



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL
CURSO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL

Flora Silveira de Figueredo

Enriquecimento de bio sólido com *Bacillus subtilis*

Florianópolis
2023

Flora Silveira de Figueredo

Enriquecimento de biossólido com *Bacillus subtilis*

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Engenharia Sanitária e Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Engenharia Sanitária e Ambiental.

Orientadora: Eng. Fernanda D. Gonçalves Ferreira, M.Sc

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra

Figueredo, Flora Silveira de
Enriquecimento de biossólido com *Bacillus subtilis* /Flora
Silveira de Figueredo ; orientadora, Fernanda Daniela Gonçalves
Ferreira, 2023.
70 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade
Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Graduação em
Engenharia Sanitária e Ambiental, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Engenharia Sanitária e Ambiental. 2. Biossólido. 3.
Bacillus subtilis. 4. Sustentabilidade. 5. Enriquecimento. I.
Ferreira, Fernanda Daniela Gonçalves . II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Graduação em Engenharia Sanitária e
Ambiental. III. Título.

Flora Silveira de Figueredo

Enriquecimento de bioossólido com *Bacillus subtilis*

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental

Florianópolis, 07 de dezembro de 2023.

Prof. Bruno Segalla Pizzolatti, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Eng. Fernanda D. Gonçalves Ferreira, M.Sc.
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Maria Elisa Magri, Dr^a.
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Nelson Libardi Junior, Dr.
Avaliador
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho a minha irmã Maya, pequena sonhadora e luz na minha vida.

É por você que eu busco construir um mundo melhor.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Andreia e Wagner, que me possibilitaram essa conquista. Sou eternamente grata pelo apoio durante os desafios, pelo amor e carinho durante todas as decisões tomadas, pelos conselhos que tornaram o processo mais leve e por sempre estarem ao meu lado. Sempre. Por me trazerem até aqui e por moldarem a pessoa que eu sou hoje, tenho muito orgulho de quem me tornei.

À minha irmã Maya, que deu um novo sentido pra minha existência.

À minha família, que todos os dias me lembram da importância de seguir meus sonhos e alcançar meus objetivos. A todos aqueles que verdadeiramente acreditam no meu potencial.

A Deus por colocar pessoas e oportunidades tão especiais em meu caminho.

À minha orientadora e amiga Fernanda, que se fez presente durante todo o processo de criação desse trabalho, intensificando meu interesse pelo saneamento ecológico e unindo forças na construção de um planeta mais sustentável. Não poderia ter escolhido uma orientadora melhor.

Às minhas amigas e colegas de curso, por tornaram tudo mais divertido e prazeroso em incontáveis bons momentos.

A todos aqueles que de alguma forma prestaram ajuda no processo de construção desse trabalho, dentro e fora do laboratório.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pelos ideais de extensão universitária, de pesquisa, e por me proporcionar oportunidades incríveis, bem como ao Grupo de Pesquisas de Recuperação de Recursos em Sistemas de Saneamento (RReSSa) pelo financiamento do trabalho.

E por fim, ao curso de graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental e seus professores, por me capacitarem em uma profissão tão importante.

RESUMO

O lodo é um subproduto dos sistemas de tratamento de esgotamento sanitário e um valioso recurso possível de ser recuperado para aplicação no setor agrícola. Seu reaproveitamento gera economia de custos que seriam dispensados para sua deposição em aterros sanitários, além de evitar seu despejo de modo irregular no meio ambiente. Entretanto, o uso de biossólidos na agricultura pode apresentar riscos, uma vez que este recurso, por ser proveniente de esgoto doméstico, traz consigo uma variedade de micro-organismos patogênicos. Nesse contexto, o objetivo principal deste trabalho é enriquecer amostras de biossólido proveniente de lodo de tanque séptico tratado por wetlands construídos, com a bactéria *Bacillus subtilis*, utilizada na agricultura como agente de biocontrole de patógenos e como promotora de crescimento das plantas. Assim, busca-se saber através de uma transposição tecnológica, a eficácia do uso da bactéria *Bacillus subtilis* no biocontrole de bactérias entéricas modelos como *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Enterococcus* no biossólido, analisando o decaimento desses microrganismos indicadores. Além disso, realizou-se ensaio de fitotoxicidade, análise da mineralização e valores de pH e umidade do biossólido. Verificou-se que os decaimentos foram promissores independentes da presença de *Bacillus subtilis*, cuja presença não intensificou significativamente os decaimentos para os valores de pH e umidade encontrados no biossólido ao longo do tempo de análise.

Palavras-chave: Biossólido; *Bacillus subtilis*; Enriquecimento; Agricultura; Sustentabilidade.

ABSTRACT

Sludge is a byproduct of sewage treatment systems and a valuable resource that can potentially be recovered for use in the agricultural sector. Its reuse results in cost savings that would otherwise be incurred for its disposal in landfills, in addition to preventing its irregular dumping into the environment. However, the use of biosolids in agriculture may pose risks, as this resource, originating from domestic sewage, carries a variety of pathogenic microorganisms. In this context, the main objective of this work is to enrich samples of biosolids from treated septic tank sludge with the bacteria *Bacillus subtilis*, used in agriculture as a biocontrol agent for pathogens and as a plant growth promoter. Thus, through technological transposition, the effectiveness of using the *Bacillus subtilis* bacteria in the biocontrol of model enteric bacteria such as *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Enterococcus* in biosolids is sought to be determined by analyzing the decay of these indicator microorganisms. Additionally, phytotoxicity assays, mineralization analysis, and pH and moisture values of the biosolid were conducted. It was found that the decays were promising regardless of the presence of *Bacillus subtilis*, whose presence did not significantly enhance the decay for the pH and moisture values found in the biosolid over the analysis period.

Keywords: Biosolids; *Bacillus subtilis*; Enrichment; Agriculture; Sustainability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rotas da geração de lodo fecal	22
Figura 2: Funcionamento de um tanque séptico.....	23
Figura 3: Gerenciamento de lodo de tanque séptico	26
Figura 4: Wetland construído para tratamento de lodo	27
Figura 5: Esquema da escala piloto do wetlands contraídos estudados no tratamento de lodo de tanque séptico.....	37
Figura 6: Sistema de wetlands do CETRE - Epagri	37
Figura 7: Tratamentos com diferentes inoculações utilizados no experimento	39
Figura 8: Metodologia de análise do <i>Bacillus subtilis</i> como agente de biocontrole contra as bactérias <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> e <i>Enterococcus</i> no bioossólido	40
Figura 9: Ensaio de Fitotoxicidade.....	41
Figura 10: Determinação sólidos totais do bioossólido.....	43
Figura 11: Determinação de sólidos fixos no bioossólido	44
Figura 12: Variação dos valores de pH para o bioossólido incluindo média e desvio padrão por tratamento	46
Figura 13: Variação dos valores de umidade para o bioossólido incluindo média e desvio padrão por tratamento	47
Figura 14: Colônias da bactéria <i>Bacillus subtilis</i> em placa de Petri do Tratamento A	48
Figura 15: Retas de decaimento da bactéria <i>Escherichia coli</i> ATCC13706 no bioossólido em cada tratamento	49
Figura 16: Colônias da bactéria <i>E. coli</i> em Placas de Petri de amostras do Tratamento C para as diluições (a) -5 e (b) -4.	49
Figura 17: Colônias da bactéria <i>E. coli</i> em Placas de Petri de amostras do Tratamento B para as diluições (a) -5 e (b) -4.	50
Figura 18: Retas de decaimento da bactéria <i>Salmonella</i> WG49 NCTC12484 no bioossólido para cada tratamento	51
Figura 19: Retas de decaimento da bactéria <i>Enterococcus</i> no bioossólido para cada tratamento	52
Figura 20: Variação da concentração das bactérias presentes no Tratamento A (a), Tratamento B (b) e Tratamento C (c).	54

Figura 21: Radículas do ensaio de fitotoxicidade para o Tratamento 1 e Tratamento 2 após cinco dias de incubação.....	57
Figura 22: Sementes germinadas e medição do comprimento das radículas do controle do Tratamento 2.....	57
Figura 23: Gráfico Box-Plot com erro padrão (caixas) e mínimas e máximas dos valores obtidos para os teores de Sólidos Totais (ST), Sólidos Totais Voláteis (STV) e Sólidos Totais Fixos (STF).....	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Principais organismos patogênicos encontrados no lodo e doenças associadas	32
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de R ² , p, K, T90 e tempo de inativação para 4 Log10 para a bactéria <i>Escherichia coli</i> ATCC13706.....	49
Tabela 2: Valores de R ² , p, K, T90 e tempo de inativação para 4 Log10 para a bactéria <i>Salmonella</i>	51
Tabela 3: Valores de R ² , p, K, T90 e tempo de inativação para 4 Log10 para a bactéria <i>Enterococcus</i>	53
Tabela 4: Valores de média das sementes germinadas e do comprimento das radículas, GRS (%), CRR (%) e IG (%) para o Tratamento 1.....	55
Tabela 5: Valores de média das sementes germinadas e do comprimento das radículas, GRS (%), CRR (%) e IG (%) para o Tratamento 2.....	55
Tabela 6: Valores do teste de Tukey para o Tratamento 1	56
Tabela 7: Valores do teste de Tukey para o Tratamento 2.....	56
Tabela 8: Resultados do ensaio de sólidos totais, sólidos totais voláteis e sólidos totais fixos	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CETRE	Centro de Treinamento
CF	Coliformes Fecais
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CRR	Comprimento relativo da raiz
CTC	Centro Tecnológico
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DSM	Difco Sporulation Medium
ENS	Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
FAO	Organização para a Alimentação e Agricultura
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GRS	Germinação relativa das sementes
IG	Índice de germinação das sementes
MSB	Modified Scholten's Broth
N	Nitrogênio
P	Fósforo
RReSSa	Grupo de Pesquisas de Recuperação de Recursos em Sistemas de Saneamento
SNIS	Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento
SLABA	Slanetz-Bartley
SST	Sólidos Suspensos Totais
ST	Sólidos Totais
STV	Sólidos Totais Voláteis
STF	Sólidos Totais Fixos
TYGB	Tryptone Yeast Extract Glucose Broth
TSB	Trypticase Soy Broth
UFC.g-1	Unidade Formadora de Colônia por grama
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
XLD	Xilose Lisina Desoxicolato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	OBJETIVOS.....	19
1.1.1	Objetivo Geral	19
1.1.2	Objetivo Específico 1	19
1.1.3	Objetivo Específico 2	19
1.1.4	Objetivo Específico 3	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1	SISTEMAS DESCENTRALIZADOS DE ESGOTAMENTO SANITÁRIO 20	
2.1.1	Tanques sépticos: Tratamento	22
2.1.2	Lodo de Tanques Sépticos	23
2.2	GESTÃO DO LODO DE SISTEMAS DESCENTRALIZADOS.....	24
2.2.1	Coleta e tratamento do lodo de tanque séptico	24
2.2.2	Wetlands construídos para o tratamento do lodo de tanque séptico	26
2.3	BIOSSÓLIDO	29
2.3.1	Biossólido: Definição	29
2.3.2	Biossólido: Aplicações como biofertilizante.....	30
2.4	BIOFERTILIZANTES: RISCOS ASSOCIADOS	30
2.4.1	<i>Microrganismos patogênicos</i>	30
2.4.2	<i>Ecotoxicidade Ambiental</i>	32
2.5	PÓS-TRATAMENTO DE BIOSSÓLIDO	33
2.5.1	<i>Bacillus subtilis</i>	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1	TRATAMENTO APLICADO AO LODO DE TANQUE SÉPTICO PARA A OBTENÇÃO DO BIOSSOLIDO DO EXPERIMENTO	36
3.2	COLETA DO BIOSSÓLIDO	38
3.3	CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO BIOSSÓLIDO.....	38

3.4	INOCULAÇÃO DOS MICRORGANISMOS NO BIOSSÓLIDO	38
3.5	ENSAIO DE FITOTOXICIDADE DO BIOSSÓLIDO.....	40
3.6	ANÁLISE DA MINERALIZAÇÃO DO BIOSSÓLIDO: SÓLIDOS TOTAIS E SÓLIDOS VOLÁTEIS	42
3.6.1	Determinação de sólidos totais	42
3.6.2	Determinação sólidos totais voláteis	43
3.6.3	Determinação de sólidos totais fixos	44
3.7	PH E UMIDADE	44
3.8	TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS OBTIDOS.....	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	46
4.1	UMIDADE E PH	46
4.2	COMPORTAMENTO DO <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	47
4.3	DECAIMENTO DOS MICRORGANISMOS.....	48
4.3.1	<i>E. coli</i>	48
4.3.2	<i>Salmonella</i>	50
4.3.3	<i>Enterococcus</i>	52
4.3.4	Comportamento das bactérias nos tratamentos.....	53
4.4	TESTE DE FITOTOXICIDADE DO BIOSSÓLIDO	54
4.5	SÓLIDOS TOTAIS, SÓLIDOS TOTAIS FIXOS E SÓLIDOS TOTAIS VOLÁTEIS	58
5	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

O aumento da população, a exaustão dos recursos naturais e a crise energética são realidades que impulsionam a necessidade da implementação de uma abordagem mais sustentável na gestão de resíduos sólidos, com respeito ao meio ambiente (PAPPU *et al.*, 2007). Nesse sentido, para garantir o acesso à alimentação de qualidade conforme a população mundial sofre suas variações, alternativas sustentáveis para impulsionar o setor agrícola estão se tornando imprescindíveis. Uma delas que vem ganhando atenção nos últimos anos é a aplicação de lodo de esgotamento sanitário como biofertilizante (GU *et al.*, 2013).

Esse resíduo é interessante quando integrado a cadeia de reciclo de nutrientes, já que necessita ser removido regularmente dos sistemas de tratamento de esgoto, e o seu correto tratamento minimiza a liberação de poluentes no solo e água, além de reduzir os riscos de contaminação microbiológica. Além disso, sabe-se que a produção de lodo em tanques sépticos por habitante é de cerca de 20-30 gST, ou seja, é um resíduo em abundância capaz de ser tratado e transformado em biofertilizante (ANDREOLI *et al.*, 2007).

O lodo utilizado para esse fim tem origem tanto dos tratamentos centralizados de esgotamento sanitário quanto dos descentralizados. Porém, a perspectiva em relação à descentralização dos tratamentos de esgoto é uma questão emergente que visa o acesso universal aos serviços de saneamento básico e na preservação da qualidade dos corpos hídricos, enquanto vai de encontro ao cumprimento dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável, assegurando a disponibilidade e gestão sustentável da água e saneamento para todos, bem como a responsabilidade acerca da preservação dos recursos naturais (LIBRALATO; VOLPI GHIRARDINI; AVEZZÙ, 2012).

De acordo com Harada e Strande (2016), cerca de 2,7 bilhões de pessoas no mundo direcionam seu esgoto doméstico para sistemas de tratamento no lote e esse número deve aumentar para 5 bilhões até 2030. Dentre as opções, o tanque séptico é o sistema on-site mais amplamente utilizado, cuja função é atuar como uma unidade de tratamento primário, removendo até 40% da matéria orgânica quando devidamente projetado e conservado (EBRAHIMI, 2023).

Por outro lado, o lodo de esgoto apresenta um potencial de poluição significativamente elevado, e a sua gestão inadequada é uma ocorrência comum em muitos países, sobretudo nas nações em desenvolvimento (MAGRI *et al.*, 2016). Assim, para possibilitar o tratamento do lodo, deve-se realizar uma gestão efetiva e sem riscos de

contaminação, visando a redução de custos e vencendo os obstáculos relacionados ao manuseio e à disposição deste recurso (JAIN *et al.*, 2022).

Portanto, dentre as diversas tecnologias existentes, os Wetlands Construídos, amplamente utilizados para tratar águas residuárias de diferentes características, possuem alta capacidade de tratamento de lodos de tanques sépticos e bons resultados em relação a desidratação desse resíduo, por meio de uma combinação de processos físicos e biológicos, sendo uma alternativa eficiente considerando o baixo custo e facilidade de operação (PANUVATVANICH *et al.*, 2009). Esses sistemas consistem, basicamente, na associação de vegetação com os microrganismos do solo e raízes das plantas presentes no sistema, decompondo os resíduos orgânicos do lodo que distribui-se na superfície do wetland.

Por outro lado, se não tratado adequadamente, o biossólido pode ser perigoso caso aplicado na agricultura e na recuperação de solos degradados, principalmente em relação ao risco microbiológico relacionado à presença de patógenos nesses resíduos. Entre os microrganismos que podem causar danos à saúde humana e do meio ambiente, destacam-se a *Escherichia coli*, os ovos de helmintos (*Ascaris*) e protozoários patogênicos, como a *Giardia* (FUNASA, 2014).

Uma das possíveis alternativas de lidar com essa questão é a aplicação de medidas de biocontrole do biossólido utilizando-se a bactéria *Bacillus subtilis*, amplamente conhecida como uma importante bactéria promotora do crescimento das plantas. As bactérias do gênero *Bacillus* são largamente utilizadas pela indústria agrícola como base para produtos de biocontrole, sendo uma alternativa para os pesticidas e combatendo grande parte dos patógenos em plantas (ETESAMI; JEONG; GLICK, 2023). Assim, buscam auxiliar na segurança da aplicação do biossólido na agricultura e procuram minimizar o uso de defensivos químicos. Além disso, as bactérias do gênero *Bacillus* também são estudadas por sua capacidade de biocontrole de patógenos prejudiciais para a saúde humana (SHEN *et al.*, 2017).

