de Janeiro: ABES, 2006.

SANTOS, V. R. **Avaliação da qualidade da água do Rio Andrada através do modelo QUAL2k**. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS.

SARATALE, R.G.; GANDHI, S.S.; PURANKAR, M.V.; KURADE, M.B.; GOVINDWAR, S.P.; OH, S.E.; SARATALE, G.D. Decolorization and detoxification of sulfonated azo dye C.I. Remazol Red and textile effluent by isolated *Lysinibacillus* sp. RGS. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 115, n. 6, p. 658-667, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.12.009>.

SARDINHA, D. S. et al. Avaliação da qualidade da água e autodepuração do Ribeirão do Meio, Leme (SP). **Rev. Eng. Sanit. Ambiental**, v.13, n.3, p. 329-338, Julho/Setembro 2008. <https://doi.org/10.1590/s1413-41522008000300013>.

SATPURE, S. K.; BANPURKAR, A. G.; DHAKEPHALKAR, P. K.; et al. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. **J. Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 30, n. 2, p. 127-144. 2010. <https://doi.org/10.3109/07388550903427280>.

SAWYER, C.N.; MC CARTY, P.L.; PARKIN, G.F. **Chemistry for Environmental Engineering**. New York: Mc Graw-Hill International Editions, 1994.

SCHINDLER, D.W.; HECKY, R.E.; FINDLAY, D.L.; STANTON, M.P.; PARKER, B.R.; PATERSON, M.J.; BEATY, K.G.; LYNG, M.; KASIAN, S. Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: Results of a 37-year whole-ecosystem experiment. **PNAS**, v. 105, p. 11254-11258, 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805108105>

SCHMIDELL, W.; SOARES, H. M.; ETCHEBEHERE, C.; MENEZES, R. J.; BERTOLA, N. C.; CONTRERAS, E. M. **Tratamento biológico de águas residuárias**, first ed. ABES, Florianópolis, 2007.

SEABRA, P. N. Uso da biorremediação em áreas impactadas pela indústria do petróleo. In: Melo, I.S.; Azevedo, J. L. *Microbiologia Ambiental*. 2.ed. Embrapa Meio Ambiente, 2008. 647p.

SELLA, S. R. B. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. *Bacillus atrophaeus*: main characteristics and biotechnological applications – a review. **J. Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 35, n. 4, p. 533-45. 2014. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.922915>.

SHABANAMOL, S.; DIVYA, K.; GEORGE, T. K.; et al. Characterization and in planta nitrogen fixation of plant growth promoting endophytic diazotrophic *Lysinibacillus sphaericus* isolated from rice (*Oryzasativa*). **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 102, p. 42-54. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.11.003>.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **J. Bot.**, v. 2012, p. 1-26. 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/217037>.

SHEN, Y.; JINGQING, G.; LINSHUAI, L. Municipal wastewater treatment via co-immobilized microalgalbacterial symbiosis: Microorganism growth and nutrients removal. **Bioresour. Technol.**, v. 243, p. 905–913. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.041>.

SHI, Z.; ZHANG, Y.; ZHOU, J.; et al. Biological removal of nitrate and ammonium under aerobic atmosphere by *Paracoccus versutus* LYM. **Bioresour. Technol.**, v. 148, p. 144–148. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.052>.

SHOEB, E.; AHMED, N.; AKHTER, J.; et al. Screening and characterization of biosurfactant-producing bacteria isolated from the Arabian Sea coast of Karachi. **Turk. J. Biol.**, v. 39, p. 210-216. 2015. <https://doi.org/10.3906/biy-1405-63>.

SILLEN, W. M. A.; THIJS, S.; ABBAMONDI, G. R.; et al. Effects of silver nanoparticles on soil microorganisms and maize biomass are linked in the rhizosphere. **Soil Biol. Biochem.**, v. 91, p.14-22. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.08.019>.

