

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

NATHALIA TURKOT CANDIAGO

**INOCULANTES MICROBIANOS NA FORMULAÇÃO DE BIOINSUMO A PARTIR
DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS**

LAGES

2024

NATHALIA TURKOT CANDIAGO

**INOCULANTES MICROBIANOS NA FORMULAÇÃO DE BIOINSUMO A PARTIR
DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.
Orientador: Dr. Osmar Klauberg Filho.

LAGES

2024

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DA OBRA

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Universitária Udesc,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Candiago, Nathalia Turkot

Inoculantes microbianos na formulação de bioinsumo a partir de
resíduos industriais / Nathalia Turkot Candiago. -- 2024.

79 p.

Orientador: Osmar Klauberg Filho

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência do Solo, Lages, 2024.

1. Biocarvão. 2. Biotecnologia. 3. Lodo. 4. Peletização. 5.
Rizobactérias. I. Filho, Osmar Klauberg. II. Universidade do Estado
de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa
de Pós-Graduação em Ciência do Solo. III. Título.

NATHALIA TURKOT CANDIAGO

**INOCULANTES MICROBIANOS NA FORMULAÇÃO DE BIOINSUMO A PARTIR
DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

BANCA EXAMINADORA

Membros:

Dr. Osmar Klauberg Filho
CAV - UDESC - Lages, SC

Dr^a. Mari Lúcia Campos
CAV - UDESC - Lages, SC

Dr^a. Martha Andréia Brand
CAV - UDESC - Lages, SC

Dr^a. Pamela Niederaurer Pompeo
CAV - UDESC - Lages, SC

Dr. Dennis Göss de Souza
IFPR – Palmas, PR

Lages, 26 de março de 2024.

Dedico este trabalho aos melhores pais que a vida poderia me conceder, Jaqueline Turkot e Osmar Candiago, com todo meu amor!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus e aos guias espirituais que me iluminaram, protegeram e ampararam durante a minha jornada científica.

Aos meus pais, Jaqueline Turkot e Osmar Candiago, meus grandes amores, pela vida, todo suporte, paciência, incentivo e muito amor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Osmar Klauberg Filho pelo acolhimento, confiança, paciência, orientação e todo conhecimento repassado.

Aos meus irmãos, Ana Paula e Renan Paulo. Aos meus tios, Iolanda, Jorge e Margarete. À minha madrinha Sandra, minha dinda Maria Elisabet (*in memorian*), que recentemente foi morar ao lado dEle. Às minhas primas amadas, Theodora, Vitoria, Emanuelle, Priscilla e Valissa. À toda minha família querida que sempre me incentivou com palavras de carinho e energia positiva.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Daniela Tomazelli, Rafaela Peron, Aline Malfatti, Thiago Freitas, Douglas Alexandre, Eduardo Lunardi, Moisés Matos, Isabela Aoki, Isadora Ávila, Paulo Teles, Silvano Siqueira, Maria Gabriela Rodrigues, Miguel Dias, Liliane Schlemper, Rafaela Lima e João Andrade, que me acolheram com tanto carinho, pelo suporte, auxílio, parceria, amizade, bons momentos e experiências compartilhadas.

Aos amigos e colegas do programa, Kelly Daboit, Guilherme Steffens, Jhullia Matté e Cleiton Lazzari, pela união e ajuda nos estudos, troca de experiências, rodas de chimarrão e boas conversas.

À Prof. Dr^a Mari Lúcia Campos, ao Dr. Luís Carlos Iuñes Oliveira Filho e à Prof. Dr^a Martha Andréia Brand por todo suporte, disponibilidade e conhecimentos compartilhados.

À Juliana Siqueira e ao Dr. Romeu Werner, por todo auxílio e paciência na formulação e obtenção dos *pellets*. Que desafio!

À todas as pessoas queridas que estiveram ao meu lado durante esse período e torcem por mim.

Às empresas parceiras do projeto – Tradecorp, pelo fornecimento dos inoculantes microbianos, Klabin e Engie por proporcionar os resíduos industriais utilizados, e Lippel Metal, pelo desenvolvimento da peletizadora.

Meu agradecimento à toda a equipe da UDESC/CAV, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, aos professores e profissionais que contribuem para o trabalho e preservação do campus.

À FAPESC pela concessão da bolsa de pesquisa e ao PAP FAPESC pelos recursos disponibilizados.

Minha eterna gratidão. Sem vocês, nada seria possível!

“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.” – Johann Goethe

RESUMO

O reaproveitamento de resíduos industriais e os bioinsumos, com foco na sustentabilidade, são destaques na atualidade. O biocarvão (*biochar*), obtido pela queima de diferentes biomassas, é um material rico em carbono e nutrientes. Outro resíduo com potencial de reaproveitamento, é o lodo de Estação de Tratamento de Efluentes Industriais (ETEI), um produto heterogêneo, constituído de matéria orgânica não biodegradável e água. Ademais, a associação de rizobactérias fixadoras de nitrogênio e solubilizadoras de fósforo a esses resíduos, pode potencializar os efeitos benéficos ao solo. O objetivo da pesquisa foi avaliar o crescimento de *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens* em biocarvão de *Pinus spp.*, e mistura com lodo de ETEI, e também, estabelecer um método de peletização da mistura e sua influência sobre a sobrevivência das rizobactérias. Os resultados mostraram que a melhor dose para inoculação no bioinsumo, foi 0,6 ml por grama (g) de biocarvão para *A. brasilense* e *P. fluorescens*. No biocarvão, somente o *A. brasilense* foi capaz de multiplicar-se no substrato, atingindo às 720 horas com concentração de UFC.g⁻¹ superior à inicial, enquanto que, a *P. fluorescens*, apresentou redução gradual ao longo do tempo. Na mistura biocarvão e lodo de ETEI, ao final do período de estocagem, as concentrações de UFC.g⁻¹ para o *A. brasilense* reduziram ao longo do tempo, já, a *P. fluorescens* aumentou sua concentração celular em relação a aplicação exclusiva no biocarvão. A peletização afetou significativamente a sobrevivência das rizobactérias no bioinsumo. A *P. fluorescens* apresentou um comportamento mais sensível, enquanto que, o *A. brasilense* foi mais resistente e constante no processo, mantendo-se com maior número de células ao longo do tempo. Nesta pesquisa, constatou-se que ambas rizobactérias foram capazes de sobreviver no biocarvão, com quantidade aceitável de células na dose de 0,6 ml de inoculante, por um período de até 30 dias. A mistura de biocarvão e lodo de ETEI tem potencial para ser enriquecida com rizobactérias benéficas, bem como, o bioinsumo desenvolvido, poderá ser utilizado nos sistemas agrícolas, contribuindo para a economia circular. A técnica de peletização merece ser reavaliada, a fim de melhor proteger as rizobactérias e garantir a sobrevivência no bioinsumo misto peletizado.

Palavras-chave: Biocarvão; Biotecnologia; Lodo; Peletização; Rizobactérias.

ABSTRACT

The reuse of industrial waste and bioinputs, focusing on sustainability, are the current highlights. The bio-charcoal (biochar), obtained by burning different biomasses, is a carbon and nutrient-rich material. Another waste that has potential for reuse, is sewage sludge from an industrial wastewater treatment station, a heterogeneous product, composed of non-biodegradable organic matter and water. Furthermore, the association of nitrogen-fixing and phosphorus-solubilizing rhizobacteria to these residues, can increase the beneficial effects on the soil. The aim of this research, was to evaluate the growth of *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* on *Pinus spp.* wood biochar, and mixing with sewage sludge, and also, establish a method for pelletizing the mixture, and its influence on rhizobacteria survival. The results revealed that the highest dose for inoculation in the bioinput, was 0.6 ml per gram of biochar for *A. brasilense* and *P. fluorescens*. On biochar, only *A. brasilense* was able to grow in the substrate, reaching at 720 hours a concentration of CFU.g⁻¹ higher than the initial one, whereas, *P. fluorescens*, showed a gradual reduction over time. In the mixture of biochar and sewage sludge, at the end of the storage period, the concentrations of CFU.g⁻¹ for *A. brasilense* decreased over time, while *P. fluorescens* increased its cell concentration compared to the application of biochar alone. Pelletization significantly affected the survival of the rhizobacteria in the bioinput. *P. fluorescens* showed more sensitive reaction, soon, *A. brasilense* was more resistant and constant in the process, maintaining a higher number of cells over time. In this research, it was verified that both rhizobacteria were able to survive on biochar, with an acceptable amount of cells at a dose of 0.6 ml of inoculant, for a period of up to 30 days. The mixture of biochar and sewage sludge has the potential to be enriched with beneficial rhizobacteria, as well as, the bioinput developed, can be used in agricultural systems, contributing to the circular economy. The pelletizing technique deserves to be re-evaluated, in order to protect the rhizobacteria and guarantee their survival in the pelletized mixed bioinput.

Keywords: Biochar; Biotechnology; Pelletization; Rhizobacteria; Sewage Sludge.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Exemplificação de economia linear.	21
Figura 2. Exemplificação de economia circular.	21
Figura 3. Exemplificação de processamento industrial da biomassa agrícola, para reutilização em diferentes atividades agropecuárias.	27
Figura 4. Organograma das etapas de desenvolvimento do projeto de pesquisa entre os anos de 2022/2023.	31
Figura 5. Biocarvão vegetal de <i>Pinus spp.</i> coletado em termoeletrica.	32
Figura 6. Ilustração do processo de combustão e obtenção de biocarvão vegetal de <i>Pinus spp.</i> , na usina termoeletrica parceira.	33
Figura 7. Resíduo da indústria papelreira. Mistura: Lodo Primário + Lodo Secundário.	34
Figura 8. Exemplificação passo a passo da análise microbiológica realizada na pesquisa.	40
Figura 9. Peletizadora matriz plana com arrefecimento.	42
Figura 10. Crescimento em UFC.g ⁻¹ na dosagem de 0,6 ml de inoculante microbiano à base de <i>Azospirillum brasilense</i> em biocarvão.	45
Figura 11. Crescimento em UFC.g ⁻¹ na dosagem de 0,6 ml de inoculante microbiano à base de <i>Pseudomonas fluorescens</i> em biocarvão.	47
Figura 12. Crescimento em UFC.g ⁻¹ na dosagem de 0,6 ml de inoculante microbiano à base de <i>Azospirillum brasilense</i> em mistura de biocarvão e lodo de ETEL.	48

Figura 13. Crescimento em UFC.g ⁻¹ na dosagem de 0,6 ml de inoculante microbiano à base de <i>Pseudomonas fluorescens</i> em mistura de biocarvão e lodo de ETEI.	49
Figura 14. Crescimento em UFC.g ⁻¹ da rizobactéria <i>Azospirillum brasilense</i> , ao longo do tempo para os <i>pellets</i>	50
Figura 15. Crescimento em UFC.g ⁻¹ da rizobactéria <i>Pseudomonas fluorescens</i> , ao longo do tempo para os <i>pellets</i>	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teores certificados e valores recuperados da amostra padrão NIST 2709A (San Joaquin Soil) (NIST, 2009).	36
Tabela 2. Caracterização química e física do biocarvão, lodo de ETEI e mistura (30 g de biocarvão + 10 g de lodo de ETEI).	37
Tabela 3. Crescimento da rizobactéria <i>Azospirillum brasilense</i> ao longo do tempo no biocarvão, utilizando diferentes doses de inoculante líquido microbiano. Valores expressos em UFC.g ⁻¹	44
Tabela 4. Crescimento da rizobactéria <i>Pseudomonas fluorescens</i> ao longo do tempo no biocarvão, utilizando diferentes doses de inoculante líquido microbiano. Valores expressos em UFC.g ⁻¹	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AEBIOM	European Biomass Association
ANOVA	Analysis of Variance
APT	Água Peptonada Tamponada
atm	Atmosfera
BPCP	Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas
CNI	Confederação Nacional da Indústria
CO ₂	Dióxido de Carbono
CRA	Capacidade de Retenção de Água
CTC	Capacidade de Troca de Cátions
Cu	Cobre
DDS	Diluição Decimal Seriada
EDX	Energia Dispersível de raios-X
ETEI	Estação de Tratamento de Efluentes Industriais
FBN	Fixação Biológica do Nitrogênio
Fe	Ferro
FMA	Fungos Micorrízicos Arbusculares
FRX	Fluorescência de Raio-X
g	Gramas
h	Horas
IBI	International Biochar Initiative
IMA	Instituto do Meio Ambiente de Santa Catarina
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
ISO	International Organization for Standardization
K	Potássio
KCl	Cloreto de Potássio
kv	Quilovolt
M	Molar
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCA	Analizador Multi-Canal
ml	Mililitro

mm	Milímetro
Mn	Manganês
mW	Megawatt
N	Nitrogênio
NBR	Norma Brasileira
NDIR	Radiação Infravermelho Não Dispersiva
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
ONU	Organização das Nações Unidas
P	Fósforo
Pb	Chumbo
RPCP	Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas
SINIR+	Sistema Nacional de Informações sobre a Gestão dos Resíduos Sólidos
t	Tonelada
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
Zn	Zinco
μA	Microampere
μm	Micrometro
~	Aproximadamente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 HIPÓTESES	19
1.2 OBJETIVO GERAL.....	19
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 ECONOMIA CIRCULAR, LINEAR E RESÍDUOS SÓLIDOS.....	21
2.1.1 Biocarvões (<i>Biobar</i>).....	23
2.1.2 Lodos de Estação de Tratamento de Efluentes Industriais (ETEI).....	24
2.1.3 Peletização	25
2.2 BIOINSUMOS PARA AGRICULTURA E SETOR FLORESTAL	25
2.2.1 Microrganismos rizosféricos e potencial de uso.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICA DOS SUBSTRATOS	31
3.1.1 Biocarvão (<i>biochar</i>).....	31
3.1.2 Lodo de esgoto.....	33
3.1.3 Caracterização química e física dos substratos	34
3.2 ANÁLISES DE CRESCIMENTO BACTERIANO	37
3.2.1 Crescimento de rizobactérias em biocarvão: definição de doses de inoculante líquido microbiano.....	38
3.2.2 Crescimento de rizobactérias em mistura de biocarvão e lodo de ETEI	40
3.2.3 Crescimento de rizobactérias nos <i>pellets</i>	41
3.2.4 Análise Estatística.....	43
4. RESULTADOS	44
4.1 CRESCIMENTO DE RIZOBACTÉRIAS EM BIOCÁRVÃO: DEFINIÇÃO DE DOSES DE INOCULANTE LÍQUIDO MICROBIANO.....	44
4.1.1 <i>Azospirillum brasilense</i>	44
4.1.2 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	45
4.2 CRESCIMENTO DE RIZOBACTÉRIAS EM MISTURA DE BIOCÁRVÃO E LODO DE ETEI	47
4.2.1 <i>Azospirillum brasilense</i>	47
4.2.2 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	48

4.3 CRESCIMENTO DE RIZOBACTÉRIAS NOS <i>PELLETS</i>	49
4.3.1 <i>Azospirillum brasilense</i>	49
4.3.2 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	50
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59
APÊNDICE A - ÁGAR VERMELHO DO CONGO	66
APÊNDICE B - ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
APÊNDICE C – BIOINSUMO PELETIZADO	75
ANEXO A – LAUDO DO LODO DE ETEI	76

1. INTRODUÇÃO

A ciência vem trabalhando intensamente em busca de tecnologia e inovação com foco no desenvolvimento sustentável. Neste sentido, os produtos à base biológica destinados aos ramos agrícola, aquícola, pecuária e florestal; e o reaproveitamento de resíduos industriais, ganham destaque, pois priorizam o meio ambiente, contribuem para redução no uso de componentes químicos, e prezam pela qualidade de vida da população (SOARES, 2022; XAVIER, 2022).

Pelo fato da sustentabilidade ser o foco da atualidade, principalmente no agronegócio, a economia circular veio para modernizar a atual economia linear, tendo como principal objetivo, minimizar a geração de resíduos no sistema produtivo, transformando subprodutos em novos produtos para utilização em demais setores (D'AMATO *et al.*, 2017; SANTERAMO, 2022).

Tratando-se de sustentabilidade e do reaproveitamento de resíduos de biomassa, um exemplo que teve sua produção e aplicação aumentadas em todo o mundo, é o biocarvão, também designado de *biochar*. O biocarvão é um material rico em carbono, obtido através da combustão de biomassa e é um veículo para introdução de nutrientes no solo (HU *et al.*, 2021). A biomassa florestal, por exemplo, é matéria-prima ideal para produção de biocarvão, contribuindo para a reciclagem de resíduos orgânicos, e seu uso pode ser aplicado em plantio ou como substrato de mudas florestais (MAIA *et al.*, 2021).

No ramo agrícola, a aplicação de biocarvão no solo confere ao sistema inúmeros benefícios, dentre eles, um local para estoque de carbono, reduzindo a emissão do componente para a atmosfera (NDIRANGU *et al.*, 2019). Conforme os mesmos autores, um ponto importante a ser considerado, é o tipo de matéria-prima que será utilizada para produção do biocarvão e suas características físico-químicas, pois, se não forem fontes seguras, poderão alterar a dinâmica do solo.

Outro resíduo de alta geração e com potencial de reutilização, é o lodo de esgoto. O lodo de esgoto é um produto heterogêneo, constituído de microrganismos, matéria orgânica não biodegradável e água (IZYDORCZYK *et al.*, 2021). Por este motivo, segundo os autores, também é fonte de nitrogênio (N) e fósforo (P), tendo potencial de utilização em sistemas agrícolas e florestais como fertilizante.

Uma maneira de potencializar a fertilidade do solo, ao utilizar compostos orgânicos como biocarvão e lodo de esgoto, é a incorporação de microrganismos, enquadrando o produto

na classe de inoculantes microbianos. Os inoculantes microbianos são bioinsumos desenvolvidos a partir de materiais livres de contaminantes e enriquecidos com microrganismos, que devem nutrir e assegurar o crescimento e a sobrevivência dos mesmos, além de atuar na nutrição de plantas (BRASIL, 2004).

A associação de rizobactérias e compostos orgânicos ainda foi pouco estudada, por isso, destaca-se a importância da presente pesquisa. O estudo de Silva *et al.* (2016), determinou que o efeito da rizobactéria *Bacillus pumilus* associado a composto de pequi, turfa, biofertilizante e esterco bovino curtido, no controle de pragas nas galhas de tomateiros, foi eficiente. Já, Zafar-ul-Hye *et al.* (2020), observou que a rizobactéria *Bacillus amyloliquefaciens* associada a biocarvão, pode minimizar a toxicidade do metal chumbo (Pb) em cultivares de espinafre, além de melhorar a absorção de outros nutrientes e promover o desenvolvimento radicular do vegetal. Ademais, como observado por a Jabborova *et al.* (2020), a associação de *Bradyrhizobium japonicum*, *Pseudomonas putida* e biocarvão, foi capaz de aumentar o crescimento, vigor, teor de nutrientes, biomassa vegetal e atividade enzimática no plantio da soja.

As rizobactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Pseudomonas*, são bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), incluindo que, o gênero *Azospirillum* também atua na fixação de nitrogênio (CRUZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2022). Por esta razão, são microrganismos que também podem ser utilizados na formulação de bioinsumos propensos à utilização agrícola (JOHN *et al.*, 2017).

A associação de bactérias, biocarvão e plantas, por exemplo, é uma estratégia que visa remediar contaminantes, melhorar a saúde do solo e potencializar a sustentabilidade ecológica (XIANG *et al.*, 2022). Da mesma forma, o lodo de esgoto por ser rico em matéria orgânica e macronutrientes, necessários para o desenvolvimento de plantas, também pode contribuir para a sustentabilidade ecológica (KACPRZAK *et al.*, 2017).

Um bioinsumo, conforme o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), é um produto, processo ou tecnologia de origem vegetal, animal ou microbiana utilizado na agricultura, a fim de promover o desenvolvimento de plantas, animais e microrganismos (BRASIL, 2021). Desta forma, a mistura; biocarvão, lodo de esgoto e BPCP, pode ser considerada um bioinsumo.

Com o objetivo de agregar valor e despertar maior interesse no mercado, a tecnologia que pode ser aplicada na produção de bioinsumos, é a peletização. Conforme Tumuluru e autores (2011), a peletização é uma técnica considerada padrão, principalmente pelas indústrias de rações e combustíveis, trabalhando na densificação da biomassa, formando *pellets*. Do

mesmo modo, a técnica vem ganhando destaque na área de bioinsumos e fertilizantes, visto a praticidade e facilidade de aplicação e transporte.

Desta maneira, esse trabalho pretende estudar o comportamento de rizobactérias associadas à mistura de biocarvão e lodo de ETEI, ao longo do tempo e em natureza peletizada. Etapa importante no desenvolvimento de tecnologias inovadoras é a de formulação de bioinsumos, a partir de resíduos industriais, visando contribuir para a economia circular e a sustentabilidade ecológica.

