

LÍVIA CARNEIRO FIDÉLIS SILVA

**DIVERSIDADE MICROBIANA DE LODO NITRIFICANTE ACLIMATADO À  
ALTAS CONCENTRAÇÕES SALINAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586d  
2015  
Silva, Livia Carneiro Fidélis, 1989-  
Diversidade microbiana de lodo nitrificante aclimatado à  
altas concentrações salinas / Livia Carneiro Fidélis Silva. –  
Viçosa, MG, 2015.  
xv, 90f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Cynthia Canêdo da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.57-72.

1. Diversidade microbiana. 2. Lodos ativados. 3. Efluente salino. 4. Tratamento biológico. 5. Remoção biológica de nitrogênio. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.


CDD 22. ed. 579.17

LÍVIA CARNEIRO FIDÉLIS SILVA

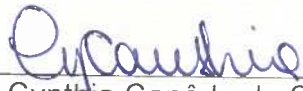
**DIVERSIDADE MICROBIANA DE LODO NITRIFICANTE ACLIMATADO À  
ALTAS CONCENTRAÇÕES SALINAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de julho de 2015.

  
Antônio Galvão do Nascimento

  
Michele Dias de Oliveira

  
Cynthia Canêdo da Silva  
(Orientadora)

*Dedico esta dissertação aos meus pais, Ana Lúcia e Gilmar, e à minha irmã Luísa, que são a razão do meu viver e o motivo de eu querer ser sempre uma pessoa melhor.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me permitido chegar até aqui, me abençoando e guiando meus passos, me indicando sempre a melhor direção.

Aos meus pais, Ana Lúcia e Gilmar, por me apoiarem e estarem sempre ao meu lado, nos momentos felizes e principalmente nos de angústia e desespero, além do amor e carinho incondicionais.

À minha irmã Luísa, pelas risadas e pelo companheirismo, e por se espelhar em mim, me fazendo ser sempre uma pessoa melhor.

A toda minha família, que mesmo de longe sempre me apoiou com palavras de carinho e incentivo.

Ao Igor, meu grande amor, por todo amor, carinho, companheirismo e compreensão durante esses anos, e principalmente nesses últimos meses em que o estresse se tornou constante.

Aos meus orientadores Cynthia e Sérgio, por todas as oportunidades concedidas, ensinamentos e pela confiança em mim depositada.

À Helena, que de estagiária se tornou uma grande amiga. Obrigada por todas as risadas e momentos de descontração no meio dessa atmosfera de nervosismo.

Ao Roberto, agradeço pela amizade, confiança e por toda a ajuda durante os experimentos.

À Mariana e Juliana, amigas de graduação, pós-graduação, e da vida! Sem vocês os dias de trabalho não seriam os mesmos!

Aos amigos do LIVM, por terem feito parte dessa experiência maravilhosa, por tornar os dias mais divertidos e contribuírem direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos de longe, que estão sempre perto, por todo apoio, carinho, risadas, noites de jogos e pela amizade de sempre e pra sempre.

Aos amigos que viçosa me deu, por fazerem meus finais de semana mais felizes e menos solitários.

A CAPES e PETROBRÁS pelo financiamento do projeto e pela bolsa concedida.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho!

## BIOGRAFIA

Lívia Carneiro Fidélis Silva, nascida em 11 de setembro de 1989, natural de Carangola, estado de Minas Gerais, filha de Gilmar Fernandes da Silva e Ana Lúcia Carneiro Fidélis Silva. Coursou o ensino fundamental na Escola Estadual Nascimento Leal, situada em Alvorada, distrito de Carangola. Em 2004 ingressou na Escola Estadual Emília Esteves Marques, localizada em Carangola, onde concluiu o ensino médio. Formou-se em Bacharel em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa no ano de 2013. Durante a graduação foi estagiária do Laboratório de Imunovirologia Molecular, onde teve bolsa de iniciação científica pela FUNARBE durante seis meses, e bolsa de iniciação científica pela PETROBRÁS durante dois anos. Os resultados obtidos neste período foram apresentados em diferentes congressos de âmbito regional, nacional e internacional. No segundo semestre de 2013 ingressou no Mestrado no programa de Pós-Graduação Microbiologia Agrícola pela mesma instituição de ensino.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xiv</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisão bibliográfica .....</b>	<b>3</b>
2.1. Água de produção.....	3
2.2. Processo biológico de lodos ativados .....	4
2.3. Remoção biológica de nitrogênio .....	5
2.3.1. Nitrificação.....	6
2.3.2. Processo ANAMMOX .....	8
2.3.3. Nitrificação heterotrófica .....	8
2.4. Remoção biológica de nitrogênio versus salinidade .....	9
2.5. O estudo da diversidade microbiana .....	11
2.5.1. Índices de diversidade .....	13
2.5.2. Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) .....	14
2.5.3. <i>Flow-fluorescence in situ hybridization (Flow-FISH)</i> .....	16
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>18</b>
3.1. Objetivos gerais .....	18
3.2. Objetivos específicos .....	18
<b>4. Metodologia .....</b>	<b>19</b>
4.1. Coleta da amostra de lodo .....	19
4.2. Aclimação do lodo .....	19
4.3. Avaliação do processo de nitrificação.....	19



4.4.	Coleta das amostras para análises moleculares .....	20
4.5.	Extração de DNA das amostras de lodo aclimatado .....	20
4.6.	Amplificação dos genes RNAr 16S .....	21
4.7.	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante – DGGE .....	22
4.8.	Sequenciamento massivo do gene RNAr 16S de bactéria e archaea	22
4.9.	Análise dos dados de sequenciamento .....	23
4.10.	<i>Flow-FISH</i> .....	24
<b>5.</b>	<b>Resultados e discussão .....</b>	<b>26</b>
5.1.	Aclimação à altas salinidades e nitrificação .....	26
5.2.	Extração de DNA e amplificação dos genes RNAr 16S de archaea e bactéria.....	26
5.3.	DGGE.....	28
5.4.	Sequenciamento parcial da região RNAr 16S de bactéria e archaea	30
5.4.1.	Composição da comunidade microbiana do lodo .....	32
5.4.1.1.	Bactéria .....	32
5.4.1.2.	Archaea .....	38
5.4.2.	Remoção biológica de nitrogênio .....	41
5.4.2.1.	Microrganismos nitrificantes convencionais .....	41
5.4.2.2.	Microrganismos ANAMMOX .....	43
5.4.2.3.	Microrganismos nitrificantes heterotróficos .....	43
5.4.3.	Análise da diversidade microbiana.....	45
5.4.3.1.	Índices de diversidade .....	45
5.4.3.2.	Análise de similaridade.....	47
5.4.3.3.	Curvas de rarefação .....	48
5.4.4.	<i>Flow-FISH</i> .....	50
<b>6.</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>56</b>
<b>7.</b>	<b>Referências .....</b>	<b>57</b>
<b>8.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>73</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema do sistema de lodos ativados.....	5
<b>Figura 2.</b> Equilíbrio da amônia livre e do íon amônio em função do pH do meio. .....	6
<b>Figura 3.</b> Atividade biológica em resposta ao aumento da concentração salina .....	10
<b>Figura 4.</b> Esquema representando amplicons de PCR de mesmo tamanho com sequências nucleotídicas diferentes analisados em: A) eletroforese em gel de agarose e B) eletroforese em gel de gradiente desnaturante .....	15
<b>Figura 5.</b> Esquema representando a desnaturação parcial e completa da dupla fita de DNA ao longo do gradiente desnaturante. ....	15
<b>Figura 6.</b> Extração de DNA total das amostras de lodo com 25, 50, 75, 100, 105, 115 e 125 g.L <sup>-1</sup> de NaCl. ....	27
<b>Figura 7.</b> Amplicons da sequência do gene RNAr 16S aplicados em gel de agarose 1 %. A) domínio Bacteria e B) domínio Archaea. ....	28
<b>Figura 8.</b> Perfil de bandas do gel de DGGE para o gene de RNAr 16S de Bacteria ao longo do processo de aclimação ao sal. ....	28
<b>Figura 9.</b> Perfil de bandas do gel de DGGE para o gene de RNAr 16S de Archaea ao longo do processo de aclimação ao sal .....	29
<b>Figura 10.</b> Número de sequências pertencentes aos Domínios: A) Bacteria e B) Archaea nas diferentes concentrações de NaCl. ....	31
<b>Figura 11.</b> Porcentagem de sequências classificadas quanto aos filios bacterianos mais abundantes. ....	33
<b>Figura 12.</b> Proporção de filios bacterianos mais abundantes nas diferentes concentrações de NaCl. ....	33
<b>Figura 13.</b> Classes mais abundantes pertencentes ao domínio Bacteria nas diferentes concentrações de NaCl. ....	34
<b>Figura 14.</b> Gêneros mais abundantes pertencentes ao domínio Bacteria nas diferentes concentrações de NaCl. ....	35
<b>Figura 15.</b> Proporção das sequências pertencentes ao filo Euryarchaeota nas diferentes concentrações de NaCl. ....	38
<b>Figura 16.</b> Proporção das sequências afiliadas à classes pertencentes ao domínio Archaea. ....	39

