



Universidade Federal de Pernambuco

Centro Acadêmico do Agreste

Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil e Ambiental

**ECOLOGIA MICROBIANA DE REATORES UASB
SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO
PARA TRATAR EFLUENTE TÊXTIL**

Mestrando: José Roberto Santo de Carvalho

Orientadora: Profa. Dra. Sávia Gavazza dos Santos Pêsoa

Coorientador: Dr. Tiago Palladino Delforno

Caruaru

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DO AGRESTE
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL

**ECOLOGIA MICROBIANA DE REATORES UASB
SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO
PARA TRATAR EFLUENTE TÊXTIL**

Discente: José Roberto Santo de Carvalho
Orientador: D. Sc. Sávvia Gavazza dos Santos Pêsoa
Co-Orientador: Prof. Dr. Tiago Palladino Delforno

Dissertação submetida ao programa de Pós-graduação em Engenharia Civil e Ambiental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para obtenção ao título de Mestre.

Caruaru
2016

Catálogo na fonte:
Bibliotecária – Simone Xavier CRB/4 - 1242

C331e Carvalho, José Roberto Santo de.
Ecologia microbiana de reatores UASB submetidos a diferentes condições de
operação para tratar efluente têxtil. / José Roberto Santo de Carvalho. – 2016.
77f. il. ; 30 cm.

Orientadora: Sália Gavazza dos Santos Pessôa
Coorientador: Tiago Palladino Delforno
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CAA, Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, 2016.
Inclui Referências.

1. Reator UASB. 2. Resíduos industriais. 3. Ecologia microbiana. I. Pessôa, Sália
Gavazza dos Santos (Orientadora). II. Delforno, Tiago Palladino (Coorientador). III. Título.

620 CDD (23. ed.) UFPE (CAA 2016-099)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL E
AMBIENTAL

A comissão examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado

**ECOLOGIA MICROBIANA DE REATORES UASB
SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO
PARA TRATAR EFLUENTE TÊXTIL**

defendida por

JOSÉ ROBERTO SANTO DE CARVALHO

Considera o candidato **APROVADO**.

Caruaru, 28 de junho de 2016

Dra. SÁVIA GAVAZZA – PPGECAM/UFPE

(orientadora)

Dr. TIAGO PALLADINO DELFORNO – PPGECAM/UFPE

(Co-orientador)

Dra. SILVANA QUEIROZ SILVA – UFOP

(examinadora externa)

Dra. SIMONE MACHADO – PPGECAM/UFPE

(examinadora interna)

*Este trabalho é dedicado à minha família e
aos meus parceiros de pesquisa, como fruto
de nosso trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por colocar pessoas excepcionais ao meu redor, que me ajudaram, ensinaram e me apoiaram nas minhas atividades. Agradeço também por ter me dado sabedoria, saúde e muitos momentos de aprendizado.

À minha família, Roberto Carvalho (Pai), Luciene Carvalho (Mãe) e Laura Carvalho (Irmã) que sempre me deu todo o suporte necessário para estudar e buscar uma profissão digna, e que me educou e ensinou a servir ao próximo.

Agradeço à minha noiva Sandrelle Lima, que com todo amor e carinho me suportou nos momentos difíceis e também sorriu comigo em todos os momentos de alegria, te amo!

Agradeço a professora Sávia Gavazza que sempre foi minha referência dentro do mundo acadêmico desde quando entrei pela primeira vez em um laboratório e até hoje me orientou e me ajudou a construir meu caráter e minha formação profissional. Foi peça fundamental neste trabalho. Não vou esquecer as inúmeras viagens feitas ao FEDEX, Banco, etc...enfim deu certo ufaaaa!

Tiago Delforno! Este trabalho definitivamente não teria se concretizado sem sua orientação. Obrigado por todo o tempo dedicado a me ensinar os conceitos básicos de bioinformática e me apresentar as inúmeras ferramentas necessárias para realizar este trabalho.

Quero fazer um agradecimento especial a professora Lourdinha Florêncio que me cedeu o notebook para terminar a dissertação em tempo, e sempre nos encanta com sua inteligência e sabedoria.

Fernanda Amaral, muitíssimo obrigado por emprestar os seus microrganismos, para serem meu objeto de estudo hahaha!

Agradeço a todos os colegas de laboratório que fizeram parte dessa jornada: Marcus, e Thorsten, obrigado por me ajudarem na Biomol; Sandra, Marcelo e Denise obrigado pelos momentos de descontração e a parceria na hora do almoço!

Agradeço a FACEPE, ao CNPQ (projeto Casadinho) e ao PRONEX pelo suporte financeiro, através de bolsa de pesquisa e financiamento de atividades.

Enfim, encerro os agradecimentos dizendo obrigado a toda equipe do LSA que me acolheu bem e me cedeu um ótimo espaço de trabalho para desenvolver essa pesquisa!

RESUMO

Neste trabalho foi realizado um estudo da ecologia microbiana com o objetivo de entender a composição e a dinâmica da comunidade microbiana formada em dois reatores do tipo UASB, correlacionando os parâmetros ambientais obtidos no monitoramento prévio com os parâmetros biológicos identificados ao longo da pesquisa. Um dos reatores foi planejado para ser operado em regime totalmente anaeróbico e o outro em condição microaerofílica. Ambos foram operados com efluente têxtil sintético durante 3 fases (Fase I – condições normais do efluente sintético; Fase II – adição de salinidade no afluente; Fase III – Adição de sulfato no afluente), ao final de cada fase foram coletadas amostras da biomassa da manta de lodo, como também uma amostra da biomassa aderida ao aerador apenas na fase III e por fim amostra do inóculo utilizado. Através das técnicas de PCR-DGGE foi possível obter uma pré-visualização da diversidade das amostras servindo como uma ferramenta para selecionar as amostras que seguiriam para sequenciamento do 16S rDNA utilizando a plataforma Illumina. As amostras coletadas foram exploradas geneticamente e analisadas por ferramentas de bioinformática (filtros de qualidade, análise de cluster, taxonomia entre outros), e por fim foram inferidas as informações fenotípicas das culturas identificadas. As amostras apresentaram índice de diversidade de microrganismos Simpson 1-D entre 0,8751 e 0,9806, onde os filos mais abundantes em todas as fases de operação foram *Proteobacteria* (13,17 – 44,21%), *Firmicutes* (7,12 - 41,94%), *Bacteroidetes* (13,05 – 26,17%) e *Chloroflexi* (2,51 – 4,77%). Os gêneros *Trichococcus*, *Syntrophus*, *Methanosaeta* foram influenciados positivamente pela adição de salinidade e sulfato com aumento significativo na abundância relativa nas fases II e III. Foram identificados gêneros aptos a catalisar a quebra do corante presente no efluente, como também foram encontrados exclusivamente na biomassa do reator micro aerado, espécies do gênero *Brevundimonas*, reportados na literatura por possuir algumas espécies aptas a realizar mineralização de alguns tipos de aminas aromáticas que são subprodutos tóxicos da degradação do corante.

Palavras-chave: reatores UASB, efluente têxtil, ecologia microbiana, PCR-DGGE, sequenciamento 16S rDNA.

ABSTRACT

In this paper is presented a study of microbial ecology with the objective to understand the composition and dynamics of microbial community formed in two UASB reactors, correlating the environmental parameters obtained in early monitoring with the biological parameters identified during the research. One of them is completely anaerobic (R1) and the other is microaerophilic (R2). The reactors were operated with synthetic textile effluent along 3 operational phases (Phase I - normal conditions of the synthetic effluent; Phase II - addition of salinity in the inffluent; Phase III – sulphate addition in the inffluent). At the end of each phase, biomass samples were collected from the sludge blanket, also, a sample of biomass attached to the aerator was collected ate the end of phase III, and finally, a sample of inoculum, used in both reactors, was collected. Through PCR -DGGE techniques was able a preview of the diversity of samples serving as a tool to select which samples went to the 16S rRNA sequencing using the Illumina platform. The samples were explored genetically and analyzed by bioinformatic tools (quality filters, cluster analysis, taxonomy among others), and finally was inferred the phenotypic information about the identified cultures. The samples showed good diversity of microorganisms (Simpson 1-d between 0.8751 and 0.9806), the most abundant phyla in all operating phases were *Proteobacteria* (13.17% to 44.21%), *Firmicutes* (7.12% to 41.94%), *Bacteroidetes* (13.05% to 26.17%) and *Chloroflexi* (2.51% to 4.77%). The genera *Trichococcus*, *Syntrophus*, *Methanosaeta* were positively influenced by the addition of salinity and sulfate with a significant increase in relative abundance in phases II and III. These genres have metabolic characteristics that complement each other indicating a possible syntrophic environment between these genera. Some genera able to catalyze the breakdown of dye were identified, as well, was identified in the sample of the biomass attached to aerator, species of genus *Brevundimonas*, reported in literature as bacterial species able to degrading some types of aromatic amines, which are toxic byproducts of azo dye degradation.

Keywords: UASB reactors, textile effluent, microbial ecology, PCR-DGGE, 16S rDNA sequencing.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 CADEIA PRODUTIVA DE UMA LAVANDERIA COMERCIAL DE <i>JEANS</i> EM CARUARU-PE. (A) PEÇAS SENDO PREPARADAS PARA LAVAGEM; (B) PEÇAS JÁ TINGIDAS; (C) ESTOQUE DE PRODUTOS UTILIZADOS NO TINGIMENTO; (D) PEÇAS PRONTAS PARA EXPEDIÇÃO. | 17 |
| FIGURA 2 ESQUEMA DE UM PROCESSO DE TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO DE LAVANDERIA COMERCIAL. | 19 |
| FIGURA 3. RELAÇÃO DO ÍNDICE Q PHRED COM A PROBABILIDADE DE ERRO NA IDENTIFICAÇÃO DE UMA BASE..... | 27 |
| FIGURA 4. ESQUEMA ILUSTRATIVO DOS REATORES R1 E R2 UTILIZADOS COMO OBJETO DE ESTUDO. | 30 |
| FIGURA 5. ESTRUTURA MOLECULAR DO CORANTE DIRECT BLACK 22. | 31 |
| FIGURA 6. SEQUÊNCIA DE ETAPAS REALIZADAS PARA ESTUDAR A DIVERSIDADE MICROBIANA NOS REATORES. | 33 |
| FIGURA 7. PROTOCOLO UTILIZADO PARA REALIZAÇÃO DA PCR NOS DOMÍNIOS BACTÉRIA E ARQUEA..... | 37 |
| FIGURA 8. SEQUÊNCIA DE PROCESSOS UTILIZADO PARA ANALISAR OS DADOS DO SEQUENCIAMENTO..... | 39 |
| FIGURA 9. ANÁLISE DE CLUSTER DGGE E NÍVEL DE SIMILARIDADE JACCARD ENTRE AS AMOSTRAS. (A) <i>BACTERIA</i> ; (B) <i>ARCHAEA</i> | 43 |
| FIGURA 10. CURVAS DE RAREFAÇÃO PARA AMOSTRAS DE R1 A NÍVEL DE GÊNERO (95%)..... | 46 |
| FIGURA 11. CURVAS DE RAREFAÇÃO PARA AMOSTRAS DE R1 A NÍVEL DE FILO (80%). | 46 |
| FIGURA 12. CURVAS DE RAREFAÇÃO PARA AMOSTRAS DE R1 A NÍVEL DE GÊNERO (95%)..... | 46 |
| FIGURA 13. DIAGRAMA DE VENN CONTENDO OS GÊNEROS COM AR MAIOR QUE 1%; (A) AMOSTRAS DA MANTA DE LODO NAS TRÊS FASES DE OPERAÇÃO DE R1; (B) AMOSTRAS DA MANTA DE LODO NAS TRÊS FASES DE OPERAÇÃO DE R2. | 48 |
| FIGURA 14. GÊNEROS COM AR ACIMA DE 1% PRESENTES NA AMOSTRA DA BIOMASSA ADERIDA AO AERADOR. | 52 |

- FIGURA 15.** ANÁLISE CCA DOS 20 GÊNEROS DE MAIOR ABUNDÂNCIA PRESENTE NOS REATORES, RELACIONADOS COM OS PARÂMETROS SALINIDADE E SULFATO..... 54
- FIGURA 16.** ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS GÊNEROS *PSEUDOMONAS*, *CLOSTRIDIUM* E *BACILLUS* NAS AMOSTRAS. (A) AMOSTRAS DA MANTA DE LODO DE R1; (B) AMOSTRAS DA MANTA DE LODO DE R2..... 60
- FIGURA 17.** POSSÍVEIS AMINAS RESULTANTES DA DESCOLORAÇÃO DO CORANTE AZO DB22.... 62

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 LISTA DE BACTÉRIAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DE AMINAS AROMÁTICAS MONOCÍCLICAS..... | 21 |
| TABELA 2 COMPOSTOS SULFURADOS E DOADORES DE ELÉTRONS NA REDUÇÃO DE SULFATO.... | 22 |
| TABELA 3 REAÇÕES DE REDUÇÃO DO SULFATO. | 23 |
| TABELA 4 COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES DE MICRO E MACRO NUTRIENTES..... | 30 |
| TABELA 5. AMOSTRAS COLETADAS PARA ANÁLISE DE BIOLOGIA MOLECULAR. | 34 |
| TABELA 6. CONCENTRAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO DAS AMOSTRAS. | 35 |
| TABELA 7. <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NA PCR. | 36 |
| TABELA 8. VOLUMES UTILIZADOS PARA PREPARAR AS SOLUÇÕES FORMADORAS DO GEL: <i>LOW</i> (BAIXA CONCENTRAÇÃO DE DESNATURANTE), <i>HIGH</i> (ALTA CONCENTRAÇÃO DE DESNATURANTE) E SOLUÇÃO PADRÃO (<i>STOCK</i>). | 37 |
| TABELA 9. INICIADORES ATRIBUÍDOS A CADA AMOSTRA DURANTE O SEQUENCIAMENTO. | 40 |
| TABELA 10. RESULTADOS DO SEQUÊNCIAMENTO (MISEQ ILUMINA)..... | 44 |
| TABELA 11. CARACTERÍSTICAS DOS GÊNEROS PRESENTE NAS AMOSTRAS, COM ABUNDANCIA RELATIVA ACIMA DE 1% E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO INDICADAS NA LITERATURA. | 49 |
| TABELA 12. 20 PRINCIPAIS GÊNEROS AGRUPADOS PELA TENDÊNCIA APRESENTADA NA ANÁLISE CCA DOS PARÂMETROS SALINIDADE E SULFATO NOS REATORES. | 55 |
| TABELA 13. ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS GÊNEROS DE BRS PRESENTES NAS AMOSTRAS. | 58 |

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

| | |
|-------------------------------|---|
| APL | Arranjo Produtivo Local |
| UASB | <i>Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo</i> |
| BAS | Biofiltro Aerado Submerso |
| R1 | Reator tipo UASB |
| R2 | Reator micro-aerofílico |
| TDH | Tempo de detenção hidráulica |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| PR | Potencial de óxido redução |
| OD | Oxigênio dissolvido |
| DQO | Demanda química de oxigênio |
| DBO | Demanda bioquímica de oxigênio |
| BRS | Bactéria redutora de sulfato |
| SO ₄ ²⁻ | Sulfato |
| S ⁰ | Enxofre elementar |
| O ₂ | Oxigênio |
| NO ₃ ⁻ | Nitrato |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| AR | Abundância relativa |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| DGGE | Eletroforese em gel de gradiente desnaturante |
| rDNA | Ácido desoxirribonucleico ribossômico |
| OTU | <i>Operational Taxonomic Unit</i> |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS | 14 |
| 1.1 Introdução | 14 |
| 1.2 Objetivos | 15 |
| 1.2.1 Objetivo geral | 15 |
| 1.2.2 Objetivos específicos | 15 |
| 2. CAPÍTULO 2 - REVISÃO DA LITERATURA..... | 16 |
| 2.1 Tratamento de Efluente Têxtil..... | 16 |
| 2.2 Tecnologias de tratamento biológico aplicadas ao setor têxtil..... | 19 |
| 2.3 Relação entre bactérias redutoras de sulfato e a descoloração de corantes azo | 22 |
| 2.4 Identificação microbiana..... | 24 |
| 2.4.1 PCR - DGGE | 25 |
| 2.4.2 Sequenciadores de próxima geração (NGS) | 26 |
| 3. CAPÍTULO 3 – METODOLOGIA | 29 |
| 3.1 Objeto de estudo | 29 |
| 3.1.1 Descrição do experimento | 29 |
| 3.1.2.Principais resultados obtidos no estudo prévio realizado por Amaral (2015). | 31 |
| 3.2 Procedimento experimental para análise de biologia molecular..... | 32 |
| 3.2.2 Extração do DNA presente nas amostras coletadas | 34 |
| 3.2.2 Análise da diversidade microbiana por PCR/DGGE | 35 |
| 3.2.3 Sequenciamento do DNA extraído | 38 |
| 3.2.4 Bioinformática..... | 39 |
| 3.2.5 Análise de Correspondência Canônica (CCA)..... | 40 |
| CAPÍTULO 4 – RESULTADO E DISCUSSÃO..... | 41 |
| 4.1 Análise da diversidade microbiana por PCR/DGGE | 41 |
| 4.2 Caracterização microbiana e biodiversidade | 44 |
| 4.2.1 Sequenciamento e taxonomia..... | 44 |
| 4.2.2 Biomassa aderida ao aerador no reator R2..... | 51 |
| 4.2.3 Influência da adição de salinidade e sulfato no ecossistema microbiano..... | 54 |
| 4.2.4 Microrganismos relacionados a degradação de corantes e seus subprodutos. | 60 |
| CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES | 63 |
| ANEXO I – Principais resultados obtidos por Amaral et al (2014) (gráficos e tabelas).. | 65 |
| ANEXO II – Procedimento de extração do DNA das amostras selecionadas..... | 67 |
| ANEXO III – Procedimento experimental para preparo das soluções utilizadas no gel de DGGE. | 68 |
| ANEXO IV – Principais comandos utilizados na reanálise dos dados recebidos pós-sequenciamento através do software QIIME..... | 69 |

REFERÊNCIAS 70

ECOLOGIA MICROBIANA DE REATORES UASB SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO PARA TRATAR EFLUENTE TÊXTIL

1. CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 Introdução

A atividade realizada pela indústria têxtil possui papel importantíssimo na economia dos países que a incentivam. Essa atividade possui características peculiares como a formação de grandes pólos industriais bem desenvolvidos como também arranjos produtivos locais (APL) de pequenas lavanderias comerciais. Tão importante quanto a economia gerada por esta atividade, está a preocupação com os rejeitos industriais que esse tipo de atividade produz.

O efluente gerado pelos processos de fabricação têxtil possui alta carga orgânica, teor elevado de sais e compostos xenobióticos, provenientes dos corantes, surfactantes e outros químicos incorporados ao efluente durante o processo de fabricação. Esses compostos não só introduzem cor ao efluente, mas principalmente atribuem toxicidade elevada para os organismos aquáticos e outras formas de vida (PINHEIRO *et al.*, 2004; SENTHIL *et al.*, 2013). A grande variedade de corantes (reativos, básicos, diretos, azo e antraquinônicos), utilizados pelo setor têxtil, torna difícil a concepção de um sistema de tratamento adequado, uma vez que uma combinação destes corantes são em geral, utilizada em uma mesma indústria ao longo do ano. Os corantes do tipo azo representam mais da metade dos corantes utilizados na indústria têxtil (KARIYAJJANAVAR *et al.*, 2010). Atualmente, a combinação de processo anaeróbio e aeróbio tem produzido bons resultados no tratamento desse tipo de efluente (FERRAZ *et al.*, 2011; AMARAL *et al.*, 2014), ou mesmo processos sob condições microaerofílicas (LADE *et al.*, 2015).

A descoloração dos corantes azo envolve processos de redução ou clivagem das duplas ligações azo (-N=N-), esses processos ocorrem em ambiente anaeróbio mediado por alguns gêneros de bactérias como *Pseudomonas spp* (SHAH *et al.*, 2013; LADE *et al.*, 2015), *Bacillus spp* (MONTIRA e BORISUT, 2012) e *Clostridium spp.* (XU *et al.*, 2010). É de extrema importância para o tratamento de efluente têxtil o estabelecimento de consórcio de microrganismos com habilidade de produzir enzimas (especialmente azo redutase) que catalisam a quebra de corantes azo, ou mesmo enzimas capazes de degradar aminas aromáticas

(glutamina amidotransferase, anilina dioxigenase, entre outras), através da mineralização ou da quebra do anel aromático (ARORA, 2015)

O avanço das tecnologias moleculares e da bioinformática garantem maior conhecimento e controle da comunidade microbiana presente em reatores e outras unidades físicas do tratamento. Com esse avanço é possível intervir na comunidade microbiana através de técnicas como a bioaugmentação (HERRERO e STUCKEY, 2014) e a bioestimulação (BAEK *et al.*, 2015). As ferramentas de sequenciamento massivo de DNA permitem a caracterização da biomassa desenvolvida nas unidades de tratamento, trazendo informações taxonômicas e fenotípicas que completam o monitoramento dos parâmetros ambientais.

Este trabalho teve como objetivo caracterizar a microbiota desenvolvida dentro de reator UASB convencional e de um reator UASB com micro-aeração, ambos utilizados para tratar efluente têxtil, utilizando as ferramentas de sequenciamento de nova geração. Além disso, também foi analisada a influência da variação nos parâmetros ambientais sobre a comunidade microbiana buscando na literatura as informações fenotípicas e a importância que cada gênero possui dentro do processo de tratamento.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Analisar a comunidade microbiana presente em dois sistemas de reatores UASB tratando efluente têxtil sintético, através de sequenciamento do rRNA 16S.

1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar e comparar a diversidade microbiana desenvolvida no reator UASB convencional e no reator UASB com micro-aeração;
- Analisar o comportamento da comunidade microbiana quando submetida ao aumento de salinidade;
- Analisar as variações da microbiota quando submetida à adição de sulfato;
- Correlacionar a identificação taxonômica com os resultados físico-químicos obtidos durante o monitoramento dos reatores UASB.

2. CAPÍTULO 2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tratamento de Efluente Têxtil

A importância da indústria têxtil na economia global é de fato bastante conhecida. Esse tipo de atividade industrial pode ser considerado um dos mais antigos (GEREFFI, 2002) e até hoje compreende parcela significativa na economia de vários países tais como Índia, Bangladesh, Vietnam, Sri Lanka, Brasil, entre outros. A peculiaridade de não necessitar de mão de obra especializada faz com que essa atividade possua um potencial na geração de empregos. Na Índia, por exemplo, o setor têxtil é responsável por 14% da produção industrial total do país e contribui com quase 30% do total das exportações, sendo o segundo maior gerador de empregos depois da agricultura (ÍNDIA, 2016).

O Brasil é considerado o quarto maior produtor mundial de artigos de vestuário e ocupa a quinta posição entre os maiores produtores de manufaturas têxteis (ABIT, 2013). O faturamento previsto em 2014, para o setor têxtil e de confecção no mundo, foi de US\$ 856 bilhões. O Brasil contribui com 0,6% deste valor (ABIT, 2014). Em Pernambuco, o Arranjo Produtivo Local de Confecções (APLC), um importante polo de fabricação de tecidos, é especializado na confecção de peças de *jeans*, com atividades distribuídas principalmente nos municípios de Caruaru, Toritama e Santa Cruz do Capibaribe. Esse APLC é responsável por aproximadamente 75% da produção do setor têxtil estadual, sendo considerado o segundo maior polo têxtil em atividade no Brasil.