1.1 HIPÓTESES

- I. O biocarvão à base de *Pinus spp.*, favorece o crescimento das espécies de rizobactérias *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens*; influenciado pela quantidade de inóculo e o período de tempo de cultivo.
- II. A sobrevivência dos dois gêneros de rizobactérias é garantida no biocarvão até 30 dias de cultivo.
- III. A adição de lodo de ETEI oriundo da indústria, na mistura de biocarvão e microrganismos, não afeta o crescimento e a sobrevivência das rizobactérias testadas.
- IV. O processo de peletização da mistura: biocarvão, lodo de ETEI e inoculantes líquidos microbianos, não afeta a sobrevivência e viabilidade dos microrganismos.

1.2 OBJETIVO GERAL

Analisar o crescimento das rizobactérias *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens*, oriundas de inoculantes líquidos comerciais, em biocarvão de *Pinus spp.*, e mistura com lodo de ETEI, bem como, estabelecer um método de peletização da mistura e sua influência sobre a sobrevivência das rizobactérias em estudo.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos no substrato biocarvão e sua associação com lodo de ETEI;

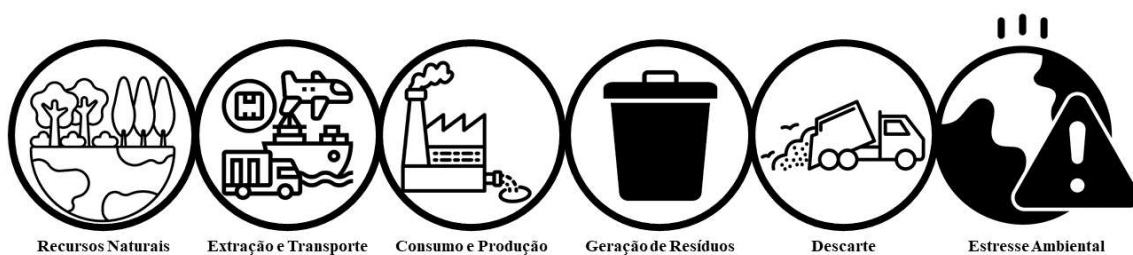
- b) Determinar as condições de peletização da mistura; biocarvão, lodo de ETEI e inoculantes líquidos microbianos e seus efeitos sobre a sobrevivência microbiana.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ECONOMIA CIRCULAR, LINEAR E RESÍDUOS SÓLIDOS

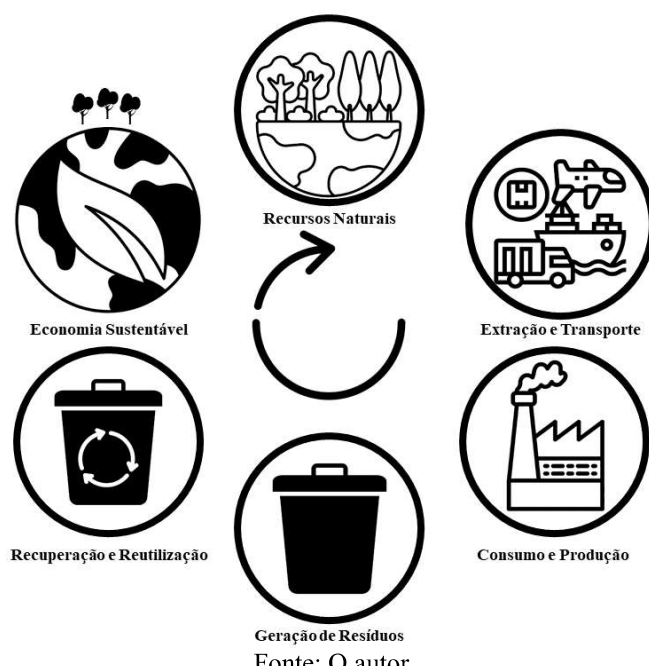
A economia circular é conceituada como um sistema regenerativo, que visa minorar a geração de resíduos através da reparação, reutilização, remanufatura, recondicionamento e reciclagem (GEISSDOERFER *et al.*, 2016). Segundo a Confederação Nacional da Indústria (CNI) (2018), o primeiro passo para uma transição entre economia linear (Figura 1) para circular (Figura 2), é inovar criando novos processos, produtos e serviços, agregando valor ao que seria rejeitado pela indústria. Redução de custos, potencialização de lucros, e novas oportunidades de investimentos com geração de empregos, são as principais vantagens da economia circular (CNI, 2018).

Figura 1. Exemplificação de economia linear.



Fonte: O autor.

Figura 2. Exemplificação de economia circular.



Fonte: O autor.

A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), através da NBR 10004:2004, denomina resíduo sólido como; o resíduo no estado sólido ou semi-sólido, resultante de práticas industriais, doméstica, hospitalar, comercial, agrícola e serviços de varrição (ABNT, 2004, p. 1). O estado de Santa Catarina possui um sistema de controle de movimentação de resíduos e rejeitos, onde é possível controlar a quantidade de resíduos sólidos industriais gerados e destinados.

No ano de 2023, o Instituto do Meio Ambiente de Santa Catarina (IMA), registrou através do boletim de desempenho do mês de dezembro, a geração de 9.681.322,57 t de resíduos. Dentre as práticas industriais com maior geração no estado, estão os resíduos do processamento de madeira, fabricação de painéis, mobiliário, papel e celulose, totalizando 2.658.718,67 t em 2023 (IMA, 2023). Dentre os mais gerados, os lodos de esgoto provenientes da indústria de papel e celulose e a casca de *Pinus spp.*, resíduos da indústria madeireira, ganham destaque (IMA, 2023).

O *Pinus spp.* é a segunda espécie florestal mais cultivada no Brasil, com 1,9 milhão de hectares plantados em 2022, sendo 89% no sul do país, ficando Santa Catarina com 701 mil hectares de área plantada (IBÁ, 2023). Dentre os resíduos gerados neste segmento, compreendem as cascas, folhas e galhos, os quais podem ser utilizados na geração de energia e materiais com valor agregado, como por exemplo, o biocarvão (*biochar*). Os lodos de esgoto, são comumente considerados como resíduos perigosos, entretanto, podem ser diversamente classificados conforme a NBR 10004:2004 (ABNT, 2004), como o caso da madeira de *Pinus spp.*, classificada como não perigosa. Os biocarvões, por sua vez, não são citados, porém é importante ter conhecimento da sua origem, pois o excesso de resíduos pode afetar a dinâmica de nutrientes no solo, na água e nos organismos.

Uma outra alternativa para o reuso destes resíduos no setor agrícola, aperfeiçoamento para aplicação no solo, e contribuição para a economia circular, é a peletização. A maior parte dos fertilizantes organominerais no Brasil, é comercializada em farelo ou em pó, o que torna a peletização destes resíduos um desafio tecnológico, devido ao alto custo na aquisição e manutenção de equipamentos, embora facilite a aplicação, transporte, manuseio, estocagem e redução de perdas (OLIVEIRA, 2014; CAPODIFOGGIO; 2023).

Essa enorme carga oriunda das atividades antrópicas, segundo Mandpe *et al.* (2023), causa um estado de estresse ambiental, por isso, o modelo de economia linear baseado em “extração, produção, geração e descarte”, configura-se de forma insustentável. Por esta razão,

tem-se a crescente busca por abordagens mais sustentáveis e ecológicas, a fim de adaptar as práticas industriais ao modelo de economia circular.

2.1.1 Biocarvões (*Biochar*)

O histórico do biocarvão, conforme a *International Biochar Initiative* (IBI, 2022), é datado de milhares de anos, com início da sua produção no Brasil, no estado da Amazônia, onde povos indígenas originaram a “terra preta de índio”. Os antropólogos supõem que as fogueiras e depósitos da cozinha, em conjunto com carvão vegetal no solo, deram origem a esses solos férteis, que até os dias atuais retêm carbono, são ricos em nutrientes e por isso, são comercializados (IBI, 2022).

O biocarvão ou *biochar*, é um produto derivado da transformação de biomassas de diversas origens, através de processos como pirólise, gaseificação ou carbonização hidrotérmica, sendo a pirólise, o principal deles (DORNER *et al.* 2022). A pirólise é um processo de combustão da biomassa, onde se aplicam altas temperaturas (200-1000°C), na ausência total ou parcial de gás oxigênio, produzindo ao final da combustão, gás de síntese, alcatrão e carvão (GUO *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2022).

A pirólise é o método mais comum e mundialmente utilizado para produção de biocarvão, e, conforme Akhil *et al.* (2020), no processo; a temperatura, o tempo de residência, tipo de gás de arraste, matéria-prima, taxa de aquecimento, modelo de aparelhos e catalisadores, merecem atenção, pois definirão a qualidade e o rendimento do substrato.

A estrutura molecular do biocarvão é heterogênea, rica em carbono, aromática, o que lhe confere alto grau de recalcitrância, outrossim, pode apresentar composição variada, dependendo da matéria-prima (TRAZZI *et al.* 2018). As matérias-primas que podem ser utilizadas para produção de energia, são inúmeras; resíduos da indústria florestal, resíduos agrícolas, lodos e esterco animal, que irão gerar no final do processo, o biocarvão (XIANG *et al.*, 2020). Por esta razão, torna-se cada vez mais relevante dentro da economia circular, a destinação deste resíduo. Como acréscimo, a associação de microrganismos como fixadores de nitrogênio, promotores de crescimento e solubilizadores de fósforo, poderão potencializar os efeitos do composto quando aplicado no solo (SHARMA *et al.*, 2023).

Embora o objetivo do biocarvão aplicado no solo, seja de aumentar a fertilidade, sequestrar carbono e recuperar o solo, existem outros pontos específicos a serem destacados (IGALAVITHANA *et al.*, 2018). Ao realizar a incorporação no solo, o mesmo, pode influenciar no aumento do fornecimento e disponibilidade de nutrientes, melhorias das características

físico-químicas do solo, restringir o crescimento e o desenvolvimento de patógenos, induzir o mecanismo de defesa das plantas e atuar na promoção da diversidade, abundância e atividade microbiana (JAISWAL *et al.*, 2017). Tendo em vista todos estes benefícios, além do baixo custo de aquisição, o biocarvão torna-se um produto interessante para a agricultura (AKHIL *et al.*, 2020).

O biocarvão possui potencial para incrementar a fertilidade do solo, haja vista que, por meio das cargas negativas, próprias da sua estrutura molecular, é capaz de elevar a capacidade de troca de cátions no solo. A retenção de elementos, proporcionada pela adição do biocarvão, é capaz de reduzir a necessidade de fertilizantes e também, de minimizar impactos ambientais decorrentes das atividades antrópicas (NÓBREGA, 2011).

2.1.2 Lodos de Estação de Tratamento de Efluentes Industriais (ETEI)

Lodos de ETEI, são subprodutos da estação de tratamento de efluentes industriais, que possuem em sua composição; material sólido e semi-sólido, resíduos orgânicos, além de microrganismos em suspensão (BETEMPS, 2018; HOU *et al.*, 2023).

Os efluentes industriais, são causadores de inúmeros problemas ambientais, visto que, podem lançar substâncias poluidoras ao meio ambiente. Entretanto, com o tratamento adequado, podem ser utilizados de modo a contribuir com a economia circular. Dependendo do tratamento, podem ser caracterizados em diferentes categorias; lodo primário, na forma bruta, contendo sólidos sedimentáveis; lodo secundário, produto da estação de tratamento biológico; e o lodo químico, proveniente da utilização de reagentes coaguladores e/ou precipitadores (SUPERBAC, 2022).

Uma das alternativas à destinação de lodos de ETEI, é a sua aplicação na agricultura, com objetivo de incrementar a disponibilidade de nutrientes no solo. Ainda que, um fator limitante ao seu uso seja a presença de poluentes, como compostos químicos e/ou biológicos e metais pesados, existem tecnologias que podem ser utilizadas no seu tratamento, antes da destinação agrícola (BUTA *et al.*, 2021; BOLESTA; GŁODNIOK; STYSZKO, 2022).

Segundo Jamil, Qasim e Umar (2006), uma das maneiras de reaproveitamento deste resíduo, é destiná-lo como fertilizante orgânico, uma vez que, em sua composição estão presentes nutrientes essenciais como N, P, K, Zn, Cu, Fe, Mn e demais elementos, essenciais para o desenvolvimento de plantas.

2.1.3 Peletização

A peletização é uma tecnologia que consiste na compactação de matérias-primas com umidade entre 8 e 15%, sobre uma matriz peletizadora com alta pressão, capaz de transformar o material orgânico em *pellets* (PALHANO, 2021; CRUZ, 2022). Esta técnica, confere facilidade de manuseio, utilização, transporte além de agregação de valor.

Conforme a *European Biomass Association* (AEBIOM) (2017), a China é a maior produtora e consumidora de *pellets* no mundo, sendo 80% produzidos da extração de madeira e o restante de demais resíduos agrícolas. O Brasil, país em evolução neste ramo, está ganhando cada vez mais destaque no mundo, visto que possui uma grande quantidade de matéria-prima e resíduos agroflorestais (SIQUEIRA, 2017).

Tratando-se da tecnologia de peletização, existem três modelos de peletizadora mais utilizados na indústria; unidade pistão-cilindro hidráulico, rolos do tipo matriz plana e matriz anelar (PALHANO, 2021). As peletizadoras de rolos, por exemplo, são utilizadas em pequenas e médias escalas.

No ramo de fertilizantes orgânicos, principalmente aqueles à base de cama de frango, a peletização vem sendo amplamente empregue com o objetivo de facilitar a aplicação e o manejo no campo (MATTEI *et al.*, 2013). Ademais, a aplicação de fertilizantes no solo, em forma de *pellets*, possibilita a inoculação de fungos e bactérias, além da associação de outras matérias-primas ao produto (CRUZ, 2022).

2.2 BIOINSUMOS PARA AGRICULTURA E SETOR FLORESTAL

Buscando aliar produção à sustentabilidade, a Organização das Nações Unidas em 2015, criou os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) que corroboram com a ideia de economia circular e do uso de bioinsumos. Os objetivos fundados na ideia são: 2. Fome zero e agricultura sustentável; 6. Água potável e saneamento; 7. Energia limpa e acessível; 8. Trabalho decente e crescimento econômico; 9. Indústria, inovação e infraestrutura; 11. Cidades e comunidades sustentáveis; 12. Consumo e produção responsáveis; 13. Ação contra a mudança global do clima; 14. Vida na água e 15. Vida terrestre.

Diante da demanda por maiores cuidados com o meio ambiente, reafirma-se a importância da economia circular alinhar-se à área de bioinsumos, para que os impactos possam ser mitigados. Neste empenho, o MAPA, através do Decreto Nº 10.375, de 26 de maio de 2020,

lançou o Programa Nacional de Bioinsumos no Brasil, com objetivo de favorecer o setor agropecuário (BRASIL, 2020). O programa sugere o seguinte conceito de bioinsumo:

O produto, o processo ou a tecnologia de origem vegetal, animal ou microbiana, destinado ao uso na produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agropecuários, nos sistemas de produção aquáticos ou de florestas plantadas, que interfiram positivamente no crescimento, no desenvolvimento e no mecanismo de resposta de animais, de plantas, de microrganismos e de substâncias derivadas e que interajam com os produtos e os processos físico-químicos e biológicos (BRASIL, 2021, p.1).

Além do Programa Nacional de Bioinsumos, existe o projeto de lei N° 3668, de 2021, o qual dispõe sobre registro, comercialização, uso, destino final de resíduos e embalagens, e também, registro, inspeção, fiscalização, pesquisa, experimentação e incentivo à produção de bioinsumos para agricultura (BRASIL, 2021).

Nesta perspectiva, ainda que existam alguns desafios na linha de pesquisa, nota-se a relevância do presente trabalho, e como divulgado pelo MAPA (2023), a legislação brasileira de bioinsumos é uma das mais inovadoras, revelando seu imenso potencial, pelo grande desenvolvimento da área.

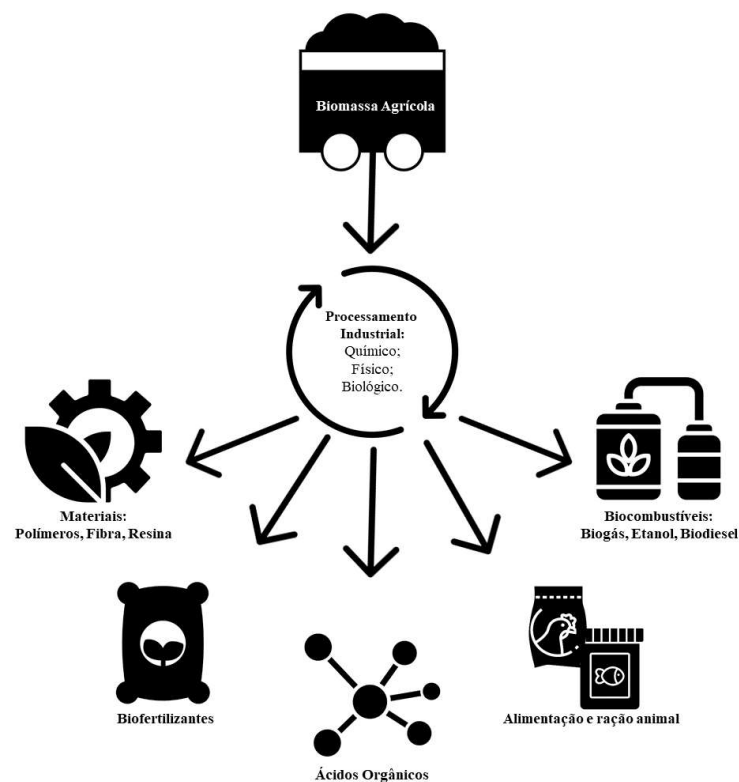
Embora o projeto de lei, atualmente encontre-se aguardando a deliberação do recurso no Plenário, há um grande incentivo à produção e utilização de bioinsumos. Com a aprovação da lei, o país dará um importante passo na regulamentação e fiscalização destes produtos, principalmente os desenvolvidos *on farm*, que garantirá maior segurança para o meio ambiente e à alimentação humana.

Tratando-se do ramo agroalimentar, o Brasil é um país altamente dependente de insumos importados, fato que, onera o sistema produtivo, desta forma, a utilização de bioinsumos, surge como uma alternativa de minimizar custos. Visto que, o país é referência em produção agrícola e pecuária, e para manter-se em destaque, torna-se fundamental adotar ações sustentáveis e tecnológicas, como, a utilização dos bioinsumos (VIDAL *et al.*, 2021). Na agricultura, estes, são empregues para promoção do desenvolvimento e crescimento vegetal, por intermédio de microrganismos, que auxiliarão no processo (SILVA *et al.* 2022).

As melhorias na retenção de nutrientes e a tolerância a fenômenos climáticos extremos, são alguns dos exemplos benéficos conferidos pela comunidade microbiana (MARIOTTE *et al.*, 2018). Dentro da biologia do solo, sabe-se da importante influência da biota no desenvolvimento vegetal, a qual auxiliará no enfrentamento dos desafios existentes na agricultura.

Atualmente, a demanda por alimentos saudáveis, pressiona os agricultores a reduzirem a quantidade agroquímicos, priorizando soluções mais sustentáveis, promovendo o avanço da utilização dos bioinsumos (MAZARO *et al.*, 2022). A ideia vai além do ramo agroalimentar, visto que, demais setores produtivos também fornecem matérias-primas para a produção de bioprodutos. A biomassa antes descartada, é reprocessada, podendo ser utilizada em demais atividades (Figura 3).

Figura 3. Exemplificação de processamento industrial da biomassa agrícola, para reutilização em diferentes atividades agropecuárias.



Fonte: Adaptado de Júnior (2020).

A biomassa vegetal, proveniente da atividade florestal e agrícola (cana-de-açúcar, soja, milho e pinus), assim como, a biomassa animal, como dejetos de bovinos, suínos, caprinos, ovinos ou aves, podem ser transformadas em bioinsumo. Como exemplo desta destinação, é possível citar a extração de produtos químicos (polímeros, ácidos orgânicos), produção de biocombustíveis, ração animal, biocarvões e geração de energia (JÚNIOR, 2020; ALBUQUERQUE *et al.*, 2022).

Outra alternativa para o uso destes resíduos agropecuários, segundo Albuquerque *et al.* (2022), é a produção de biogás através da biodigestão, capaz de produzir energia, beneficiando

produtores e o meio ambiente. Com esta tecnologia, contribui-se com a redução da emissão dos gases de efeito estufa, além de poder servir como fonte de renda.

