

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL INSTITUTO DE  
CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE DA COMUNIDADE BACTERIANA EM UMA  
ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS DA INDÚSTRIA  
PETROQUÍMICA**

THEMIS COLLARES ANTUNES

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sueli Van Der Sand

Porto Alegre

Junho/2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL INSTITUTO DE  
CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE DA COMUNIDADE BACTERIANA EM UMA  
ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS DA INDÚSTRIA  
PETROQUÍMICA**

Themis Collares Antunes

Mestre em Microbiologia

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia  
Ambiental

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sueli Van Der Sand

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Junho/2018



Uma das coisas maravilhosas em relação à ciência é que, quando cientistas não sabem alguma coisa, eles podem tentar todos os tipos de teorias e hipóteses, mas ao final têm de admitir sua ignorância.

Yuval Harari, 2015. Homo Deus: Uma breve história do amanhã.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus exemplos e meus amores: meus pais, minha irmã e minha avó, pelo amor, incentivo e compreensão.

À Professora Dr.<sup>a</sup> Sueli T. Vand Der Sand pela orientação de longos anos, por acreditar e me apoiar sempre desde a iniciação científica, pelos conselhos (de vida e acadêmicos) e pela amizade construída ao longo dessa jornada.

A Dra. Adriana Giongo pela parceria e pela disponibilidade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, pelos ensinamentos.

As gurias (e o João) do laboratório 323, em especial as Ms. Marcela Borba Proença pela amizade e momentos de desabafo.

Aos amigos, pelos momentos de descontração e pelo carinho indispensável.

Ao CAPES pelo auxílio financeiro.

# ANÁLISE DA DIVERSIDADE DA COMUNIDADE BACTERIANA EM UMA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS DA INDÚSTRIA PETROQUÍMICA<sup>1</sup>

Autora: Themis Collares Antunes

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sueli Van Der Sand

## RESUMO

Indústrias petroquímicas demandam grandes volumes de água para as suas atividades gerando efluentes que podem conter óleo ou outros contaminantes químicos. O lodo ativado e as lagoas facultativas são comumente utilizados para o tratamento de águas residuais devido à baixa necessidade de requisitos operacionais. No entanto, poucas informações estão disponíveis sobre as comunidades microbianas desses ecossistemas. Neste estudo, foram utilizados ensaios microbiológicos e análises moleculares para estimar a diversidade bacteriana e monitorar sua mudança temporal em uma estação de tratamento do efluente de uma indústria de petroquímica que utiliza processos de lodo ativado e lagoas facultativas. Além disso, foi analisada a relação entre parâmetros físico-químicos e as comunidades bacterianas. Para isso, foram realizadas quatro coletas (C1, C2, C3, C4) entre maio de 2015 e março de 2016. O lodo ativado apresentou maior quantificação de bactérias heterotróficas em todas as coletas. Não foram observadas diferenças significativas na quantificação de bactérias redutoras de sulfato. O número de bactérias desnitrificantes foi reduzido ao longo da estação de tratamento, do lodo ativado até a última lagoa de estabilização, em todas as coletas. Foi observado diminuição do nitrogênio total de Kjeldahl, da demanda de oxigênio e do fósforo no efluente do lodo ativado até última lagoa de estabilização. A identificação dos isolados ambientais foi realizada através da comparação entre as técnicas de Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI-TOF MS) e sequenciamento do 16S rDNA. MALDI-TOF MS permitiu a identificação de 68 (93%) dos isolados. A análise de do lodo ativado foi realizada através do sequenciamento de alto desempenho. Todas as sequências foram classificadas no nível do filo, e até 55% dos ASVs (Amplicon Sequence Variants) foram associados a gêneros bacterianos conhecidos. *Proteobacteria* foi o filo mais abundante em três estações, enquanto o filo *Armatimonadota* dominou em uma estação. O gênero *Hyphomicrobium* foi o mais abundante no outono, inverno e verão, e um ASV pertencente à família *Fimbriimonadaceae* foi o mais abundante na primavera. A Análise de Correspondência Canônica mostrou que os parâmetros físico-químicos de SS, SD e TSS estão correlacionados, assim como o nitrogênio amoniacal. Os maiores valores de COD, AN e sólidos estão correlacionados à alta frequência do filo *Armatimonadota* em C3.

<sup>1</sup>Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (93 p.) Junho, 2018.

# ANALYSIS OF THE DIVERSITY OF THE BACTERIAL POPULATION IN A WASTEWATER TREATMENT STATION OF THE PETROCHEMICAL INDUSTRY<sup>1</sup>

Author: Themis Collares Antunes

Advisor: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sueli Van Der Sand

## ABSTRACT

Petrochemical industries demand large volumes of water for their activities producing effluents that may contain oil or other chemical contaminants. Activated sludge and facultative lagoons are commonly used for wastewater treatment because of the facility for operational requirements. However, little information is available about the microbial communities of these ecosystems. In this study, microbiological assays and molecular analyzes were used to estimate bacterial diversity and to monitor their temporal change in an effluent treatment plant of a petrochemical industry using activated sludge and facultative lagoons. In addition, the relation between physicochemical parameters and the bacterial community was analyzed. For this, four collections were carried out between May 2015 and March 2016. Activated sludge presented higher quantification of heterotrophic bacteria in all collections. No significant differences were observed in the quantification of sulfate reducing bacteria. The number of denitrifying bacteria was reduced throughout the wastewater treatment plant, from the activated sludge to the last facultative lagoon, in all collections. Also, a decrease of total Kjeldahl nitrogen, oxygen demand and phosphate were observed. The identification of the environmental isolates was performed by comparing the Matrix-assisted laser desorption / ionization (MALDI-TOF MS) and 16S rDNA sequencing techniques. MALDI-TOF MS allowed the identification of 68 (93%) of the isolates. The analysis of the activated sludge was performed using high through sequence. All of the sequences were classified at the phylum level, and up to 55% of the ASVs (Amplicon Sequence Variants) were associated with known bacterial genera. *Proteobacteria* was the most abundant phylum in three seasons, while the phylum *Armatimonadota* dominated in one season. The genus *Hyphomicrobium* was the most abundant in autumn, winter and summer, and an ASV belonging to the family *Fimbriimonadaceae* was the most abundant in the spring. Canonical Correspondence Analysis showed that physicochemical parameters of SS, SD and TSS are correlated, as well as ammoniacal nitrogen. The highest COD, AN, and solids values are correlated to the high frequency of the phylum *Armatimonadota* in C3.

<sup>1</sup>Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (93 p.) Junho, 2018.



## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVOS....	4
2,1	Objetivo Geral.....	4
2.2	Objetivos específicos.....	4
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1	Tratamento De Água Residuárias.....	5
3.2	Lodo Ativado.....	10
3.3	Comunidade Microbiana Presente Em Lodos Ativados.....	14
3.3.1	Microrganismos Nitrificantes.....	15
3.3.2	Microrganismos Desnitrificantes.....	17
3.3.3	Bactérias Redutoras De Sulfato.....	19
3.4	Lagoas De Estabilização.....	21
3.5	Comunidade Microbiana Presente Em Lagoas De Estabilização.....	26
3.5.1	Remoção De Nitrogênio.....	27
3.6	Técnicas De Identificação De Microrganismo Ambientais.....	28
3.6.1	Biologia Molecular E A Ecologia Microbiana.....	30
3.6.1.1.	Eletroforese Em Gel Com Gradiente Desnaturante.....	31
3.6.1.2	Sequenciamento de alta performance.....	35
4.	ARTIGOS.....	39
4.1	Artigo 1.....	39
4.2	Artigo 2.....	42
4.3	Artigo 3.....	52
5.	DISCUSSÃO GERAL.....	55
6.	CONCLUSÃO.....	59
7.	REFERÊNCIAS.....	60

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Operação de processo de lodos ativados.....	12
Figura 2. Tanque de aeração. Lodo ativado de aeração prolongada – SITEL.....	14
Figura 3. Zonas em Lagoa Facultativa.....	24

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**SITEL:** Superintendência de Tratamento de Efluentes Líquidos

**ETE:** Estação de Tratamento de Efluentes

**UASB:** Digestor Anaeróbio de Fluxo Ascendente

**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico

**rRNA:** ácido ribonucleico ribossômico

**DGGE:** eletroforese em gel de gradiente desnaturante

**PCR:** polimerização de reação em cadeia

**PGM:** Personal Genome Machine

**EC:** Condutividade elétrica

**SDT:** Sólidos dissolvidos totais

**SS:** Sólidos suspensos

**OD:** Oxigênio dissolvido

**DBO:** Demanda bioquímica de oxigênio

**DQO:** Demanda química de oxigênio

**TOC:** Carbono orgânico total

**TC:** Coliformes totais

**FC:** Coliformes fecais

**pH:** potencial hidrogeniônico

**N-:** nitrogênio orgânico

**NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:** nitrogênio amoniacal

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>:** nitrito

**NH<sub>3</sub>:** amônia/amoníaco

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>:** nitrato

**CO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono

**AOB:** bactérias oxidadoras de amônio

**NOB:** bactérias oxidadoras de nitrito

**BRS:** bactérias redutoras de sulfato

**Nap:** enzima nitrato redutase periplasmática

**mg/L:** microgramas por litro

**°C:** graus Celsius

**$\alpha$ :** alfa

**$\beta$ :** beta

**$\gamma$ :** gama

**$\epsilon$ :** épsilon

**Fe III:** óxido de ferro

**U:** uranila

**Tc:** pertecnetato

**Se:** selenato

**Cr:** cromato

**As:** Arsenato

## 1. INTRODUÇÃO

Os resíduos industriais e domésticos decorrentes das atividades humanas devem ser adequadamente tratados em estação de tratamento de efluentes (ETE) a fim de remover a maior quantidade possível de poluentes, minimizar os efeitos adversos ao ambiente, prevenir a poluição e proteger a saúde pública (Lambolez et al., 1994; Fernández et al., 1995).

O tratamento biológico de águas residuais tem sido um campo de pesquisa em constante crescimento desde a introdução de poluentes não biodegradáveis ou recalcitrantes no meio ambiente. Os sistemas de tratamento biológicos de águas residuais são a maneira mais fácil e barata de reduzir a demanda bioquímica (DBO), a demanda química de oxigênio (DQO) e a toxicidade dos resíduos líquidos industriais antes destes serem lançados em seu destino. Embora ocorra o monitoramento por parâmetros físicos e químicos, existe uma falta de informação sobre a funcionalidade e estrutura da comunidade microbiana, uma vez que os microrganismos exercem papel crucial na depuração da matéria orgânica (Moretti et al., 2015).

Os tratamentos baseados em processos biológicos permitem tratar grandes volumes de efluente, apresentam menor custo de funcionamento e simplicidade operacional (Freire et al., 2000; Da Motta et al., 2003). Existem diferentes processos biológicos para o tratamento de efluentes tais como: lagoas facultativas, lodos ativados, filtros biológicos e reatores anaeróbios (Von Sperling, 2002).

Segundo Campos (1994), dentre os processos biológicos aeróbios, o sistema de lodos ativados é o mais utilizado no tratamento de águas residuais, sendo a alternativa empregada em mais de 90% das ETEs de médio e grande porte, nos países desenvolvidos. Em sistemas de lodo ativado, a diversidade da comunidade biológica é muito grande,

contendo muitas espécies de vírus, bactérias, arqueias, protozoários, fungos, metazoários e algas. Neste complexo, as bactérias, que são geralmente cerca de 95% da comunidade microbiana total, desempenham um papel fundamental na remoção de material orgânico e de nutriente das águas residuais (Jenkins et al., 2003).

Outro método de tratamento de efluente são as lagoas de estabilização. Neste sistema, os microrganismos, assim como no lodo ativado, também estão entre os maiores responsáveis pela transformação dos compostos orgânicos, sendo os organismos-chave do processo (Von Sperling, 2002; Fujioka et al., 2020).

A estrutura da comunidade de lagoas de estabilização apresenta forte relação com as condições operacionais e com a qualidade e quantidade de efluente que alimenta o processo (Vazoller et al., 1989). Mudanças nas condições ambientais provenientes da composição do afluente do reator, ou mesmo da operação da estação, podem levar a alterações na comunidade do lodo influenciando os processos de biodegradação (Forney et al., 2001; Dalzell et al., 2002).

A compreensão da estrutura da comunidade microbiana presente em processos de tratamento biológicos possibilita a relação entre fatores físico-químico e biológicos permitindo um melhor desempenho do sistema (Boon et al., 2002), pois o processo de autodepuração de água residuária está intimamente ligado com o metabolismo microbiano (Foster et al., 2003).

O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular e sua grande utilização na área da ecologia microbiana permitiu que os problemas associados aos métodos dependentes de cultura, como a subestimação da verdadeira diversidade, fossem superados.

A análise de ácido nucléicos extraídos da comunidade total do ambiente permitem a detecção e identificação filogenética dos organismos, incluindo os não cultivados. A eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) é amplamente utilizada para descrever a diversidade genética dos microrganismos de diferentes ambientes, a combinação desse método com a microbiologia tradicional auxilia numa análise mais abrangente da diversidade microbiana no sistema (Onuki et. al., 2000; Abd El-Latif Hesham et al., 2011; Eland et al., 2018).

Estudos de dinâmica e perfil microbianos em vários ecossistemas como solo, lodo ativado e sedimentos, já foram conduzidos utilizando métodos independentes de cultura e baseados na polimerização de reação em cadeia (PCR) e sequenciamento do gene 16S rRNA (McLellan et al., 2010, Yu e Zhang, 2012).

O surgimento de tecnologias de sequenciamento de alta performance permitiu revelar a diversidade e estrutura da comunidade microbiana com maior profundidade. Essa tecnologia possibilitou avaliações de biodiversidade de amostra ambientais em alta resolução gerando muitas sequências disponíveis para análise (Shendure J and Jo H, 2008). Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) é uma plataforma de sequenciamento eficaz e adequada para estudos sobre ecologia microbiana (Whiteley et al., 2012; Moustapha et al., 2015; Delforno et al., 2015).

Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo analisar a diversidade e a dinâmica da comunidade microbiana presente no lodo ativado e na lagoa de estabilização facultativa de uma estação de tratamento de efluentes do Polo Petroquímico do Rio Grande do Sul, utilizando ensaios microbiológicos e análises moleculares.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Analisar, ao longo de um período compreendido entre maio de 2015 a março de 2016, a diversidade microbiana e sua dinâmica ecológica no tratamento do efluente líquido resultantes das atividades operacionais das indústrias do Polo Petroquímico do Rio Grande do Sul, que utiliza os processos de lodo ativado e lagoa de estabilização facultativa.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- i. Estimar a quantidade de bactérias heterotróficas, bactérias desnitrificantes, bactérias redutoras de sulfato e redutoras de nitrato presentes no lodo ativado e nas lagoas de estabilização.
- ii. Analisar os perfis das comunidades bacterianas presentes no lodo ativado e nas lagoas de estabilização através de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE).
- iii. Analisar a biodiversidade de bactérias cultiváveis de lodo ativado através da MALDI-TOF.
- iv. Analisar a biodiversidade e a estrutura da comunidade microbiana das amostras de lodo ativado utilizando sequenciamento de DNA de alto desempenho.



### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Tratamento De Água Residuárias

A água residual é a água cujas propriedades físicas, químicas ou biológicas apresentam as suas características naturais alteradas como resultado da introdução de certas substâncias. O dia a dia das atividades do homem é principalmente dependente da água resultando em lançamento de resíduos na mesma. Algumas dessas substâncias incluem resíduos fisiológicos (fezes e urina), xampu para cabelo, restos de comida, gordura, condicionadores de tecido, papel higiênico, produtos químicos, detergentes, produtos de limpeza doméstica, microrganismos que podem danificar o meio ambiente, tornando o tratamento desse efluente muito importante (Metcalf and Eddy, 2003).

As características das águas residuais variam de indústria para indústria, portanto, os processos de tratamento aplicados dependem da natureza dos efluente gerado. Em geral, os contaminantes presentes nas águas residuais são classificados como físicos, químicos e biológicos. Segundo Peavy et al., (1985) e Obuobie et al., (2006) alguns indicadores servem como medidas indiretas da presença de contaminantes, entre eles temos:

Indicadores Físicos:

- Condutividade elétrica (EC): indica o teor de sal.
- Sólidos dissolvidos totais (SDT): compreendem sais inorgânicos e pequenas quantidades de matéria orgânica dissolvida em água.
- Sólidos suspensos (SS): compreendem partículas sólidas suspensas (mas não dissolvidas) em água.