Apesar destas aplicações os *Bacillus* não são normalmente aplicados em biossólidos, e o trabalho busca fazer esta transposição tecnológica (ETESAMI; JEONG; GLICK, 2023). Assim, a fim de fomentar a pesquisa acerca dos biossólidos provenientes do tratamento de lodo de sistemas descentralizados de esgotamento sanitário, por um viés microbiológico, esse trabalho pretende estudar, pela primeira vez, a viabilidade do pós-tratamento de lodo de tanque séptico tratado por wetlands construídos, utilizando-se a bactéria *Bacillus subtilis*, enriquecendo o resíduo e avaliando sua capacidade de biocontrole na inativação dos patógenos *Salmonella*, *E. coli* e *Enterococcus* após o processo de inoculação. Por fim,

procura-se incentivar as tecnologias no setor agrícola relacionadas a alternativas de biofertilizantes em prol de defensivos químicos (agrotóxicos).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Analisar o processo de enriquecimento de bio sólido proveniente de wetland de tratamento de lodo após mineralização.

1.1.2 Objetivo Específico 1

Avaliar a capacidade de biocontrole em bactérias modelos *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Enterococcus* por *Bacillus subtilis* inoculados em lodo de esgoto desaguado em wetland construído.

1.1.3 Objetivo Específico 2

Analisar a fitotoxicidade do bio sólido em sementes de *Lactuca Sativa*.

1.1.4 Objetivo Específico 3

Analisar a mineralização do bio sólido por meio de metodologias de análise de sólidos totais e voláteis.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SISTEMAS DESCENTRALIZADOS DE ESGOTAMENTO SANITÁRIO

No Brasil, o índice de atendimento da população ao sistema de esgotamento sanitário corresponde a 55,8% (SNIS, 2022). Porém, este índice de atendimento quantifica o acesso da população aos sistemas centralizados desse serviço, sistemas convencionais de coleta e tratamento constituído por redes coletoras e estações de tratamento de esgoto. Por outro lado, esses sistemas podem ser pouco práticos e desvantajosos economicamente em países em desenvolvimento, impulsionando a população desses países a investir em sistemas descentralizados de tratamento de esgoto, já que é uma alternativa menos onerosa e mais prática do ponto de vista operacional (MAGRI *et al.*, 2016).

Assim, a centralização do sistema de esgotamento sanitário é o usual no contexto urbano dos países desenvolvidos, já que satisfazem a demanda de áreas com populações expressivas. Nos países em desenvolvimento, as águas residuárias das residências, empresas e indústrias muitas vezes não recebem tratamento ou são frequentemente tratadas em sistemas no lote, como por exemplo os tanques sépticos, e despejadas (tratadas ou não) no solo ou em corpos hídricos próximos (LIBRALATO; VOLPI GHIRARDINI; AVEZZÙ, 2012).

Nesse sentido, o tratamento descentralizado dá-se pelo fato das águas residuárias serem tratadas próximo a fonte (WILDERER; SCHREFF, 2000). Todavia, a difusão de práticas descentralizadoras no saneamento esbarra na notável aceitação do público em geral em relação aos sistemas centralizados, dos quais estão amplamente habituados (LIBRALATO; VOLPI GHIRARDINI; AVEZZÙ, 2012). Uma possível explicação para essa questão é o desenvolvimento da consciência coletiva em torno do distanciamento entre os resíduos gerados e a fonte geradora, principalmente quando o assunto é esgoto, dificultando o acolhimento de uma abordagem descentralizada nesse quesito. Assim, todos os seres humanos produzem seus resíduos, mas geralmente não estão envolvidos diretamente em seu tratamento e preferem não se envolver (LIENERT; LARSEN, 2006).

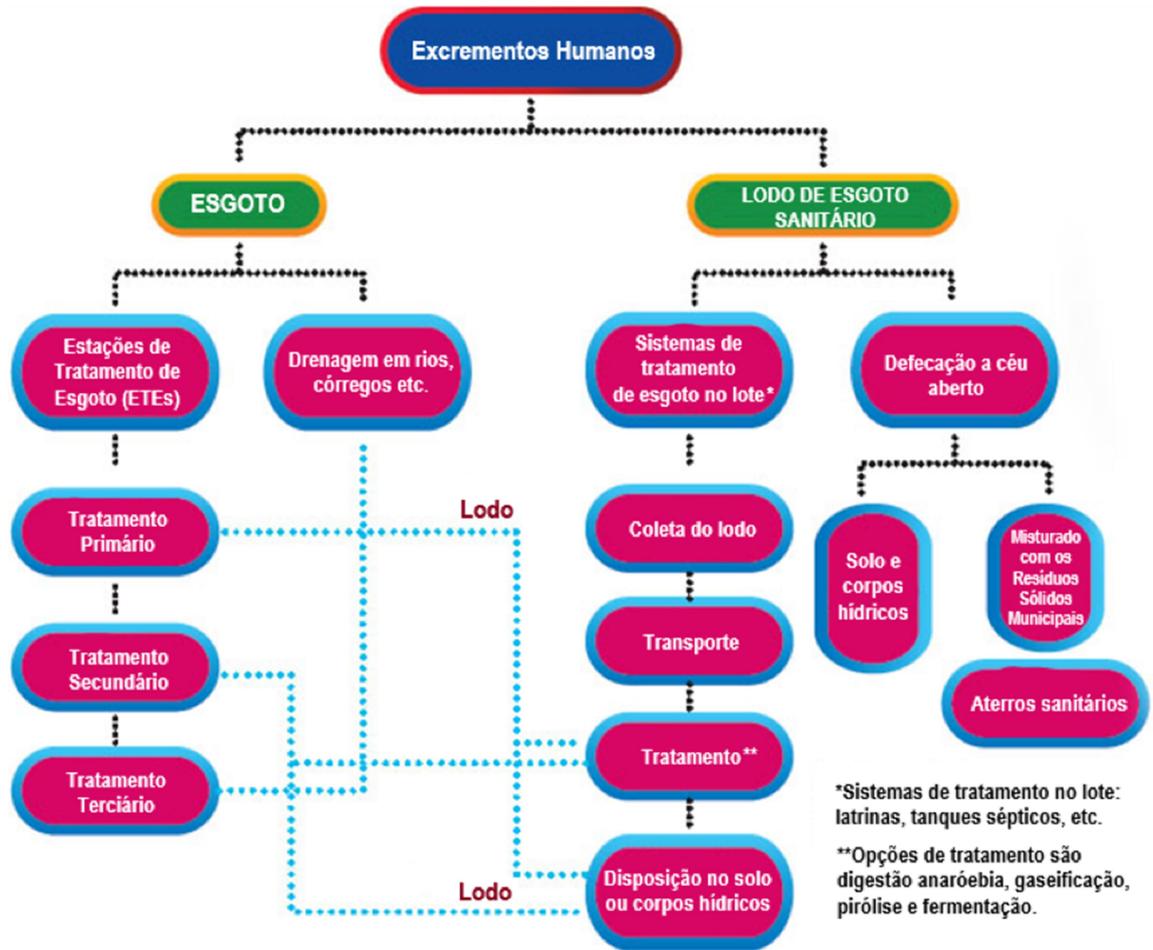
Analisando-se estudos acerca do tema, também é possível concluir a expressividade daqueles que não dispõem dos serviços de saneamento básico e como esse cenário pode ser contornado. De acordo com a Organização das Nações Unidas (2022), cerca de um quarto da população mundial não possui acesso a água potável e saneamento básico. Governanças locais que incentivam a descentralização do saneamento contribuem intensamente na redução da população nessas condições (BIEKER *et al.*, 2010; LARSEN; MAURER, 2011).

Por outro lado, as excretas de aproximadamente 60% da população mundial são descartadas sem tratamento no meio ambiente (MCCONVILLE *et al.*, 2019), outro problema cuja descentralização também é vista como uma possível solução. Assim, simplificam-se os sistemas de esgotamento sanitário por meio de tecnologias simples e custos relativamente baixos, retendo a matéria fecal e descarregando a fração líquida de modo mais responsável, diminuindo a poluição dos corpos hídricos e do solo (LIBRALATO; VOLPI GHIRARDINI; AVEZZÙ, 2012).

Nos sistemas centralizados, alguns pontos de desvantagem são o alto custo para a coleta e transporte das águas residuárias até o local de tratamento, os custos de manutenção, a forte dependência do fornecimento de energia elétrica e o risco de eutrofização dos corpos hídricos caso um grande volume de esgoto tratado seja despejado nesses locais. Em contrapartida, os sistemas centralizados de esgotamento sanitário podem intensificar o desenvolvimento de pequenas comunidades, já que exigem menos espaço para instalação, implantação de componentes de descarga mais simples e baratos, tubulações menores, possibilidade de otimizar o reuso no local, diminuindo o volume final a ser despejado nos corpos hídricos, entre outros (LIBRALATO; VOLPI GHIRARDINI; AVEZZÙ, 2012).

Além disso, os sistemas centralizados não correspondem às expectativas em torno do reuso e reutilização da água, bem como pouco investe na recuperação de nutrientes e eliminação de contaminantes emergentes. Sabe-se que os tratamentos descentralizados têm o potencial de satisfazer todos os requisitos dos tratamentos centralizados tradicionalmente aplicados. O diferencial favorável está na capacidade de redução do potencial de contaminação do efluente residual e dos possíveis desequilíbrios a serem causados no ecossistema, por meio da remoção de micropoluentes como metais, produtos farmacêuticos e cosméticos (BORSUK *et al.*, 2008).

Figura 1: Rotas da geração de lodo fecal



Fonte: Adaptado de Teriin.org (2023).

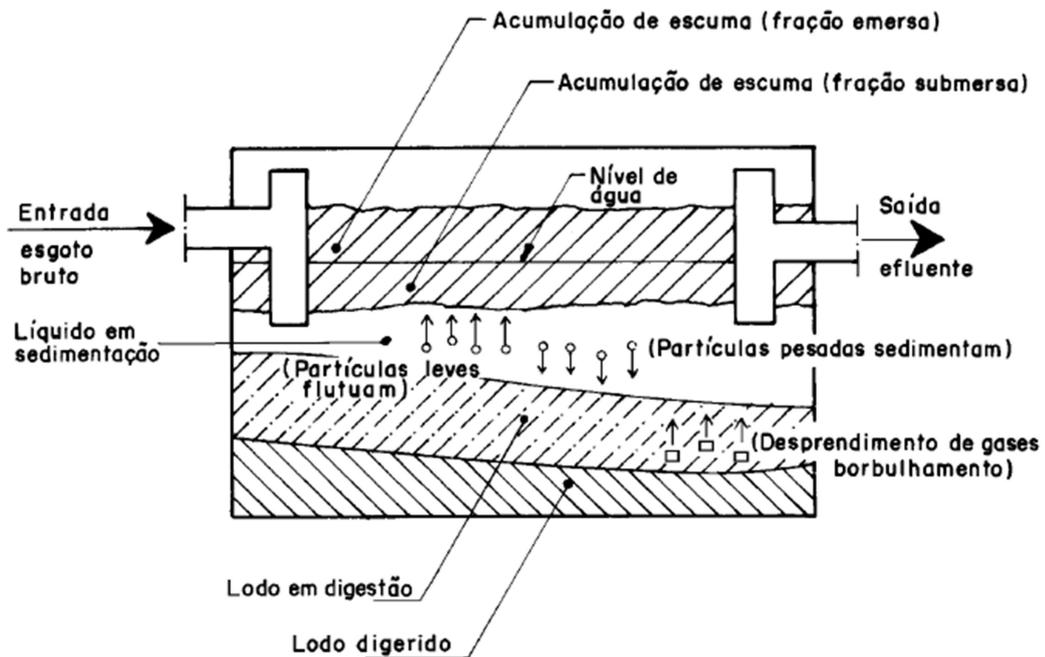
De todo modo, o ideal é uma abordagem que inclua a coexistência entre os dois modelos de tratamento que envolva os diferentes níveis de aplicabilidade e tratamentos necessários, acolhendo as contribuições de centros comerciais, hospitais, aeroportos, etc. (GUEST *et al.*, 2009).

2.1.1 Tanques sépticos: Tratamento

Os sistemas de tratamento no lote são utilizados para receber, armazenar e parcialmente tratar os resíduos fecais produzidos na interface do usuário. Existem diversos tipos de sistemas de contenção, como fossas de infiltração, tanques sépticos, reatores anaeróbicos de múltiplas câmaras, filtros anaeróbicos ascendentes, entre outros. Tanques sépticos e fossas de infiltração são os sistemas de contenção mais populares (SHUKLA *et al.*, 2023).

O tratamento do efluente no tanque séptico (fossa séptica) consiste em processos de sedimentação, flotação e digestão. Esse sistema compreende uma unidade cilíndrica ou de seção retangular, que pode ser construída em argamassa armada (ferrocimento), alvenaria, ou outro material que assegure a impermeabilidade e a durabilidade, cujas dimensões definidas no projeto técnico devem seguir as orientações da NBR 7.229/1993, variando em função do número de moradores do domicílio. A sua manutenção consiste na limpeza ou remoção periódica do lodo e espuma gerados pelo sistema, e é possível o reaproveitamento do seu efluente final em irrigação de pomares, desde que este passe por mais um processo de tratamento, como filtros biológicos (FUNASA, 2014).

Figura 2: Funcionamento de um tanque séptico



Fonte: NBR 7.229 (1993).

É importante que os tanques sépticos tenham seus sólidos removidos a cada 2-3 anos a depender da fonte de geração, mas geralmente esses sistemas são esvaziados apenas após o entupimento (EBRAHIMI *et al.*, 2018).

2.1.2 Lodo de Tanques Sépticos

O lodo é um resíduo gerado em quase todos os sistemas de tratamento de esgotos. O lodo de sistemas no lote possui características semissólidas e são estabilizadas de diferentes formas para diversificadas taxas de geração, causando grande variação na concentração de

diversos parâmetros físico-químicos e biológicos, bem como revelando sua heterogeneidade (Funasa, 2014; JAIN *et al.*, 2022).

Assim, possui alta Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Demanda Química de Oxigênio (DQO), Sólidos Suspensos Totais (SST), Nitrogênio (N), Fosfatos (P) e Coliformes Fecais (CF), sendo 10 a 20 vezes mais concentrado que o esgoto, dificultando seu tratamento. (EBRAHIMI *et al.*, 2018; KURUP *et al.*, 2002).

Além das características físico-químicas citadas, esse resíduo também contém elevada concentração de agentes patogênicos, dos quais os grupos de microrganismos mais comumente encontrados são os helmintos, protozoários, fungos, vírus e bactérias. Esses patógenos podem causar inúmeros danos à saúde, representando a necessidade do correto gerenciamento, tratamento e disposição final do lodo de tanque séptico (KOOTTATEP *et al.*, 2005).

Em relação à escolha do tratamento adequado, é preciso basear-se em pesquisas realizadas nesse campo de estudos, condições climáticas locais, número de usuários, viabilidade de remoção e serviços de transporte. Após tratado corretamente, a abundância de nutrientes e matéria orgânica são características que possibilitam o emprego do lodo de tanque séptico como biofertilizante e condicionador de solo. É importante que essas aplicações sejam disseminadas na agricultura e jardinagem, a fim de sensibilizar agricultores acerca do potencial desse resíduo (SHUKLA *et al.*, 2023).

2.2 GESTÃO DO LODO DE SISTEMAS DESCENTRALIZADOS

2.2.1 Coleta e tratamento do lodo de tanque séptico

Apesar da fração de lodo representar apenas 1% a 2% do volume de esgoto tratado, seu gerenciamento é complexo, representando de 20% a 60% do custo total de operação da estação de tratamento de esgoto. Embora o lodo possua grande importância econômica, a operação de sua destinação final é delicada, motivo pelo qual é frequentemente realizada fora das estações de tratamento (ANDREOLI; FERNANDES, 2007). Por outro lado, a gestão do lodo de tanque séptico inclui todos os processos que ocorrem na cadeia de saneamento desse resíduo, ou seja, sua coleta e desaguamento, transporte, tratamento e seu reuso ou disposição final (AKUMUNTU *et al.*, 2017).

Assim, ao ser removido dos tanques sépticos, o lodo é submetido a uma série de etapas consideradas desafiadoras para a maioria das cidades ao redor do mundo, devido à falta de estrutura e serviços adequados. Algumas cidades possuem sistemas de gestão desse

resíduo, porém contam com opções limitadas para seu gerenciamento e tratamento (MAQBOOL; SHAHID, 2022).

O processo inicial da gestão de lodo inicia-se com sua remoção dos tanques sépticos e seu transporte para um local seguro onde possa ser tratado (SHUKLA *et al.*, 2023). Conforme esclarecido pela Funasa (2014), não se recomenda limpezas anuais dos lodos de tanques sépticos. O ideal é que os tanques sépticos sejam dimensionados para que a retirada do lodo mínima ocorra a cada dois anos, já que desta forma o lodo estará mais estabilizado, pois foi digerido por mais tempo, além de ser economicamente mais vantajoso.