SILVA, A. A. L.; CARVALHO, M. A. R.; SOUZA, S. A. L.; et al. Heavy metal tolerance (cr, ag and hg) in bacteria isolated from sewage. **Braz. J. Microbiol.**, v. 2012, n. 4, p. 1620-1631. 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000400047>.

SILVA, A. C.; TORRADO, P. V.; ABREU JUNIOR, J. S. **Métodos de quantificação da matéria orgânica do solo**, Universidade de Alfenas, Alfenas, 1999.

SILVA, A.L. S.; SANTOS, E.C.L.; SANTOS, Í.A.P.; et al. Seleção polifásica de microrganismos produtores de polihidroxialcanoatos. **Química Nova** (Impresso), v. 39, p. 782-788, 2016. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20160083>.

SILVA, K. F. S.; SANTOS, E.C.L.; PEROVANO FILHO, N.; et al. Profile of enzymes secreted by *Nocardia* sp. isolated from sugarcane bagasse leachate and its application in degradative processes of organic matter. **African J. Microb. Res.**, v. 8, p. 3079-3086, 2014. <http://dx.doi.org/10.5897/AJMR2014.6679>

SILVA, M. O. M. B.; BISPO, D. F.; PAGANO, R. L.; et al. Isolamento de microrganismos e estudo da produção de lipase utilizando resíduos agroindustriais. **Sci. Plena.**, v. 12, n. 5, p. 12:1-9. 2016. <http://dx.doi.org/10.14808/sci.plena.2016.054214>.

SILVA, N. **Testes bioquímicos para a identificação de bactérias em alimentos**, Instituto de tecnologia de alimentos. Campinas: Instituto de tecnologia de alimentos; 1996.

SLIFINK, M. Tween 80 Opacity Test Responses of Various *Candida* Species. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 12, p.4626-4628. 2000.

SONG, C.; ZHANG, Y.; XIA, X.; QI, H.; LI, M.; PAN, H.; XI, B. Effect of inoculation with a microbial consortium that degrades organic acids on the composting efficiency of food waste. **Microb. Biotechnol.**, v. 11, n. 6, p. 1124-1136, 2018. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13294>.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; et al. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, v. 40, n. 11, p. 1149-1152. 2005. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2005001100015>.

SOUZA, E. C.; AZEVEDO, P. O. S.; DOMÍNGUEZ, J. M.; et al. Influence of temperature and pH on the production of biosurfactant, bacteriocin and lactic acid by *Lactococcus lactis* CECT-4434. **J. food**, v. 15, n. 4, p. 525-530. 2017. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1306806>.

SOUZA, L. A.; ANDRADE, S. A. L.; SOUZA, C. R.; et al. Tolerância e potencial fitorremediador de *Stizolobium aterrimum* associada ao fungo micorrízico arbuscular *Glomusetunicatum* em solo contaminado por chumbo. **Rev. Bras. Cienc. Solo**, v. 35, n. 3, p. 1441-1451, 2011. <https://doi.org/10.1590/s0100-06832011000400038>.

SOUZA, T. R.; BÔAS, R. L. V.; QUAGGIO, J. A.; et al. Dinâmica de nutrientes na solução do solo em pomar fertirrigado de citros. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, v. 47, n. 6, p. 846-854, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2012000600016>.

SOWMYA, M.; REJULA, M. P.; REJITH, P. G.; MOHAN, M.; KARUPPIAH, M.; HATHA, A. A. Heavy metal tolerant halophilic bacteria from Vembanad Lake as possible source for bioremediation of lead and cadmium. **J. Environ. Biol.**, v. 35, n. 4, p. 655-60. 2014.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 24, n. 4, p. 487-506. 2000. [https://doi.org/10.1016/s0168-6445\(00\)00036-x](https://doi.org/10.1016/s0168-6445(00)00036-x).

SURYANTI, V.; HANDAYANI, D. S.; MARLIYANA, S. D.; et al. Physicochemical Properties of Biosurfactant Produced by *Pseudomonas fluorescens* Grown on Whey Tofu. **Mat. Sci. Eng.**, v. 176, p. 1-6. 2017. <https://doi.org/10.1088/1757-899x/176/1/012003>.