Na alimentação animal, os bioinsumos podem ser utilizados como probióticos, pois, melhoram a flora gastrointestinal dos animais, trazendo benefícios para o sistema digestivo (SIQUEIRA *et al.*, 2022). No sistema agrícola, os bioinsumos à base de microrganismos, melhoram a saúde das plantas e do solo, pois possuem em sua composição, grandes grupos de microrganismos como BPCP, bactérias fixadoras de nitrogênio e Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) (AREMU *et al.*, 2017; POPPELIERS; SÁNCHEZ-GIL; JONGE, 2023).

2.2.1 Microrganismos rizosféricos e potencial de uso

O Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), aponta que o Brasil encontra-se entre os maiores solicitantes de patentes do mundo na área de inoculantes microbianos, fechando 2023 com total de 186 famílias de pedidos de patentes e 29 com depósito em mais de um país.

Dentre os números de famílias de pedidos de patente no mundo, por tipo e gênero de microrganismos, destacam-se as bactérias com 5.677 registros, e dentro do grande grupo, especificamente os gêneros *Pseudomonas* com 1.380 e *Azospirillum* com 237 registros (INPI, 2023). Os gêneros *Pseudomonas* e *Azospirillum* são consideradas Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP) e habitam a rizosfera de plantas, auxiliando no desenvolvimento e crescimento das mesmas (PHAM *et al.*, 2022).

2.2.1.1 *Azospirillum brasilense*

As bactérias do gênero *Azospirillum sp.* são predominantemente endorizosféricas, ou seja, habitam o interior das raízes de plantas e contribuem para o desenvolvimento vegetal (PHAM *et al.*, 2022). Este gênero, pode ser obtido e isolado a partir de diversas raízes vegetais, como no milho, arroz, trigo, sorgo, entre outras, que são importantes nas pesquisas mundiais (ZHANG *et al.*, 1997).

A espécie *Azospirillum brasilense* é classificada como Gram-negativa, flagelada, fixadora de nitrogênio (diazotrófica) e promotora de crescimento de plantas (PEREG, 2015). Por exercer alguns serviços ecossistêmicos, pode ser utilizada na formulação de bioinsumos, sendo uma alternativa sustentável para aplicação em culturas como milho, trigo e arroz. Tendo em vista a demanda por fertilizantes nitrogenados na agricultura brasileira, a inoculação de *A.*

brasiliense via bioinsumos, auxiliará na Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN), tornando o sistema menos dependente de agroquímicos (GARCIA; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2021).

2.2.1.2 *Pseudomonas fluorescens*

O gênero *Pseudomonas* é considerado um grupo de bactérias amplamente diverso e ecologicamente importante da crosta terrestre, isso porque, o microrganismo pode ser encontrado em diversos ambientes, sendo considerado ubíquo (SPIERS; BUCKLING; RAINEY, 2000).

A *Pseudomonas fluorescens* é uma das espécies dentro deste gênero, podendo ser encontrada colonizando animais, humanos, na água, no solo e/ou associada às raízes das plantas (BOSSIS *et al.*, 2000). A célula da rizobactéria tem formato de bacilo, flagelada, é Gram-negativa, sendo capaz de colonizar a região externa das raízes das plantas, classificada como ectorizosférica.

Uma vez presente na ectorizosfera de plantas, a *P. fluorescens* é um forte competidor, realizando o controle de patógenos, disputando nutrientes e os espaços na superfície das raízes, atuando assim, no controle biológico (COUILLEROT *et al.* 2009). Além disso, a rizobactéria atua na solubilização de P para as plantas, reduzindo a necessidade de vastas aplicações de fertilizantes fosfatados no solo, e, considerando que a mesma coloniza as raízes, torna o P disponível para a planta, contribuindo para uma agricultura mais sustentável (PARK; LEE; SON, 2009). Por essa razão, o potencial de uso da *P. fluorescens* na agricultura é uma alternativa promissora, sendo um microrganismo competente para formulação de bioinsumos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi desenvolvida nas dependências do Laboratório de Ecologia do Solo, no Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UDESC), localizado em Lages, Santa Catarina, Brasil.

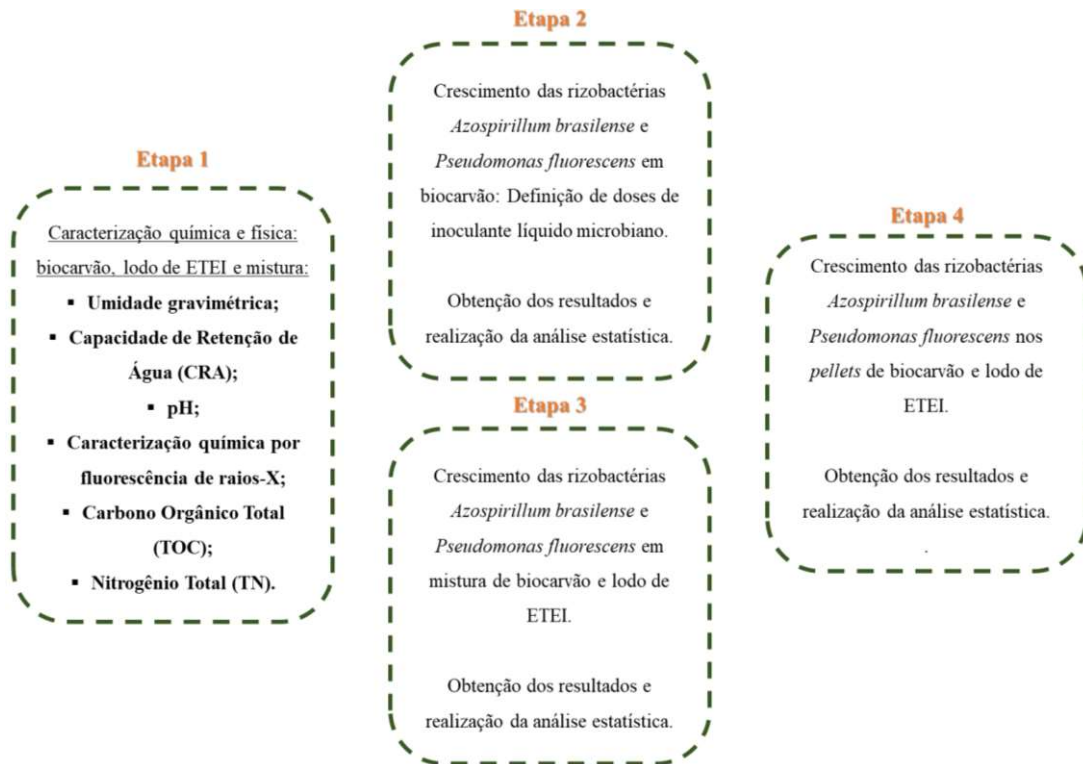
Todo o protocolo desenvolvido para o estudo, realizado durante os anos de 2022/2023, está representado na Figura 4. Neste ensaio experimental, foram utilizados dois substratos para a formulação do bioinsumo à base de resíduos industriais e microrganismos rizosféricos, sendo o biocarvão (*biochar*) e o lodo de ETEI, que são caracterizados química e fisicamente na tabela 2.

Os inoculantes líquidos microbianos utilizados na presente pesquisa, foram fornecidos por uma empresa parceira do projeto, com sede na cidade de Hortolândia, interior do estado de São Paulo, Brasil. Dentre os dois produtos utilizados, um deles foi um inoculante líquido para milho e coinoculação em soja, a base da rizobactéria *Azospirillum brasilense* (Cepas AbV5 e AbV6) fixadora de nitrogênio atmosférico e promotora de crescimento de plantas. E o outro, utilizado principalmente na cultura da soja, com cepas selecionadas da rizobactéria *Pseudomonas fluorescens*, solubilizadora de fósforo e promotora de crescimento vegetal.

Para alcançar os objetivos do projeto, inicialmente analisou-se o crescimento das rizobactérias *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens* em biocarvão, utilizando diferentes doses dos inoculantes à base das rizobactérias de interesse (Item 3.2.1).

O próximo passo, foi associar ao biocarvão, o lodo de ETEI e acompanhar o crescimento das rizobactérias nessa mistura ao longo do tempo (Item 3.2.2). Por fim, a última etapa foi o acompanhamento do crescimento das rizobactérias na mistura peletizada (Item 3.2.3).

Figura 4. Organograma das etapas de desenvolvimento do projeto de pesquisa entre os anos de 2022/2023.



Fonte: O autor.

3.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICA DOS SUBSTRATOS

3.1.1 Biocarvão (*biochar*)

O biocarvão foi fornecido por uma usina termoeletrica, unidade de cogeração, localizada no município de Lages, estado de Santa Catarina, Brasil. O mesmo, possuía origem vegetal, obtido através do processo de combustão de cavacos e casca de *Pinus spp.* (Figura 5).

Figura 5. Biocarvão vegetal de *Pinus spp.* coletado em termoelétrica.



Fonte: O autor.

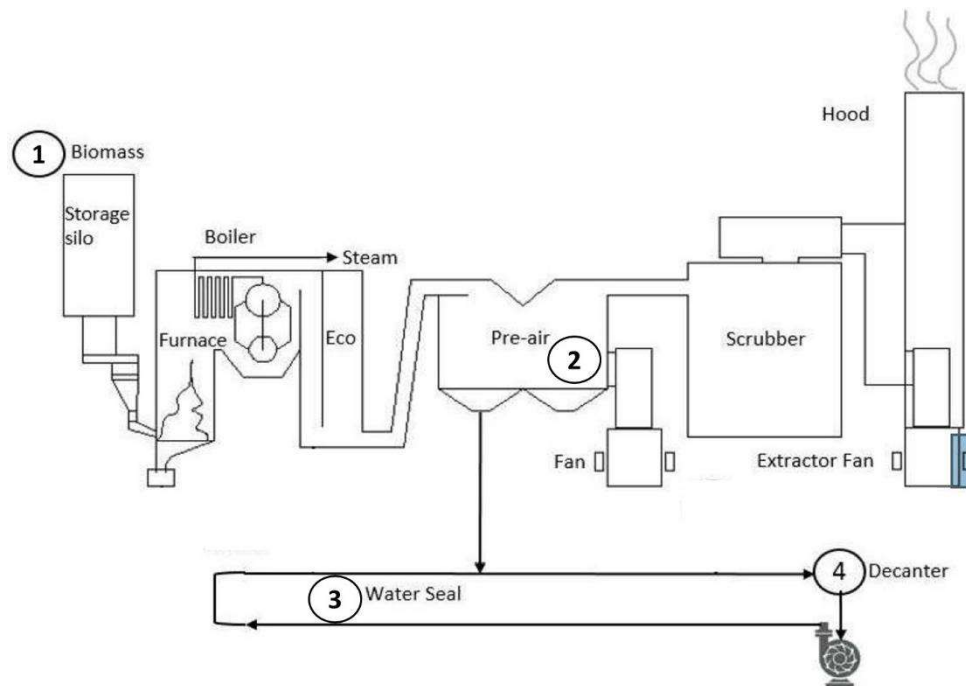
Na usina termoelétrica, o biocarvão é caracterizado como cinza volante, entretanto, por suas características (Tabela 2), pode ser considerado um biocarvão ou *biochar*. Na usina, seu processo de produção ocorreu em caldeira, e é demonstrado na Figura 6.

Primeiramente, a caldeira foi alimentada com a biomassa (*Pinus spp.*) (ponto 1), e o material inicialmente queimado na grelha da fornalha (*furnace*), com temperatura variando entre 800 °C – 1000 °C. Nesta primeira etapa, a cinza pesada (material grosseiro) foi separada da cinza volante (partículas finas).

Em seguida, a cinza volante juntamente com os gases de combustão, foram transportados pelo sistema até o lavador de gases (*pre-air*) (ponto 2), onde ocorreu a separação da cinza volante dos gases de combustão. Nesta etapa, os materiais passaram por uma “cortina d’água”, onde os gases de combustão foram resfriados e seguiram até a chaminé (*hood*), já, a cinza volante foi depositada em uma calha (*water seal*) (ponto 3).

No ponto 3, a cinza volante continha excesso de água em sua composição, por isso, foi realizada uma prensagem, a fim de retirar o excesso do líquido, e então, a cinza foi decantada (*decanter*), e o biocarvão (produto final) coletado no ponto 4.

Figura 6. Ilustração do processo de combustão e obtenção de biocarvão vegetal de *Pinus spp.*, na usina termoeletrica parceira.



Fonte: Adaptado de Henne *et al.* (2019).

3.1.2 Lodo de esgoto

O lodo de esgoto foi fornecido por uma indústria de papel e celulose, localizada na cidade de Otacílio Costa, estado de Santa Catarina, Brasil. Sua composição é uma mistura contendo 50% de lodo primário e 50% de lodo secundário, considerado como um biossólido classe II A – não inerte (Anexo A), e sua caracterização pode ser visualizada na Tabela 2. O processo de produção e tratamento do resíduo, ocorreu na ETEI da própria indústria.

Inicialmente, o lodo foi recebido na estação de tratamento de efluentes, e na primeira etapa, realizou-se o gradeamento, a fim de reter sólidos maiores. Após, no decantador primário, os resíduos em suspensão sedimentaram e depositaram-se no fundo do tanque, originando, o lodo primário.

O lodo primário, através de bombas, foi transferido para um equipamento misturador, onde aplicou-se um polímero, a fim de formar grandes conglomerados. Em seguida, o material foi direcionado à prensa, onde o líquido presente foi removido através de compressão mecânica, e os conglomerados, originaram o produto de interesse.

O lodo secundário, é o lodo originário do processo biológico e foi processado em decantador biológico ou secundário, através da ação de microrganismos, como bactérias. O lodo em suspensão ou não sedimentável, foi degradado pela ação desses microrganismos. No

equipamento, através da aeração, as bactérias desempenharam processos bioquímicos, consumindo a matéria orgânica disponível no resíduo, sedimentando a biomassa e dando origem ao lodo secundário. Em seguida, o lodo foi transferido para um adensador, a fim de aglomerar ainda mais as partículas e reduzir volume.

Por fim, obtendo-se o lodo primário e secundário, ambos foram transferidos para equipamento prensa, e prensados juntamente, gerando a mistura utilizada na presente pesquisa. O substrato pode ser visualizado na Figura 7.

Figura 7. Resíduo da indústria papaleira. Mistura: Lodo Primário + Lodo Secundário.



Fonte: O autor.

3.1.3 Caracterização química e física dos substratos

Para realização das análises químicas e físicas, exceto análise de umidade gravimétrica, os substratos foram primeiramente secos e peneirados. O biocarvão, foi seco ao ar em temperatura controlada de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período de 7 dias, já o lodo de ETEI foi seco em estufa de secagem a $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 8 dias, após, moído em moinho de martelos para reduzir fragmentos. Posteriormente, ambos foram peneirados conforme necessidade de cada análise.

3.1.3.1 Umidade Gravimétrica

A análise da umidade em base seca foi realizada nos substratos biocarvão, lodo de ETEI (*in natura*), e na mistura (biocarvão + lodo), previamente peneirados em tamis com malha de 2 mm, a fim de determinar a quantidade de água presente nos mesmos. O método de resolução foi efetuado conforme padrão NBR 6457:2016 para determinação de umidade do solo (ABNT, 2016).

3.1.3.2 Capacidade de Retenção de Água (CRA)

Através do biocarvão, lodo de ETEI e mistura (biocarvão + lodo) previamente peneirados em tamis com malha 2 mm, realizou-se a análise de CRA. Visando compreender qual o potencial de retenção de umidade após adição dos inoculantes microbianos na mistura seca. A fim de então determiná-la, o método aplicado baseou-se no padrão ISO NBR 11267:2019 (ABNT, 2019).

3.1.3.3 pH

As análises de pH dos substratos biocarvão, lodo de ETEI e mistura (biocarvão + lodo), preliminarmente peneirados em tamis com malha 2 mm, foram realizadas conforme padrão ISO 10390:2021 (2021), que preconiza através de método experimental, identificar com maior sensibilidade, as variações no potencial hidrogeniônico dos substratos.

3.1.3.4 Caracterização química por fluorescência de raios-X

A análise dos teores totais de elementos foi realizada através da técnica de fluorescência de raios-X (FRX). De antemão, as amostras de biocarvão, lodo de ETEI e mistura (biocarvão + lodo) foram preparadas, peneirando-as em tamis com malha 0,053 mm.

Para iniciar, pesou-se em balança analítica calibrada 2 g de amostra, acondicionando-as em porta amostras padrão com fundo revestido com filme poliéster “mylar” de 3,6 µm. No carrossel do equipamento de fluorescência de raios-X Epsilon 3 da Panalytical, as amostras foram distribuídas e encaixadas para realização da análise. No ensaio, foi incluída uma amostra padrão certificada NIST 2709A (SRM San Joaquin Soil), cujos teores recuperados e certificados podem ser visualizados na Tabela 1.

O equipamento é um espectrômetro compacto de Energia Dispersível de raios-X (EDX), alimentado de gás hélio pressurizado e refrigeração eletrônica. Possui um gerador com máxima potência de 9000 mW, 4 a 30 kV de voltagem e 1 a 1000 µA de intensidade de corrente. Os tubos de raios-X são confeccionados em anodo, ródio, berílio em janela com 50 µm de espessura e detector de diodo Si-PIN, com tratamento dos dados por meio de analisador multi-canal (MCA).

Tabela 1. Teores certificados e valores recuperados da amostra padrão NIST 2709A (San Joaquin Soil) (NIST, 2009).

NIST 2709A (San Joaquin Soil)			
Elementos Químicos	Valor Certificado – mg.kg ⁻¹	Valor no FRX - mg.kg ⁻¹	Recuperação* – %
Alumínio	73.700	94.439,72	128,14
Arsênio	17,7	15,14	85,53
Bário	979	895,65	91,48
Chumbo	17,3	18,57	95,70
Cobre	33,9	47,93	141,39
Cromo	130	177,89	136,84
Fósforo	688	1.136,77	183,35
Níquel	85	102,15	120,18
Zinco	103	128,54	124,80

Legenda: *Considerar um intervalo de recuperação ideal entre 65-130%.

3.1.3.5 Determinação de Carbono Orgânico Total e Nitrogênio Total

Para análise de Carbono Orgânico Total e Nitrogênio Total utilizou-se peneira com abertura 0,053 mm para peneiragem das amostras de biocarvão, lodo de ETEI e mistura (biocarvão + lodo de ETEI).

A determinação de carbono orgânico e nitrogênio total nas amostras foi realizada por meio de analisador de carbono (multi N/C 2100, Analytik Jena, Alemanha), que efetua a análise pela absorção da Radiação Infravermelha Não Dispersiva (NDIR), através do Dióxido de Carbono (CO₂) formado após a queima de 12 mg de amostra a 900 °C em forno horizontal.

A tabela 2 contempla toda a caracterização química e física dos substratos com base nas metodologias anteriormente descritas: análise de umidade gravimétrica, capacidade de retenção

de água, pH, carbono orgânico total, nitrogênio total e caracterização química dos substratos por fluorescência de raios-X.

Tabela 2. Caracterização química e física do biocarvão, lodo de ETEI e mistura (30 g de biocarvão + 10 g de lodo de ETEI).

	Biocarvão	Lodo de ETEI	Mistura
Umidade Gravimétrica	60,26 %	16,44 %	37,38 %
CRA	268,81 %	69,41 %	142,19 %
pH	9,0	7,3	6,9
COT	37,43 %	15,6 %	12,5 %
Nitrogênio Total	0,09 %	0,06 %	0,015 %
Alumínio	95,250 g.kg ⁻¹	165,6 g.kg ⁻¹	96,8 g.kg ⁻¹
Arsênio	N.D	9,85 mg.kg ⁻¹	N.D
Bário	N.D	26,87 mg.kg ⁻¹	N.D
Chumbo	4,375 mg.kg ⁻¹	0,188 mg.kg ⁻¹	0,312 mg.kg ⁻¹
Cobre	479,31 mg.kg ⁻¹	22,37 mg.kg ⁻¹	35,95 mg.kg ⁻¹
Cromo	116,31 mg.kg ⁻¹	49,95 mg.kg ⁻¹	10,26 mg.kg ⁻¹
Enxofre	1453,630 mg.kg ⁻¹	5458,13 mg.kg ⁻¹	404,45 mg.kg ⁻¹
Fósforo	9644,730 mg.kg ⁻¹	1073,58 mg.kg ⁻¹	1099,76 mg.kg ⁻¹
Níquel	47,14 mg.kg ⁻¹	12,57 mg.kg ⁻¹	2,36 mg.kg ⁻¹
Potássio	40,05 g.kg ⁻¹	10,38 g.kg ⁻¹	36,53 g.kg ⁻¹
Zinco	666,81 mg.kg ⁻¹	142,2 mg.kg ⁻¹	88,37 mg.kg ⁻¹

Legenda: CRA: Capacidade de Retenção de Água; COT: Carbono Orgânico Total; Lodo de ETEI: Lodo de Estação de Tratamento de Efluentes Industriais; N.D: Não Detectado.