#### Indicadores Químicos:

- Oxigênio dissolvido (OD): indica a quantidade de oxigênio na água.
- Demanda bioquímica de oxigênio (DBO): indica a quantidade de oxigênio exigida por microrganismos aeróbios para decompor a matéria orgânica em uma amostra de água em um período definido.
  - Demanda química de oxigênio (DQO): é um parâmetro que diz respeito à quantidade de oxigênio consumido por materiais e por substâncias orgânicas e minerais, que se oxidam sob condições definidas. No caso de águas, o parâmetro torna-se particularmente importante por estimar o potencial poluidor (no caso, o “consumidor de oxigênio”) de efluentes domésticos e industriais, assim como por estimar o impacto dos mesmos sobre os ecossistemas aquáticos (Rocha et al., 1990).
- Carbono orgânico total (TOC): medição de contaminantes orgânicos à base de carbono em um sistema de água.
- $\text{NH}_4\text{-N}$  e  $\text{NO}_3\text{-N}$ : mostram nitrogênio dissolvido na água (Amônio e Nitrato, respectivamente).
- O nitrogênio total de Kjeldhal: é uma medida do nitrogênio amoníaco de ligação orgânica.
- Total-P: reflete a quantidade de todas as formas de fósforo em uma amostra.

#### Indicadores Biológicos:

- Coliformes totais (TC): engloba coliformes fecais e é um amplo indicador de possível contaminação da água.

- Coliformes fecais (FC): é um indicador da contaminação da água com matéria fecal.
- Análise de helmintos: analisa a presença de ovos de helmintos e oocistos de protistas na água.

O tratamento de águas residuais é o processo utilizado para remover a maioria dos contaminantes que são encontrados a fim de garantir um ambiente sadio. Pode ser definido como técnicas que combinam sistemas e tecnologias necessárias para adequar as águas residuais à qualidade requerida para o meio receptor. O tratamento é necessário pois através dele ocorre a reciclagem e reutilização da água, a redução da concentração de nutrientes e de agentes patógenos despejados no meio ambiente. Nutrientes como nitrogênio e o fósforo quando presentes nas águas residuais e liberados no ambiente enriquecem os corpos d'água causando o processo de eutrofização no qual ocorre o crescimento anormal de algas e plantas aquáticas, esgotando o oxigênio nos corpos d'água e dificultando a vida aeróbia neste ambiente (Awuah e Amankwaa- Kuffuor, 2002; National Academy, 2005).

Segundo Von Sperling (2002), existem três níveis de tratamento de águas residuárias: tratamento primário, secundário e terciário. Um tratamento preliminar pode preceder ao tratamento primário. O tratamento preliminar consiste num conjunto de operações físicas para remover da água residual, por exemplo, materiais grosseiros, areias e gorduras. O objetivo desta etapa é proteger os processos de tratamento seguintes, bem como evitar obstruções dos circuitos hidráulicos e contaminações das águas e lodos, permitindo, desta forma, uma maior eficiência do processo. Esse processo é realizado através de (Simões et al., 2008):

a) **Gradeamento:** um sistema de grades, instalado num ou mais canais por onde circula a água residual, que retém os sólidos de maiores dimensões (ex. latas, papéis, paus, folhas etc.). Estes sólidos grosseiros são temporariamente armazenados e posteriormente encaminhados a um destino adequado.

b) **Peneiração:** tem o mesmo efeito que o sistema anterior, mas apresenta uma maior eficiência de remoção pois possui uma malha mais fina que retém os sólidos de menores dimensões. Esta operação é realizada por equipamentos eletromecânicos que podem apresentar vários tipos de configurações.

c) **Desarenação:** podendo ser efetuada de várias formas, o objetivo desta operação é retirar as areias do efluente. Pode consistir, por exemplo, num tanque onde o efluente passa com uma velocidade reduzida, permitindo que as areias assentem por gravidade, sendo posteriormente removidas e encaminhadas para um classificador de areias. As operações de desarenação e remoção de óleos e gorduras podem ser realizadas no mesmo setor de tratamento (desarenadores/desengorduradores).

d) **Remoção de óleos e gorduras:** tem como objetivo retirar as gorduras e óleos existentes e pode recorrer à injeção de um fluxo de ar ascendente no seio do efluente, levando à acumulação de gorduras na superfície. Após a sua remoção, são geralmente encaminhadas para um concentrador de gorduras e, posteriormente, encaminhadas ao destino adequado.

O tratamento primário pode ser constituído por processos físicos e químicos, e tem por objetivo remover os sólidos facilmente sedimentáveis. Pretende-se com este tratamento que a DBO das águas residuais seja reduzida em no mínimo 20% e o total das partículas sólidas em suspensão (SST) das águas recebidas seja reduzido, no mínimo, em

50%. O tratamento primário é efetuado através de sedimentação/decantação ou flotação (Simões et al., 2008):

a) Decantação: tem como objetivo principal retirar os sólidos em suspensão decantáveis (ação da gravidade). Esta operação é realizada num decantador onde a água permanece o tempo suficiente para permitir que as partículas suspensas sedimentem no fundo, sendo também removidas as escumas que se acumulam à superfície dos decantadores. A água clarificada passa para o tratamento secundário, enquanto os lodos primários são recolhidos para posterior tratamento na fase sólida e as escumas são encaminhadas para o concentrador de gorduras do tratamento preliminar.

b) Flotação: é uma operação destinada a remover sólidos de dimensões tão reduzidas que sua separação não é viável somente por ação da gravidade. Consiste na injeção de um fluxo de ar ascendente no interior do tanque sendo os sólidos arrastados juntamente com as bolhas de ar para a superfície, onde são recolhidos e encaminhados para tratamento na fase sólida.

O tratamento secundário é constituído geralmente por processos biológicos e visa retirar a matéria orgânica biodegradável existente no efluente, na forma coloidal, dissolvida ou suspensa, que não foi retirada através de tratamento primário (Simões et al., 2008).

Os processos biológicos são métodos de tratamento em que a remoção da matéria orgânica ocorre por meio da ação de microrganismos que promovem a oxidação dos materiais biodegradáveis. Tais processos procuram reproduzir, em espaços predefinidos, os fenômenos biológicos observados na natureza. A matéria orgânica complexa é transformada em substâncias simples, como sais minerais, gás carbônico e outros, caracterizando, assim, o fenômeno da autodepuração (Sant'Anna, 2013).

Os processos biológicos, aeróbios e anaeróbios, são amplamente empregados em sistemas de tratamento de águas residuárias. Em cada processo há diferenças quanto ao crescimento microbiano (disperso ou aderido); quanto ao fluxo (contínuo ou intermitente) e quanto à hidráulica (mistura completa, fluxo pistão ou fluxo arbitrário). Para propiciar condições adequadas à microbiota envolvida no tratamento das águas é necessário observar os fatores ambientais e os parâmetros de projeto. Fatores como pH, temperatura, características da matéria orgânica/tipo de resíduo, concentração de substrato também influenciam no desenvolvimento do projeto e, principalmente, no desenvolvimento dos microrganismos (Mendonça, 2002).

Algumas condições são essenciais para a efetiva degradação da matéria orgânica, dentre elas: a comunidade de microrganismos ativos, o contato adequado entre estes e a matéria a ser degradada, a disponibilidade de oxigênio e nutrientes. As condições ambientais também devem ser favoráveis, principalmente em termos de pH, temperatura e tempo de contato (Ferreira and Coraiola, 2008).

### 3.2. Lodo Ativado

O sistema de lodos ativados consiste em uma complexa associação de microrganismos composta por bactérias, arqueias, protistas, fungos e micro metazoários que oxidam os compostos orgânicos e inorgânicos presentes nos efluentes (Bento et al., 2005; Davies, 2005). As bactérias são os organismos mais numerosos com respeito ao número de espécies e biomassa total (Bento et al., 2005).

A estrutura do lodo é dividida em dois níveis: macroestrutura e microestrutura. A macroestrutura é responsável pela estruturação do lodo, sendo formada principalmente

por bactérias filamentosas. A microestrutura é constituída por bactérias e arqueias formadoras do lodo, bem como protozoários, micro metazoários e fungos, que são responsáveis por manter o equilíbrio do floco (Bento et al., 2005). A comunidade estabelecida nesse sistema é dinâmica e fundamental ao tratamento, sendo que cada espécie tem sua importância para o bom funcionamento do sistema (Amman et. al., 1997). A estrutura dessa comunidade apresenta forte relação com as condições operacionais e com a qualidade e de efluente do processo (Vazoller et al., 1999).

O processo de lodos ativados é estritamente biológico e aeróbio, no qual o esgoto bruto afluente e o lodo ativado são misturados, agitados e aerados em unidades denominadas tanques de aeração. Após este procedimento, o lodo formado é enviado para o decantador secundário, onde a parte sólida é separada do esgoto tratado, sendo este último descartado. O lodo decantado retorna ao tanque de aeração ou é retirado para tratamento específico (Vilanova et al., 2005).

De acordo com Von Sperling (2002), o sistema de lodos ativados é amplamente utilizado para o tratamento de despejos domésticos e industriais, e em situações em que é necessária uma elevada qualidade do efluente e reduzido requisito de área.

As seguintes unidades são parte integrante da etapa biológica do sistema de lodos ativados (Figura 1):

1. Tanque de aeração (reator)
2. Tanque de decantação
3. Recirculação de lodo

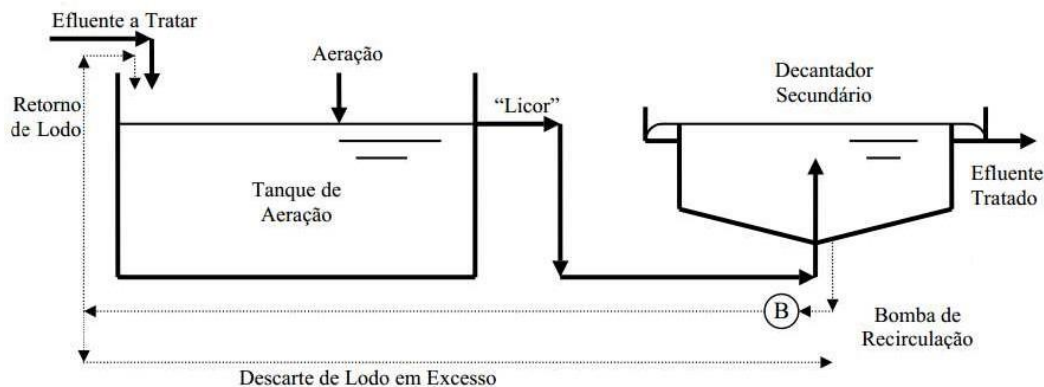


Figura 1. Operação de processo de lodos ativados (Fonte: Von Sperling, 2002).

No reator ocorrem as reações bioquímicas de remoção da matéria orgânica e, em determinadas condições, da matéria nitrogenada. A biomassa se utiliza do substrato presente no efluente para se desenvolver. No decantador secundário, ocorre a sedimentação dos sólidos (biomassa) permitindo que o efluente final saia clarificado. Os sólidos sedimentados no decantador secundário são recirculados para o reator aumentando a concentração de biomassa no sistema, acarretando o aumento da eficiência do sistema. A biomassa consegue ser facilmente separada no decantador secundário devido a sua propriedade de flocular. O processo de tratamento por lodos ativados fundamenta-se na floculação da biomassa de lodo. Esses flocos são formados por um consórcio de microrganismos com capacidade de utilizar os compostos presentes no efluente como fonte de nutrientes e carbono.

O sistema de lodos ativados possui algumas variantes:

- Sistema de Lodo Ativado Convencional

O sistema de lodo ativado convencional é constituído por reator e decantadores primário e secundário. Este sistema possui decantador primário para que a matéria orgânica em suspensão sedimentável seja retirada antes do tanque de aeração gerando



assim uma economia no consumo de energia. O tempo de detenção hidráulico é bem baixo, da ordem de 6 a 8 horas e a idade do lodo em torno de 4 a 10 dias. Como o lodo retirado ainda é jovem e possui grande quantidade de matéria orgânica em suas células há necessidade de uma etapa de estabilização do lodo (Von Sperling, 2002).

- Sistema de Lodo Ativado de Aeração Prolongada (Fluxo Contínuo)

Além do processo físico-químico ocorre o processo biológico de lodos ativados com aeração prolongada (figura 2). O processo recebe este nome devido ao fato da biomassa permanecer no sistema por um período mais longo, da ordem de 18 a 30 dias, recebendo a mesma carga de DBO (demanda bioquímica de oxigênio), havendo assim menor disponibilidade de alimento para as bactérias. Uma vez que há menor quantidade de matéria orgânica por unidade de volume do tanque de aeração e por unidade de biomassa do reator, os microrganismos são obrigados a utilizar, de forma mais intensa nos seus processos metabólicos, a matéria orgânica biodegradável que compõe suas células. Assim, já ocorre a estabilização da biomassa de forma aeróbia no próprio tanque de aeração (Von Sperling, 2002).

- Sistema de Lodos Ativados de Fluxo Intermitente (Batelada)

Neste sistema há apenas uma unidade e todas as etapas de tratamento do esgoto ocorrem dentro do reator. Estas etapas são sequências no tempo e não mais unidades distintas. A biomassa permanece no tanque não havendo necessidade de sistema de recirculação de lodo. Um sistema de lodos ativados de fluxo intermitente possui ciclos bem definidos de operação. São estes: enchimento, reação, sedimentação, esvaziamento e repouso. Em sistemas que recebem esgotos de forma contínua, como por exemplo, as estações que recebem esgotos domésticos, há a necessidade de ser ter mais de um tanque de aeração trabalhando em paralelo, pois um tanque que está no ciclo de decantação não

pode estar recebendo esgotos e para isso deve haver um outro tanque que esteja no ciclo de enchimento. Este sistema pode funcionar tanto como um de lodos ativados convencional como um de aeração prolongada (Von Sperling, 2002).



Figura 2. Tanque de aeração. Lodo ativado de aeração prolongada – Superintendência de Tratamento de Efluentes Líquidos (SITEL).

### 3.3. Comunidade Microbiana Presente em Lodos Ativados

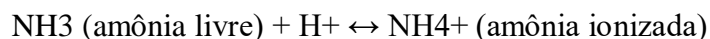
A maioria das bactérias presentes em sistemas de lodo ativado são quimioheterotróficas e Gram-negativas, oxidam a matéria orgânica a dióxido de carbono e água e utilizam oxigênio molecular como aceptor de elétrons (Jenkins et al., 2003). Também são encontradas bactérias quimioautotróficas que realizam a síntese orgânica a partir de gás carbônico e água utilizando com fonte de energia a oxidação aeróbia de compostos inorgânicos formados por nitrogênio, enxofre e ferro (Eckenfelder, 1992).

Sistemas de lodo ativado têm capacidade de remoção tanto de matéria orgânica como de nutrientes (nitrogênio, enxofre e fósforo). No tratamento biológico, as bactérias

heterotróficas são responsáveis pela remoção de material carbonáceo e as autotróficas em conjunto com heterotróficas removem material nitrogenado (Pavlostathis, 2006).

### 3.3.1. Microrganismos Nitrificantes

No esgoto municipal, o nitrogênio pode se apresentar em diversas formas, sendo as mais encontradas: nitrogênio orgânico (N-Orgânico), nitrogênio amoniacal (íon amônio:  $\text{NH}_4^+$  + gás amoníaco:  $\text{NH}_3$ ), nitrito (N- $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato (N- $\text{NO}_3^-$ ). A amônia existe em ambientes aquáticos tanto na forma de íon ( $\text{NH}_4^+$ ), como na forma livre não ionizada ( $\text{NH}_3$ ), segundo o seguinte equilíbrio dinâmico (Von Sperling, 2002):

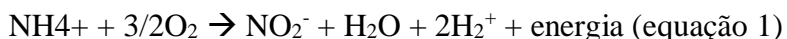


A amônia é o principal composto de nitrogênio do efluente domésticos e está presente em efluentes gerados pela indústria de petróleo (Furlan, 1996). A remoção biológica da amônia em estação de tratamento de águas residuais se dá por conversão em azoto gasoso por nitrificação e desnitrificação (Von Sperling, 2002).