No entanto, nem tudo na atividade têxtil é lucrativo e favorável ao desenvolvimento do país. Para se ter ideia dos impactos ambientais gerados no setor têxtil, cerca de 200 L de água são utilizados para produção de 1 kg de produto têxtil (GHALY *et al.*, 2014). Além do uso de grandes volumes de água para produção, a incorporação de produtos químicos em cada etapa do processo de fabricação faz com que o efluente adquira propriedades prejudiciais às formas de vida presente em ambientes aquáticos.

2.1.1 A geração de resíduos na indústria têxtil

A indústria têxtil utiliza como matéria prima diferentes tipos de fibras, como algodão, seda, lã, bem como fibras sintéticas. Todos esses materiais são pré-tratados, processados e customizados antes de ficarem prontos para o mercado de consumidores. Nas lavanderias de

jeans que formam o APL de confecções em Pernambuco, as etapas de beneficiamento das peças podem ser descritas, conforme apresentado na Figura 1.

Figura 1 Cadeia produtiva de uma lavanderia comercial de *jeans* em Caruaru-PE. (A) peças sendo preparadas para lavagem; (B) peças já tingidas; (C) estoque de produtos utilizados no tingimento; (D) peças prontas para expedição.



Fonte: Adaptado de Amaral *et al* (2014).

Desde o pré-teste, as peças começam a receber aplicação de produtos químicos. Nesta etapa, alguns corantes são aplicados e avalia-se o resultado obtido, para em seguida escolher o tipo de lavagem necessário. A desengomagem é realizada em etapa úmida objetivando a remoção de goma nas peças (colocada para evitar o atrito com as máquinas de tear), atribuindo ao efluente mais um componente a ser tratado, dessa vez com elevado teor orgânico, que, conseqüentemente, gera demanda biológica de oxigênio para degradação (amido em geral é utilizado para esse fim).

Segundo Ghaly *et al.* (2014), a produção da indústria têxtil no mundo é classificada conforme o tipo de fibra processada (fibras de celulose, a base de proteínas ou sintéticas) e por esta razão, os tipos de corantes selecionados variam (corantes reativos, corantes diretos, corantes ácidos, entre muitos outros tipos). A quantidade de corantes no mercado mundial cresce a cada ano, em 1988, cerca de 60.000 toneladas de corantes era produzida, esse número em 2014 já alcançava 178.000 toneladas (PHILLIPS, 1996).

Completando a lista dos principais compostos identificados no efluente têxtil estão os agentes oxidativos (hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, permanganato de potássio e clorito de sódio) que contribuem com o aumento de cátions K^+ e Na^+ , aumentando a salinidade e, conseqüentemente, prejudicando a atividade microbiana em eventual tratamento biológico.

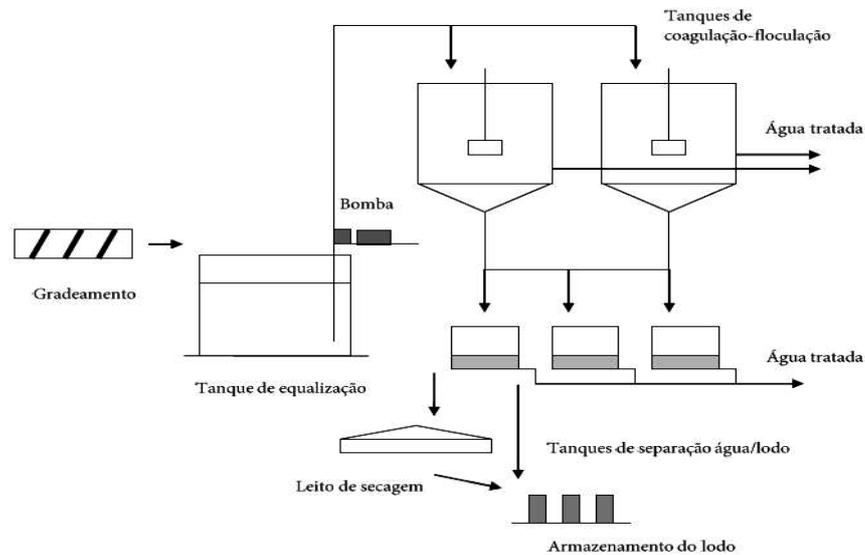
Efluentes de processamento têxtil geralmente contêm de moderada a altas concentrações de sulfato, usado como aditivo no processo de tingimento ou pode ser formado a partir da oxidação de formas mais reduzidas, utilizada de enxofre em processos de tingimento, tal como sulfeto (van der ZEE *et al.*, 2003). Os processos de oxidação e redução do sulfato possuem importância relevante na descoloração dos corantes presentes no efluente têxtil, uma vez que possuem afinidade por alguns doadores de elétrons em comum.

2.1.2 Alternativas de tratamento

O tratamento físico-químico ainda hoje é o mais utilizado nas indústrias de pequeno e grande porte. Material coloidal, carga orgânica, odor, ácidos, álcalis, metais pesados e óleos podem ser removidos com boa eficiência através do emprego do tratamento físico-químico (BRAILE e CAVALCANTI, 1993; e ABRAHÃO, 1998). O princípio básico de funcionamento desse tipo de tratamento consiste na estabilização da matéria orgânica coloidal, a partir da formação e remoção de micro-flocos, formados por coagulação entre um agente coagulador e os sólidos suspensos e parte dos dissolvidos (HALLER, 1993).

Apesar da boa eficiência na remoção de cor e matéria orgânica, o tratamento físico-químico gera grandes volumes de lodo no final do processo (Figura 2). Esse lodo, por sua vez, gera uma demanda de deposição em aterros sanitários, onde seria necessário um tratamento especial para esse rejeito pelo seu potencial de liberar produtos tóxicos que não seriam removidos em estações de tratamento de chorume convencionais, sem contar com o custo envolvido para transporte desse material. Outras desvantagens podem ser atribuídas ao tratamento físico-químico. Podem ser citados os custos elevados com a compra de produtos químicos e a incapacidade de remover alguns metabólitos recalcitrantes provenientes da quebra dos corantes (FORGACS *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2004).

Figura 2 Esquema de um processo de tratamento físico-químico de lavanderia comercial.



Fonte: Buss *et al.* (2015).

Em contrapartida ao tratamento físico-químico, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas utilizando sistemas biológicos para realizar o tratamento adequado (sem geração de grandes volumes de lodo e eficiente à remoção de poluentes) dos efluentes provenientes do setor têxtil.

2.2 Tecnologias de tratamento biológico aplicadas ao setor têxtil

O tratamento de efluentes de origem têxtil por vias de degradação biológicas podem ser consideradas as mais promissoras, uma vez que o consórcio de microrganismos presente nas unidades de tratamento possui habilidades tanto de realizar a descoloração dos corantes presentes, como de remover matéria orgânica e outros compostos recalcitrantes.

A capacidade das bactérias para metabolizar corantes azo em condições aeróbias mostra que, corantes azóicos não são prontamente metabolizados embora Kulla (1981), relatou que algumas espécies de *Pseudomonas* são aptas a degradar em meio aeróbio certos corantes azóicos. No entanto, os intermediários formados nas etapas de degradação resultou em ruptura de vias metabólicas e os corantes não foram mineralizados. Sob condições anaeróbicas muitas bactérias gratuitamente reduzem corantes azo pela atividade de redutases citoplasmáticas solúveis, conhecidos como azo-redutases. Essas enzimas são reportadas por conseguirem realizar a descoloração de corantes azo, liberando compostos aromáticos sem cor (aminas aromáticas).

É possível encontrar vários trabalhos que utilizam reatores anaeróbios para tratar efluentes têxtil, ou mesmo reatores de leito fluidizado (CIRIK *et al.*, 2013), reatores em batelada sequencial (BONAKDARPOUR *et al.*, 2011), reatores anaeróbios de fluxo ascendente com manta de lodo (ISIK e SPONZA, 2008) e reatores anaeróbios em batelada (SANTOS, 2012; AMORIM *et al.*, 2013). Essas são algumas das configurações de tratamento encontradas na literatura. Apesar das diversas configurações de tratamento biológico, nem sempre o efluente é tratado de maneira adequada em uma só unidade de tratamento ou em um só processo.

Os corantes azo são degradados geralmente em meio anaeróbio, onde as ligações azo são quebradas, e como subprodutos alguns tipos de aminas aromáticas com propriedades tóxicas são liberadas no efluente, (AFTAB *et al.*, 2011). Em ambientes aeróbios, uma gama de microrganismos é capaz de produzir enzimas específicas para realizar a mineralização dessas aminas aromáticas. Arora (2015) em seu trabalho lista algumas espécies com capacidade de realizar a degradação de aminas aromáticas (anilina, aminofenóis e cloroaminofenóis – Tabela 1), sob condições específicas. É possível observar que todos os gêneros de bactérias, listados por Arora (2015), degradam aminas aromáticas preferencialmente em meio aeróbio.

Tabela 1 Lista de bactérias envolvidas na degradação de aminas aromáticas monocíclicas.

| Bacteria | Amina aromática | Modo de ação |
|----------------------------------|---|--|
| Acinetobacter sp. YAA | Anilina | Aeróbio, degradado via formação de catecol e seus caminho de meta-clinvagem |
| Delftia tsuruhatensis AD9 | Anilina | Aeróbio, degradado via formação de catecol e seus caminho de meta-clinvagem |
| Delftia sp. XYJ6 | Anilina | Aeróbio, degradado via formação de catecol e seus caminho de meta-clinvagem |
| Delftia sp. HY99 | Anilina | Aeróbio por formação de catecol e anaeróbio por transformação em ácido 4-aminobenzoico |
| Desulfobacterium aniline | Anilina | Anaeróbio por transformação em ácido 4-aminobenzoico |
| Frateuria sp. ANA-18 | Anilina | Aeróbio, degradado via formação de catecol e seus caminho de meta-clinvagem |
| Pseudomonas sp. AW-2 | Anilina | Aeróbio, degradado via formação de catecol e seus caminho de meta-clinvagem |
| Burkholderia xenovorans LB400 | 2-aminofenol | Aeróbio, degradado por via de clinvagem direta formando 2-aminomuconic-6-semialdeído |
| Pseudomonas sp. AP-3 | 2-aminofenol | Aeróbio, degradado por via de clinvagem direta formando 2-aminomuconic-6-semialdeído |
| Pseudomonas pseudocaligenes JS45 | 2-aminofenol | Aeróbio, degradado por via de clinvagem direta formando 2-aminomuconic-6-semialdeído |
| Burkholderia sp. AK-5 | 4-aminofenol | Aeróbio, degradado via formação de 1,4-benzenodiol e 1,2,4-benzenotriol |
| Arthrobacter sp. SPG | 2-cloro-4-aminofenol | Aeróbio, degradado via clorohidroquinona e hidroquinona |
| Acinetobacter sp. ADP1 | Antranilato | Aeróbio, degradado por via de formação do catecol |
| Azoarcus evansii | Antranilato | Aeróbio por via de formação de 2-aminobenzoil-CoA e anaeróbio por via de formação do benzoil-CoA |
| Brevundimonas diminuta INMI KS-7 | 3-cloroanilina, 4-cloroanilina, e 3,4-dicloroanilina | Aeróbia, degradado por via de formação de cloropirocatecóis |
| Diaphorobacter PC039 | 4-cloroanilina | Aeróbio, degradado via 4-clorocatecol |
| Bacillus megaterium IMT21 | 2,3-dicloroanilina, 2,4-dicloroanilina, 2,5-dicloroanilina, 3,4-dicloroanilina e 3,5-dicloroanilina | Aeróbio, degradados por via dicloroaminofenol ou por via dicloroacetanilídeos |

Fonte: Adaptado de Arora (2015).

Em face das limitações observadas tanto em unidades aeróbias (baixa remoção de cor) quanto nas anaeróbias (dificuldade na mineralização de aminas aromáticas), muitos autores sugerem que uma alternativa viável para o tratamento de efluentes contendo diferentes tipos de corantes azo, é a combinação de ambos os processos (BAËTA *et al.*, 2015; O'NEILL *et al.*).

O tratamento combinado anaeróbio-aeróbio tem sido estudado e vem apresentando resultados promissores quanto à remoção de cor, DQO e aminas aromáticas (BONAKDARPOUR *et al.*, 2011; FERRAZ *et al.*, 2011; AMARAL *et al.*, 2014). O'Neill *et al.* (2011) operaram um sistema anaeróbio-aeróbio (reator UASB convencional seguido por um estágio aeróbio) tratando efluente têxtil com alta concentração de amido e o corante azo

PROCION Red H-E7B. O sistema apresentou bons resultados na remoção de matéria orgânica e cor, alcançando valores de 88% e 77%, respectivamente.

Além da escolha adequada das unidades de tratamento biológico, a preocupação em entender o consórcio de bactérias e arqueas presente em cada etapa do processo é fundamental. Semelhantemente, a dinâmica de compostos inorgânicos (reações de oxirredução do sulfato por exemplo) e os mediadores redox devem ser analisados, investigando as interferências positivas ou negativas nos processos de tratamento do efluente têxtil e as possíveis relações com o corante e seus subprodutos.

2.3 Relação entre bactérias redutoras de sulfato e a descoloração de corantes azo

Vários compostos sulfurados inorgânicos são importantes aceptores de elétrons na respiração anaeróbia. O sulfato, forma mais oxidada do enxofre, é um dos principais ânions encontrados na água do mar e em diversos sistemas de tratamento, sendo reduzido por bactérias redutoras de sulfato (BRS), grupo amplamente distribuído na natureza (MADIGAN *et al*, 2010). O produto final da redução de sulfato é o sulfeto de hidrogênio- H_2S , que por sua vez participa de inúmeros processos biogeoquímicos. Contudo, o ciclo redox do sulfato apresenta alguns estados de oxidação que variam de cargas +6 até -2 e podem receber os elétrons necessários, a partir de alguns doadores específicos (Tabela 2).

Tabela 2 Compostos sulfurados e doadores de elétrons na redução de sulfato.

| Composto | Estado de oxidação |
|---|---------------------------|
| S orgânico (R-HS) | -2 |
| Sulfeto (H_2S) | -2 |
| Enxofre elementar (S_0) | 0 |
| Tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$) | +2 |
| Dióxido de enxofre (SO_2) | +4 |
| Sulfito (SO_3^{2-}) | +4 |
| Sulfato (SO_4^{2-}) | +6 |
| Alguns doadores de elétrons utilizados na redução de sulfato | |
| H_2 | Acetato |
| Lactato | Propionato |
| Piruvato | Butirato |
| Etanol e outros álcoois | Ácidos graxos (CL) |
| Fumarato | Benzoato |
| Malato | Indol |
| Colina | Hidrocarbonetos |

Fonte: Adaptado de Madigan *et al* (2010).

Algumas rotas de redução do sulfato são bastante específicas (exceções e não regras) realizadas por microrganismos com habilidades diferenciadas como o *Desulfovibrio desmutans*, entretanto, as rotas comuns da redução são por vias assimilativas (o H₂S gerado é rapidamente convertido para forma orgânica geralmente aminoácidos) ou dissimilativa (H₂S é excretado no meio e acontece em escala muito maior que a via assimilativa). Essas rotas de redução do sulfato são executadas exclusivamente pelas BRS, e podem ser observadas dentro de unidades de tratamento anaeróbio como reatores UASB. Contudo, a presença de outros gêneros de bactérias na microbiota de reatores proporciona um ambiente competitivo por alguns substratos em comum.

Segundo Moyzer e Stams (2008), em ambiente anaeróbio, as BRS podem competir com outros organismos anaeróbios pela disponibilidade de substrato como: acetato, propionato e butirato (Tabela 3), obtendo vantagem termodinâmica em relação à metanogênese.

Tabela 3 Reações de redução do sulfato.

| Equação | ΔG^0 (kJ/reação) |
|---|-----------------------------|
| Reações de Redução de Sulfato | |
| $4 \text{ H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{HS}^- + 4 \text{ H}_2\text{O}$ | -151,9 |
| Acetato + $\text{SO}_4^{2-} \longrightarrow 2 \text{ HCO}_3^- + \text{HS}^-$ | -47,6 |
| Propionato + $0,75 \text{ SO}_4^{2-} \longrightarrow$ Acetato + $\text{HCO}_3^- + 0,75 \text{ HS}^- + 0,25 \text{ H}^+$ | -37,7 |
| Butirato + $0,5 \text{ SO}_4^{2-} \longrightarrow 2 \text{ Acetato} + 0,5 \text{ HS}^- + 0,5 \text{ H}^+$ | -80,2 |
| Reações Metanogênicas | |
| $4 \text{ H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \longrightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{ H}_2\text{O}$ | -135,6 |
| Acetato + $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$ | -31 |

Fonte: Moyzer e Stams (2008).

Como citado anteriormente, o efluente têxtil possui quantidades elevadas de corantes em sua composição (principalmente do tipo azo). Em condições anaeróbias os corantes azo atuam como aceptores de elétrons, com redução das ligações azo características (-N=N-) e produção de aminas aromáticas.

A descoloração dos corantes azo acontece de forma redutiva na presença de um substrato doador de elétrons (são necessários 4 elétrons para quebra de cada ligação azo). A primeira

forma de descoloração pode acontecer sob ação enzimática direta no corante, por cofatores enzimáticos intermediários, gerados biologicamente, ou por outros carreadores de elétrons, caracterizando a via biótica de descoloração (STOLZ, 2001). Contudo, a descoloração pode seguir por via biológica indireta, utilizando um agente reduzido, (H_2S por exemplo, gerado biologicamente na redução do sulfato) como doador de elétrons através de reação puramente química (VAN DER ZEER E LETTINGA, 2001). Nas duas vias de descoloração a quebra das ligações azo são influenciadas na presença de sulfato e sulfeto, podendo ser favorecida pela doação de elétrons proveniente de H_2S , ou ocorrer simultaneamente (sem fase *Lag*) com a redução do sulfato, competindo pelo mesmo doador de elétrons.

O balanço nas relações de $\text{SO}_4^{2+}/\text{H}_2\text{S}$, juntamente com o monitoramento do potencial de oxirredução no meio é de extrema importância para regular os processos que acontecem nos reatores. É nessa tentativa que novas pesquisas são realizadas utilizando variáveis que possam induzir as reações de oxirredução para o estágio desejado, como por exemplo, a adição de pequena parcela de oxigênio (microaeração) para limitar a formação de H_2S de forma que a redução do sulfato alcance apenas o nível de enxofre elementar S_0 (DÍAZ *et al.*, 2011; NGHIEM *et al.*, 2014).

2.4 Identificação microbiana

O processo biológico por via anaeróbia é guiado por uma rede complexa de microrganismos pertencentes aos domínios *Archaea* e *Bacteria*, que juntos realizam a completa degradação de componentes orgânicos até a forma de CH_4 e CO_2 . Para que a cadeia anaeróbia chegue aos produtos finais, são necessárias quatro etapas metabólicas principais: hidrólise, fermentação, acetogênese e metanogênese (ZINDER, 1984). Cada etapa da degradação anaeróbia requer o trabalho específico de grupos diferentes de microrganismos, cada grupo com sua respectiva função. Apesar de, em geral, apresentar alta diversidade, a composição do lodo presente em reatores anaeróbios também demonstra uma certa redundância em sua composição. Isso significa que muitos microrganismos podem desempenhar a mesma função, dependendo da flexibilidade metabólica dos microrganismos presentes no lodo anaeróbio (FERNANDEZ *et al.* 1999).

Para conhecer e entender um pouco a complexidade dessa rede de trabalho, formada pelos microrganismos, as ferramentas da biologia molecular em associação com a bioinformática e a estatística garantem boas condições para explorar esse fantástico habitat.

Segundo Cabezas *et al.* (2015), o primeiro passo para investigar uma comunidade microbiana é escolher a informação que se deseja conhecer a respeito da comunidade microbiana. Geralmente, são feitas quatro perguntas fundamentais: 1- Quais microrganismos estão presentes na comunidade microbiana? (Taxonomia); 2- Como essa comunidade se altera com o passar do tempo ou em diferentes condições operacionais? (Dinâmica); 3- Quantos microrganismos de diferentes grupos estão presentes? (Abundância relativa); 4- Qual a função específica de cada microrganismo, e qual a relação entre eles? (Informações fenotípicas). É no intuito de responder essas perguntas que as técnicas de biologia molecular vêm se desenvolvendo nos últimos anos.

2.4.1 PCR - DGGE

Para investigação da diversidade microbiana, é necessária a obtenção de um grande número de moléculas de DNA dos diferentes microrganismos presentes na amostra. Para isso, realiza-se uma amplificação da região do DNA de interesse, como por exemplo, o DNAr 16S por meio de uma reação enzimática chamada de reação da polimerase em cadeia (*Polimerase Chain Reaction* – PCR). A região do DNA a ser amplificada é determinada pelo par de primers ou iniciadores, que são pequenas sequências de nucleotídeos (oligonucleotídeos) de DNA, construídas artificialmente, complementares e específicas a duas regiões distintas no DNA microbiano de interesse.

Cada ciclo de replicação *in vitro* de DNA envolve três etapas básicas: desnaturação, anelamento e extensão. Na desnaturação (normalmente a 94 °C) ocorre a separação da dupla fita de DNA para exposição dos sítios-alvo. Na segunda etapa, com a diminuição da temperatura (por exemplo, a 55 °C), ocorre o anelamento dos primers em regiões específicas de cada fita de DNA separada que serve como molde, delimitando, assim, a região inicial e a região final da sequência genética a ser amplificada. Finalmente, na etapa de extensão, ocorre a síntese de DNA complementar à fita-molde e, geralmente, é feita sob uma temperatura em torno de 72°C. Em 25 a 40 ciclos, é possível produzir em poucas horas milhões de cópias específicas de DNA, até mesmo quando a amostra de partida contém apenas uma única sequência alvo original (WALKER e RAPLEY., 1999).

A eletroforese em gel de gradiente desnaturante ou DGGE, desenvolvida por Muyzer, Wall e Uitterlinden (1993), é uma técnica que permite a separação de fragmentos amplificados de DNA de mesmo tamanho, mas que têm diferenças na sua constituição química. Seu princípio

baseia-se na diferença de estabilidade das fitas duplas de DNA, que depende principalmente do conteúdo das bases nitrogenadas guanina (G) e citosina (C), dentro de um gradiente de desnaturação. A migração diferenciada dos produtos de PCR amplificados gera um perfil de bandas. Geralmente, cada banda separada é interpretada como sendo de um organismo presente no ambiente estudado. Por ter caráter qualitativo e semi-quantitativo, esta técnica é particularmente útil para examinar séries temporais e dinâmicas populacionais, comparando partida e evolução de sistemas de tratamento.

A técnica de DGGE tem sido intensamente utilizada, em vários estudos, para investigar a biodiversidade microbiana nos mais variados ambientes, tais como aquíferos contaminados, campos de plantio de arroz, sedimentos de lagos, reatores anaeróbios e aterros sanitários (CASAMAYOR *et al.*, 2000; CASSERLY e ERISTIAN, 2003; WATANABE *et al.*, 2004; BUZZINI *et al.*, 2006).