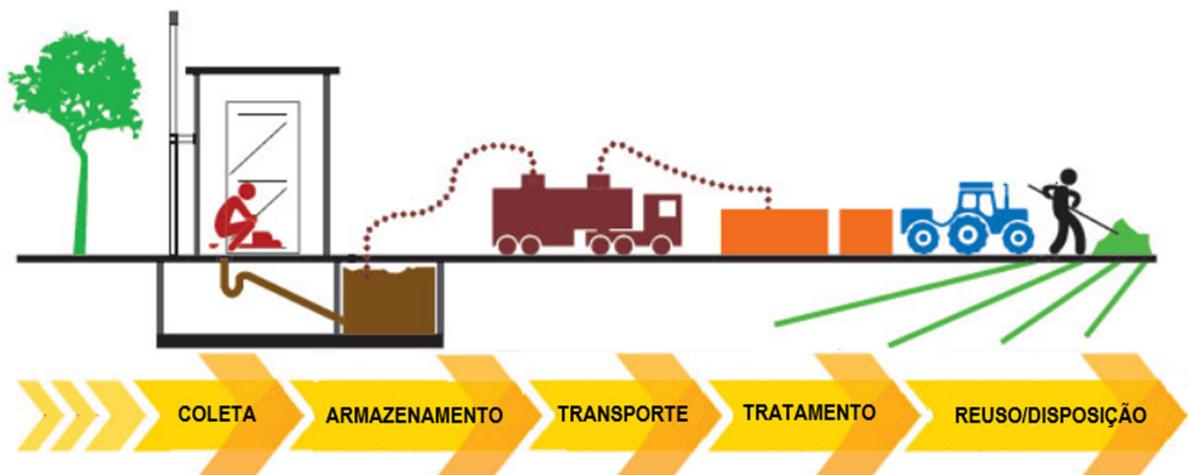
Nesse viés, é importante destacar que os serviços de coleta de lodo de sistemas descentralizados geralmente pertencem ao setor privado e funcionam sem legislações estabelecidas, criando um monopólio desse mercado e conseqüentemente aumentando os custos de coleta. A fim de superar esse problema, representantes locais e os governos devem cooperar com o setor privado para definir diretrizes apropriadas e legislações que busquem garantir o funcionamento ideal da cadeia de gerenciamento desse resíduo (SHUKLA *et al.*, 2023).

Ao ser coletado e transportado até o local de tratamento, a pasta semissólida que caracteriza o lodo inicia a sua primeira e principal etapa: a separação sólido-líquido, onde cada fração necessita ser tratada separadamente. Deste modo, desaguar o lodo é necessário para reduzir o conteúdo líquido e aumentar a sua matéria seca, concentrando os sólidos, diminuindo seu volume e facilitando sua degradação (NIELSEN; WILLOUGHBY, 2005). Assim, o tratamento da fração sólida do lodo tem como objetivo estabilizar os compostos orgânicos, os microrganismos patogênicos e tratar o odor do lodo bruto, por meio da decomposição de compostos orgânicos simples, como carboidratos, proteínas, lipídios, e compostos orgânicos complexos, como ácido fúlvico e ácido húmico (SHUKLA *et al.*, 2023).

Porém, as características e quantificação do lodo variam de local para local, impactando na definição do tratamento mais adequado e na estratégia de gestão utilizada, buscando alinhar aspectos financeiros e técnicos (JAIN *et al.*, 2022; SHUKLA *et al.*, 2023).

Assim, conciliando o tratamento apropriado para a fração sólida, o remanescente biossólido obtido pode ser utilizado como biofertilizante (NIELSEN; WILLOUGHBY, 2005). O produto final, estando adequado para aplicação agrícola, deve respeitar as legislações pertinentes e procurar tornar acessíveis os investimentos e custos de operação e manutenção, tornando o processo de tratamento o mais sustentável possível (UGGETTI *et al.*, 2012b; SHUKLA *et al.*, 2023).

Figura 3: Gerenciamento de lodo de tanque séptico



Fonte: Adaptado de Teriin.org (2023).

2.2.2 Wetlands construídos para o tratamento do lodo de tanque séptico

Desde a década de 80, os wetlands têm sido adaptados para serem capazes de tratar, de modo eficiente, o lodo de esgoto. A partir de então, muitos países da Europa e América do Norte utilizam essa tecnologia, que além de simples, apresenta boas taxas de tratamento e boa performance em relação ao desaguamento do lodo (UGGETTI *et al.*, 2010; BIANCHI *et al.*, 2011; MBURU *et al.*, 2013). Além disso, a mineralização do lodo tratado via wetlands demonstra alto potencial de obtenção de um bio sólido apto para a aplicação agrícola, além de demonstrar bom desempenho em relação a redução da concentração de metais pesados e microrganismos indicadores, como bactérias fecais no lodo mineralizado (UGGETTI *et al.*, 2012a).

Porém, ao contrário das águas residuárias, a pesquisa acerca de wetlands aplicado ao tratamento desse resíduo de tanque séptico ainda é limitada (ARDEN; MA, 2018; JAIN *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2015). Apesar disso, tem-se conhecimento que as principais vantagens desses sistemas incluem baixa necessidade de energia, reduzidos custos e facilidade de operação e manutenção, bem como integração ao meio ambiente (UGGETTI *et al.*, 2010).

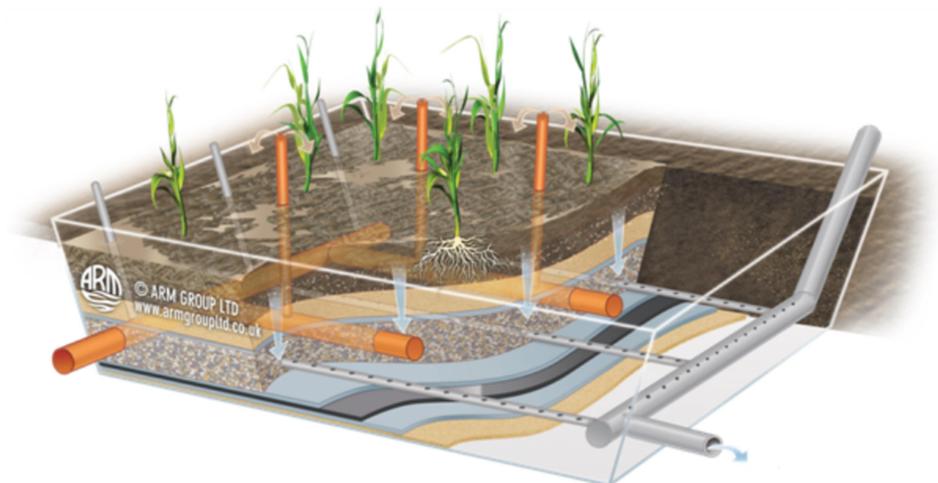
Os wetlands construídos para o tratamento de lodo consistem em recipientes selados formados por um filtro de sucessivas camadas de pedras e cascalho, onde são plantadas espécies botânicas próprias para tratar o resíduo. O lodo é bombeado para dentro do sistema e se dispersa de modo uniforme na superfície do wetland, iniciando-se a etapa de alimentação. Em seguida inicia-se o período de descanso, onde a fração líquida do lodo é drenada por gravidade através do resíduo e do filtro, evapotranspirada pelas plantas e onde ocorre a

degradação dos contaminantes (NIELSEN; STEFANAKIS, 2020). Assim, o resíduo torna-se mais concentrado e permanece na superfície do wetland onde, após alguns dias respeitando a então etapa de descanso, retoma-se o ciclo de alimentação.

Durante os períodos de alimentação, a altura da camada de lodo aumenta a uma taxa de 10 cm/ano. Quando a camada se aproxima da borda do sistema de wetland, usualmente a partir de um período de 8 a 12 anos, a alimentação é interrompida. O lodo inicia seu descanso final, que varia entre 2 meses a 1 ano, visando o aprimoramento da secagem do resíduo e sua mineralização. Após esse período, o produto final é retirado e o ciclo se reinicia. (UGGETTI *et al.*, 2012a). A qualidade deste resíduo dependerá principalmente dos processos de secagem (drenagem e evapotranspiração) e biodegradação da matéria orgânica do lodo (NIELSEN; WILLOUGHBY, 2005).

De acordo com Jain *et al.* (2022), os wetlands construídos podem receber várias configurações, como por exemplo wetlands flutuantes, com fluxo subsuperficial horizontal, fluxo subsuperficial vertical, etc. Em todos os casos, a camada de aplicação do efluente é acima da superfície do solo. A escolha da estrutura dependerá das características do resíduo a ser tratado, cujos aspectos variam de acordo com a população e o local, buscando-se alta eficiência de tratamento. Ainda assim, a performance do sistema definido também pode ser afetada por fatores operacionais tais quais as macrófitas selecionadas, os microrganismos presentes, a composição do substrato e o oxigênio dissolvido/aeração.

Figura 4: Wetland construído para tratamento de lodo



Fonte: Globalwettech (2023).

O tempo de alimentação de lodo no sistema pode variar de dias a semanas, possuindo períodos de descanso geralmente maiores que os períodos de alimentação. A seleção da

duração de cada período depende da profundidade do meio filtrante, o tamanho e qualidade da camada de lodo, condições ambientais, maturidade, espécies de plantas, fatores locais, entre outros (BRIX, 2017; NIELSEN; STEFANAKIS, 2020)

Em relação ao oxigênio, estudos indicam que esse elemento desempenha um importante papel nos wetlands construídos, sendo o principal responsável pela remoção de DBO e assim garantindo o funcionamento correto do sistema. As plantas são importantes nesse sentido, já que suas raízes formam zonas ricas em oxigênio, ajudando na sua concentração dentro do sistema e contribuindo para a mineralização e estabilização do lodo. Além disso, quando o lodo seca, rachaduras são produzidas devido ao movimento das raízes, criando caminhos para a introdução de ar. Os microrganismos que habitam no substrato e no resíduo degradam contaminantes utilizando o oxigênio presente na atmosfera infiltrada, na rizosfera e dos nitratos presente no resíduo (JAIN *et al.*, 2020).

Já em relação ao meio filtrante, este executa o papel de controlar as taxas de infiltração e tempo de retenção, filtrando sedimentos e partículas. Além disso, fornece uma superfície para a fixação do biofilme, atuam como fonte de nutrientes para os microrganismos e plantas e proporcionam uma superfície de sorção para vários nutrientes (DE ROZARI *et al.*, 2018; MANYÀ, 2012).

Acerca da seleção das plantas para o tratamento do lodo coletado de tanques sépticos, Magri *et al.* (2016) usou três diferentes espécies, denominadas *Zizaniopsis bonariensis*, *Cyperus Papyrus* e *Typha domingensis*, descobrindo que a *Zizaniopsis bonariensis* são as mais efetivas para o tratamento de lodo entre as espécies estudadas. Além disso, obteve-se uma correlação positiva entre a desidratação do lodo e coliformes totais, bem como a remoção de *E. coli*. De modo geral, as raízes das macrófitas desempenham um importante papel ao fornecerem área para a fixação de microrganismos e absorção de nutrientes presentes no lodo, utilizando-os para o seu crescimento.

A remoção de patógenos ocorre principalmente por meio de processos biológicos que acontecem durante a humificação do lodo em wetlands. Sua remoção também é influenciada por fatores físicos e químicos, como radiação UV, temperatura, pH e microrganismos que se alimentam desses patógenos. Já o nitrogênio é removido principalmente pelos processos como a nitrificação, desnitrificação, absorção pelas plantas, amonificação, assimilação de biomassa, assimilação pelas plantas, rotas físico-químicas (DE ROZARI *et al.*, 2018).

Uma comparação interessante de ser realizada entre as estações de tratamento de esgoto e os wetlands construídos relaciona-se a pegada de carbono do gás metano nestes dois sistemas, que no segundo caso é insignificante quando comparada a energia necessária e o

consumo de matéria prima, enquanto a geração desse metano é maior em estações de tratamento de esgoto (UGGETTI *et al.*, 2010).

Os contaminantes presentes no esgoto são tratados em wetlands construídos por meio de uma combinação de diferentes mecanismos compreendidos por atividades químicas, físicas e biológicas. Esses processos incluem ações sinérgicas de degradação microbiana, absorção pelas plantas, volatilização, adsorção e filtração (DE ROZARI *et al.*, 2015; SARDANA *et al.*, 2019; STEFANAKIS *et al.*, 2016).

Assim, resíduo sólido reutilizável e um lixiviado tratado são basicamente resultados de longos processos de desidratação e mineralização da matéria orgânica (NIELSEN; WILLOUGHBY, 2005). Ademais, o processo de desaguamento do lodo é afetado por parâmetros meteorológicos, como temperatura, velocidade do vento, precipitação, intensidade de radiação, espécies plantadas, propriedades do substrato, períodos de alimentação e descanso do sistema e aeração (GAGNON *et al.*, 2012; STEFANAKIS; TSIHRINTZIS, 2011).

2.3 BIOSSÓLIDO

2.3.1 Biossólido: Definição

De acordo com a Resolução CONAMA nº 498 de 19 de agosto de 2020 (BRASIL, 2020), cujo intuito é principalmente definir critérios e procedimentos para produção e aplicação de biossólido em solos, a definição de biossólido é estabelecida como o produto do tratamento do lodo de esgoto sanitário que, atendendo aos critérios microbiológicos e químicos estabelecidos pela própria Resolução, está apto para ser aplicado em solos.

Nesse sentido, Andreoli *et al.* (2007) afirma que o termo “lodo” é amplamente designado como o subproduto sólido do tratamento de águas residuárias. Nos processos de tratamento biológico, parte da matéria orgânica é absorvida e convertida em biomassa microbiana, chamada de lodo biológico ou lodo secundário, composto principalmente de sólidos de origem biológica, explicando o emprego do termo “biossólido”. Para ser um biossólido, as características químicas e biológicas devem possibilitar a aplicação do lodo na agricultura e outros usos produtivos. Assim, os biossólidos são a forma mais valorizada do lodo, em comparação com outros meios de disposição final, como incineração e aterros sanitários.

2.3.2 **Biossólido: Aplicações como biofertilizante**

Atualmente, a valorização agrícola desse resíduo é preferível em relação ao seu envio ao aterro sanitário, já que o reciclo de nutrientes do lodo garante o retorno dos componentes orgânicos, nutrientes e microelementos para as plantações, possibilitando a substituição de fertilizantes químicos (OLESZKIEWICZ; MAVINIC, 2002). Assim, uso de lodo de tanque séptico mineralizado como biofertilizante, além de reduzir a contaminação dos solos e das águas, diminui a sobrecarga das empresas produtoras de fertilizantes (WOOD; COWIE, 2004).

2.4 **BIOFERTILIZANTES: RISCOS ASSOCIADOS**

Assim, apesar do potencial do lodo como biofertilizante, esse resíduo possui restrições, pois pode conter patógenos e metais pesados capazes de prejudicar seres humanos e outros organismos, além do meio ambiente (MAÑAS; DE LAS HERAS, 2018).

2.4.1 ***Microrganismos patogênicos***

Em relação à presença de microrganismos patogênicos, sua concentração varia de acordo com a região geográfica, as condições sanitárias e socioeconômicas da população e principalmente em relação ao tratamento realizado no lodo. Vale ressaltar que algumas bactérias, como no caso da *Escherichia coli*, estão presentes no trato intestinal, então sua presença no lodo não indica necessariamente que as pessoas que produziram o esgoto estão doentes. Por outro lado, patógenos como helmintos são indicadores que demonstram que a população analisada sofre de alguma parasitose (FUNASA, 2014). O

Quadro 1 reúne os principais organismos patogênicos encontrados no lodo e as doenças causadas por eles.

Quadro 1: Principais organismos patogênicos encontrados no lodo e doenças associadas

ORGANISMO	DOENÇAS E PRINCIPAIS SINTOMAS
Grupo: Bactérias	
<i>Salmonella typhi</i>	Febre tifóide
<i>Escherichia coli</i>	Gastroenterite
<i>Leptospira spp</i>	Leptospirose
Grupo: Helmintos (Parasitas intestinais)	
<i>Ascaris lumbricóides</i>	Distúrbios digestivos, vômito, dor abdominal
<i>Taenia solium</i>	Distúrbios digestivos, vômito, dor abdominal
<i>Giardia lamblia</i>	Diarreia, perda de peso
Grupo: Vírus	
Vírus da Hepatite A e B	Hepatite infecciosa
Rotavírus	Gastroenterite
Esterovírus	Meningite, encefalite, doenças respiratórias

Fonte: Adaptado de Funasa (2014).

2.4.2 *Ecotoxicidade Ambiental*

Apesar das inúmeras vantagens que a aplicação de lodo de esgoto como biofertilizante oferece, conseqüentemente sua participação na cadeia alimentar pode gerar potenciais problemas relacionados à bioacumulação. Assim, o principal risco associado é a potencial acumulação em longo prazo de elementos tóxicos (SINGH; AGRAWAL, 2008), que podem ser absorvidos pelas culturas. Esses elementos incluem poluentes inorgânicos, como metais pesados, e micropoluentes orgânicos.

Nesse sentido, caso o resíduo contenha algum componente tóxico, sua utilização pode implicar em riscos para a saúde humana. Além disso, saber do efeito tóxico dos poluentes é elementar para possibilitar a avaliação de riscos ambientais (MAÑAS; DE LAS HERAS, 2018).

Deste modo, fitotoxicidade é o resultado da combinação de diversos fatores, que incluem a exposição a amônia, metais pesados, sais e ácidos graxos, que tem mostrado efeitos inibitórios no crescimento das plantas.

Em sementes de trigo, por exemplo, metais pesados como cromo, cobre, chumbo, níquel e zinco acima de um certo valor inibem a germinação das sementes e o comprimento das raízes (PHOUNGTHONG *et al.* 2016). Assim, ensaios de fitotoxicidade buscam avaliar a

germinação e crescimento de diferentes espécies de vegetais, fornecendo respostas biológicas a estabilização de bioossólidos (MENDES *et al.* 2016).