<b>Figura 17.</b> Proporção de sequências afiliadas aos gêneros pertencentes ao domínio Archaea em diferentes salinidades. A) Gêneros mais abundantes e B) Gêneros <i>Methanosaeta</i> , <i>Halogranum</i> e <i>Methanothermobacter</i> . .....	41
<b>Figura 18.</b> Proporção de gêneros de bactérias e archaeas envolvidos no processo de nitrificação biológica nas diferentes concentrações de sal. ....	42
<b>Figura 19.</b> Proporção de espécies de bactérias envolvidas no processo ANAMMOX nas diferentes concentrações de sal. ....	43
<b>Figura 20.</b> Proporção de potenciais bactérias nitrificantes heterotróficas encontradas nas diferentes concentrações de sal. ....	44
<b>Figura 21.</b> Dendrograma das três amostras de lodo, 25 g/L, 100 g/L e 125 g/L. ....	48
<b>Figura 22.</b> Curva de rarefação observada para as OTUs de procariotos (bacteria + archaea) ( <i>cutoff</i> de 3 %) nas diferentes concentrações de sal. ....	49
<b>Figura 23.</b> Curva de rarefação para o conjunto de OTUs do domínio Bacteria ( <i>cutoff</i> de 3 %) nas diferentes concentrações de sal. ....	50
<b>Figura 24.</b> Curva de rarefação para o conjunto OTUs do domínio Archaea ( <i>cutoff</i> de 3 %) nas diferentes concentrações de sal. ....	50
<b>Figura 25.</b> Gráfico mostrando as regiões das 'gates' para água e procariotos (células de <i>E. coli</i> ) definidas pelo citômetro. ....	52
<b>Figura 26.</b> Gráfico do controle da especificidade da sonda de Archaea obtido pelo <i>Flow-FISH</i> . ....	52
<b>Figura 27.</b> Gráfico representando a quantificação de archaea na amostra com 25 g/L de sal obtido pelo <i>Flow-FISH</i> . ....	53
<b>Figura 28.</b> Gráfico representando a quantificação de archaea na amostra com 100 g/L de sal obtido pelo <i>Flow-FISH</i> . ....	54
<b>Figura 29.</b> Gráfico representando a quantificação de archaea na amostra com 125 g/L de sal obtido pelo <i>Flow-FISH</i> . ....	54
<b>Figura 30.</b> Curva de rarefação observada para as OTUs de procariotos (bacteria + archaea) ( <i>cutoff</i> de 3 %) nas diferentes concentrações de sal a partir dos resultados obtidos com os "primers" 27f/338r. ....	89
<b>Figura 31.</b> Curva de rarefação observada para as OTUs de procariotos (bacteria + archaea) ( <i>cutoff</i> de 3 %) nas diferentes concentrações de sal a partir dos resultados obtidos com os "primers" 349f/534r. ....	90

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Primers utilizados para amplificação do gene RNAr 16S. ....	21
<b>Tabela 2.</b> Sondas utilizadas para a hibridização e seus respectivos fluoróforos .....	24
<b>Tabela 3.</b> Índices de diversidade microbiana de procariotos nas diferentes concentrações de sal.....	46
<b>Tabela 4.</b> Índices de diversidade para o domínio Bacteria nos diferentes concentrações de sal.....	47
<b>Tabela 5.</b> Índices de diversidade para o domínio Archaea nos diferentes concentrações de sal.....	47
<b>Tabela 6.</b> Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 27f/338r pertencentes ao domínio Bacteria quanto ao Filo, e a abundância ao longo do aumento da salinidade. ....	73
<b>Tabela 7.</b> Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 27f/338r pertencentes ao domínio Bacteria quanto à Classe, e a abundância ao longo do aumento da salinidade. ....	74
<b>Tabela 8.</b> Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 27f/338r pertencentes ao domínio Bacteria quanto ao Gênero, e a abundância ao longo do aumento da salinidade. ....	75
<b>Tabela 9.</b> Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 27f/338r pertencentes ao domínio Archaea quanto ao Filo, e a abundância ao longo do aumento da salinidade. ....	82
<b>Tabela 10.</b> Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 27f/338r pertencentes ao domínio Archaea quanto à Classe, e a abundância ao longo do aumento da salinidade. ....	82
<b>Tabela 11.</b> Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 27f/338r pertencentes ao domínio Archaea quanto ao Gênero, e a abundância ao longo do aumento da salinidade. ....	82
<b>Tabela 12.</b> Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 349f/534r pertencentes ao domínio Bacteria quanto ao Filo, e a abundância ao longo do aumento da salinidade. ....	83

<b>Tabela 13.</b> Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 349f/534r pertencentes ao domínio Bacteria quanto à Classe, e a abundância ao longo do aumento da salinidade. ....	84
<b>Tabela 14.</b> Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 349f/534r pertencentes ao domínio Bacteria quanto ao Gênero, e a abundância ao longo do aumento da salinidade. ....	85
<b>Tabela 15.</b> Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 349f/534r pertencentes ao domínio Archaea quanto ao Filo, e a abundância ao longo do aumento da salinidade. ....	87
<b>Tabela 16.</b> Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 349f/534r pertencentes ao domínio Archaea quanto à Classe, e a abundância ao longo do aumento da salinidade. ....	87
<b>Tabela 17.</b> Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 349f/534r pertencentes ao domínio Archaea quanto ao Gênero, e a abundância ao longo do aumento da salinidade ....	88
<b>Tabela 18.</b> Índices de diversidade microbiana de procariotos nas diferentes concentrações de sal a partir dos resultados obtidos com os “primers” 27f/338r .....	89
<b>Tabela 19.</b> Índices de diversidade microbiana de procariotos nas diferentes concentrações de sal a partir dos resultados obtidos com os “primers” 349f/534r .....	89

## RESUMO

SILVA, Livia Carneiro Fidélis, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Diversidade microbiana de lodo nitrificante aclimatado à altas concentrações salinas.** Orientadora: Cynthia Canêdo da Silva. Coorientador: Sérgio Oliveira de Paula.

Durante o processo de extração do petróleo, um elevado volume de água é consumido gerando grandes volumes de efluentes salinos contaminados com compostos tóxicos de difícil degradação. A amônia é um desses compostos, que em concentrações elevadas, pode ser prejudicial para o ambiente. Por isso, antes de ser descartado ou reutilizado, o efluente deve ser tratado. O tratamento biológico por lodos ativados tem sido o mais utilizado devido ao baixo custo e boa qualidade do efluente tratado. O processo biológico de remoção de amônia é denominado nitrificação, onde a amônia é oxidada a nitrito que é oxidado a nitrato. A primeira oxidação pode ser realizada tanto por bactérias quanto por archaeas. O sal é um fator de instabilidade nas estações de tratamento biológico, porque interfere diretamente nos processos de degradação de poluentes como a nitrificação. Então, o uso de microrganismos adaptados ao sal nas estações de tratamento otimizaria o processo. Dessa forma, o objetivo do estudo foi avaliar a diversidade microbiana total e nitrificante no lodo nitrificante ao longo do processo de aclimação dos microrganismos à altas concentrações salinas, visando um melhor entendimento sobre a ecologia destes microrganismos. Para tal, o lodo foi aclimatado em batelada, com adição semanal de 5 g/l de NaCl ao efluente de alimentação e a taxa de remoção de amônia foi monitorada. O sal foi adicionado até a completa inibição da nitrificação, que ocorreu na concentração de 125 g/l de NaCl. Em cada concentração salina, uma alíquota do lodo foi coletada e fixada. Os pontos com 25, 50, 75, 100, 105, 115 e 125 g/L foram selecionados, e o DNA total foi extraído das amostras. O DNA foi amplificado com *primers* específicos para a região RNAr 16S de bactéria e Archaea, e a separação dos amplicons foi feita por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). Após o DGGE, três pontos foram selecionados para o estudo da diversidade através de sequenciamento massivo da região RNAr 16S de bactéria e archaea e quantificação das populações metabolicamente ativas por *Flow-FISH*. Foram selecionados os pontos com 25 g/l de NaCl,

concentração salina normal do efluente, 100 g/l de NaCl, que foi a última concentração salina onde a taxa de nitrificação foi de 100 %, e 125 g/l de NaCl, onde a nitrificação chegou a zero. Os resultados mostraram que com o aumento da salinidade a abundância de bactérias diminuiu e a de Archaea aumentou, e na concentração de 125 g/L de sal, 80 % da população metabolicamente ativa é composta por archaea. Este resultado era esperado, uma vez que muitos microrganismos pertencentes ao domínio Archaea são resistentes às condições extremas como altas salinidades. Os resultados também mostraram que a remoção de amônia nas três concentrações salinas analisadas é feita por um grupo distinto de microrganismos, envolvendo bactérias autotróficas, bactérias heterotróficas e archaeas, evidenciando a ocorrência da nitrificação autotrófica, heterotrófica e processo ANAMMOX.

## ABSTRACT

SILVA, Livia Carneiro Fidélis, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Microbial diversity of nitrifying sludge acclimated to high salt concentrations.** Adviser: Cynthia Canêdo da Silva. Co-adviser: Sérgio Oliveira de Paula.

During the process of petroleum extraction, a high volume of water is consumed generating large volumes of saline effluent contaminated with toxic compounds that are difficult to degrade. Ammonia is one of these compounds, which at high concentrations can be harmful to the environment. Therefore, before being discarded or reused, the wastewater must be treated. Biological treatment has been the most widely used due to low cost and good quality of the final effluent. The biological process of removing ammonia is nitrification, where ammonia is oxidized to nitrite which is oxidized to nitrate. The first step may be performed both by bacteria and by archaea. The salt is a factor of instability in biological treatment plants, because it interferes directly on pollutant degradation processes such as nitrification. Then, the use of microorganisms adapted to salt in wastewater treatment station would optimize the process. Thus, the aim of the study was to evaluate the total and nitrifying microbial diversity in nitrifying sludge during the acclimation process of microorganisms to high salt concentrations, seeking a better understanding of the ecology of these microorganisms. For this, the sludge acclimatization was carried out in batch with weekly addition of NaCl to the effluent and the removal rate of ammonia was monitored. The salt was added until complete nitrification inhibition, which occurred in the concentration of 125 g/l NaCl. At each salt concentration, a sludge aliquot was collected and fixed for analysis. The points 25, 50, 75, 100, 105, 115 and 125 g/L were selected, and total DNA was extracted from the samples. The DNA was amplified with specific primers for the 16S rRNA region of bacteria and archaea and the separation of amplicons was performed in denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). After DGGE, three points were selected for the study of diversity by massive sequencing of 16S rRNA region of bacteria and Archaea and quantification of metabolically active population by *Flow-FISH*. Points were selected with 25 g/l of NaCl, initial salt concentration of the effluent, 100 g/l of NaCl, which was the last salt concentration where nitrification rate was 100 %, and 125 g/l of NaCl, where nitrification reached



zero. The results showed an increase in the abundance of archaea and a decrease in the abundance of bacteria over increasing the salt concentration, and in the concentration of 125 g/l of salt, 80 % of metabolically active population is Archaea. This result was expected, since many microorganisms belonging to domain Archaea are resistant to extreme conditions such as high salinity. The results also showed that removal of ammonia in the three salt concentrations analyzed is made by a distinct group of microorganisms, involving autotrophic bacteria, heterotrophic bacteria and archaea, indicating the occurrence of nitrification autotrophic, nitrification heterotrophic and ANAMMOX processes.

## 1. Introdução

A indústria petroleira, em seus diferentes processos e unidades, é grande consumidora de água, apresentando elevada relação de volume de água utilizado por volume de petróleo processado. Os terminais marítimos de petróleo, que são responsáveis pela recepção, armazenamento e distribuição de petróleo oriundo das plataformas, são grandes produtores de efluentes contaminados. Ao petróleo extraído, existe uma grande quantidade de água associada, que precisa ser separada do óleo antes da distribuição para as refinarias, denominada água de produção (Fortis et al., 2007).