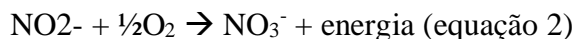
A nitrificação biológica é um processo fisiológico de nitrificação que ocorre em duas etapas consecutivas: nitritação e nitratação. Na nitritação, as bactérias oxidadoras de amônio (AOA) oxidam o amônio a nitrito (Equação 1), e dentro desse grupo podem ser encontrados gêneros como: *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* e *Nitrospira*, sendo que as mais estudadas são as *Nitrosomonas*. Continuando, na nitratação, as bactérias oxidadoras de nitrito (NOB) oxidam o nitrito a nitrato (Equação 2) e dentro desse grupo se encontram os gêneros: *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Nitrospina* e *Nitrococcus*; sendo as mais estudadas as *Nitrobacter* (Antileo et al., 2003; Beltran, 2008; Ciudad, 2007).

Exemplificando o processo, tem-se (Metcalf and Eddy, 2003):

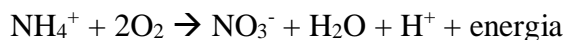
- Nitritadoras ou bactérias oxidantes de N-amoniacal:



- Nitratadoras ou bactérias oxidantes de nitrito:



- Equação global para a nitrificação:



As bactérias nitrificantes são sensíveis a vários fatores ambientais, como concentração de substrato, pH, temperatura, concentração de oxigênio, entre outros. Os substratos das bactérias nitrificantes são as formas não iônicas de amônia e de nitrito ( $\text{NH}_3$  e  $\text{HNO}_2$ , respectivamente), devido ao menor requerimento energético associado ao transporte desses até o interior da célula. O pH e a temperatura determinam o equilíbrio químico entre as formas iônicas e não iônicas (Ciudad, 2007). O pH tem importante efeito sobre a taxa de nitrificação, sendo recomendados valores dentro da faixa ótima de 7,0 a 8,5 dependendo da formação de amônia livre e do ácido nitroso livre.

Se o pH é alcalino (>8,0) o equilíbrio se desloca até a formação de amônia favorecendo a atividade das AOB. A atividade das NOB é fortemente dependente da concentração de amônia (Anthonisen et al., 1976). No entanto, em pH menores de 6,0, tanto as AOB quanto as NOB decrescem sua atividade (Beltran, 2008). A taxa de crescimento máxima de microrganismos nitrificantes é significativamente afetada pela temperatura. Para cada acréscimo de aproximadamente  $7^\circ\text{C}$  na temperatura, a taxa de crescimento dobra e, inversamente, cada queda de  $7^\circ\text{C}$  implica na redução pela metade (Von Sperling, 2002). Segundo alguns autores foram observados a ocorrência de nitrificação numa faixa de 5 a  $50^\circ\text{C}$ , mas a temperatura ótima encontra-se na faixa de  $25^\circ\text{C}$  a  $36^\circ\text{C}$  (Barnes and Bliss, 1983; Kim, Lee and Keller 2006).

Dentre fatores limitantes, a presença do oxigênio também afeta o crescimento das bactérias nitrificantes e afigura-se que a concentração de oxigênio dissolvido (OD) crítica encontra-se em torno de 0,2 mg/L (Barnes and Bliss, 1983). Porém existe divergência entre os autores, podendo essa faixa limítrofe ser de 0,5 mg/L (Downing, 1978) até 2,0 mg/L (EPA, 1983).

### 3.3.2. Microrganismos Desnitrificantes

A desnitrificação é a redução biológica de nitrato a óxido nítrico, óxido nitroso e nitrogênio molecular usando-se material orgânico como redutor e sem a presença de oxigênio dissolvido (Von Sperling, 2002, Metcalf and Eddy, 2003). Microrganismos que apresentam a capacidade para desnitrificação exibem elevada diversidade taxonômica e abrangem vasta gama de características fisiológicas, a maior parte pertencente às subclasses  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\epsilon$ -*Proteobacteria* e ao Domínio *Archaea* (Philippot, 2005; Shao et al., 2010).

São grupos reconhecidos entre os microrganismos desnitrificantes alguns membros de *Archaea* hipertermófilas e alcalifílicas (Han, 2006; Lee et al., 2008), as espécies *Acidovorax delafieldii* e *Acidovorax temperans*, *Hyphomicrobium denitrificans* e *Brachymonas denitrificans* e anammox.

A capacidade de desnitrificação está relacionada com a quantidade de substrato biodegradável presente (relação carbono orgânico/nitrogênio) (Liu et al., 2010). Geralmente, nos tratamentos biológicos de efluentes a presença de substrato facilmente degradável é baixa. De acordo com Cox (2009), a velocidade de crescimento dos microrganismos desnitrificantes depende da presença de matéria orgânica e da

concentração de NO<sub>x</sub> (nitrito e nitrato, aceptores finais de elétrons). Pouco se sabe das condições que definem a composição de desnitrificadores ativos em estação de tratamento de águas residuais, embora se saiba que existe uma forte dependência entre desnitrificantes e doadores de elétrons disponíveis (Hagman et al., 2008; Morgan-Sagastume et al., 2008). Em sistemas de tratamento de efluentes várias fontes importantes de carbono estão presentes como aminoácidos, ácidos graxos de cadeia longa e açúcares, que podem atuar como doadores de elétrons auxiliando a desnitrificação (Morgan-Sagastume et al., 2008).

A ausência de oxigênio é um pré-requisito fundamental para a ocorrência da desnitrificação. A necessidade é de que haja condições anóxicas no floco, ou seja, na vizinhança imediata das bactérias desnitrificantes. Desta maneira, pode ser que haja reduzidos teores de oxigênio dissolvido no meio líquido, e mesmo assim ocorra desnitrificação, pelo fato das bactérias desnitrificantes estarem em um microambiente anóxico (Von Sperling, 2002). No entanto, estudos relatam a ocorrência de bactérias desnitrificantes aeróbias, como a *Paracoccus pantotropha* (Robertson et al., 1985), *Thauera mechernichensis* sp. nov.TL1T (Scholten et al., 1999) e *Klebsiella pneumonia* CF-S9 (Padhi et al., 2013). Estas bactérias podem reduzir o nitrato em nitrogênio gasoso sob condições aeróbias, indicando o potencial de nitrificação e desnitrificação simultâneas.

Desnitrificadores aeróbios podem conduzir uma respiração aeróbia, no qual o nitrato é gradualmente reduzido para N<sub>2</sub> (Ji et al., 2013). A enzima nitrato redutase periplasmática (Nap) desempenha um papel chave na conversão de nitrato em nitrito sob condições aeróbias. Esta enzima está localizada na membrana periplasmática da célula e é capaz de manter sua atividade na presença do oxigênio (Sparacino-Watkins et al., 2014).

O efeito da temperatura manifesta-se na taxa de crescimento das bactérias desnitrificantes. A reação de desnitrificação ocorre em ampla faixa de temperatura, de 0°C a 50°C, com um ótimo na faixa de 35°C a 50°C (Barnes and Bliss, 1983).

Existe certa variação na literatura com relação ao pH ótimo para a desnitrificação apresentando uma faixa de valores de 7,5 a 9,2 (Arceivala, 1981), porém outros autores sugerem uma faixa de 6,5 a 7,5 (Barnes and Bliss, 1983). De acordo com a EPA (1993), a taxa máxima de pH fica entre 7,0 e 7,5, decrescendo linearmente com redução ou aumento do pH. Apesar da variação das informações, pode-se concluir que o pH deve situar-se próximo da neutralidade.

### 3.3.3. Bactérias Redutoras de Sulfato

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são microrganismos anaeróbios que usam sulfato como aceptor final de elétron na degradação de compostos resultando na produção de sulfeto. Além disso, são microrganismos amplamente difundidos na natureza (Muyzer and Stams, 2008).

Em condições óxicas o sulfeto sofre oxidação espontânea sob pH neutro. As bactérias quimiolitotróficas oxidantes de enxofre, em condições aeróbias, podem catalisar a oxidação do sulfeto. Havendo disponibilidade de luz a oxidação anóxica do sulfeto pode ser realizada também por bactérias fototróficas sulfurosas púrpuras e verdes (Madigan, 2016).

Embora nomeados devido a sua capacidade de usar o sulfato como um aceptor final de elétrons, os redutores de sulfato podem usar outros aceptores para o crescimento e podem fermentar outros substratos na ausência de receptores de elétrons inorgânicos. A

ocorrência de altos números de BRS em um ambiente não reflete necessariamente a ocorrência de redução de sulfato, pois as SBR podem reduzir outros compostos de enxofre (tiosulfato, sulfito e enxofre) a sulfeto ou podem reduzir nitrato e nitrito a amônio (Dalsgaard and Bak, 1994; Moura et al., 1997). Outros compostos, como ferro (Fe (III)) (Park et al., 2007), uranila (U (VI)) (Lovley and Phillips, 1992), pertecnetato (Tc (VII)) (Lloyd et al., 1999), selenato (Se (VI)) (Tucker and Thompson, 1998), cromato (Cr (VI)) (Lovley and Phillips, 1994) e arsenato (As (VI)) (Macy et al., 2000) também podem servir como aceptores finais de elétrons para algumas BRS. No entanto, nem todos esses processos de redução estão acoplados ao crescimento desse microrganismo.

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) estão presentes nas proximidades de microrganismos que consomem oxigênio, criando condições nas quais as bactérias anaeróbias estritas podem se desenvolver. Algumas cepas de SBR são irreversivelmente inativadas em baixas concentrações de oxigênio, enquanto outras sobrevivem à aeração, embora a redução de sulfato seja suprimida pelo oxigênio (Mogensen et al., 2005; Kjeldsen et al., 2004).

Dilling e Cypionka (1990) descreveram BRS que utilizam oxigênio e que podem até mesmo acoplar a respiração aeróbia à formação de ATP. O microrganismo *Desulfovibrio oxyclinae* foi isolado da camada superior de um ambiente hipersalino e mostrou crescimento dependente de oxigênio e com maiores taxas de crescimento após a exposição ao gás (Sigalevich et al., 2000).

BRS já foram detectadas e/ou isoladas a partir de sedimentos marinhos (Mussmann et al., 2005), fontes hidrotermais (Jeanthon et al., 2002), escoamentos de hidrocarbonetos (Kniemeyer et al., 2007), campos de petróleo (Minz et al., 1999),



sedimentos de água doce (Sass et al., 1998), rizosfera de plantas (Hines et al., 1999), aquíferos e em estações de tratamento de efluentes (Dar et al., 2007; Ben-Dov, 2007).

As BRS são compostas por espécies mesofílicas que apresentam temperatura ótima de crescimento próxima de 30 °C, mas toleram temperaturas de até 42 °C. Espécies termofílicas também são encontradas dentro das BRS sendo capazes de crescer em temperaturas entre 50°C e 70°C (Postgate,1979).

#### 3.4. Lagoas de estabilização

Lagoas de estabilização são grandes reservatórios de pequena profundidade, delimitados por diques de terra nas quais as águas residuárias brutas ou pré-tratadas são estabilizadas por processos biológicos inteiramente naturais, envolvendo algas, bactérias e procariotos, necessitando apenas da energia da luz solar e da energia proveniente das reações químicas (Silva and Mara, 1979). O princípio de funcionamento dessas lagoas é o de um reator biológico no qual a matéria orgânica biodegradável (proteínas, carboidratos e gorduras) é oxidada biologicamente, sendo convertida em moléculas simples e estáveis, tais como dióxido de carbono, fosfato, sulfato, nitrato e água. Podem tratar, efetivamente, além das águas residuárias produzidas pelas atividades domésticas, as águas residuárias industriais ou agrícolas, desde que estas não contenham substâncias tóxicas aos microrganismos envolvidos no processo, fornecendo efluentes de qualidade conforme os padrões estabelecidos (Oliveira, 1990). Nas lagoas de estabilização atuam diferentes mecanismos de tratamentos. De acordo com Oliveira (1990), podem ser destacados:

a) O efeito reservatório, o qual expressa a capacidade de diluição da lagoa e permite a absorção de choques de carga orgânica e hidráulica.

b) A estabilização da matéria orgânica envolve, primeiramente, os processos físico-químicos. Os sólidos suspensos passíveis de sedimentação se depositam no fundo da lagoa, esse processo ocorre principalmente nas lagoas facultativas primárias e em lagoas anaeróbias que recebem águas residuárias brutas.

c) Biodegradação de compostos orgânicos através dos processos biológicos que atuarão para completar a estabilização da matéria orgânica, através da degradação anaeróbia dos sólidos sedimentados e da degradação aeróbia ou facultativa do material dissolvido.

A biodegradação da matéria orgânica via digestão anaeróbia e oxidação aeróbia constitui-se no mecanismo mais importante para a remoção de material orgânico em um sistema de tratamento biológico no qual as bactérias utilizam a matéria orgânica como fonte de energia (catabolismo) ou para a síntese de material celular (anabolismo) transformando-o em produtos estáveis. A parte catabólica se divide em dois processos: catabolismo oxidativo e o fermentativo. O catabolismo oxidativo é uma reação redox na qual a matéria orgânica redutora é oxidada por um oxidante também presente no meio líquido (oxigênio, nitrato ou sulfato). O catabolismo oxidativo, que também se chama respiração aeróbia, quando o oxigênio é o oxidante, e anaeróbia quando nitrato ou sulfato são aceptores de elétrons do material orgânico. No catabolismo fermentativo não há presença de um oxidante, o processo ocorre devido ao rearranjo de elétrons na molécula fermentada formando no mínimo dois produtos. Geralmente, para que se formem produtos estabilizados são necessárias várias fermentações sequenciais (Van Haandel and

Lettinga, 1994). Um processo fermentativo muito importante é a digestão anaeróbia, pois, sendo considerada como uma última fermentação, seus produtos são estáveis.

Os sistemas de lagoas de estabilização constituem-se na forma mais simples para o tratamento de efluentes. Há diversas variantes dos sistemas de lagoas de estabilização, com diferentes níveis operacionais e requisitos de área. Os principais tipos de lagoas, que normalmente compõem os sistemas de tratamento, são classificados de acordo com a atividade biológica predominante que é determinada pela carga orgânica afluenta. A profundidade, por sua vez, determina a fração da massa líquida com maior penetração de luz e conseqüentemente maior taxa fotossintética (Andrade Neto, 1997).

Lagoas anaeróbias e facultativas são utilizadas para remoção da matéria orgânica carbonácea, enquanto lagoas de maturação possuem a finalidade de reduzir o número de organismos patogênicos. As lagoas que funcionam em condição predominante de anaerobiose recebem elevada carga de matéria orgânica, o que resulta numa taxa de consumo superior à de produção. Tais lagoas são denominadas anaeróbias e sua maior profundidade aliada à alta atividade biológica impede a presença de oxigênio dissolvido nas camadas mais inferiores da coluna de água (Von Sperling, 2002).

As lagoas podem ser classificadas como: anaeróbia, facultativa, maturação e polimento levando-se em consideração a carga superficial ou volumétrica aplicada, oxigênio dissolvido na massa líquida e as características físicas do sistema.

- Lagoa Anaeróbia

A principal função da lagoa anaeróbia, de acordo com Mozaheb et al., (2010), é estabilizar águas residuárias com elevada carga orgânica não necessariamente produzindo efluente de boa qualidade. Com isso, devido à ineficiência do tratamento em atender os

requisitos de descarte de efluentes, este requer o uso de outro sistema de tratamento para adequar o efluente para o descarte em corpos aquáticos ou reuso agrícola.

- Lagoas de Maturação e Polimento

Lagoas de maturação e polimento são aplicadas para a realização de tratamentos terciários, cujo objetivo é remover microrganismos patogênicos. Apresentam condição estritamente aeróbia e características semelhantes, diferindo apenas quanto ao tipo de efluente que será aplicado o pós-tratamento. Von Sperling et al., (2002) descreveram lagoa de polimento como uma forma de lagoa de maturação, onde seu tratamento será aplicado para melhorar a qualidade dos efluentes de reatores anaeróbios de manta de lodo e fluxo ascendente (digestor anaeróbio de fluxo ascendente - UASB), tendo como objetivo a remoção de organismos patogênicos de modo que o efluente gerado após o tratamento possa ser descartado de forma segura em um corpo de água ou usado para irrigação.