2.5 PÓS-TRATAMENTO DE BIOSSÓLIDO

2.5.1 *Bacillus subtilis*

Antigamente, a qualidade das plantações e sua produção foram significativamente impulsionadas pelo uso de defensivos agrícolas. No entanto, recentemente o gerenciamento das plantações tem sofrido mudanças, buscando-se evitar o uso de pesticidas químicos, pois possuem alto potencial de poluição do meio ambiente e seus resíduos afetam a saúde humana e os ecossistemas. O uso de bioossólidos como biofertilizante na agricultura pode ser uma alternativa nesse sentido, mas apesar de ser adequado para aplicação agrícola, um pós-tratamento pode ser necessário, buscando melhorar sua ação de biocontrole (ZWARA; OBARSKA-PEMPKOWIAK, 2000).

Uma alternativa possível e pouco explorada, é o pós-tratamento utilizando as bactérias do gênero *Bacillus*, que possuem diversos benefícios em relação ao controle de doenças em plantas (BACON; HINTON, 2002; LIU *et al.*, 2009) e na promoção do crescimento delas (RAJENDRAN *et al.*, 2008). Além disso, esses microrganismos também são aliados na ação inibitória contra patógenos prejudiciais à saúde humana, como por exemplo *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. enterica Typhimurium*, e *Shigella flexineri* (BACON; HINTON, 2002; FÖLDES *et al.*, 2000; ISLAM *et al.*, 2010; LA RAGIONE *et al.*, 2001; LA RAGIONE; WOODWARD, 2003; MOORE *et al.*, 2013; PINCHUK *et al.*, 2002; SABATÉ; AUDISIO, 2013).

No contexto agrícola, fitopatógenos são uma séria ameaça para a produção e incluem bactérias, fungos, nematóides, parasitas de plantas e vírus. São cada vez mais comuns e podem causar diversas doenças em plantas, gerando grandes perdas em plantações ao redor do mundo (ETASAMI *et al.* 2023). Por outro lado, patógenos como *Salmonella* e *E. coli*, por vezes podem contaminar solos e plantas, apresentando risco para a saúde humana (HOUGH *et al.*, 2018).

Nesse sentido, agentes de biocontrole atuam contra fungos e bactérias patogênicos por meio de uma série de mecanismos, como competição por espaço e nutrientes, parasitismo, antibiose e ou estimulando as defesas da planta hospedeira. Assim, as diversas capacidades e vantagens das bactérias do gênero *Bacillus* em comparação com os agroquímicos tradicionais

são aliadas no desenvolvimento de biofertilizantes e agentes de biocontrole para uso na agricultura (HASHEM *et al.*, 2019).

As bactérias do gênero *Bacillus subtilis* são chamadas de bactérias promotoras do crescimento das plantas, as quais crescem na rizosfera, colonizam raízes das plantas e ajudam-nas de diferentes maneiras. No geral, auxiliam no crescimento das defesas das plantas contra estresses bióticos e abióticos. Para promover o crescimento da planta e o controle da proliferação de patógenos, os mecanismos diretos e indiretos que o *Bacillus spp.* utiliza incluem a solubilização e mineralização de nutrientes como fósforo e potássio, fixação de nitrogênio produção de 1-aminocyclopropne-1-carboxylic acid (ACC), fitohormônios, compostos antimicrobianos, enzimas hidrolíticas e sideróforos (ETESAMI *et al.*,2023).

Além disso, os *Bacillus spp.* tem a habilidade de formar esporos resilientes que os fazem adequados para aplicações agrícolas, intensificando a saúde dos solos e das plantas (ETESAMI *et al.*,2023). Esses esporos são altamente resistentes a fatores ambientais severos, tornando-os favoráveis como agentes de biocontrole por suas vantagens de produção, transporte e armazenamento em diversos ambientes, sem perder sua viabilidade (DRIKS, 2004).

Em relação as medidas de biocontrole, Shen et al. 2017 afirma que o emprego da bactéria *Bacillus subtilis* demonstra ser mais promissor se comparado com métodos químicos ou físicos de controle, pois oferecem proteção contínua ao meio. Além disso, são frequentemente mais ativos que biocontrole baseado em outras bactérias promotoras de crescimento das plantas, pois os *Bacillus spp.* são mais efetivos na formação de esporos e produção de metabólitos, melhorando a viabilidade celular em produtos formulados para comercialização. Outras finalidades atualmente comuns do *Bacillus subtilis*, são o seu uso como probióticos oferecendo diversos benefícios para a saúde humana (KHATRI *et al.*, 2016; TOMPKINS *et al.*, 2010) e também são eficientes na segurança microbiana de produtos de origem animal (JOERGER; GANGULY, 2017).

Em relação a sua morfologia e características bioquímicas, são descritas como gram-positivas, em forma de bastonetes, facultativamente aeróbicas ou anaeróbicas com altas taxas de crescimento, baixos requisitos nutricionais e de catálise positiva.

Shen et al. (2017) estudou a internalização de *Salmonella* e *E.coli* em brotos de feijão aliados a ação antagonista realizada por diferentes cepas de *Bacillus subtilis*, já que os microrganismos *Salmonella* e *Escherichia coli* são comumente utilizados como indicadores de contaminação fecal em água e alimentos, fato que serviu de motivação para o presente

trabalho, consistindo em uma transposição tecnológica que visou avaliar o biocontrole contra agentes patogênicos como *E. coli* e *Salmonella*, além da bactéria *Enterococcus*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho é uma contribuição para a linha de pesquisa da recuperação de recursos proveniente do tratamento de efluentes domésticos, forte segmento da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde o Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (ENS) do Centro Tecnológico (CTC) abriga o grupo de pesquisas em Recuperação de Recursos de Sistemas de Saneamento (RReSSa).

3.1 TRATAMENTO APLICADO AO LODO DE TANQUE SÉPTICO PARA A OBTENÇÃO DO BLOSSÓLIDO DO EXPERIMENTO

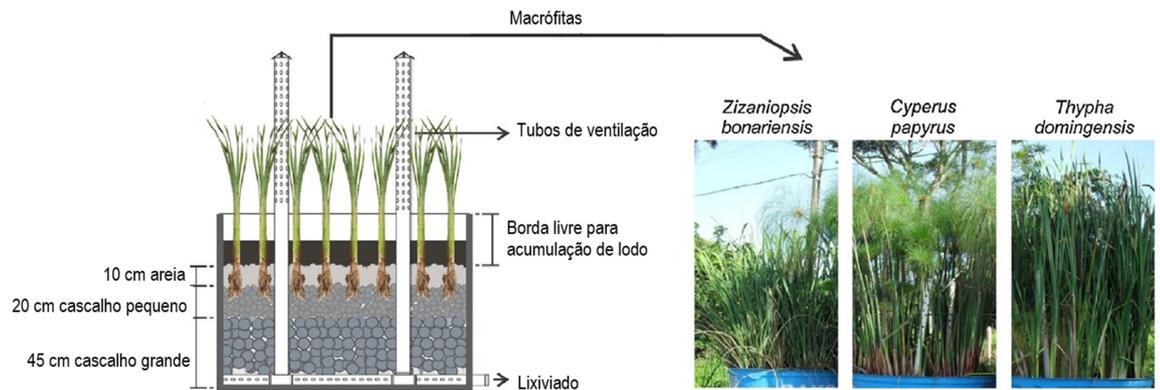
O biossólido analisado no presente estudo corresponde ao resíduo tratado por um sistema de wetlands construídos, localizado no Centro de Treinamento da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (CETRE - Epagri), localizado no bairro Itacorubi em Florianópolis, Santa Catarina. Esse sistema, definido por Magri et al. (2016), é composto por três wetlands construídos onde cada wetland possui 0,8 m² de área superficial e densidade de plantas de 15 plantas/m². Os pilotos diferenciam-se entre si pela espécie de macrófita plantada, sendo elas: *Zizaniopsis bonarienses*, *Cyperus Papyrus* e *Thypha domingensis*.

Cada wetland é constituído por uma camada de 0,10 m de areia grossa, 0,20 m de cascalho pequeno e 0,45 m de cascalho grande. Uma borda livre de 0,20 m foi projetada para permitir a acumulação do lodo desidratado. Possuem tubos de ventilação de 45 mm de diâmetro, alocados verticalmente nos tubos de drenagem, e a 1,0 m acima das superfícies filtrantes. A operação em relação à alimentação do sistema foi definida para uma aplicação de 200kgST.m⁻².year⁻¹ e tempo de percolação de seis dias (MAGRI *et al.*, 2016).

As condições operacionais do sistema foram realizadas em ciclos, sendo que: os wetlands construídos foram alimentados semanalmente, alternando o lodo de tanque séptico (carga de 150 kgST m⁻²ano⁻¹) e lixiviado (etapa de recirculação). Para alcançar a carga de sólidos totais, o volume de lodo aplicado foi definido como 430L para cada alimentação em cada wetland. O volume de lixiviado recirculado não foi constante por causa de processos como evapotranspiração e retenção de água no filtro. O tempo de retenção hidráulica estabelecido foi de seis dias para ambos os processos, alimentação de lodo e recirculação. Cada ciclo completo durou 13 dias. O experimento e ciclos de alimentação e descanso foram conduzidos até o ano de 2016. Assim, até a data de coleta do biossólido para a presente

pesquisa, o tempo de mineralização do lodo foi de aproximadamente sete anos (MAGRI *et al.*, 2016).

Figura 5: Esquema da escala piloto do wetlands contraídos estudados no tratamento de lodo de tanque séptico



Fonte: Magri et al. (2016)

Sobre a qualidade do líquido percolado, os três pilotos obtiveram boa eficiência em relação à Demanda Química de Oxigênio de 98-99% e por meio de análises estatísticas as performances dos wetlands podem ser consideradas iguais. O mesmo aconteceu com o nitrogênio amoniacal, cujas porcentagens de remoção foram de 79-82%, não apresentando diferenças estatísticas entre os pilotos (MAGRI *et al.*, 2016).

Figura 6: Sistema de wetlands do CETRE - Epagri



Fonte: Arquivo da autora (2023).

3.2 COLETA DO BIOSSÓLIDO

A coleta das amostras de bioossólidos foi realizada no dia 30 de agosto de 2023, no Centro de Treinamento da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (CETRE - Epagri), localizado no bairro Itacorubi em Florianópolis, Santa Catarina. O sistema responsável por tratar o lodo de tanque séptico e mineralizar seus compostos, transformando-o em bioossólido, é composto por três wetlands construídos de fluxo vertical em escala piloto. Em cada wetland utilizou-se uma espécie diferente de macrófitas: *Zizaniopsis bonarienses*, *Cyperus Papyrus* e *Thypha domingensis* (MAGRI *et. al*, 2016). Coletou-se uma amostra de bioossólido por wetland de aproximadamente 3,0 kg cada.

3.3 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO BIOSSÓLIDO

A contaminação microbiológica inicial do bioossólido foi analisada no Laboratório de Microbiologia do ENS/UFSC, por meio da preparação de amostra de bioossólido na qual se diluiu 1g de biofertilizante em 9 ml de solução salina peptonada e posterior diluição seriada. As análises ocorreram em triplicata e o plaqueamento ocorreu em ágares específicos para a identificação dos microrganismos de interesse presentes na amostra: para *Escherichia coli*, o ágar MacConkey; para *Salmonella*, o ágar XLD (Xilose Lisina Desoxicolato); para *Enterococcus*, o ágar SlaBa (Slanetz-Bartley); e por fim, para *Bacillus subtilis*, DSM (Difco sporulation médium). Assim, as placas foram incubadas a 37 ± 2 °C por 24 h e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC.g-1).

As condições iniciais do bioossólido foram verificadas por meio de análises microbiológicas realizadas em triplicatas em suas amostras. Assim, anteriormente à inoculação, constatou-se que o bioossólido não apresentou contaminação das bactérias *Salmonella* e *Enterococcus*. Porém, para as bactérias *E. coli* e *Bacillus subtilis*, a contaminação média encontrada nas amostras de bioossólido foram de, respectivamente, $1,17 \times 10^4$ UFC.g-1 (4,07 Log₁₀.UFC.g-1) e $4,65 \times 10^4$ UFC.g-1 (4,67 Log₁₀.UFC.g-1).

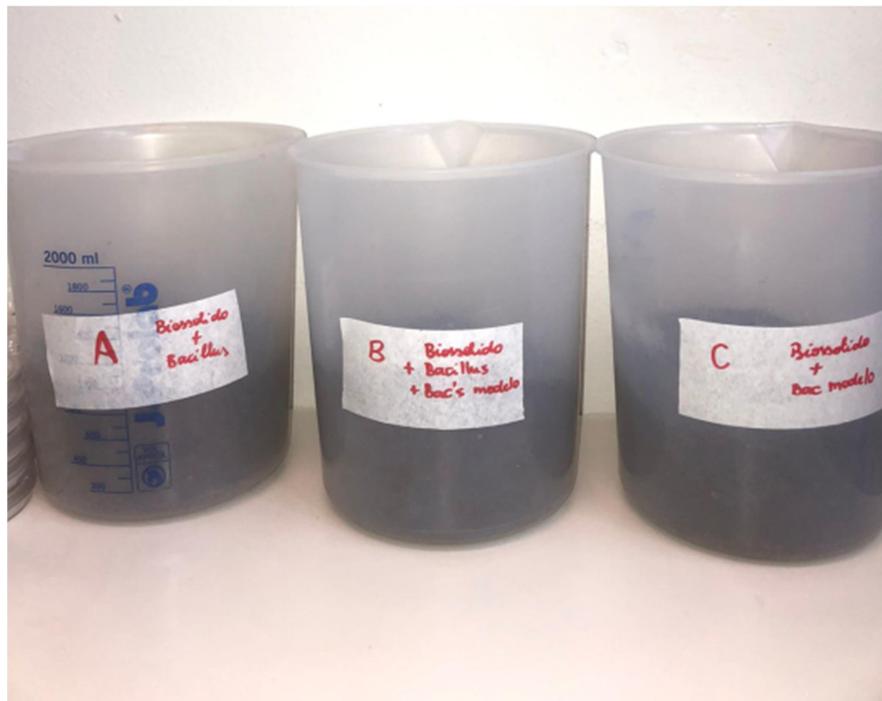
3.4 INOCULAÇÃO DOS MICRORGANISMOS NO BIOSSÓLIDO

O teste foi preparado para verificar se o enriquecimento do bioossólido com *Bacillus subtilis* poderia desempenhar alguma ação de biocontrole contra bactérias entéricas. Deste modo, as amostras dos três wetlands foram levadas ao laboratório, e misturadas para a obtenção de amostras compostas. Para tanto, amostras de 200g de cada wetland foram

utilizadas para formar uma amostra composta de 600 g. Por fim, 3 amostras compostas foram preparadas para receber os tratamentos do teste.

Para o ensaio de ação biocida dos *Bacillus subtilis*, foram utilizados os modelos bacterianos *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Enterococcus*. As cepas utilizadas foram: cepa bacteriana (BAC-FAR) – *Bacillus subtilis* subsp *spizizenii* CCCD – B005; cepa bacteriana (BAC-FAR) – *Enterococcus faecalis* CCCD – E002; *Escherichia coli* ATCC13706; e *Salmonella* WG49 NCTC12484. Assim, cada recipiente recebeu uma inoculação diferente: o tratamento A foi inoculado com *Bacillus subtilis* à 2% (m/v) da massa do biossólido (12 ml da bactéria *Bacillus subtilis*); O tratamento B, foi inoculado com 2% (m/v) de *Bacillus subtilis* (12 mL) e microrganismos indicadores *Salmonella*, *E. coli* e *Enterococcus* (12 ml de cada microrganismo); e por fim, a amostra C foi inoculada apenas com os modelos bacterianos *E. coli*, *Salmonella* e *Enterococcus* em mesma quantidade das amostras anteriores, 2% (m/v) ou 12 ml de cada microrganismo. A Figura 7 ilustra as amostras descritas.

Figura 7: Tratamentos com diferentes inoculações utilizados no experimento



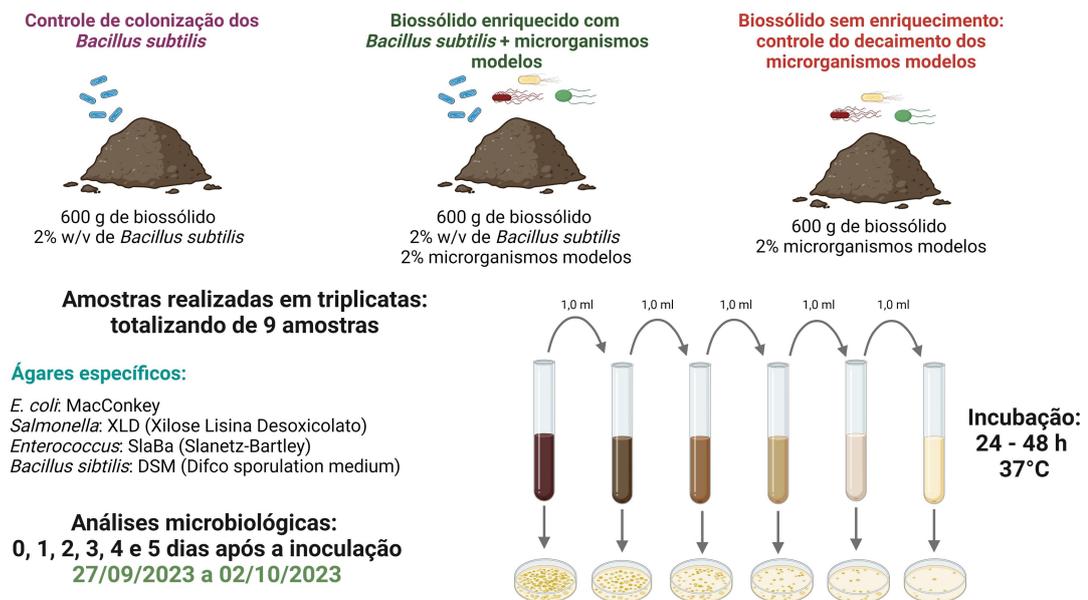
Fonte: A autora (2023).