A água de produção consiste em grande parte da água de formação que está presente naturalmente na formação geológica do reservatório de petróleo e é transportada para superfície junto com óleo (Santos, 1999; Stephenson, 1992). Devido à suas origens, a água de formação possui íons em solução com concentrações variadas, tendo como mais significativo o cloreto, sódio, cálcio, magnésio, sulfeto e amônia. Despejos de águas residuais contendo altas concentrações de nitrogênio podem ser tóxicos à vida aquática, causar depleção de oxigênio e eutrofização no meio ambiente afetando negativamente a qualidade da água (Ahn, 2006). Dessa forma, de acordo com as exigências ambientais, o efluente, antes de ser despejado no corpo receptor, ou reutilizado no processo de extração do petróleo, deve ser tratado.

Entre os tratamentos biológicos de efluentes, os sistemas aeróbios tem ganhado destaque, devido à eficiência do processo, que consegue remover grande parte dos principais poluentes. Dentre os tipos de sistemas aeróbios, destacam-se os sistemas de lodos ativados por possuir uma grande flexibilidade de configurações, o que lhe permite uma maior eficiência na remoção de matéria orgânica e de nutrientes.

A remoção biológica de nitrogênio acontece pela conversão do nitrogênio em sua forma encontrada no efluente para nitrogênio molecular ( $N_2$ ), que posteriormente é incorporado ao ar atmosférico, por meio da ação de microrganismos. (Ferreira, 2000; Gao, 2013).

Um grande desafio encontrado nas estações de tratamento desses efluentes é a elevada salinidade com que eles chegam, uma vez que o sal

pode dificultar o transporte de componentes químicos entre o meio e a célula, alterando seu metabolismo, diminuindo a taxa de remoção dos componentes, além de causar a desidratação e lise celular (Measures, 1975). Com o crescimento da exploração do petróleo nas camadas do pré-sal, os efluentes gerados por esta exploração apresentarão uma concentração salina ainda maior do que as encontradas atualmente, dificultando os processos de tratamento biológico do efluente. Neste contexto, estratégias de adaptação de microrganismos presentes no lodo ativado se fazem necessárias para o tratamento destes efluentes salinos. Microrganismos adaptados à altas concentrações salinas e, que consigam remover amônia, dariam ao processo biológico uma maior eficiência de remoção de nitrogênio.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade microbiana total e nitrificante ao longo do processo de aclimatação dos microrganismos às crescentes concentrações de sal, visando assim, o melhor entendimento da ecologia dos microrganismos relacionados principalmente com a remoção do nitrogênio.

## **2. Revisão bibliográfica**

### **2.1. Água de produção**

A água de produção consiste em grande parte de água de formação, naturalmente presente na formação geológica do reservatório de petróleo, e água de injeção, inserida no reservatório para recuperação do óleo, e quaisquer produtos químicos adicionados durante o processo de extração (Patin, 1999). A água de produção representa a corrente de efluentes líquidos de maior volume nas atividades de produção de petróleo (Amini et al., 2012).

Mundialmente, estima-se que em 2011, 260 milhões de barris de água de produção foram produzidos por dia (BP, 2012). Sua composição é bastante complexa, com presença de componentes químicos, partículas de óleo em suspensão, metais pesados, radionucleotídeos, hidrocarbonetos, amônia e altos teores de sais (Stephenson, 1992). Apresentam concentrações de nitrogênio amoniacal elevada e acima do valor permitido pela legislação. Segundo a resolução CONAMA 430/2011, o padrão de lançamento de nitrogênio nos efluentes, na forma de nitrogênio amoniacal total, é estabelecido em 20,0 mg N/L. Alguns estudos mostram que essas concentrações podem variar de 22 a 800 mg.L<sup>-1</sup>, com média de 85,4 mg.L<sup>-1</sup> (Gabardo 2007, Lima 2008, Andrade 2009). Esses aspectos fazem com que o gerenciamento da água de produção requeira cuidados específicos, não apenas relacionados à aspectos técnicos e operacionais, mas, também, aos ambientais (Amini et al., 2012).

A água de produção pode ser descartada no oceano ou reinjetada nos poços de petróleo, desde que atenda às condições e padrões estabelecidos pela resolução do CONAMA 393/2007, específica para o descarte contínuo de água de processo ou de produção e plataformas marítimas de petróleo e gás natural. Dessa forma, antes do descarte, a água de produção deve passar por uma série de tratamentos. Diferentes tecnologias são empregadas, como a coagulação e a floculação, flotação, tratamentos biológicos, filtração em membrana e processos de oxidação avançada, porém, devido à complexidade dos componentes do efluente, algumas técnicas podem ser ineficientes.

Em vista disso, a busca por novos processos de tratamento de água de

produção se faz importante uma vez que a exploração de petróleo vem aumentando consideravelmente ao longo dos anos. Estima-se que entre 2001 e 2011, a produção mundial de petróleo aumentou em 12 %, passando de 74,77 milhões para 83,58 milhões de barris por dia. No Brasil, particularmente, nesse mesmo período, o aumento passou os 60 %, passando de 1,34 milhões para 2,19 milhões de barris por dia (BP, 2012).

## **2.2. Processo biológico de lodos ativados**

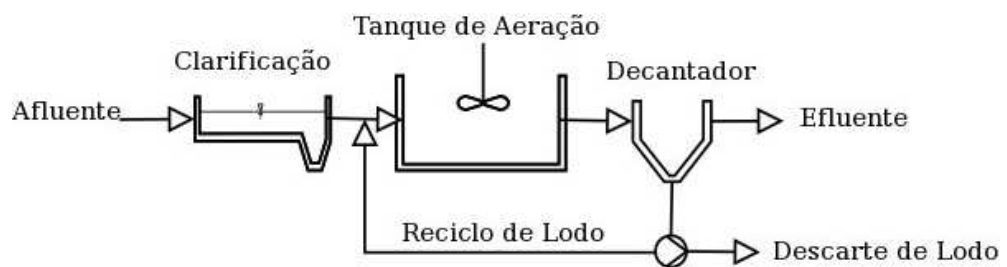
Os tratamentos biológicos permitem tratar grandes volumes de efluentes, apresentando um menor custo de funcionamento e uma maior facilidade operacional quando comparado com os tratamentos físicos e químicos (Freire et al., 2000; Da Motta et al., 2003). O processo de lodo ativado é um tipo de tratamento biológico de efluentes. É o mais empregado no mundo, principalmente pela alta eficiência de remoção de matéria orgânica e nutrientes associada à pequena área de implantação requerida, quando comparado a outros sistemas de tratamento (Jordão e Pessoa, 2005).

O princípio do processo baseia-se na oxidação bioquímica dos compostos orgânicos e inorgânicos presentes nos efluentes, mediada por uma população microbiana diversificada e mantida em suspensão num meio aeróbio. O processo consiste em se provocar o desenvolvimento de culturas microbiológicas na forma de flocos (lodos ativados) em um tanque de aeração, que é alimentado pelo efluente a ser tratado. No tanque, a finalidade da aeração é promover a oxigenação dos microrganismos e evitar a deposição dos flocos bacterianos, misturando-os homoganeamente ao efluente. O oxigênio necessário ao crescimento biológico é levado até o efluente com o lodo por meio de um sistema de aeração mecânica, por ar comprimido, ou ainda, pela introdução de oxigênio puro.

Neste processo, o efluente juntamente com o lodo é enviado continuamente a um decantador, destinado a separar o efluente tratado do lodo. O lodo é então recirculado ao tanque de aeração para a manutenção da concentração dos microrganismos. O sobrenadante do decantador já é o efluente tratado, pronto para ser descartado ao corpo receptor (Figura 1). Devido ao crescimento contínuo dos microrganismos, um lodo excedente é

formado e posteriormente é extraído do sistema.

O sistema de lodos ativados, comparado à outros sistemas de tratamento biológico, apresenta como vantagens os seguintes fatores: excelente qualidade do efluente obtido, flexibilidade operacional, requer pequenos volumes de reator, segurança e estabilidade do processo. As desvantagens do processo são: operação mais delicada, custo maior de operação e investimento, necessidade de controle adequado do processo por pessoal especializado e maior geração de lodo (Braile e Cavalcanti, 1993).

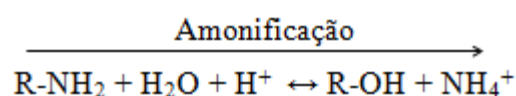


**Figura 1.** Esquema de sistema de lodos ativados (Braile e Cavalcanti, 1993).

### 2.3. Remoção biológica de nitrogênio

A remoção biológica do nitrogênio pode acontecer de três maneiras distintas: através da nitrificação autotrófica seguida da desnitrificação, nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia e pelo processo ANAMMOX.

O nitrogênio pode ser encontrado no ambiente como amônia ( $\text{NH}_3$ ), amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrogênio gasoso ( $\text{N}_2$ ) ou na forma orgânica. As substâncias orgânicas nitrogenadas podem ser degradadas por bactérias decompositoras da matéria proteica, gerando  $\text{NH}_3$ , através de um processo denominado amonificação. (Henze et al., 1997, Madigan et al., 1997). O termo amonificação é devido à formação de amônia como produto final, como demonstrado abaixo.



Nessa etapa, ocorre a alcalinização do meio, que se faz necessária para

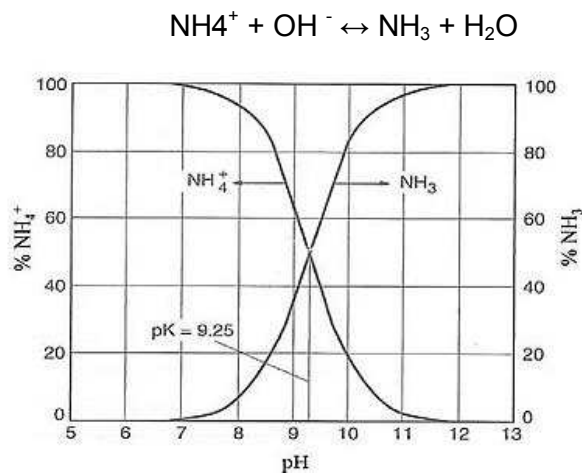
as outras etapas do processo de remoção.