- Lagoa Facultativa

Segundo Von Sperling (2002), em uma lagoa facultativa, ocorrem três zonas, classificadas em função da presença ou ausência de oxigênio: aeróbia, anaeróbia e facultativa. A Figura 3 ilustra um esquema de uma lagoa facultativa com as suas três zonas.

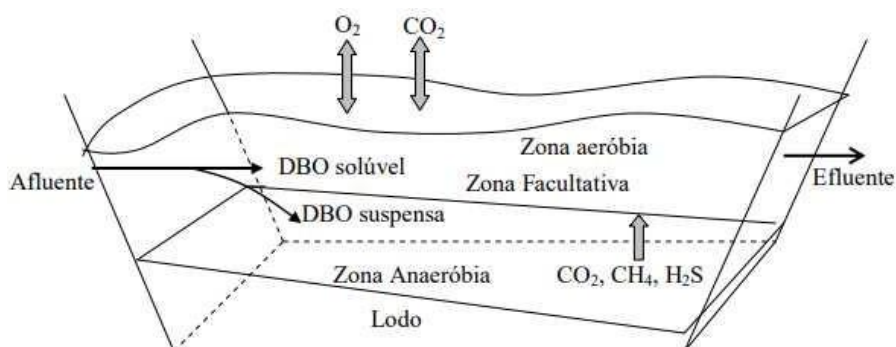


Figura 3. Zonas em Lagoa Facultativa (Fonte: Von Sperling, 2002).

Zona anaeróbia: A matéria orgânica em suspensão (DBO particulada) tende a sedimentar, vindo a constituir o lodo de fundo (zona anaeróbia). Este lodo sofre o processo de decomposição por microrganismos por processo anaeróbio com a produção de gases como metano, gás carbônico e sulfídrico. O gás sulfídrico gerado não causa problemas de mau cheiro pelo fato de ser oxidado por processos químicos e bioquímicos na camada aeróbia superior. Após certo período, apenas a fração inerte (não biodegradável) permanece na camada de fundo da lagoa (Von Sperling, 2002).

Zona aeróbia: a matéria orgânica dissolvida, conjuntamente com a matéria orgânica em suspensão de pequenas dimensões, não sedimenta permanecendo dispersa na massa líquida. Na camada superficial as bactérias aeróbias realizam a decomposição da matéria orgânica. O metabolismo das algas presentes nesta camada aumenta a concentração do oxigênio favorecendo o metabolismo microbiano aeróbio. Respiração e fotossíntese são reações de oxidação-redução realizadas por bactérias, cianobactérias e algas. A energia utilizada para fotossíntese é suprida pela radiação do sol. Por isto, durante a noite não ocorre fotossíntese; as algas respiram consumindo oxigênio dissolvido no líquido. Durante o dia, como há consumo de CO<sub>2</sub>, o pH se eleva podendo atingir o valor de 10,0. Durante a noite, com a produção de CO<sub>2</sub>, o pH se reduz. A elevação de pH durante o dia causa a conversão da amônia ionizada em amônia livre, que pode escapar para a atmosfera. Tem-se assim, um perfeito equilíbrio entre o consumo e a produção de oxigênio e gás carbônico (Von Sperling, 2002).

Zona facultativa: a penetração da luz diminui com a profundidade da lagoa, desta forma, a fotossíntese reduz-se até chegar ao ponto em que deixa de ocorrer. Existe uma camada intermediária em que as variações das taxas de fotossíntese e respiração resultam em ausência de oxigênio em certos períodos e presença em outros.

### 3.5. Comunidade Microbiana Presente em Lagoas de Estabilização

O tratamento das águas residuárias em lagoas de estabilização apresenta ação conjunta de diferentes espécies de microrganismos e, portanto, elevada versatilidade metabólica. Ecossistemas estratificados promovem o estabelecimento de diferentes *micro-habitat* favorecendo a diversidade metabólica e, conseqüentemente, a distribuição de diferentes populações microbianas. Estabelecidos verticalmente, os gradientes físicos e químicos podem acomodar distintas populações dependendo de suas fisiologias. Dessa forma há um estabelecimento de uma estrutura microbiana complexa (Aguila, 2007).

Os principais decompositores primários na lagoa facultativa são os procariontes facultativos e os aeróbios. Os tipos microbianos dominantes neste sistema são similares àqueles encontrados em outros sistemas de tratamento aeróbios e pertencem, principalmente, aos gêneros *Pseudomonas* sp., *Achromobacter* sp. e *Flavobacterium*; além de grupos como os coliformes, arqueias anaeróbias, bactérias redutoras de sulfato e bactérias púrpuras do ciclo do enxofre (Gray, 1989).

As bactérias fototróficas púrpuras são representadas pelas famílias *Chromatiaceae*, *Rhodospirillaceae* e *Ectothiorhodospiraceae*; enquanto as bactérias fototróficas verdes, pelas famílias *Chloroflexaceae*, *Chlorobiaceae* e *Heliobacteriaceae*. Na família *Rhodospirillaceae* encontram-se distribuídas as bactérias púrpuras não sulfurosas, fototróficas facultativas, que crescem em condições foto-heterotróficas e foto-autotróficas (Madigan et al., 2016).

Em processos de purificação de água residuária, as bactérias fototróficas vivem em simbiose com outros heterótrofos e fotoautótrofos (NG et al., 1989). As bactérias

fototróficas púrpuras e verdes são encontradas em ampla variedade de habitats aquáticos, inclusive em lagos ricos em sulfeto, lagoas poluídas por esgoto e em águas termais. Nos lagos, esses microrganismos podem apresentar densidades extremamente altas sob condições ambientais favoráveis que incluem quantidade suficiente de luz na região anaeróbia, além da presença de doadores de elétrons (Varesche, 1997).

### 3.5.1. Remoção de Nitrogênio

Os principais mecanismos de remoção do nitrogênio em lagoas de estabilização são (EPA, 1983):

- Volatilização da amônia
- Assimilação da amônia pelas algas
- Assimilação dos nitratos pelas algas
- Nitrificação-desnitrificação
- Sedimentação do nitrogênio orgânico particulado

Destes mecanismos, o mais importante é a volatilização da amônia. A amônia livre é passível de volatilização, ao passo que a amônia ionizada não pode ser removida pelo mesmo processo. O deslocamento da reação de equilíbrio (equação 4), desloca-se de acordo com o pH do meio, em pH em torno da neutralidade praticamente toda a amônia encontra-se na forma de  $\text{NH}_4^+$ . No pH próximo a 9,5 aproximadamente 50% da amônia está na forma de  $\text{NH}_3$  e 50% na forma de  $\text{NH}_4^+$ . Em pH 11,0 praticamente toda a amônia está na forma de  $\text{NH}_3$  (Von Sperling, 2002).



A fotossíntese contribui para a elevação do pH por retirar do meio líquido o CO<sub>2</sub>, ou seja, a acidez carbônica. Em condições de alta taxa de fotossíntese, a elevada produção de algas contribui para o consumo direto de NH<sub>3</sub> pelas algas. O mecanismo de volatilização tende a ser mais importante em lagoas com reduzida profundidade, já que, em profundidades mais reduzidas, a intensa atividade fotossintética e, conseqüentemente, a considerável elevação de pH, distribui-se ao longo de toda a coluna d'água. Demais mecanismos de remoção de nitrogênio atuam simultaneamente e são de menor importância. A nitrificação é pouco representativa em lagoas facultativas e lagoas aeradas (Von Sperling, 2002).

### 3.6. Técnicas de Identificação de Microrganismo Ambientais

Nosso conhecimento sobre a diversidade microbiana e seu papel na natureza é limitado, principalmente devido às limitações das técnicas de microbiologia tradicional. A classificação baseada na morfologia é restrita, uma vez que os microrganismos são pequenos, visualmente simples e geralmente não apresentam características externas conspícuas marcantes e robustas. Além disso, a classificação baseada nas características fisiológicas e bioquímicas é insuficiente, estima-se que aproximadamente 99% de todos os microrganismos presentes na natureza não podem ser isolados em culturas puras, devido à limitação das condições de cultivos ao tentarem simular as condições naturais do ambiente do qual o microrganismo foi isolado (Amann et al., 1995).

Uma grande parte dos microrganismos existentes não é capaz de crescer nos meios de cultivo tradicionais. Embora, a parcela de microrganismos ditos como cultiváveis varie entre os diferentes tipos de amostra, sabe-se que a recuperação da diversidade é muito



baixa, desse modo o conhecimento sobre a ecologia microbiana na maior parte dos ecossistemas é pouco conhecido (Torsvik and Ovreas, 2002).

Os microrganismos que conseguem crescer em meios artificiais não são necessariamente metabolicamente ou numericamente dominantes no meio natural de onde foram retirados, havendo uma forte seleção em função da habilidade dos microrganismos em se desenvolverem em meios com determinadas concentrações de nutrientes e geralmente em condições aeróbias (Hugenholtz, 2002; Myuzer and Ramsing, 1995).

Por consequência, a abordagem baseada em cultivo tem limitado a estimativa da diversidade microbiana devido à limitação de cultivo da maioria dos microrganismos pelos métodos convencionais (Myuzer, 1999).

Inúmeras espécies de bactérias estão presentes no lodo ativado, mas apenas uma pequena fração pode ser detectada por técnicas baseadas em métodos de cultura. Dentre elas, particularmente as bactérias Gram-negativas, constituem o principal componente das bactérias do lodo. Utilizando técnicas baseadas em cultura, descobriu-se que os principais gêneros presentes no lodo ativado são: *Zooglea*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Corynebacterium*, *Comomonas*, *Brevibacterium*, *Acinetobacter*, *Bacillus* sp., assim como a presença de microrganismos filamentosos responsáveis pelo “bulking” do lodo ativado: *Sphaerotilus*, *Beggiatoa*, *Vitreoscilla* (Bitton, 2011).

Em sistemas de lagoas de estabilização, os grupos bacterianos presentes são os mesmos encontrados em outros sistemas de tratamento, uma vez que o processo de degradação microbiana da matéria orgânica é similar aos demais sistemas biológicos.

Dentre os organismos que têm importante função nas lagoas de estabilização, encontram-se *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Alcaligenes* (Rivera et al., 1986).

### 3.6.1. Biologia Molecular e a Ecologia Microbiana

A introdução de técnicas de biologia molecular aplicadas à ecologia microbiana alterou profundamente a compreensão da diversidade microbiana. Através destas técnicas, que se baseiam na especificidade das sequências dos ácidos nucleicos (DNA ou RNA), muitos filotipos e divisões filogenéticas têm sido reformuladas e descritas (Hugenholtz et al., 1998).

Ferramentas moleculares vêm reduzindo essas limitações e revelando nova perspectiva sobre a diversidade microbiana. Novos métodos de detecção de microrganismos, sem necessariamente cultivá-los, certamente contribuem para o entendimento da ecologia microbiana em amostras ambientais. O desenvolvimento da biologia molecular permitiu a mudança de alcance em estudo da diversidade microbiana (Myuzer, 1999).

A técnica de PCR tem permitido grandes avanços em estudos de biologia molecular, particularmente para estudos de comunidades microbianas, por ser uma metodologia sensível, específica e de rápida execução (Lehninger; Nelson; Cox, 2002).

O gene 16S rRNA é muito conservado entre os domínios *Bacteria* e *Archaea*. A identificação taxonômica, utilizando 16S rRNA, é possível devido a presença de nove regiões hipervariáveis. Essas regiões são flanqueadas por regiões conservadas permitindo à amplificação desses fragmentos utilizando oligonucleotídeos iniciadores universais (Head et al., 1998; Zwirgmaier, 2005; Sanz et al., 2007). As sequências de rRNA não

necessitam de cultivo prévio por serem analisadas a partir de qualquer amostra tanto ambiental quanto clínica (Sanz et al, 2007).

Técnicas de biologia molecular vêm sendo utilizadas em amostras de sistemas de tratamento de águas residuais, principalmente para o estudo de comunidades ou grupos específicos presentes em UASB (digestor anaeróbico de fluxo ascendente) (Shenbin et al., 2016; Keyser et al, 2006), lodos ativados (Congyuan et al., 2014; Wanga et al., 2016), reatores anaeróbios em batelada, lagoas de estabilização (Subhasis et al., 2016; Eland et al., 2018), e outros ambientes.

Embora a análise molecular seja considerada um método revolucionário para estudar comunidades e a diversidade microbiana, assim como para complementar e suprir as limitações dos métodos dependentes de cultivo, essa técnica está sujeita a erros que devem ser levados em consideração na análise de dados. O tipo de lise empregado na extração de DNA, os iniciadores escolhidos para amplificação de DNA, a amplificação preferencial a certos tipos de sequências e a possibilidade de resultar em formação de quimeras e artefatos na amplificação (Reysenbach et al., 1992; Farrelly et al., 1995; Von Wintzingerode et al., 1997; Osborne et al., 2005) devem ser avaliados.

#### 3.6.1.1. Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante

A técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) utilizada primeiramente por Muyzer et al. (1993) para avaliação da diversidade microbiana é utilizada principalmente para estudos populacionais, onde apresenta alto poder discriminatório entre as amostras ambientais. O DGGE pode ser utilizado como uma

técnica de “fingerprint” para analisar o perfil da diversidade de uma comunidade microbiana quantitativamente e qualitativamente.

A DGGE se baseia na mobilidade eletroforética de fragmentos de DNA parcialmente desnaturados de mesmos tamanhos, mas de diferentes sequências de pares de base amplificados por PCR de uma mesma amostra ambiental, em um gel de poliacrilamida que contém gradiente linear desnaturante crescente composto por ureia e formamida (Muyzer et al., 1993). Quando sequências de mesmos pares de bases atingem a temperatura de desnaturação a uma determinada posição no gel, a migração cessa. Sequências de pares de bases diferentes irão parar de migrar em diferentes posições devido à variação de gradiente de desnaturação e, assim, podem ser separados pela DGGE (Lerman et al., 1984). As duas cadeias de DNA se separam em uma temperatura específica, dependendo das pontes de hidrogênio formadas entre as duas fitas (Dorigo et al., 2005).

Uma sequência de oligonucleotídeo rica em guanina e citosina (grampo de GC) que varia entre 30 e 40 de base é anexada no final 5' do oligonucleotídeos iniciador forward, modificando o comportamento de desnaturação (Muyzer and Smalla, 1998; Dorigo et al., 2005). Assim, o fragmento amplificado por PCR pode ser desnaturado no gel de DGGE e para de migrar quando alcança a temperatura máxima, permanecendo na sua configuração de dupla fita (Myers et al., 1985). O perfil das bandas de DNA pode ser visualizado corando-se o gel de DGGE com brometo de etídio (Muyzer et al., 1993; Muyzer and Smalla, 1998), Sybr Green (Muyzer and Smalla, 1998) e Sybr Gold (Griffiths et al., 2000).

Estudos com amostras de lodos ativados mostram que o método de PCR-DGGE pode ser muito poderoso para caracterizar a estrutura da comunidade microbiana, em

nível de gênero e espécie, e para monitorar as mudanças da comunidade ao longo do tempo (Onuki et. al., 2000; Abd El-Latif Hesham et al., 2011; Chengchen Ye et al., 2016). Onuki et al. (2000) utilizaram a técnica de PCR-DGGE para investigar a mudança de estrutura comunitárias microbiana em lodo ativado de uma estação de tratamento e, através dessa metodologia detectaram o grupo *Nitrosomonas* no reator como responsável pelo processo de nitrificação. Já Abd El-Latif Hesham et al. (2011) compararam a comunidade microbiana presente em duas estações de tratamento de esgoto ao longo de seis meses e os padrões de DGGE mostraram que havia bandas em comuns entre os dois sistemas, sugerindo alta similaridade entre as comunidades. No estudo de Abd El-Latif Hesham et al. (2011), as principais bandas de padrões DGGE das amostras de lodo ativado foram posteriormente sequenciadas e a filiação filogenética indicou que a maioria das sequências obtidas foram classificadas como: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes / Chlorobi* (grupo) e  $\alpha$  e  $\beta$  - *Proteobacterias*.