A solução bacteriana para inoculação nas amostras de biossólido foi preparada através da propagação dos microrganismos utilizados em seus respectivos meios de crescimento. Os inóculos foram produzidos no laboratório RReSSa, no departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC, de modo que para a *E. coli* utilizou-se o meio MSB (Modified Scholtens' Broth), para *Salmonella* o TYGB (Tryptone Yeast Extract

Glucose Broth), para *Enterococcus* o TSB (Trypticase Soy Broth) e para *Bacillus subtilis* o caldo nutriente. Vials de 1,2 ml dos estoques bacterianos cresceram overnight, em 50 ml de meio de crescimento à 37°C por 12 h e posterior adição de 30 ml, com incubação por mais 5 horas.

Incorporaram-se manualmente os microrganismos no bio sólido e posteriormente realizou-se a diluição das amostras em triplicatas. Na primeira análise as diluições utilizadas foram -4, -5 e -6. Já a segunda e terceira análise ocorreram nas diluições -3, -4 e -5 e por fim, as análises do quarto e quinto dias foram nas diluições -2, -3 e -4. A primeira análise foi realizada 4 horas após a inoculação, sendo que outras 4 análises foram realizadas a cada 24 horas, totalizando 5 dias de análises.

Figura 8: Metodologia de análise do *Bacillus subtilis* como agente de biocontrole contra as bactérias *E. coli*, *Salmonella* e *Enterococcus* no bio sólido



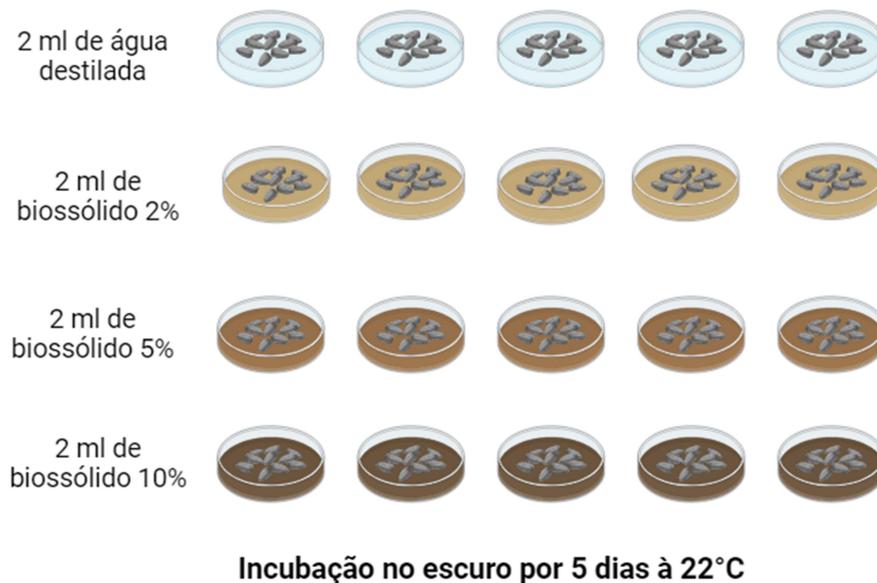
Fonte: A autora, por Biorender.com (2023).

3.5 ENSAIO DE FITOTOXICIDADE DO BIOSSÓLIDO

Para o ensaio de fitotoxicidade, utilizaram-se sementes de *Lactuca sativa*, popularmente conhecida com alface, a fim de avaliar o desenvolvimento de suas sementes quando envolta no bio sólido, por meio do estudo da quantidade de sementes germinadas e comprimento de suas raízes. Assim, adaptações realizadas na metodologia proposta por Priac et al. (2017), possibilitaram a análise do comportamento das sementes quando germinadas na presença de bio sólido diluído em água destilada a concentrações de 2%, 5% e 10%, além do controle com água destilada.

Desta forma, a cada concentração cinco placas de Petri foram utilizadas, onde em cada uma delas foram posicionadas 10 sementes e logo em seguida depositados um alíquota de 2 ml da diluição na concentração associada. No total, foram necessárias 20 placas de Petri (90x11mm) e 200 sementes de alface. Após a preparação das placas, estas foram conservadas em ambiente escuro a uma temperatura de 22°C durante cinco dias. Ao final desse período, contou-se a quantidade de sementes germinadas por placa e mediu-se o comprimento de suas radículas.

Figura 9: Ensaio de Fitotoxicidade



Fonte: A autora, por Biorender.com (2023).

Os resultados obtidos foram utilizados nos cálculos de germinação relativa das sementes (GRS), comprimento relativo da raiz (CCR) e índice de germinação (IG). A Equação 1, Equação 2 e Equação 3 descrevem os parâmetros citados e foram calculadas com auxílio do software Excel.

$$GRS (\%) = \frac{n^{\circ} \text{ de sementes germinadas na amostra}}{n^{\circ} \text{ de sementes germinadas no controle}} \quad (1)$$

$$CCR (\%) = \frac{\text{comprimento total das raízes germinadas na amostra}}{\text{comprimento total das raízes germinadas no controle}} \quad (2)$$

$$IG (\%) = \frac{GRS * CCR}{100} \quad (3)$$

Por fim, os dados receberam tratamentos estatísticos passando por um teste de normalidade e, apresentando normalidade, receberam uma análise de variância ANOVA de dois fatores.

3.6 ANÁLISE DA MINERALIZAÇÃO DO BIOSSÓLIDO: SÓLIDOS TOTAIS E SÓLIDOS VOLÁTEIS

Os sólidos totais e os sólidos voláteis são indicadores que podem ser empregados para avaliar o nível de estabilização da matéria orgânica, refletindo diretamente no teor de decomposição do lodo. Esse processo, por sua vez, está associado à capacidade do lodo de gerar odores desagradáveis e atrair vetores transmissores de doenças (CORREIA, 2009).

O Art. 11. da Resolução CONAMA nº489/2020 (BRASIL, 2020) define que biossólidos a serem utilizados em solos deverão atender a pelo menos um dos critérios apresentados pela resolução em relação a redução de atratividade de vetores. Entre os critérios, está a estabilização da fração do biossólido, tendo que ser comprovado uma relação entre sólidos voláteis e sólidos totais inferior a 0,65, para lodos provenientes de diversos processos de esgoto sanitário, entre eles sistemas alagados construídos, sempre de acordo com a evidência da conformidade com os parâmetros operacionais específicos ou com as variáveis de controle de qualidade do biossólido tratado.

Para as determinações de sólidos totais, sólidos totais fixos e sólidos totais voláteis, foram realizadas triplicadas de quatro diferentes amostras, sendo elas: amostra A, biossólido inoculado com *Bacillus subtilis*; amostra B, biossólido inoculado com *Bacillus subtilis* e as bactérias modelos *Salmonella*, *E. coli* e *Enterococcus*; amostra C, biossólido inoculado apenas com as bactérias modelos; e amostra D, sendo somente o biossólido sem nenhuma inoculação dos microrganismos de interesse. Deste modo, totalizaram-se 12 amostras.

3.6.1 Determinação de sólidos totais

No início do processo de determinação dos sólidos, os cadinhos de porcelana utilizados foram dispostos vazios em uma mufla a (550 ± 50) °C por 30 minutos e posterior resfriamento completo em dessecador, à temperatura ambiente. Após o esfriamento, foram pesados imediatamente, obtendo-se o peso do cadinho “P1”. Em seguida, cada cadinho foi preenchido com aproximadamente 10 g de biossólido. As amostras foram secas em estufa entre 103 e 105 °C por 1h, esfriadas em temperatura ambiente dentro do dessecador e pesadas imediatamente, cujo peso do resíduo seco em estufa mais o cadinho foi denominado de “P2”. Deste modo, a determinação de sólidos totais pode ser obtida através da diferença entre a

massa inicial de cada amostra e a massa obtida da amostra após a secagem, conforme a Equação 4 (APHA, 2012).

$$ST (\%) = \frac{(P2-P1)(g)}{\text{Peso da amostra (g)}} \quad (4)$$

Figura 10: Determinação sólidos totais do biossólido



Fonte: Arquivo da autora (2023).

3.6.2 Determinação sólidos totais voláteis

Para a determinação dos sólidos fixos, submeteu-se o resíduo resultante do processo de determinação dos sólidos totais ao procedimento de calcinação, onde permaneceu a uma temperatura de (550 ± 50) °C por 30 minutos, cujo esfriamento ocorreu em temperatura ambiente em dessecador e pesado imediatamente, obtendo-se o peso do resíduo seco após a calcinação mais o cadinho “P3”. Os sólidos fixos foram obtidos por meio da subtração do peso do cadinho com a amostra após calcinação do peso do cadinho no início do procedimento, conforme a Equação 5 (APHA, 2012).

$$STV (\%) = \frac{(P2-P3)(g)}{\text{Peso da amostra (g)}} \quad (5)$$

Figura 11: Determinação de sólidos fixos no biossólido



Fonte: Arquivo da autora (2023).

3.6.3 Determinação de sólidos totais fixos

Os sólidos voláteis são definidos como a diferença entre os sólidos totais e os sólidos voláteis, de acordo com a Equação 6.

$$STF (\%) = ST (\%) - STV (\%) \quad (6)$$

3.7 PH E UMIDADE

Ao longo das análises, mediram-se os valores de pH por meio de um medidor de pH, de acordo com o método descrito por Tedesco (1995), pH em água destilada 1:2,5 solo água, sendo 4 g de solo para 10 mL de água, com agitação por 1 min e posterior medição.

Os valores de umidade durante o experimento foram obtidos por meio da disposição de triplicatas das amostras de biossólido A, B e C em estufa a 105°C, durante 24 horas. Assim, os valores de umidade gravimétrica foram adquiridos por meio da Equação 7.

$$\text{Umidade gravimétrica} = 100 \frac{(a-b)}{b} \quad (7)$$

Onde:

a = peso da amostra úmida (g);

b = peso da amostra seca (g).

3.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS OBTIDOS

Os dados foram analisados por meio do software GraphPad Prism 10 e BioEstat 5.0. Os dados de pH, umidade e fitotoxicidade passaram por teste de normalidade com posterior aplicação dos testes paramétricos ANOVA com teste *post hoc* de Tukey para verificação da diferença estatística entre as médias. Os dados microbiológicos por sua vez, foram obtidos em UFC.g⁻¹ e log normalizados (Log10UFC.g⁻¹) para aplicação de regressão linear, de forma a obter os valores de T90 e o coeficiente de decaimento de cada micro-organismo nos tratamentos testados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

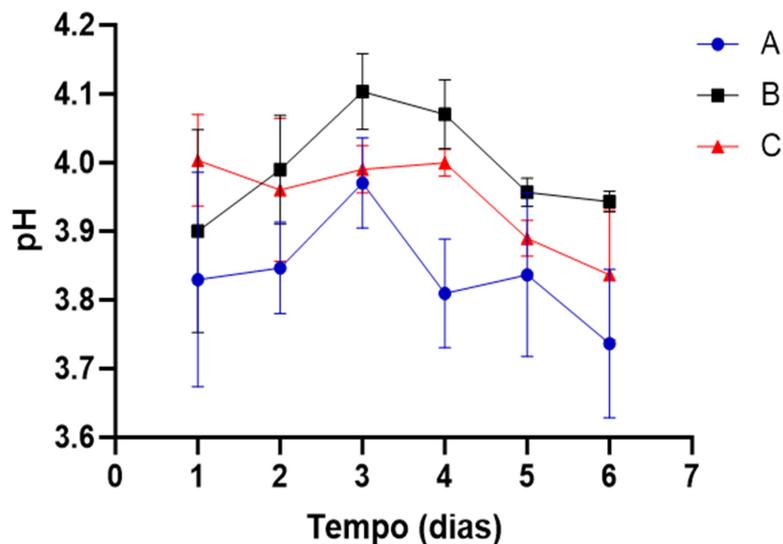
4.1 UMIDADE E PH

Medições de pH no bioossólido foram realizadas nos tratamentos A, B e C ao longo do tempo de experimento. Deste modo, anteriormente à inoculação das bactérias no bioossólido, o pH médio da amostra composta resultou em um valor de 3,6. Após inoculado, no primeiro dia de análise seus valores médios para os tratamentos A, B e C foram, respectivamente: 3,8, 3,9 e 4,0. Por outro lado, no quinto e último dia de análise, os valores foram de 3,7 para A, 3,9 para B e 3,8 para C. A variação de seus valores com desvio padrão pode ser observada na Figura 12.

Para a normalidade dos dados de pH, os tratamentos A, B e C apresentaram normalidade de dados ($p > 0,05$), cujos valores de p foram de 0,40 e 0,64 para A e B, respectivamente, e 0,14 para C.

Encontrou-se variância significativa entre os valores dos tratamentos A e B ($p < 0,01$), enquanto entre os tratamentos A e C não houve variância significativa ($p > 0,05$), bem como entre os tratamentos B e C ($p > 0,05$).

Figura 12: Variação dos valores de pH para o bioossólido incluindo média e desvio padrão por tratamento



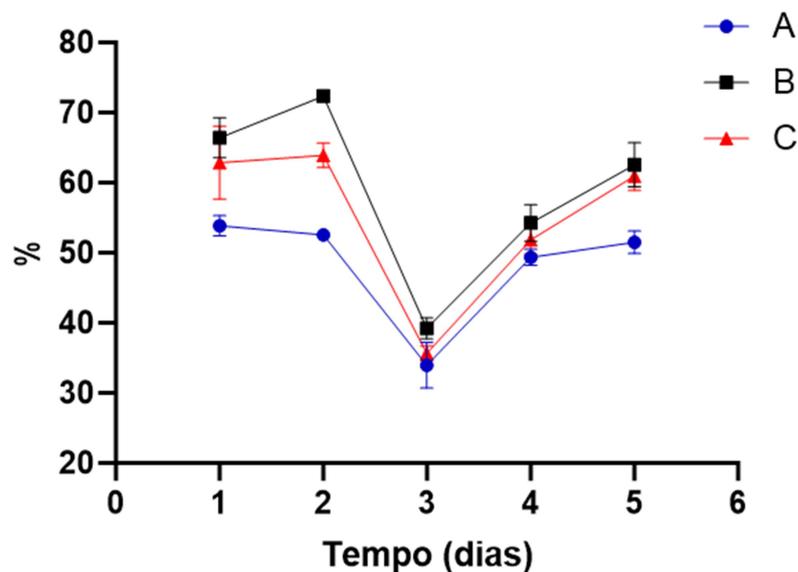
Fonte: A autora (2023).

No que diz respeito à umidade, para o primeiro dia de análise os valores médios foram de 53,88% para o tratamento A, 66,41% para B e para C foi de 62,88%. No terceiro dia de análise a média dos valores de umidade esteve próxima dos 36% em todos os tratamentos. O

quinto e último dia de análise retornou valores médios de 51,53% para A, 62,60% para B e 61,00% para C. A Figura 13 ilustra a variação dos valores do teor de umidade por meio da média e desvio padrão desses dados.

Os dados de umidade apresentam normalidade para os tratamentos B e C ($p > 0,05$), cujos valores foram, respectivamente, $p = 0,6924$ e $p = 0,1132$, já para o tratamento A o valor foi de $p = 0,0222$. Acerca da variância do teor de umidade, não houve variância significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$).

Figura 13: Variação dos valores de umidade para o biossólido incluindo média e desvio padrão por tratamento



Fonte: A autora (2023).

4.2 COMPORTAMENTO DO *BACILLUS SUBTILIS*

A concentração inicial de *Bacillus* na amostra de biossólido antes da inoculação, foi de: $4,65 \times 10^4$ ($4,07 \text{ Log}_{10} \text{UFC.g}^{-1}$). Após 4 horas da inoculação, a concentração média de *Bacillus subtilis* foi de $1,37 \times 10^6$ ($5,98 \text{ Log}_{10} \text{UFC.g}^{-1}$), $6,00 \times 10^5$ ($5,46 \text{ Log}_{10} \text{UFC.g}^{-1}$) e $8,83 \times 10^4$ ($4,94 \text{ Log}_{10} \text{UFC.g}^{-1}$) para os tratamentos A, B e C, respectivamente. No tratamento C, a presença de *Bacillus* indica a presença de espécies de *Bacillus sp.* naturais que já estavam presentes no biossólido antes do processo de inoculação, aqui denominadas de não típicas, pois apesar de parecidas morfológicamente, não se pode afirmar que são da mesma estirpe da cepa de *Bacillus subtilis* utilizada na inoculação.

Após 5 dias de inoculação, detectaram-se os valores de $1,59 \times 10^5$ ($5,14 \text{ Log}_{10} \text{UFC.g}^{-1}$) para A, $1,28 \times 10^5$ ($4,86 \text{ Log}_{10} \text{UFC.g}^{-1}$) para o tratamento B e para o C $7,71 \times 10^4$ ($4,83 \text{ Log}_{10} \text{UFC.g}^{-1}$).

Figura 14: Colônias da bactéria *Bacillus subtilis* em placa de Petri do Tratamento A



Fonte: A autora (2023).