TAMÁS, M.J.; SHARMA, K.S.; CHRISTEN, P. Heavy metals and metalloids as a cause for protein misfolding and aggregation. **Biomolecules** v.4, n.1, p. 252-67. 2014. <http://dx.doi.org/10.3390/biom4010252>.

THAPA, B.; KUMAR, K. C.; GHIMIRE, A. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. **Kathmandu Univ. J. Sci. Eng. Technol.**, v. 8, n. 1, p.164-170, 2012. <https://doi.org/10.3126/kuset.v8i1.6056>.

TOMOVA, I.; STOILOVA-DISHEVA, M.; LAZARKEVICH, I.; et al. Antimicrobial activity and resistance to heavy metals and antibiotics of heterotrophic bacteria isolated from sediment and soil samples collected from two Antarctic islands. **Front. Life Sci.**, v. 8, n. 4, p. 348-57. 2015. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1044130>.

TYAGI, M.; FONSECA, M.M.R.; CARVALHO, C.C. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation**, v. 22, n. 2, p. 231-241, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4>.

VEERAPAGU, M.; NARAYANAN, S. A.; PONMURUGAN, K.; et al. Screening selection identification production and optimization of bacterial lipase from oil spilled soil. **Asian J. Pharm. Clin. Res.**, v. 6, n. 3, p. 62-67. 2013. ISSN - 0974-2441.

VENKATESWAR, K.; REDDY, A.; VAMSHI, K.; et al. Applications of *Bacillus* sp in Aquaculture Waste. **Water Treat. Sci. Technol.**, v. 4, n. 5, p. 2018. ISSN: 2395-6011.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep-water rice. **J. Biotechnol.**, v. 91, n. 2-3, p. 127-141. 2001. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(01\)00333-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(01)00333-9).

VIJAYARAJ, A.S.; MOHANDASS, C.; JOSHI, D. Microremediation of tannery wastewater by siderophore producing marine bacteria. **Environ. Technol.**, v.9, p. 1-14, 2019. <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1615995>.

VILAÇA, A.C.; PINTO, D.C.A. Sustentabilidade do setor sucroalcooleiro. Disponível em: <http://www.fazu.br/ojs/index.php/posfazu/article/viewFile/467/359>. Acesso em: 24 jan. 2017.

VIRAMONTES-RAMOS, S.; PORTILLO-RUIZ, M. C.; BALLINAS-CASARRUBIAS, M. L.; et al. Selection of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated soil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 41, n. 3, p. 668-675. 2010. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822010000300017>.

VISCHETTI, C, CASUCCI C, PERUCCI P. Relationship between changes of soil microbial biomass content and imazamox and benfluralin degradation. **Biology and Fertility of Soils**. v. 35, n. 1, p. 13-17, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00374-001-0433-5>.

VOGEL, A. I. **Química Analítica Qualitativa**. 5. ed. Mestre Jou: São Paulo, 1981.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 2. ed. – Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais; 1996.

WANDERLEY, R. A. 2009. Salinização de solos sob aplicação de rejeito de dessalinizadores com e sem adição de fertilizantes. Disponível em <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede/handle/tede2/5675>. Acesso em: 15 jan. 2018.

WASEEM, A.; ARSHAD, J.; IQBAL, F.; SAJJAD, A.; MEHMOOD, Z.; MURTAZA, G. Pollution Status of Pakistan: A Retrospective Review on Heavy Metal Contamination of Water, Soil, and Vegetables. **BioMed Research International**, v. 2014, 29 p., 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/813206>.

WEEKLEY, J.; GABBARD, J.; NOWAK, J. Micro-level management of agricultural inputs: emerging approaches. **Agronomy**, v. 2, n. 4, p. 321–357. 2012. <https://doi.org/10.3390/agronomy2040321>.