2.4.2 Sequenciadores de próxima geração (NGS)

O desenvolvimento dos sequenciadores de próxima geração (Next Generation Sequencing - NGS) conseguiu romper as principais barreiras, até então encontradas nas tecnologias de clonagem e sequenciamento. Os NGS conseguem trazer rapidez, baixo custo e grandes volumes de dados (CABEZAS *et al.*, 2015).

Antes do surgimento dos NGS existiam outros tipos de técnicas que utilizavam substâncias químicas para realizar a lise das moléculas de DNA em nucleotídeos específicos. A primeira delas foi criada em 1973, por Maxam e Gilbert, e logo em seguida Sanger *et al.* (1977) desenvolveram uma técnica de sequenciamento com base na utilização de ddNTP marcados radioativamente ou com fluorocromo.

Só em 2005 que as técnicas de alto rendimento e economicamente viáveis começaram a se difundir no mercado dos sequenciadores. Podem ser destacadas as plataformas de sequenciamento do tipo Ion Proton e Ion Torrent da empresa Personal Genome Machine e as plataformas Hiseq e Miseq da empresa Illumina, sendo esta a empresa que oferecemos a vantagem econômica (0,74 \$/Mb - Miseq e 0,1 \$/Mb – Hiseq) (SHOKRALLA *et al.* 2012).

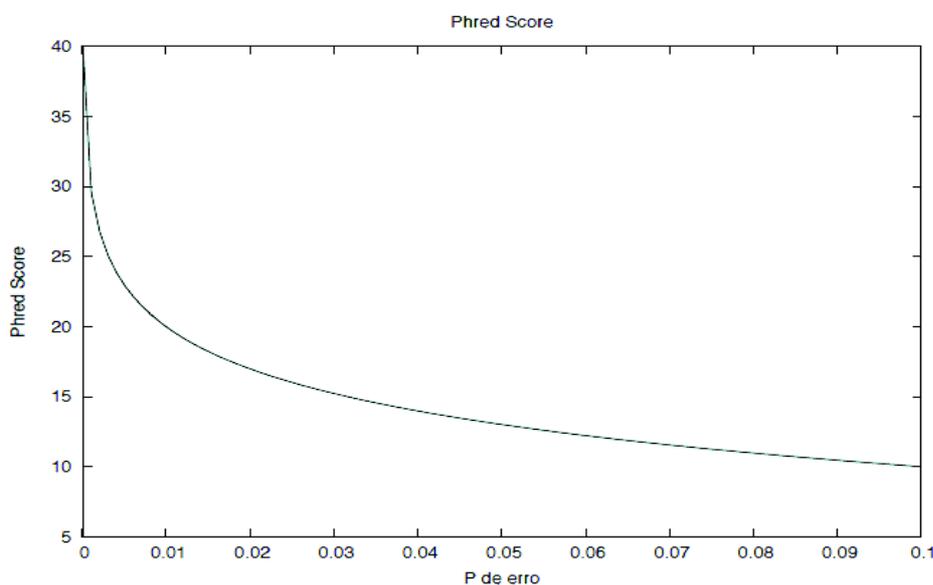
Geralmente o que diferencia uma plataforma de sequenciamento da outra são os fatores precisão, tamanho dos fragmentos (pb), rendimento por corrida e o custo. Por exemplo, a plataforma Pac-Bio SMRT consegue sequenciar fragmentos de até 1500 pb. Já a Illumina se

destaca no rendimento por corrida, obtendo 600 Gb de informação por corrida (LOMAN *et al.* 2012). A plataforma de sequenciamento adequada vai depender do tipo de resultado que se deseja obter. Por exemplo, se o desejável for a obtenção de informações apenas a nível de filo, então, não é necessário a obtenção de sequencias muito longas. Segundo Hamady e Knight (2009), para sequenciar a região 16s rRNA, fragmentos de 250pb são tão acurados quanto sequenciar inteiramente o gene.

Atualmente para analisar a qualidade de um sequenciamento utiliza-se um índice de qualidade chamado Phred ou Q Phred, que é calculado a partir da probabilidade de erro de uma base ter sido identificada de forma errada (Figura 3). Geralmente, utiliza-se como padrão de qualidade o valor de Q Phred = 20 para filtrar as sequencias obtidas.

$$Q = -10 \text{Log}_{10} P_{\text{erro}}$$

Figura 3. Relação do índice Q Phred com a probabilidade de erro na identificação de uma base.



A escolha de um Q Phred = 20 serve para limitar o sequenciamento a uma precisão de 99% da identificação de cada par de base estar correta, gerando resultados confiáveis. Os arquivos gerados no fim de um sequenciamento podem ser salvos em formatos distintos (.sff, .fasta, .qual entre outros). O arquivo no formato “.qual” é o responsável por carregar as informações de

qualidade enquanto o arquivo “.fasta” carrega as sequencias de nucleotídeos presentes em cada amostra.

Ex.: .fasta > GCTAGCTTAC

qual > 21 26 19 22 30 21 18 24 22 34

A acessibilidade às novas tecnologias de sequenciamento faz com que análises mais específicas do DNA sejam possíveis de se executar, e com isso, novas áreas na biologia molecular, como a Metaproteômica (identificação de proteínas), Metabolômica (fluxos metabólicos), Metatranscriptoma (expressão dos genes) e a Metagenômica (potencial metabólico) surgem para auxiliar as mais diversas áreas da ciência.

3. CAPÍTULO 3 – METODOLOGIA

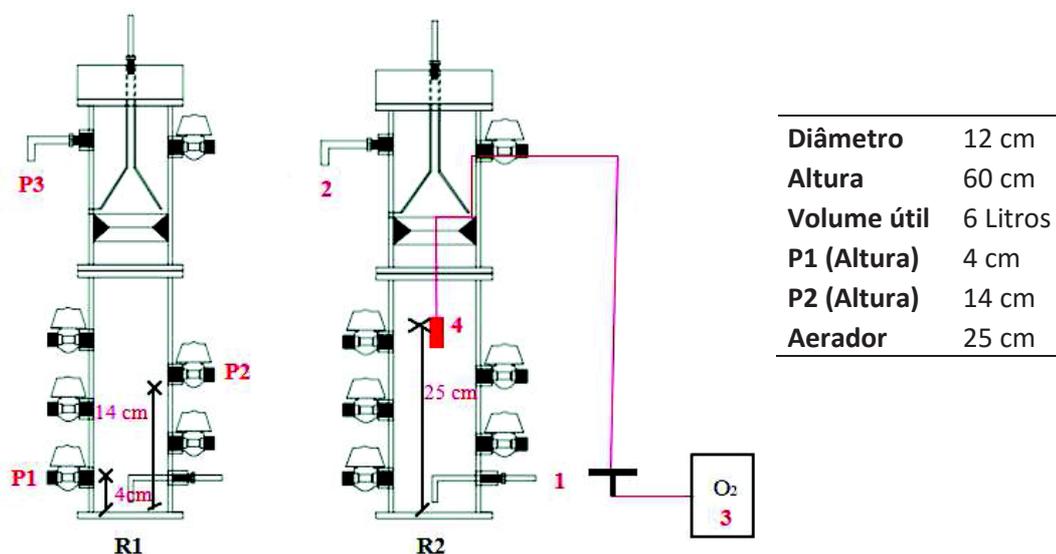
3.1 Objeto de estudo

3.1.1 Descrição do experimento

Para a realização desse estudo, dois reatores UASB foram montados em escala de bancada para tratar efluente têxtil sintético. Os reatores do tipo UASB, foram configurados como sendo um anaeróbio convencional (R1) e um anaeróbio com micro-aeração (R2). Os reatores foram operados no Laboratório de Engenharia Ambiental (LEA) do campus Agreste da UFPE (Caruaru-PE) durante um período de 290 dias conforme descrito por Amaral (2015). Os principais objetivos de se testar esse sistema foi a avaliação individualizada de interferentes como salinidade e concentração de sulfato sobre o desempenho dos reatores, além de buscar uma alternativa para promover remoção de cor e aminas aromáticas em uma única unidade de tratamento por meio da micro-aeração.

O reator R1 foi utilizado como reator controle (sem interferência de microaeração) enquanto R2 foi operado utilizando um sistema de ar difuso (bomba de aquário e válvula de controle) posicionado após a manta de lodo (25 cm a partir do fundo -Figura 4). O oxigênio dissolvido medido no efluente de R2 foi quantificado com um valor médio de $0,18 \pm 0,2$ mg de O_2/L durante todo o período operacional. A localização física do sistema por ar difuso no interior do R2, foi selecionada visando minimizar a perturbação que o oxigênio poderia causar para os microrganismos anaeróbios responsáveis pela degradação do corante azo e para favorecer a degradação de aminas aromáticas (em zona com presença de O_2), que seriam formadas a partir da descoloração, por via anaeróbia, do corante na manta de lodo.

Figura 4. Esquema ilustrativo dos reatores R1 e R2 utilizados como objeto de estudo.



Fonte: Amaral (2015).

Pontos de coleta de amostras para análises físico-químicas (P1, P2 e P3). 1- Alimentação; 2- Saída do efluente tratado; 3- Bomba de aquário; 4- Aerador.

O lodo anaeróbico utilizado como inóculo em R1 e R2 foi proveniente de um reator UASB implantado e monitorado em uma lavanderia comercial de jeans durante 373 dias tratando o efluente final gerado após o processamento das peças de jeans confeccionadas (AMARAL et al., 2014).

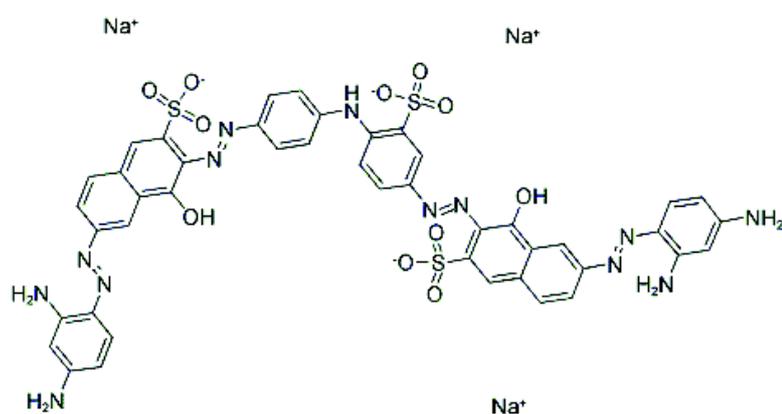
O efluente sintético foi produzido a partir de uma mistura de micro e macro nutrientes, amido (1g/L) foi utilizado como fonte de carbono e completando a composição do efluente foi adicionado corante *Direct Black 22*. O corante foi previamente hidrolisado conforme metodologia de Santos (2012) e Amorim *et al.* (2013), alcançando uma concentração de 0,06 mM no efluente preparado.

Tabela 4 Composição das soluções de micro e macro nutrientes.

| | |
|------------------------------|--|
| Macronutrientes (g/L) | NH ₄ Cl (0,280), K ₂ HPO ₄ (0,252), MgSO ₄ .7H ₂ O (0,100), CaCl ₂ (0,070), NaHCO ₃ (0,400) |
| Micronutrientes (g/L) | FeCl ₂ .4H ₂ O (2,000), ZnCl ₂ (0,050), MnCl ₂ .4H ₂ O (0,500), NiCl ₂ .6H ₂ O (0,142), NaSeO ₃ .5H ₂ O (0,164), H ₃ BO ₃ (0,050), CuCl ₂ .2H ₂ O (0,038), CoCl ₂ .6H ₂ O (2,000), AlCl ₃ .6H ₂ O (0,090), (NH ₄) ₆ .Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O (0,050), EDTA (1,000), HCl (1mL/L) |

Nesta pesquisa foi utilizado o corante azo *Direct Black 22* (DB22 - Figura 5). O DB22 ($C_{44}H_{32}N_{13}Na_3O_{11}S_3$) possui estrutura com 4 ligações do tipo azo (tetra-azo) e peso molecular de 1083,97 g/mol. Como todo corante azo, o DB22 é confeccionado para resistir a agentes oxidantes aeróbios, à degradação por luz solar e à água, não sendo facilmente degradável no meio ambiente (SAVIN, 2008).

Figura 5. Estrutura molecular do corante Direct Black 22.



Fonte: CAS 6473-13-8.

Amaral (2015) operou os reatores em 3 fases, onde, na primeira delas (FI), o sistema operou com temperatura média de $25 \pm 1,4$ °C em condições nutricionais normais do efluente sintético. Já na fase 2 (FII_{Sal}) foi adicionado 1g/L de NaCl conferindo ao efluente sintético uma salinidade pouco mais elevada (3,1) se comparada com a salinidade natural do efluente sintético (1,9). Por último, na fase 3 (FIII_{Sal+SO4}), além da adição de 1g/L de NaCl, foi incorporado ao efluente 400 mg/L de SO_4^{2-} , adicionado na forma de sulfato de sódio. Amaral *et al.* (2014), observaram que a salinidade do efluente da lavanderia comercial estudada alcançava valores entre 2,5-3,5, justificando a importância de se elevar a salinidade em FII. De mesmo modo, a adição de sulfato foi intencionada a equiparar a concentração do efluente sintético com o efluente real (Amaral *et al.*, 2014), e analisar as modificações na eficiência do reator.

3.1.2. Principais resultados obtidos no estudo prévio realizado por Amaral (2015).

As principais observações e conclusões obtidas por Amaral (2015) estão listadas a seguir:

- ✓ As eficiências de remoção de DQO em FI, FII_{Sal} e FIII_{Sal+SO₄} foram respectivamente 72±17%; 67±10% e 69±6% para R1 já para R2 foram obtidas: 78±18%; 59±10% e 70±8%.
- ✓ A micro-aeração do reator UASB (R2) não favoreceu a remoção de DQO em nenhuma das fases em relação ao reator UASB não aerado (R1). No entanto, observou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) em R2 entre FI, quando o reator foi operado com a salinidade de 1,9 ($E_{DQO} = 78\%$), e FII_{Sal}, quando a salinidade foi aumentada para 3,2 ($E_{DQO} = 59\%$). Em FIII_{Sal+SO₄}, R2 recuperou a eficiência (70%), provavelmente por adaptação da população microbiana à salinidade aplicada.
- ✓ Não se observou diferença significativa entre a remoção de cor entre os reatores UASB com e sem micro-aeração em nenhuma das fases operacionais: FI (78±10% para R1, e 80±12% para R2); FII_{Sal} (73±17% para R1, e 71±11% para R2) e FIII_{Sal+SO₄} (65±9% em R1, e 69±11% para R2).
- ✓ A micro-aeração do reator UASB promoveu um gradiente no potencial de oxirredução a partir do fundo (condições anaeróbias) para o topo (condições aeróbias) do reator, que favoreceu a degradação do corante azo através da formação (zona anaeróbia) e remoção de amins aromáticas (zona aeróbia), utilizando um único reator.

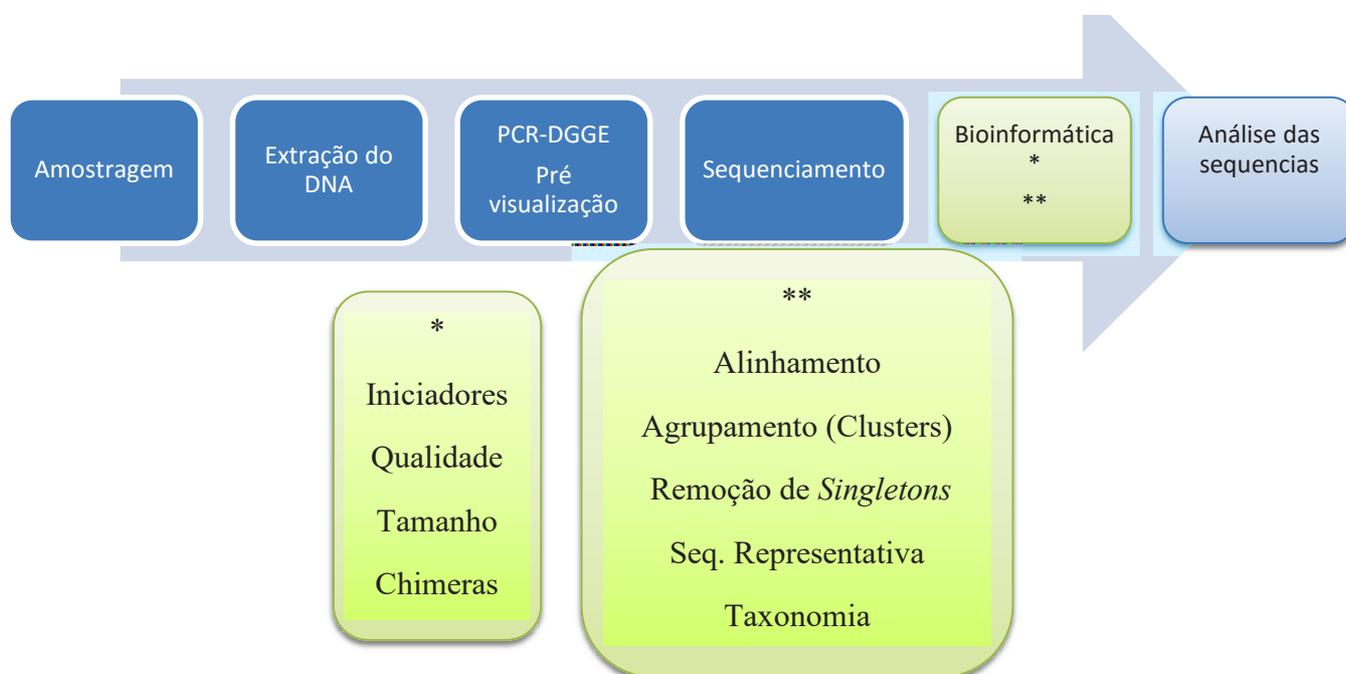
Alguns dados importantes obtidos na pesquisa de Amaral (2015) podem ser vistos no Anexo I.

3.2 Procedimento experimental para análise de biologia molecular

Quando se pretende estudar a dinâmica microbiana dentro de um sistema, seja ele reator anaeróbio ou qualquer outro tipo de tratamento biológico, alguns questionamentos devem ser esclarecidos. O tipo de informação que se quer conhecer sobre os microrganismos deve ser bem delineado, pois o método de sequenciamento é escolhido com base nessas informações (Metagenômica, Proteômica, Metabarcoding, entre outros). Neste estudo o método selecionado para realizar o estudo taxonômico da comunidade microbiana formada nos reatores foi o Metabarcoding. Esse método destaca-se por conseguir amplificar pequenos fragmentos de DNA, além de utilizar primers universais que possibilitam o sequenciamento de diferentes tipos de DNA e por fim por apresentar uma resolução taxonômica adequada para explorar a comunidade microbiana. Procedimentos como a coleta de amostras e a obtenção de parâmetros

ambientais, também precisam ser esclarecidos com cautela. Neste trabalho a sequência de etapas realizadas pode ser descrita pelo fluxograma abaixo (Figura 6):

Figura 6. Sequência de etapas realizadas para estudar a diversidade microbiana nos reatores.



A ferramenta selecionada para explorar a comunidade microbiana do sistema descrito previamente consistiu em sequenciar a região 16S do DNA dos microrganismos que estavam presentes no inóculo e no final da operação de cada uma das 3 fases operacionais. Para isso, uma série de procedimentos e análises foram realizadas com esse objetivo.

3.2.1 Coleta e preservação das amostras selecionadas

A primeira e uma das mais cautelosas etapas desse trabalho consistiu no recolhimento de amostras da biomassa responsável pelos processos biológicos dentro do reator. A importância de se ter um bom planejamento de amostragem é fundamental para as etapas subsequentes da pesquisa, uma vez que os protocolos dos métodos utilizados requerem quantidades e características físicas específicas nas amostras e devem ser seguidos com rigor, para se obter bons resultados.

Seguindo recomendações fornecidas pelo fabricante do kit de extração de DNA utilizado neste trabalho (Tópico 3.2.2), a quantidade necessária para realizar a extração do DNA com concentração de trabalho adequada (>10ng) é de no mínimo de 0,25 a 1 g de biomassa (SSV). Entretanto, o lodo de reatores geralmente é suspenso em liquor misto, contendo pequena parcela

de sólidos inorgânicos, sólidos orgânicos e água com sais dissolvidos. O volume total recolhido de cada amostra foi equivalente a 25 mL de liquor misto para garantir fração de SSV superior a 1g como exigido pelo protocolo.

No total foram coletadas oito amostras (Tabela 5), a primeira delas foi tomada do inóculo utilizado no início do monitoramento dos reatores. As demais amostras foram retiradas da manta de lodo em R1 e R2 ao final de cada fase de operação, totalizando 6 amostras referentes a biomassa da manta de lodo. Por fim no final da FIII_{Sal+SO4} foi coletada a última amostra referente à biomassa que se formou aderida ao aerador em R2.

A escolha desse planejamento amostral teve como objetivo entender alguns questionamentos levantados a respeito da dinâmica microbiana dentro dos reatores, como a influência da aeração sobre os microrganismos anaeróbios estritos, as modificações na composição taxonômica ao mudar de fase, entre outros fatores de influência.

Tabela 5. Amostras coletadas para análise de biologia molecular.

| Amostras | Descrição |
|---------------------------|--|
| I | Amostra retirada do inóculo utilizado em R1 e R2; |
| R1FI | Amostra retirada da manta de lodo de R1 no final da primeira fase; |
| R2FI | Amostra retirada da manta de lodo de R2 no final da primeira fase; |
| R1FII _{Sal} | Amostra retirada da manta de lodo de R1 no final da segunda fase; |
| R2FII _{Sal} | Amostra retirada da manta de lodo de R2 no final da segunda fase; |
| R1FIII _{Sal+SO4} | Amostra retirada da manta de lodo de R1 no final da terceira fase; |
| R2FIII _{Sal+SO4} | Amostra retirada da manta de lodo de R2 no final da terceira fase; |
| Aerador | Amostra retirada da biomassa aderida ao aerador em R2 |

Todas as amostras coletadas foram armazenadas em tubo falcon com volume de 50ml a -20°C. A extração do DNA das amostras foi realizada em prazo máximo de 48 horas após a coleta.

3.2.2 Extração do DNA presente nas amostras coletadas

Para realizar a extração do DNA foi utilizado o kit PowerSoil[®] (Mo Bio Laboratories Inc. Carlsbad, CA). Essa metodologia permite a extração do DNA ultrapuro para utilização em PCR eliminando substâncias húmicas e outros inibidores que podem prejudicar a polimerase.

O procedimento completo pode ser checado no Anexo II. Após a extração foi realizada uma leitura em espectrofotômetro (Nanodrop 2000 Espectrophotometer) das concentrações de

DNA em cada amostra (Tabela 6). Para padronizar as concentrações foi utilizada a equação (1), que normaliza as amostras tomando como parâmetro a amostra que apresentou menor concentração.

Tabela 6. Concentração do DNA extraído das amostras.

| Amostras | Concentração (ng/μL) |
|---------------------------|-----------------------------|
| I | 12,5 |
| R1FI | 11,7 |
| R2FI | 11,0 |
| R1FII _{Sal} | 13,0 |
| R2FII _{Sal} | 13,3 |
| R1FIII _{Sal+SO4} | 12,3 |
| R2FIII _{Sal+SO4} | 10,2 |
| Aerador | 14,8 |

$$(1) \quad V_f = V_i \times C_i / C_f$$

Onde:

C_i = amostra com maior concentração de DNA.

C_f = amostra com menor concentração de DNA.

V_i = 98,5 μL de água ultrapura.