A Resolução N° 375, de 29 de agosto de 2006 (CONAMA, 2006), define critérios para destinação e uso na agricultura, de lodos de esgoto e derivados. Conforme a legislação, os valores descritos na tabela 2 estão dentro dos padrões, indicando que os substratos não oferecerão risco quando aplicados ao solo.

3.2 ANÁLISES DE CRESCIMENTO BACTERIANO

Para todos os ensaios a seguir, os inoculantes líquidos microbianos à base das rizobactérias *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens* foram testados de forma individualizada. Ademais, o biocarvão foi primeiramente peneirado em tamis com malha 2 mm,

como também, realizou-se um teste de umidade com o substrato, adicionando diferentes doses dos inoculantes ao mesmo:

Em beakers contendo amostras de 30 g de biocarvão, foi acrescentado doses de 18 ml, 30 ml, 48 ml e 60 ml de inoculante, homogeneizando cada mistura com auxílio de bastão de vidro. Através do aspecto das mesmas, definiu-se como quantidade máxima para ambos os produtos, 18 ml para cada 30 g de biocarvão, ou seja, $0,6 \text{ ml.g}^{-1}$, obtendo-se uma mistura com aspecto pastoso satisfatório, para posterior incorporação dos demais substratos.

Definida a dose máxima, estabeleceu-se os valores de 0,2 ml e 0,4 ml, além de 0,6 ml, para também serem avaliadas nos ensaios de crescimento das rizobactérias no biocarvão.

3.2.1 Crescimento de rizobactérias em biocarvão: definição de doses de inoculante líquido microbiano

Nos ensaios, foram avaliadas as doses predefinidas, de 0,2 ml, 0,4 ml e 0,6 ml dos inoculantes líquidos microbianos à base de *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluoresces*, em biocarvão, além do tratamento controle sem adição dos mesmos. No total, 4 tratamentos para cada inoculante microbiano, com amostras contendo 30 g de biocarvão. Os ensaios foram realizados nos períodos de 16, 360 e 720 horas (h), em triplicata, totalizando 12 amostras por período, para cada microrganismo.

Inicialmente, a capela de fluxo laminar foi previamente descontaminada com álcool 70% e desinfetada com luz ultravioleta por 20 minutos para o preparo das amostras. Em frascos de vidro snap cap estéreis – em autoclave a $121^{\circ}\text{C}/15$ minutos em 1 atm de pressão – adicionou-se 30 g de biocarvão previamente esterilizado, e em seguida, foi associado ao substrato, as respectivas doses dos inoculantes à base das rizobactérias *A. brasilense* e *P. fluorescens*. Os frascos foram vedados com parafilme, previamente imersos em álcool 70% e mantidos em luz ultravioleta por 20 minutos para descontaminação e desinfecção, vedando-os com banda elástica. Os frascos foram mantidos durante todo o período de estocagem em ambiente com temperatura controlada $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, e em cada intervalo do ensaio, amostras de cada microrganismo eram coletadas para realização da análise microbiológica, conforme item 3.2.1.1.

Posteriormente à tabulação e análise estatística dos dados (item 3.2.1.1.1), um ensaio de confirmação foi realizado com a dosagem que apresentou melhor desenvolvimento e concentração de UFC.g^{-1} . As análises microbiológicas (item 3.2.1.1) foram realizadas nos

tempos de 16, 72, 168, 360 e 720 horas, em quintuplicata, totalizando 10 amostras/período/microrganismo.

3.2.1.1 Análise Microbiológica

Em capela de fluxo laminar descontaminada e desinfetada, foi realizada a análise microbiológica, conforme Figura 8. A partir de cada amostra (1), em beckers, pesava-se 10 g de amostra em balança digital (2), incorporando em seguida 90 ml de solução de Água Peptonada Tamponada (APT) (3), homogeneizando a mistura com bastão de vidro estéril, obtendo-se a diluição 10^{-1} , ou seja, diluindo 10 vezes a amostra (1 parte da amostra, para 9 partes de solução de APT). A partir da diluição 10^{-1} , foi transferindo 1 ml com auxílio de micropipeta (4) para tubos de ensaio contendo 9 ml de solução salina 0,85%, iniciando o método de Diluição Decimal Seriada (DDS) (5), obtendo-se a diluição 10^{-2} . O processo de transferência de 1 ml da diluição atual para a próxima, segue até a diluição desejada, dependendo da concentração de microrganismos na amostra.

A partir das últimas duas diluições (6), retirou-se uma alíquota de 0,1 ml, inoculando em placas de Petri (7) contendo ágar vermelho do congo (Apêndice A), realizando o espalhamento pelo método *spread plate* com alça de Drigalski (8), em triplicata. As placas foram incubadas em estufa BOD a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72 horas (9). Passado o período, as colônias obtidas foram contadas em contador de colônias (10), aplicando-se o número obtido à Equação 1, para determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama de substrato:

$$\frac{f \times N}{10} = UFC \cdot g^{-1}$$

(Equação 1)

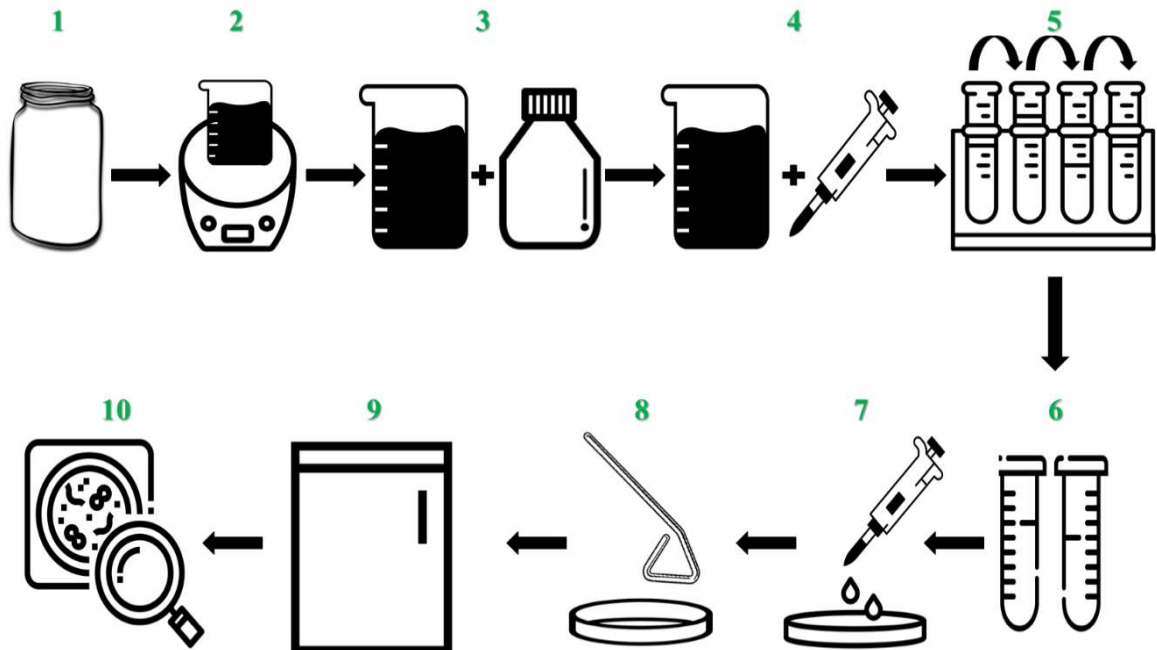
Onde:

f = fator de diluição (diluição multiplicado por 10);

N = número médio de colônias das placas;

10 = 10 g utilizados na primeira diluição.

Figura 8. Exemplificação passo a passo da análise microbiológica realizada na pesquisa.



Fonte: O autor.

3.2.1.1.1 Análise Estatística

Após a tabulação dos resultados em UFC.g^{-1} , pretendia-se saber qual a dose dos inoculantes apresentou melhor crescimento ao longo do tempo, assim, os dados foram convertidos para Log_{10} , e sujeitos a análise estatística no software STATISTICA version 10. Os resultados alcançaram os pressupostos de normalidade e homogeneidade, e foram submetidos a análise de variância, utilizando o método *Analysis of Variance* (ANOVA) (Fatorial), seguido de teste de comparações de médias, utilizando o teste das amplitudes múltiplas de Duncan ($p < 0,05$).

3.2.2 Crescimento de rizobactérias em mistura de biocarvão e lodo de ETEI

Preliminarmente, realizou-se um teste para definir com precisão a composição da mistura no presente trabalho. Sabe-se que a madeira das coníferas, como o pinus, possui aproximadamente 28% de lignina em sua biomassa. A lignina, componente responsável pela estrutura e rigidez, atuaria como agente aglutinante durante a peletização da mistura, entretanto, sofre degradação no processo de queima durante a produção do biocarvão.

No entanto, a substância determinada para atuar como agente aglutinante em substituição à lignina, foi a farinha de trigo, pois, quando submetida ao calor, juntamente com

água, gelatiniza, formando a estrutura necessária para atuar como aglutinante na mistura, o que promoverá estruturação ao *pellet*.

Posto isto, determinou-se a proporção da mistura:

**1 g de biocarvão + 0,33 g de lodo de ETEI + 0,13 g de farinha de trigo
+ 0,6 ml de inoculante líquido microbiano**

A mistura, sem adição dos inoculantes, foi formulada, homogeneizada e submetida ao processo de esterilização em autoclave (121 °C / 15 minutos). Logo depois, em capela de fluxo laminar descontaminada e desinfetada, preparou-se os frascos snap cap com 30 g da mistura, realizando a inoculação dos inoculantes líquidos microbianos à base de *A. brasilense* e *P. fluorescens*. O tratamento controle não recebeu nenhuma dose.

Os frascos foram selados com parafilme descontaminado e desinfetado, vedando-os com banda elástica, mantidos durante o período de armazenamento em ambiente com temperatura controlada 25 °C +/- 2 °C. As análises microbiológicas para cada microrganismo, foram realizadas conforme metodologia descrita no item 3.2.1.1, nos tempos de 16, 72, 168, 360 e 720 horas, em quintuplicata, totalizando 10 amostras/período/microrganismo.

3.2.3 Crescimento de rizobactérias nos *pellets*

Inicialmente, as misturas de biocarvão; lodo de ETEI; farinha de trigo e inoculantes microbianos à base de *A. brasilense* e *P. fluorescens*, foram elaboradas. Como a mistura continha mais de 20% de umidade, foram mantidas em incubação a 28 °C +/- 2 °C por 26 horas, para ajuste de umidade (8 - 20%).

Ao retirar as formulações da BOD, após 26 horas, amostras de 10 g de cada mistura, foram selecionadas para realização da análise microbiológica controle, desenvolvida conforme a metodologia descrita no item 3.2.1.1, a fim de determinar a quantidade de UFC.g⁻¹ presente inicialmente nas misturas, previamente à peletização.

As formulações foram preparadas em uma proporção de 500 g:

- **Controle estéril** (em autoclave a 121 °C/15 minutos em 1 atm de pressão): biocarvão + lodo de ETEI + farinha de trigo;
- **Controle:** biocarvão + lodo de ETEI + farinha de trigo;

- **Associação A:** biocarvão + lodo de ETEI + farinha de trigo + dose de inoculante à base de *Azospirillum brasilense*;
- **Associação P:** biocarvão + lodo de ETEI + farinha de trigo + dose de inoculante à base de *Pseudomonas fluorescens*.

Subsequentemente à peletização, realizou-se a primeira análise microbiológica (item 3.2.1.1) 3 horas após a obtenção dos *pellets*, desta forma, os tempos de análise realizados foram: 3, 168, 360 e 720 horas. As amostras foram mantidas em estufa BOD a 16 °C +/- 2 °C durante todo o período de estocagem, a fim de evitar o desenvolvimento de possíveis bolores.

A máquina utilizada para formulação dos *pellets*, foi uma peletizadora matriz plana com sistema de arrefecimento (Figura 9), própria para realização de testes laboratoriais em pequena escala. Desenvolvida pela empresa Lippel Metal, exclusivamente para uso na presente pesquisa, a máquina possuía um sistema de arrefecimento acoplado, com objetivo de garantir que a matriz não atinja temperaturas elevadas durante o processo de peletização, sendo ideal para uso com microrganismos, não interferindo na sobrevivência microbiana durante o processo.

Figura 9. Peletizadora matriz plana com arrefecimento.



Fonte: O autor.

Desenvolvida por: Lippel Metal | Agrolândia, SC; e-mail: atendimento@lippel.com.br;
Telefones: +55 (47) 3534-4266; +55 (47) 3300-1220.

3.2.4 Análise Estatística

Por se tratar de curvas de crescimento bacteriano, o comportamento dos microrganismos ao longo do tempo nos ensaios, foi verificado através de modelos de regressão não linear. As análises foram realizadas no programa SigmaPlot 10.0 para análise de regressão não linear ($p < 0,05$), quantificando a qualidade do ajuste através do coeficiente de determinação, R^2 .

4. RESULTADOS

4.1 CRESCIMENTO DE RIZOBACTÉRIAS EM BIOCARVÃO: DEFINIÇÃO DE DOSES DE INOCULANTE LÍQUIDO MICROBIANO

4.1.1 *Azospirillum brasilense*

A análise estatística através da ANOVA (Apêndice B), calculada para um arranjo fatorial, apontou haver diferença significativa ao analisar a interação dose e tempo. No período de 720 h de cultivo, a dose de 0,6 ml.g⁻¹ inoculada no biocarvão, apresentou a maior concentração final de células de *A. brasilense* (Tabela 3), sendo 3,39 x10⁷ UFC.g⁻¹, aproximadamente 4,68 vezes maior que a concentração inicial (7,24 x10⁶ UFC.g⁻¹). Na dose de 0,4 ml.g⁻¹ de inoculante, foi observado menor crescimento da rizobactéria com valor final (720 h) de 1,21 x10⁷ UFC.g⁻¹, o que significa um valor 1,53 vezes maior que o inicial (16 h) de 7,88 x10⁶ UFC.g⁻¹. Na menor dose testada, 0,2 ml.g⁻¹ de inoculante, não foi observado crescimento bacteriano, o que representou uma redução de 3,32 x10⁶ UFC.g⁻¹ para 5,95 x10⁵ UFC.g⁻¹.

Tabela 3. Crescimento da rizobactéria *Azospirillum brasilense* ao longo do tempo no biocarvão, utilizando diferentes doses de inoculante líquido microbiano. Valores expressos em UFC.g⁻¹.

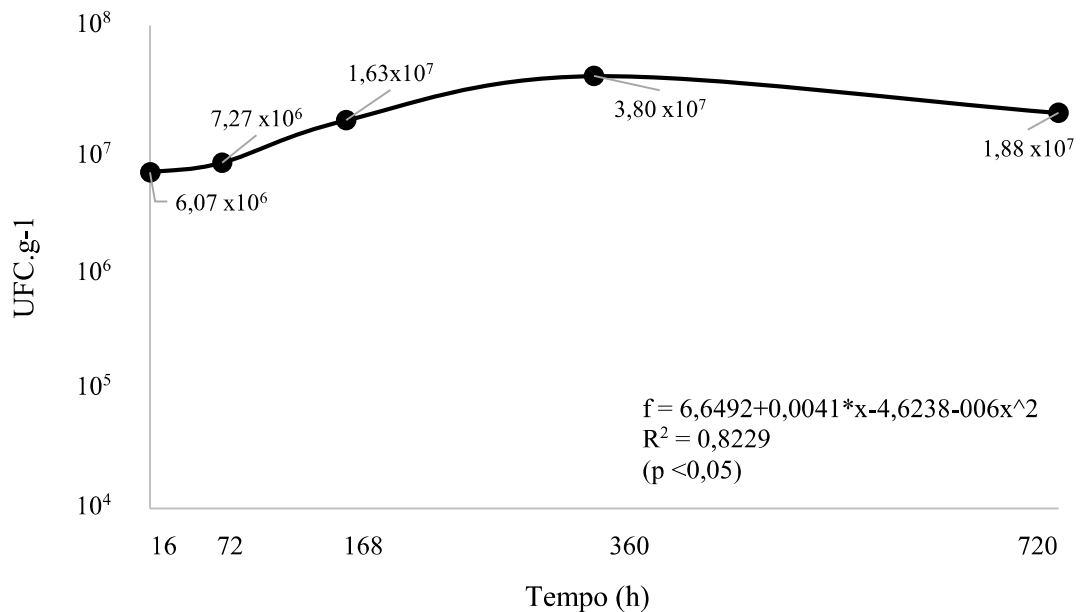
Doses (ml)	Tempo (h)		
	16	360	720
0,2	3,32 x10 ⁶ bA	3,29 x10 ⁶ cA	5,95 x10 ⁵ cB
0,4	7,88 x10 ⁶ aB	5,64 x10 ⁶ bB	1,21 x10 ⁷ bA
0,6	7,24 x10 ⁶ aC	1,35 x10 ⁷ aB	3,39 x10 ⁷ aA

Legenda: UFC.g⁻¹: Unidades Formadoras de Colônias por grama; h: horas; ml: mililitros.
*letras minúsculas (a, b, c) representam a comparação entre as doses.
*letras maiúsculas (A, B, C) representam a comparação entre os tempos.
*médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 95% de significância.
*médias seguidas pela mesma letra maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 95% de significância.

Considerando os maiores resultados de UFC.g⁻¹ ao longo do tempo, foi realizado um ensaio de confirmação com a maior dose, 0,6 ml.g⁻¹ de inoculante no biocarvão, utilizando o *A. brasilense*. Conforme a Figura 10, inicialmente o substrato possuía um número de UFC.g⁻¹ de 6,07 x10⁶ (16 h). Até o tempo de 360 h, a rizobactéria desenvolveu-se 6,25 vezes, atingindo

uma concentração celular de $3,80 \times 10^7$ UFC.g⁻¹. Entre 360 h e 720 h, diminuiu cerca de 50% o número de células, finalizando o período de análise com $1,88 \times 10^7$ UFC.g⁻¹. O ajuste do modelo, conforme análise estatística (Apêndice B), foi de 82% ($R^2 = 0,82$).

Figura 10. Crescimento em UFC.g⁻¹ na dosagem de 0,6 ml de inoculante microbiano à base de *Azospirillum brasilense* em biocarvão.



Legenda: UFC.g⁻¹: Unidades Formadoras de Colônias por grama; h: horas; f: função; R²: R-quadrado; p: probabilidade/nível descritivo.

4.1.2 *Pseudomonas fluorescens*

O resultado da ANOVA (Fatorial) apresentou efeito significativo da interação dose e tempo, no crescimento da rizobactéria *P. fluorescens* em biocarvão (Apêndice B). Pelo teste de Duncan ($p < 0,05$), constatou-se diferença entre as médias de UFC em 16 h de cultivo, onde observou-se o maior valor de UFC.g⁻¹ em todas as doses de inoculante testadas, com destaque para a dosagem de 0,6 ml no biocarvão, que apresentou o maior número de células, $1,10 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ (Tabela 4).

Ao longo do tempo, foi possível observar reduções no crescimento da *P. fluorescens*. Na dose 0,6 ml em 16 h, a concentração celular foi de $1,10 \times 10^7$ UFC.g⁻¹, aproximadamente 22 vezes maior que a observada em 720 h, que foi de $4,96 \times 10^5$ UFC.g⁻¹. Já na dose de inoculante 0,4ml, também houve redução na concentração de células de *P. fluorecens* até 720 h de cultivo, sendo o valor inicial $7,49 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ (16 h), 10,35 vezes maior que no final, $7,23 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ (720 h). Na menor dose inoculada de 0,2 ml, no tempo 16 h, observou-se a menor concentração

celular inicial ($5,61 \times 10^6$ UFC.g⁻¹), o número foi 11,5 vezes maior que a concentração final $4,89 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ (720 h).

Tabela 4. Crescimento da rizobactéria *Pseudomonas fluorescens* ao longo do tempo no biocarvão, utilizando diferentes doses de inoculante líquido microbiano. Valores expressos em UFC.g⁻¹.

Doses (ml)	Tempo (h)		
	16	360	720
0,2	$5,61 \times 10^6$ cA	$1,19 \times 10^6$ aB	$4,89 \times 10^5$ aB
0,4	$7,49 \times 10^6$ bA	$6,87 \times 10^5$ aB	$7,23 \times 10^5$ aB
0,6	$1,10 \times 10^7$ aA	$8,10 \times 10^5$ aB	$4,96 \times 10^5$ aB

Legenda: UFC.g⁻¹ : Unidades Formadoras de Colônias por grama; h : horas; ml : mililitros.

*letras minúsculas (a, b, c) representam a comparação entre as doses.