WINSLEY, T.; VAN DORST, J. M.; BROWN, M. V.; et al. Capturing greater 16S rRNA gene sequence diversity within the domain Bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 78, p. 5938-41. 2012. <https://doi.org/10.1128/AEM.01299-12>.

WU, C.; LI, W.; WANG, K.; LI, Y.; Usage of pumice as bulking agent in sewage sludge composting. **Bioresour. Technol.**, v. 190, p. 516-521, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.104>.

YOTHI, K. J.; VIJAYALAKSHMI, K.; RANI, M. S.; et al. Isolation and screening of phosphate solubilizing bacterium from soil. **Biotechnol. Indian. J.**, v. 7, p. 6-10. 2013. ISSN 0974-7435.

YOUSSEF, N. A.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D. P.; et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **J. Microbiol. Methods**, v. 86, n. 2, p. 339-347. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.001>.

ZHANG, J.; XUE, Q.; GAO, H.; et al. Production of lipopeptidebiosurfactants by *Bacillus atrophaeus* 5-2a and their potential use in microbial enhanced oil recovery. **Microb. Cell. Fact.**, v. 168, p. 1-11. 2016. <https://dx.doi.org/10.1186%2Fs12934-016-0574-8>.

ZHAO, X.; WEI, Y.; ZHANG, F.; TAN, W.; FAN, Y.; XI, B. How do fungal communities and their interaction with bacterial communities influence dissolved organic matter on the stability and safety of sludge compost? **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, v. 26, n. 4, p. 4141-4146, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-4023-6>.

ZHOU, M.; HAIREN, Y.; XIAOWEI, Z. Isolation and characterization of a novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas stutzeri* KTB for bioremediation of wastewater. **Biotechnol. Bioprocess Eng.**, v.19, n. 2, p. 231-238. 2014. <https://doi.org/10.1007/s12257-013-0580-1>.

APÊNDICE

Apêndice 1. Sequências depositadas no National Center for Biotechnological Information (NCBI).**Pseudomonas aeruginosa strain LBPMA-EFI 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

GenBank: MH107766.1

[FASTA Graphics](#)[Go to:](#)

LOCUS MH107766 613 bp DNA linear BCT 28-MAR-2018

DEFINITION Pseudomonas aeruginosa strain LBPMA-EFI 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION MH107766

VERSION MH107766.1

KEYWORDS .

SOURCE Pseudomonas aeruginosa

ORGANISM [Pseudomonas aeruginosa](#)

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas.

REFERENCE 1 (bases 1 to 613)

AUTHORS Santos,E.C.L., Silva,A.L.S., Cruz,H.L. and Lopez,A.M.Q.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (23-MAR-2018) Biotechnology and Chemistry Institute, LBPMA, Campus A.C. Simoes, Maceio, Alagoas 57072-970, Brazil

COMMENT Sequences were screened for chimeras by the submitter using DECIPHER 2.2.0.

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..613

/organism="Pseudomonas aeruginosa"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="LBPMA-EFI"

/isolation_source="Effluent"

/db_xref="taxon:287"

/country="Brazil"

/collected_by="Elane Cristina Lourenco dos Santos"

/PCR_primers="fwd_name: 356F, fwd_seq: acwcctacgggwgccwgc,

rev_name: 1064R, rev_seq: ayctcacgrcagagctgac"

[rRNA](#) <1..>613

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 tgccgcgtgt gtgaagaagg tctcggatt gtaaagcact taaagtggg aggaagggca

61 gtaagttaat acctgtctgt ttgacgta ccaacagaat aagcaccggc taactcgtg

121 ccagcagccg cggtaatagc aagggtgcaa gcgtaatcg gaattactgg gcgtaaagcg

181 cgcgtaggtg gttcagcaag ttggatgtga aatccccggg ctcaacctgg gaactgcatc

241 caaaactact gagctagagt acggtagagg gtggtggaat ttctgtgta gcggtgaaat

301 gcgtagatat aggaaggaac accagtggcg aaggcgacca cctggactga tactgacact

361 gaggtgcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagatacc tggtagtcca gcgcgtaaac