V_f = volume final.

Com as concentrações normalizadas o DNA foi armazenado em microtubos com volume de 1,5 mL a -20 °C. Após esse procedimento o DNA seguiu para ser utilizado na reação em cadeia de polimerase (PCR).

3.2.2 Análise da diversidade microbiana por PCR/DGGE

Após a extração de DNA, as amostras foram submetidas à amplificação específica dos genes que codificam a região 16S do RNA ribossômico (DNAr 16S) de arqueas e bactérias. Para a amplificação, foram utilizados o par de iniciadores (primers): primer forward 968 F e o primer reverse 1392R GC Clamp (Tabela 7), indicados para a filogenia de bactérias. Para o domínio *Archaea* foram utilizados os primers 1100 F e 1400 R GC Clamp. O protocolo de amplificação adotado foi realizado nas condições descritas na Figura 9. Essas foram as condições que ofereceram melhores resultados de amplificação: 5 minutos a 94°C

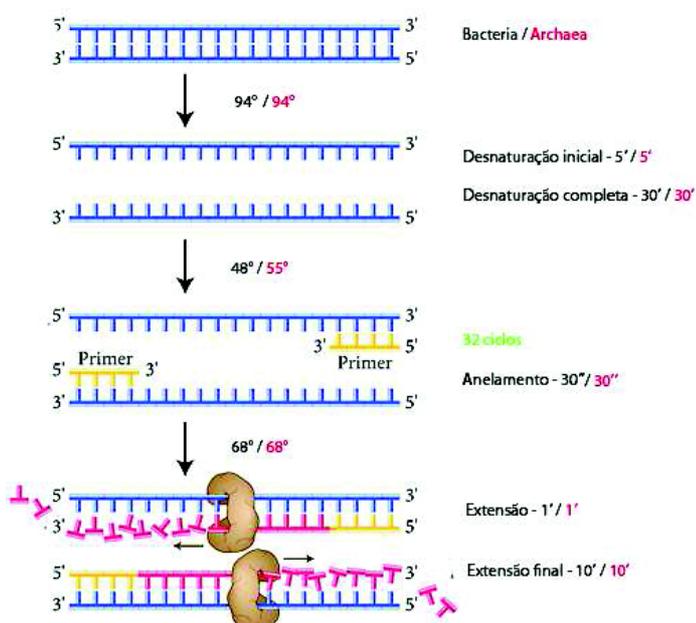
(desnaturação inicial); 30 ciclos de 1 minuto a 94° (desnaturação), 30 segundos a 56°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão); e, finalmente, 30 minutos a 72° (extensão final). A extensão final é para minimizar “rastros” no DGGE (JANSEN et al., 2004). A reação ocorreu em volumes de 50 µL, contendo 36,8 µL de H₂O ultra-pura (Milli-Q), 5,0 µL de tampão da PCR 10X (Invitrogen), 2 µL Mg²⁺ (50 mM, Invitrogen), 2 µL de cada primer (5µM, Invitrogen), 1,0 µL de dNTP (10 mM, Invitrogen), 0,2 µL de enzima Taq polimerase (5,0 u/µL, Invitrogen) e 1,0 µL de amostra de DNA extraído e purificado (diluída ou não). As reações de PCR foram desenvolvidas em termociclador MyCycler (Bio-rad Laboratories). Para a observação dos amplicons (fragmentos de DNA amplificados) e verificação do seu tamanho, foi feita eletroforese em gel de agarose (concentração de 1,0%) com marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen).

Tabela 7. *Primers* utilizados na PCR.

| Posição | Sequencia | Domínio | Fonte |
|--------------------|---|-----------------|--------------------------------|
| 968 F | 5' – AAC GCG AAG AAC CTT AC – 3' | <i>Bacteria</i> | Nielsen <i>et al.</i> , (1999) |
| 1392 R GC clamp | 5' – ACG GGC GGT GTG TAC – 3' 5' – CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GCG GGG GCA CGG GGG – 3' | | |
| 1100 F | 5' – AAC CGT CGA CAG TCA GGY AAC GAG CGAG – 3' | <i>Archaea</i> | Kudo <i>et al.</i> , (1997) |
| 1400 R GC clamp | 5' – CGG CGA ATT CGT GCA AGG AGC AGG GAC – 3' 5' – CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG – 3' | | |

Fonte: Autor

Figura 7. Protocolo utilizado para realização da PCR nos domínios bactéria e arquea.



Fonte: Adaptado de Microbiologia de Brock 12^a ed. (MADIGAN *et al.* 2010)

Os produtos gerados na PCR foram submetidos a eletroforese vertical em gel gradiente desnaturante, técnica conhecida como DGGE. A desnaturação do gel ideal para obter uma visualização das bandas adequada foi de 45% - 70% para bactéria e 40% - 60% para arqueas, esse intervalo de desnaturação foi escolhido após realizar testes na faixa de 40-80%. A composição das soluções utilizadas para formar o gel foi calculada conforme protocolo sugerido por Muyzer et al (1996). Para executar a montagem do gel e a eletroforese foram utilizadas as ferramentas do equipamento Dcode™ *Mutation System* (Bio-rad Laboratories), seguindo o manual do fabricante. Na tabela 8 estão descritos os volumes utilizados para preparo de cada solução formadora do gel desnaturante

Tabela 8. Volumes utilizados para preparar as soluções formadoras do gel: *Low* (baixa concentração de desnaturante), *High* (alta concentração de desnaturante) e solução padrão (*Stock*).

| | 0% | 45% | 70% | 40% | 60% |
|------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 0% (acrilamida) | 8 mL | 6,125 mL | 1,75 mL | 7 mL | 3,5 mL |
| 80% (acrilamida) | - | 7,875 mL | 12,25 mL | 7 mL | 10,5 |
| APS 10% | 70 μ L | 100 μ L | 100 μ L | 100 μ L | 100 μ L |
| TEMED | 7 μ L | 10 μ L | 10 μ L | 10 μ L | 10 μ L |

Fonte: autor

O procedimento experimental utilizado para preparar as soluções de acrilamida (0% e 80%) e a solução de persulfato de amônio (APS 10%) encontram-se no Anexo III.

Após polimerização do gel, os poços formados na parte superior foram lavados com a solução tampão utilizada para preencher a cuba de eletroforese (7 litros de água ultra-purificada acrescida de 140 mL de TAE 50 X) e inoculadas com 5 µL do produto da PCR homogeneizado com 1 µL de tampão de carga (*loading dye*).

A eletroforese foi conduzida a 220 Volts por 5 horas para ambos os domínios *Archaea* e *Bacteria*. Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio por 15 minutos; lavado com água Milli-Q por 5 minutos; e exposto a 254 nm UV para foto-documentação por meio do Transiluminador UV 302nm T26M (Bioagency).

Os produtos de DGGE gerados nesta etapa, foram utilizados como uma pré-visualização da dinâmica microbiana nas amostras, indicando quais amostras deveriam seguir para sequenciamento, como também serviu para analisar a diversidade das amostras de maneira semidireta.

3.2.3 Sequenciamento do DNA extraído

O método de sequenciamento adotado nessa pesquisa foi o sequenciamento através de códigos de barras genéticos mais conhecidos como *Barcoding*, através da plataforma Illumina Miseq. Essa plataforma é considerada como sendo parte dos sequenciadores de nova geração que utilizam metodologia com menor custo e mais velocidade se comparada com os sequenciadores do tipo *Sanger*.

O sequenciamento foi realizado para as 8 amostras descritas no tópico 3.2.1, pela empresa Mr. DNA (Shallowater-TX, USA). Foram enviadas alíquotas de 30µL do DNA extraído de cada amostra, armazenados em tubos eppendorf com capacidade para 200µL. O transporte foi realizado no prazo de 48 horas, com as amostras acondicionadas em gelo seco. O primer utilizado no sequenciamento foi o 515F, conhecido por apresentar universalidade nos domínios *Archaea* e *Bacteria*, permitindo em um só ensaio sequenciar DNA pertencentes a ambos os domínios. O número de leituras especificado para o sequenciamento foi de 20.000 (20K), enquanto o tamanho de cada leitura foi de 2 x 300pb, sendo contabilizadas as leituras *foward* e *reverse*.

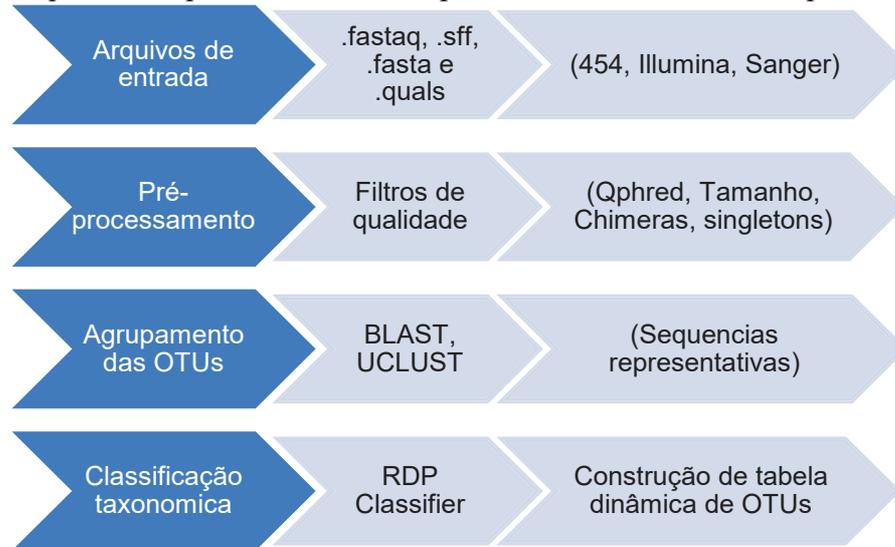
Os resultados do sequenciamento foram recebidos em arquivos no formato “.fasta” e “.qual” como também foi recebido um pacote de arquivos “.txt” referentes aos arquivos de saída, produto de cada etapa de filtragem dos dados..

3.2.4 Bioinformática

A princípio os dados do sequenciamento foram reprocessados a fim de buscar possíveis divergências no tratamento dos dados, como também para obter informações mais detalhadas (tamanho médio das sequências, quantidade de *singletons* entre outras informações).

A análise de bioinformática seguiu uma adaptação da sequência de comandos proposto por Caporaso *et al* (2010) (Figura 8) que utiliza o software QIIME para processar resultados da plataforma Illumina. O fluxograma de análises compreende as etapas de Pré-processamento (filtragem dos dados), agrupamento de OTUs e seleção da sequência representativa e por último a atribuição taxonômica e construção de uma tabela dinâmica contendo dados taxonômicos, número de sequencias e identificação da OTU. Todo conjunto de comandos (*script*) utilizado para realizar a análise completa das sequências pode ser encontrado no Anexo IV.

Figura 8. Sequência de processos utilizado para analisar os dados do sequenciamento.



O primeiro passo foi converter os arquivos contendo os dados brutos (fasta e .qual) em um arquivo único no formato .fastaq. Os softwares utilizados para realizar essa tarefa foram o FastQC (Babraham Bioinformatics) e o Phred33 *Conversion* (MR. DNA Lab).

Após a conversão do arquivo para o formato de trabalho “.fastaq” o software QIIME foi utilizado para realizar a maioria das tarefas de processamento. O pré-processamento dos dados consistiu na filtragem dos dados através das seguintes restrições: separação das amostras por iniciadores; qualidade das sequencias utilizando o índice Qphred > 25; tamanho das sequencias maior que 200 pb; remoção de chimeras detectadas. As sequencias foram separadas de acordo com os iniciadores mostrados na Tabela 9:

Tabela 9. Iniciadores atribuídos a cada amostra durante o sequenciamento.

| ID da amostra | Sequência de nucleotídeos |
|---------------------------|---------------------------|
| I | GATTGGGA |
| R1FI | GATTGTGG |
| R2FI | GATTTGCC |
| R1FII _{Sal} | GCAAAAAG |
| R2FII _{Sal} | GCAAAAAGT |
| R1FIII _{Sal+SO4} | GCAAGGCC |
| R2FIII _{Sal+SO4} | GCAAGTCA |
| Aerador | GCAATCCA |

As medidas de alfa e beta diversidade foram calculadas utilizando o software PAST3.0 (HAMMER, 2001) assim como as curvas de rarefação. Para criação dos diagramas de Venn foi utilizada a ferramenta jvenn Viewer (BARDOU *et al* 2014).

3.2.5 Análise de Correspondência Canônica (CCA)

A CCA é um tipo de análise multivariada utilizada principalmente em pesquisas ecológicas para estudar as relações espécie-ambiente. Dois conjuntos de dados são analisados simultaneamente: o primeiro contém a ocorrência de diferentes espécies e animais (matriz de abundância); e o segundo descreve as condições ambientais (matriz ambiental). A aplicação dessa técnica é uma importante ferramenta na identificação das relações espécie - ambiente, permitindo inclusive classificar espécies em termos de suas preferências quanto ao habitat (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 1994; SMITH, 1995), além de investigar questões específicas sobre a resposta de espécies às características ambientais (JOSE *et al.*, 1996).

Neste trabalho a técnica de CCA foi utilizada para investigar a influência das alterações ambientais (concentração de sulfato e teor de salinidade) sobre a comunidade microbiana presente nos reatores.

CAPÍTULO 4 – RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Análise da diversidade microbiana por PCR/DGGE

A análise das alterações ocorridas na microbiota foi inicialmente realizada através da técnica de amplificação do DNA das amostras (inóculo e manta de lodo dos dois reatores em cada uma das três fases) por PCR seguido de eletroforese em gel desnaturante (DGGE).

É possível ver nos produtos da DGGE uma boa distribuição de bandas ao longo do gel, o que indica boa diversidade microbiana nas amostras. Também é notável a presença de algumas bandas com maior intensidade, indicando de maneira semidireta OTUs com abundância relativa um pouco maior que as demais.

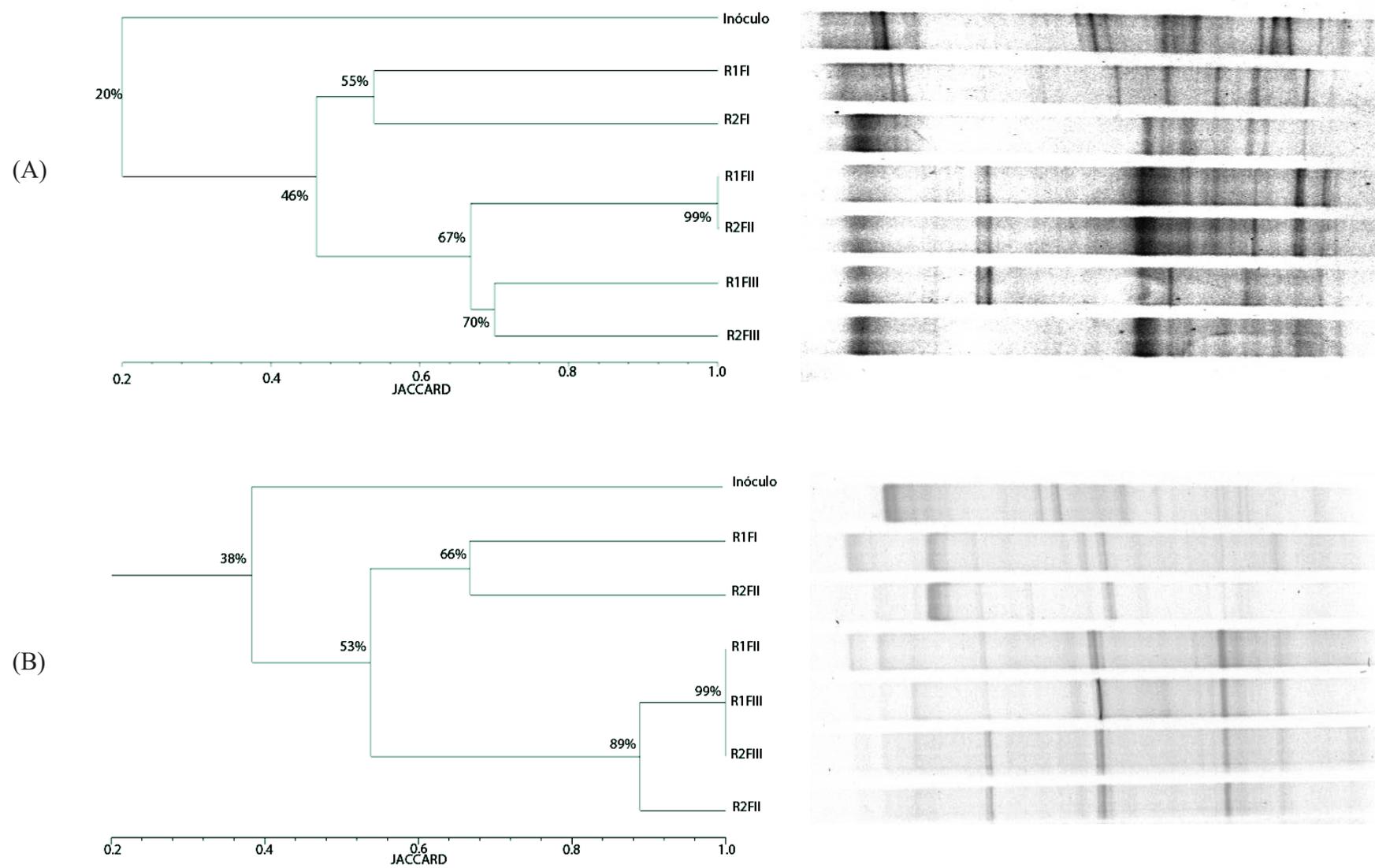
A análise de cluster (DGGE), para o domínio *Bacteria*, resultou no agrupamento das amostras apresentado na Figura 9 (A). É possível observar que em FI a análise das amostras provenientes da manta de lodo dos reatores R1 e R2 indicou perfil de bandas com 56% de similaridade entre a comunidade bacteriana presente nos reatores. Já em FII_{Sal} (adição de salinidade) a microbiota da manta de lodo passou a ter uma maior similaridade entre os dois reatores (98%). Finalmente, em FIII_{Sal+SO₄}, após adição de 400 mg/L de sulfato em ambos os reatores, a comunidade microbiana da manta de lodo se adaptou a um nível de similaridade de 70% entre os reatores. O inóculo apresentou apenas 20% de similaridade com relação às demais amostras, indicando que o ambiente dentro do reator proporcionou condições para o desenvolvimento de pequena parcela da comunidade microbiana presente no inóculo, com importante desenvolvimento de novas culturas. Apesar de ter sido utilizado um inóculo já adaptado ao tratamento de efluente têxtil, as condições aplicadas promoveram seleção microbiana a partir do inóculo, com maior diferença entre as comunidades microbianas de ambos os reatores em FI (56%), que se assemelhou mais ainda após adição de salinidade (98%) e que teve a diversidade ampliada diferentemente em FIII_{Sal+SO₄} (70%). Essa discussão será ampliada e melhor compreendida no item 4.2, quando se teve acesso composição das comunidades microbianas presentes em ambos os reatores.

Tratando-se do domínio *Archaea* foram detectadas poucas bandas presentes no gel como esperado (Figura 9-B), uma vez que a comunidade de microrganismos da biomassa não foi adaptada em reator metanogênico (onde a diversidade de arqueas metanogênicas é mais abundante), mas sim de reator com múltipla atividade metabólica (redução de sulfato, catalise

de corantes, degradação de aminas, entre outros processos), como no caso dos reatores utilizados para tratar efluente têxtil. Os reatores R1 e R2 apresentaram pela análise de cluster (Jaccard) similaridade de 66%, 89% e 99% respectivas as fases FI, FII_{Sal} e FIII_{Sal+SO4}.

A realização da análise de cluster através da técnica combinada PCR-DGGE possibilitou uma pré-visualização de como a comunidade microbiana desenvolvida nos reatores se modificou ao passar das fases. Desse modo, as amostras selecionadas foram encaminhadas para sequenciamento massivo do 16S rDNA, onde informações mais detalhadas sobre taxonomia e abundância relativa dentro da comunidade microbiana foram obtidas.

Figura 9. Análise de cluster DGGE e nível de similaridade Jaccard entre as amostras. (A) *Bacteria*; (B) *Archaea*.



4.2 Caracterização microbiana e biodiversidade

4.2.1 Sequenciamento e taxonomia

Através da leitura do DNA presente nas amostras via sequenciador Illumina (Miseq), foram obtidas um total de 800.554 sequências distribuídas numa faixa de 92.100 - 136.337 sequências para cada amostra (Tabela 10). O número total de sequências lidas foi reduzido para 764.927 após o processo de filtragem dos dados. Para filtragem das sequências foram levados em consideração à remoção de iniciadores (marcadores), qualidade das bases (índice Qphred > 25), tamanho das sequências (a partir de 200pb), e por fim, a presença de chimeras.

Tabela 10. Resultados do sequenciamento (Miseq Illumina).

| | Fase I | | Fase II | | Fase III | | Inóculo |
|---|---------|--------|---------|---------|----------|---------|---------|
| | R1 | R2 | R1 | R2 | R1 | R2 | |
| Total de sequências (dados brutos) | 96.471 | 95.090 | 120.424 | 126.380 | 92.100 | 136.337 | 133.752 |
| Total de sequências (dados filtrados) | 92.284 | 91.123 | 115.115 | 121.228 | 87.920 | 130.617 | 126.640 |
| Total de OTU's (nível de gênero) | 396 | 387 | 385 | 381 | 370 | 363 | 447 |
| Estimadores de riqueza | | | | | | | |
| Chao1 | 1856 | 1729 | 1659 | 1762 | 1902 | 1767 | 1903 |
| Índices de diversidade | | | | | | | |
| Dominância | 0,04182 | 0,0257 | 0,01941 | 0,04104 | 0,02778 | 0,1249 | 0,03266 |
| Simpson (1-D) | 0,9582 | 0,9743 | 0,9806 | 0,959 | 0,9722 | 0,8751 | 0,9673 |
| Shannon (H) | 4,517 | 4,733 | 4,902 | 4,598 | 4,755 | 3,921 | 4,566 |

O número de sequências obtido após a filtragem dos dados normalmente difere entre as amostras, como visto na tabela 10. A amostra com menor número de sequências foi proveniente de R1 em FIII_{Sal+SO4} (87.920), enquanto que o maior número de sequências foi encontrado em R2 em FIII_{Sal+SO4} (130.617). Para executar de maneira correta cálculos estatísticos e, principalmente, para calcular os índices de alfa e beta diversidade, houve a necessidade de normalizar o número de sequências em todas as amostras. Com auxílio do software Qiime o número de sequências foi normalizado para 87.920 (menor número) compatibilizando todas as amostras. Após a normalização o número de OTUs em cada amostra foi contabilizado conforme visto na Tabela 10.

Com relação aos índices de diversidade microbiana as amostras apresentaram boa diversidade de microrganismos (Simpson 1-D entre 0,8751 e 0,9806). A amostra de R2 em

FIII_{Sal+SO₄} foi a que apresentou o menor índice de diversidade (0,8751), indicando maior condição de seletividade neste reator. Quanto ao índice Dominância todas as amostras apresentaram valor próximo a zero, o que indica que não houveram OTUs com abundância relativa significativamente elevada, ou seja, não houve uma espécie dominante nas amostras. Esses resultados diferem dos obtidos por Ferraz Jr. et al. (2011), que, ao estudarem a diversidade microbiana presente em um sistema de dois reatores anaeróbio-aeróbio (UASB - BAS) tratando efluente têxtil, observaram domínio do gênero *Clostridium* (AR = 94,9%) na manta de lodo do reator UASB.