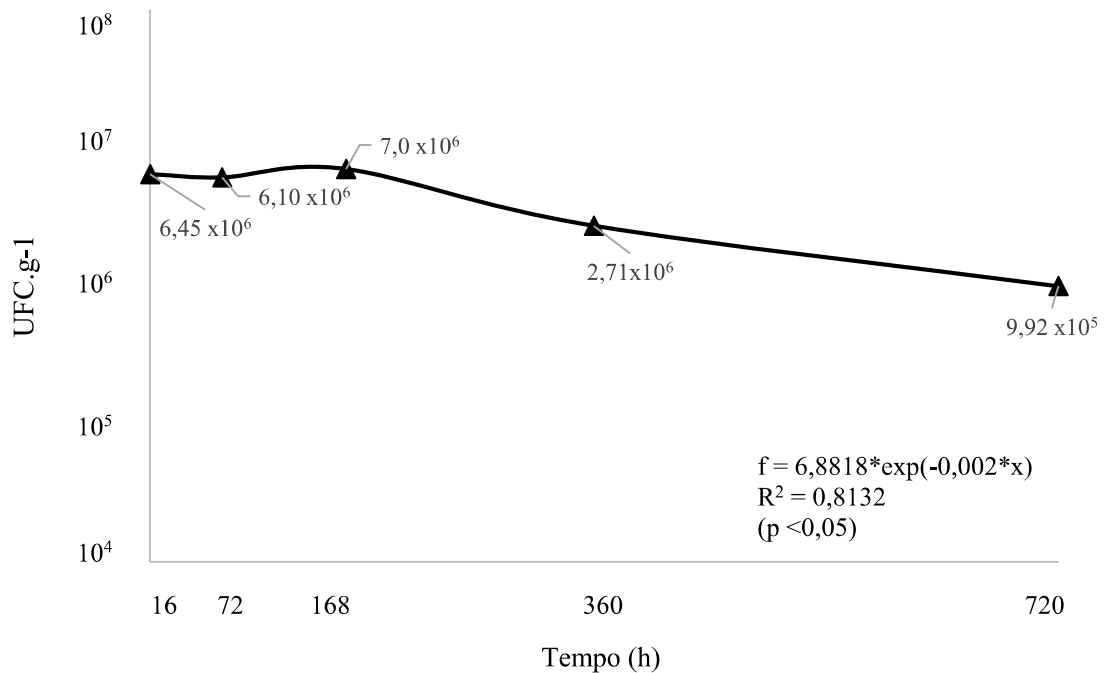
*letras maiúsculas (A, B, C) representam a comparação entre os tempos.

*médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 95% de significância.

*médias seguidas pela mesma letra maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 95% de significância.

Tendo em vista que somente no tempo 16 h houve diferença significativa no biocarvão, e considerando o maior valor de células bacterianas inicialmente para a dose 0,6 ml, ficou determinado que seria a dose ideal para se utilizar nos demais testes com a *P. fluorescens*. No teste de confirmação com a dose 0,6 ml do inoculante microbiano em biocarvão, o número de células entre 16 h e 168 h aumentou, partindo de $6,45 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ para $7,0 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ (Figura 11). A partir de 168 até 720 h, a concentração celular reduziu, finalizando o período com o valor de $9,92 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ (720 h). Segundo a análise estatística, o modelo se ajustou com coeficiente de determinação de 81% ($R^2 = 0,81$) (Apêndice B).

Figura 11. Crescimento em UFC.g⁻¹ na dosagem de 0,6 ml de inoculante microbiano à base de *Pseudomonas fluorescens* em biocarvão.



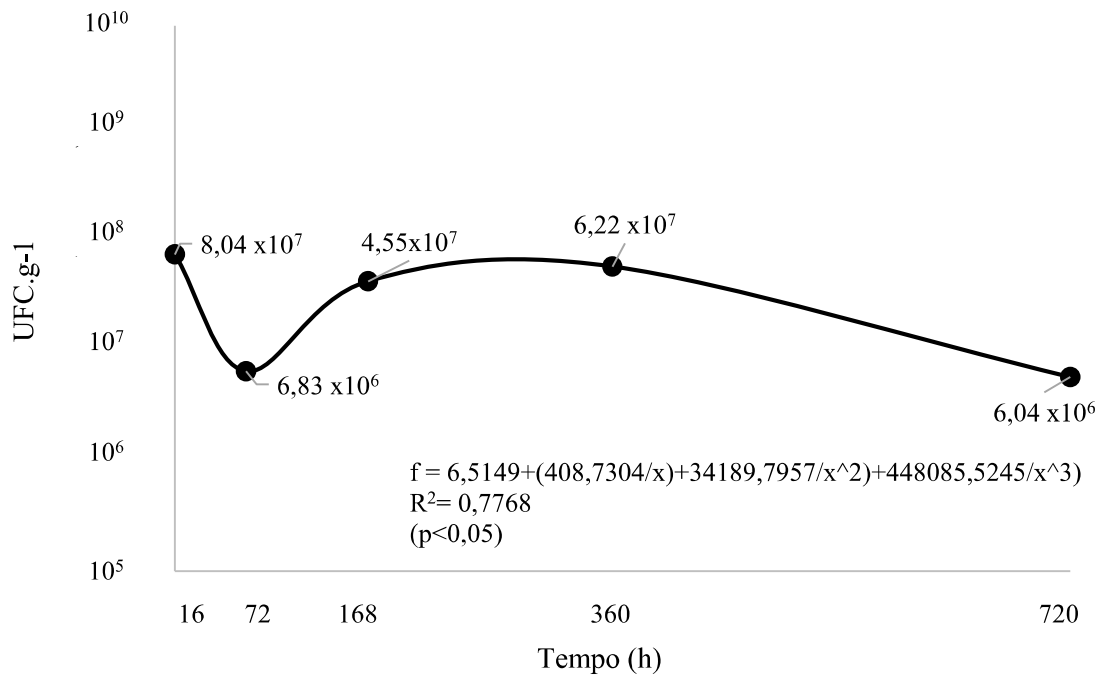
Legenda: UFC.g⁻¹: Unidades Formadoras de Colônias por grama; h: horas; f: função; R²: R-quadrado; p: probabilidade/nível descritivo.

4.2 CRESCIMENTO DE RIZOBACTÉRIAS EM MISTURA DE BIOCARVÃO E LODO DE ETEI

4.2.1 *Azospirillum brasilense*

O *A. brasilense* na mistura de biocarvão e lodo de ETEI, na fase inicial, lag (adaptação) do desenvolvimento bacteriano, foi verificado uma concentração celular 11,77 vezes maior em 16 h ($8,04 \times 10^7$ UFC.g⁻¹) do que em 72 h ($6,83 \times 10^6$ UFC.g⁻¹) (Figura 12). Ao atingir a fase log (crescimento), entre 72 h e 360 h, este, cresceu 9,10 vezes, alcançando $6,22 \times 10^7$ UFC.g⁻¹. A redução na concentração celular, iniciou a partir de 360 h, finalizando o ensaio com $6,04 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ (720 h). Para estes resultados, o modelo estatístico ajustou-se com um coeficiente de determinação de 77,6% ($R^2 = 0,77$) (Apêndice B).

Figura 12. Crescimento em UFC.g⁻¹ na dosagem de 0,6 ml de inoculante microbiano à base de *Azospirillum brasilense* em mistura de biocarvão e lodo de ETEI.

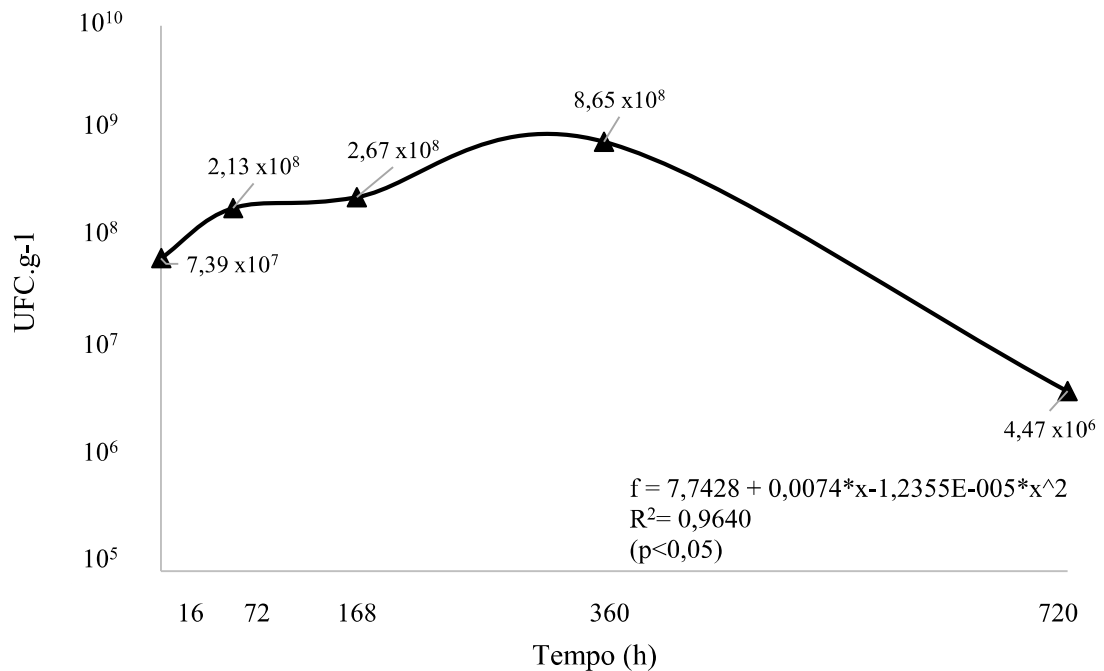


Legenda: UFC.g⁻¹: Unidades Formadoras de Colônias por grama; h: horas; f: função; R²: R-quadrado; p: probabilidade/nível descritivo.

4.2.2 *Pseudomonas fluorescens*

Na mistura de biocarvão e lodo de ETEI, a *P. fluorescens* conseguiu enriquecer em 11,7 vezes sua concentração celular até 360 h, partindo de 7,39 x 10⁷ UFC.g⁻¹ (16 h) para 8,65 x 10⁸ UFC.g⁻¹ (360 h) (Figura 13). Entretanto, após este período, houve perda de células, restando ao final do ensaio, 4,47 x 10⁶ UFC.g⁻¹ (720 h). O modelo estatístico de predição ajustou-se aos dados observados, a um coeficiente de determinação de 96,4 % (R² = 0,96) (Apêndice B).

Figura 13. Crescimento em UFC.g⁻¹ na dosagem de 0,6 ml de inoculante microbiano à base de *Pseudomonas fluorescens* em mistura de biocarvão e lodo de ETEI.



Legenda: UFC.g⁻¹: Unidades Formadoras de Colônias por grama; h: horas; f: função; R²: R-quadrado; p: probabilidade/nível descritivo.

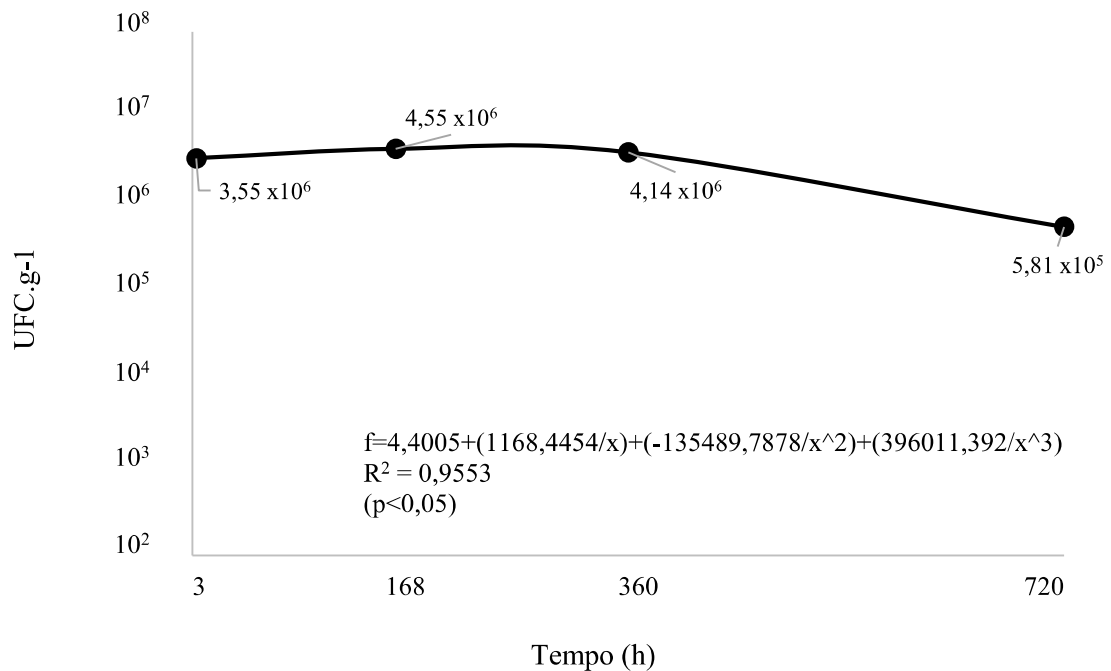
4.3 CRESCIMENTO DE RIZOBACTÉRIAS NOS *PELLETS*

4.3.1 *Azospirillum brasilense*

A rizobactéria *A. brasilense*, anteriormente ao processo de peletização, após 26 h em BOD a 28°C +/- 2°C, continha na mistura: biocarvão + lodo de ETEI, uma concentração celular de 5,0 x 10⁷ UFC.g⁻¹, quantidade 14,28 vezes maior, que nos *pellets* obtida na primeira análise (3 h) (Apêndice C).

A curva de crescimento bacteriano nos *pellets*, iniciou com uma concentração celular de 3,55 x 10⁶ UFC.g⁻¹ (3 h), apresentando leve crescimento até 360 h (4,14 x 10⁶ UFC.g⁻¹) (Figura 14). Após este período, a concentração reduziu até o tempo de 720 h, terminando o período de estocagem com 5,81 x 10⁵ UFC.g⁻¹. O ajuste obtido com o modelo estatístico, foi de 95,6% (R² = 0,96) (Apêndice B).

Figura 14. Crescimento em UFC.g⁻¹ da rizobactéria *Azospirillum brasilense*, ao longo do tempo para os *pellets*.



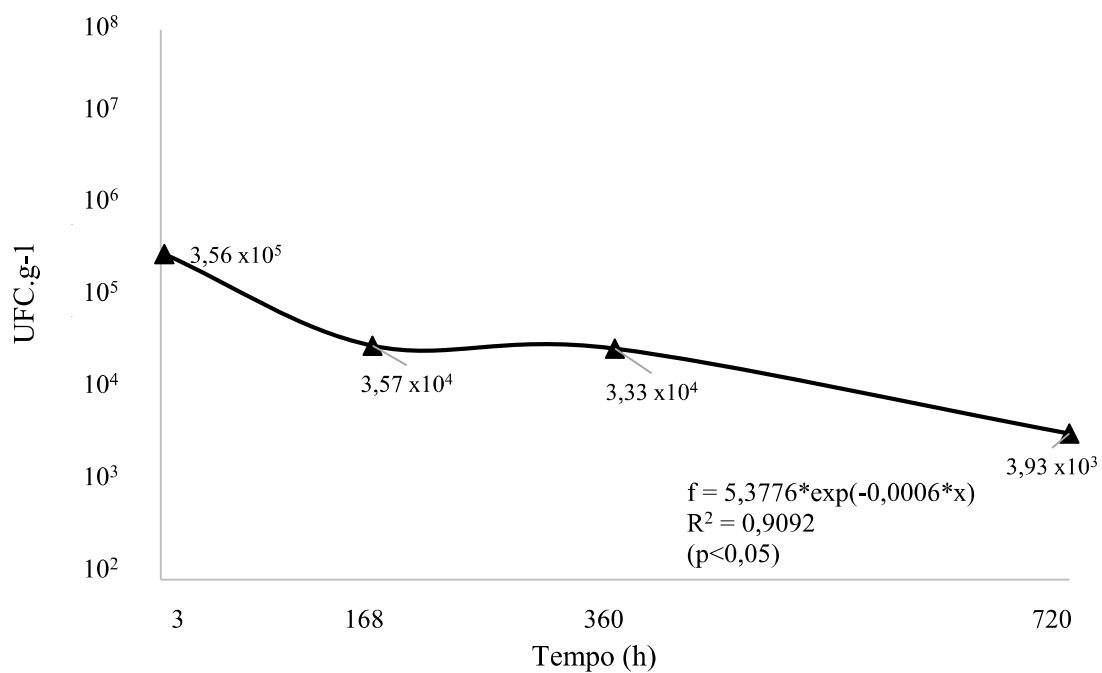
Legenda: UFC.g⁻¹: Unidades Formadoras de Colônias por grama; h: horas; f: função; R²: R-quadrado; p: probabilidade/nível descritivo.

4.3.2 *Pseudomonas fluorescens*

Assim como a outra rizobactéria estudada, o teste controle da mistura: biocarvão + lodo de ETEI, em 26 h a 28°C +/- 2°C, continha uma concentração de células de 1,26 x 10⁸ UFC.g⁻¹, este valor foi 353,93 vezes maior que a concentração inicial nos *pellets* (3h) (Apêndice C).

A curva de crescimento da rizobactéria *P. fluorescens* nos *pellets*, iniciou com 3,56 x 10⁵ UFC.g⁻¹, reduzindo de forma constante o número de células até o período final do ensaio, chegando em 720 h com uma concentração celular de 3,93 x 10³ (Figura 15). O coeficiente de determinação da curva de crescimento bacteriano, para estes resultados, foi de 90,9% (R² = 0,90) (Apêndice B).

Figura 15. Crescimento em UFC.g⁻¹ da rizobactéria *Pseudomonas fluorescens*, ao longo do tempo para os *pellets*.



Legenda: UFC.g⁻¹: Unidades Formadoras de Colônias por grama; h: horas; f: função; R²: R-quadrado; p: probabilidade/nível descritivo.

5. DISCUSSÃO

Conforme os resultados obtidos na condução da pesquisa, constatou-se que o biocarvão vegetal à base de *Pinus spp.*, favoreceu o crescimento da rizobactéria *Azospirillum brasilense*, todavia, o mesmo comportamento não foi observado com a *Pseudomonas fluorescens*, confirmando a hipótese inicial, de que o crescimento das populações microbianas neste substrato, depende da dose de inoculante aplicada e do tempo de cultivo.

As menores dosagens de inoculantes à base das rizobactérias testadas, como a dose de 0,2 ml e 0,4 ml em biocarvão, não foram suficientes para manter a concentração de UFC.g⁻¹ do *A. brasilense*, enquanto que, a maior dosagem de inoculante (0,6 ml.g⁻¹), demonstrou aumento do número de UFC.g⁻¹ ao longo do tempo de incubação. Já a *P. fluorescens*, não foi capaz de se desenvolver no biocarvão, mesmo com a dosagem maior de 0,6 ml.g⁻¹.

A sobrevivência de microrganismos em biocarvão, depende da origem do substrato (vegetal/animal), presença de elementos potencialmente tóxicos, gêneros de microrganismos que estão sendo utilizados e da quantidade de inóculo (BANDARA *et al.*, 2019; SAMMAURIA *et al.*, 2020). Além das propriedades e características do substrato, avaliadas na presente pesquisa, existem outras que também determinam o comportamento de microrganismos em biocarvão para uso agrícola. Como exemplos, tem-se a área superficial específica, cargas superficiais, porosidade, método de produção e grupos funcionais (BOLAN *et al.*, 2023).

No trabalho de Blanco-Vargas *et al.* (2022), foi inoculado 19 ml (1,0 x 10⁷ UFC.g⁻¹) de um consórcio de bactérias benéficas (*Pseudomonas sp.*, *Serratia sp.* e *Kosakonia sp.*) em 200 g de biocarvão derivado da serragem do pinus (equivalente a 0,095 ml.g⁻¹). O biofertilizante quando aplicado no cultivo de *Allium cepa* L., aumentou a germinação, crescimento e absorção de nutrientes, com destaque para o fósforo (BLANCO-VARGAS *et al.*, 2022). Nesta pesquisa, a dose de 0,6 ml.g⁻¹ de inoculante à base de *P. fluorescens*, continha 1,10 x 10⁷ UFC.g⁻¹, considerando a quantidade inicial de inóculo, o bioinsumo desenvolvido também possui potencial para uso agrícola.

Saranya *et al.* (2011), trabalhando com biocarvões à base de madeira de acácia e outro de casca de coco, inocularam uma concentração celular de 2,56 x 10¹² UFC.g⁻¹ da bactéria fixadora de nitrogênio *Azospirillum lipoferum* em 100 g de biocarvão. A concentração obtida por tais autores, manteve-se estável nos substratos até aproximadamente 30 dias após a inoculação, e no período final de 180 dias, foi de aproximadamente (~) 10¹⁰ UFC.g⁻¹, valores superiores aos obtidos com este trabalho aos 30 dias com o *A. brasilense* (3,39 x 10⁷ UFC.g⁻¹).