421 gatgtcact agccgtggg atccttgaga tcttagtggc gcagetaacg cgataagtcg

481 accgctggg gactacggcc gcaaggttaa aactcaaatg aattgacggg ggccccgaca

541 agcgggtggag catgtggttt aattcgaaac accgcgaaga accttactg gccttgacat

601 gctgasaact ttc

//

SANTOS, E. C. L. *Isolamento e Seleção de Microrganismos Promotores de Crescimento Vegetal*.....

Bacillus atrophaeus strain LBPMA-EFII 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MH107104.1

[FASTA Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS MH107104 709 bp DNA linear BCT 28-MAR-2018
 DEFINITION Bacillus atrophaeus strain LBPMA-EFII 16S ribosomal RNA gene,
 partial sequence.
 ACCESSION MH107104
 VERSION MH107104.1
 KEYWORDS .
 SOURCE Bacillus atrophaeus
 ORGANISM [Bacillus atrophaeus](#)
 Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 709)
 AUTHORS Santos,E.C.L., Silva,A.L.S., Cruz,H.L. and Lopez,A.M.Q.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (23-MAR-2018) Biotechnology and Chemistry Institute,
 LBPMA, Campus A.C. Simoes, Maceio, Alagoas 57072-970, Brazil
 COMMENT Sequences were screened for chimeras by the submitter using
 DECIPHER 2.2.0.

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..709
 /organism="Bacillus atrophaeus"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="LBPMA-EFII"
 /isolation_source="Effluent"
 /db_xref="taxon:[1452](#)"
 /country="Brazil"
 /collected_by="Elane Cristina Lourenco dos Santos"
 /PCR_primers="fwd_name: 356F, fwd_seq: acwctacgggwgwgc,
 rev_name: 1064R, rev_seq: ayctcacgrcacgagctgac"
[rRNA](#) <1..>709
 /product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 tcttncgcaa tggacgaaag tntgacggag caacgccgag tgagtatga aggtttcgg
 61 atcgtaaac tctgttgta ggaagaaca agtgccgtc aatagggcg gcacctgac
 121 ggtacctaac cagaaagcca cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtagtg
 181 gcaagcgttg tccggaatta ttggcgtaa agggctcgca ggcggttct taagtctgat
 241 gtgaaagccc ccggctcaac cggggagggt cattggaac tggggaactt gactgcagaa
 301 gaggagagtg gaattccacg tgtagcgggtg aatgcgtag agatgtggag gaacaccagt

SANTOS, E. C. L. *Isolamento e Seleção de Microrganismos Promotores de Crescimento Vegetal*.....

```

361 ggcgaaaggcg actctctggt ctgtaactga cgctgaggag cgaagcgtg gggagcgaac
421 aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgag tgctaagtgt tagggggtt
481 ccgcccctta gtgctgcagc taacgcatta agcactccgc ctggggagta cggtcgcaag
541 actgaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc
601 gaagcaacgc gaagaacctt accaggtctt gacatcctct gacanccta gagatagggc
661 ttccccttcg ggggcagagt gacaggtggt gcatggtgt cgtcagctc

```

//

Bacillus cereus strain LBPMA-EFIII 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MH108122.1

[FASTA Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS MH108122 693 bp DNA linear BCT 28-MAR-2018

DEFINITION Bacillus cereus strain LBPMA-EFIII 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION MH108122

VERSION MH108122.1

KEYWORDS .

SOURCE Bacillus cereus

ORGANISM [Bacillus cereus](#)

Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus;
Bacillus cereus group.