Considerando o estimador de riqueza Chao1, os maiores valores encontrados foram para a amostra do inóculo (Chao1 = 1903) e para amostra de R1 em FIII_{Sal+SO₄} (Chao1 = 1902). Contudo, as amostras em geral não apresentaram diferença significativa nos valores do estimador Chao1, indicando que em todas as fases de operação dos reatores UASB a comunidade microbiana manteve índice de riqueza entre as espécies semelhante em todas as fases de operação. Entretanto, as abundâncias relativas de cada espécie podem ter variado ao longo das mudanças de fase.

As curvas de rarefação foram as ferramentas utilizadas para estimar o quanto o sequenciamento conseguiu explorar a diversidade microbiana das amostras. Ao observar as curvas a nível de Filo (porcentagem de similaridade = 80% - Figura 10) para R1, é notável a formação de um patamar no comportamento da curva, indicando que todo patrimônio genético das amostras foi acessado. A nível de gênero (porcentagem de similaridade = 95% - Figura 11) também em R1, é possível observar um leve comportamento ascendente na curva de rarefação, indicando que nem toda diversidade das amostras foi acessada. Um pouco mais de sequências seria suficiente para resultar na formação de um patamar na curva. O mesmo comportamento foi observado para RII.

Figura 11. Curvas de rarefação para amostras de R1 a nível de filo (80%).

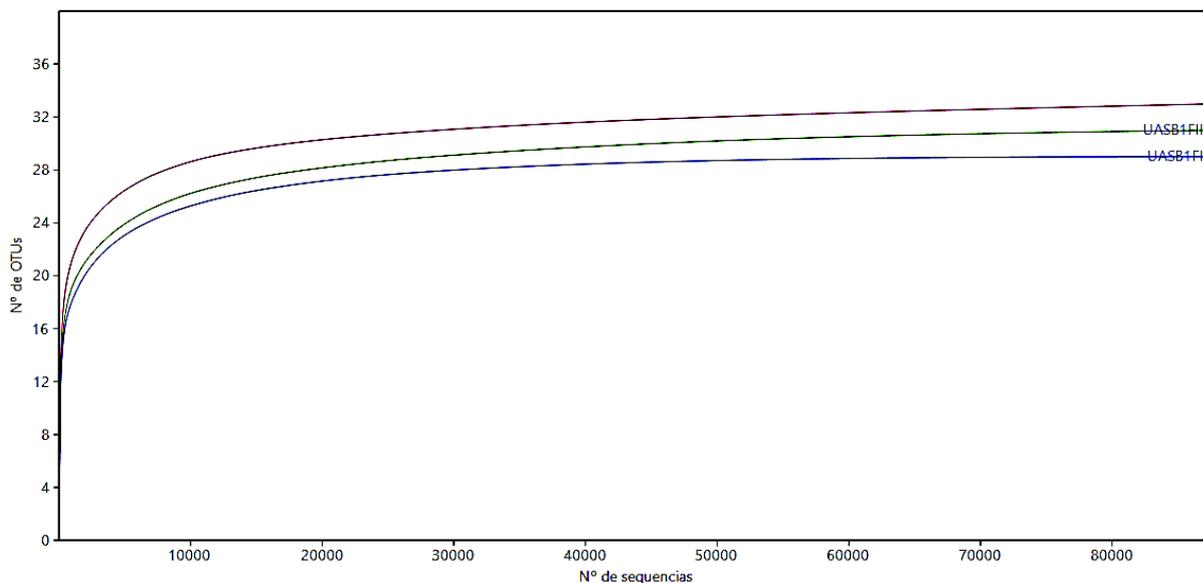
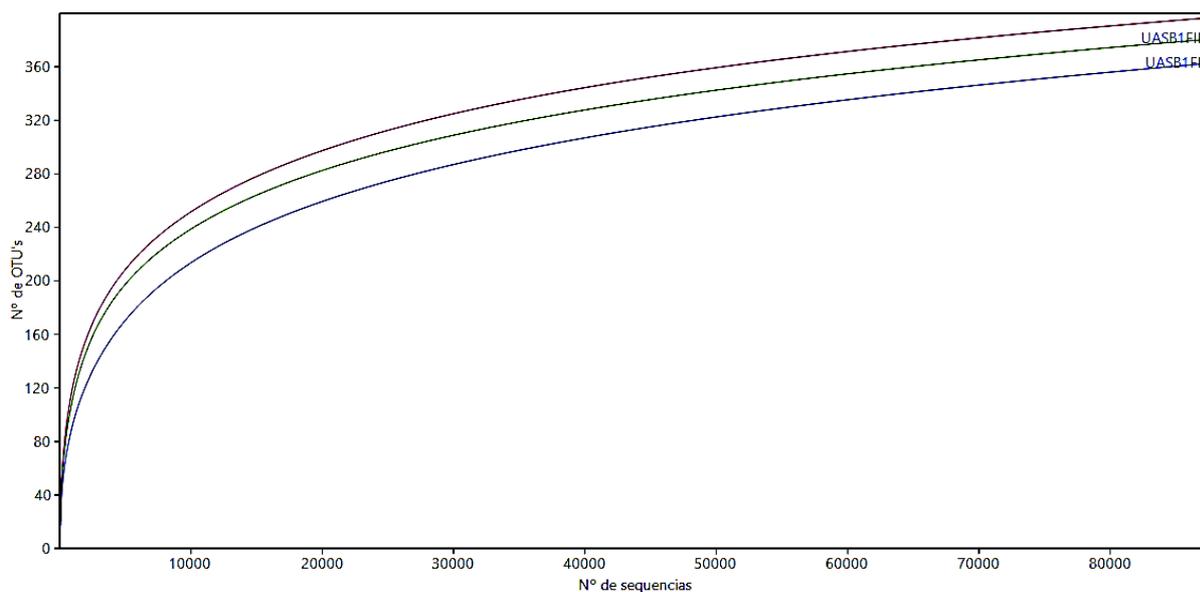


Figura 10. Curvas de rarefação para amostras de R1 a nível de gênero (95%).



A classificação taxonômica foi realizada por meio das plataformas de banco de dados RDPII e NCBI por meio do algoritmo de busca BLAST. A princípio os filos mais abundantes em todas as amostras da manta de lodo em ambos os reatores e em todas as fases de operação foram *Proteobacteria* (13,17 – 44,21%), *Firmicutes* (7,12 - 41,94%), *Bacteroidetes* (13,05 – 26,17%) e por fim, *Chloroflexi* (2,51 – 4,77%). Esses filos são comumente expressivos na ecologia microbiana de sistemas anaeróbios, geralmente com abundância relativa acima de 1%.

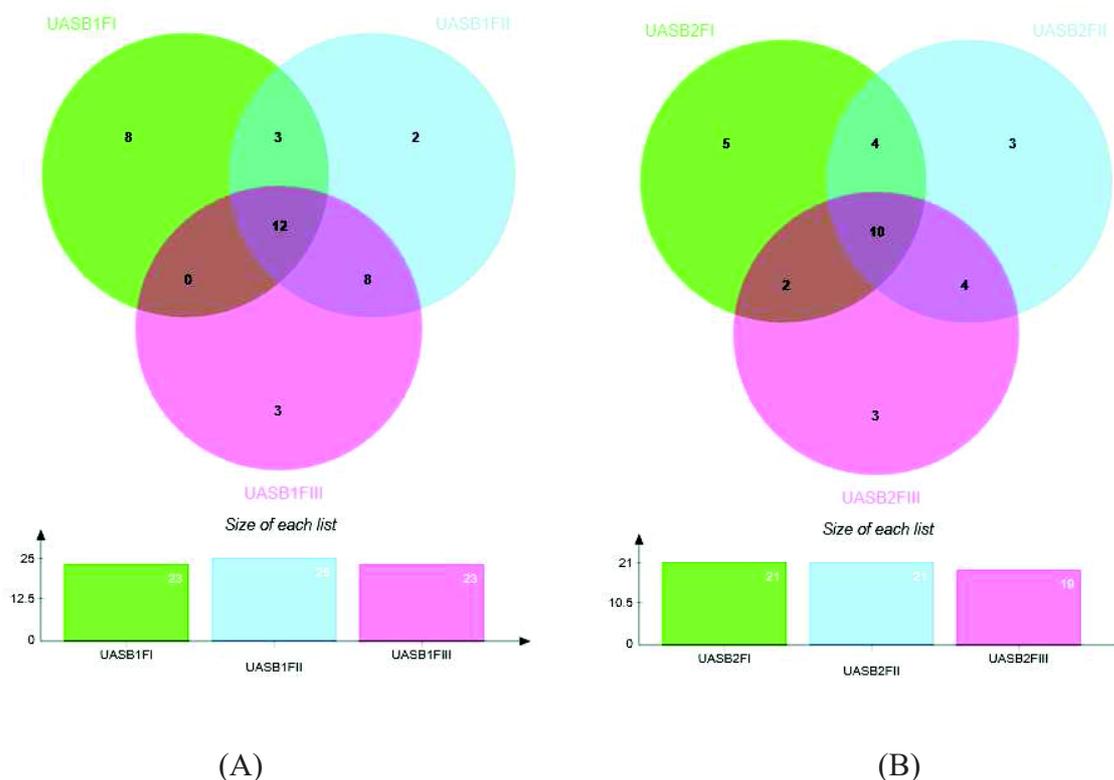
Sistemas de lodos ativados (YANG et al., 2011), reatores UASB tratando efluentes domésticos ou industriais (KÖCHLING et al. (no prelo), OKADA, 2012), e filtros percoladores utilizados para tratamento de efluente doméstico (MAC CONELL, 2014), fornecem condições nutricionais adequadas para o desenvolvimento desses filos.

Durante as três fases de operação foram identificadas nas amostras retiradas da manta de lodo de R1, a nível de gênero, 36 OTUs (com AR > 1%), conforme mostrado no diagrama de Venn (Figura 12 - A). É possível observar que 12 gêneros permaneceram com abundância relativa acima de 1% em todas as fases de operação. Esses gêneros podem ser considerados os principais participantes dos processos biológicos em R1, visto que a adaptação às mudanças de fase e a abundância relativa significativa, indica que os microrganismos pertencentes a esses gêneros encontraram ambiente favorável para seu crescimento. Contudo, os gêneros que apresentaram abundância relativa acima de 1% em somente uma das fases, podem ter sido influenciados pelas alterações ocorridas no ambiente após as transições nas fases de operação. Por exemplo, o gênero *Sulfuricurvum* que foi abundante apenas na fase I na manta de lodo de R1 (condições normais do efluente sintético), teve abundância relativa inferior a 1% nas fases II e III quando a salinidade foi aumentada para 3,1. As espécies desse gênero requerem baixa salinidade para crescimento ótimo (menor que 1% de NaCl). O gênero *Sulfuricurvum* possui informações fenotípicas na sua classificação como sendo organismos quimiolitotróficos ligados a oxidação de compostos de enxofre. Em ambientes anaeróbios este gênero utiliza sulfeto, enxofre elementar, tiosulfato e hidrogênio como doadores de elétrons e utilizam o nitrato como acceptor de elétrons, sem habilidade para usar o nitrito (KODAMA & WATANABE, 2004). A sensibilidade ao sal inibiu seu crescimento em ambiente supostamente rico em H₂S.

O reator R2 que operou com uma zona inferior anaeróbia (do fundo a 25 cm da altura do reator) e uma zona intermediária e superior microaerofílicas (25cm – 80cm) apresentou diversidade correspondente a 31 gêneros, com abundância relativa acima de 1%, durante as três fases de operação (Figura 12-B). Vale ressaltar que apenas 10 gêneros mantiveram abundância relativa acima de 1% durante todo o período operacional (ao longo das 3 fases). Entre os mais expressivos podem ser destacados os gêneros *Clostridium* (2,55 – 8,79%), *Methanobacterium* (1,79 – 3,86%), *Trichococcus* (2,45 – 34,58%) e *Bacteroides* (1,80 – 2,15%). O gênero *Trichococcus* apresentou uma elevada taxa de crescimento com a progressão das fases de operação do reator apresentando abundância relativa 2,45%, 16,00% e 34,58%,

respectivamente para as fases I, II e III. *Trichococcus* são microrganismos fermentativos, aerotolerantes, que produzem acetato e lactato em ambientes aeróbios (RAINEY, 2005), o que justifica a tolerância ao oxigênio de R2 e adaptação às condições aplicadas, com aumento da AR ao longo do tempo de operação.

Figura 13. Diagrama de Venn contendo os gêneros com AR maior que 1%; (A) amostras da manta de lodo nas três fases de operação de R1; (B) amostras da manta de lodo nas três fases de operação de R2.



Do total de micro-organismos com AR maior que 1%, foram identificados 54,76% dos gêneros como sendo de microrganismos anaeróbios estritos, 21,42% de anaeróbios facultativos, 11,90% de aeróbios e 11,90% de microrganismos que crescem em ambientes anóxicos ou são gêneros microbianos que possuem espécies tanto aeróbias quanto anaeróbias. As informações fenotípicas dos microrganismos foram investigadas na literatura e, com base nos dados obtidos, foi possível relacionar os microrganismos mais abundantes nas amostras com o conjunto de nutrientes e as condições ambientais em que se desenvolvem (Tabela 11).

Tabela 11. Características dos gêneros presente nas amostras, com abundancia relativa acima de 1% e condições de crescimento indicadas na literatura.

| Gênero | Amostras | | | | | | | | Condição | Acceptores/Doadores | | | Degradação de aromáticos | Referências |
|-------------------------------|----------|--------|--------|---------|-------|--------|---------|--------------|----------------------------------|---------------------|-----|-----|--------------------------|--------------------------------|
| | Inóculo | R1 FI | R1 FII | R1 FIII | R2 FI | R2 FII | R2 FIII | Aerador FIII | | S | N | Fe | | |
| <i>acidithiobacillus</i> | - | 5,00% | - | - | 6,35% | - | - | - | Aeróbia | + | - | - | | (Donovan e Wood, 2010) |
| <i>actinomyces</i> | 4,11% | - | - | - | - | - | - | - | Anaeróbia facultativa | - | + | - | | (An,Cai e Dong, 2006) |
| <i>allochromatium</i> | - | - | - | 4,37% | - | 1,57% | - | - | Anoxica (fotolitoautotrofica) | + | - | +/- | | (Imhoff, Suling e Petri, 1998) |
| <i>anaerophaga</i> | - | 2,77% | 1,96% | 2,73% | - | 4,63% | 1,55% | - | Anaeróbia estrita | - | - | - | | (Denger et al., 2002) |
| <i>arcobacter</i> | - | 4,77% | - | - | - | - | - | - | Anaeróbia facultativa | + | - | - | | (Brenner et al. 2005) |
| <i>azoarcus</i> | - | 1,99% | - | - | - | - | - | - | Anaeróbia facultativa | - | + | - | • | (Brenner et al. 2005) |
| <i>bacillus</i> | - | - | 3,26% | 2,68% | - | - | 1,76% | - | Anaeróbia facultativa | - | - | - | • | (Brenner et al. 2005) |
| <i>bacteroides</i> | 7,40% | - | - | 1,85% | 1,80% | 2,15% | 2,13% | 17,09% | Anaeróbia estrita | - | - | - | | (Cato, Holdeman e Moore, 1979) |
| <i>bellilinea</i> | 7,79% | - | - | - | 2,30% | - | - | - | Anaeróbia estrita | - | - | - | | (Yamada et al. 2007) |
| <i>brevundimonas</i> | - | - | - | - | - | - | - | 2,66% | Aeróbia | - | + | - | • | (Surovtseva et al.1993) |
| <i>caldisericum</i> | 1,36% | - | - | - | - | - | - | - | Anaeróbia estrita | + | - | - | | (Mori et al. 2009) |
| <i>candidatus cloacimonas</i> | - | 2,15% | 5,79% | - | - | 1,89% | - | - | Anaeróbia estrita | - | - | - | | (Pelletier et al. 2008) |
| <i>clostridium</i> | 4,62% | 2,67% | 3,47% | 2,51% | 8,79% | 3,57% | 2,55% | 14,92% | Anaeróbia facultativa | - | +/- | - | | (Brenner et al. 2005) |
| <i>cytophaga</i> | 2,42% | 2,70% | - | 2,54% | - | - | 1,50% | - | Aeróbia | - | - | - | | (Glase e Pate, 1973) |
| <i>desulfobulbus</i> | - | 2,57% | 2,99% | 4,92% | 4,07% | - | - | - | Anaeróbia estrita | + | - | - | | (Brenner et al. 2005) |
| <i>desulfotomaculum</i> | 8,00% | - | - | - | - | - | - | - | Anaeróbia estrita | + | - | - | | (Brenner et al. 2005) |
| <i>flavobacterium</i> | - | - | - | - | - | - | 2,56% | - | Aeróbia/Microaerofílica | - | +/- | - | | (Brenner et al. 2005) |
| <i>fusobacterium</i> | - | 18,62% | 4,91% | - | 5,23% | 10,16% | - | - | Anaeróbia estrita | + | - | - | | (Azrina et al. 2015) |
| <i>geobacter</i> | - | - | - | - | 1,56% | - | 1,65% | - | Anaeróbia estrita | +/- | - | + | | (Méthé et al. 2003) |
| <i>haloplasma</i> | - | 1,91% | 4,17% | 4,10% | - | 3,44% | 3,66% | - | Anaeróbia estrita | - | + | - | | (Antunes at al. 2008) |

Cont. Tabela 11. Características dos gêneros presente nas amostras, com abundância relativa acima de 1% e condições de crescimento indicadas na literatura.

| Gênero | Amostras | | | | | | | | Condição | Receptores de elétrons | | | Degradação de aromáticos | Referências |
|---------------------------|----------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|--------------|-------------------------|------------------------|---|----|--------------------------|---------------------------------|
| | Inóculo | R1 FI | R1 FII | R1 FIII | R2 FI | R2 FII | R2 FIII | Aerador FIII | | S | N | Fe | | |
| <i>halothiobacillus</i> | - | 2,49% | - | - | 5,69% | - | - | - | Aeróbia | + | - | - | | (Sievert et al. 2000) |
| <i>kosmotoga</i> | 6,07% | - | - | - | - | - | - | - | Anaeróbia estrita | +/- | - | - | | (Dippio et al. 2009) |
| <i>leptospira</i> | - | - | 1,88% | - | - | 1,59% | 1,48% | - | Anaeróbia/Aerobia | - | - | - | | (Brenner et al. 2005) |
| <i>methanobacterium</i> | 2,27% | - | 3,80% | 2,40% | 3,86% | 2,52% | 1,79% | - | Anaeróbia estrita | - | - | - | | (Shauer, Brown e Ferry, 1982) |
| <i>methanocorpusculum</i> | - | - | - | - | - | - | - | 3,56% | Anaeróbia estrita | - | - | - | | (Brenner et al. 2005) |
| <i>methanolinea</i> | 2,39% | - | - | - | - | - | - | - | Anaeróbia estrita | - | - | - | | (Brenner et al. 2005) |
| <i>methanosaeta</i> | - | - | 2,33% | 8,50% | - | - | 2,61% | - | Anaeróbia estrita | - | - | - | | (Brenner et al. 2005) |
| <i>omatilinea</i> | - | - | - | - | - | 1,56% | 2,61% | 13,47% | Anaeróbia estrita | - | - | - | | (Podosokorskaya et al. 2013) |
| <i>parabacteroides</i> | - | - | - | - | - | - | - | 11,39% | Anaeróbia estrita | - | - | - | | (Brenner et al. 2005) |
| <i>petrimonas</i> | - | - | - | - | - | - | - | 2,07% | Anaeróbia estrita | - | - | - | | (Brenner et al. 2005) |
| <i>pseudomonas</i> | - | 2,85% | 2,07% | - | 10,86% | 1,92% | - | - | Anaeróbia facultativa | - | + | - | • | (Brenner et al. 2005) |
| <i>ralstonia</i> | 9,12% | - | - | - | - | - | - | - | Aeróbia | - | + | - | • | (Brenner et al. 2005) |
| <i>ruminococcus</i> | - | - | - | - | - | - | - | 3,69% | Anaeróbia estrita | - | - | - | | (Brenner et al. 2005) |
| <i>smithella</i> | 7,06% | - | - | - | - | - | - | - | Anaeróbia estrita | - | - | - | | (Brenner et al. 2005) |
| <i>solitalea</i> | - | - | 8,31% | 5,47% | 3,67% | 9,95% | 11,36% | - | Anaeróbia facultativa | + | + | - | | (Heejung et al. 2016) |
| <i>sphingobacterium</i> | - | 2,35% | 4,54% | 3,52% | 2,66% | 4,11% | 2,50% | - | Anaeróbia/Aerobia | - | - | - | | (Brenner et al. 2005) |
| <i>spirochaeta</i> | 2,36% | - | - | - | 1,83% | 1,70% | - | 1,92% | Anaeróbias facultativas | - | - | - | | (Zhilina et al. 1996) |
| <i>sulfuricurvum</i> | - | 7,49% | - | - | 4,76% | - | - | - | Anaeróbias facultativas | + | - | - | | (Kodama & Watanabe, 2004) |
| <i>synergistes</i> | 3,38% | - | - | - | - | - | - | - | Anaeróbia estrita | - | - | - | • | (Okada, 2012; Kumar et al 2010) |
| <i>syntrophus</i> | 3,55% | - | 3,16% | 4,27% | - | - | 3,29% | - | Anaeróbia estrita | - | - | - | • | (Brenner et al. 2005) |
| <i>thiomonas</i> | - | 3,65% | - | - | - | - | - | - | Anaeróbia/Aerobia | + | - | - | | (Brenner et al. 2005) |
| <i>trichococcus</i> | - | - | 7,51% | 11,58% | 2,45% | 16,00% | 34,58% | 6,71% | Anaeróbia estrita | - | - | - | | (Van Gelder et al. 2012) |
| Total | 36,20% | 18,83% | 33,60% | 35,75% | 35,79% | 39,35% | 60,21% | 42,81% | | | | | | |

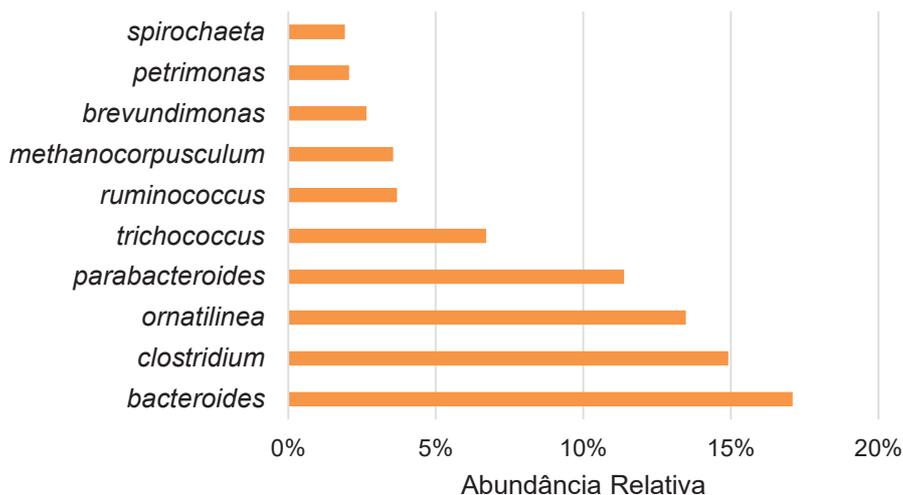
Gêneros como *Actinomyces*, *Kosmotoga*, *Methanolinea*, *Synergistes* e *Desulfotomaculum* foram encontrados com AR entre 2,39% e 8% no inóculo, e não foram abundantes nas amostras da manta de lodo dos reatores (AR<1%). Vale destacar a redução da AR do gênero *Desulfotomaculum*, conhecido por se desenvolver em condições semelhantes às de R1. O gênero *Desulfotomaculum* utiliza compostos de enxofre (sulfato, tiosulfato e sulfeto) como aceptores finais de elétrons, além de se adaptarem a ambientes de extrema salinidade (AÜLLO et al. 2013; PARSHINA et al. 2005). Essas condições estavam presentes no efluente sintético e são facilmente detectadas em efluente de lavanderia comercial, visto que a utilização de permanganato (utilizado para produzir efeito de desgaste nas peças) seguida pelo uso do metabissulfito de sódio, fornece compostos de enxofre ao efluente. No entanto, outros gêneros relacionados com o ciclo do enxofre como *Halothiobacillus* (FI em R1 e R2), *Thiomonas* (FI em R1), *Sulfuricurvum* (FI em R1 e R2) e *Fusobacterium* (FI e FII_{Sal} em R1 e R2) estiveram presentes principalmente em R1 e prevaleceram sobre o gênero *Desulfotomaculum*.