A seguir estão descritos os diferentes processos de remoção biológica de nitrogênio:

### 2.3.1. Nitrificação

A nitrificação é um processo biológico, realizada por bactérias e algumas espécies de Archaea, que ocorrem naturalmente em sistemas onde existam condições aeróbias e a presença de nitrogênio amoniacal (Ferreira, 2000; Limpiyakorn 2013).

Depois de passar pela etapa de amonificação, o nitrogênio amoniacal pode estar na forma de amônia livre ( $\text{NH}_3$ ) ou ionizada ( $\text{NH}_4^+$ ), dependendo do pH e da temperatura do meio (Figura 2). Em ambientes de pH baixo há predominância do íon amônio, devido ao aumento da concentração de  $\text{H}^+$ . Em pH alto, a concentração de  $\text{H}^+$  diminui, predominando a amônia. Em condições onde o pH do meio é maior que 11, a amônia se encontra na forma gasosa (Metcalf e Eddy, 2003).



**Figura 2.** Equilíbrio da amônia livre e do íon amônio em função do pH do meio (Metcalf e Eddy, 2003).

A nitrificação é a passagem da amônia a nitrato sob condições aeróbias, e é realizada em duas etapas pela ação de um conjunto de microrganismos, na maioria bactérias. A primeira etapa, que consiste na oxidação de nitrogênio

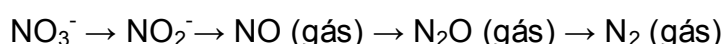
amoniaco a nitrito, pode ser realizada por bactérias dos gêneros *Nitrosococcus*, *Nitrospira* e *Nitrosomonas* e por algumas espécies de archaeas pertencentes ao Filo Thaumarchaeota (Madigan et al., 1997; Uemoto e Saiki, 2000; Limpiyakorn, 2013). Enquanto que a segunda etapa, a oxidação de nitrito a nitrato, é feita por bactérias dos gêneros *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrospina* e *Nitrococcus* (Vanparys, 2006). Essa etapa do processo gera H<sup>+</sup>, ou seja, consome a alcalinidade do meio, o que pode ser prejudicial ao processo de nitrificação, sendo necessário o fornecimento de alcalinidade por fontes externas (van Haandel e Marais, 1999).

As bactérias e archaeas nitrificantes são autótrofas, ou seja, utilizam o CO<sub>2</sub> como fonte de carbono, produzido durante a degradação aeróbia da matéria carbonácea. Realizam esses processos em condições aeróbias, mas se caracterizam por possuir um crescimento lento.

## **Desnitrificação**

O nitrato gerado pela nitrificação servirá de substrato para próxima etapa do ciclo do nitrogênio, a desnitrificação.

A desnitrificação é o fenômeno de transformação de nitrato em gás nitrogênio (N<sub>2</sub>) pela ação de bactérias desnitrificantes. A sequência de reações desta etapa está demonstrada abaixo e, em cada etapa, ocorre a participação de uma enzima redutase.



Quando o ambiente se torna anóxico, ou seja, o oxigênio se torna limitante para a respiração aeróbia e há presença de nitrato no meio, ocorrerá a desnitrificação, onde o nitrato passa a ser utilizado como aceptor de elétrons (Vazoller et al., 2001).

As bactérias anaeróbias facultativas são as responsáveis pela desnitrificação. Elas utilizam o oxigênio como aceptor final de elétrons em ambientes aeróbios, e em ambientes anóxicos utilizam o nitrato, consumindo a matéria orgânica e convertendo-a em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. A desnitrificação pode ser realizada por diversos gêneros de bactérias como: *Pseudomonas*,



*Achromobacter, Alcaligenes, Bacillus, Micrococcus, Proteus, Hiphomicrobium, Chromobacterium, Halobacterium, Moraxella, Neisseria, Paracoccus, Azospirillum, Rhodopseudomonas, Thiobacillus, Vibrio, Xanthomonas e Klebsiella* (Rittman & Langeland, 1985).

### **2.3.2. Processo ANAMMOX**

O processo ANAMMOX foi descoberto na década de 90, em Delft na Holanda por Arnold Mulder, em um reator biológico tratando efluente de uma indústria de fermento (MULDER et al., 1995). O processo envolve a oxidação do íon amônio diretamente a nitrogênio gasoso usando o nitrito como acceptor final de elétrons sob condições anaeróbias estritas (Strous et al., 1997). O processo é autotrófico, utilizando CO<sub>2</sub> como única fonte de carbono (Strous et al., 1999). Um dos subprodutos é o nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), que representa, aproximadamente, 10 % do nitrogênio removido (Khin e Annachhatre, 2004). O nitrito é reduzido a hidroxilamina, que reage com o doador de elétrons amônio, culminando com a produção de nitrogênio gasoso (Jetten, et al., 1999).

Os organismos ANAMMOX estão classificados no grupo dos Planctomicetos, cinco dos quais foram denominados provisoriamente de *Candidatus Brocadia anammoxidans*, *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*, *Candidatus Scalindua wagneri*, *Candidatus Anammoxoglobus propionicus* (Kartal et al., 2007) e *Candidatus Jettenia asiatica* (Quan et al., 2008). Estes constituem em um grupo interessante de bactérias, com muitas propriedades raras ou únicas. Além do íon amônio, esses microrganismos são capazes de utilizar o ferro ferroso (Fe<sup>+2</sup>) e vários compostos orgânicos como doadores de elétrons (Strous et al., 2006; Kartal et al., 2007).

### **2.3.3. Nitrificação heterotrófica**

Diferente do processo de nitrificação que acabamos de descrever, o qual chamaremos nesta dissertação de nitrificação convencional, a nitrificação heterotrófica é realizada por bactérias heterotróficas. Em 1972 foi isolada de um ambiente natural, a primeira bactéria heterotrófica capaz de nitrificar, a

*Arthrobacter* sp. (Verstrae e Alexande, 1972). Onze anos mais tarde, em 1983, a segunda bactéria *Paracoccus denitrificans* foi isolada de lodo ativado em uma estação de tratamento. Esta é capaz de realizar, simultaneamente, a nitrificação heterotrófica e a desnitrificação aeróbica (Robertson e Kuenen, 1983). Desde então, uma maior atenção se voltou para as bactérias nitrificantes heterotróficas/desnitrificantes aeróbias.

Comparada com a nitrificação convencional, esse tipo de nitrificação oferece algumas vantagens no que se refere ao tratamento biológico: utilização de substrato orgânico e tolerância ao oxigênio durante todas as etapas de remoção de nitrogênio, permitindo com que o tratamento possa ocorrer em um único reator (Third et al., 2005). Além disso, o processo de desnitrificação pode equilibrar a mudança de pH no reator, evitando a acidificação causada pela nitrificação (Marazioti et al., 2003).

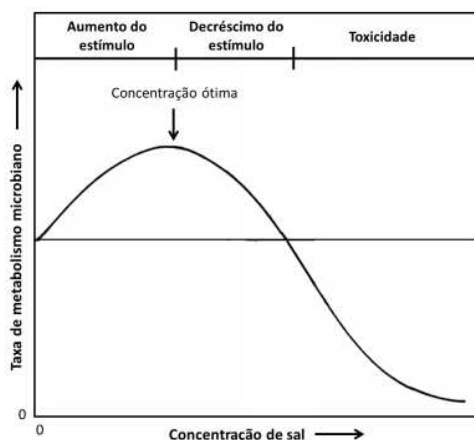
Nos últimos tempos, outras espécies de bactérias nitrificantes heterotróficas/desnitrificantes aeróbias já foram isoladas, como: *Alcaligenes faecalis* (Joo et al., 2005), *Bacillus* sp. (Yang et al., 2011), *Pseudomonas* sp. (Wan et al., 2011), *Aeromonas* sp. (Chen et al., 2014), *Halomonas campisalis* (Guo et al., 2013), *Acinetobacter* sp. (Yao et al., 2013), *Bacillus methylophilicus* (Zhang et al., 2012) e *Pseudomonas stutzeri* (Zhang et al., 2011).

#### **2.4. Remoção biológica de nitrogênio versus salinidade**

Atualmente, o sal é considerado um fator comum de instabilidade em estações de tratamento de águas residuárias, especialmente no âmbito industrial. Indústrias de processamento de frutos de mar e de conservas, curtumes, fabricação de queijo, produção de químicos e farmacêuticos e indústrias petrolíferas, geram efluentes com elevadas concentrações de sais inorgânicos (Dahl et al., 1997).

De acordo com Mc Carty (1964), o sal, em baixas concentrações, pode ser favorável aos processos biológicos, funcionando como um estimulador da atividade biológica dos microrganismos, até o momento onde o ponto máximo do crescimento microbiano é atingido. Entretanto, à medida que a concentração salina aumenta, a taxa metabólica diminui, e os processos

biológicos são prejudicados (Figura 3).



**Figura 3.** Atividade biológica em resposta ao aumento da concentração salina (Mc Carty, 1964).

A salinidade afeta o metabolismo de bactéria, reduzindo seu crescimento e a taxa de oxidação de amônia. Por isso estudos para aprimorar o conhecimento a cerca dos processos de remoção de nitrogênio de efluentes salinos são de grande interesse para diversos ramos industriais que necessitam desse tipo de tratamento biológico (Dalmacija et al., 1996).

Um dos motivos para a diminuição da taxa de crescimento de bactérias não-halofílicas com o aumento da salinidade, é que parte do substrato consumido é gasto na síntese de “solutos compatíveis”, usados no balanceamento da pressão osmótica do meio. Isto implica em um alto custo energético para o microrganismo, além de que, a alta salinidade provoca perturbações no sistema biológico devido à variação da força iônica do meio, resultando na perda de água dos microrganismos para o meio e perda da atividade metabólica (UYGUR e KARGI, 2004). Para as bactérias nitrificantes, em particular, esse encargo se adicionaria ao custoso processo de redução de  $\text{CO}_2$  (Measures, 1975).

O sal pode inibir direta ou indiretamente a taxa de consumo  $\text{NH}_3$ . Ele interfere diretamente quando inibe as enzimas do periplasma que estão envolvidas na nitrificação, e interfere indiretamente quando o aumento da salinidade diminui a taxa de transporte do substrato através do periplasma (Measures, 1975).