REFERENCE 1 (bases 1 to 693)

AUTHORS Santos,E.C.L., Silva,A.L.S., Cruz,H.L. and Silva,A.L.S.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (23-MAR-2018) Biotechnology and Chemistry Institute,
LBPMA, Campus A.C. Simoes, Maceio, Alagoas 57072-970, Brazil

COMMENT Sequences were screened for chimeras by the submitter using
DECIPHER 2.2.0.

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..693

/organism="Bacillus cereus"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="LBPMA-EFIII"

/isolation_source="Effluent"

/db_xref="taxon:[1396](#)"

/country="Brazil"

/collected_by="Elane Cristina Lourenco dos Santos"

/PCR_primers="fwd_name: 356F, fwd_seq: acwcctacgggwgccwgc,

rev_name: 1064R, rev_seq: ayctcacgrcagagctgac"

[rRNA](#) <1..>693

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 agtagggaat ctccgcaat ggacgaaagt ctgacggagc aacgccgcgt gagtgatgaa
 61 ggctttcggg tcgtaaaaac tctgttgta gggaagaaca agtgctagtt gaataagctg
 121 gcacctgac ggtacctaac cagaaagcca cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa
 181 tacgtaggtg gcaagcgta tccggaatta ttgggcgtaa agcgcgcgca ggtggttct
 241 taagtctgat gtgaaagccc acggctcaac cgtggagggt cattggaac tgggagactt
 301 gagtgcagaa gaggaaagtg gaattccatg ttagcgggtg aatgcgtag agatatggag
 361 gaacaccagt ggcgaaagcg actttctggt ctgtaactga cactgaggcg cgaaagcgtg
 421 gggagcaaac aggattagat acctggtag tccacgccgt aaacgatgag tgctaagtgt
 481 tagagggttt ccgccctta gtgctgaagt taacgatta agcactccgc ctggggagta
 541 cggccgcaag gctgaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt
 601 ggttaattc gaagcaacgc gaagaacct accaggtctt gacatcctct gaaaacctc
 661 gagatagggc ttctcctcg ggagcagagt gac

//

Lysinibacillus macroides strain LBPMA-LOII 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MH108121.1

[FASTA Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS MH108121 667 bp DNA linear BCT 28-MAR-2018

DEFINITION Lysinibacillus macroides strain LBPMA-LOII 16S ribosomal RNA gene,
 partial sequence.

ACCESSION MH108121

VERSION MH108121.1

KEYWORDS .

SOURCE Lysinibacillus macroides

ORGANISM [Lysinibacillus macroides](#)

Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae;

Lysinibacillus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 667)

AUTHORS Santos,E.C.L., Silva,A.L.S., Cruz,H.L. and Lopez,A.M.Q.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (23-MAR-2018) Biotechnology and Chemistry Institute,

LBPMA, Campus A.C. Simoes, Maceio, Alagoas 57072-970, Brazil

COMMENT Sequences were screened for chimeras by the submitter using
 DECIPHER 2.2.0.

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..667

/organism="Lysinibacillus macroides"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="LBPMA-LOII"
 /isolation_source="sludge"
 /db_xref="taxon:33935"
 /country="Brazil"
 /collected_by="Elane Cristina Lourenco dos Santos"
 /PCR_primers="fwd_name: 356F, fwd_seq: acwcctacgggwgccwgc,
 rev_name: 1064R, rev_seq: ayctcacgrcacgagctgac"

[rRNA](#) <1..>667
 /product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 ttccacaatg ggcgaaagcc tgatggagca acgccgcgtg agtgaagaag gtttcggat
 61 cgtaaaactc tgttgtaagg gaagaacaag tacagtagta actggctgta ccttgacggt
 121 accttattag aaagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac gtaggtggca
 181 agcgttgctc ggaattattg ggcgtaaagc gcgcgcaggc ggtcctttaa gtctgatgtg
 241 aaagccacg gctcaaccgt ggagggtcat tggaaactgg gggacttgag tgcagaagag
 301 gaaagtggaa ttccaagtgt agcggtgaaa tgcgtagaga tttggaggaa caccagtggc
 361 gaagggcact ttctggtctg taactgacgc tgaggcgcga aagcgtgggg agcaaacagg
 421 attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgagtgc taagtgttag ggggtttccg
 481 ccccttagtg ctgcagctaa cgcattaagc actccgcctg gggagtacgg tcgcaagact
 541 gaaactcaaa ggaattgacg ggggcccgca caagcgtggg agcatgtggt ttaattcgaa
 601 gcaacgcgaa naaccttacc aggtcttgac atcccgttga ccaactgtaga gatatagttt
 661 ccccttc