A sobrevivência do gênero de rizobactéria *A. brasilense* é garantida no biocarvão à base de *Pinus spp.* até 30 dias de incubação (720 h), entretanto, o mesmo não foi observado com a *P. fluorescens*, considerando o decréscimo celular ao longo do tempo. Kumar *et al.* (2017) de igual modo, observaram a sobrevivência das rizobactérias *Burkholderia sp.* e *Bacillus megaterium* nas doses 25-30 ml em 200 g de biocarvão (0,125 - 0,150 ml.g⁻¹), originário de resíduos agrícolas durante 240 dias a 27°C. Inicialmente, o valor de UFC para ambas as espécies era ~10¹⁰ UFC.g⁻¹, e apesar do decréscimo ao longo do tempo, o biocarvão foi capaz de manter a concentração de células em 1,19 x10⁸ UFC.g⁻¹ (*Burkholderia sp.*) e 1,03 x10⁸ UFC.g⁻¹ (*B. megaterium*) até 180 dias, com decréscimo gradual até 240 dias para ambos os microrganismos, entretanto, com valores viáveis ao final do período, próximos a 10⁷ UFC.g⁻¹.

Os dados descritos anteriormente, assemelham-se com os observados neste estudo, em especial com o *A. brasilense* que se mostrou mais resistente ao período de incubação, mantendo sua viabilidade na dose inoculada de 0,6 ml por g de biocarvão, até 30 dias (720 h) com concentração final de 1,88 x10⁷ UFC.g⁻¹.

A possibilidade de associar lodo de indústria papelreira com biocarvão de *Pinus spp.*, constitui uma alternativa de uso destes resíduos, fortalecendo os interesses atuais relacionados aos pressupostos da economia circular. A adição de lodo ao biocarvão de *Pinus spp.*, afetou positivamente o crescimento e a sobrevivência da rizobactéria *P. fluorescens*, sendo o seu uso, uma boa alternativa para destinação deste resíduo. O *A. brasilense* e *P. fluorescens* na mistura contendo lodo de ETEI, atingiram as fases do crescimento bacteriano: Lag (adaptação; não há divisão celular), Log (rápida divisão celular e crescimento), Estacionária (carência de nutrientes, equilíbrio da população) e Declínio (morte celular), indicando haver um comportamento padrão das rizobactérias no ensaio (VIEIRA; FERNANDES, 2012).

Pouco foi pesquisado sobre a combinação do biocarvão com lodo de esgoto, por isso, reitera-se a importância da presente pesquisa, visto que a associação destes substratos possui potencial para formulação de um bioinsumo. Outro fator interessante em uní-los, é que o biocarvão comparado ao lodo de esgoto, é pobre em nutrientes, e a mistura destes resíduos poderá mitigar impactos ambientais, uma vez que o biocarvão é um material com alta capacidade de adsorção, o que poderia reduzir a disponibilidade de possíveis contaminantes presentes no lodo (MILLER-ROBBIE *et al.*, 2014; PENIDO *et al.*, 2019).

No ensaio com a mistura de biocarvão e lodo de ETEI, as rizobactérias apresentaram diferentes comportamentos. O *A. brasilense* iniciou o período de estocagem com uma concentração celular de 8,04 x10⁷ UFC.g⁻¹ (16h), 12 vezes maior que a concentração inicial no

mesmo tempo apenas no biocarvão ($\sim 6,65 \times 10^6$ UFC.g⁻¹). Após atingir as demais fases do desenvolvimento bacteriano, a rizobactéria finalizou o período de estocagem (720 h) com $6,04 \times 10^6$ UFC.g⁻¹, valor menor que no biocarvão, que foi de $\sim 2,63 \times 10^7$ UFC.g⁻¹. Desta forma, conclui-se que para o *A. brasilense*, a adição de lodo de ETEI afetou seu crescimento e sobrevivência.

Para a *P. fluorescens*, a adição de lodo de ETEI ao biocarvão, potencializou o crescimento da rizobactéria na mistura. No início do período de estocagem (16h), possuía uma concentração de células de $7,39 \times 10^7$ UFC.g⁻¹, uma quantidade 8,5 vezes maior que a obtida apenas com o biocarvão ($\sim 8,72 \times 10^6$ UFC.g⁻¹). O microrganismo conseguiu durante a fase Log, crescer 11,7 vezes, porém, com declínio a partir de 360 h, finalizando o ensaio com $4,47 \times 10^6$ UFC.g⁻¹. Apesar da redução no número de células, a concentração final para a *P. fluorescens* com lodo de ETEI, foi maior quando comparando ao ensaio com apenas biocarvão, o qual apresentou uma concentração de $\sim 10^5$ UFC.g⁻¹.

A partir dos resultados obtidos, e ao confrontar-se a hipótese de que a mistura de biocarvão e lodo de ETEI é possível e suporta o crescimento microbiano, constata-se que a hipótese admitiu apenas o comportamento da espécie *P. fluorescens* e não se confirmou para o *A. brasilense*.

A comunidade microbiana depende de fatores como textura do solo, pH, quantidade de nutrientes e matéria orgânica, para o pleno desenvolvimento (MARSCHNER, CROWLEY, YANG, 2004; KACZYNSKI *et al.*, 2020). A estratégia de unir o biocarvão (rico em carbono) ao lodo de ETEI (rico em matéria orgânica), resulta num substrato com potencial, criando um ambiente ideal para o desenvolvimento de rizobactérias.

Kaczynski *et al.* (2020), ao avaliar a degradação do glifosato com a aplicação de lodo e *P. fluorescens* no solo, constatou que após a incorporação da associação, o número de bactérias e fungos aumentou, influenciando positivamente na degradação do herbicida e na fertilidade do solo. Tal resultado sugere que, para o bioinsumo em estudo, configura-se mais um ponto positivo em sua utilização, principalmente em ambientes de manejo tradicional dos sistemas agrícolas, onde as aplicações do referido herbicida são continuamente empregues.

Ismail, Subaschandrabose e Balasubramanian (2001) observaram a interferência no desenvolvimento de espécies florestais, *Azadirachta indica* e *Eucalyptus tereticomi*, de bioinoculantes à base de *Azospirillum sp.* e *Phosphobacterium* em solo enriquecido com lodo de esgoto. Os resultados demonstraram, de um modo geral, que a adição de lodo aumentou o número de plantas para ambas as espécies. Ainda, a inoculação exclusiva com *Azospirillum sp.*,

promoveu o maior tamanho em diâmetro e biomassa na espécie *A. indica*. Os autores afirmam que a combinação de lodos e inoculantes microbianos, é eficaz para implantação de espécies florestais em solos pobres em nutrientes.

No Brasil, a Instrução Normativa nº 13, de 24 de março de 2011 (MAPA, 2011), define que os produtos destinados para simbiose com leguminosas, devem apresentar no mínimo, $1,0 \times 10^9$ UFC.g⁻¹. Já, para demais bactérias associativas ou promotoras de crescimento, como é o caso das utilizadas nesta pesquisa, a concentração de células deverá ser informada quando realizar o registro do produto. Todavia, um bioinoculante de boa procedência, deve conter no mínimo $1,0 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ (BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012; SAMMAURIA *et al.*, 2020; KHAN *et al.*, 2023).

Jorjani *et al.* (2011), Selvaraj *et al.* (2014) e Biradar e Santhosh (2018), em suas bioformulações utilizando cepas de *P. fluorescens*, inocularam inicialmente doses superiores às utilizadas nos ensaios deste estudo, com valores de $\sim 10^9$ UFC.g⁻¹, $\sim 10^{10}$ UFC.g⁻¹ e $\sim 10^{10}$ UFC.g⁻¹, respectivamente, e obtiveram resultados satisfatórios ao final dos testes. Sabendo-se que a quantidade de inóculo interfere na sobrevivência, acredita-se que o baixo valor de UFC encontrado ao final dos testes com a *P. fluorescens* nesta pesquisa, decorrem da baixa concentração inicial inoculada nos substratos.

A peletização da mistura de biocarvão e lodo de ETEI, associada a rizobactérias, pode constituir uma alternativa interessante na composição de bioinsumos à base de resíduos oriundos do setor florestal. Neste estudo, ao avaliar o efeito da peletização sobre *A. brasilense* e *P. fluorescens*, verificou-se que o processo reduziu as populações inicialmente inoculadas na mistura, para ambas as rizobactérias. Desta forma, afetou-se a sobrevivência e a viabilidade dos microrganismos, refutando a hipótese de que a peletização não interferiria no crescimento das rizobactérias.

As concentrações presentes nas misturas antes da peletização, recém retiradas da BOD a 28°C por 26 h, continham 14,28 vezes mais células para o *A. brasilense*, e 353,93 vezes para a *P. fluorescens*, quando comparados com a primeira análise nos *pellets*. Deste modo, a curva de crescimento do *A. brasilense* iniciou com $3,55 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ (3 h) e finalizou com $5,81 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ (720 h). Já, a *P. fluorescens*, iniciou com $3,56 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ (3 h) e terminou com $3,93 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ (720 h). Como citado anteriormente, um bioinoculante de boa procedência deve conter no mínimo $1,0 \times 10^7$ UFC.g⁻¹, à vista disso, a metodologia e o método de estocagem utilizados no bioinsumo peletizado, merecem reavaliações, com o objetivo de aumentar a

qualidade do produto desenvolvido, e garantir uma maior resistência e sobrevivência dos microrganismos ao processo de peletização.

O processo de peletização de materiais orgânicos requer cuidados com relação aos fatores; tamanho de partículas, umidade, pressão e temperatura, que são cruciais para determinar a qualidade do *pellet* (RELOVA *et al.*, 2009). Segundo os autores, a temperatura e a umidade, são propriedades importantes ao processo de peletização. Tendo em vista que, para a formação do *pellet*, a umidade deva estar entre 8% e 15%, nas misturas formuladas, utilizou-se uma porcentagem maior, sendo 20,1% (*A. brasilense*) e 17,4% (*P. fluorescens*), com o objetivo de manter a umidade ideal durante a peletização. Assim, a umidade excedente associada à pressão e temperatura da peletizadora, serviram para ativar a ação ligante da farinha de trigo.

Os *pellets*, de um modo geral, podem ser produzidos a partir de diversas matérias-primas, com partículas preferencialmente finas e baixa umidade, aplicando-se pressão, com ou sem adição de ligantes ou tratamento térmico (SENA, 2021). A lignina é um componente da madeira que atua como ligante natural, entretanto, em temperaturas entre 280 °C – 500 °C, acaba sendo degradada (KALIYAN; MOREY, 2009; REPOSSI *et al.*, 2022). Tendo em vista que o biocarvão utilizado na presente pesquisa foi produzido entre 800°C – 1000°C, certamente, a lignina ora presente, tenha se degradado, logo, diante da expressa necessidade da presença de algum agente ligante para a formação dos *pellets*, utilizou-se a farinha de trigo como substituta.

Neste trabalho, para peletização do bioinsumo, utilizou-se uma peletizadora de matriz plana, onde os rolos movimentavam-se de forma circular em sua superfície, pressionando o material a ser peletizado. Apesar do acoplamento de um sistema de arrefecimento à peletizadora, a fim de evitar um alto aquecimento e consequente morte das rizobactérias, ainda assim, a pressão e a velocidade exercida pelo mecanismo de funcionamento, acabaram gerando um mínimo aquecimento na matriz.

Tripathi e Klingmüller (1992), constataram que a taxa ideal de crescimento da rizobactéria *A. brasilense*, em condições de fixação de Nitrogênio, é entre 30°C e 35°C. Molina *et al.* (2018), identificou uma redução de 90% no número de células ao expor os microrganismos a uma temperatura de 45°C. Corroborando com tais autores, estão os resultados obtidos nesta etapa da pesquisa, onde observou-se a redução de 83,64% de células bacterianas de *A. brasilense*, frente às condições de estresse.

A *P. fluorescens* é cultivada em laboratório em faixas de temperatura, variando entre 5°C e 32°C (SCALES *et al.*, 2014). Cullen, Phillips e Shipley (1971), trabalhando com variações

de temperaturas, alegaram que a *P. fluorescens* conseguiu sobreviver até a temperatura de 33°C, sendo incapaz de se desenvolver em valores superiores a 34°C. Esta sensibilidade descrita pelos autores, também foi observada neste trabalho, em que a *P. fluorescens* demonstrou ser um microrganismo sensível às condições de estresse térmico, visto o declínio sucessivo em sua sobrevivência na mistura peletizada.

Considerando os resultados obtidos durante a pesquisa e os estudos abordados, uma alternativa para aumentar a concentração de células nas doses utilizadas, seria cultivar previamente a dose de inoculante em um caldo de enriquecimento, utilizando agitador *shaker*. Desta forma, a inoculação iniciaria com uma quantidade de UFC.g⁻¹ superior à obtida na pesquisa, prolongando a viabilidade das rizobactérias, atingindo concentrações próximas ou superiores a 10⁷ UFC.g⁻¹, no maior período de estocagem.

Alguns fatores no processo de produção de bioinsumos, merecem ser estudados com maiores critérios, visto que, o processo de peletização neste estudo, gerou redução significativa na sobrevivência microbiana e viabilidade dos microrganismos. Dentre os fatores a serem considerados, estão: métodos alternativos de proteção celular; aumento na concentração inicial de UFC.g⁻¹; método de inoculação e temperatura de estocagem.

Esta pesquisa, destaca o potencial de uso dos insumos de base biológica associados a resíduos industriais e submetidos à tecnologia da peletização. Ressalta ainda, a importância de novas pesquisas para que a associação de importantes microrganismos rizosféricos, como BPCP, solubilizadores de fósforo e fixadores de nitrogênio, sejam incorporados em substratos alternativos provenientes da economia circular, principalmente na forma peletizada, de forma a agregar valor e contribuir para redução na utilização de agroquímicos e mitigar impactos ambientais.

6. CONCLUSÃO

- A rizobactéria *Azospirillum brasilense* na maior dose de inoculante 0,6 ml, em biocarvão de *Pinus spp.*, é capaz de crescer no substrato, atingindo os 30 dias (720 h) com concentração de UFC.g⁻¹ superior à inicial, ~10⁷ UFC.g⁻¹;
- A *Pseudomonas fluorescens* é capaz de sobreviver em biocarvão de *Pinus spp.*, com uma quantidade reduzida de células na maior dosagem de inoculante (0,6 ml), com ~10⁵ UFC.g⁻¹ no tempo de 30 dias (720 h);
- A mistura de lodo ETEI de indústria papaleira e o biocarvão de *Pinus spp.*, afetou o crescimento do *A. brasilense*, o qual, ao final do período de estocagem de 30 dias (720 h), apresentou uma concentração de ~10⁶ UFC.g⁻¹;
- O crescimento da *P. fluorescens* foi favorecido pela adição do lodo de ETEI ao biocarvão de *Pinus spp.*, a qual finalizou o período de 30 dias (720 h) com uma quantidade celular de ~10⁶ UFC.g⁻¹;
- A peletização da mistura de biocarvão e lodo de ETEI, reduziu a sobrevivência das rizobactérias. O *A. brasilense* iniciou com maior número de células, entretanto, a partir de 360 h, reduziu sua concentração celular, finalizando o período com ~10⁵ UFC.g⁻¹. Já, a *P. fluorescens*, teve sua concentração celular reduzida gradativamente ao longo do tempo, com concentração celular final de ~10³ UFC.g⁻¹ no tempo de 30 dias (720 h);
- O bioinsumo à base de biocarvão, lodo de ETEI e inoculantes microbianos, apresenta potencial de uso, contribuindo para a economia circular, entretanto, a técnica de peletização merece ser reavaliada, a fim de melhor proteger as rizobactérias e melhorar a sobrevivência no bioinsumo peletizado.

REFERÊNCIAS

- AKHIL, D. *et al.* Production, characterization, activation and environmental applications of engineered biochar: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, 2020.
- ALBUQUERQUE, M. G. *et al.* Impactos Socioambientais dos Dejetos da Pecuária no Âmbito Rural: Uma Revisão de Literatura. **Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica**, v. 15, n. 1, 2022.
- AREMU, B. R. *et al.* Potentials of microbial inoculants in soil productivity: An outlook on African legumes. **Microorganisms for Green Revolution**, v. 1, 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6457/2016 - Amostras de solo - preparação para ensaios de compactação e ensaios de caracterização: método de ensaio**. Rio de Janeiro: ABNT, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10004: Resíduos sólidos – Classificação**. Rio de Janeiro, 68 p., 2004.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 11267:2019 – Qualidade do Solo – Inibição da reprodução de *Collembola (Folsomia candida)* por poluentes do solo**. Rio de Janeiro, 22 p., 2019.
- BANDARA, T. *et al.* Chemical and biological immobilization mechanisms of potentially toxic elements in biochar-amended soils. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 9, 2019.
- BETEMPS, C. Lodo de esgoto é ótimo componente de substratos para plantas. Embrapa Clima Temperado. 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/32485890/lodo-de-esgoto-e-otimo-componente-de-substratos-para-plantas>. Acesso em 11 set. 2023.
- BIRADAR, B. P.; SANTHOSH, G. P. Cell protectants, adjuvants, surfactant and preservative and their role in increasing the shelf life of liquid inoculant formulations of *Pseudomonas fluorescens*. **International Journal of Pure & Applied Bioscience**, v. 6, n. 4, 2018.
- BLANCO-VARGAS, A. *et al.* Production of pine sawdust biochar supporting phosphate-solubilizing bacteria as an alternative bioinoculant in *Allium cepa* L., culture. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 2022.
- BOLAN, S. *et al.* The potential of biochar as a microbial carrier for agricultural and environmental applications. **Science of the Total Environment**, v. 886, 2023.
- BOLESTA, W.; GŁODNIOK, M.; STYSZKO, K. From Sewage Sludge to the Soil—Transfer of Pharmaceuticals: A Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 16, 2022.
- BOSSIS, E. *et al.* The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. **Agronomie**, v. 20, n. 1, 2000.
- BRAHMAPRAKASH, G. P.; SAHU, P. K.. Biofertilizers for sustainability. **Journal of the Indian Institute of Science**, v. 92, n. 1, 2012.
- BRASIL. Decreto Nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004. 2004. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos->

agricolas/fertilizantes/legislacao/decreto-4954-2004-com-alteracoes-do-dec-8384-2014-planalto.pdf. Acesso em 08 fev. 2024.

BRASIL. Decreto Nº 10.375, de 26 de maio de 2020. 2020. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10375.htm. Acesso em 26 jul. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Conceitos. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos/o-programa/conceitos>. Acesso em 24 jul. 2023.

BRASIL. Projeto de Lei Nº 3668, de 2021. 2021. Disponível em: https://legis.senado.leg.br/sdleg-getter/documento?dm=9028589&ts=1690818207338&disposition=inline&_gl=1*12wmq18*_ga*MTAwMjUwNDM5OC4xNjkyNzI1MzM3*_ga_CW3ZH25XMK*MTY5MjgzMTc4OS4yLjAuMTY5MjgzMTc4OS4wLjAuMA... Acesso 23 ago. 2023.

BUTA, M. *et al.* Sewage sludge in agriculture—the effects of selected chemical pollutants and emerging genetic resistance determinants on the quality of soil and crops—a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 214, 2021.

CAPODIFOGGIO, B. F. Peletização: benefícios e fatores que interferem na formação dos peletes. Agrocere Multimix. 2023. Disponível em: <https://agrocere multimix.com.br/blog/peletizacao-beneficios-e-fatores-que-interferem-na-formacao-dos-peletes/>. Acesso em 07 fev. 2024.

CONAMA. Resolução Nº 375 , de 29 de Agosto de 2006. Disponível em: https://incaper.es.gov.br/Media/incaper/PDF/legislacao_biosolido/res_conama37506-1.pdf. Acesso em 01 de abr. 2024.

CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA. Circular economy: opportunities and challenges for the brazilian industry. 2018. 68 p. Disponível em: https://static.portaldaindustria.com.br/media/filer_public/70/ef/70efcf44-703c-4ce3-bbe6-63647b66e491/circular_economy_opportunities_and_challenges_for_the_brazilian_industry.pdf. Acesso em 26 jul. 2023.

COUILLEROT, O. *et al.* Pseudomonas fluorescens and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. **Letters in applied microbiology**, v. 48, n. 5, 2009.

CRUZ-HERNÁNDEZ, M. A *et al.* Azospirillum spp. from plant growth-promoting bacteria to their use in bioremediation. **Microorganisms**, v. 10, 2022.