O sal também pode afetar a estrutura e as características de sedimentação do floco de microrganismos, constituinte dos lodos ativados, e a solubilidade do oxigênio no meio, tornando-o um fator limitante (Van't Riet e Tramper, 1991). O efeito salino leva à diminuição da diversidade da população de nitrificantes (Moussa et al., 2006 e Grommen et al., 2005). Isto é problemático, visto que o aumento da diversidade de microrganismos em sistemas de tratamento de águas residuárias é recomendado para propiciar consórcios microbianos mais resistentes a perturbações (Nogueira et al., 2002).

Uma alternativa ao problema da alta salinidade é adaptar os microrganismos ao sal, por meio da aclimação, onde são submetidos ao aumento gradual da concentração de sal. Os microrganismos aclimatados ao sal, para sobreviver e prosperar nesse ambiente precisam desenvolver mecanismos de osmoadação e tolerância ao sal (Oren, 2002). Os microrganismos podem seguir basicamente duas estratégias de adaptação: o "high-salt-in" que exige que todas as proteínas intracelulares permaneçam estáveis e ativas na presença de concentrações molares de sal, e a estratégia "low-salt, organic-solutes-in", que se baseia na biossíntese e/ou acumulação intracelular de solutos orgânicos que não interfiram na atividade das enzimas normais. Porém, há necessidade das bactérias expressarem proteínas que sejam ativas na presença do sal na membrana celular exposta ao meio salino (Ventosa et.al, 2010).

## **2.5. O estudo da diversidade microbiana**

O acesso à diversidade microbiana presente em amostras ambientais, tal como de lodos ativados, se dá por meio de diferentes estratégias, incluindo técnicas dependentes e independentes de cultivo. As duas técnicas permitem caracterizar a diversidade, por isso são consideradas complementares. Estima-se que apenas 1 % dos microrganismos consegue ser detectado em placas com meio de cultura devido às condições seletivas e à composição dos meios (Torsvik et al., 1990; Torsvik et al., 2002; Whitman et al., 1998). Por outro lado, a abordagem independente de cultivo consegue ter acesso à muitas espécies ainda não cultivadas (Schloss e Handelsman, 2004).

Os métodos tradicionais de análise da diversidade de bactérias envolvem o cultivo e a caracterização de culturas puras isoladas em laboratório. O isolamento em meio de cultivo exige que a composição do meio supra as necessidades metabólicas dos microrganismos. Essa é uma das principais dificuldades para o estudo de diversidade microbiana, pois o repertório metabólico dos procariontes é vasto (Torsvik et al., 1990). As técnicas dependentes de cultivo são muito bem sucedidas na microbiologia médica, para isolamento de patógenos, microrganismos produtores de antibióticos, apresentando grupos com um grande número de espécies cultivadas e identificadas (Schloss e Handelsman, 2004), enquanto que na microbiologia ambiental, se faz necessário um aprimoramento dos meios de cultura já existentes (Hugenholtz et al., 1998).

As técnicas independentes de cultivo permitem o acesso ao genoma de toda a comunidade microbiana de uma amostra. A maioria das técnicas independentes de cultivo é baseada na reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), onde o DNA genômico extraído da matriz é amplificado e submetido a outras análises. Um aspecto importante a ser considerado é a seleção da região do DNA que vai ser amplificada. O gene alvo deve possuir duas características importantes: deve estar presente em todos os membros do grupo microbiano a ser estudado, e deve possuir regiões conservadas, para uso de *primers* universais, e regiões variáveis, onde a diferenciação entre os microrganismos é realizada (Fogel et al., 1999). Os genes que codificam o RNA ribossomal 16S entram nessa categoria. Os genes RNAr são universalmente distribuídos nos diferentes grupos de seres vivos, apresentando um elevado grau de conservação (Lane et al., 1985).

As metodologias independentes de cultivo para o estudo da diversidade microbiana incluem, dentre outras, o DGGE (Eletroforese em gel de gradiente desnaturante), o T-RFLP ("Terminal restriction fragment length polymorphism"), o PCR quantitativo, a Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) e seus derivados, e a construção de bibliotecas gênicas. Adicionalmente, existem as técnicas de sequenciamento que podem ser utilizadas para acessar a diversidade, como Sanger e as NGS ("Next Generation Sequencing"), que permitem o sequenciamento massivo de amostras ambientais (Hermansson e Lindgren, 2001; Stubner, 2004). Para o estudo de comunidades microbianas

relacionadas ao tratamento de efluentes, as técnicas mais utilizadas têm sido o DGGE, a FISH e a construção de bibliotecas gênicas, devido ao melhor custo-benefício e à complementariedade das técnicas (Sanz, Köchling, 2007). Por meio destas técnicas acima citadas, é possível ter acesso à grande parte da diversidade microbiana presente na amostra ambiental, o que não é alcançado pelas metodologias dependentes de cultivo.

### 2.5.1. Índices de diversidade

Os índices de diversidade representam uma poderosa ferramenta para quantificar numericamente a diversidade em uma comunidade, combinando riqueza e equitabilidade de espécies. Para a estimativa da diversidade da amostra, o índice de Shannon é um dos mais amplamente empregados. Ele é correlacionado positivamente com a riqueza e equitabilidade de espécies. No índice de Shannon, as espécies raras possuem um peso maior do que as espécies comuns. Para a interpretação dos resultados, quanto maior o índice, maior a diversidade (Magurran, 2004, Silva et. al. 2010)

A riqueza da amostra pôde ser determinada através do índice de Chao1, que leva em consideração o número de *singletons* e *doubletons* em uma amostra. A partir da estimativa de Chao1 e o número real de OTUs encontradas, é possível achar o índice de cobertura alcançado para cada amostra, que indica o quanto os resultados obtidos reproduzem a comunidade observada (Good, 1953; Lemos et. al., 2011).

Para estimativa da dominância de espécie nas amostras, vários índices podem ser calculados, porém, o índice de Berger-Parker, assim com o de Shannon, leva em consideração as espécies raras na amostra, e por isso, é um dos mais utilizados em estudos de diversidade (Magurran, 2004).

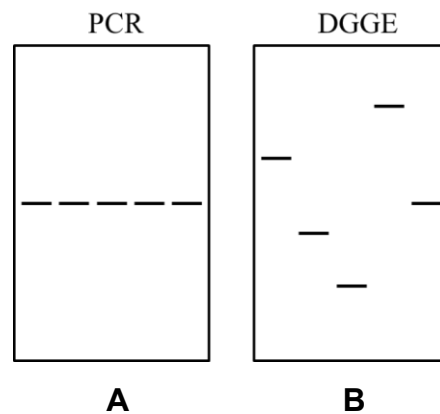
Para comparar duas ou mais amostras, os índices mais utilizados são os de Jaccard e Bray-Curtis, ambos permitem avaliar a similaridade entre as amostras estudadas. Os valores encontrados para os índices de similaridade, se enquadram na escala de 0 a 1, assim, quanto mais próximo de 1 maior será a similaridade.

Dessa maneira, através dos índices de diversidade é possível atribuir valores à diversidade de diferentes amostras, além de compará-las através da similaridade.

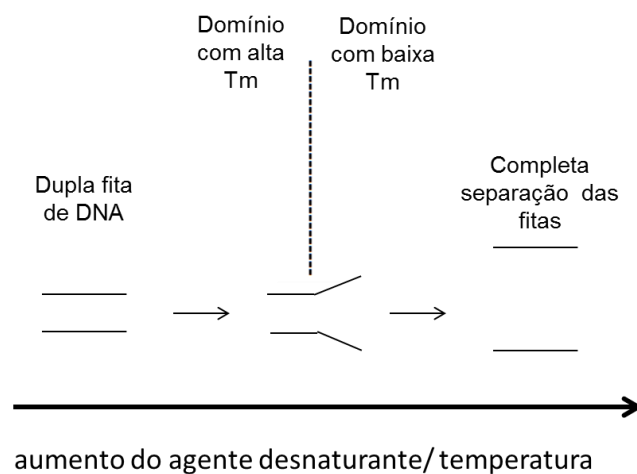
### **2.5.2. Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)**

Técnicas de “fingerprinting” fornecem um perfil da diversidade genética em uma comunidade microbiana. A eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), é uma técnica de “fingerprinting” que em um curto período de tempo atraiu a atenção de muitos microbiologistas ambientais, e se tornou rotina nos laboratórios de ecologia microbiana (Muyzer e Smalla, 1998). Até 1993, a técnica era amplamente utilizada na genética humana, até que Muyzer e colaboradores a utilizaram para avaliar o perfil microbiano de um biofilme, sendo assim, o primeiro a aplicar o método em ecologia microbiana (Muyzer e Smalla, 1998).

A técnica consiste na separação eletroforética dos produtos de PCR em um gel de poliacrilamida contendo um gradiente químico desnaturante de uréia e formamida. Os amplicons separados na corrida possuem o mesmo tamanho, porém com sequências nucleotídicas diferentes, que é a base da separação (Figura 4). A separação dos fragmentos é baseada na diminuição da mobilidade eletroforética de uma molécula de DNA dupla fita parcialmente desnaturada ao longo do gradiente desnaturante. O anelamento da dupla fita ocorre em domínios específicos chamados de domínios de anelamento, onde os pares de base possuem a mesma temperatura de anelamento ( $T_m$ ). Quando o domínio com uma menor temperatura de anelamento da molécula de DNA dupla fita atinge sua  $T_m$ , em um determinado ponto de desnaturação, ocorre uma transição da forma helicoidal para parcialmente desnaturada, onde a migração da molécula praticamente cessa (Figura 5). O grau de desnaturação varia com as diferenças nas sequências de nucleotídeos das moléculas de DNA (Muyzer e Smalla, 1998; Ercolini, 2004).



**Figura 4.** Esquema representando amplicons de PCR de mesmo tamanho com seqüências nucleotídicas diferentes analisados em: A) eletroforese em gel de agarose e B) eletroforese em gel de gradiente desnaturante (adaptado de ROSADO e DUARTE, 2002).



**Figura 5.** Esquema representando a desnaturação parcial e completa da dupla fita de DNA ao longo do gradiente desnaturante.

A adição de uma região rica em guanina e citosina, chamada de grampo GC, à extremidade 5' de uma das fitas de DNA, modifica o padrão de desnaturação do DNA, fazendo com que aproximadamente 100 % das seqüências possam ser detectadas (Sheffield et al., 1989). O grampo GC impede a completa dissociação da dupla fita de DNA e pode variar entre 30 a 50 nucleotídeos (Muyzer et al., 1997).