Em lagoas de estabilização, a técnica de PCR-DGGE também possibilitou a discriminação de perfis populacionais de microrganismos (Eland et al., 2018). Abdelaziz et al. (2013), ao estudarem a diversidade microbiana de bactérias sulfurosas em lagoas de estabilização observaram uma diversidade microbiana relativamente alta, onde *Proteobacteria*, *Chlorobi* e *Bacteroidetes* constituíram os principais grupos bacterianos, para isso, utilizaram fragmentos amplificados por PCR do gene 16S rRNA e de diferentes genes funcionais envolvidos no metabolismo do enxofre microbiano.

Moura et. al. (2007) utilizaram a técnica de PCR-DGGE para estimar a diversidade bacteriana e monitorar mudanças nas comunidades de duas lagoas de estabilização aeradas de uma usina de tratamento de águas residuárias receptora de afluentes urbanos e industriais. Tal pesquisa procurou mostrar a composição, a estrutura

e a dinâmica ao longo de um ano, permitindo entender que as mudanças nas estações podem afetar a estrutura da comunidade e conseqüentemente o tratamento do lixiviado e, além disso, foram identificadas comunidades bacterianas compostas de organismos pertencentes ao gênero *Bacteroides*.

O alvo mais comumente empregado para a amplificação PCR, prévia ao DGGE, é o DNA ribossômico. Devido ao fato de ser uma região muito conservada do genoma que também inclui regiões variáveis. Oligonucleotídeos iniciadores podem ser projetados para as regiões conservadas e abrangem as regiões variáveis a fim de obter amplicons de PCR que podem ser separados por DGGE devido a diferenças espécies-específicas na composição dos pares de bases. Logo, a escolha da região variável utilizada para amplificação pode apresentar grande influência nos perfis do gel de DGGE, e mesmo diferenças mínimas na sequência de oligonucleotídeos iniciadores podem resultar em diferentes perfis de uma comunidade microbiana (Yu and Morrison, 2004).

A região variável V4 é relatada como a que apresenta o maior número de sequências corretamente classificadas (Zhang et al, 2012). Muitos trabalhos utilizaram a região V4 do 16S rRNA para estudar comunidades microbianas através da técnica de DGGE e de outras técnicas moleculares: sistemas de tratamento de esgoto (Cortés et al 2014) o lodo ativado (Zhang et al, 2012; Yang et al, 2014), biorreatores (Hai et al, 2014).

Apesar de muitas qualidades, o PCR-DGGE apresenta limitações sendo a maior delas a possibilidade de separar apenas fragmentos de até 500bp no gel de acrilamida, isso acaba limitando a inferência filogenética no posterior sequenciamento (Myers et al., 1985). Outro fator é a impossibilidade de separar fragmentos de DNA que possuem certa variação de sequencias e à amplificação de diferentes regiões variáveis do gene 16S rRNA, além do fato de que diferentes condições de DGGE podem resultar em variações

no perfil em um mesmo gel (Muyzer and Smalla, 1998). A DGGE apresenta limites de detecção, isto é, apenas espécies predominantes presentes na comunidade podem ser detectadas e muitas bandas não podem ser discriminadas umas das outras (Nikolausz et al., 2005). Além disso, estima-se que a comunidade detectada no gel corresponde a menos de 1% dos organismos existentes na amostra, limitando a detecção da verdadeira diversidade presente na amostra (Fromin et al., 2002).

### 3.6.1.2. Sequenciamento de alta performance (Next Generation Sequence - NGS)

O desenvolvimento de técnicas independentes de cultivo e a popularização do sequenciamento de alta performance vêm expandindo a capacidade de análise da diversidade microbiana presente em uma grande gama de ambientes. A última década presenciou avanços na tecnologia do sequenciamento que se basearam na detecção óptica altamente paralela de reações de polimerização. Esses avanços reduziram substancialmente os custos do sequenciamento, no entanto, a redução de custo é limitada pela dependência dessas plataformas a sensores foto-receptivos e reagentes associados a ela. Em 2011, “*Life Technologies*” desenvolveu o “*Ion Torrent Personal Genome Machine*” (PGM). O *Ion Torrent* PGM aproveita os avanços na tecnologia de semicondutores e transistores sensíveis a íons para sequenciar o DNA usando apenas DNA polimerase e nucleotídeos, com cada evento de polimerização reconhecido apenas por alterações de pH (Rothberg et al., 2011).

Atualmente, a tecnologia de sequenciamento está evoluindo rapidamente e mostrando superioridade em relação às técnicas convencionas e moleculares ao determinar perfis de estrutura e comunidade microbiana. A metagenômica “*shotgun*”

completa tem a capacidade de sequenciar totalmente a maioria dos genomas disponíveis dentro de uma amostra ambiental (ou comunidade). Isso cria um perfil de biodiversidade que pode ser associado com análise de composição funcional de microrganismos, conhecidos e desconhecidos (filos, gêneros etc.) (Oulas et al., 2015). Estudos demonstram que o *Ion Torrent* PGM é uma plataforma de sequenciamento adequada para estudar ecologia microbiana incluindo a águas residuárias (Moustapha et al., 2015; Delforno et al 2015), lodos ativados (Luo et al., 2013; Congyuan, 2014) e lagoas de estabilização (Eland et al., 2018).

Congyuan et al. (2014), através de um estudo utilizando sequenciamento de alta performance, identificou e quantificou a comunidade de bactérias filamentosas presente em um sistema de tratamento de lodo ativados e demonstrou que estes microrganismos podem ser determinados por essa técnica desde que ocorra o uso de oligonucleotídeos específicos para as espécies em interesse. De Almeida et al. (2018) avaliaram o efeito da temperatura na diversidade microbiana e no desempenho de remoção de nitrogênio de um reator de tratamento de águas residuárias municipais. O sequenciamento por *Ion Torrent* revelou que a estrutura da comunidade microbiana mudou com a diminuição da temperatura.

Fan et al. (2015) avaliaram a dinâmica da comunidade microbiana em resposta a concentrações de metais em sistemas de lodos ativados utilizando *Ion Torrent* e observaram, que a abundância de bactérias não classificadas em nível do filo aumentou substancialmente com o aumento da concentração de metais no efluente.

As tecnologias de sequenciamento de alto desempenho fornecem uma visão profunda das populações bacterianas (Ibarbalz et al., 2013). A investigação da diversidade e abundância da comunidade microbiana tem sido usada com sucesso em diversas



amostras ambientais. No entanto, essas técnicas ainda estão longe de revelar a extensão da comunidade bacteriana a partir de amostras ambientais complexas como solo e lodo ativado (Claesson et al., 2009; Zhang et al., 2011; Yang et al., 2014; Gwin et al., 2018). Por consequência, não é possível identificar toda a comunidade microbiana permanecendo uma porcentagem sem identificação (Krishnan et al., 2016) mostrando assim que há muito a ser descoberto sobre a biodiversidade de amostras ambientais.

#### 3.6.1.3. Espectrometria de massa de tempo de ionização por dessorção assistida por matriz de laser (MALDI-TOF MS)

A espectrometria de massa de tempo de ionização por dessorção assistida por matriz de laser (MALDI-TOF MS) emergiu como uma ferramenta potencial para a identificação microbiana. Durante o processo MALDI-TOF MS, os microrganismos são identificados usando células intactas ou extratos celulares. O processo é rápido, sensível e econômico em termos de mão de obra e custos envolvidos (Singhal et al, 2015).

Para realizar a identificação MALDI-TOF, os microrganismos são colocados em uma placa alvo, onde são cobertos com uma solução de matriz que co-cristaliza com a amostra e lisa as células. A placa é colocada no instrumento onde um laser converte os constituintes da célula bacteriana, principalmente moléculas de proteína ribossômica, em íons de fase gasosa que são separados e identificados de acordo com sua relação massa / carga. O espectrômetro de massa dá uma impressão digital espectral que é única para o microrganismo que está sendo analisado. O organismo é então identificado comparando seu perfil espectral com um banco de dados de referência. Correlações de posições de pico e intensidades entre experimental e banco de dados espectros são usados para gerar uma pontuação de partida. Esta pontuação é o nível de confiança que o isolado

desconhecido é um representante do(s) microrganismo(s) candidato(s) correspondente(s) banco de dados. Os espectros de padrão de massa de proteína podem ser usados para identificar bactérias em gênero, espécies e em nível de subespécie (Krásný et al, 2013; Fenselau and Demirev, 2001).

A limitação dessa tecnologia se dá pelo fato de que a identificação dos isolados é possível somente se o banco de dados espectral contiver picos de massa de peptídeos do tipo cepas de gêneros / espécies / subespécies / cepas específicas (Singhal et al, 2015).

A MALDI-TOF MS tem sido amplamente aplicada em diversos estudos, principalmente em análises de microbiologia clínica (Seng et al 2010). No entanto, MALDI-TOF MS também pode fornecer uma contribuição em microbiologia ambiental. A aplicação de MALDI-TOF MS já foi descrita para a identificação de microrganismos em amostras ambientais, tais como lodo de esgoto, esponjas marinhas, água, solo, raízes e a rizosfera (Ruelle et al, 2004; Kopcakova et al, 2014; Busquets et al 2014; Koubek et al, 2012).

## 4. ARTIGOS

### 4.1. Artigo 1

Título: Temporal variation of bacterial population and response to physical and chemical parameters along a petrochemical industry wastewater treatment plant.

Publicado na revista: Anais da Academia Brasileira de Ciências (2019):  
doi:10.1590/0001-3765201920180394

**Temporal variation of bacterial population and response to physical and chemical parameters along a petrochemical industry wastewater treatment plant.**

Antunes, Themis Collares<sup>a</sup>, Ballarini, Ana Elisa<sup>a</sup>, Van Der Sand, Sueli<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Microbiology, Immunology and Parasitology Department, Institute of Basic and Health Science, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, 90050-170, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

\*Corresponding author: svands@ufrgs.br +5551 3308 4505

Keywords: bacteria; diversity; wastewater treatment; facultative lagoon; activated sludge

Running title: Bacterial population wastewater treatment plant Section area: Biological Science

## ABSTRACT

The petrochemical industry has played a considerable role in generation and release of waste into the environment. Active sludge and facultative lagoons are commonly used for domestic and industrial wastewater treatment due to their low-cost and minimal need for operational requirements. Microorganisms present in wastewater treatment plant (WWTP) are responsible for most nutrient removal. However, some factors like physicochemical parameters and competing bacteria influence microorganisms responsible for nutrient removal. In this study, microbiological and physicochemical parameters were used to estimate changes in bacterial community in a petrochemical industrial WWTP. The activated sludge was the place with higher heterotrophic bacterial quantification. Denitrifying bacteria was reduced at least 5.3 times throughout all collections. We observe a decrease in the total Kjeldahl nitrogen, oxygen demand and phosphate throughout the WWTP. In this work, we also use Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) for environmental bacteria isolates identification. And we compare the results based on protein profiles with 16S rDNA sequencing. The MALDI-TOF MS allowed the identification of 68 (93%) of the 73 isolates tested and only 5% of isolates show different results from 16S rDNA sequencing showing that the MALDI-TOF MS can be an excellent tool for identifying environmental bacteria.

Keywords: bacteria; diversity; wastewater treatment; facultative lagoon; activated sludge.

#### **4.2. Artigo 2 (short report).**

Título: The bacterial community structures of a petrol industry wastewater treatment plant composed by active sludge and facultative ponds performance by nested PCR-DGGE method.

**The bacterial community structures of a petrol industry wastewater treatment plant composed by active sludge and facultative ponds performance by nested PCR-DGGE method.**

Antunes, Themis Collares<sup>a</sup>, Ballarini, Ana Elisa<sup>a</sup>, Van Der Sand, Sueli<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Microbiology, Immunology and Parasitology Department, Institute of Basic and Health Science, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, 90050-170, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

\*Corresponding author: svands@ufrgs.br, +5551 3308 4505

Keywords: bacteria, DGGE, active sludge, facultative lagoons, wastewater.

Running title: Bacterial population wastewater treatment plant

Section area: Biological Science

### **ABSTRACT**

The present study aimed analyze bacterial community of activated sludge and facultative lagoons from a wastewater treatment plant of a petrol industry using DGGE amplifying the V4 hypervariable region of 16S rDNA gene. Activated sludge a showed a higher pattern of bands in collections 2 and collection 4. Facultative lagoon 1 presented more bands than lagoon 8. Activated sludge and the stabilization lagoon 1 showed proximity in the neighbor-joining phylogenetic tree analysis.

Keywords: bacteria, DGGE, active sludge, facultative lagoons, wastewater.



## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo analisar a comunidade bacteriana de lodo ativado e lagoas facultativas de uma estação de tratamento de efluente de uma indústria petrolífera utilizando DGGE através da amplificação da região hipervariável V4 do gene 16S rDNA. A lagoa facultativa 1 apresentou mais bandas do que a lagoa 8. O lodo ativado e a lagoa de estabilização 1 mostraram proximidade na análise filogenética neighbor-joining.

Palavras-chave: bactérias, DGGE, lodo ativo, lagoas facultativas, águas residuárias.

Biological wastewater treatment plants (WWTP) consist of a complex mixture of microorganisms. Methods of molecular biology, such as the analysis of the nucleic acids extracted from a community of the environment, allow the detection and phylogenetic identification of most organisms, including those uncultivable in media<sup>1</sup>. Determining the structure of the microbial community is essential for understanding the biological processes that occur in WWTP.

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) is widely used to describe the genetic diversity of microorganisms in different environments. <sup>2,1</sup> They are routinely used in many microbiological laboratories worldwide as a molecular tool to compare the diversity of microbial communities and to monitor population dynamics. <sup>3,4</sup>

The present work aimed at to analyzing bacterial community of activated sludge and facultative lagoons from a WWTP of a petrol industry using DGGE amplifying the V4 hypervariable region of 16S rDNA gene.

Activated sludge (AS) samples and two facultative lagoons (FL1 and FL8) were taken from a petrol wastewater treatment plant as describe by Antunes et al. (2018)<sup>5</sup>. Sampling was performed in May (collection 1 - C1), August (collection 2 - C2), and December (collection 3 - C3) 2015, and March 2016 (collection 4 - C4).

Total DNA was extracted from 0.25 g of active sludge using the DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen) following the manufacturer's standard protocol. For facultative lagoons, 50 mL of samples were filtered through a 0.22 µm cellulose membrane. The pellet was transferred to a 1.5 mL Eppendorf, and DNA extraction followed manufacturer's standard

protocol. The concentration and purity of the DNA were determined using an ND-100Nanodrop spectrophotometer (Kasvi).

Partial 16S rDNA gene sequences were amplified using universal primers 515F and 806R, previously identified as suitable for bacteria and archaea.<sup>6</sup> Amplification reactions were performed as described by Weber et al. (2016).<sup>7</sup> To increase the sensitivity and to facilitate the DGGE by analyzing fragments of the same length two rounds of PCR were performed. In the second PCR reaction, the same set of primers was used but at this time with GC-clamp added to primer 515F.

The casting of the DGGE followed the protocol of Muyzer et al. (1993)<sup>8</sup> and was performed in a Bio-Rad D Gene System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The PCR products from the second round were loaded onto 8% (w/v) polyacrylamide gel in 1×TAE (20 mM Tris, 10 mM acetate, 0.5 mM EDTA pH 7.4). The polyacrylamide gel was made with denaturing gradient ranging from 15 to 55% (where 100% denaturant contains 7 M urea and 40% formamide). The electrophoresis was performed for 16 h at 60°C and 40 V. After the electrophoresis, the gel was placed into a dish containing 250 mL of SYBR Gold stain (1:10 000 dilution 1×TAE, Invitrogen). The gel staining solution was carefully spread over the gel which was left for one hour in the dark. Then, the gel was washed with distilled water and transferred to the photodocumentary device.

DGGE bands were analyzed using CLIQS 1D software (Total Lab). Clustering analysis was conducted based on CLIQS 1D-analysis results.

Evaluating the DGGE pattern it was possible to observe that the DGGE bands in the active sludge treatment were in higher numbers than that in the facultative lagoons indicating a higher bacterial diversity in the active sludge treatment (Table 1).