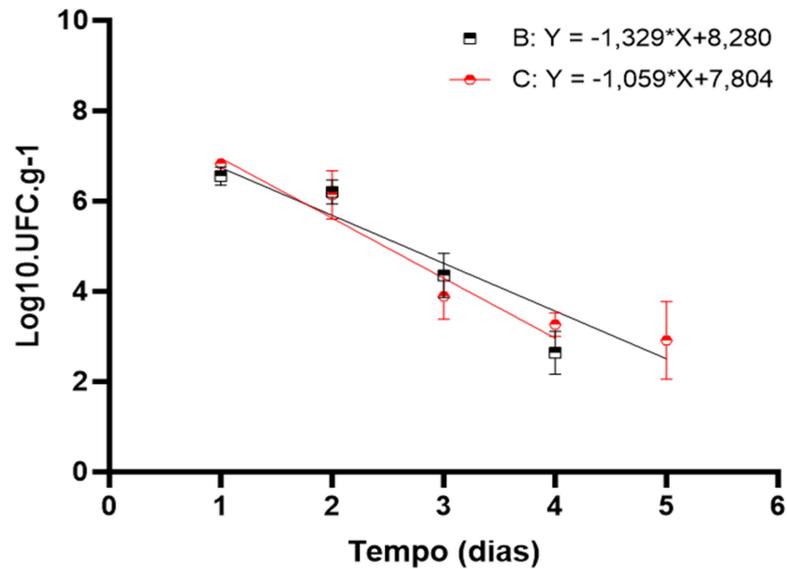
4.3 DECAIMENTO DOS MICRORGANISMOS

4.3.1 *E. coli*

Antes da inoculação, a contaminação média de *E. coli* encontrada nas amostras de biossólido foi de $1,17 \times 10^4$ UFC.g-1 (4,07 Log10.UFC.g-1). Quatro horas após a inoculação, os tratamentos apresentaram uma concentração média inicial correspondente a $3,82 \times 10^6$ (6,55 Log10.UFC.g-1) para o tratamento B e $6,73 \times 10^6$ (6,83 Log10.UFC.g-1) para o tratamento C. No quarto dia de análise, detectou-se $5,75 \times 10^2$ (2,64 Log10.UFC.g-1) no tratamento B e $2,0 \times 10^3$ (3,26 Log10.UFC.g-1) no tratamento C. Após 5 dias de inoculação, não detectou-se *E. coli* no tratamento B, porém para C a concentração correspondente foi de $2,08 \times 10^3$ (2,91 Log10.UFC.g-1). Logo, o decaimento dessa bactéria foi de 3,91 unidades logarítmicas para o tratamento B entre o primeiro e quarto dias de análise o decaimento para o tratamento C do primeiro ao quinto dia foi de 3,91 unidades logarítmicas.

Em relação ao tratamento A, não detectou-se *E. coli* ao longo das análises, porém na quarta e quinta análise houve a detecção de bactérias não típicas, cujas concentrações médias foram de $8,67 \times 10^2$ (2,94 Log10.UFC.g-1) e $3,73 \times 10^3$ (3,57 Log10.UFC.g-1), respectivamente. Bactérias não típicas também apareceram em resultados do quarto dia para o tratamento C, com uma detecção de $8,00 \times 10^2$ (2,90 Log10.UFC.g-1), bem como uma detecção em B, no quinto dia, de $1,00 \times 10^2$ (2,00 Log10.UFC.g-1). O comportamento da *E. coli*, bactérias típicas das cepas de referência, ao longo das análises está demonstrado na Figura 15.

Figura 15: Retas de decaimento da bactéria *Escherichia coli* ATCC13706 no biossólido em cada tratamento



Fonte: A autora (2023).

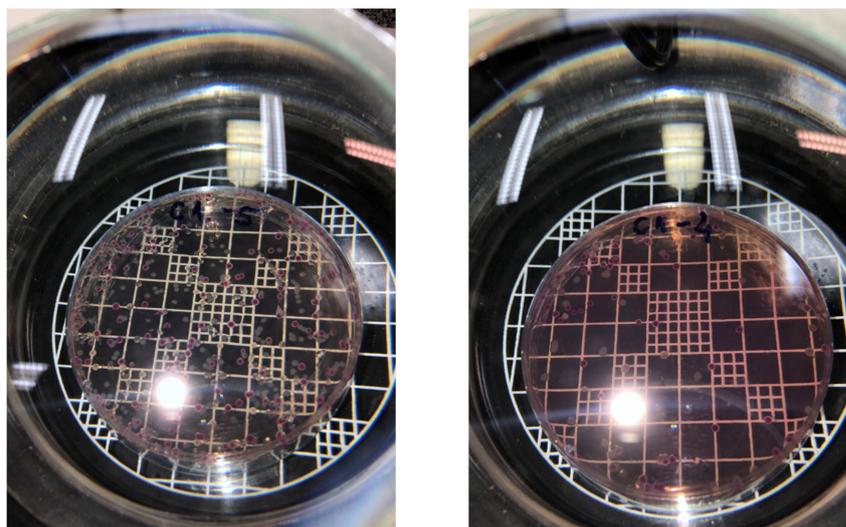
As taxas de coeficiente de decaimento (K), valores de r^2 e p, tempo de inativação de 1 unidade logarítmica (T90), e o tempo para inativação de 99,99% (4 logs) estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Valores de R^2 , p, K, T90 e tempo de inativação para 4 Log10 para a bactéria *Escherichia coli* ATCC13706

Tratamentos	R^2	p	K	T90 (dias)	4Log10
A	-	-	-	-	-
B	0,8989	<0,0001	0,1575	0,7527	3,0108
C	0,8534	<0,0001	0,1268	0,9439	3,7756

Fonte: A autora (2023).

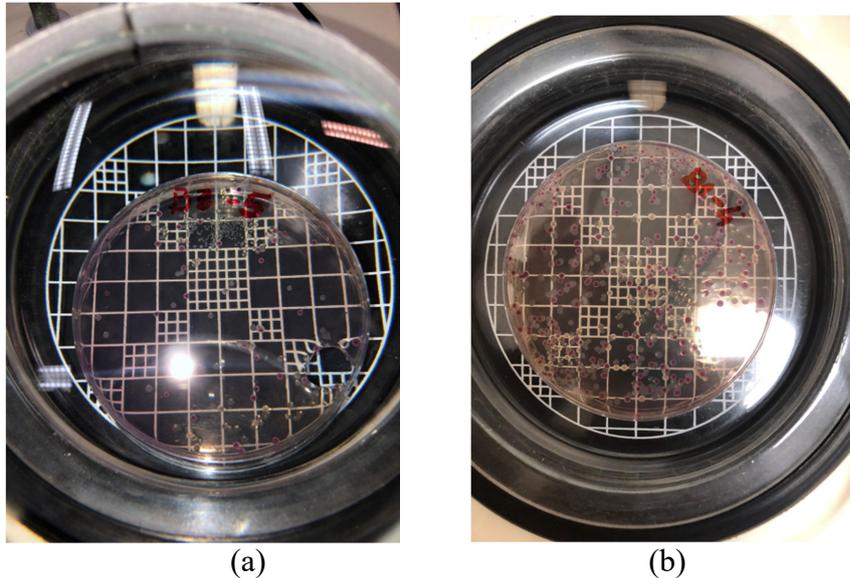
Figura 16: Colônias da bactéria *E. coli* em Placas de Petri de amostras do Tratamento C para as diluições (a) -5 e (b) -4.



(a) (b)

Fonte: Arquivo da autora (2023).

Figura 17: Colônias da bactéria *E. coli* em Placas de Petri de amostras do Tratamento B para as diluições (a) -5 e (b) -4.



Fonte: Arquivo da autora (2023).

Neste trabalho foi possível observar um rápido decaimento bacteriano no biossólido, diferente dos resultados obtidos em solos adubados com biofertilizantes parecidos. Neste sentido, Carlon (2021), ao analisar o comportamento da *E. coli* em tratamentos de solo com fezes co-compostadas, obteve um valor para o T90 de 10,2 dias. No mesmo sistema de plantio e mesmo biofertilizante, Ferreira (2022) obteve coeficiente de decaimento K foi de -0,06117 e T90 de 13,24 dias, um decaimento bem mais lento que o observado neste trabalho.

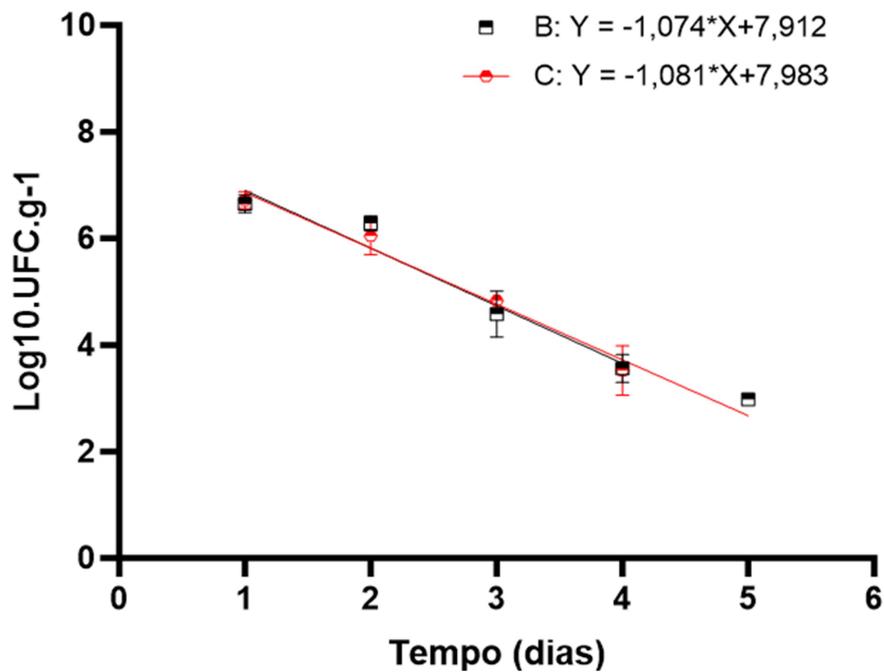
Outro fator que pode afetar a sobrevivência do modelo bacteriano são os microrganismos já presentes no biossólido. Neste experimento o biossólido não foi autoclavado. Neste sentido, Jiang e colaboradores (2002) testaram a diferença na adubação com compostos contaminados em solos autoclavados e não autoclavados. O declínio da bactéria *E. coli* O157:H7 foi mais rápido em solos não autoclavados, o que pode ter ocorrido devido às interações antagônicas entre as cepas utilizadas no estudo e os microrganismos já presentes no solo.

4.3.2 *Salmonella*

Antes da inoculação não houve detecção de *Salmonella* no biossólido. Quatro horas após a inoculação, a concentração média da *Salmonella* detectada foi de $9,88 \times 10^6$ (6,99 Log₁₀.UFC.g⁻¹) para o tratamento B e $1,18 \times 10^7$ (7,05 Log₁₀.UFC.g⁻¹) para o tratamento

C. No quarto dia de análise, obteve-se a concentração média para o tratamento B de $4,12 \times 10^3$ ($3,56 \text{ Log}_{10}.\text{UFC.g}^{-1}$) e $4,97 \times 10^3$ ($3,52 \text{ Log}_{10}.\text{UFC.g}^{-1}$) para o tratamento C, enquanto que no quinto dia de análise, a concentração para o tratamento B foi de $3,17 \times 10^2$ ($2,98 \text{ Log}_{10}.\text{UFC.g}^{-1}$) e para o tratamento C não houve detecção desta bactéria, apenas $5,0 \times 10^3 \text{ UFC.g}^{-1}$ de uma bactéria não típica. Assim, o decaimento para o tratamento B ocorrido do primeiro ao quinto dia foi de 4,01 unidades logarítmicas e entre o primeiro e o quarto dia de análise o decaimento no tratamento C foi de 3,53 unidades logarítmicas. Não foi detectada *Salmonella* no tratamento A ao longo do tempo.

Figura 18: Retas de decaimento da bactéria *Salmonella* WG49 NCTC12484 no bio-sólido para cada tratamento



Fonte: A autora (2023).

As taxas de coeficiente de decaimento (K), valores de r^2 e p , tempo de inativação de 1 unidade logarítmica (T_{90}), e o tempo para inativação de 99,99% (4 logs) estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de R^2 , p , K , T_{90} e tempo de inativação para 4 Log_{10} para a bactéria *Salmonella*

Tratamentos	R^2	p	K	T_{90} (dias)	4 Log_{10}
A	-	-	-	-	-
B	0,931	<0,0001	0,08594	0,9549	3,8196
C	0,9417	<0,0001	0,08512	0,9247	3,6988

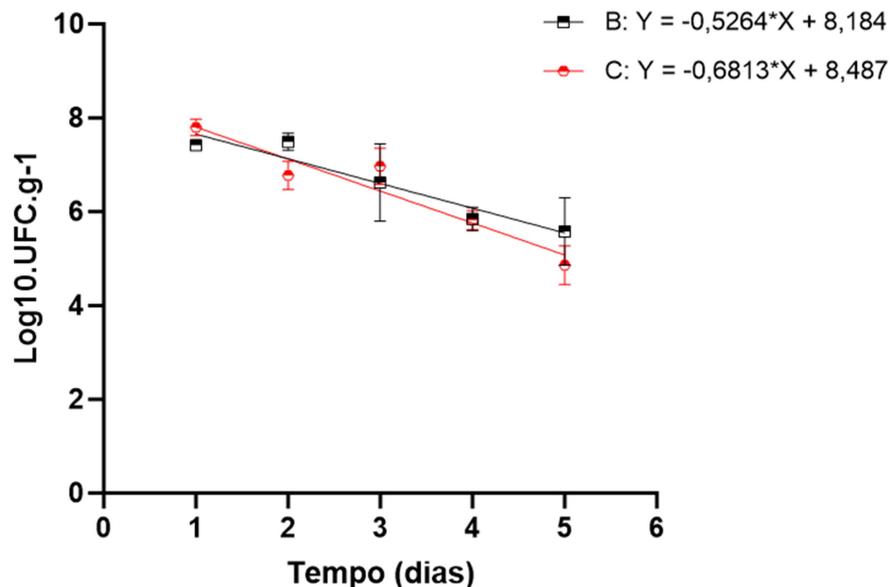
Fonte: A autora (2023).

O trabalho de Carlon (2021) utilizou fezes co-compostadas inoculadas com 7 logs de *Salmonella* em lisímetros plantados com *Lactuca Sativa* e obteve um coeficiente de decaimento de -0,0838, com a redução de 1 log estimada em 11,9 dias. Já Ferreira (2022) obteve nos mesmos lisímetros, valores do coeficiente K -0,075 e T90 de 16,74 dias para *Salmonella*.

4.3.3 *Enterococcus*

Em relação à bactéria *Enterococcus*, no primeiro dia de análise a sua concentração média inicial foi de $2,67 \times 10^7$ (7,42 Log₁₀.UFC.g⁻¹) para o tratamento B e $6,59 \times 10^7$ (7,79 Log₁₀.UFC.g⁻¹) para C, avaliados 4 horas após a inoculação. Já no quinto dia, as concentrações detectadas foram de $6,74 \times 10^5$ (5,58 Log₁₀.UFC.g⁻¹) e $1,01 \times 10^5$ (4,86 Log₁₀.UFC.g⁻¹) respectivamente para B e C. Desta forma, o decaimento bacteriano resultante foi de 1,84 unidades logarítmicas para o tratamento B e 2,93 unidades logarítmicas para o tratamento C. No tratamento A não foi detectada *Enterococcus* ao longo do tempo.

Figura 19: Retas de decaimento da bactéria *Enterococcus* no biossólido para cada tratamento



Fonte: A autora (2023).

As taxas de coeficiente de decaimento (K), valores de r^2 e p, tempo de inativação de 1 unidade logarítmica (T90), e o tempo para inativação de 99,99% (4 logs) estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Valores de R², p, K, T90 e tempo de inativação para 4 Log10 para a bactéria *Enterococcus*

Tratamentos	R ²	p	K	T90 (dias)	4Log10
A	-	-	-	-	-
B	0,7141	0,0003	0,1004	1,9	7,6
C	0,8572	<0,0001	0,07712	1,468	5,872

Fonte: A autora (2023).