A técnica apresenta vantagens e desvantagens. Embora seja uma técnica relativamente rápida, de baixo custo, que possibilita a análise



simultânea de várias amostras, somente fragmentos de até 500 pb conseguem ser separados no gel, interferindo no sequenciamento das bandas do gel. Somente espécies dominantes conseguem ser detectadas, e muitas bandas não são discriminadas umas das outras, por apresentarem o mesmo padrão de migração no gel (Myers et al., 1995; Muyzer e Smalla, 1998; Muyzer, 1999).

Os estudos em ecologia microbiana na maioria das vezes necessitam de amostragem de diferentes pontos ao longo de um período ou condição. Dessa maneira, diferente de outras técnicas como clonagem, a técnica de DGGE pode analisar diferentes amostras simultaneamente, fazendo da técnica uma ferramenta poderosa para monitorar o comportamento de uma comunidade microbiana ao longo de mudanças ambientais (Muyzer e Smalla, 1998).

### **2.5.3. *Flow-fluorescence in situ* hybridization (*Flow-FISH*)**

Ao lado de outras técnicas de quantificação de microrganismos, como o PCR quantitativo, a hibridização de sondas ao RNAr 16S de células microbianas tem sido uma escolha para a quantificação em amostras ambientais. Nesta abordagem, o FISH tem o RNAr 16S como alvo de oligonucleotídeos marcados com fluorescência, seguido da contagem das células ao microscópio. O FISH é um método histoquímico que permite a visualização, identificação, enumeração e localização simultânea de microrganismos *in situ* em seu habitat natural, sem a necessidade de cultivo, extração de DNA ou amplificação (Neves e Guedes, 2012). A primeira etapa da técnica é a fixação da amostra. A fixação preserva a morfologia celular, e as protege quando as sondas estão internalizando a membrana, além de impedir a lise celular durante a hibridização e possibilitar a estocagem da amostra. A fixação pode ser feita com vários fixadores, de acordo com a parede celular dos microrganismos em estudo (Nettman et al., 2013). A segunda etapa é a permeabilização da parede celular para facilitar a entrada das sondas de oligonucleotídeos (contem entre 17 a 34 nucleotídeos), seguido da etapa de hibridização das sondas com o alvo, o RNAr 16S, em concentrações ótimas de formamida, devido às condições de estringência das sondas. A última etapa do FISH é a lavagem da amostra para retirar o excesso de sonda que não se ligou ao alvo (Amann, 1990).

A abordagem convencional da técnica de FISH é muito demorada devido ao número de técnicas e replicatas biológicas que devem ser feitas. Como alternativa, a citometria de fluxo permite uma quantificação de alto rendimento e uma separação fenotípica de diferentes tipos celulares, baseada em características de superfície celular. Dessa maneira, antes de realizar o experimento, deve-se obter um “gate”, ou seja, uma região selecionada manualmente baseada no tamanho celular desejado. O “gate” será baseado no tamanho da célula de interesse, assim tudo que for menor ou maior que a célula de interesse, não será contabilizado pelo citômetro. A citometria de fluxo tem sido utilizada para gerar um perfil citométrico através da utilização de corantes intercalantes de DNA. Embora possa se obter informações sobre a quantidade de células microbianas com os corantes intercalantes de DNA, não é possível obter a identidade taxonômica (Günther et. al, 2009, Koch et. al., 2013). Esse problema foi resolvido através da combinação das duas técnicas, o FISH e a citometria de fluxo, dando origem ao *Flow-FISH*. Essa técnica foi primeiramente utilizada na análise de linfócitos humanos em 1998, por Rufer e colaboradores. Em 2006, Friedrich e Lenk aplicaram a técnica pela primeira vez em análises com células microbianas. Depois disso, o *Flow-FISH* tem sido aplicado com sucesso em análises tanto de culturas puras quanto em populações microbianas complexas (Wallner et. al., 1993; Amann et. al., 1990).

Dessa forma, através do *Flow-FISH*, é possível analisar amostras ambientais quantitativamente e qualitativamente, com alta eficiência e precisão, pela contagem das células através do citômetro de fluxo, acoplado com a alta especificidade das sondas pelos seus alvos dentro da célula.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivos gerais**

Analisar a diversidade de bactéria e archaea, envolvidas ou não no processo de nitrificação, presentes no lodo ativado durante o processo de aclimação em diferentes concentrações salinas.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Aclimação do lodo em diferentes concentrações de NaCl, até a completa inibição do processo de nitrificação;
- Monitoramento da diversidade de bactérias e archaeas nas diferentes concentrações de NaCl por DGGE;
- Caracterização da diversidade de bactérias e de archaeas pelo sequenciamento massivo de uma região do gene RNAr 16S em diferentes concentrações de NaCl;
- Quantificação das populações metabolicamente ativas de bactérias e archaeas em diferentes concentrações salinas por meio da técnica de *Flow-FISH*.

## **4. Metodologia**

### **4.1. Coleta da amostra de lodo**

Foram coletados 2 litros de lodo nitrificante proveniente do sistema de tratamento de lodos ativados do Terminal Marítimo Almirante Barroso/TEBAR (São Sebastião/SP). A coleta foi feita pelos técnicos do CENPES/PETROBRÁS. A amostra foi acondicionada em galão de plástico à temperatura ambiente e transportada até o laboratório de Papel e Celulose – Departamento de Floresta - UFV. Para análises moleculares, alíquotas de 15 ml do lodo foram armazenadas em tubos Falcon de 15 mL e congeladas para as análises posteriores no Laboratório de Imunovirologia- Departamento de Biologia Geral - UFV.

### **4.2. Aclimação do lodo**

A aclimação do lodo foi realizada pela estudante do programa de Pós-graduação da Engenharia Civil/UFV, Larissa Quartaroli, como parte de sua tese de doutorado. Tais experimentos foram conduzidos no Laboratório de Celulose e Papel/UFV. Para tal, foram utilizados três reatores aeróbios: 1 como controle, sem adição de sal, e 2 e 3 com adição gradual de NaCl. O sal foi adicionado semanalmente ao reator 2 e 3, pelo acréscimo de  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de NaCl, até a completa inibição da nitrificação.

### **4.3. Avaliação do processo de nitrificação**

Para a avaliação da taxa de nitrificação nos reatores, a remoção de nitrogênio amoniacal foi monitorada seguindo os procedimentos padrões do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998). Essa etapa do experimento foi realizada pela estudante de doutorado Larissa Quartaroli no Laboratório de Celulose e Papel/UFV como parte de sua tese de doutorado.

#### **4.4. Coleta das amostras para análises moleculares**

Foram coletadas amostras de lodo ativado dos reatores 2 e 3 em diferentes concentrações de NaCl (25, 50, 75, 100, 105, 115 e 125 g.L<sup>-1</sup> de NaCl). As amostras foram coletadas de cada reator em triplicata, armazenadas em tubos Falcon de 15 mL, fixadas e mantidas congeladas a -20°, para as análises moleculares.

#### **4.5. Extração de DNA das amostras de lodo aclimatado**

Foi realizada a extração de DNA da amostra composta pela junção das triplicatas dos dois reatores, para cada uma das salinidades coletadas, 25, 50, 75, 100, 105, 115 e 125 g.L<sup>-1</sup> de NaCl. O DNA total da amostra de lodo foi extraído de acordo com o protocolo descrito em Silva et al., (2010): uma alíquota de 4 mL da amostra de lodo foi lavada com 10 mL de tampão SET, seguido de centrifugação por 10 minutos a 3.000 g. A lavagem foi feita cinco vezes. Depois de lavada, a amostra de lodo foi suspensa em 600 µL de tampão SET e homogeneizada no agitador de tubo. Em seguida, foi adicionado lisozima (GE Health Care®) (50 µL de uma solução de 100 mg/mL) e a solução foi incubada em banho-maria a 37 °C, com agitação a cada 10 minutos. Posteriormente, foi adicionada proteinase K (Sigma®) (50 µL de uma solução de 10 mg/mL) e 200 µL de SDS 10 % (C<sub>f</sub>= 2 %), e a solução foi incubada a 60 °C por 30 minutos, com agitação a cada 10 minutos. A amostra foi então submetida a três ciclos *freeze-thaw*, sendo 2 minutos no nitrogênio líquido e 2 minutos a 65 °C. Igual volume de fenol saturado pH 8,0 foi adicionado à solução, homogeneizado por 2 minutos e centrifugado por 10.000 g por 5 minutos. Recolhido o sobrenadante, foi adicionado igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e centrifugado a 10.000 g por 5 minutos. Novamente, o sobrenadante foi recolhido, e à ele adicionado uma solução de NaCl 5 M (10 % do volume total), seguido da adição de 2 volumes etanol absoluto gelado. O microtubo foi centrifugado durante 20 minutos a 10.000 g. O “pellet” foi lavado com etanol 70 % e após a secagem, eluído em 25 µL de H<sub>2</sub>O-Milli-Q.

#### 4.6. Amplificação dos genes RNAr 16S

Após a extração de DNA do lodo ativado nos pontos 25, 50, 75, 100, 105, 115 e 125 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, as amostras foram submetidas à amplificação do gene que codifica a região RNA ribossomal 16S dos domínios Bacteria e Archaea seguida de DGGE. A amplificação do DNA foi realizada em triplicata e em todos os pontos de salinidade coletados. Os pares de *primers* que foram utilizados para amplificação estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Primers utilizados para amplificação do gene RNAr 16S.

<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	Alvo	Referência
968-GC-F	grampoGC- AACGCGAAGAACCT TAC	RNAr 16S do Domínio Bacteria	Heuer et al., 1997
1401R	GGTGTGTACAAGGCCCGGAACG		
344-GC-F	grampoGC- ACGGGGTGCAGGCGCGA	RNAr 16S do Domínio Archaea	Casamayor et al., 2000
915R	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT		

As reações foram realizadas em volumes de 50 µL, contendo 10 µL de tampão da enzima 5X, 3 µL MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 µL de cada *primer* (200 µM), 1,0 µL de dNTP (10 mM), 2,5 µL de albumina soro bovina (BSA 2,5 mg/µL), 0,2 µL de enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase (5,0 u/µL) (Promega) e, aproximadamente 50 ng de amostra de DNA. As reações de PCR foram realizadas em termociclador modelo Veriti (Applied Biosystem). Os programas de amplificação foram os seguintes:

**Gene RNAr 16S de Bacteria:** 5 minutos a 94 °C; 10 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 58 °C (queda de 0,5 °C por ciclo) e 2 minutos a 72 °C; 25 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 53 °C e 2 minutos a 72 °C e, finalmente, 5 minutos a 72 °C.