Apesar dos índices de diversidade microbiana da biomassa do aerador não apresentar muita distinção com relação as outras amostras, é notável que o número de gêneros com AR maior que 1% foi menor nessa amostra (Tabela 12). Esse fato pode ser atribuído a condição de micro-aeração do meio que potencialmente inibe alguns gêneros (mais sensíveis a presença de O₂) de se desenvolverem adequadamente.

4.2.2 Biomassa aderida ao aerador no reator R2

O número de leituras obtido no sequenciamento da biomassa aderida ao micro aerador (amostra coletada no final da operação em FIII_{Sal+SO4}) foi contabilizado em 111.032 sequências, entretanto, esse número foi normalizado para 87.920 sequências assim como ocorrido com as demais amostras, possibilitando o cálculo adequado dos índices de riqueza e diversidade, (explicado no início do tópico anterior). A comunidade microbiana apresentou um nível de diversidade (Shannon = 4,116; Simpson 1-D = 0,9518) semelhante ao encontrado nas amostras da manta de lodo e inóculo (Shannon entre 3,921 e 4,902); Simpson 1-D entre 0,8751 e 0,9806). Apesar de apresentar bom nível de diversidade alguns gêneros tiveram maior abundância relativa na biomassa do aerador do que na manta de lodo: *Bacteroides* (17,09%), *Clostridium* (14,92%) e *Ornatilinea* (13,47%) (Figura 13).

Figura 14. Gêneros com AR acima de 1% presentes na amostra da biomassa aderida ao aerador.



Os microrganismos pertencentes a esses três gêneros (*Bacteroides*, *Clostridium* e *Ornatilinea*) trazem em comum a característica de serem anaeróbios fermentativos. A dificuldade de adaptação das espécies anaeróbias estritas em ambientes com presença de oxigênio é esperada, todavia a baixa concentração de oxigênio fornecida ao reator não inibiu o desenvolvimento de bactérias deste tipo. É possível, em ambientes aerados ou micro-aerados, a ocorrência de nichos anaeróbios, principalmente em biofilmes como o formado na superfície de aeradores, onde um gradiente decrescente de OD se forma no biofilme, a partir da superfície do aerador (KATO, FIELD e LETTINGA.,1997). Outro aspecto a ser considerado é que amido era fonte de carbono utilizada no substrato. Após passar pela manta de lodo, é possível que amido remanescente ou açúcares de menor cadeia estivessem disponíveis para a biomassa que cresceu aderida na superfície do aerador. Ambas as condições (gradiente de oxigênio e disponibilidade de carbono orgânico, como amido ou açúcares) são favoráveis ao desenvolvimento desses três gêneros de anaeróbios e justificam a ocorrência na biomassa do aerador. Além disso, o biofilme do aerador é formado por uma quantidade pequena de biomassa, de forma que o número reduzido de microrganismos não oferece o mesmo grau de competição pelo substrato, se comparado com as proporções encontradas na manta de lodo.

Microrganismos pertencentes ao gênero *Bacteroides* (17,09%) são quimiorganotróficos, preferencialmente sacarolíticos, com succinato e acetato como principais produtos de metabolismo (SONG et al., 2005). O gênero *Clostridium* (14,92%) abriga microrganismos bastante versáteis metabolicamente. Rainey, Hollen and Small (2005) indicam no Manual do Berguey de Bacteriologia Sistemática que a maioria das espécies de *Clostridium* são quimiorganotróficas, mas que algumas são quimioautotróficas ou quimiolitotróficas; são

também anaeróbios estritos, embora a tolerância ao oxigênio já tenha sido detectada em várias espécies; e, por fim, produzem ácidos orgânicos a partir de açúcares ou proteínas. *Clostridium* também participa da degradação anaeróbia de compostos tóxicos e recalcitrantes (Esteve-NÚÑES, CABALLERO e RAMOS, 2001; KLEINSTEUBER *et al.*, 2008), além de ter sido detectado em reator anaeróbio tratando corante azo (XU *et al.*, 2010). Desta forma, a presença de *Clostridium* é bem justificada no biofilme do aerador.

Merece destaque o gênero *Ornatilinea* (13,47%), com 11% do gênero pertencente a espécie *Ornatilinea apprima*, que é um microrganismo que foi descrito apenas recentemente (PODOSOKORSKAYA *et al.*, 2013). Pertence ao filo *Chloroflexi*, classe *Anaerolineae*, ordem *Anaerolineales*, família *Anaerolineaceae*. De acordo com os autores, esse microrganismo anaeróbio organotrófico, foi isolado de banho de águas termais (42-45°C) profundas (2775 m de profundidade). Acetato, etanol e hidrogênio são descritos como os principais produtos de fermentação. Mais recentemente ainda, Oba, Futagami e Amachi (2014) sugeriram que microrganismo do gênero *Ornatilinea* apresentava capacidade de remover iodo de 2,4,6-iodobenzeno por via redutiva. Desta forma, é possível que *Ornatilinea apprima* tenha participado da degradação de aminas aromáticas, que foi o processo predominante na zona micro-aerada do reator.

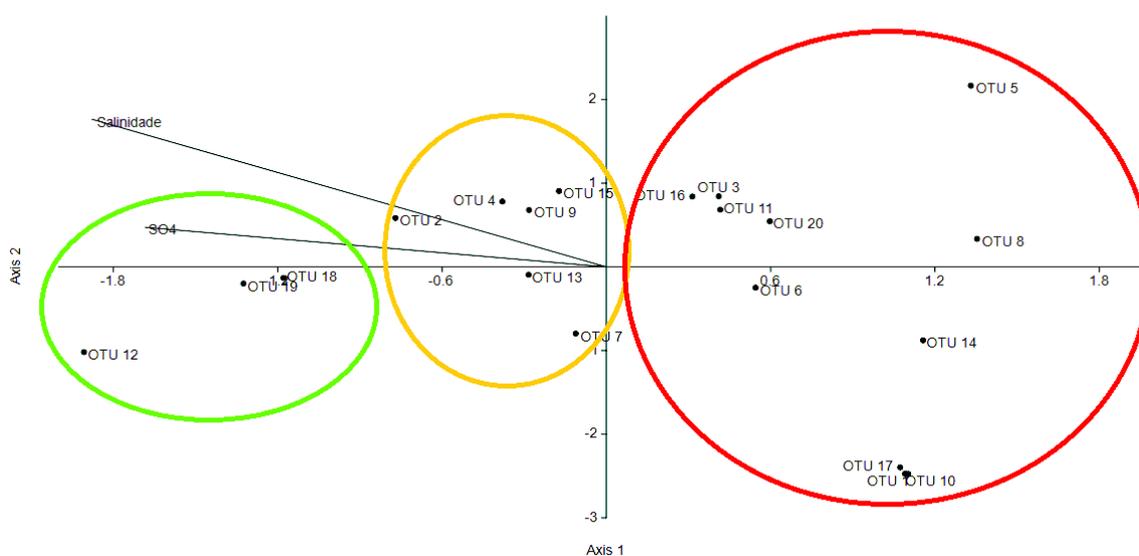
Por outro lado, alguns gêneros que não foram expressivos nas amostras analisadas da manta de lodo em ambos os reatores se desenvolveram com AR superior a 1% no biofilme do aerador. Os gêneros *Brevundimonas* (2,66%), *Petrimonas* (2,07%), *Ruminococcus* (3,69%), *Parabacteroides* (11,39%) e *Methanocorpusculum* (3,56%) podem ser citados. Exceto *Brevundimonas*, os microrganismos pertencentes aos demais gêneros se justificam por se desenvolverem em ambientes anaeróbios e fermentarem carboidratos com formação de acetato, formiato, succinato, lactato e etanol (BRENNER *et al.*, 2005).

Já gênero *Brevundimonas* é caracterizado por microrganismos aeróbios quimiorganotróficos que se desenvolvem em ambientes oligotróficos possuindo espécies capazes de realizar a redução de nitrato (BRENNER *et al.*, 2005). As informações fenotípicas desse gênero precisam ser melhor exploradas, haja visto que na literatura encontra-se pesquisas que relacionam microrganismos do gênero à degradação de alguns tipos de aminas aromáticas (SUROVTSEVA *et al.* 1986). Microrganismos com essa característica na zona de aeração do reator são fundamentais, uma vez que a degradação de aminas aromáticas foi detectada nessa região.

4.2.3 Influência da adição de salinidade e sulfato no ecossistema microbiano

A relação entre a dinâmica da comunidade microbiana em resposta às mudanças nos parâmetros físico-químicos selecionados (salinidade e sulfato) foi realizada por Análise de Correspondência Canônica (CCA). Uma matriz de abundância das espécies foi gerada para avaliar a correlação entre os 20 gêneros mais abundantes nos dois reatores, com as condições ambientais alteradas em cada período operacional (teores de salinidade e sulfato nas fases I, II e III) (Figura 14).

Figura 15. Análise CCA dos 20 gêneros de maior abundância presente nos reatores, relacionados com os parâmetros salinidade e sulfato.



Analisando os vetores dos parâmetros ambientais e agrupando as OTUs com mesmo comportamento, é possível notar 3 grupos de tendência dentro da comunidade microbiana dos reatores. O grupo 1 (grupo marcado em verde - Figura 14) compreende o grupo que apresentou maior abundância quando valores de salinidade e concentração de sulfato foram mais elevados. O grupo foi formado pelos gêneros *Trichococcus*, *Syntrophus*, *Methanosaeta*, conforme apresentado na Tabela 12.

Tabela 12. 20 principais gêneros agrupados pela tendência apresentada na análise CCA dos parâmetros salinidade e sulfato nos reatores.

| Agrupamento dos gêneros por tendência | | | | | |
|---------------------------------------|---------------------|---------|-----------------------|---------|--------------------------|
| Grupo 1 | | Grupo 2 | | Grupo 3 | |
| OTU 12 | <i>Methanosaeta</i> | OTU 2 | <i>Allochromatium</i> | OTU 1 | <i>Acidithiobacillus</i> |
| OTU 18 | <i>Syntrophus</i> | OTU 4 | <i>Bacillus</i> | OTU 3 | <i>Anaerophaga</i> |
| OTU 19 | <i>Trichococcus</i> | OTU 7 | <i>Desulfobulbus</i> | OTU 5 | <i>C. Cloacimonas</i> |
| - | - | OTU 9 | <i>Clostridium</i> | OTU 6 | <i>Haloplasma</i> |
| - | - | OTU 13 | <i>Ornatilinea</i> | OTU 8 | <i>Fusobacterium</i> |
| - | - | OTU 15 | <i>Solitalea-</i> | OTU 10 | <i>Halothiobacillus</i> |
| - | - | - | - | OTU 11 | <i>Methanobacterium</i> |
| - | - | - | - | OTU 14 | <i>Pseudomonas</i> |
| - | - | - | - | OTU 16 | <i>Sphingobacterium</i> |
| - | - | - | - | OTU 17 | <i>Sulfuricurvum</i> |
| - | - | - | - | OTU 20 | <i>Thiomonas</i> |

O gênero *Trichococcus* teve seu crescimento mais acentuado nas fases II e III, em ambos os reatores, com ocorrência bem expressiva em FIII_{Sal+SO4} (AR 11,58%, em R1 e 34,58%, em R2). A abundância de *Trichococcus* está relacionada a versatilidade metabólica desse gênero, bem como a variedade de condições ambientais em que sobrevivem. O gênero é formado por micro-organismos fermentativos, aerotolerantes, que produzem acetato e lactato em ambientes aeróbios, mas que em ambientes anaeróbios produzem acetato, lactato, formiato e etanol a partir de glicose (RAINEY, 2005). Isso justifica a tolerância ao oxigênio de R2 e adaptação às condições aplicadas em ambos os reatores, com aumento da AR ao longo do tempo de operação.

Methanosaeta é gênero de arqueias acetoclásticas bastante conhecido e bem comum em reatores anaeróbios, uma vez que esse microrganismo utiliza acetato (CH₃COOH) como fonte de carbono e energia para produzir metano (CH₄) (WHITMAN, BOWEN e BOONE, 2006; MADIGAN *et al*, 2010).

Já os microrganismos do gênero *Syntrophus* aparentam ter desempenhado um papel de mediação, viabilizando o desenvolvimento de outros microrganismos. Trata-se de microrganismos anaeróbios estritos, quimiorganotróficos, com metabolismo fermentativo. Todas as espécies fermentam crotonato, enquanto algumas espécies fermentam compostos aromáticos. Substratos como benzoato ou ácidos graxos são oxidados na presença de H₂, em associação com a ação de arqueias metanogênicas utilizadoras de formiato ou de bactérias redutoras de sulfato. Um fato interessante é que a oxidação de substrato por *Syntrophus* é incompleta até acetato. Desta forma, esse gênero pode desempenhar um papel de mediador, que pode ter sido tanto de degradação de compostos aromáticos do corante, quanto de ácidos graxos intermediários provenientes do amido, levando ambos a acetato, utilizando metabólitos de

espécies do gênero *Trichococcus* como substrato, atuando de forma colaborativa com arqueias methanosetas (que utilizam acetato) ou BRS. A AR do gênero *Syntrophus* foi maior em FIII_{Sal+SO₄}, quando sulfato foi adicionado ao substrato de ambos os reatores.

Li *et al.* (1995) operaram reator UASB alimentado com benzoato e obtiveram acetato como único subproduto de degradação, com domínio de *Syntrophus buswellii*. De forma semelhante, Fang *et al.* (2004) tratando água residuária contendo fenol identificaram a participação de microrganismos do gênero *Desulfotomaculum* e *Clostridium* como degradadores de fenol a benzoato, enquanto *Syntrophus* foram responsáveis por converter benzoato a acetato. É possível que simbiose semelhante tenha se estabelecido no presente trabalho, uma vez que compostos aromáticos são intermediários da degradação anaeróbica do corante azo DB22 e acetato foi o principal ácido detectado em ambos os reatores, tendo o gênero *Clostridium* estado presente em todas as fases operacionais com AR superior a 1%.

Os microrganismos do segundo grupo (grupo 2 – Tabela 12) sofreram pouca influência da matriz ambiental (salinidade e sulfato). Os maiores valores de AR estiveram relacionados com valores medianos de salinidade e sulfato (Figura 16). Esses microrganismos aparentam ter desempenhado papéis específicos individualmente, sem relação com as alterações das fases operacionais. Tratam-se de microrganismos fermentativos na sua maioria, como os do gênero *Bacteroides*, *Clostridium* e *Ornatilinea*, que estiveram presentes independente dos fatores ambientais, embora o gênero *Ornatilinea* tenha sido detectado apenas no reator com aeração (R2).

A terceira tendência que pode ser observada na análise CCA corresponde ao grupo 3 (Tabela 12) que contém gêneros que apresentaram AR maior que 1% apenas na fase I, quando os teores de salinidade e sulfato foram mais baixos. Merecem destaque os gêneros *Acidithiobacillus*, *Pseudomonas* e *Thiomonas* que estiveram presentes em FI em ambos os reatores, entretanto nas fases seguintes apresentaram valor de AR próximo de zero. Microrganismos do gênero *Acidithiobacillus* são quimiolitotróficos, usam compostos reduzidos de enxofre como fonte de energia em metabolismo autotrófico, embora preferencialmente utilizem complexos de metal-sulfeto. Esse gênero esteve presente com AR superior a 1% apenas em FI, em ambos os reatores. O lodo utilizado como inóculo em ambos os reatores foi proveniente de reator UASB piloto, utilizado para tratamento de efluente têxtil real (AMARAL *et al.*, 2014). Os autores identificaram a presença de material precipitado no reator, que foi caracterizado como sendo composto de 98% de enxofre e traços de metais,

principalmente ferro, que foi significativamente removido da fase líquida (98%). Desta forma, a abundância de *Acidithiobacillus* em FI do presente trabalho pode estar relacionada à utilização desse precipitado contido no lodo, devendo ter sido eliminado em FII_{Sal} e FIII_{Sal+SO₄}, por ausência de substrato para assegurar seu desenvolvimento. O gênero *Thiomonas* é composto em geral por bactérias aeróbias quimiolitotróficas, apresentando crescimento ótimo em ambientes mixotróficos suplementados com compostos reduzidos de enxofre e fonte orgânica, geralmente aminoácidos e açúcares (MOREIRA e AMILS, 1997). A concentração de sulfeto durante a operação dos reatores manteve-se na faixa de valores entre 12-36 mg/L, podendo ser considerada uma baixa concentração em comparação com os valores de sulfato. A competição pela fonte de carbono entre gêneros redundantes (os que utilizam o mesmo substrato) pode ter prejudicado o desenvolvimento desse gênero com o passar do tempo, uma vez que espécies anaeróbias tem melhor adaptação nesse tipo de reator. De forma semelhante o gênero *Pseudomonas* também apresentou baixa AR em FIII_{Sal+SO₄}, uma vez que correspondem a bactérias aeróbias que utilizam O₂ como aceptor final de elétrons, entretanto podem sobreviver em ambientes anaeróbios utilizando o nitrato como aceptor de elétrons.

O ciclo de oxirredução do enxofre em ambiente anaeróbio é de extrema importância no tratamento biológico de efluentes de origem têxtil, visto que o corante presente no efluente pode atuar como aceptor de elétrons de forma semelhante ao sulfato, recebendo elétrons provenientes da oxidação de substratos orgânicos tornando um ambiente competitivo pelo mesmo doador de elétrons (redução biológica). Por outro lado, o corante pode também ser reduzido por via química recebendo elétrons provenientes do íon HS⁻, produto da redução de sulfato (mediado por BRS) (ALFONS e PLUGGE, 2009). Essa relação entre as concentrações de corante, sulfato, sulfeto e carga orgânica (DQO) tem sido discutida em muitos trabalhos devido a sua complexidade (ALFONS e PLUGGE, 2009; ZHAO, 2008).

Somando todos os gêneros de BRS que fazem redução de sulfato é contabilizado abundância relativa na faixa de 3,78% a 8,91% na manta de lodo dos reatores (Tabela 13). Chama atenção (Tabela 13) o fato das BRS não terem aumentado AR em R2 em FIII_{Sal+SO₄}. No entanto, é possível notar em R1 um aumento na comunidade de BRS com o aumento na concentração de sulfato (FIII_{Sal+SO₄}). Os principais gêneros de BRS identificados na comunidade microbiana dos reatores foram *Desulfobulbus*, *Desulfomicrobium*, *Desulfotomaculum* e *Desulfovibrio*.

Tabela 13. Abundância relativa dos gêneros de BRS presentes nas amostras.

| Gênero | Inóculo | R1FI | R2FI | R1FII | R2FII | R1FIII | R2FIII | Aerador |
|--------------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <i>Desulfobacca</i> | 0,136% | 0,023% | 0,011% | 0,015% | 0,032% | 0,019% | 0,009% | 0,007% |
| <i>Desulfobacter</i> | 0,373% | 0,323% | 0,049% | 0,213% | 0,122% | 0,142% | 0,084% | 0,026% |
| <i>Desulfobacterium</i> | 0,030% | 0,005% | 0,008% | 0,009% | 0,018% | 0,016% | 0,016% | 0,003% |
| <i>Desulfobulbus</i> | 0,334% | 2,571% | 4,072% | 2,992% | 0,695% | 4,924% | 0,420% | 0,071% |
| <i>Desulfocaldus</i> | 0,002% | 0,000% | 0,000% | 0,000% | 0,000% | 0,000% | 0,000% | 0,000% |
| <i>Desulfocapsa</i> | 0,005% | 0,007% | 0,003% | 0,007% | 0,005% | 0,006% | 0,005% | 0,002% |
| <i>Desulfocarbo</i> | 0,001% | 0,002% | 0,000% | 0,000% | 0,000% | 0,001% | 0,001% | 0,000% |
| <i>Desulfococcus</i> | 0,011% | 0,005% | 0,008% | 0,018% | 0,009% | 0,165% | 0,005% | 0,002% |
| <i>Desulfocurvus</i> | 0,001% | 0,001% | 0,001% | 0,009% | 0,009% | 0,002% | 0,002% | 0,000% |
| <i>Desulfofaba</i> | 0,284% | 0,060% | 0,060% | 0,395% | 0,124% | 0,317% | 0,693% | 0,027% |
| <i>Desulfoglaeba</i> | 0,026% | 0,002% | 0,000% | 0,007% | 0,001% | 0,001% | 0,003% | 0,001% |
| <i>Desulfomicrobium</i> | 1,174% | 0,205% | 0,547% | 0,914% | 0,768% | 1,480% | 0,884% | 0,049% |
| <i>Desulfomonile</i> | 0,756% | 0,035% | 0,050% | 0,034% | 0,026% | 0,059% | 0,041% | 0,016% |
| <i>Desulfonatronum</i> | 0,016% | 0,040% | 0,045% | 0,025% | 0,071% | 0,019% | 0,030% | 0,002% |
| <i>Desulfonema</i> | 0,018% | 0,020% | 0,028% | 0,020% | 0,063% | 0,008% | 0,014% | 0,006% |
| <i>Desulforegula</i> | 0,019% | 0,065% | 0,081% | 0,041% | 0,045% | 0,182% | 0,016% | 0,010% |
| <i>Desulforhabdus</i> | 0,218% | 0,019% | 0,013% | 0,023% | 0,023% | 0,020% | 0,044% | 0,015% |
| <i>Desulfosarcina</i> | 0,005% | 0,011% | 0,002% | 0,010% | 0,005% | 0,015% | 0,007% | 0,000% |
| <i>Desulfosporosinus</i> | 0,002% | 0,009% | 0,002% | 0,001% | 0,003% | 0,001% | 0,003% | 0,010% |
| <i>Desulfotalea</i> | 0,002% | 0,005% | 0,003% | 0,011% | 0,014% | 0,017% | 0,008% | 0,002% |
| <i>Desulfotomaculum</i> | 8,003% | 0,091% | 0,157% | 0,312% | 0,251% | 0,280% | 0,353% | 0,171% |
| <i>Desulfovibrio</i> | 0,798% | 0,516% | 0,458% | 1,192% | 1,125% | 1,181% | 1,084% | 0,521% |
| <i>Desulfurococcus</i> | 0,047% | 0,035% | 0,019% | 0,045% | 0,018% | 0,017% | 0,016% | 0,002% |
| <i>Desulfuromonas</i> | 0,058% | 0,008% | 0,009% | 0,034% | 0,023% | 0,032% | 0,033% | 0,007% |
| <i>Desulfuromusa</i> | 0,005% | 0,009% | 0,008% | 0,006% | 0,010% | 0,007% | 0,008% | 0,001% |
| AR total | 12,33% | 4,07% | 5,64% | 6,33% | 3,46% | 8,91% | 3,78% | 0,95% |

Analisando os resultados apresentados na Tabela 13 percebe-se que o gênero *Desulfotomaculum*, com 8% de AR no inóculo, foi sendo selecionado do meio em ambos os reatores, apresentando AR menor que 1% em todas as fases operacionais, embora com tendência de crescimento ao longo do tempo de operação. Este gênero de microrganismo é formado por microrganismos anaeróbios estritos, que utilizam compostos orgânicos simples como doadores de elétrons e apresentam habilidade para reduzir sulfato, sulfito ou tiosulfato, que são convertidos a H₂S. O composto orgânico pode ser tanto oxidado completamente a CO₂, ou convertido em acetato. A quantidade de sequencias também cai drasticamente do inóculo (7037 seq.) para a FI de ambos os reatores (cerca de 80 seq. em R1 e 138 seq. em R2). Esse fato merece destaque, uma vez que o inóculo foi proveniente de reator que estava em operação na indústria têxtil, alimentado com efluente com características semelhantes às aplicada neste trabalho (teores de corantes, DQO e salinidade). A exceção se dá em relação ao teor de sulfato, que era muito superior na indústria (cerca de 400 mg SO₄²⁻/L) em comparação ao aplicado em

FI (cerca de 20 mg SO₄²⁻/L). Desta forma, o teor de sulfato parece ter sido o agente causador da redução do gênero *Desulfotomaculum* do inóculo para FI dos reatores.