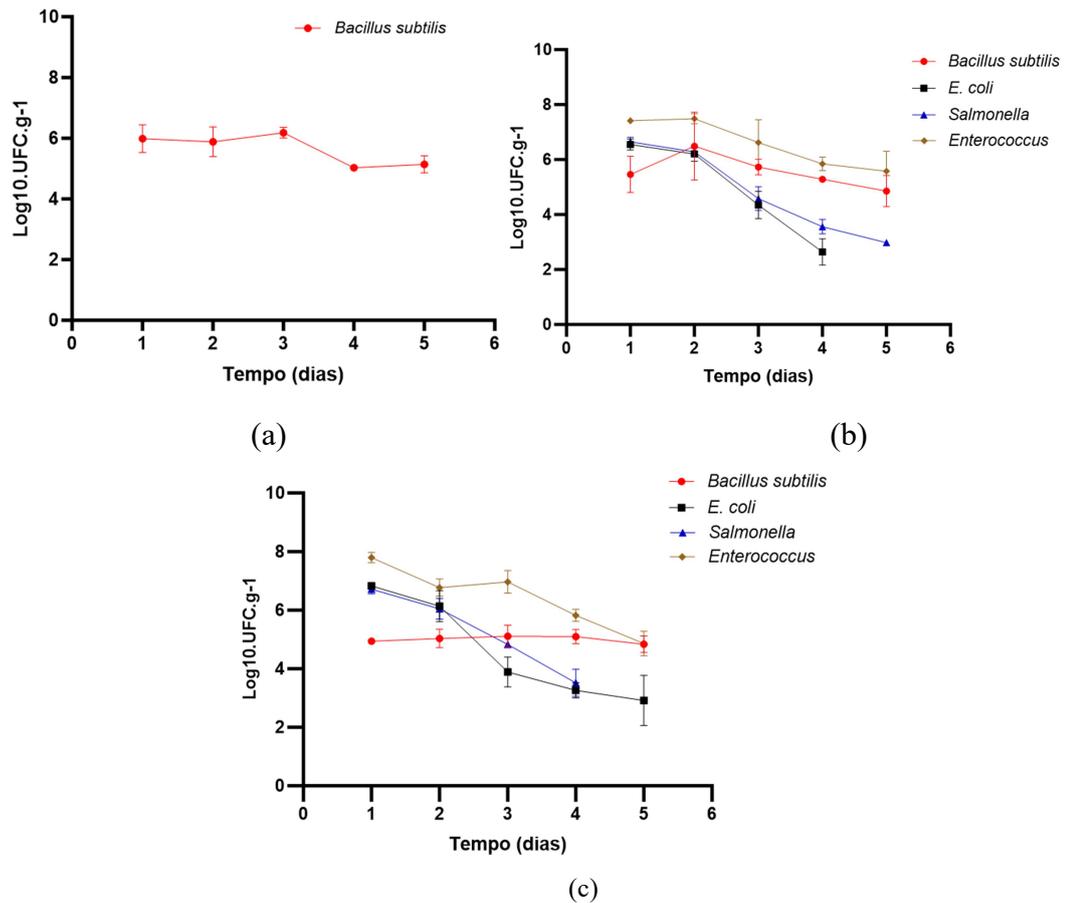
4.3.4 Comportamento das bactérias nos tratamentos

O comportamento das bactérias por tratamento está ilustrado na Figura 20, que busca facilitar o entendimento entre o comportamento dos microrganismos modelos nos tratamentos.

Assim, para o tratamento A, o decaimento para a bactéria *Bacillus subtilis* foi de 0,85 unidades logarítmicas, não sendo detectada a presença dos outros microrganismos analisados. Para o tratamento B, o decaimento da bactéria *Bacillus subtilis* foi de 0,61 unidades logarítmicas, para a bactéria *Salmonella* foi de 4,01 unidades logarítmicas e de 1,84 unidades logarítmicas para a bactéria *Enterococcus*, não sendo detectada a presença de *Escherichia coli* no quinto e último dia de análise, porém no quarto dia de análise o decaimento de *E. coli* para esse tratamento foi de 3,91 unidades logarítmicas. Por fim, no tratamento C o decaimento da bactéria *Bacillus* não típicas foi de 0,11 unidades logarítmicas, enquanto que para a *Escherichia coli*, foi de 3,91 unidades logarítmicas e 2,93 unidades logarítmicas para a bactéria *Enterococcus*, sendo que a bactéria *Salmonella* não foi detectada ao fim do período das análises, mas no quarto dia o decaimento encontrado foi de 3,53 unidades logarítmicas.

Shen et al. (2017) analisou a internalização das bactérias *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* e diferentes cepas de *Bacillus subtilis* em brotos de feijão, bem como o comportamento entre esses microrganismos durante o processo de brotação. Os resultados do autor demonstram que os microrganismos *Salmonella* e *Escherichia coli* decaíram ao longo do tempo independente da presença de *Bacillus subtilis*.

Figura 20: Variação da concentração das bactérias presentes no Tratamento A (a), Tratamento B (b) e Tratamento C (c).



Fonte: A autora (2023).

A taxa de decaimento no solo é influenciada por uma variedade de elementos bióticos e abióticos, tais como as propriedades físicas do solo, a atividade microbiana, bem como condições climáticas e ambientais relacionadas ao pH e umidade (ALEGBELEYE; SANT'ANA, 2020). Assim, os baixos valores de umidade e pH obtidos foram essenciais nos resultados de decaimentos obtidos.

4.4 TESTE DE FITOTOXICIDADE DO BIODISSÓLIDO

As sementes de *Latuca sativa* foram incubadas ao longo de cinco dias, possibilitando a análise de quantas sementes foram germinadas e o comprimento de suas raízes. Desta forma, avaliaram-se os valores para a média das sementes germinadas, média dos comprimentos das radículas, a germinação relativa das sementes (GRS), o comprimento relativo da raiz (CRR) e o índice de germinação das sementes (IG). Essas análises foram realizadas para três diferentes concentrações de biodissólido, além do controle, sendo elas: 2%, 5% e 10%. Além disso, essas concentrações foram aplicadas a dois diferentes tratamentos,

cujo Tratamento 1 indica apenas o bioestólido e o Tratamento 2 é referente ao bioestólido inoculado com *Bacillus subtilis*. Os resultados para cada tratamento estão explícitos, respectivamente, no Tabela 4 e Tabela 5.

Para o Tratamento 1, o bioestólido não apresentou toxicidade em nenhuma das concentrações avaliadas, apenas auxiliando no crescimento, sendo que os valores de IG para as concentrações de 2%, 5% e 10% resultaram em índices maiores do que 100%. O mesmo ocorreu no Tratamento 2. Segundo Roig et al. (2012), índices de germinação (IG) maiores do que 100% possuem o que o autor chama de “efeito benéfico”.

Valores semelhantes foram obtidos na pesquisa realizada por Venegas et al. (2019) utilizando diferentes tipos de lodo de esgoto aplicados no solo. Foram alcançados efeitos benéficos ($GI > 100$) ou sem toxicidade ($100 > GI > 80$) nas doses de bioestólidos, tratados por processos de digestão anaeróbia convencional e avançada, aplicadas entre valores de 5 a 100g.kg^{-1} .

Tabela 4: Valores de média das sementes germinadas e do comprimento das radículas, GRS (%), CRR (%) e IG (%) para o Tratamento 1

Concentração	Controle	2%	5%	10%
Média das sementes germinadas (unidades)	10	9,8±0,40	10	10
Média do comprimento das radículas (mm)	50,38±1,02	66,14±1,35	73,16±1,22	66,36±1,44
GRS (%)	-	98,00	100,00	100,00
CRR (%)	-	131,29	145,21	131,73
IG (%)	100	128,66	145,21	131,73

Fonte: A autora (2023).

Tabela 5: Valores de média das sementes germinadas e do comprimento das radículas, GRS (%), CRR (%) e IG (%) para o Tratamento 2

Concentração	Controle	2%	5%	10%
Média das sementes germinadas (unidades)	10	10	9,80±0,40	9,80±0,40
Média do comprimento das radículas (mm)	52,43±0,97	62,78±1,14	66,77±1,57	70,22±1,18
GRS (%)	-	100,00	98,00	98,00
CRR (%)	-	119,73	127,36	133,94
IG (%)	100	119,73	124,81	131,26

Fonte: A autora (2023).

Os dados das sementes germinadas não apresentaram normalidade ($p < 0,05$) para o Tratamento 1, bem como para o Tratamento 2. Por meio do teste não paramétrico de Mann-

Whitney, obteve-se que os tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,9999$).

Já os valores do comprimento das radículas apresentaram normalidade ($p > 0,05$) para os dois tratamentos avaliados, sendo que para o Tratamento 1 o valor foi de $p = 0,3466$ e para o Tratamento 2 foi de $p = 0,6034$. Além disso, não houve diferença significativa entre os dados do Tratamento 1 e do Tratamento 2.

Por outro lado, para o Tratamento 1, houve diferença significativa entre os valores do controle e da concentração de 2%, do controle e da concentração de 5% e do controle e da concentração 10% ($p < 0,0001$). Para o Tratamento 2, houve diferença significativa entre as mesmas concentrações, além da diferença entre os dados da concentração 2% em relação à concentração 10%.

Tabela 6: Valores do teste de Tukey para o Tratamento 1

Comparativo	Diferença significativa?	Valor de p
Controle vs. 2%	Sim	<0,0001
Controle vs. 5%	Sim	<0,0001
Controle vs. 10%	Sim	<0,0001
2% vs. 5%	Não	0,0674
2% vs. 10%	Não	0,9997
5% vs. 10%	Não	0,0823

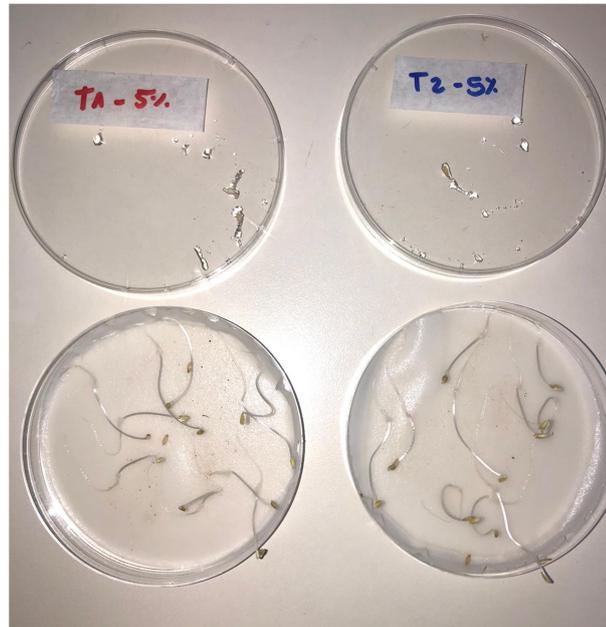
Fonte: A autora (2023).

Tabela 7: Valores do teste de Tukey para o Tratamento 2

Comparativo	Diferença significativa?	Valor de p
Controle vs. 2%	Sim	0,0035
Controle vs. 5%	Sim	<0,0001
Controle vs. 10%	Sim	<0,0001
2% vs. 5%	Não	0,4535
2% vs. 10%	Sim	0,049
5% vs. 10%	Não	0,6157

Fonte: A autora (2023).

Figura 21: Radículas do ensaio de fitotoxicidade para o Tratamento 1 e Tratamento 2 após cinco dias de incubação



Fonte: Arquivo da autora (2023).

Figura 22: Sementes germinadas e medição do comprimento das radículas do controle do Tratamento 2



Fonte: Arquivo da autora (2023).

Manãs e De las Heras (2018), ao estudarem a fitotoxicidade de lodo de esgoto proveniente de uma Estação de Tratamento de Esgoto na Espanha utilizando sementes de *Lactuca sativa*, obtiveram resultados para o índice de germinação de 53,6 % para uma concentração de 10%. Por

outro lado, o trabalho de Ferreira (2021) apresentou um IG de 66,55% para a mesma concentração quando analisado a fitotoxicidade de fezes co-compostadas.

Avaliando-se o biossólido proveniente de lodo de tanque séptico tratado via wetland, tem-se para o Tratamento 2, crescimento nos valores de média do comprimento das radículas conforme aumentou-se a concentração, e conseqüentemente o índice de germinação. Para o Tratamento 1, ocorreu uma situação parecida analisando-se o controle e as concentrações de 2% e 5%. Porém, a concentração de 10% foi contra essa tendência, gerando um valor de IG menor quando comparado ao 5%, mas maior quando comparado ao 2%.

Para o desempenho entre os tratamentos, não se obteve respostas promissoras quanto à inoculação de *Bacillus subtilis*, que apresentou valores de índice de germinação menores em todas as concentrações se comparado ao biossólido sem a inoculação desse micro organismo. Embora a diferença nos valores, não foi detectada diferença estatística entre os tratamentos. Diante os resultados, mesmo sem a efetividade da inoculação de *Bacillus subtilis*, o biossólido proveniente de Wetlands construídos para mineralização de lodo de tanque séptico demonstrou não possuir potencial fitotóxico para as plantas.

4.5 SÓLIDOS TOTAIS, SÓLIDOS TOTAIS FIXOS E SÓLIDOS TOTAIS VOLÁTEIS

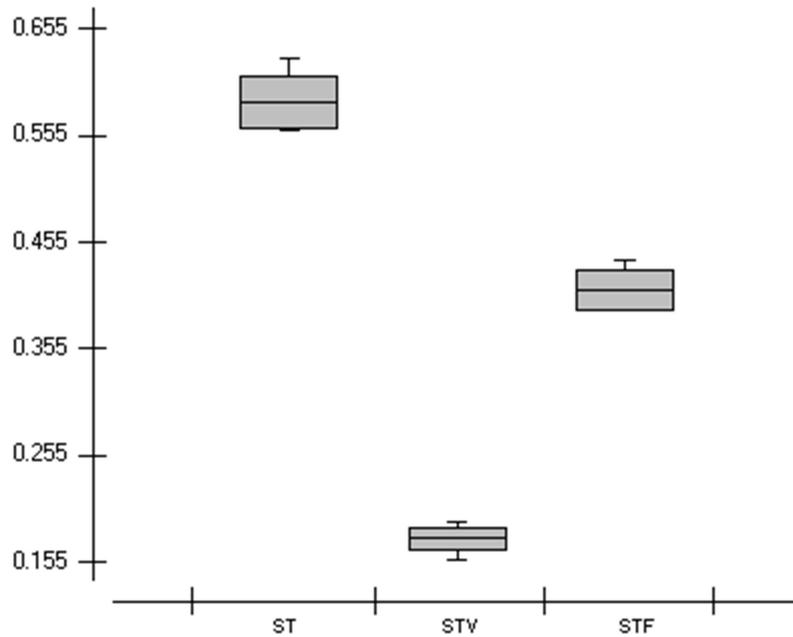
A média da análise para os sólidos totais, sólidos totais voláteis e sólidos totais fixos está descrita na Tabela 8. A Figura 23 ilustra, para todos os valores de teores de sólidos para A, B, C e D, a média e desvio-padrão para cada fração de sólidos.

Tabela 8: Resultados do ensaio de sólidos totais, sólidos totais voláteis e sólidos totais fixos

	Amostra A	Amostra B	Amostra C	Amostra D
ST (%)	62,36	57,07	57,21	57,74
STV (%)	19,06	17,01	17,58	16,91
STF (%)	43,30	40,06	39,62	40,84

Fonte: A autora (2023).

Figura 23: Gráfico Box-Plot com erro padrão (caixas) e mínimas e máximas dos valores obtidos para os teores de Sólidos Totais (ST), Sólidos Totais Voláteis (STV) e Sólidos Totais Fixos (STF).



Fonte: A autora (2023).

Abreu et al. (2019) encontraram no biossólido da ETE Alegria no Rio de Janeiro teores de sólidos totais e sólidos voláteis de 74,29% e 24,29%, respectivamente.

A média dos valores de sólidos totais considerando os tratamentos A, B, C e D foi de 58,59%, já a média para os sólidos totais voláteis foi de 17,64%, valores próximos daqueles encontrados por Abreu et al. (2019), enquanto para sólidos totais fixos obteve-se 40,95%.

A estabilidade do biossólido foi determinada pela relação entre sólidos voláteis e sólidos totais, conforme definido na Resolução CONAMA nº 498/2020 (BRASIL, 2020), o lodo de esgoto, para ser considerado estabilizado e, deste modo, definido como biossólido, necessita apresentar índice de estabilidade (relação entre sólidos voláteis e sólidos totais) de no máximo 0,65. Observando os tratamentos A, B, C e D é possível confirmar essa relação.

5 CONCLUSÃO

Para práticas de enriquecimento e biocontrole de bioossólidos com a bactéria *Bacillus subtilis*, é necessário avaliar o comportamento de microrganismos presentes no solo na presença dessa bactéria, e buscar meios de avaliar suas interações.

Assim, testou-se a viabilidade da inoculação de *Bacillus subtilis* no bioossólido, encontrando-se resultados de decaimentos promissores independentes da presença de *Bacillus subtilis*, cuja presença não intensificou significativamente os decaimentos. Por outro lado, o teste de fitotoxicidade demonstrou o potencial de biofertilizante do bioossólido, com valores de índice de germinação maiores que 100%, mas novamente a presença de *Bacillus subtilis* não demonstrou ser um diferencial.

Sobre os valores médio de pH obtidos, que variaram de 3,6 a 4,0, verificou-se a acidez do bioossólido, sendo recomendadas alternativas para correção alcalina, como por exemplo o uso de cal. Além disso, os resultados de umidade aliados aos valores de pH são determinantes nos decaimentos obtidos. Recomenda-se o estudo dos decaimentos para diferentes valores de pH e umidade.

Em relação ao gerenciamento do lodo de sistemas descentralizados de tratamento de esgoto e as possibilidades de tratamento e pós-tratamento visando sua aplicação agrícola, é necessário desenvolver o sistema de coleta e transporte até as estações de tratamento, promovendo parcerias entre o setor público e privado para tornar mais eficiente essas etapas.

Conclui-se ainda que é inevitável a urgência de alternativas que substituam ou diminuam o uso de fertilizantes químicos bem como a redução da aplicação de defensivos agrícolas. Assim, sugerem-se testes do biofertilizante no solo, a fim de analisar as práticas agrícolas e o desempenho do solo e plantas. Por outro lado, em relação às ações de biocontrole, a aplicação das bactérias *Bacillus subtilis* em solos de campos agrícolas torna-se complexa, pois o ambiente é menos controlável e sujeito a diversos estímulos externos, podendo afetar as ações de biocontrole.

Outro problema que cerca o tema é a falta de diretrizes e monopólio no mercado de coleta e transporte dos lodos de sistemas descentralizados que leva à eliminação ilícita dos resíduos causando perigos, e desvalorizando o setor de tratamento de esgoto. Para auxiliar no desenvolvimento e aprimoramento de legislações, aliados a ampliação da aceitação e aplicabilidade do bioossólido em culturas agrícolas, é crucial a colaboração entre instituições de pesquisa, empresas do setor e órgãos reguladores.