//

Bacillus thuringiensis strain LBPMA-LOIII 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: MH107283.1

[FASTA Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS MH107283 717 bp DNA linear BCT 28-MAR-2018

DEFINITION *Bacillus thuringiensis* strain LBPMA-LOIII 16S ribosomal RNA gene,
 partial sequence.

ACCESSION MH107283

VERSION MH107283.1

KEYWORDS .

SOURCE *Bacillus thuringiensis*

ORGANISM [Bacillus thuringiensis](#)

Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus;
 Bacillus cereus group.

REFERENCE 1 (bases 1 to 717)

AUTHORS Santos,E.C.L., Silva,A.L.S., Cruz,H.L. and Lopez,A.M.Q.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (23-MAR-2018) Biotechnology and Chemistry Institute,
 LBPMA, Campus A.C. Simoes, Maceio, Alagoas 57072-970, Brazil

COMMENT Sequences were screened for chimeras by the submitter using
 DECIPHER 2.2.0.

```

##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
source               1..717
                    /organism="Bacillus thuringiensis"
                    /mol_type="genomic DNA"
                    /strain="LBPMA-LOIII"
                    /isolation_source="sludge"
                    /db_xref="taxon:1428"
                    /country="Brazil"
                    /collected_by="Elane Cristina Lourenco dos Santos"
                    /PCR_primers="fwd_name: 356F, fwd_seq: acwcctacgggwggcwgc,
rev_name: 1064R, rev_seq: ayctcacgrcacgagctgac"
rRNA                 <1..>717
                    /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
    1 gtnnggaatc ttccgcaatg gacgaaagtn tgacggagca acgccgctg agtgatgaag
    61 gctttcgggt cgtaaaactc tgtgttagg gaagaacaag tgctagtga ataagctgac
    121 accttgacgg tacctaacca gaaagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggttaata
    181 cgtaggtggc aagcgttacc cggaattatt gggcgtaaag cgcgcgcagg tggtttcta
    241 agtctgatgt gaaagccacc ggctcaaccg tggagggtca ttgaaactg ggagactga
    301 gtcagaaga ggaaagtgga attccatgtg tagcggtgaa atgcgtagag atatggagga
    361 acaccagtgg cgaaggcgac tttctgtct gtaactgaca ctgaggcgcg aaagcgtggg
    421 gagcaaacag gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgagtg ctaagtgtta
    481 gagggttcc gccctttagt gctgaagtta acgattaag cactccgct ggggagtacg
    541 gccgcaaggc tgaactcaa aggaattgac gggggcccgc acaagcggtg gagcatgtgg
    601 ttaattcga agcaacgca agaaccttac caggtcttga catcctctga naaccctaga
    661 gatagggctt ctcctcggg agcagagtga caggtggtgc atggttctc tcagctc
//

```

Apêndice 2. Custos dos reagentes para o preparo da formulação viável para aplicação do consórcio microbiano no campo.

Formulações para cultivo do consórcio	Valor/ litro de meio ou saquinho de 150 g	Valor para 30 dias de tratamento	Valor total safra (duração de 8 meses)
Meio sintético (bactérias)	R\$ 5,84	R\$ 2.452,80	R\$ 19.622,40
Meio sintético (fungos)	R\$ 18,32	R\$ 7.694,40	R\$ 61.555,20
Meio de baixo custo	R\$ 0,95	R\$ 273,60	R\$ 2.188,80