Table 1. The number of bands observed in DGGE fingerprint gel of activated sludge samples and facultative lagoons, according to collection sample.

Samples	Number of Bands (n)
ASC1	8
ASC2	13
ASC3	7
ASC4	11
FL1C1	5
FL1C2	11
FL1C3	9
FL1C4	3
FL8C1	4
FL8C2	6
FL8C3	8
FL8C4	4

AS: active sludge. FL1: facultative lagoon 1. FL8: facultative lagoon 8. C1: collection 1; C2: collection 2; C3: collection 3; C4: collection 4.

According to the CLIQs analysis, facultative lagoon 1 (FL1) presented more bands than lagoon 8 (FL8) (Figure 1). In the activated sludge a higher pattern of bands was observed for collections 2 (C2) and collection 4 (C4). For stabilization lagoon FL1, C2 and C3 show the more bands than in FL8 for collections C2 and C3.

ASC1 ASC2 ASC3 ASC4 FL1C1 FL1C2 FL1C3 FL1C4 FL8C1 FL8C2 FL8C3 FL8C4

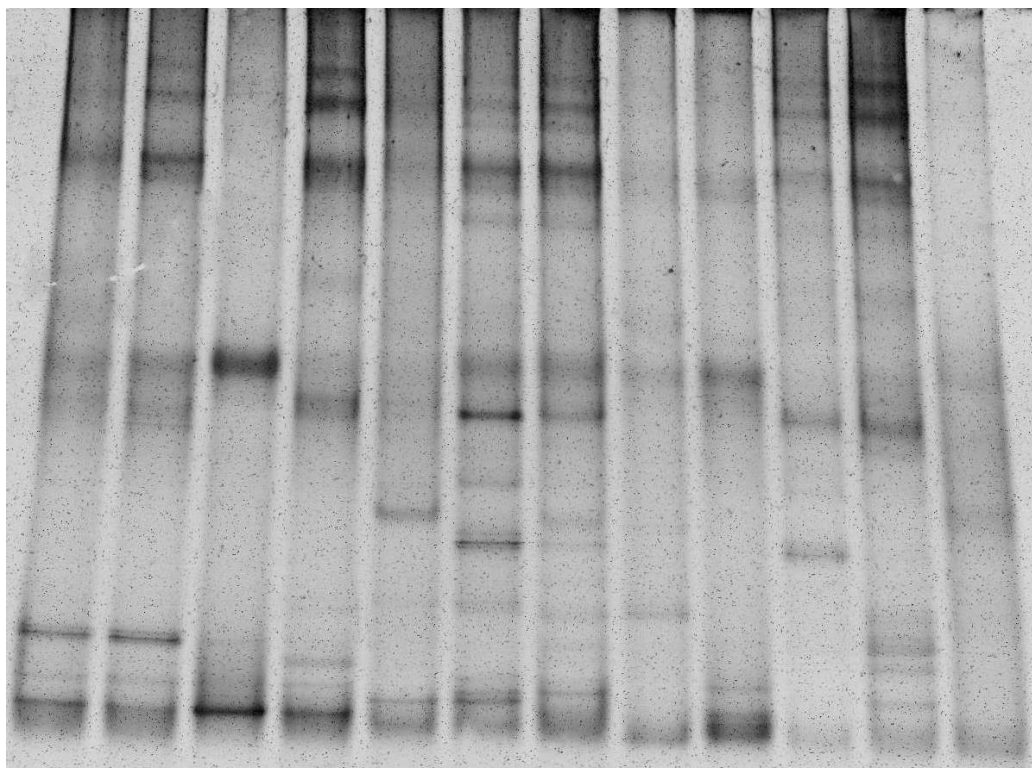


Figure 1. DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) analysis of 16S rRNA fragments of the total bacterial population from active sludge and facultative lagoon samples. AS: active sludge. FL1: facultative lagoon 1. FL8: facultative lagoon 8. C1: collection 1; C2: collection 2; C3: collection 3; C4: collection 4.

A neighbor-joining phylogenetic tree was constructed to visualize the relationships between the sequences from active sludge and facultative lagoons (Figure 2). The active sludge samples C1, C2 and C3 showed a closed association. In the other hand, ASC4 was close to facultative lagoons samples FL1C2 and FL1C3. All samples from FL8 presented short distance from each other staying in the same initial branch.

Based on these results, we can conclude that the proximity between the activated sludge and the stabilization lagoon FL1 interfered with the composition of the microbial

community, showing a transition between the microbiota. The stabilization lagoon FL8 is located away from the other points, this point is the last step of the industrial WWTP composed of eight stabilization lagoons and this may be the reason why it presents a more different microbiota.

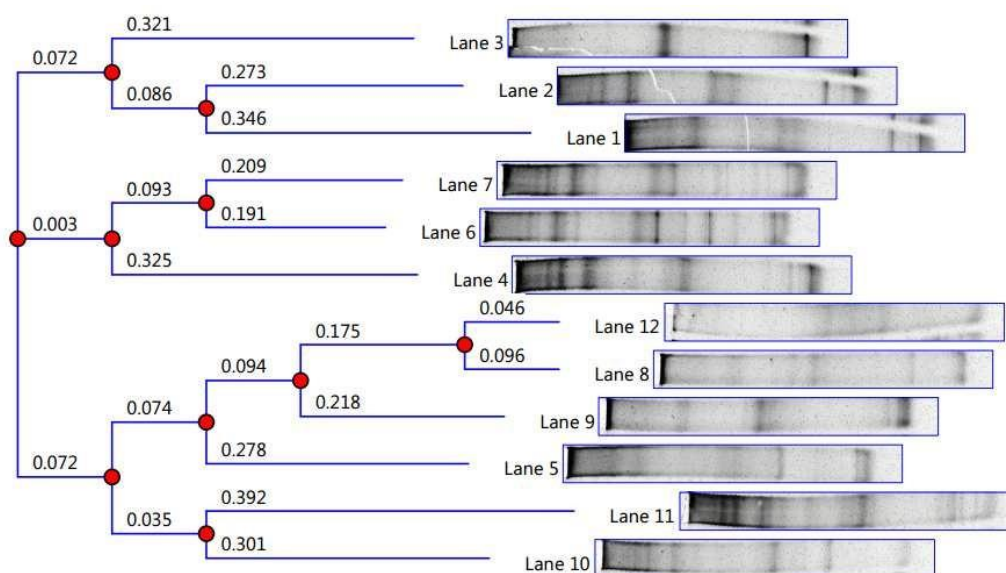


Figure 2. Relationship between bands patterns of DGGE 16S rRNA gene sequences from active sludge and facultative lagoons.

## REFERENCES

1. Aguila, NKS. 2007. Avaliação de bactérias fototróficas em lagoas de estabilização: diversidade, purificação e identificação. Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo.
2. Curtis TP, Craine CG. 1998. The comparison of the diversity of activated sludge plants. *Water Sci. Technol.* 37(4-5):71-78.
3. Boon N, Windt W, Verstraete W, Top EM. 2002. Evaluation of nested PCR–DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers

for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiol Ecol* 39(2):101–112. doi.org/10.1111/j.1574-69412002.tb00911.x

4. Muyzer G, Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 73:127–141.

5. Antunes, TC, Ballarini, AE, Van Der Sand, S. 2018. Temporal variation of bacterial population and response to physical and chemical parameters along a petrochemical industry wastewater treatment plant. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences.*

6. Bates ST, Berg-Lyons D, Caporaso JG, Walters WA, Knight R, Fierer N. 2011. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J* 5: 908-17.

7. Weber AM, Giongo A, Valdez FP, Amorin DB, Tavares M, d’Azevedo PA, Franco AC, Frazzon J, Frazzon APG. 2016. Characterization of the faecal bacterial community of wild young South American (*Arctocephalus australis*) and Subantarctic fur seals (*Arctocephalus tropicalis*). *FEMS Microbiol. Ecol* 92(3):1 fiw029, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw029>

8. Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden A. 1993. Profiling of complex microbial populations using denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695 –700

### **4.3. Artigo 3**

Título: Analysis of microbial community biodiversity in activated sludge from a petrochemical plant

Publicado na Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science em 2021. ISSN 1980-993X – doi:10.4136/1980-993X



**Analysis of microbial community biodiversity in activated sludge from a  
petrochemical plant**

Themis Collares Antunes<sup>1</sup>, Leticia Marconatto<sup>2</sup>, Luiz Gustavo dos Anjos Borges<sup>2</sup>,  
Adriana Giongo<sup>2</sup>, Sueli Van Der Sand<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmento Leite, nº500, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: themis.antunes@gmail.com

<sup>2</sup>Instituto do Petróleo e dos Recursos Naturais. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga, nº 6681, CEP: 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: leticia.marconatto@puers.br, luizgaborges@gmail.com, adrianagiongo@gmail.com

<sup>3</sup>Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Instituto de Ciências Básicas da Saúde.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmento Leite, nº500, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

\*Corresponding author: svands@ufrgs.br

Keywords: bacterial community, high throughput sequencing, wastewater sludge.

## ABSTRACT

The active sludge process is one of the most-used techniques for the biodegradation of organic compounds present in effluents from an assortment of wastewaters. This study investigated the bacterial community structure of a petroleum industry's activated sludge and its physical and chemical parameters using high-throughput sequencing. Samples were collected over one year: autumn 2015 (C1), winter 2015 (C2), spring 2015 (C3), and summer 2016 (C4). Total DNA was extracted, and the primers targeting the V4 region of the 16S rRNA gene were used for amplicon sequencing. The majority of the detected microorganisms were considered rare microbiota, presenting a relative abundance below 1% of the total sequences. All the sequences were classified at the phylum level, and up to 55% of the ASVs (Amplicon Sequence Variants) were associated with known bacterial genera. *Proteobacteria* was the most abundant phylum in three seasons, while the phylum *Armatimonadota* dominated in one season. The genus *Hyphomicrobium* was the most abundant in autumn, winter and summer, and an ASV belonging to the family *Fimbriimonadaceae* was the most abundant in the spring. Canonical Correspondence Analysis showed that physicochemical parameters of SS, SD and TSS are correlated, as well as ammoniacal nitrogen. Sample C3 presented the highest values of COD, AN and solids (SS, SD and TSS). The highest COD, AN, and solids values are correlated to the high frequency of the phylum *Armatimonadota* in C3.

Keywords: bacterial community, high throughput sequencing, wastewater sludge.

## 5. DISCUSSÃO GERAL

Os sistemas de tratamento biológicos são amplamente empregados no mundo todo devido à alta eficiência alcançada e o baixo custo de operação (Von Sperling, 2002).

De acordo com Madoni (1994) e Figueiredo et al. (1997), um bom desempenho do sistema está diretamente relacionado às espécies microbianas presentes no processo. A determinação da comunidade bacteriana presente nesse sistema é importante para garantir um desempenho estável e um eficiente tratamento biológico de efluentes (Zhang et al., 2012; Ju et al., 2013).

Os microrganismos apresentam uma vasta diversidade metabólica e fisiológica, desse modo, a determinação da composição da comunidade bacteriana de uma amostra ambiental através de técnicas de cultivos em laboratório se torna limitada (Sabree et al., 2009). De modo geral, a descrição de comunidades microbianas requer o emprego de técnicas que não envolvam somente o cultivo em laboratórios, uma vez que apenas um pequeno percentual dos organismos na natureza (<1%) é cultivável por meio de técnicas microbiológicas de rotina (Amann et al., 1995).

No presente estudo, a caracterização realizada por técnicas de cultivo permitiu quantificar grupos funcionais de microrganismos (heterotróficas, desnitrificantes, nitrificantes e redutoras de sulfato) ao longo das etapas de tratamento. Os resultados obtidos permitem uma visão macroscópica da dinâmica da estação de tratamento do efluente industrial ao longo das etapas de tratamento e através do período das coletas. Em relação a observação dos grupos microbianos, o lodo ativado foi o local com maior quantificação de bactérias heterotróficas. Ademais, foi observado uma redução das

bactérias desnitrificantes e nitrificantes ao longo do tratamento do efluente, ou seja, do lodo até a lagoa de estabilização 8. Fatores químicos como presença de nitrogênio e fosfato, assim como a demanda de oxigênio foram reduzidos ao final do tratamento do efluente.

A fim de obter uma melhor compreensão do papel da diversidade microbiana em diversos ecossistemas, outras abordagens que complementam os procedimentos microbiológicos tradicionais são necessárias. A aplicação de técnicas de biologia molecular para detectar e identificar microrganismos através de marcadores moleculares, como 16S rRNA (Amann et al., 1995), é frequentemente usada para explorar a diversidade microbiana e analisar sua estrutura (Muyzer and Ramsing, 1995, Muyzer and Smalla, 1998).

A técnica de DGGE é amplamente utilizada para descrever a diversidade de microrganismos em diferentes ambientes (Curtis and Craine, 1998; Aguila, 2007). No estudo realizado, o perfil da comunidade microbiana do lodo ativado e nas lagoas de estabilização foi determinado através da técnica de DGGE. O lodo ativado e a lagoa 1 apresentaram maior número de bandas do que a lagoa 8, na maioria das coletas. De acordo com a análise filogenética, a lagoa de estabilização 1 e o lodo ativado mostraram maior similaridade, esse resultado pode estar relacionado com o fato da proximidade entre os locais e por estarem ligadas por caixas de passagem.

Para uma visão mais detalhada da comunidade microbiana, ferramentas de sequenciamento de alto desempenho independente de cultura tem sido amplamente utilizado para pesquisar e melhorar nossa compreensão da biodiversidade em diversas estações de tratamento de águas residuárias municipais ou industriais (Kwon et al., 2010; Ibarbalz et al., 2013). Essas metodologias permitiram um novo olhar sobre através da

identificação de filotipos microbianos, permitindo um melhor entendimento de sistemas ambientais (Roesch LFW et al., 2007; Lauber et al., 2009; Caporaso et al., 2011).

Essa metodologia se baseia na amplificação de regiões específicas, ou seja, na análise de regiões-alvos conservados ou em genes específicos (Petrosino et al., 2009). A análise de amplificação do gene de RNA ribossômico 16S é a abordagem padrão para a investigação da diversidade microbiana através de técnicas independente de cultivo (Klindworth et al., 2013).

Definir a diversidade microbiana presente em sistemas biológicos de tratamento, como lodo ativado e lagoa de estabilização, é muito importante uma vez que a eficiência do processo está estritamente ligada com a comunidade microbiana (Amman et al., 1997).

O conhecimento sobre a microbiota fornece uma base que pode ser utilizada para comparações da composição da comunidade microbiana em virtude de mudanças no ambiente, podendo assim, prever alguns problemas relacionados ao tratamento do efluente de interesse (Poole, 1984).

A importância do estudo da microbiota de estação de tratamento de efluentes se deve ao fato de que as variações do efluente, os fatores físico-químicos e os fatores ambientais influenciam diretamente na dinâmica da comunidade bacteriana (Vazollér et al., 1989). Mudanças quantitativas entre autotróficos e bactérias heterotróficas são afetadas por características das águas residuais, pelo tipo e pelo funcionamento das tecnologias sistema ou localização geográfica, uma vez que cada estação de tratamento apresenta as suas particularidades (Zhang et al., 2012; Ma et al., 2013).

No presente estudo, as amostras de lodo ativado submetidas ao sequenciamento de alto desempenho apresentaram o filo *Proteobacteria* como o mais abundante nas

amostras das coletas C1, C2 e C4, representando até 48,7% do total de sequências em C2, seguido do filo *Chlorobi* presente nas amostras C1 e C2 (12,4% e 17,1% das sequências totais, respectivamente). Na amostra C3, o filo mais abundante foi o *Armatimonadetes* e o *Proteobacteria*, que representou 56,9% e 23,7% das sequências totais. E as classes mais dominantes correspondentes no filo *Proteobacteria* foi *Alphaproteobacteria*.

Estudos realizados em WWTPs industriais utilizando sequenciamento de última geração também demonstram a prevalência do filo *Proteobacteria* (Ibarbalz et al. 2013; Xia et al., 2010; Kwiatkowska and Zielinska, 2016).