Além disso, estudos sobre a viabilidade econômica dessa prática de pós-tratamento, a fim de buscar alternativas para alavancar seu custo-benefício; teste com diferentes cepas de *Bacillus*; estudos de cinética de reação para avaliar a taxa de degradação de diferentes componentes nos biossólidos para obtenção de informações sobre a eficácia desse pós-tratamento ao longo do tempo, etc. são recomendações de trabalhos, buscando ampliar a pesquisa sobre o tema.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. H. M. de et al. **Characterization of biosolids and potential use in the production of seedlings of schinus terebinthifolia raddi**. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 24, n. 3, p. 591–599, 1 maio 2019b.
- AKUMUNTU, J. B. et al. Enabling the sustainable Faecal Sludge Management service delivery chain—A case study of dense settlements in Kigali, Rwanda. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 220, n. 6, p. 960–973, 1 ago. 2017.
- ALEGBELEYE, Oluwadara Oluwaseun; SANT’ANA, Anderson S.. Manure-borne pathogens as an important source of water contamination: an update on the dynamics of pathogen survival/transport as well as practical risk mitigation strategies. **International Journal Of Hygiene And Environmental Health**, [S.L.], v. 227, p. 113524, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113524>.
- ANDREOLI, C. V. (CLEVERSON V.; SPERLING, M. VON.; FERNANDES, FERNANDO. Sludge treatment and disposal. **IWA Publishing**, 2007.
- ARDEN, S.; MA, X. Constructed wetlands for greywater recycle and reuse: A review. **Science of the Total Environment**. Elsevier B.V., 15 jul. 2018.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7229: Projeto, construção e operação de sistemas de tanques sépticos**. Rio de Janeiro. 1993.
- APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington: **American Public Health Association**, 2012.
- BACON, Charles W.; HINTON, Dorothy M.. Endophytic and Biological Control Potential of *Bacillus mojavensis* and Related Species. **Biological Control**, v. 23, n. 3, p. 274-284, mar. 2002. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/bcon.2001.1016>.
- BIANCHI, V. et al. Efficiency assessment of a reed bed pilot plant (*Phragmites australis*) for sludge stabilisation in Tuscany (Italy). **Ecological Engineering**, v. 37, n. 5, p. 779–785, maio 2011.

BIEKER, S.; CORNEL, P.; WAGNER, M. Semicentralised supply and treatment systems: Integrated infrastructure solutions for fast growing urban areas. **Water Science and Technology**, v. 61, n. 11, p. 2905–2913, 2010.

BORSUK, M. E. et al. Charting a path for innovative toilet technology using multicriteria decision analysis. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 6, p. 1855–1862, 15 mar. 2008.

BRIX, H. Sludge dewatering and mineralization in sludge treatment reed beds. **Water (Switzerland)**. MDPI AG, 2017.

CARLON, Priscila. **Aplicação de biofertilizantes de excretas humanas para o cultivo de alimentos: eficiência agrônômica e comportamento microbiológico**. 2021. 121 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **RESOLUÇÃO Nº 498, DE 19 DE AGOSTO DE 2020**. 1 ed. Brasil: Ministério do Meio Ambiente, 2020. 4 p. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-n-498-de-19-de-agosto-de-2020-273467970>. Acesso em: 30 ago. 2023.

CORREIA, J. E. **Caracterização físico-química e microbiológica do lodo gerado na Estação de Tratamento de Esgoto Contorno**. Feira de Santana, BA. 94 f. Dissertação (Mestrado) – Pós Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

COWIE, A. L.; WOOD, S. **A Review of Greenhouse Gas Emission Factors for Fertiliser Production**. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/235704822>>.

DE ABREU, A. H. M. et al. Characterization of biosolids and potential use in the production of seedlings of schinus terebinthifolia raddi. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 24, n. 3, p. 591–599, 1 maio 2019.

DE ROZARI, P.; GREENWAY, M.; EL HANANDEH, A. An investigation into the effectiveness of sand media amended with biochar to remove BOD₅, suspended solids and coliforms using wetland mesocosms. **Water Science and Technology**, v. 71, n. 10, p. 1536–1544, 2015.

DE ROZARI, P.; GREENWAY, M.; EL HANANDEH, A. Nitrogen removal from sewage and septage in constructed wetland mesocosms using sand media amended with biochar. **Ecological Engineering**, v. 111, p. 1–10, 1 fev. 2018.

DRIKS, A. **The Nature and Application of Biocontrol Microbes: Bacillus spp. The Bacillus Spore Coat**. [s.l: s.n.].

EBRAHIMI, A.; YOUSEFI KEBRIA, D.; NAJAFPOUR, G. D. Co-treatment of septage and municipal wastewater in a quadripartite microbial desalination cell. **Chemical Engineering Journal**, v. 354, p. 1092–1099, 15 dez. 2018.

ETESAMI, H.; JEONG, B. R.; GLICK, B. R. Biocontrol of plant diseases by *Bacillus* spp. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 126, p. 102048, jul. 2023.

FERREIRA, Fernanda Daniela Gonçalves. **Avaliação da segurança no uso de biofertilizantes produzidos a partir de excretas humanas em cultivos de vegetais: contaminação do solo e das plantas**. 2022. 121 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

FOLDES, T.; BANHEGYI, I.; HERPAI, Z.; VARGA, L.; SZIGETI, J.. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 89, n. 5, p. 840-846, nov. 2000. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01184.x>.

GAGNON, V. et al. Effect of plant species on water quality at the outlet of a sludge treatment wetland. **Water Research**, v. 46, n. 16, p. 5305–5315, 15 out. 2012.

GU, Ganyu; CEVALLOS-CEVALLOS, Juan M.; VALLAD, Gary E.; VAN BRUGGEN, Ariena H. C.. Organically Managed Soils Reduce Internal Colonization of Tomato Plants by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Phytopathology**®, [S.L.], v. 103, n. 4, p. 381-388, abr. 2013. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-04-12-0072-fi>.

GUEST, Jeremy S.; SKERLOS, Steven J.; BARNARD, James L.; BECK, M. Bruce; DAIGGER, Glen T.; HILGER, Helene; JACKSON, Steven J.; KARVAZY, Karen; KELLY, Linda; MACPHERSON, Linda. A New Planning and Design Paradigm to Achieve

Sustainable Resource Recovery from Wastewater. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 16, p. 6126-6130, 14 jul. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/es9010515>.

HASHEM, Abeer; TABASSUM, Baby; ABD_ALLAH, Elsayed Fathi. Bacillus subtilis: a plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, [S.L.], v. 26, n. 6, p. 1291-1297, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>.

HOUGH, R., TOMPKINS, D., NICHOLSON, F., PIERSON, S., WILLIAMS, J., MUNRO, D.; DUCKETT, D. The Impacts On Human Health and Environment Arising From the Spreading Of Sewage Sludge To Land (CR/2016/23). **Scottish Government**. 2018

ISLAM, Shah Md. Asraful; MATH, Renukaradhya K.; KIM, Jong Min; YUN, Myoung Geun; CHO, Ji Joong; KIM, Eun Jin; LEE, Young Han; YUN, Han Dae. Effect of Plant Age on Endophytic Bacterial Diversity of Balloon Flower (*Platycodon grandiflorum*) Root and Their Antimicrobial Activities. **Current Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 346-356, 11 mar. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-010-9618-1>.

JAIN, M. et al. A review on treatment of petroleum refinery and petrochemical plant wastewater: A special emphasis on constructed wetlands. *Journal of Environmental Management*. **Academic Press**, 15 out. 2020.

JIANG, X.; MORGAN, J.; DOYLE, M. P. Population Dynamics of Generic E. coli and Naturally Occurring Listeria in Manure-Amended Soils in the Northeastern U.S. **Applied and Environmental Microbiology**, v. Abstract, n. 5, p. 2605–2609, 2016.

JOERGER, R. D.; GANGULY, A. **Current Status of the Preharvest Application of Pro- and Prebiotics to Farm Animals to Enhance the Microbial Safety of Animal Products**. 2017.

KATSUMI, T. et al. Towards future earth : challenges and progress of global environmental studies. **Kaisei Publishing**, 2016.

KHATRI, I. et al. Complete genomes of *Bacillus coagulans* S-lac and *Bacillus subtilis* TO-A JPC, two phylogenetically distinct probiotics. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, 1 jun. 2016.

KLERKS, M. M. et al. Differential interaction of *Salmonella enterica* serovars with lettuce cultivars and plant-microbe factors influencing the colonization efficiency. **ISME Journal**, v. 1, n. 7, p. 620–631, nov. 2007.

KOOTTATEP, T. et al. Treatment of septage in constructed wetlands in tropical climate: Lessons learnt from seven years of operation. **Water Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 119–126, 2005.

KURUP, B. et al. **Co-treatment of septage in a municipal sewage treatment pond system.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://iwaponline.com/wst/article-pdf/46/9/315/426458/315.pdf>>.

LARAGIONE, R. *Bacillus subtilis* spores competitively exclude *Escherichia coli* O78: k80 in poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 133-142, 20 mar. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00350-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00350-3).

LARAGIONE, R. Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens. **Veterinary Microbiology**, [S.L.], v. 94, n. 3, p. 245-256, 17 jul. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1135\(03\)00077-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1135(03)00077-4).

LARSEN, T. A. et al. Source separation: Will we see a paradigm shift in wastewater handling? **Environmental Science and Technology**, 15 ago. 2009.

LIBRALATO, G.; VOLPI GHIRARDINI, A.; AVEZZÙ, F. To centralise or to decentralise: An overview of the most recent trends in wastewater treatment management. **Journal of Environmental Management**, v. 94, n. 1, p. 61–68, 2012.

LIENERT, J.; LARSEN, T. A. **Considering user attitude in early development of environmentally friendly technology: A case study of NoMix toilets.** **Environmental Science and Technology**, 15 ago. 2006.

LIU, Bing; QIAO, Hongping; HUANG, Lili; BUCHENAUER, Heinrich; HAN, Qingmei; KANG, Zhensheng; GONG, Yufei. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. **Biological Control**, v. 49, n. 3, p. 277-285, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.02.007>.

MAGRI, M. E. et al. Constructed wetlands for sludge dewatering with high solids loading rate and effluent recirculation: Characteristics of effluent produced and accumulated sludge. **Ecological Engineering**, v. 95, p. 316–323, 1 out. 2016.

MAÑAS, P.; DE LAS HERAS, J. Phytotoxicity test applied to sewage sludge using *Lactuca sativa* L. and *Lepidium sativum* L. seeds. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 15, n. 2, p. 273–280, 1 fev. 2018.

MANYÀ, J. J. Pyrolysis for biochar purposes: A review to establish current knowledge gaps and research needs. **Environmental Science and Technology**, 7 ago. 2012.

MAQBOOL, N.; SHAHID, M. A.; KHAN, S. J. Situational assessment for fecal sludge management in major cities of Pakistan. **Environmental Science and Pollution Research**, 1 set. 2022.

MBURU, N. et al. Performance comparison and economics analysis of waste stabilization ponds and horizontal subsurface flow constructed wetlands treating domestic wastewater: A case study of the Juja sewage treatment works. **Journal of Environmental Management**, v. 128, p. 220–225, 5 out. 2013.

MCCONVILLE, J. R. et al. Infrastructure investments and operating costs for fecal sludge and sewage treatment systems in Kampala, Uganda. **Urban Water Journal**, v. 16, n. 8, p. 584–593, 14 set. 2019.

MENDES, P. M. et al. Phytotoxicity as an indicator of stability of broiler production residues. **Journal of Environmental Management**, v. 167, p. 156–159, 1 fev. 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Fundação Nacional de Saúde. Operação e manutenção de tanques sépticos – lodo: manual de boas práticas e disposição do lodo acumulado em filtros plantados com macrófitas e desinfecção por processo térmico.** – Brasília: Funasa, 2014.

MOORE, T. Antagonistic Activity of *Bacillus* Bacteria against Food-Borne Pathogens. **Journal of Probiotics & Health**, v. 01, n. 03, 2013.

NIELSEN, S.; STEFANAKIS, A. I. Sustainable dewatering of industrial sludges in sludge treatment reed beds: Experiences from pilot and full-scale studies under different climates. **Applied Sciences (Switzerland)**. MDPI AG, 1 nov. 2020.

NIELSEN, S.; WILLOUGHBY, N. Sludge treatment and drying reed bed systems in denmark. **Water and Environment Journal**, v. 19, n. 4, p. 296–305, 2005.

OLESZKIEWICZ, J. A.; MAVINIC, D. S. Wastewater biosolids: an overview of processing, treatment, and management. **Journal of Environmental Engineering and Science**, v. 1, n. 2, p. 75–88, 1 mar. 2002.

PANUVATVANICH, A.; KOOTTATEP, T.; KONE, D. Influence of sand layer depth and percolate impounding regime on nitrogen transformation in vertical-flow constructed wetlands treating faecal sludge. **Water Research**, v. 43, n. 10, p. 2623–2630, 2009.

PAPPU, A.; SAXENA, M.; ASOLEKAR, S. R. Solid wastes generation in India and their recycling potential in building materials. **Building and Environment**, v. 42, n. 6, p. 2311–2320, jun. 2007.

PHOUNGTHONG, K. et al. Variation of the phytotoxicity of municipal solid waste incinerator bottom ash on wheat (*Triticum aestivum* L.) seed germination with leaching conditions. **Chemosphere**, v. 146, p. 547–554, 1 mar. 2016.

PINCHUK, Irina V.; BRESSOLLIER, Philippe; SOROKULOVA, Irina B.; VERNEUIL, Bernard; URDACI, Maria C.. Amicoumacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats. **Research In Microbiology**, [S.L.], v. 153, n. 5, p. 269-276, jun. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0923-2508\(02\)01320-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0923-2508(02)01320-7).

PRIAC, A.; BADOT, P. M.; CRINI, G. Évaluation de la phytotoxicité d'eaux de rejets via *Lactuca sativa* : paramètres des tests de germination et d'élongation. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 340, n. 3, p. 188–194, 1 mar. 2017.

RAJENDRAN, Geetha; SING, Falguni; DESAI, Anjana J.; ARCHANA, G.. Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* spp. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4544-4550, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.057>.

ROIG, N. et al. Relationship between pollutant content and ecotoxicity of sewage sludges from Spanish wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 425, p. 99–109, 15 maio 2012.

SABATÉ, Daniela C.; AUDISIO, M. Carina. Inhibitory activity of surfactin, produced by different *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strains, against *Listeria monocytogenes* sensitive and bacteriocin-resistant strains. **Microbiological Research**, v. 168, n. 3, p. 125-129, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2012.11.004>.

SARDANA, A. et al. Dissolved organic matter processing and photoreactivity in a wastewater treatment constructed wetland. **Science of the Total Environment**, v. 648, p. 923–934, 15 jan. 2019.

SHEN, Z. et al. Biocontrol of the internalization of *Salmonella enterica* and Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in mung bean sprouts with an endophytic *Bacillus subtilis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 250, p. 37–44, 5 jun. 2017.

SHUKLA, A. et al. A review on generation, characterization, containment, transport and treatment of fecal sludge and septage with resource recovery-oriented sanitation. **Environmental Research**, v. 216, p. 114389, jan. 2023.

SINGH, R. P.; AGRAWAL, M. Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. **Waste Management**, v. 28, n. 2, p. 347–358, 2008.

STEFANAKIS, A. I. et al. Performance of pilot-scale horizontal subsurface flow constructed wetlands treating groundwater contaminated with phenols and petroleum derivatives. **Ecological Engineering**, v. 95, p. 514–526, 1 out. 2016.

STEFANAKIS, A. I.; TSIHRINTZIS, V. A. Dewatering mechanisms in pilot-scale Sludge Drying Reed Beds: Effect of design and operational parameters. **Chemical Engineering Journal**, v. 172, n. 1, p. 430–443, 1 ago. 2011.

TEDESCO, M. J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.

TOMPKINS, T.; XU, X.; AHMARANI, J.. A comprehensive review of post-market clinical studies performed in adults with an Asian probiotic formulation. **Beneficial Microbes**, v. 1, n.

1, p. 93-106, 1 mar. 2010. Wageningen Academic Publishers.
<http://dx.doi.org/10.3920/bm2008.1005>.

UGGETTI, E. et al. Sludge treatment wetlands: A review on the state of the art. **Bioresource Technology**, maio 2010.

UGGETTI, E. et al. Technical, economic and environmental assessment of sludge treatment wetlands. **Water Research**, v. 45, n. 2, p. 573–582, 2011.

UGGETTI, E. et al. Characteristics of biosolids from sludge treatment wetlands for agricultural reuse. **Ecological Engineering**, v. 40, p. 210–216, mar. 2012a.

UGGETTI, E. et al. Carbon footprint of sludge treatment reed beds. **Ecological Engineering**, v. 44, p. 298–302, jul. 2012b.

WILDERER, P. A.; SCHREFF, D. **Decentralized and centralized wastewater management: a challenge for technology developers**. Disponível em: <<http://iwaponline.com/wst/article-pdf/41/1/1/426874/1.pdf>>.

WU, H. et al. A review on the sustainability of constructed wetlands for wastewater treatment: Design and operation. **Bioresource Technology** Elsevier Ltd, , 1 jan. 2015.

ZWARA, W.; OBARSKA-PEMPKOWIAK, H. **Polish experience with sewage sludge utilization in reed beds**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://iwaponline.com/wst/article-pdf/41/1/65/426833/65.pdf>>.