Merece destaque também os microrganismos do gênero *Desulfovibrio*, que possuem metabolismo de desenvolvimento bastante similar aos do gênero *Desulfotomaculum*. O gênero *Desulfovibrio* apresentou AR crescente a partir de FI, estabilizando com AR em torno de 1% em FII_{Sal} e FIII_{Sal+SO4} em ambos reatores. Isto indica que as alterações feitas nos fatores ambientais entre os reatores e entre as fases de operação não prejudicaram o desenvolvimento desse gênero, diferentemente do ocorrido com *Desulfotomaculum*. O fato de algumas espécies pertencentes ao gênero *Desulfovibrio* apresentar características halofílicas deve ter contribuído para a manutenção desses microrganismos nos reatores, uma vez que são pouco afetados pela salinidade.

Comportamento distinto foi notado para microrganismos do gênero *Desulfobulbus*. Em R1 é evidente o aumento na AR desse gênero durante FIIISAL+SO₄, quando a concentração de sulfato foi aumentada nos reatores (FI = 2,57%; FII_{Sal} = 2,99% e FIII_{Sal+SO4} = 4,92%). Contudo, em R2 a abundância relativa do gênero *Desulfobulbus* foi significativa apenas em FI (4,07%) e foi extremamente reduzida em FII_{Sal} (0,69%) e FIII_{Sal+SO4} (0,42%). Essa distinção no comportamento dos microrganismos do gênero *Desulfobulbus* entre R1 e R2 não pode ser explicada pela alteração de fatores ambientais no meio, pois a única divergência nos sistemas foi a presença de oxigênio em R2. Caso o O₂ fosse agente limitante no desenvolvimento desse gênero, a AR não teria aumentado a partir do inóculo na primeira fase de operação em R2. Desta forma, nos parece que a redução da AR de *Desulfobulbus* em FII_{Sal} e FIII_{Sal+SO4} no reator R2 esteja mais relacionada à competição pelo substrato do que às condições ambientais em si. Paralelamente à redução na AR de *Desulfobulbus* se observou crescimento acelerado dos gêneros *Solitalea* e *Trichococcus* em R2, atingindo AR de 11% e 34% respectivamente em FIIISAL+SO₄. Chama atenção o fato de os 11% de AR do gênero *Solitalea* corresponder a apenas uma espécie, *Solitalea canadensis*. Essa espécie apesar de ser proposta pela primeira vez em 1945 foi classificada como gênero *Solitalea* apenas recentemente e ainda não possuem muitas informações na literatura que descreva detalhes sobre o metabolismo, condições de crescimento, etc. As informações disponíveis (banco genômico Uniprot – www.uniprot.org/uniprot/H8KUG5) indicam que trata-se de BRS que sintetiza as proteínas sulfato adenylyltransferase e thioredoxina-dependente phosphoadenylyl-sulfato redutase, que catalisam a redução de sulfato a sulfito ou H₂S. Heejung *et al.* 2016 detectaram que o processo

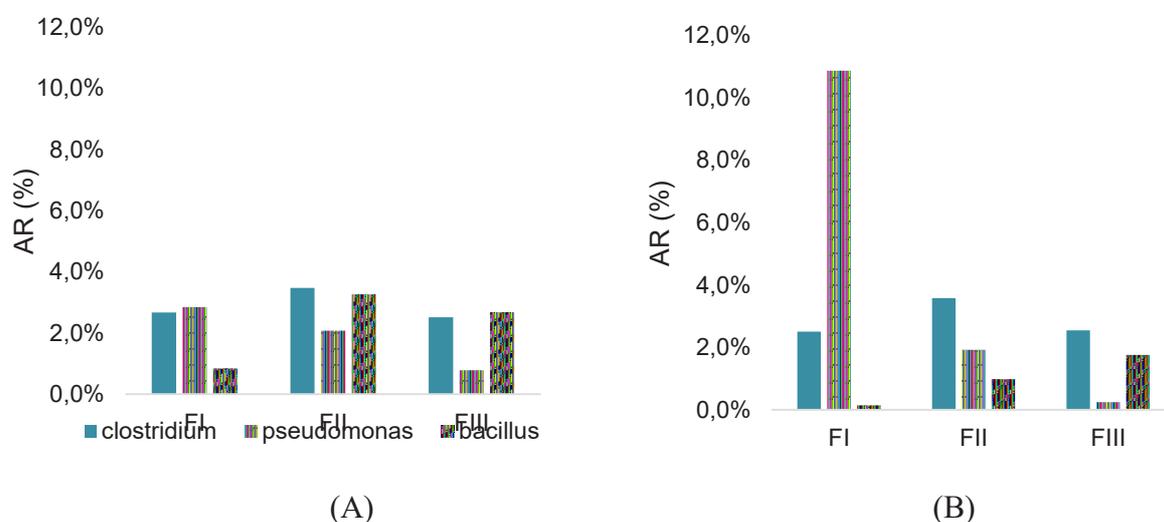
de redução de sulfato desempenhado pela espécie *Solitalea canadensis* foi responsável pela inibição da atividade metanogênica em reator sequencial em batelada. Desta forma, apesar da limitação de informações sobre esta espécie de microrganismo, é possível que *Solitalea Canadensis* tenha metabolismo de redução de sulfato mais eficiente do que microrganismos do gênero *Desulfobulbus*.

4.2.4 Microrganismos relacionados a degradação de corantes e seus subprodutos.

Os corantes azo, como descrito anteriormente, podem ser quebrados por redução anaeróbia, onde suas ligações características reagem com cofatores enzimáticos em condições redox específicas (algumas evidências indicam ser um processo extra-celular - PANDEY e IYENGAR, 2007). Na literatura é possível encontrar informações sobre os diversos tipos de enzimas aptas a degradar os corantes azo, Joshi *et al.* (2010) confirmou em seu trabalho que as enzimas oxiredutases lacase, azo redutase, NADH-DCIP redutase e veratril álcool oxidase são agentes chave para degradação de corantes.

Neste trabalho foram encontrados alguns gêneros com potencial para realizar a síntese de algumas dessas enzimas. Podem ser destacados os gêneros *Pseudomonas* (JOSHI *et al.*, 2010), *Clostridium* (XU *et al.*, 2010) e *Bacillus* (KUMAR *et al.*, 2016). Esses gêneros estavam presentes nos dois reatores e apresentaram AR >1% em pelo menos uma das fases de operação (Figura 15), e, por esta razão podem ter atuado na descoloração do efluente têxtil utilizado neste trabalho.

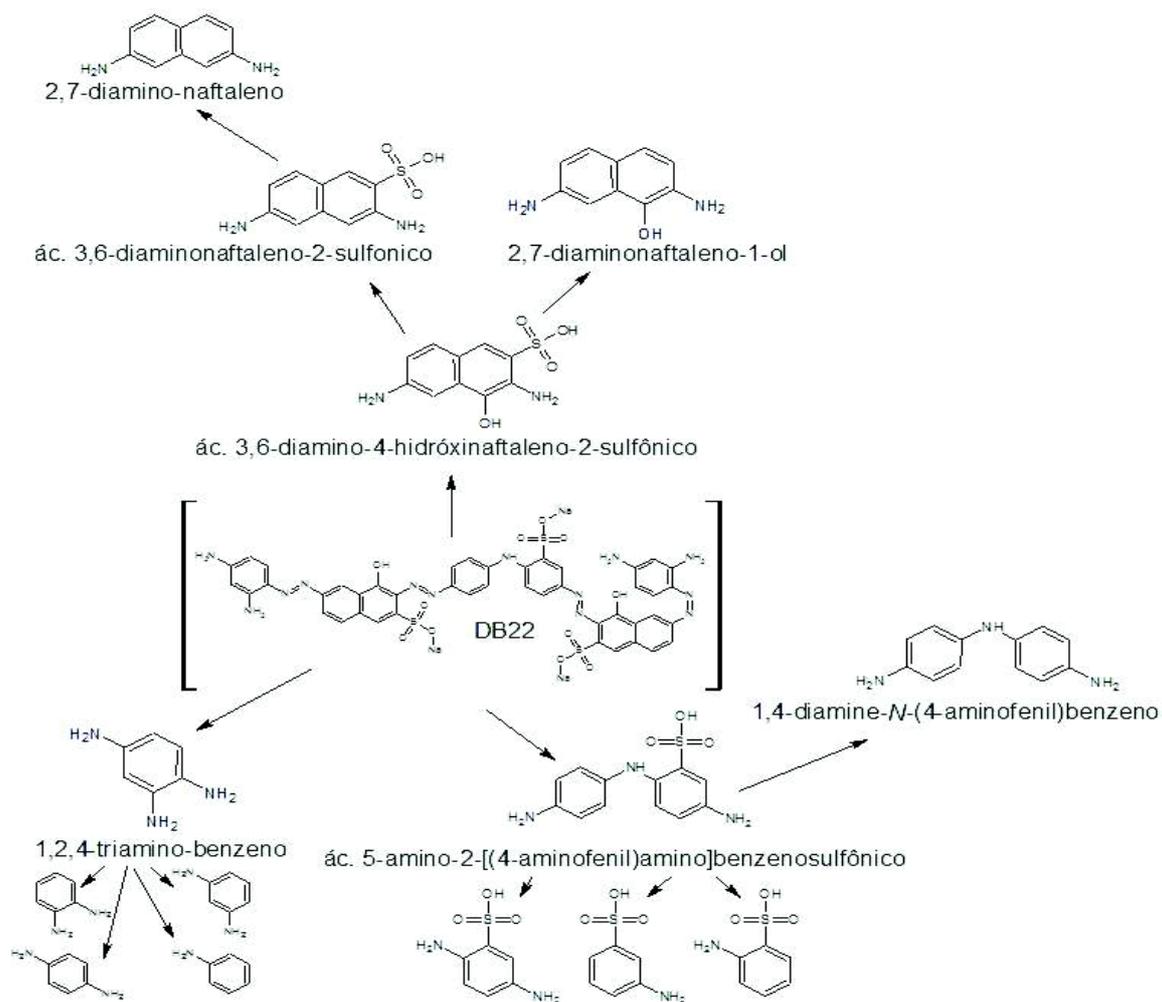
Figura 16. Abundância relativa dos gêneros *Pseudomonas*, *Clostridium* e *Bacillus* nas amostras. (A) amostras da manta de lodo de R1; (B) amostras da manta de lodo de R2.



Quanto a degradação de aminas aromáticas os gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas* e *Brevundimonas* conhecidos por atuar na degradação aeróbia de compostos aromáticos (SUROVTSEZVA *et al.* 1986; KIM *et al.* 2015), como as aminas, foram identificados na comunidade dos reatores. Entretanto os dois primeiros gêneros não se desenvolveram na biomassa do aerador (zona com maior disponibilidade de O₂). Esse fato, torna difícil a correlação desses dois gêneros (neste trabalho) com a degradação de aminas aromáticas, uma vez que a mineralização das aminas acontece na maioria dos casos em ambiente aeróbio. Contudo, o gênero *Brevundimonas* se desenvolveu apenas na biomassa do aerador. Esse microrganismo foi estudado por Surovtsezva *et al.* (1986) que identificou a habilidade da espécie *Brevundimonas diminuta* de mineralizar as aminas 3-Cloroanilina, 4-Cloroaniline e 3,4-Dicloroanilina. Aminas aromáticas são subprodutos da quebra de hidrocarbonetos aromáticos que contém grupos amina (-NH), amino (-NH₂) e/ou nitrogênio apenas (-N) em sua estrutura. Geralmente essas aminas podem ser classificadas como monocíclicas, policíclicas ou heterocíclicas (STELLMAN, 1998).

O corante DB22 utilizado nesse trabalho foi estudado pelo grupo de pesquisa da UFPE e foram identificadas algumas das possíveis aminas geradas a partir da degradação desse corante (Figura 16). Contudo, é de extrema importância em trabalhos futuros realizar alguns testes com as aminas produzidas a partir da quebra do DB22 almejando obter informações mais acuradas a respeito desse gênero.

Figura 17. Possíveis aminas resultantes da descoloração do corante azo DB22.



Fonte: Grupo de pesquisa de efluentes têxteis – Laboratório de Saneamento Ambiental – UFPE.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES

- ✓ A microbiota formada no início da operação dos reatores apresentou boa diversidade microbiana sem demonstrar dominância de nenhuma espécie. Entretanto, com o passar das fases de operação e o incremento de salinidade e sulfato, fez com que o gênero *Trichococcus* se tornasse bastante expressivo na comunidade microbiana de R2 (34% em R2), indicando uma possível dominância caso os reatores continuassem em operação.
- ✓ Alguns gêneros presentes no inóculo com AR>1% não se desenvolveram na manta de lodo dos reatores. Contudo, outros gêneros com características fenotípicas que sugerem função metabólica semelhante, se desenvolveram durante a operação dos reatores.
- ✓ A adição de salinidade promoveu maior seleção na comunidade microbiana, uma vez que gêneros sensíveis à salinidade diminuíram a AR dentro da microbiota.
- ✓ A dinâmica microbiana das BRS foi diferente em R1 (convencional) e R2 (microaerado), em resposta a adição de sulfato (FIIISAL+SO₄). A AR das bactérias redutoras de sulfato diminuiu em R2, diferentemente do que ocorreu em R1 (houve aumento na AR das BRS). Contudo, em ambos os reatores as eficiências de remoção de sulfato foram praticamente iguais ($\pm 60\%$), indicando em R2 o uso do sulfato por outro tipo de metabolismo.
- ✓ A composição da microbiota identificada na biomassa do aerador mostrou que poucos gêneros obtiveram AR>1% (ambiente mais seletivo), contudo a concentração de O₂ não inibiu a presença de microrganismos anaeróbios estritos.
- ✓ Houve desenvolvimento de gêneros relacionados a degradação de aminas aromáticas na biomassa aderida ao aerador.

Sugestões

- Testar diferentes taxas de micro-aeração em R2.
- Realizar um estudo de Metagenômica na microbiota desenvolvida nos reatores, a fim de confirmar as hipóteses levantadas nesse trabalho. Esse tipo de abordagem trará novas perspectivas a respeito da real função dos

microrganismos dentro dos reatores, informações enzimáticas e possíveis rotas metabólicas.

- Estudar a mineralização das aminas geradas com a descoloração do corante DB22 quando expostas a ação biológica dos gêneros identificados nesse trabalho.

ANEXO I – Principais resultados obtidos por Amaral et al (2014) (gráficos e tabelas).

Tabela 14. Valores de DQO para afluente e efluente de cada unidade de tratamento e eficiência de remoção de DQO nas unidades de tratamento e sistema.

| | Afluente | Efluente de R1 | Efluente de R2 |
|---|----------------|----------------|----------------|
| DQO em FI | 1.334±340 mg/L | 387±259 mg/L | 306±282 mg/L |
| DQO em FII | 1.530±264 mg/L | 495±172 mg/L | 603±205 mg/L |
| DQO em FII | 1.534±284 mg/L | 469±64 mg/L | 442±74 mg/L |
| | R1 | | R2 |
| Eficiência de remoção de DQO Bruta/Filtrada em FI | 72±17% | | 78±18% |
| Eficiência de remoção de DQO Bruta/Filtrada em FII | 67±10% | | 59±10% |
| Eficiência de remoção de DQO Bruta/Filtrada em FIIISAL+SO4 | 69±6% | | 70±8% |

Figura 22. Resultados obtidos para eficiência de remoção de DQO ao longo do período operacional nos reatores R1 (●) e R2 (●).

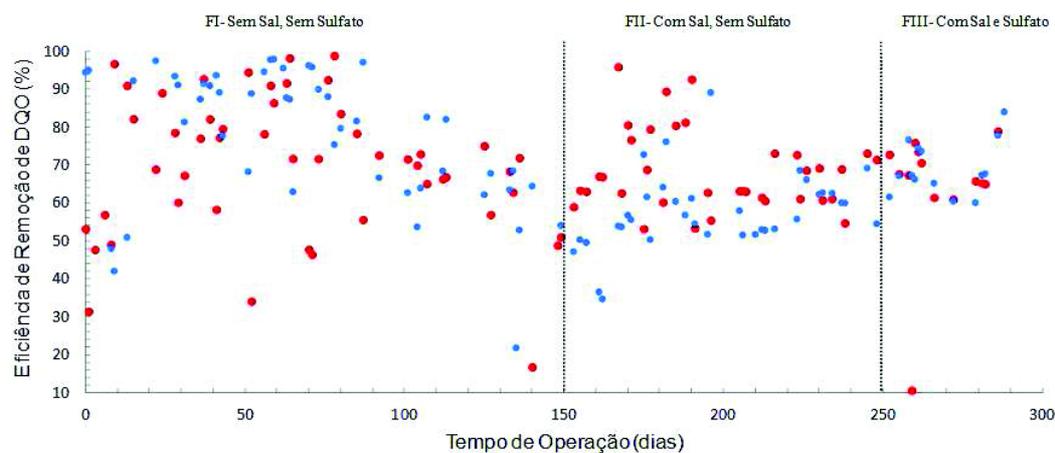
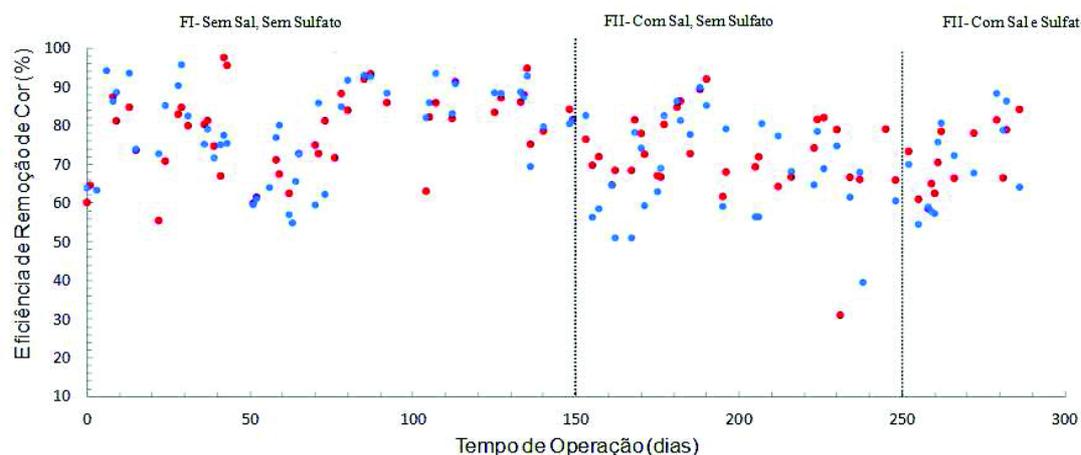
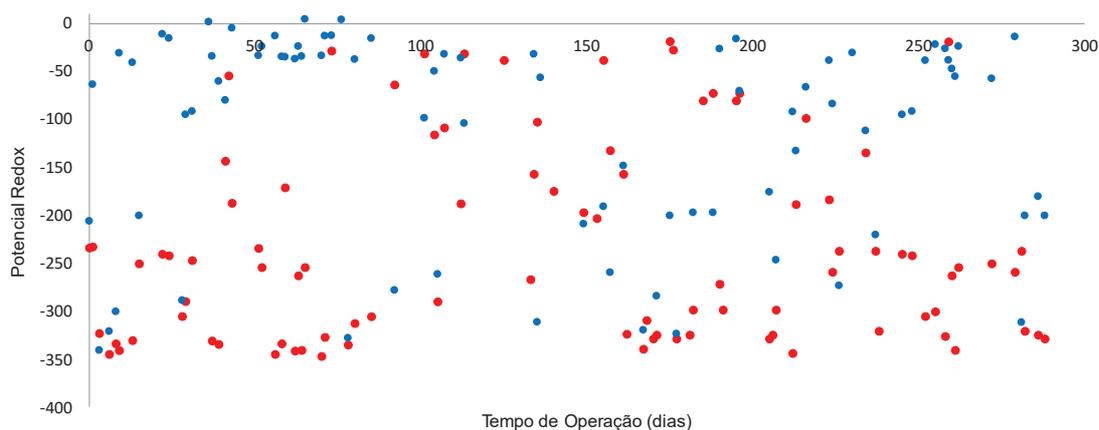


Figura 23. Variação na eficiência de remoção de cor nos reatores R1(●) e R2 (●).**Tabela 15.** Concentração de sulfato e sulfeto com respectivas eficiências de remoção.

| | Afluente | Efluente do R1 | Efluente do R2 |
|--|----------|----------------|----------------|
| Sulfato (mg SO ₄ ²⁻) em FI | 90±16 | 40±20 | 44±27 |
| Sulfato (mg SO ₄ ²⁻) em FII | 97±10 | 37±25 | 44±19 |
| Sulfato (mg SO ₄ ²⁻) em FIIISAL+SO ₄ | 400±99 | 163±41 | 255±47 |
| Sulfeto (mg /L) em FI | 0 | 30±5 | 32±4 |
| Sulfeto (mg/L) em FII | 0 | 19±2 | 19±4 |
| Sulfeto (mg/L) em FIIISAL+SO ₄ | 0 | 37±2 | 30±1 |
| | | R1 | R2 |
| Eficiência de remoção de Sulfato em FI | | 54±24% | 52±28% |
| Eficiência de remoção de Sulfato em FII | | 61±24% | 52±20% |
| Eficiência de remoção de Sulfato em FIIISAL+SO ₄ | | 60±23% | 36±20% |

Figura 25. Variação do PR ao longo do período experimental R1(●) e R2 (●).