A análise de comunidades bacterianas através do sequenciamento de nova geração muitas vezes não é capaz de elucidar com confiança as espécies presentes na amostra. No presente estudo, quase a totalidade das sequências (até 99,9%) foi classificada em nível de filo, mas apenas poucas UTOs (23,7%) foram associadas a um gênero bacteriano conhecido. No entanto, essas técnicas ainda estão longe de revelar o perfil total bacteriano a partir de algumas amostras ambientais complexas, como solo e lodo ativado (Claesson et al., 2009; Yang et al., 2014; Gwin et al., 2018). Logo, não é possível identificar toda a comunidade microbiana, permanecendo uma porcentagem sem identificação, demonstrando que há muito a ser descoberto sobre a biodiversidade de amostras ambientais múltiplas (Abe et al., 2016; Krishnan et al., 2016).

## 6. CONCLUSÃO

O presente trabalho foi baseado na análise de metodologias para determinar a comunidade de microrganismos presentes em uma estação de tratamento de efluentes. Através da técnica de cultivo foi possível quantificar grupos de microrganismos (heterotróficos, desnitrificantes, nitrificantes e redutoras de sulfato) presentes no lodo ativado e nas lagoas de estabilização. A técnica de DGGE permitiu uma análise da estrutura microbiana, sem definições de grupos específicos. As duas técnicas, cultivo e DGGE, permitiram uma visão geral dos microrganismos presentes na estação de tratamento do efluente industrial.

Para a identificação de isolados cultiváveis, a técnica de MALDI TOF MS apresentou um bom desempenho, sendo uma boa alternativa para isolados oriundos de amostras ambientais.

O sequenciamento de alto desempenho permitiu uma melhor análise dos filos presentes no lodo ativado, em contrapartida, poucas UTOs foram classificadas em nível de gênero.

Os resultados demonstram que alguns ambientes complexos, como lodo ativado e lagoas de estabilização, ainda permanecem como uma “caixa preta” com potenciais novos microrganismos ou espécies ainda não identificadas.

A determinação dos microrganismos presente em efluentes industriais é importante para que se tenha um melhor desempenho do sistema uma vez que estes são os principais agentes de remoção da matéria carbonácea e de nutrientes, como fósforo e nitrogênio.

## 7. REFERÊNCIAS

- Abe T, Ushiki N, Fujitani H, Tsuneda S. 2016. A rapid collection of yet unknown ammonia oxidizers in pure culture from activated sludge. *Water Research* doi: 10.1016/j.watres.2016.10.070.
- Abd El-Latif H, Rong Q, Min Y. 2011. Comparison of bacterial community structures in two systems of a sewage treatment plant using PCR-DGGE analysis. *Journal of Environmental Sciences* 23(12):2049–2054.
- Abdelaziz B, Abbas, Fazaa I, Saidi N, Snoussi M, Hassen A, Muyzer G. 2013. Sulfur bacteria in wastewater stabilization ponds periodically affected by the ‘red-water’ phenomenon. *Applied Microbiology Biotechnology* 97:379–394 DOI 10.1007/s00253-012-3931-5
- Aguila, NKS. 2007. Avaliação de bactérias fototróficas em lagoas de estabilização: diversidade, purificação e identificação. Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo.
- Amann RI, Ludwig W, Scheleiffer K. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59(1): 143–169.
- Amman R, Glöckner FO, Neef A. 1997. Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microbiology Reviews* 20(3-4):191-200.



- Andrade Neto CO. 1997. Sistemas simples para tratamento de esgotos sanitários: experiência brasileira. ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. Rio de Janeiro, RJ. 299p.
- Anthonisen AC, Prakasam TB, Srinath EG. 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal of Water Pollution Control Federation* 48(5):835–852.
- Antileo C, Roeckel M, Wiesmann U. 2003. High nitrite buildup during nitrification in a rotating disk reactor. *Water Environment Research* 75(2):151-162.
- Arceivala SJ. 1981. *Wastewater Treatment and Disposal: Engineering and Ecology in Pollution Control*. Books on Demand. 904 pg.
- Awuah E, Amankwah-Kuffour R, Lubberding HJ, Gijzen HJ. 2002. Characterisation and management of domestic wastewater in two suburbs of Kumasi, Ghana. In: *Drinking water safety: A total quality management approach*. (Hrudey, S.E. ed). Inst. for risk research 367-384.
- Barnes D, Bliss PJ. 1983. *Biological control of nitrogen in wastewater treatment*. E.& F.N. Spon, London. 146 p.
- Beltran CAE. 2008. Aplicación de un sistema de control supervisor de pH y OD en la operación continua de un reactor nitrificante de disco rotatório. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.
- Ben-Dov E, Brenner A, Kushmaro A. 2007. Quantification of sulfate-reducing bacteria in industrial wastewater by real-time polymerase chain reaction (PCR) using *dsrA* and *apsA* genes. *Microbial Ecology* 54:439–451.

- Bento AP, Sezerno PH, Phillippi LS, Reginatto V, Lapolli FR. 2005. Caracterização da microfauna em estação de tratamento de esgotos do tipo lodos ativados: um instrumento de avaliação e controle do processo. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental* 10(4):329-338.
- Bitton G. 2011. *Wastewater Microbiology*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss. Fourth edition.
- Boon N, de Windt W, Verstraete W, Top E. M. 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology* 9:101-112.
- Campos, J. R. 1994. *Alternativas para Tratamento de Esgotos - Pré-Tratamento de Águas para Abastecimento*, publicação n 09, Consórcio Intermunicipal das Bacias dos Rios Piracicaba e Capivari, Americana, SP.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. 2011. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108(Suppl 1):4516-4522. doi:10.1073/pnas.1000080107.
- Chengchen Y, Yang X, Zhao FJ, Ren L. 2016. The shift of the microbial community in activated sludge with calcium treatment and its implication to sludge settleability. *Bioresource Technology* 207:11–18.
- Ciudad GAB. 2007. *Nitrificación-desnitrificación vía nitrito en reactores de discos rotatorios bajo dos modalidades de operación: continua y secuenciada*. Departamento de Engenharia Química. Instituto de Agroindústria, Universidad de

La Frontera, Temuco. Claesson MJ, Wang Q, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, Cole JR, Ross RP, O'Toole PW. 2010. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic acids research* 38:e200.

Congyuan C, Inchio L, Chen H, Ming-Yuen L. 2014. Metagenomic sequencing of activated sludge filamentous bacteria community using the Ion Torrent platform. *Desalination and Water Treatment* 57(5): 2175-2183. doi 10.1080/19443994.2014.979447

Cortés LC, Sipkema D, Rodríguez-Díaz M., Fuentes S, Juárez-Jiménez B, Rodelas B, Smidt H, González-López J. 2014. Microbial community dynamics in a submerged fixed bed bioreactor during biological treatment of saline urban wastewater. *Ecological Engineering* 71:126–132.

Cox MJF. 2009. Desarrollo de una estrategia de operación para promover el proceso nitrificación: desnitrificación simultánea em un reactor secuencial de biopelícula. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de La Frontera, Temuco.

Da Motta M, Pons MN, Roche N, Amaral AL, Ferreira EC, Mota M. 2003. Estudo do funcionamento de estações de tratamento de esgotos por análise de imagem: validações e estudo de caso. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental* 8(3):170-181.

Dalsgaard T, Bak, F. 1994. Nitrate reduction in a sulfatereducing bacterium, *Desulfovibrio desulfuricans*, isolated from rice paddy soil: sulphide inhibition, kinetics, and regulation. *Applied Environment Microbiology* 60:291–297.

- Dalzell DJB, Alte S, Aspichueta E, De La Sota A, Etxebarria J, Gutierrez M, Hoffmann CC, Sales D, Obst U, Christofi N. 2002. A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge. *Chemosphere* 47(5):535-545.
- Dar SA, Yao L, Van Dongen U, Kuenen JG, Muyzer G. 2007. Analysis of diversity and activity of sulfatereducing bacterial communities in sulfidogenic bioreactors using 16S rRNA and dBRS genes as molecular markers. *Applied Environmental Microbiology* 73:594–604.
- Davies PS. 2005. *The biological basis of wastewater treatment*. Glasgow, UK: Strathkelvin Instrument Ltda.
- De Almeida FL, Pereira AD, Leal CD, Davenport R, Werner D, Filho CRM, Bressani-Ribeiro T, de Lemos Chernicharo CA, de Araújo JC. 2018. Effect of temperature on microbial diversity and nitrogen removal performance of an anammox reactor treating anaerobically pretreated municipal wastewater. *Bioresource Technology* 258:208–219.
- Delforno TP, Moura AGL, Okada DY, Sakamoto IK, Varesche MBA. 2015. Microbial diversity and the implications of sulfide levels in an anaerobic reactor used to remove an anionic surfactant from laundry wastewater. *Bioresource Technology* 192:37-45.
- Dilling W, Cypionka H. 1990. Aerobic respiration in sulphate-reducing bacteria. *Archives Microbiology* 71:123–128. doi 10.1007/s00253-016- 7529-1
- Dorigo U, Volatier L, Humbert JF. 2005. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research* 39:2207-2218.

- Downing AL. 1978. Selected subjects in waste treatment. 3<sup>a</sup> ed. Delft, IHE.
- Eckenfelder WW. 1992. Activated sludge process design and control: Theory and practice. Water Quality Management Library, Vol. 1.
- Eland EE, Russell JD, Bezerra AS, Mota CF. 2018. Molecular evaluation of microalgal communities in full-scale waste stabilisation ponds. *Environmental Technology* doi: 10.1080/09593330.2018.1435730
- EPA: United States Environmental Protection Agency. 1993. Manual, Nitrogen Control. Technology Transfer. Cincinnati. 311p.
- Fan O, Min J, Hongyan Z, Zhao D, Lin Y. 2015. Dynamics of the diversity and structure of the overall and nitrifying microbial community in activated sludge along gradient copper exposures. *Applied Microbiology Biotechnology* 100(15): 6881-6892. doi 10.1007/s00253-016-7529-1
- Farrelly, V, Rainey FA, Stackebrandt, E. 1995. Effect of Genome Size and rrn Gene Copy Number on PCR Amplification of 16S rRNA Genes from a Mixture of Bacterial Species. *Applied and Environmental Microbiology* 61(7):2798–2801.
- Fenselau C, Demirev PA. 2001. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 20:157–171.
- Fernández A, Tejedor C, Cabrera F, Chordi A. 1995. Assessment of toxicity of river water and effluents by the bioluminescence assay using *Photobacterium phosphoreum*. *Water Research* 29(5):1281-1286. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)00293-G](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)00293-G)
- Ferreira FD, Coraiola M. 2008. Eficiência do lodo ativado em fluxo contínuo para tratamento de esgoto. *Revista Acadêmica Agrárias e Ambientais Curitiba* 6(2):259-279. Figueiredo MG, Domingues VB. 1997. *Microbiologia de Lodos Ativados*.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. São Paulo: CETESB, 48 p.

Forney LJ, Liu WT, Guckert JB, Kumagai Y, Namkung E, Nishihara T, Larson RJ. 2001. Structure of microbial communities in activated sludge: potential implications for assessing the biodegradability of chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49(1): 40- 53.

Foster S, Lappin-Scott H, Snape J, Porter J. 2003. Rains, drains and active strains: towards online assessment of wastewater bacterial communities. *Journal of Microbiological Methods* 55: 859-864.

Freire, RS, Pelegrini R, Kubota LT, Durán. 2000. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. *Química Nova* 23(4):504-511 doi 10.1590/S0100-40422000000400013.

Fujioka AMA, Carvalho EH, Carrilho SMAV, Bittar KH, Pfeiffer SC. 2020, Avaliação da eficiência da remoção de nitrogênio e fósforo em lagoas de estabilização no tratamento de lixiviado e esgoto sanitário. *Brazilian Journal of Development* 6(3):12049-12058 doi 10.34117/bjdv6n3-171.

Furlan LT. 1996. Processo microbiológico de redução de amônia do efluente industrial da refinaria de Paulínia – REPLAN. Paulínia; Petrobras – CETESB.

Gray NF. 1989. *Biology of Wastewater Treatment*. New York: Oxford University Press.

Griffiths RI, Whiteley AS, O'Donnell AG, Bailey MJ. 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. *Applied Environmental Microbiology* 66(12): 5488-5491.

- Gwin CA, Lefevre E, Alito CL, Gunsch CK. 2018. Microbial community response to silver nanoparticles and Ag<sup>+</sup> in nitrifying activated sludge revealed by ion semiconductor sequencing. *Science of the Total Environment* 616–617:1014–1021 doi 10.1016/j.scitotenv.2017.10.217
- Guo, J, Peng Y, Ni BJ, Han X, Fan L, Yuan Z. 2015. Dissecting microbial community structure and methane-producing pathways of a full-scale anaerobic reactor digesting activated sludge from wastewater treatment by metagenomic sequencing. *Microbial Cell Factories* 201514:33 <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0218-4>
- Hagman M, Nielsen JL, Nielsen PH, Jansen J. 2008. Mixed carbon sources for nitrate reduction in activated sludge-identification of bacteria and process activity studies. *Water Research* 42:1539–1546.
- Hai R, Wang Y, Wang X, Li Y, Du Z. 2014. Bacterial Community Dynamics and Taxa-Time Relationships within Two Activated Sludge Bioreactors. *PLoS ONE* 9(3): e90175. doi 10.1371/journal.pone.0090175
- Han, Y.H. 2006. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry* 41:1709-1721.
- Head IM, Saunders JR, Pickup RW. 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology* 35:1-21.
- Hines ME, Evans RS, Genthner BRS, Willis SG, Friedman S, Rooney-Varga JN, Devereux R. 1999. Molecular phylogenetic and biogeochemical studies of sulfate-reducing bacteria in the rhizosphere of *Spartina alterniflora*. *Applied Environmental Microbiology* 65:2209–2216.

- Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal Bacteriology* 180: 4765-4777.
- Hugenholtz P. 2002. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology* 3(2).
- Ibarbalz F, Figuerola MLM, Erijman L. 2013. Industrial activated sludge exhibit unique bacterial community composition at high taxonomic ranks. *Water research* 4(7):3854- 3864.
- Jeanthon C, L'Haridon S, Cuff V, Banta A, Reysenbach AL, Prieur D. 2002. *Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin and emendation of the genus *Thermodesulfobacterium* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:765–772.
- Jenkins D, Richard MG, Daigger GT. 2003. Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming, and other solids separation problems. 3rd ed. Boca Raton: Lewis Publishers.
- Ji B, Wang H, Yang K. 2013. Tolerance of an aerobic denitrifier (*Pseudomonas stutzeri*) to high O<sub>2</sub> concentrations. *Biotechnology Letters* 36:719–722.
- Ju F, Xia Y, Guo F, Wang Z, Zhang T. 2013. Taxonomic relatedness shapes bacterial assembly in activated sludge of globally distributed wastewater treatment plants. *Environmental Microbiology* 16: 2421–2432.



- Krásný L, Hynek R, Hochel I. 2013. Identification of bacteria using mass spectrometry techniques. *International Journal of Mass Spectrometry* 353:67–79. doi: 10.1016/j.ijms.2013.04.016.
- Keyser M, Witthuhn RC, Lamprechta MPA, Coetzee TJB. 2006. PCR-based DGGE fingerprinting and identification of methanogens detected in three different types of UASB granules. *Systematic and Applied Microbiology* 29(1):77-84.
- Kim DJ, Lee DI, Keller J. 2006. Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. *Bioresource Technology* 97(3):459-468.
- Kjeldsen KU, Joulain C, Ingvorsen K. 2004. Oxygen tolerance of sulphate-reducing bacteria in activated sludge. *Environment Science Technology* 38:2038–2043.
- Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glöckner FO. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies, *Nucleic Acids Research* 41(1):e1, <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Kniemeyer O, Musat F, Sievert SM, Knittel K, Wilkes H, Blumenberg M, Michaelis W, Classen A, Bolm C, Joye SB, Widdel F. 2007. Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. *Nature* 449:898–901.
- Krishnan M, Suganya T, Pandiarajan J. 2016. Bacterial community exploration through Ion Torrent sequencing from different treatment stages of CETP for tannery. *Expert Opinion Environment Biology* 5:3. doi: 10.4172/2325-9655.1000136

- Kwon S, Kim T-S, Yu GH, Jung J-H, Park H-D. 2010. Bacterial community composition and diversity of a full-scale integrated fixed-film activated sludge system as investigated by pyrosequencing. *J Microbiol Biotechnol* 20: 1717–1723.
- Lambolez L, Vasseur P, Ferard JF. 1994. The environmental risks of industrial waste disposal: an experimental approach including acute and chronic toxicity studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 28(3):317-328.
- Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N (2009) Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environ Microbiol* 75:5111–5120.
- Lee HW, Park YK, Choi E, Lee JW. 2008. Bacterial Community and Biological Nitrate Removal: Comparisons of Autotrophic and Heterotrophic Reactors for Denitrification with Raw Sewage. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18 (11):1826–1835.
- Lehninger, AL, Nelson DL, Cox MM. 2002. *Princípios de bioquímica*. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975p.
- Lerman LS, Fischer SG, Hurley I, Silverstein K, Lumelsky N. 1984. Sequence-determined DNA separations. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 13:399-423.
- Liu J, Wu W, Chen C, Sun F, Chen Y. 2011. Prokaryotic diversity, composition structure, and phylogenetic analysis of microbial communities in leachate sediment ecosystems. *Applied Microbiology Biotechnology* 91(6):1659-1675.