CRUZ, H. C. Efecto del fertilizante peletizado en la producción de palto (Persea americana MILL. cv. Hass) y en las propiedades químicas y biológicas del suelo. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Agronomia) - Universidad Nacional Del Centro Del Perú, Peru, 2022.

CULLEN, J.; PHILLIPS, M. C.; SHIPLEY, G. G. The effects of temperature on the composition and physical properties of the lipids of Pseudomonas fluorescens. **Biochemical Journal**, v. 125, n. 3, 1971.

D'AMATO, D. *et al.* Green, circular, bio economy: A comparative analysis of sustainability avenues. **Journal of cleaner production**, v. 168, p. 716-734, 2017.

DORNER, M. *et al.* Biochar-mediated abiotic and biotic degradation of halogenated organic contaminants—A review. **Science of The Total Environment**, v. 852, 2022.

European Biomass Association. Pellet Market Overview. 2017. Disponível em: <https://epc.bioenergyeurope.org/wp-content/uploads/2017/10/FINAL-PELLET-MARKET-OVERVIEW-2017.pdf>. Acesso em 09 de out. 2023.

GARCIA, M. V. C.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Combining microorganisms in inoculants is agronomically important but industrially challenging: case study of a composite inoculant containing *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* for the soybean crop. **AMB Express**, v. 11, n. 1, 2021.

GEISSDOERFER, M. *et al.* The Circular Economy—A new sustainability paradigm?. **Journal of cleaner production**, 2016.

GUO, F. *et al.* Development of biochar-based nanocatalysts for tar cracking/reforming during biomass pyrolysis and gasification. **Bioresource technology**, v. 298, 2020.

HENNE, R. A. *et al.* Thermal behavior of forest biomass wastes produced during combustion in a boiler system. **Revista Árvore**, v. 43, 2019.

HOU, T. *et al.* Effects of microbial inoculum on microbial community and enzyme activity involved in nitrogen-sulfur metabolism during sewage sludge composting. **Science of The Total Environment**, v. 858, 2023.

HU, Q. *et al.* Biochar industry to circular economy. **Science of the Total Environment**, v. 757, 2021.

IGALAVITHANA, A. D. *et al.* Advances and future directions of biochar characterization methods and applications. **Critical reviews in environmental science and technology**, v. 47, n. 23, 2018.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES – IBÁ. 2023: Relatório Anual. 2023. Disponível em: <https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2023-r.pdf>. Acesso em 13 fev. 2024.

INSTITUTO DO MEIO AMBIENTE DE SANTA CATARINA – IMA. Boletim de Desempenho: Resíduos Sólidos em Santa Catarina. Disponível em: <https://www.ima.sc.gov.br/index.php/qualidade-ambiental/mtr/boletim-mensal>. Acesso em 06 fev. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL – INPI. Bioinsumos na Agricultura: Inoculantes. 2023. Disponível em: https://www.gov.br/inpi/pt-br/assuntos/informacao/13_12_2023_RadarInoculantesfinal.pdf. Acesso em 06 fev. 2024.

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13, DE 24 DE MARÇO DE 2011 – MAPA. 2011. Disponível em: <https://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=recuperarTextoAtoTematicaPortal&codigoTematica=1229256>. Acesso em 14 fev. 2024.

INTERNATIONAL BIOCHAR INICIATIVE. **Soil Health: Biochar use in soils**. 2022. Disponível em: <https://biochar-international.org/about-biochar/soil-health/>. Acesso em 11 set. 2023.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10390 - Soil, treated biowaste and sludge – Determination of pH**. Suíça, 10 p. 2021.

ISMAIL, S. M.; SUBASCHANDRABOSE, M.; BALASUBRAMANIAN, S. Response of *Azadirachta Indica* and *Eucalyptus tereticornis* to Bioinoculants (VAM, *Phosphobacterium* and *Azospirillum*) in Sewage Sludge Amended Soil. **Pertanika Journal Of Tropical Agricultural Science**, v. 24, n. 2, p. 131-138, 2001.

IZYDORCZYK, G. *et al.* Agricultural and non-agricultural directions of bio-based sewage sludge valorization by chemical conditioning. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, 2021.

- JABBOROVA, D. *et al.* Co-inoculation of rhizobacteria and biochar application improves growth and nutrients in soybean and enriches soil nutrients and enzymes. **Agronomy**, v. 10, n. 8, 2020.
- JAISWAL, A. K. *et al.* Linking the belowground microbial composition, diversity and activity to soilborne disease suppression and growth promotion of tomato amended with biochar. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- JAMIL, M.; QASIM, M.; UMAR, M. Utilization of sewage sludge as organic fertilizer in sustainable agriculture. **Journal of Applied Science**, v. 6, n. 3, 2006.
- JOHN, C. J. *et al.* *Pseudomonas fluorescens* R68 assisted enhancement in growth and fertilizer utilization of *Amaranthus tricolor* (L.). **3 Biotech**, v. 7, n. 256, 2017.
- JORJANI, M. *et al.* Development of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus coagulans* based bioformulations using organic and inorganic carriers and evaluation of their influence on growth parameters of sugar beet. **Journal of biopesticides**, v. 4, n. 2, 2011.
- JÚNIOR, S. V. **Aproveitamento de resíduos agroindustriais: uma abordagem sustentável**. 1 ed. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2020.
- KACPRZAK, M. *et al.* Sewage sludge disposal strategies for sustainable development. **Environmental research**, v. 156, 2017.
- KACZYNSKI, P. *et al.* Complex study of glyphosate and metabolites influence on enzymatic activity and microorganisms association in soil enriched with *Pseudomonas fluorescens* and sewage sludge. **Journal of hazardous materials**, v. 393, 2020.
- KHAN, A. *et al.* Microbial bioformulation: a microbial assisted biostimulating fertilization technique for sustainable agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 2023.
- KALIYAN, N.; MOREY, R. V. Factors affecting strength and durability of densified biomass products. **Biomass and bioenergy**, v. 33, n. 3, 2009.
- KIM, M. *et al.* Evaluation of the Impact of Activated Biochar-Manure Compost Pellet Fertilizer on Volatile Organic Compound Emissions and Heavy Metal Saturation. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 19, 2022.
- KUMAR, A. *et al.* Biochar and flyash inoculated with plant growth promoting rhizobacteria act as potential biofertilizer for luxuriant growth and yield of tomato plant. **Journal of environmental management**, v. 190, 2017.
- KUMAR, L. *et al.* Integrating torrefaction in the wood pellet industry: A critical review. **Energy & Fuels**, v. 31, n. 1, 2017.
- MAIA, C. M. B. F. *et al.* Biochar e o eucalipto. In: OLIVEIRA, E. B.; JUNIOR, J. E. P. (Ed). O eucalipto e a Embrapa: quatro décadas de pesquisa e desenvolvimento. Brasília, DF: Embrapa, 2021. p. 589-609.
- MANDPE, A. *et al.* Circular economy approach for sustainable solid waste management: A developing economy perspective. **Waste Management & Research**, v. 41, n. 3, 2023.
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Brasil tem legislação progressista para bioinsumos**, diz indústria. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt->

br/composicao/superintendencias-federais-de-agricultura-sfa/sao-paulo/noticias/brasil-tem-legislacao-progressista-para-bioinsumos-diz-industria. Acesso em 04 set. 2023.

MARIOTTE, P. *et al.* Plant–soil feedback: bridging natural and agricultural sciences. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 33, n. 2, 2018.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; YANG, C. H. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. **Plant and soil**, v. 261, n. 1-2, 2004.

MATTEI, R. M. *et al.* A fertilidade do solo por fertilizantes orgânicos peletizado e farelado com cama de aves. In: XXXIV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 2013, Florianópolis. **Resumos [...]**. 2013.

MAZARO, S. M. *et al.* Desafios na adoção de bioinsumos. In: MEYER, M. C. *et al.* **Bioinsumos na cultura da soja**. 1 ed. Brasília, DF: Embrapa Soja, 2022. p. 75-84.

MILLER-ROBBIE, L. *et al.* Life cycle energy and greenhouse gas assessment of the co-production of biosolids and biochar for land application. **Journal of Cleaner Production**, 2014.

MOLINA, R. *et al.* Regulation of IAA biosynthesis in *Azospirillum brasilense* under environmental stress conditions. **Current microbiology**, v. 75, 2018.

NDIRANGU, S. M. *et al.* Risk evaluation of pyrolyzed biochar from multiple wastes. **Journal of Chemistry**, v. 2019, 2019.

NIST - National Institute of Standards & Technology. Certificate of Analysis: Standard Reference Material 2709a, San Joaquin Soil. 2009. Disponível em: https://assets.lgcstandards.com/sys-master%2Fpdfs%2Fh86%2Fhcf%2F10132385955870%2FCOA_NIST-2709A_ST-WB-CERT-2828051-1-1-1.PDF. Acesso em 05 fev. 2024.

NÓBREGA, I. P. C. **Efeitos do Biochar nas propriedades físicas e químicas do solo: - Sequestro de carbono no solo**. 2011. 46 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.

OLIVEIRA, G. R. **Validação do processo de digestão e de peletização de cama de aviário para a produção de fertilizante organomineral**. 2014. 211 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Como as Nações Unidas apoiam os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável no Brasil**. 2015. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em 27 jul. 2023.

PALHANO, A. X. **Reestruturação de máquina peletizadora para uso laboratorial**. 2021. 100 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia Mecânica) - Faculdade de Tecnologia, Brasília, 2021. Disponível em: <https://bdm.unb.br/handle/10483/32566>. Acesso em 09 de out. 2023.

PARK, K. H.; LEE, C.Y.; SON, H.J. Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. **Letters in applied microbiology**, v. 49, n. 2, 2009.

PENIDO, E. S. *et al.* Combining biochar and sewage sludge for immobilization of heavy metals in mining soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 172, 2019.

PEREG, L. *Azospirillum* Cell aggregation, attachment, and plant interaction. **Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols**, 2015.

PHAM, T. *et al.* Isolation of indole-3-acetic acid-producing *Azospirillum brasilense* from Vietnamese wet rice: Co-immobilization of isolate and microalgae as a sustainable biorefinery. **Journal of Biotechnology**, v. 349, 2022.

POPPELIERS, S. W.; SÁNCHEZ-GIL, J. J.; JONGE, R. Microbes to support plant health: understanding bioinoculant success in complex conditions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 73, 2023.

RELOVA, I. *et al.* Optimisation of the manufacturing variables of sawdust pellets from the bark of *Pinus caribaea* Morelet: Particle size, moisture and pressure. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 10, 2009.

REPOSSI, Bruno Fazolo *et al.* **Produção de biocarvões para utilização como condicionadores do solo**. Comunicado Técnico - Nº 16. 2022. Disponível em: <https://repositorio.ifes.edu.br/bitstream/handle/123456789/2051/Produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20biocarv%C3%B5es.pdf?sequence=1>. Acesso em 20 de fev. 2024.

SAMMAURIA, R. *et al.* Microbial inoculants: potential tool for sustainability of agricultural production systems. **Archives of microbiology**, v. 202, n. 4, 2020.

SANTERAMO, F. G. Circular and green economy: the state-of-the-art. **Heliyon**, v. 8, 2022.

SARANYA, K. *et al.* Potential for biochar as an alternate carrier to lignite for the preparation of biofertilizers in India. **International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology**, v. 4, n. 2, 2011.

SCALES, B. S. *et al.* Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 4, 2014.

SELVARAJ, S. *et al.* Evaluation of a liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and *Helicotylenchus multicinctus* in banana plantation. **BioControl**, v. 59, 2014.

SENA, A. L. Efeito da composição da biomassa nos parâmetros de processo e na qualidade dos pellets produzidos em peletizadora de matriz plana. 2021. 78 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Do Estado De Santa Catarina, Lages, 2021.

SHARMA, A. K. *et al.* A critical review on biochar production from pine wastes, upgradation techniques, environmental sustainability, and challenges. **Bioresource technology**, 2023.

SILVA. A. C. B. *et al.* Uso e efeitos dos bioinsumos na agricultura. **Ciências Agrárias: o avanço da ciência no Brasil**, v. 4, 2022.

SILVA, F. J. *et al.* Rizobactérias associadas a materiais orgânicos no controle de nematoides das galhas em tomateiro. **Horticultura brasileira**, v. 34, 2016.

SIQUEIRA, F. G. *et al.* **Bioinsumos para nutrição de ruminantes em contribuição ao alcance dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável**. 1 ed. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2022.

SIQUEIRA, H. F. Efeito de aditivos na qualidade de *pellets* de madeira para uso energético. 2017. 50 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

SOARES, C. O. O próximo salto da agricultura. **AgroANALYSIS**, v. 42, n. 4, 2022.

SPIERS, A. J.; BUCKLING, A.; RAINEY, P. B. The causes of *Pseudomonas* diversity. **Microbiology**, v. 146, n. 10, 2000.

SUPERBAC. **Ambiental: Quais os principais tipos de lodo e suas classificações?**. 2022. Disponível em: <https://www.superbac.com.br/blog/quais-os-principais-tipos-de-lodo-e-suas-classificacoes/>. Acesso em 13 set. 2023.

TRAZZI, P. A. *et al.* Biocarvão: realidade e potencial de uso no meio florestal. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 2, 2018.

TRIPATHI, A. K.; KLINGMÜLLER, W. Temperature sensitivity of nitrogen fixation in *Azospirillum* spp. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 12, 1992.

TUMULURU, J. S. *et al.* A review of biomass densification systems to develop uniform feedstock commodities for bioenergy application. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 5, n. 6, 2011.

VIDAL, M. C *et al.* Bioinsumos: a construção de um Programa Nacional pela Sustentabilidade do Agro Brasileiro. **Economic Analysis of Law Review**, v. 12, n. 3, 2021.

VIEIRA, D. A. P; FERNANDES, N. C. A. Q. Microbiologia Geral. 1 ed. Inhumas, GO. 2012. 100 p. Disponível em: https://www.ufsm.br/app/uploads/sites/413/2018/12/05_microbiologia_geral.pdf. Acesso em 15 fev. 2024.

XAVIER, V. L. Programa Nacional de Bioinsumos: Proposição de um Sistema de Monitoramento de Biofábricas. 2022. 87 p. Dissertação (Mestrado Profissional em Avaliação e Monitoramento de Políticas Públicas) - Escola Nacional de Administração Pública, Brasília, 2022.

XIANG, L. *et al.* Integrating biochar, bacteria, and plants for sustainable remediation of soils contaminated with organic pollutants. **Environmental Science & Technology**, v. 56, n. 23, 2022.

XIANG, W. *et al.* Biochar technology in wastewater treatment: A critical review. **Chemosphere**, v. 252, 2020.

ZAFAR-UL-HYE, M. *et al.* Potential role of compost mixed biochar with rhizobacteria in mitigating lead toxicity in spinach. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, 2020.

ZHANG, Y. *et al.* Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 152, n. 2, 1997.

APÊNDICE A - ÁGAR VERMELHO DO CONGO

1. Materiais e Reagentes:

Água destilada;
 Balança analítica;
 Autoclave;
 Espátulas;
 Placas de Petri;
 Becker;
 Câmara de Fluxo Laminar;
 pHmêtro;
 Agitador Magnético;
 Barra Magnética;
 Pipeta graduada;
 Pêra de sucção;
 Fosfato de Potássio Bibásico Anidro (K_2HPO_4) 98%;
 Sulfato de Magnésio Heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 98%;
 Cloreto de Sódio (NaCl) 98%;
 Extrato de Levedura;
 Cloreto Férrico ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) 98%;
 DL- Ácido Málico 98%;
 Vermelho Congo;
 Azul de bromotimol;
 Hidróxido de Potássio (KOH);
 Ácido Clorídrico (HCl).

2. Preparo de Soluções:

2.1 SOLUÇÃO VERMELHO DO CONGO ($g \cdot 100ml^{-1}$):

Vermelho do congo	0,25 g
Água destilada	100 ml

2.2 SOLUÇÃO DE KOH 0,2 N (g.100ml⁻¹):

KOH _____ 1,122 g
 Água destilada _____ 100 ml

2.3 SOLUÇÃO AZUL DE BROMOTIMOL 0,5% (g.100ml⁻¹ de KOH 0,2N):

Azul de bromotimol _____ 0,5 g
 Solução de KOH 0,2 N _____ 100 ml

2.4 SOLUÇÃO DE ÁCIDO FOSFÓRICO (H₃PO₄) 30% (ml.L⁻¹):

Ácido Fosfórico _____ 300 ml
 Água destilada _____ 1000 ml

2.5 SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO (KOH) 30% (g.L⁻¹):

Hidróxido de Potássio _____ 300 g
 Água destilada _____ 1000 ml

3. Preparo do Meio de Cultura Vermelho do Congo (g.L⁻¹):

Fosfato de Potássio Bibásico Anidro _____ 0,5 g
 Sulfato de Magnésio Heptahidratado _____ 0,2 g
 Cloreto de Sódio _____ 0,1 g
 Extrato de Levedura _____ 0,5 g
 Cloreto Férrico _____ 0,015 g
 DL- Ácido Málico _____ 5 g

Todos os componentes acima foram pesados em balança analítica calibrada, sendo dissolvidos com aproximadamente 100 ml de água destilada inicialmente. Após, a mistura foi transferida para balão volumétrico de 1000 ml, completando o volume do balão com água destilada e ajustando o menisco.

Em agitador magnético, utilizando-se a barra magnética, adicionou-se 15 ml da solução de vermelho do congo, passado 10 minutos, complementou-se com 2 ml de solução azul de bromotimol.

Previamente à incorporação do ágar, realizou-se o ajuste do pH entre 6,8-7,0, utilizando as soluções de ácido fosfórico 30% e hidróxido de potássio 30%.

Em agitação e aquecimento a fim de evitar a formação de grumos, a adição de 13 g de Ágar foi realizada.

O meio de cultura foi passado para frasco de vidro, e submetido a esterilização em autoclave a 121 °C, pressão de 1 atm, por 20 minutos. Posterior a isso, com o meio resfriado (aproximadamente 55°C), verteu-se aproximadamente 20-25 ml para placas de Petri estéreis.

Com a solidificação do meio, as placas foram identificadas e armazenadas em geladeira até a realização das análises microbiológicas.

APÊNDICE B - ANÁLISE ESTATÍSTICA

CRESCIMENTO DE RIZOBACTÉRIAS EM BIOCARVÃO: DEFINIÇÃO DE DOSES DE INOCULANTE LÍQUIDO MICROBIANO

Tabela B 1. Teste de homogeneidade das variâncias de diferentes doses de inoculante líquido microbiano à base da rizobactéria *Azospirillum brasilense* em biocarvão.

	Hartley - F-max	Cochran - C	Bartlett - Chi-Sqr.	df	p
UFC.g ⁻¹	61,21297	0,241610	6,439955	8	0,598075

Tabela B 2. Análise de Variância das amostras contendo diferentes doses de inoculante líquido microbiano à base da rizobactéria *Azospirillum brasilense*.

	Degr. of - Freedom	SS	MS	F	p
Intercept	1	1239,988	1239,988	113495,8	0,000000
Dose	2	3,878	1,939	177,5	0,000000
Tempo	2	0,010	0,005	0,4	0,650143
Dose*Tempo	4	1,969	0,492	45,1	0,000000
Error	18	0,197	0,011		
Total	26	6,053			

Tabela B 3. Comparação entre períodos de tempo dentro das diferentes doses de inoculante líquido microbiano à base de *Azospirillum brasilense* em biocarvão pelo teste de Duncan ao nível de significância de 95%.

Dose	Tempo	d0,2t16	d0,2t168	d0,2t720	d0,4t16	d0,4t168	d0,4t720	d0,6t16	d0,6t168	d0,6t720
0,2	16		0,997371	0,000161	0,000756	0,022764	0,000039	0,001607	0,000029	0,000023
0,2	168	0,997371		0,000075	0,000669	0,018146	0,000042	0,001335	0,000033	0,000027
0,2	720	0,000161	0,000075		0,000031	0,000060	0,000027	0,000036	0,000023	0,000022
0,4	16	0,000756	0,000669	0,000031		0,109181	0,049720	0,675115	0,014656	0,000060
0,4	168	0,022764	0,018146	0,000060	0,109181		0,001880	0,194531	0,000488	0,000031
0,4	720	0,000039	0,000042	0,000027	0,049720	0,001880		0,026460	0,483144	0,000118
0,6	16	0,001607	0,001335	0,000036	0,675115	0,194531	0,026460		0,007134	0,000036
0,6	168	0,000029	0,000033	0,000023	0,014656	0,000488	0,483144	0,007134		0,000319

0,6	720	0,000023	0,000027	0,000022	0,000060	0,000031	0,000118	0,000036	0,000319
-----	-----	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------

Tabela B 4. Comparação das diferentes doses de inoculante líquido microbiano à base de *Azospirillum brasilense* em biocarvão em cada período de tempo pelo teste de Duncan ao nível de significância de 95%.