**Gene RNAr 16S de Archaea:** 5 minutos a 94 °C; 10 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C (queda de 0,5 °C por ciclo) e 1 minuto a 72 °C; 25 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C e 1 minuto a 72 °C e, finalmente, 5 minutos a 72 °C.

Os amplicons foram observados em gel de agarose 1 % com marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen).

#### **4.7. Eletroforese em gel de gradiente desnaturante – DGGE**

Amostras de DNA extraídos dos pontos 25, 50, 75, 100, 105, 115 e 125 g.L<sup>-1</sup> de NaCl que foram amplificados por PCR foram analisados por DGGE (BioRad). Foram utilizados 3 µL de marcador de peso molecular de 100 pares de base (Roche) em todos os géis. As condições do gel e da corrida para os genes analisados foram descritos abaixo:

**Domínio Bacteria:** foram aplicados 7 µL do amplicon em gel de poliacrilamida de 6 % (p/v) em tampão TAE 1 X. O gel foi preparado com gradiente desnaturante variando de 45 a 65 % (onde 100 % de desnaturação significa a concentração de 7 M de uréia e 40 % de formamida). O gel foi submetido à eletroforese vertical por 12 h a 100 V à temperatura de 60 °C.

**Domínio Archaea:** Amostras de 12 µL dos amplicons de archaea foram aplicadas em gel de poliacrilamida de 6 % (w/v) em tampão TAE 1 X. Este gel foi preparado com gradiente desnaturante variando de 35 a 80 % (onde 100 % de desnaturação significam a concentração de 7 M de uréia e 40 % de formamida). O gel foi submetido à eletroforese vertical por 12 h a 100 V à temperatura de 60 °C.

Após corrida, os géis foram corados por 1 h com *SYBR Gold* (1X) e fotografado sobre luz ultra-violeta em fotodocumentador.

#### **4.8. Sequenciamento massivo do gene RNAr 16S de bacteria e archaea**

Após o processo de aclimação e as análises do gel do DGGE, baseado na salinidade e no perfil de bandas, três pontos, dentre os sete analisados, foram selecionados para construção da biblioteca e quantificação

das populações de bactéria e archaea. Os pontos escolhidos foram 25 g/l de NaCl, no início do processo de aclimação com 100 % de remoção de amônia, 100 g/l de NaCl, concentração salina máxima com 100 % de remoção de amônia, e 125 g/l de NaCl, concentração salina onde ocorreu a completa inibição da nitrificação.

Para a construção das bibliotecas, o DNA genômico dos pontos com 25, 100 e 125 g/l de NaCl foi enviado para sequenciamento na “Molecular Research DNA” (www.mrdnalab.com, Shallowater, TX, USA). A metodologia aplicada pela empresa está descrita a seguir: foram utilizados “primers” para a região variável V1-V2 e V3 do gene RNAr 16S, 27f/338r e 349f/534r, respectivamente. Ambos os pares de “primer” possuíam “barcode” no “primer” “forward”. A PCR foi realizada utilizando o “kit HotStar Taq Plus Master Mix” (Qiagen, USA), e as condições foram as seguintes: 94°C por 3 minutos, seguido por 28 ciclos de 94°C por 30 segundos, 53°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto, e finalmente 72°C por 5 minutos para extensão final. Depois da amplificação, os produtos de PCR foram checados em gel de agarose 2 % para determinação do sucesso da amplificação e intensidade das bandas. As amostras (25, 100 e 125 g/l de NaCl) foram misturadas em proporções iguais baseado no seu peso molecular e na concentração de cada amostra. O “pool” de amostras foi purificado usando “beads” calibradas “Ampure XP” (Beckman Coulter). Depois, o “pool” dos produtos de PCR purificados foram usados para preparar a biblioteca de DNA seguindo o protocolo de preparação de biblioteca “TruSeq DNA library” (Illumina). O sequenciamento foi realizado usando a plataforma MiSeq (Illumina), seguindo as orientações do fabricante.

#### **4.9. Análise dos dados de sequenciamento**

Os dados de sequência foram processados usando o “MR DNA analysis pipeline” (MR DNA, Shallowater, TX, USA). Os “*barcodes*” foram retirados, sequências menores que 150bp e quimeras foram removidas. Os *contigs* foram montados e um arquivo de OTU (Unidade Taxonômica Operacional) foi gerado. As OTUs foram definidas pelo agrupamento em 3 % divergência (97 % de similaridade). Uma sequência representativa de cada OTU foi classificada taxonomicamente usando BLASTn contra um banco de dados, com curadoria



derivado de GreenGenes, RDPII e NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov, DeSantis et al 2006, http://rdp.cme.msu.edu). As análises de diversidade foram realizadas utilizando o “software” PAST (“Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis”) (Hammer, Harper e Ryan,. 2001).

#### 4.10. Flow FISH

Foram quantificadas células dos domínios Bacteria e Archaea para os pontos com 25, 100 e 125 g/l de NaCl do processo de aclimação do lodo. As sondas utilizadas para ambos os domínios estão apresentadas na Tabela 2. O protocolo foi seguindo de acordo com Nettman et al.,(2013) com modificações, e o procedimento foi dividido em quatro etapas: i) fixação da amostra, ii) pré-tratamento/permeabilização, iii) hibridização fluorescente *in situ*, iv) quantificação no citômetro de fluxo

**Tabela 2.** Sondas utilizadas para a hibridização e seus respectivos fluoróforos

Sonda	Sequência (5' – 3')	Fluoróforo	Alvo	Referência
EUB388	TGCCTCCCGTAGGAG	FITC	Maioria das bactérias	Amann et. al., 1990
EUB388II	CACCCGTAGGTGT	FITC	Planctomicetos	Amann et. al., 1990
EUB388III	CACCCG AGGAGT	FITC	Verrucomicrobia	Amann et. al., 1990
ARCH915	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	Cy5	Archaea	Stahl e Amann, 1991
CREN499	CCAGRCTTGCCCCCGCT	Cy5	Crenarchaeota	Burggraf et al., 1994
EURY498	CTTGCCCRGCCCTT	Cy5	Euryarchaeota	Burggraf et al., 1994

**I) Fixação:** 30 ml de paraformaldeído 3,7 % (diluído em PBS 1X) foram adicionados a 10 ml de cultura e a solução foi incubada na geladeira a 4°C por 16 horas. A mistura foi centrifugada a 9.000g por 20 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado 2X com PBS 1X. O pellet foi suspenso em 5 ml de PBS 1X e 5 ml de álcool 95 % (PA) e estocado a -20°C.

**II) Pré-tratamento/permeabilização:** 10 ml da amostra fixada foi centrifugada a 9.000 g por 20 minutos. O pellet foi lavado com PBS 1X,

centrifugado a 9.000g durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi suspenso em 10 ml de tween 80 a 0,1 %, e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. A solução foi sonicada por 1 minuto a 65 W em banho de ultrassom. A solução foi centrifugada a 650 g durante 2 minutos, e o sobrenadante foi transferido para um tubo estéril. O pellet foi novamente suspenso em 10 ml de tween 80 a 0,1 %, incubado a temperatura ambiente por 10 minutos, sonicado, centrifugado, e o sobrenadante foi transferido para um tubo estéril (esse procedimento foi feito 5 vezes). Os sobrenadantes foram misturados e centrifugados a 9000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o pellet foi suspenso em 10 ml de PBS 1X. a amostra foi deixada na geladeira overnight.

**III) FISH:** 250 microlitros da amostra fixada previamente tratada foi centrifugada a 9.000 g durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi suspenso em 221 microlitros de tampão de hibridização pré-aquecido a 46°C junto com 21 microlitros de cada sonda utilizada (50 nanogramas/microlitro). A solução foi incubada durante 2 horas a 46 °C, e o tubo foi invertido de 20 em 20 minutos. A solução foi centrifugada a 9000 g por 20 minutos. O pellet foi lavado 2X com 500 microlitros de PBS 0,05 M. Finalmente o pellet foi suspenso em 500 microlitros de PBS 0,05 M.

**IV) Citometria de fluxo:** após a hibridização, as amostras foram levadas para análise no citometro de fluxo FACS VERSE, da marca BD Biosciences, que se encontra no Núcleo de microscopia e microanálise da Universidade Federal de Viçosa. Para análise, a fluorescência das sondas de bactéria e de archaea foram excitadas por lasers com comprimentos de onda de 488 e 633 nm, respectivamente. A emissão da fluorescência foi medida usando filtros de 530/30 nm para sondas de bactéria, e 660/10 nm para sondas de archaea. As amostras sem sonda foram analisadas como controle, e para calibrar o aparelho em relação à autofluorescência das amostras. Em todas as corridas, um total de 10.000 eventos foi analisado.

## **5. Resultados e discussão**

### **5.1. Aclimação à altas salinidades e nitrificação**

Durante a aclimação do lodo ativado, o processo de remoção de amônia foi monitorado a cada adição de NaCl. O comportamento dos dois reatores foi similar, até a concentração salina de 100 g/L de NaCl onde houve 100 % de remoção de amônia. Acima desta concentração, a taxa de remoção foi caindo gradualmente, até atingir zero, com 125 g/L de NaCl.

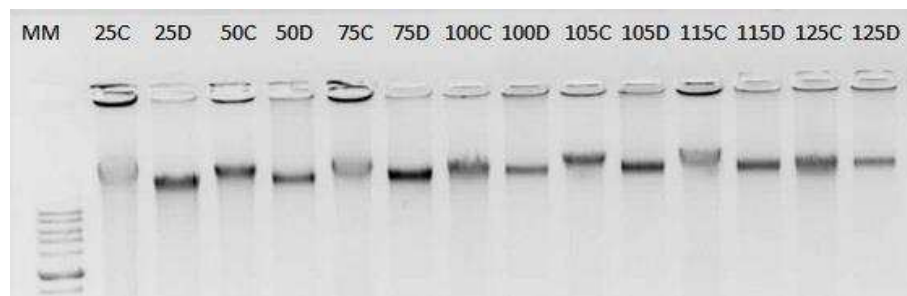
A inibição do processo de nitrificação com o aumento da salinidade foi um resultado esperado. A salinidade é um fator que afeta diretamente processos biológicos, como a nitrificação (Mc Carty, 1964, Dalmacija et al., 1996). Trabalhos na literatura vêm mostrando que concentrações de sal acima de 40 g/L já inibem os processos biológicos. Em Moussa et. al., (2006), concentrações acima de 40 g/L de  $\text{Cl}^-$ , inibiram 95 % da remoção de amônia. Campos et al., (2002) estudando o processo de nitrificação em afluente salino, manteve o sistema operando com altas taxas de remoção até 30,7 g/L de sal.