- Lloyd JR., Ridley J, Khizniak T, Lyalikova NN, Macaskie LE. 1999. Reduction of technetium by *Desulfovibrio desulfuricans*: biocatalyst characterization and use in a flowthrough bioreactor. *Applied Environmental Microbiology* 65:2691–2696.
- Lovley DR, Phillips, EJ. 1994. Reduction of chromate by *Desulfovibrio vulgaris* and its c3 cytochrome. *Applied Environmental Microbiology* 60:726–728.
- Luo G, Wang W, Angelidaki I. 2013. Anaerobic Digestion for Simultaneous Sewage Sludge Treatment and CO<sub>2</sub> Biomethanation: Process Performance and Microbial Ecology. *Environmental Science & Technology* 47:10685–10693. doi.org/10.1021/es401018d.
- Ma J, Wang Z, Yang Y, Mei X, Wu Z. 2013. Correlating microbial community structure and composition with aeration intensity in submerged membrane bioreactors by 454 high-throughput sequencing. *Water Res* 47:859–869
- Macy JM, Santini, JM, Pauling BV, O’Neill AH, Sly LI. 2000. Two new arsenate/sulphate-reducing bacteria: mechanisms of arsenate reduction. *Archives of Microbiology* 173: 49–57.
- Madigan M, Martinko JM, Buckley DH, Bender SK, Stahl DA. 2016. *Microbiologia de Brock*. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed.
- Madoni PA. 1994. Sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis. *Water Research*, v. 28, n. 1, p. 67-75.
- McLellan SL, Huse SM, Mueller-Spitz SR., Andreishcheva EN, Sogin ML. 2010. Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in

wastewater treatment plant influent. *Environ. Microbiol* 12:378–392 doi: 10.1111/j.1462- 2920.2009.02075.x

Mendonça LC. 2002. Microbiologia e cinética de sistema de lodos ativados como pós tratamento de efluente de reator anaeróbio de leito expandido. Tese de doutorado. Universidade de São Carlos/USP. São Carlos.

Metcalf & Eddy. 2003. *Wastewater engineering: treatment and reuse*. Boston: McGraw-Hill. 1819 p.

Minz D, Flax JL, Green SJ, Muyzer G, Cohen Y, Wagner M, Rittman BE, Stahl DA. 1999. Diversity of sulfate-reducing bacteria in oxic and anoxic regions of a microbial mat characterized by comparative analysis of dissimilatory sulfite reductase genes. *Applied Environmental Microbiology* 65:4666–4671.

Mogensen GL, Kjeldsen KU, Ingvorsen K. 2005. *Desulfovibrio aerotolerans* sp. nov., an oxygen tolerant sulphate-reducing bacterium isolated from activated sludge. *Anaerobe* 11:339–349.

Moretti G, Matteucci F, Ercole C, Vegliò F, Del Gallo M. 2015. Microbial community distribution and genetic analysis in a sludge active treatment for a complex industrial wastewater: a study using microbiological and molecular analysis and principal component analysis. *Annual Microbiology* doi 10.1007/s13213-015-1122-1

Morgan-Sagastume F, Nielsen JL., Nielsen PH. 2008. Substrate-dependent denitrification of abundant probe-defined denitrifying bacteria in activated sludge. *FEMS Microbiology Ecology* 66:447–461.

- Moura A, Tacao M, Henriques I, Dias J, Ferreira P, Correia A. 2007. Characterization of bacterial diversity in two aerated lagoons of a wastewater treatment plant using PCR- DGGE analysis. *Microbiological Research* 164: 560-569.
- Moura I, Bursakov S, Costa C, Moura JJG. 1997. Nitrate and nitrite utilization in sulphate-reducing bacteria. *Anaerobe* 3, 279–290.
- Moustapha H, Yanghui X, Jeremy G, Gary Amya, Pei-Ying Hong. 2015. Differences in microbial communities and performance between suspended and attached growth anaerobic membrane bioreactors treating synthetic municipal wastewater. *Environmental Science: Water Research Technology* 1:800-813 doi 10.1039/C5EW00162E.
- Mozaheb SA, Ghaneian MT, Ghanizadeh GH, Fallahzadeh M. 2010. Evaluation of the Stabilization Ponds Performance for Municipal Wastewater Treatment in Yazd – Iran, *Middle-East Journal of Scientific Research*. 6(1):76-82.
- Musmann M, Ishii K, Rabus R, Amann R. 2005. Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured Deltaproteobacteria in an intertidal mud flat of the Wadden Sea. *Environmental Microbiology* 7:405–418.
- Muyzer G, Dewaal EC, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16S ribosomal-RNA. *Applied Environmental Microbiology* 59: 695–700.
- Muyzer G, Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:127-141.

- Muyzer G, Stams AJM. 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature reviews Microbiology* 6:441 – 454.
- Myers RM, Fischer SG, Lerman LS, Maniatis T. 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 3(9):3131-3145.
- Myuzer G, Ramsing NB. 1995. Molecular methods to study the organization of microbial communities. *Water Science Technology* 32:1-9.
- Myuzer G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2:317:322.
- NG WJ, Chin KK, Wong KK. 1989. Biological treatment alternatives for piggery wastes. In: *International Biosystems*, v.2, cap.6. Florida.
- Nielsen PH, Mielczarek AT, Kragelund C et al (2010) A conceptual ecosystem model of microbial communities in enhanced biological phosphorus removal plants. *Water Res* 44:5070–5088
- Nikolausz M, Sipos R, Révész S, Székely A, Márialigeti K. 2005. Observation of bias associated with re-amplification of DNA isolated from denaturing gradient gels. *FEMS Microbiology Letters* 244:385-390. Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, Roesti D, Jourdain-Miserez K, Forestier N, Teyssier-Cuvelle S, Gillet F, Aragno M, Rossi P. 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* 4(11):634-643.
- Obuobie E, Keraita BN, Danso G, Amoah P, Cofie OO, Raschid-Sally L, Dreschsel P. 2006. Sanitation and Urban Wastewater Management” Book Chapter in *Irrigated*

Urban Vegetable Farming in Ghana: Characteristics, Benefits and Risks.

<http://www.cityfarmer.org/GhanaIrrigateVegis.html>

Oliveira R. 1990. The performance of deep waste stabilization ponds in northeast Brazil.

Ph.D Thesis. The University of Leeds, U. K. 231 p.

Onuki M, Satoh H, Mino T, Matsuo T. 2000. Application of molecular methods to microbial community analysis of activated sludge. *Water Science and Technology* 42(3- 4):17-22.

Osborne CA, Galic M, Sangwan P, Janssen PH. 2005. PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific primers. *FEMS Microbiology Letters* 248:183-187.

Oulas A, Pavloudi C, Polymenakou P, Pavlopoulos GA, Papanikolaou N, Kotoulas G, Arvanitidis C, Iliopoulos I. 2015. Metagenomics: Tools and Insights for Analyzing Next-Generation Sequencing Data Derived from Biodiversity Studies. *Bioinformatics and Biology Insights* 9:75–88 doi: 10.4137/BBI.S12462.

Padhi SK, Tripathy S, Sen R, Mahapatra AS, Mohanty S, Maiti NK. 2013. Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of wastewater. *Int Biodeterior Biodegrad* 78:67–73.

Park HS, Lin S, Voordouw G. 2007. Ferric iron reduction by *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough wild type and energy metabolism mutants. *Antonie van Leeuwenhoek* 93:79–85.

Pavlostathis, S.G. 2006. Basic concepts of biological process. In: Cervantes, F.J.; *Advanced biological treatment processes for industrial wastewaters*. London: IWA Publishing.

- Peavy SH, Rowe DR, Tchobanoglous G. 1985. Environmental Engineering, International Edition MacGraw-Hill 207-322.
- Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. 2009. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. Clin Chem. 2009 May;55(5):856-66. doi: 10.1373/clinchem.2008.107565. Epub 2009 Mar 5.
- Philippot L. 2005. Tracking nitrate reducers and denitrifiers in the environment. Biochemical Society Transactions 33:200–204.
- Poole, J.E.P. 1984. A study of the relationship between the mixed liquor fauna and plant performance for a variety of activated sludge sewage treatment works. Water Research, 18(3):281-287.
- Postgate JR. 1979. The sulphate-reducing bacteria. 2nd edn Cambridge University Press, New York.
- Reysenbach AL, Giver LJ, Wickham GS, Pace NR. 1992. Differential Amplification of rRNA Genes by Polymerase Chain Reaction. Applied and Environmental Microbiology 58(10):3417-3418.
- Robertson LA, Kuenen JG, Kleijntjens R. 1985. Aerobic denitrification and heterotrophic nitrification by *Thiosphaera pantotropha*. Antonie Van Leeuwenhoek 51:445.
- Roesch LFW, et al. 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. ISME J 1:283–290.
- Rocha, JC, Barbiéri RS, Cardoso AA, Graner CAF. 1990. Agilização do processo de rotina analítica para a determinação da DQO (demanda química de oxigênio). Química Nova 13:200-201.



- Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W. 2011. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 475: 348–352. doi:10.1038/nature10242.
- Sabree, Z. L., Rondon, M. R., & Handelsman, J. 2009. Metagenomics. *Encyclopedia of Microbiology*, 622-632.
- Sant’Anna GL Jr. 2013. Tratamento biológico de efluentes: fundamentos e aplicações. Ed. Interciência. 2 ed. Rio de Janeiro/RJ. 418p.
- Sanz JL, Köchling T. 2007. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry* 42:119-133.
- Sass H, Wieringa E, Cypionka H, Babenzien HD, Overmann J. 1998. High genetic and physiological diversity of sulfate-reducing bacteria isolated from an oligotrophic lake sediment. *Archives Microbiology* 170:243–251.
- Scholten E, Lukow T, Auling G, Kroppenstedt RM, Rainey FA, Diekmann H. 1999. *Thauera mechernichensis* sp. nov., an aerobic denitrifier from a leachate treatment plant. *International Journal Systematic Bacteriology* 49:1045–1051.
- Seng P, Rolain JM, Fournier PE, Scola LB, Drancourt M, Raoult D. 2010. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiology* 5:11 doi.org/10.2217/fmb.10.127
- Shao MF, Zhang T, Fang HHP. 2010. Sulfur-driven autotrophic denitrification: diversity, biochemistry, and engineering applications. *Applied Microbiology Biotechnology* 88:1027–1042.

- Shenbin C, Rui D, Baikun L, Nanqi R, Yongzhen P. 2016. High-throughput profiling of microbial community structures in an ANAMMOX-UASB reactor treating high-strength wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(14):6457.
- Shendure J, Jo H. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 26:1135–1145
- Sigalevich, P, Meshorer E, Helman Y.,Cohen Y. 2000. Transition from anaerobic to aerobic growth conditions for the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio oxycloinae* results in flocculation. *Applied Environmental Microbiology* 66: 5005–5012.
- Silva SA, Mara DD. 1979. *Tratamentos biológicos de águas residuárias: Lagoas de estabilização*. Rio de Janeiro. ABES.
- Simões C, Rosmaninho I, Henriques AG. 2008. *Guia para a Avaliação de Impacte Ambiental de Estações de Tratamento de Águas Residuais*. Edição: Agência Portuguesa do Ambiente. Impressão: Euro dois. Novembro 2008. ISBN: 987-972-8577-39-1.
- Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK., Viridi JS. 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* 6:791 doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791
- Sparacino-Watkins C, Stolz JF, Basu P. 2014. Nitrate and periplasmic nitrate reductases. *Chemical Society Reviews* 43:676–706.
- Subhasis S, Prosun T, Phanibhusan G, Tapan S, Alok KS. 2016. Sequential Changes of Microbial Community Composition During Biological Wastewater Treatment in Single Unit Waste Stabilization System. *Waste and Biomass Valorization* 7(3):483.

- Torsvik V, Ovreas L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *CurrOpinion Microbiology* 5(3):240-245.
- Tucker MD, Barton LL, Thompson BM. 1998. Reduction of Cr, Mo, Se and U by *Desulfovibriodesulfuricans* immobilized in polyacrylamide gels. *Journal Industrial Microbiology. Biotechnology* 20:13–19.
- Van Haandel AC, Lettinga G. 1994. Tratamento Anaeróbio de esgoto em Regiões de Clima Quente. Campina Grande – PB: Epgraf. 198p.
- Varesche MB. 1997. Estudo com bactérias fototróficas anoxigênicas: enriquecimento, isolamento, caracterização nutricional e cinética de crescimento. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 363p.
- Vazoller, RF. 1989. Estudo sobre isolamento, caracterização e crescimento de culturas puras de bactérias metanogênicas provenientes de biodigestores de lodo de esgoto. 1989. 145f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Vazoller, RF. 1999. Microbiologia de processos biológicos de tratamento. In: IV Curso De Tratamento Biológico De Resíduos, Florianópolis.
- Vilanova X, Blanch AR. 2005. Distribution and persistence of fecal bacterial populations in liquid and dewatered sludge from a biological treatment plant. *The Journal of General and Applied Microbiology* 51(6):361-8.
- Von Sperling, M. 2002. Lagoas de estabilização. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais.

- Von Wintzingerode FV, Göbel UB, Stackebrandt E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 21:(213-229).
- Wang X, Hu M, Xia Y, Wen X, Ding K. 2012. Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in 14 wastewater treatment systems in China. *Bioresour Technol* 78(19):7042– 7047
- Wanga L, Jinli L, Quanyu Z, Wei W, Yuhan S. 2016. Comparative study of wastewater treatment and nutrient recycle via activated sludge, microalgae and combination systems. *Bioresource Technology* 211:1-5.
- Whiteley AS, Jenkins S, Waite I, Kresoje N, Payne H, Mullan B, Allcock R, O'Donnell A. 2012. Microbial 16S rRNA Ion Tag and community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) Platform. *Journal Microbiology Methods* 91: 80–88.
- Yang Y, Quensen J, Mathieu J, Wang Q, Wang J, Mengyan L, Tiedje JM, Alvarez PJJ. 2014. Pyrosequencing reveals higher impact of silver nanoparticles than AgD on the microbial community structure of activated sludge. *Water research* 48:317-325.
- Yang Y, Yu K, Xia Y, Lau FT, Tang DT, Fung WC, Fang HH. 2014. Metagenomic analysis of sludge from full-scale anaerobic digesters operated in municipal wastewater treatment plants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 5709
- Yu Z, Morrison M. 2004. Comparisons of Different Hypervariable Regions of rrs Genes for Use in Fingerprinting of Microbial Communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 70(8):4800–4806.

- Yu K, Zhang T. 2012. Metagenomic and metatranscriptomic analysis of microbial community structure and gene expression of activated sludge. *PLoS ONE* 7:e38183. doi: 10.1371/journal.pone.0038183
- Zhang T, Shao MF, Lin Y. 2012. 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from sewage treatment plants. *The ISME Journal* 6:1137–1147 doi:10.1038/ismej.2011.188.
- Zwirgmaier K. 2005. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) – the next generation. *FEMS Microbiology letters* 246:151-158.