Tempo (h)	Dose (ml)	t16d0,2	t16d0,4	t16d0,6	t168d0,2	t168d0,4	t168d0,6	t720d0,2	t720d0,4	t720d0,6
16	0,2		0,997371	0,000161	0,000756	0,022764	0,000039	0,001607	0,000029	0,000023
16	0,4	0,997371		0,000075	0,000669	0,018146	0,000042	0,001335	0,000033	0,000027
16	0,6	0,000161	0,000075		0,000031	0,000060	0,000027	0,000036	0,000023	0,000022
168	0,2	0,000756	0,000669	0,000031		0,109181	0,049720	0,675115	0,014656	0,000060
168	0,4	0,022764	0,018146	0,000060	0,109181		0,001880	0,194531	0,000488	0,000031
168	0,6	0,000039	0,000042	0,000027	0,049720	0,001880		0,026460	0,483144	0,000118
720	0,2	0,001607	0,001335	0,000036	0,675115	0,194531	0,026460		0,007134	0,000036
720	0,4	0,000029	0,000033	0,000023	0,014656	0,000488	0,483144	0,007134		0,000319
720	0,6	0,000023	0,000027	0,000022	0,000060	0,000031	0,000118	0,000036	0,000319	

Tabela B 5. Teste de homogeneidade das variâncias de diferentes doses de inoculante líquido microbiano à base da rizobactéria *Pseudomonas fluorescens* em biocarvão.

	Hartley - F-max	Cochran - C	Bartlett - Chi-Sqr.	df	p
UFC.g ⁻¹	74,53789	0,383551	10,77425	8	0,214821

Tabela B 6. Análise de Variância das amostras contendo diferentes doses de inoculante líquido microbiano à base da rizobactéria *Pseudomonas fluorescens*.

	Degr. of - Freedom	SS	MS	F	p
Intercept	1	2,709324E+14	2,709324E+14	352,1216	0,000000
Dose	2	1,313918E+13	6,569592E+12	8,5383	0,002468
Tempo	2	3,205651E+14	1,602826E+14	208,3138	0,000000
Dose*Tempo	4	3,242084E+13	8,105210E+12	10,5341	0,000141
Error	18	1,384972E+13	7,694286E+11		
Total	26	3,799749E+14			

Tabela B 7. Comparação entre períodos de tempo dentro das diferentes doses de inoculante líquido microbiano à base de *Pseudomonas fluorescens* em biocarvão pelo teste de Duncan ao nível de significância de 95%.

Dose (ml)	Tempo (h)	d0,2t16	d0,2t168	d0,2t720	d0,4t16	d0,4t168	d0,4t720	d0,6t16	d0,6t168	d0,6t720
0,2	16		0,000167	0,000029	0,017162	0,000038	0,000062	0,000075	0,000077	0,000033
0,2	168	0,000167		0,391924	0,000075	0,524260	0,542299	0,000060	0,598043	0,391169
0,2	720	0,000029	0,391924		0,000023	0,797516	0,768189	0,000022	0,691792	0,992736
0,4	16	0,017162	0,000075	0,000023		0,000031	0,000036	0,000263	0,000060	0,000027
0,4	168	0,000038	0,524260	0,797516	0,000031		0,959889	0,000027	0,873172	0,792724
0,4	720	0,000062	0,542299	0,768189	0,000036	0,959889		0,000031	0,905247	0,767691
0,6	16	0,000075	0,000060	0,000022	0,000263	0,000027	0,000031		0,000036	0,000023
0,6	168	0,000077	0,598043	0,691792	0,000060	0,873172	0,905247	0,000036		0,692656
0,6	720	0,000033	0,391169	0,992736	0,000027	0,792724	0,767691	0,000023	0,692656	

Tabela B 8. Comparação das diferentes doses de inoculante líquido microbiano à base de *Pseudomonas fluorescens* em biocarvão em cada período de tempo pelo teste de Duncan ao nível de significância de 95%.

Tempo (h)	Dose (ml)	t16d0,2	t16d0,4	t16d0,6	t168d0,2	t168d0,4	t168d0,6	t720d0,2	t720d0,4	t720d0,6
16	0,2		0,017162	0,000075	0,000167	0,000038	0,000077	0,000029	0,000062	0,000033
16	0,4	0,017162		0,000263	0,000075	0,000031	0,000060	0,000023	0,000036	0,000027
16	0,6	0,000075	0,000263		0,000060	0,000027	0,000036	0,000022	0,000031	0,000023
168	0,2	0,000167	0,000075	0,000060		0,524260	0,598043	0,391924	0,542299	0,391169
168	0,4	0,000038	0,000031	0,000027	0,524260		0,873172	0,797516	0,959889	0,792724
168	0,6	0,000077	0,000060	0,000036	0,598043	0,873172		0,691792	0,905247	0,692656
720	0,2	0,000029	0,000023	0,000022	0,391924	0,797516	0,691792		0,768189	0,992736
720	0,4	0,000062	0,000036	0,000031	0,542299	0,959889	0,905247	0,768189		0,767691
720	0,6	0,000033	0,000027	0,000023	0,391169	0,792724	0,692656	0,992736	0,767691	

Tabela B 9. Regressão não-linear do tipo polinomial quadrática da rizobactéria *Azospirillum brasilense* em biocarvão utilizando dose 0,6 ml de inoculante microbiano líquido.

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate		
0,9071	0,8229	0,8060	0,1373		
	Coefficient	Std. Error	t	P	VIF
y0	6,6492	0,0544	122,3079	<0,0001	3,7607
a	0,0041	0,0005	8,9451	<0,0001	37,3360<
b	-4,6238x10 ⁻⁶	5,9879x10 ⁻⁷	-7,7219	<0,0001	26,8994<
Analysis of Variance:					
	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	1,8398	0,9199	48,7733	<0,0001
Residual	21	0,3961	0,0189		
Total	23	2,2359	0,0972		

Tabela B 10. Regressão não-linear do tipo decaimento exponencial simples com dois parâmetros da rizobactéria *Pseudomonas fluorescens* em biocarvão utilizando dose 0,6 ml de inoculante microbiano líquido.

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate		
0,9018	0,8132	0,8047	0,1585		
	Coefficient	Std. Error	t	P	VIF
a	6,8818	0,0479	143,7091	<0,0001	1,9857
b	0,0002	1,9864x10 ⁻⁵	9,5649	<0,0001	1,9857
Analysis of Variance:					
	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	2,4053	2,4053	95,7564	<0,0001
Residual	22	0,5526	0,0251		
Total	23	2,9579	0,1286		

CRESCIMENTO DE RIZOBACTÉRIAS EM MISTURA DE BIOCARVÃO E LODO DE ETEI

Tabela B 11. Regressão não-linear do tipo polinomial inversa de terceira ordem da rizobactéria *Azospirillum brasilense* na mistura biocarvão, lodo de ETEI e inoculante microbiano.

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate		
0,8814	0,7768	0,7450	0,2546		
	Coefficient	Std. Error	t	P	VIF
y0	6,5149	0,1729	37,6841	<0,0001	11,5316<
a	408,7304	70,1324	5,8280	<0,0001	1572,8955<
b	-34189,7957	5341,4762	-6,4008	<0,0001	33678,7843<
c	448085,5245	68455,9299	6,5456	<0,0001	21556,2575<
Analysis of Variance:					
	DF	SS	MS	F	P
Regression	3	4,7368	1,5789	24,3677	<0,0001
Residual	21	1,3607	0,0648		
Total	24	6,0976	0,2541		

Tabela B 12. Regressão não-linear do tipo polinomial quadrática da rizobactéria *Pseudomonas fluorescens* na mistura biocarvão, lodo de ETEI e inoculante microbiano.

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate		
0,9818	0,9640	0,9607	0,1569		
	Coefficient	Std. Error	t	P	VIF
y0	7,7428	0,0613	126,2650	<0,0001	3,8200
a	0,0074	0,0005	14,7939	<0,0001	34,6034<
b	-1,2355 x10 ⁻⁵	6,4761x10 ⁻⁷	-19,0783	<0,0001	24,4010<
Analysis of Variance:					
	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	14,5000	7,2500	294,6038	<0,0001
Residual	22	0,5414	0,0246		
Total	24	15,0415	0,6267		

CRESCIMENTO DE RIZOBACTÉRIAS NOS *PELLETS*Tabela B 13. Regressão não-linear do tipo polinomial inversa de terceira ordem da rizobactéria *Azospirillum brasilense* na mistura peletizada.

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate		
0,9774	0,9553	0,9469	0,0879		
	Coefficient	Std. Error	t	P	VIF
y0	4,4005	0,1275	34,5119	<0,0001	42,0436<
a	1168,4454	86,6950	13,4777	<0,0001	540134,9647<
b	-135489,7878	11542,3472	-11,7385	<0,0001	1063368622,9043<
c	396011,3920	33857,5395	11,6964	<0,0001	1016632062,7916<
Analysis of Variance:					
	DF	SS	MS	F	P
Regression	3	2,6426	0,8809	113,8982	<0,0001
Residual	16	0,1237	0,0077		
Total	19	2,7663	0,1456		

Tabela B 14. Regressão não-linear do tipo decaimento exponencial simples com dois parâmetros da rizobactéria *Pseudomonas fluorescens* na mistura peletizada.

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate		
0,9535	0,9092	0,9041	0,2200		
	Coefficient	Std. Error	t	P	VIF
a	5,3776	0,0807	66,6007	<0,0001	1,9720
b	0,0006	4,4182x10 ⁻⁵	12,8560	<0,0001	1,9720
Analysis of Variance:					
	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	8,7242	8,7242	180,2208	<0,0001
Residual	18	0,8714	0,0484		
Total	19	9,5955	0,5050		

APÊNDICE C – BIOINSUMO PELETIZADO

Figura C 1. Bioinsumo produzido a partir de resíduos industriais, associado a inoculantes microbianos.



Fonte: O autor.

ANEXO A – LAUDO DO LODO DE ETEI

Tabela A 1. Relatório de ensaio concedido pela empresa fornecedora do substrato lodo de ETEI. Os ensaios foram realizados no ano de 2019, por um laboratório externo, e preconiza os dados de referência baseados na ABNT NBR 10004:2004 (ABNT, 2004).

	Lodo Primário		Lodo Secundário		ABNT NBR 10004:2004	
			Solubilizado			
Cianeto Total	0,008	mg.L ⁻¹	0,019	mg.L ⁻¹	até 0,07	mg.L ⁻¹
Cloreto Total	<10,0	mg.L ⁻¹	<10,0	mg.L ⁻¹	até 250	mg.L ⁻¹
Fenóis Totais	0,08	mg.L ⁻¹	0,10	mg.L ⁻¹	até 0,01	mg.L ⁻¹
Fluoreto	<0,1	mg.L ⁻¹	<0,1	mg.L ⁻¹	até 1,5	mg.L ⁻¹
Nitrato	66,6	mg.L ⁻¹	92,3	mg.L ⁻¹	até 10	mg.L ⁻¹
Sulfato	<10	mg.L ⁻¹	20	mg.L ⁻¹	até 250	mg.L ⁻¹
Surfactantes aniônicos	<0,3	mg.L ⁻¹	<0,3	mg.L ⁻¹	até 0,5	mg.L ⁻¹
2,4,5-T	<1,0	µg.L ⁻¹	<1,0	µg.L ⁻¹	até 0,002	mg.L ⁻¹
2,4,5-TP	<1,0	µg.L ⁻¹	<1,0	µg.L ⁻¹	até 0,03	mg.L ⁻¹
2,4-D	<0,002	µg.L ⁻¹	<0,002	µg.L ⁻¹	até 0,03	mg.L ⁻¹
Aldrin + Dieldrin	<0,005	µg.L ⁻¹	<0,005	µg.L ⁻¹	até 0,00003	mg.L ⁻¹
Clordano	<0,1	µg.L ⁻¹	<0,10	µg.L ⁻¹	até 0,0002	mg.L ⁻¹
DDT (p,p'-DDT; p,p'-DDE; p,p'-DDD)	<0,005	µg.L ⁻¹	<0,005	µg.L ⁻¹	até 0,002	mg.L ⁻¹
Endrin	<0,001	µg.L ⁻¹	<0,0010	µg.L ⁻¹	até 0,0006	mg.L ⁻¹
Heptacloro + Heptacloro epóxido	<0,005	µg.L ⁻¹	<0,005	µg.L ⁻¹	até 0,00003	mg.L ⁻¹
Lindano (gama – HCH)	<0,2	µg.L ⁻¹	<0,2	µg.L ⁻¹	até 0,002	mg.L ⁻¹
Metoxicloro	<0,5	µg.L ⁻¹	<0,5	µg.L ⁻¹	até 0,02	mg.L ⁻¹
Toxafeno	<0,01	µg.L ⁻¹	<0,01	µg.L ⁻¹	até 0,01	mg.L ⁻¹
			Massa Bruta			
Cianeto total	0,005	mg.Kg ⁻¹	0,005	mg.Kg ⁻¹	até 250	mg.Kg ⁻¹
pH 1:1	7,48		7,42		de 2,00 a 12,5	
Ponto de fulgor	105	°C	112	°C	≥ 60	°C
Porcentagem de sólidos	98,20	%	96,10	%		%
Sulfeto de hidrogênio	58	mg.Kg ⁻¹	20,60	mg.Kg ⁻¹	até 500	mg.Kg ⁻¹
			Lixiviado			
Benzeno	<2,5	µg.L ⁻¹	<2,50	µg.L ⁻¹	até 0,5	mg.L ⁻¹
pH final	5,61		5,12			
2,4-Dinitrotolueno	<0,1	µg.L ⁻¹	<0,1	µg.L ⁻¹	até 0,13	mg.L ⁻¹
Metiletilcetona	<2,5	µg.L ⁻¹	<2,5	µg.L ⁻¹	até 200	mg.L ⁻¹
Nitrobenzeno	<0,05	µg.L ⁻¹	<0,05	µg.L ⁻¹	até 2,0	mg.L ⁻¹
Piridina	<0,002	µg.L ⁻¹	<0,002	µg.L ⁻¹	até 5,0	mg.L ⁻¹
PAH - Benzo(a)pireno	<0,05	µg.L ⁻¹	<0,05	µg.L ⁻¹	até 0,07	mg.L ⁻¹
2,4,5-T	<1,0	µg.L ⁻¹	<1,0	µg.L ⁻¹	até 0,2	mg.L ⁻¹

2,4,5-TP	<1,0	µg.L ⁻¹	<1,0	µg.L ⁻¹	até 1,0	mg.L ⁻¹
2,4,5-Triclorofenol	<0,05	µg.L ⁻¹	<0,05	µg.L ⁻¹	até 400	mg.L ⁻¹
2,4,6-Triclorofenol	<0,5	µg.L ⁻¹	<0,5	µg.L ⁻¹	até 20	mg.L ⁻¹
2,4-D	<0,002	µg.L ⁻¹	<0,002	µg.L ⁻¹	até 3	mg.L ⁻¹
Aldrin + Dieldrin	<0,005	µg.L ⁻¹	<0,005	µg.L ⁻¹	até 0,003	mg.L ⁻¹
Clordano	<0,10	µg.L ⁻¹	<0,1	µg.L ⁻¹	até 0,02	mg.L ⁻¹
DDT (p,p'-DDT; p,p'-DDE; p,p'- DDD)	<0,005	µg.L ⁻¹	<0,005	µg.L ⁻¹	até 0,2	mg.L ⁻¹
Endrin	<0,0	µg.L ⁻¹	<0,0	µg.L ⁻¹	até 0,1	mg.L ⁻¹
Heptacloro + Heptacloro epóxido	<0,01	µg.L ⁻¹	<0,01	µg.L ⁻¹	até 0,00	mg.L ⁻¹
Hexaclorobenzeno	<0,006	µg.L ⁻¹	<0,006	µg.L ⁻¹	até 0,1	mg.L ⁻¹
Hexacloroetano	<0,050	µg.L ⁻¹	<0,05	µg.L ⁻¹	até 3,0	mg.L ⁻¹
Lindano	<0,2	µg.L ⁻¹	<0,2	µg.L ⁻¹	até 0,2	mg.L ⁻¹
m-Cresol	<0,100	µg.L ⁻¹	<0,1	µg.L ⁻¹	até 200	mg.L ⁻¹
Metoxicloro	<0,500	µg.L ⁻¹	<0,5	µg.L ⁻¹	até 2,0	mg.L ⁻¹
o-Cresol	<0,050	µg.L ⁻¹	<0,05	µg.L ⁻¹	até 200	mg.L ⁻¹
p-Cresol	<0,050	µg.L ⁻¹	<0,05	µg.L ⁻¹	até 200	mg.L ⁻¹
Pentaclorofenol	<0,1	µg.L ⁻¹	<0,1	µg.L ⁻¹	até 0,1	mg.L ⁻¹
Toxafeno	<0,01	µg.L ⁻¹	<0,01	µg.L ⁻¹	até 0,50	mg.L ⁻¹
THM - Clorofórmio	<2,50	µg.L ⁻¹	<2,5	µg.L ⁻¹	até 6,0	mg.L ⁻¹
1,1-Dicloroetileno	<2,50	µg.L ⁻¹	<2,5	µg.L ⁻¹	até 3,0	mg.L ⁻¹
1,2-Dicloroetano	<2,50	µg.L ⁻¹	<2,5	µg.L ⁻¹	até 1,0	mg.L ⁻¹
1,4-Diclorobenzeno	<2,50	µg.L ⁻¹	<2,5	µg.L ⁻¹	até 7,5	mg.L ⁻¹
Cloreto de vinila	<2,00	µg.L ⁻¹	<2,0	µg.L ⁻¹	até 0,5	mg.L ⁻¹
Clorobenzeno	<2,50	µg.L ⁻¹	<2,5	µg.L ⁻¹	até 100	mg.L ⁻¹
Hexaclorobutadieno	<2,50	µg.L ⁻¹	<2,5	µg.L ⁻¹	até 0,5	mg.L ⁻¹
Tetracloroeto de carbono	<2,50	µg.L ⁻¹	<2,5	µg.L ⁻¹	até 0,2	mg.L ⁻¹
Tetracloroetileno	<2,50	µg.L ⁻¹	<2,5	µg.L ⁻¹	até 4,0	mg.L ⁻¹
Tricloroetileno	<2,00	µg.L ⁻¹	<2,0	µg.L ⁻¹	até 7,0	mg.L ⁻¹

Metodologias:

- Fluoreto – PEFQ 019 Rev.03;
- Nitrato – PEFQ 021 Rev.03;
- Sulfato – PEFQ 035 Rev.04;
- Surfactantes aniônicos – PEFQ 039 Rev.03;
- Cloreto total – SMEWW, 23ª Edição, Método 4500Cl- B;
- Fenóis Totais – SMEWW, 23ª Edição, Método 5530 B e D;
- 2,4,5-T, 2,4,5-TP, 2,4-D, Aldrin + Dieldrin, Clordano, DDT (p,p'-DDT; p,p'-DDE; p,p'-DDD), Endrin, Heptacloro + Heptacloro epóxido, Lindano (gama - HCH), Metoxicloro, Toxafeno – US EPA Métodos 3510 C Rev.03 / 8270 D Rev.04 / 8015 C Rev.03;
- Cianeto total – WAH, 9ª Edição, Método 8027;
- Sulfeto de hidrogênio – SMEWW, 22ª Edição, Método 4500-S2 –H;
- Porcentagem de sólidos – SMEWW, 23ª Edição, Método 2540 B e E;
- pH 1:1 – SMEWW, 23ª Edição, Método 4500H+ B;
- pH final – SMEWW, 23ª Edição, Método 4500H+ B;
- Piridina – US EPA Método 8260 D Rev.04;
- Nitrobenzeno – US EPA Método 8270 D Rev.04;
- Benzeno, 2,4-Dinitrotolueno, Metiletilcetona, PAH-Benzo(a)pireno, 2,4,5-T, 2,4,5-TP, 2,4,5-Triclorofenol, 2,4,6-Triclorofenol, 2,4-D, Aldrin + Dieldrin, Clordano, DDT (p,p'-DDT; p,p'-DDE; p,p'-DDD), Endrin, Heptacloro + Heptacloroepóxido, Hexaclorobenzeno, Hexacloroetano, Lindano, m-Cresol, Metoxicloro, o-Cresol, p-Cresol,

Pentaclorofenol, Toxafeno, THM - Clorofórmio, 1,1-Dicloroetileno, 1,2-Dicloroetano, 1,4-Diclorobenzeno, Cloreto de vinila, Clorobenzeno, Hexaclorobutadieno, Tetracloroeto de carbono, Tetracloroetileno, Tricloroetileno – US EPA Métodos 3510 C Rev.03 / 8270 D Rev.04 / 8015 C Rev.03.