ANEXO II – Procedimento de extração do DNA das amostras selecionadas.

Protocolo de extração de DNA: *PowerSoil™ DNA Isolation Kit* (modificado)

1. Passo: Adicionar 0,25 g de amostra de solo nos tubos *PowerBead* fornecidos. Em caso de amostras líquidas. Filtrar 100 mL da amostra em membrana 0,22 µm de porosidade e recortá-la. Adicionar nos tubos *PowerBead* fornecidos.
2. Passo: Usar vórtex gentilmente para misturar.
3. Passo: Verificar a solução C1. Se houver precipitado, aquecer a solução a 60°C até dissolvê-lo.
4. Passo: Adicionar 60 µl da solução C1 e inverter várias vezes.
5. Passo: Usar o MO BIO Vortex mais o adaptador para prender os tubos horizontalmente na velocidade máxima por 5 minutos.
6. Passo: Certifique-se que os tubos *PowerBead* girem livremente sem atrito. Centrifugue os tubos a 10000 g por 30 segundos à temperatura ambiente.
7. Passo: Transferir o sobrenadante para um tubo de 2 ml limpo.
8. Passo: Adicionar 250 µl da solução C2 e vortex por 5 segundos. Incubar a 4°C por 5 minutos.
9. Passo: Centrifugue os tubos em temperatura ambiente por 1 minuto a 10000 g.
10. Passo: Evitando o *pellet*, transferir até 600 µl do sobrenadante para um tubo de 2 ml limpo.
11. Passo: Adicionar 200 µl da solução C3 e agite em vórtex brevemente. Incubar a 4°C por 5 minutos.
12. Passo: Centrifugue os tubos em temperatura ambiente por 1 minuto a 10000 g.
13. Passo: Evitando o *pellet*, transferir até 750 µl do sobrenadante para um tubo de 2 ml limpo.
14. Passo: Adicionar 1200 µl da solução C4 ao sobrenadante e vórtex por 5 segundos.
15. Passo: Transferir cerca de 675 µl para um *Spin Filter* e centrifugar a 10000 g por 1 minuto à temperatura ambiente. Descarte o líquido do tubo e adicione 675 µl restantes do sobrenadante no *Spin Filter*. Centrifugar a 10000 g por 1 minuto à temperatura ambiente. Coloque o restante do sobrenadante no *Spin Filter* e centrifugue a 10000 g por 1 minuto à temperatura ambiente. Nota: um total de três ciclos para cada amostra processada são obrigatórios.
16. Passo: Adicionar 500 µl da solução C5 e centrifugar à temperatura ambiente por 30 segundos a 10000 g.
17. Passo: Rejeitar o líquido do tubo.
18. Passo: Centrifugar novamente à temperatura ambiente por 1 minuto a 10000 g.
19. Passo: Cuidadosamente coloque o *Spin Filter* em um tubo de 2 ml limpo. Evite qualquer contato do filtro com a solução C5.
20. Passo: Adicionar 100 µl da solução C6 no centro da membrana branca.
21. Passo: Centrifugar em temperatura ambiente por 30 segundos a 10000 g.
22. Passo: Descarte o *Spin Filter*. O DNA no tubo está pronto para qualquer aplicação. Recomendamos armazenar o DNA congelado (-20° a -80°C).

ANEXO III – Procedimento experimental para preparo das soluções utilizadas no gel de DGGE.

Procedimento operacional para soluções de DGGE 50 mL

1° Passo: Preparar solução de 40% Acrilamida (AA) e Bis-Acrilamida (BA)

- Adicionar 38,93 g de Acrilamida;
- Adicionar 1,07 g de Bis-Acrilamida.
- Dissolver na ordem apresentada;
- Acertar o volume para 100 mL com água mili q;
- Filtrar em membrana de 45 μm .

2° Passo → Preparar a solução 0% de Ureia/Formamida (UF) e 8% de Acrilamida (AA) 50 mL

- Adicionar 10 mL de Acrilamida 40%;
- Adicionar 1 mL de TAE 50x;
- Completar com 39 mL de água mili-q;
- Filtrar em membrana de 45 μm .

3° Passo → Preparar a solução 80% de Ureia/Formamida (UF) e 8% de Acrilamida (AA) 50 mL

- Adicionar 10 mL de Acrilamida 40%;
- Adicionar 1 mL de TAE 50%;
- Adicionar 16 mL de Formamida deionizada;
- Adicionar 16,8 g de Ureia (Final);
- Completar com água mili-q até 50 mL;
- Filtrar em membrana de 45 μm .

ANEXO IV – Principais comandos utilizados na reanálise dos dados recebidos pós-sequenciamento através do software QIIME.

Links importantes utilizados: <http://qiime.org/tutorials/tutorial.html>

- ✓ Verificar o Mapping File.txt

Command: `check_id_map.py -m Fasting_Map.txt -o check_mapping/`

- ✓ Atribuir sequencias por amostra; executar o workflow;

Command: `split_libraries.py -m Fasting_Map.txt -f Fasting_Example.fna -q Fasting_Example.qual -o split_library_output`

Command: `pick_otus_through_otu_table.py -i split_library_output/seqs.fna -o split_library_output/wf_output/ -p qiime_parameters.txt -f -p`

- ✓ Alpha-Diversidade

Command: `alpha_rarefaction.py -m Fasting_Map.txt -o split_library_output/wf_output/alpha_div/ -i split_library_output/wf_output/otu_table.txt -t split_library_output/wf_output/rep_set.tre -f -v`

- ✓ Normalização do número de sequências nas 8 amostras.

Command: `biom convert -i otu_table.txt -o new_otu_table.biom --to-hdf5 --table-type="OTU table" --process-obs-metadata taxonomy`

Command: `biom summarize-table -i new_otu_table.biom`

Command: `biom convert -i table.biom -o table.from_biom_w_taxonomy.txt --to-tsv --header-key taxonomy`

REFERÊNCIAS

- ABIT – **Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecções**. 2015. Disponível em: <http://www.abit.org.br/Home.aspx>. Acessado em 03 de janeiro de 2015.
- AFTAB U., KHAN M.R., MAHFOOZ M., ALI M., ASLAM S.H., REHMAN A., Decolourization and degradation of textile azo dyes by *Corynebacterium* sp. Isolated from industrial effluent, Pak. **Journal Zool.** 43 1–8. [3], 2011
- ALFONS J. M. STAMS & CAROLINE M. PLUGGE. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. **Nature Reviews Microbiology.** (7) 568-577, 2009.
- AMARAL F. M. **Tratamento de efluente têxtil por processo anaeróbio e aeróbio**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, 2014.
- AMARAL F. M., KATO M. T., FLORENCIO L., GAVAZZA S.. Color, organic matter and sulfate removal from textile effluents by anaerobic and aerobic processes. **Bioresource Technology** 364-369, 2014.
- AMORIM, S. M., KATO, M. T., FLORENCIO, L., GAVAZZA, S. **Influence of Redox Mediators and Electron Donors on the Anaerobic Removal of Color and Chemical Oxygen Demand from Textile Effluent.** *Clean-Soil, Air, Water*, v. 41, p. 928-933, 2013.
- AN, D., S. CAI AND X. DONG. *Actinomyces ruminicola* sp. nov., isolated from cattle rumen. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 56: 2043–2048, 2006.
- ARORA P. K. Bacterial degradation of monocyclic aromatic amines. **Frontiers in Microbiology.** 6:820, 2015.
- AÜLLO T., Peyruse A. R., OLLIVIER B., Magot M. *Desulfotomaculum* spp. and related gram-positive sulfate-reducing bacteria in deep subsurface environments. **Frontiers in Microbiology**, 4(362), 2013.
- BAEK G., KIM J., CHO K., BAE H., LEE C. The biostimulation of anaerobic digestion with (semi)conductive ferric oxides: their potential for enhanced biomethanation. **Applied Microbiology and Technology.** 99(23), 2015.
- BAÊTA B. E. L., LIMA D. R. S., SILVA S. Q., AQUINO S. F. Evaluation of soluble microbial products and aromatic amines accumulation during a combined anaerobic/aerobic treatment of a model azo dye. **Chemical Engineering Journal**, 936-944, 2015.
- BARDOU P., MARIETTE J., ESCUDIÉ F., DJEMIEL C. AND KLOPP C. **jvenn**: an interactive Venn diagram viewer. **BMC Bioinformatics** 2014, 15:293 doi:10.1186/1471-2105-15-293
- BERNARDET J. F., BOWMAN J. P. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2ª Ed. Volume 4, 2010 .p. 112.

BONAKDARPOUR, B., VYRIDES, I., STUCKEY, D.C. Comparison of the Performance of BRAILE P. M., CAVALCANTI J. E. W. A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**. 18 ed., São Paulo, CETESB, 1997.

BRENNER D. J., KRIEG N. R., STALEY J. T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2^a Ed. Springer, New York. 2010

BUSS M. V., RIBEIRO E. F., SHNEIDER I. A. H., MENEZES J. C. S. S. Tratamento dos Efluentes de uma Lavanderia Industrial: Avaliação da Capacidade de Diferentes Processos de Tratamento. **Revista de Engenharia Civil IMED**, 2(1) 2-10, 2015.

BUZZINI, A. P., SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B., PIRES, E. C. Evaluation of the microbial diversity in an UASB reactor treating wastewater from an unbleached pulp plant. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 168-176, 2006.

CABEZAS A., ARAÚJO J. C., CALLEJAS C., GALÉS A., HAMELIN J., MARONE A., SOUSA D. Z., TRABLY E., ETCHEBEHERE C. How to use molecular biology tools for the study of the anaerobic digestion process? **Rev Environmental Sci Biotechnol**. 2015.

CASAMAYOR, E. O.; SHÄFER, H.; BAÑERAS, L.; PEDRÓS-ALIÓ, C; MUYZER, G. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 499-508, 2000.

CASSERLY, C.; ERIJMAN, L. Molecular monitoring of microbial diversity in an UASB reactor. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, p. 7-12, 2003.

CATO, E.P., L.V. HOLDEMAN AND W.E.C. MOORE. Proposal of neotype strains for seven non-saccharolytic *Bacteroides* species. **Int. J. Syst. Bacteriol**. 29: 427-434, 1979.

CIRIK, K., DURSUN, N., SAHINKAYA, E., CINAR, O. Effect of Electron Donor Source on the Treatment of Cr(VI)-Containing Textile Wastewater Using Sulfate-Reducing Fluidized Bed Reactors (FBRs). **Bioresource and Technology**, v. 133, p. 414-420, 2013.

DENGER, K., R. WARTHMAN, W. LUDWIG AND B. SCHINK. *Anaerophaga thermohalophila* gen. nov., sp. nov., a moderately thermohalophilic, strictly anaerobic fermentative bacterium. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. 52: 173-178, 2002.

DÍAZ, I., FDZ-POLANCO, M. Robustness of the Microaerobic Removal of Hydrogen Sulfide from Biogas. **Water Science Technology**, v. 65, p. 1368-1374, 2012.

DONOVAN P. K., WOOD A. P. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2^a Ed. Volume 2, p. 60. 2010

ESTEVE-NÚÑEZ A, CABALLERO A, RAMOS J. L. Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. **Microbiol Mol Biol Rev** 65: 335-352, 2001.

FERRAZ A. D. N, KATO M. T., FLORENCIO L., GAVAZZA S. Textile effluent treatment in a UASB reactor followed by submerged aerated biofiltration. **Water Science and Technology**, 64(8), 2011.

FORGACS, E., CSERHATI, T., OROS, G. Removal of Synthetic Dyes from Wastewaters: a Review. **Environment International**, v. 30, p. 953-571, 2004.

GEREFFI G, SPENER D, BAIR J, **Free Trade and Uneven Development: The North American Apparel Industry After NAFTA**, manual (2002), pp. 369, Temple University Press, ISBN 1439901147

GHALY AE, ANANTHASHANKAR R, ALHATTAB M., RAMAKRISHNAN V. V. Production, Characterization and Treatment of Textile Effluents: A Critical Review. **J Chemical Engineering Process Technology**, 5:1, 2014.

GLASER, J. AND J.L. PATE. Isolation and characterization of gliding motility mutants of *Cytophaga columnaris*. **Arch. Mikrobiol.** 93: 295–309, 1973.

HALLER M. Tratamento de efluentes. Textília, São Paulo: Editora Brasil Têxtil LTDA, 1993.
HAMADY M., KNIGHT R. Microbial community profiling for human microbiome projects: tools, techniques and challenges. **Genome Research.** 19 1141-1152, 2008.

HAMMER Ø., HARPER D. A. T., RYAN P. D. **Past: paleontological statistics software package for education and data analysis**. Palaeontological Association, 2001.

HEEJUNG J. A., KIM J. A., LEE J. B., HWANG S. B., LEE C. Biomethanation potential of marine macroalgal *Ulva* biomass in sequencing batch mode: Changes in process performance and microbial community structure over five cycles, **Biomass and Bioenergy** 91 143 e 149, 2016.

HERRERO M., STUCKEY D. C. Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: A review. **Journal Chemosphere.** 140:119-128, 2015.

IMHOFF, J.F., SU*LING, J. AND PETRI, R. Phylogenetic relationships among the Chromatiaceae, their taxonomic reclassification and description of the new genera *Allochromatium*, *Halochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Thiococcus*, *Thiohalocapsa*, and *Thermochromatium*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 48: 1129–1143. 1998.

ÍNDIA, Ministry of Textiles, **Indian Textile Journal, Department of Industrial Policy and Promotion, Press Information Bureau** – acessado em www.ibef.org/industry/textiles, 2016.

ISIK, M., SPONZA, D. T. Anaerobic/Aerobic Treatment Of A Simulated Textile Wastewater. **Separation and Purification Technology**, V. 60, P. 64-72, 2008.

JOSE, S.; GILLESPIE, A.R.; GEORGE, S.J.; et.al. Vegetation responses along edge-to-interior gradients in a high altitude tropical forest in peninsular India. **Forest Ecology and Management**, v.87, p.51-62, 1996.

KARIYAJJANAVAR, P.; NARAYANA, J.; NAYAKA, Y. A. E UMANAIK, M. Electrochemical Degradation and Cyclic Voltammetric Studies of Textile Reactive Azo Dye Cibacron Navy WB. **Portugaliae Eletrochimica Acta.** 28(4), 2010.

- KIM, D., YOO, M., KIM, E. E., HONG, S. G. Anthranilate degradation by a cold adapted *Pseudomonas* sp. **J. Basic Microbiol.** 55, 354–362, 2015.
- KLEINSTEUBER S., SCHLEINITZ K.M., BREITFELD J., HARMS H., RICHNOW H.H., VOGT C. Molecular characterization of bacterial communities mineralizing benzene under sulfate-reducing conditions' **Microbiol Ecol.** 66:143–157, 2008.
- KODAMA Y., WATANABE K. *Sulfuricurvum kujiense* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground crude-oil storage cavity. **Int Journal of Systematic Evol Microbiol**, 54(6), 2004.
- LADE H, KADAM A, PAUL D, GOVINDWAR S. Biodegradation and detoxification of textile azo dyes by bacterial consortium under sequential microaerophilic/aerobic processes. **EXCLI Journal** 158(74), 2015.
- LEELAKRIANGSAK M., BORISUT S. Characterization of the decolorizing activity of azo dyes by *Bacillus subtilis* azoreductase AzoR1. **J. Sci. Technology.** 34(5), 2012.
- LOMAN N. J., MISRA R. V., DALLMAN T. J., CONSTANTINIDOU C., GHARBIA S. E., WAIN J., PALLEN M. J. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. **Nat. Biotechnol.** 30 434-439, 2012.
- KATO M.T., FIELD J.A. e LETTINGA G. ANAEROBE TOLERANCE TO OXYGEN AND THE POTENTIALS OF ANAEROBIC AND AEROBIC COCULTURES FOR WASTEWATER TREATMENT Braz. **J. Chem. Eng** vol. 14 no. 1997
- MADIGAN M. T., CLARK D. P., STAHL D., MARTINKO J. M. **Brock Biology of Microorganisms**. 13th ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2010.
- MOREIRA, D. e AMILS, R. Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and other mixotrophic Thiobacilli: proposal for *Thiomonas* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, April 1997, vol. 47, no. 2, p. 522-528.
- MUYZER, DGGE/TGGE a Method for Identifying Genes from Natural Ecosystems. **Current Opinion Microbiology**, v. 2, p. 317-322, 1999.
- MUYZER, G., DE WAAL, E. C., UITTERLINDEN, A. G. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-amplified Genes Coding for 16s rRNA. **Applied Environmental Microbiology**. V. 59, p. 695-700, 1993.
- MUYZER, G., TESKE, A., WIRSEN, C. O., JANNASCH, H. W. Phylogenetic Relationships of *Thiomicrospira* Species and their Identification in Deep-sea Hydrothermal Vent Samples by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of 16s rDNA Fragments. **Archives of Microbiology**. v. 164, p. 165-174, 1995.
- NGHIEM, L. D., MANASSA, P., DAWSON, M., FITZGERALD, S. K. Oxidation Reduction Potential as a Parameter to Regulate Micro-oxygen Injection into Anaerobic Digester for

Reducing Hydrogen Sulphide Concentration in Biogas. **Bioresource and Technology**, v. 173, p. 443-447, 2014.

O'NEILL C., LOPEZ A., ESTEVES S., HAWKES F.R., HAWKES D.L., WILCOX S., Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operating on simulated textile effluent, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 53 249–254, 2000.

OKADA D. Y. **Degradação de surfactantes aniônicos e reator UASB com água residuárias de lavanderia** in: Escola de Engenharia de São Carlos. Tese de Doutorado, 2012

OLIVEIRA FILHO, A.T., ALMEIDA, R.J., MELLO, J.M. & GAVILANES, M.L. 1994. Estrutura fitossociológica e variáveis ambientais em um trecho da mata ciliar do córrego dos Vilas Boas, Reserva Biológica do Poço Bonito, Lavras (MG). **Revista Brasileira de Botânica** 17: 67-85.

PARSHINA S. N., SIPMA J., NAKASHIMADA Y., HENSTRA A. M., SMIDT H., LYSENKO A. M., LENS P. N. L., LETTINGA G. STAMS A. J. M. Desulfotomaculum carboxydivorans sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium capable of growth at 100% CO. **Int Journal os Syst. and Evol Microbiol.** 55, 2005.

PERES, C.S.; ABRAHÃO, A.J. Características e sistemas de tratamento de águas residuais das indústrias têxteis. **Revista Química Têxtil**, V.21, p. 22–39, 1998.

PHILLIPS D. Environmentally Friendly, Productive and Reliable: Priorities for Cotton Dyes and Dyeing Processes. **Journal of the Society of Dyers and Colourists** 112:183–186, 1996.

PINHEIRO H. M., TOURAUD E., THOMAS O. Aromatic Amines from Azo Dye Reduction: Status Review with Emphasis on Direct UV Spectrophotometric Detection in Textile Industry Wastewaters. **Dyes and Pigments**, v. 61, p. 121-139, 2004.

PODOSKORSKAYA O., OSMOLOVSKAYA E. A., NOVIKOV A. A., KUBLANOV I. V. Ornatilinea apprima gen. nov., sp nov., a cellulolytic representative of the class Anaerolineae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** 63, 2012

RAINEY F. A. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2^a Ed. Volume 4, 2010.p. 585.

RAINEY F. A., HOLLEN B. J., SMALL A. in **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2^a Ed. Volume 3, 2010.p. 738.

SANGER F., NICKLEN S., COULSON A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, 74 5463-5467, 1977.

SANTOS, B. R. T. **Efeito de Diferentes Doadores de Elétrons e da Variação de Concentração de Sulfato na Descoloração Redutiva do Corante Direct Black 22.** 84p. Dissertação (Mestrado) -Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 2012.

SANTOS, E. O. **Caracterização, Biodegradabilidade e Tratabilidade do Efluente de uma Lavanderia Industrial.** Dissertação (Mestrado) – Centro de Tecnologia e Geociências, 138 p. Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

SCHAUER, N. L., D. P. BROWN, AND J. G. FERRY. Kinetics of formate metabolism in *Methanobacterium formicicum* and *Methanospirillum hungatei*. **Appl. Environ. Microbiol.** 44:549–554. 1982.

SENTHIL S. KUMAR, MURUGANANDHAM T., KATHIRAVAN V., RAVIKUMAR R., MOHAMED JABBIR M.S. Rapid decolorisation of disperse Red F3B by *Enterococcus Faecalis* and its phytotoxic evaluation. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, p. 52-67, 10 (2013).

SHAH M. Evaluation of *Aeromonas* Spp. In Microbial Degradation and Decolorization of Reactive Black in Microaerophilic – Aerobic Condition. **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, 5:246, 2004.

SMITH, M.L. Community and edaphic analysis of upland northern hardwood communities, central Vermont, USA. **Forest Ecology and Management**, v.72, p.267-74, 1995.

SONG Y., LIU C., FINEGOLD M. in **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2^a Ed. Volume 4, 2010.p. 85.

STOLZ A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. **Appl Microbiol Biotechnol**;56:69–80, 2001 .

SUROVTSEVA, E.G., SUKHIKH, A.P., E IVOILOV, V.S..Isozymes of the pathway for aniline and 4-chloroaniline preparatory metabolism in *Alcaligenes* sp. **Mikrobiologiya** 61, 99–106. 1993.

VAN DER ZEE FP, LETTINGA G, FIELD JA. Azo dye decolourisation by anaerobic granular sludge. **Chemosphere**;44(5):1169–76, 2001.

VANDAMME, P., VANCANNEYT M., POT B., MELS L., HOSTE B., DEWETTINCK D., VLAES L., VAN DEN BORRE C., HIGGINS R., HOMMEZ J., KERSTERS K., BUTZLER J. P, GOOSSENS H. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. **J. Syst. Bacteriol.** 42: 344–356, 1992.

WANG Q, GARRITY G.M, TIEDJE J.M, COLE J.R, 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Appl Environ Microbiol** 73:5261–5267

WATANABE, T.; ASAKAWA, S.; NAKAMURA, A.; NAGAOKA, K.; KIMURA, M. DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 232, p. 153-163, 2004.

WHITMAN, W.B., BOWEN, T.L. AND BOONE, D.R. **The methanogenic bacteria. The Prokaryotes: An evolving electronic resource for the microbiological community.** Ed. M. Dworkin. Springer. New York, 2006

XU H., HEINZE T. M., PAINE D. D., CERNIGLIA C. E., CHEN H. Sudan azo dyes and Para Red degradation by prevalent bacteria of the human gastrointestinal tracts. **Anaerobe**. (16) 114-1199, 2010.

XU M, GUO J, SUN G. Biodegradation of textile azo dye by *Shewanella decolorationis* S12 under microaerophilic conditions. **Appl Microbiol Biotechnology**,76:719–26, 2007.

YANG C1, ZHANG W, LIU R, LI Q, LI B, WANG S, SONG C, QIAO C, MULCHANDANI A. Phylogenetic diversity and metabolic potential of activated sludge microbial communities in full-scale wastewater treatment plants. **Environmental Science & Technology**. 45(17):7408-15, 2011.

ZHAO Y1, REN N, WANG A. Contributions of fermentative acidogenic bacteria and sulfate-reducing bacteria to lactate degradation and sulfate reduction. **Chemosphere**, 72(2) 233-2, 2008.