Entretanto, nossos resultados se mostraram promissores, uma vez que o sistema conseguiu alcançar 100 % de remoção de amônia em uma concentração salina de 100 g/L de  $\text{Cl}^-$ . Costa, A. M. (2014) conseguiu uma taxa de remoção máxima de 70 % com 10 g/L de  $\text{Cl}^-$ . Apesar de depender muito da composição da microbiota, o processo de aclimação permite que os microrganismos se adaptem gradativamente a uma nova condição ambiental. Essa adaptação pode ocorrer através da síntese de solutos compatíveis, para que o equilíbrio osmótico da célula seja alcançado, ou através de síntese de proteínas internas estáveis em altas concentrações salinas. Diferente do que ocorre quando eles são expostos a um choque de alta salinidade.

### **5.2. Extração de DNA e amplificação dos genes RNAr 16S de archaea e bacteria**

Foi extraído o DNA total das amostras dos pontos com salinidades de 25, 50, 75, 100, 105, 115 e 125 g/L de NaCl. Após a extração, o DNA foi checado em gel de agarose 1 % (Figura 6). Podemos observar no gel, que as bandas estão visíveis, são únicas e não apresentam arraste, indicando uma

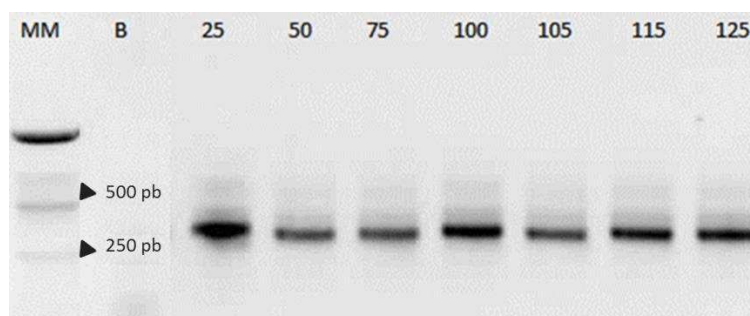
boa qualidade, e mostrando que o DNA das amostras de todos os pontos foi extraído de maneira satisfatória.



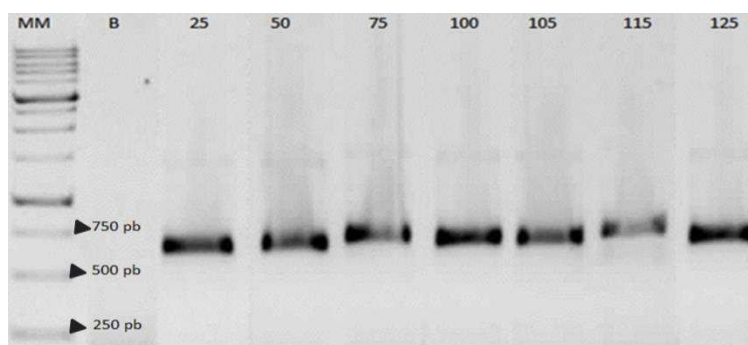
**Figura 6.** Extração de DNA total das amostras de lodo com 25, 50, 75, 100, 105, 115 e 125 g.L<sup>-1</sup> de NaCl. Ordem do gel: MM: Marcador molecular 1kb, amostra C (concentrada) e D (diluída 10 vezes).

Após a extração do DNA total das amostras, foram realizadas amplificações dos genes que codificam o RNAr 16S dos domínios Bacteria e Archaea. Na Figura 8 observa-se a presença de amplicons, correspondentes à região do gene RNAr 16S, do tamanho esperado de 430 e 570 pb para os domínios Bacteria (Figura 7A) e Archaea (Figura 7B), respectivamente. Assim, observamos a presença de ambos os domínios em todas as concentrações salinas analisadas.

**A**



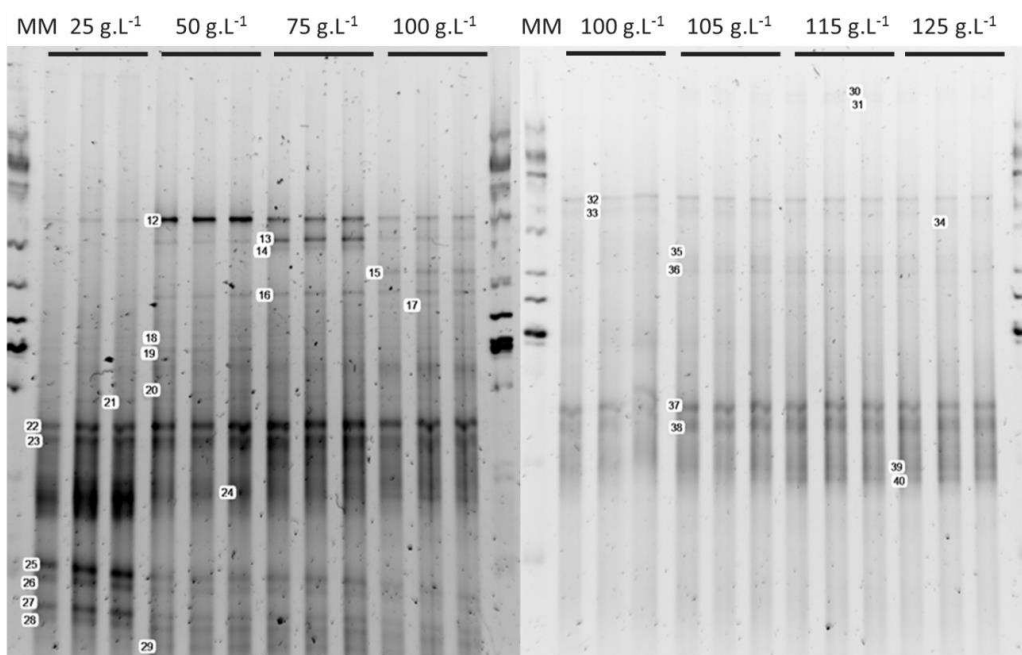
**B**



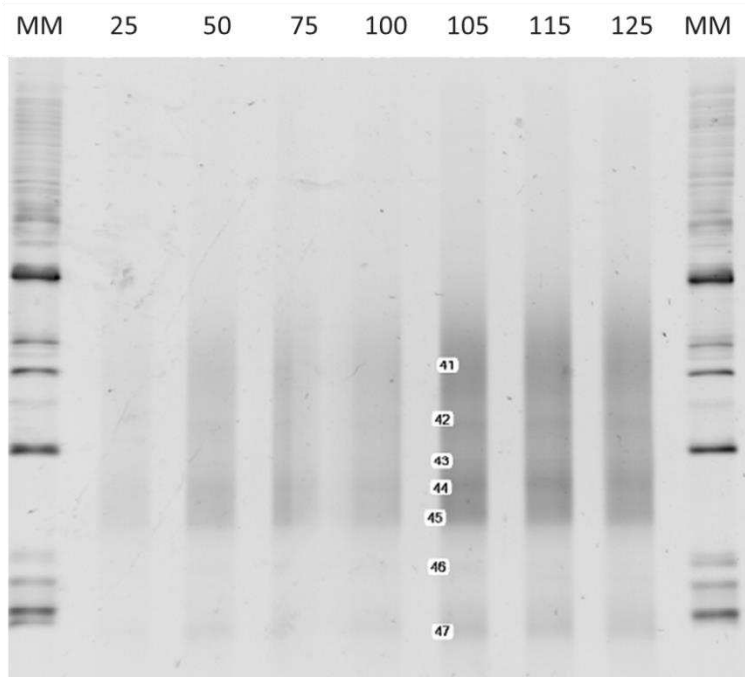
**Figura 7.** Amplicons da sequência do gene RNAr 16S aplicados em gel de agarose 1 %. A) domínio Bacteria e B) domínio Archaea. Ordem do gel: MM: Marcador molecular 1kb, B: branco e amostras de 25 a 125g.L<sup>-1</sup> de NaCl.

### 5.3. DGGE

Após a extração do DNA e amplificação dos genes que codificam o RNAr 16S de Bacteria e Archaea, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante para avaliar a diversidade de procariotos nas amostras provenientes do processo de aclimação. Os padrões de bandas encontrados para Bacteria e Archaea estão representados nas Figuras 8 e 9, respectivamente.



**Figura 8.** Perfil de bandas do gel de DGGE para o gene de RNAr 16S de Bacteria ao longo do processo de aclimação ao sal. Ordem do gel: MM: marcador molecular 100 pb, amostras de 25 a 125 g.L<sup>-1</sup> de NaCl em triplicata.



**Figura 9.** Perfil de bandas do gel de DGGE para o gene de RNAr 16S de Archaea ao longo do processo de aclimação ao sal. Ordem do gel: MM: marcador molecular 100 pb, amostras de 25 a 125 g.L<sup>-1</sup> de NaCl.

Para o gel de bactérias, todas as amostras foram aplicadas em triplicata, que de acordo com os géis, foram bastante semelhantes, mostrando a reprodutibilidade das mesmas. Para o gel de archaea, houve a necessidade de diversas repetições em diferentes condições do gel, e uma vez que já havia sido observada a reprodutibilidade das triplicatas, as amostras foram aplicadas uma única vez.

De acordo com o perfil de bandas de bactéria, ao longo do aumento da salinidade, podemos observar que os pontos de maior riqueza de espécies são os de 50 e 75 g/L de NaCl. Embora muitas bandas apareçam em todas as amostras, com o aumento da salinidade, a intensidade de muitas bandas diminui como as bandas 12, 13, 22 e 23, e algumas até desaparecem como as bandas 25, 26, 27 e 28. Entretanto, muitas das bandas apresentadas como as bandas 32, 34, 37, 38, 39 e 40, ainda são observadas na concentração salina de 125 g/L, mostrando o efeito positivo do processo de aclimação e a adaptação desses microrganismos às novas condições ambientais.

No perfil de bandas observado para archaeas observa-se que o número de bandas é menor do que o observado em bactéria, embora a intensidade das mesmas aumente ao longo do aumento da salinidade. Esse perfil foi esperado,

uma vez que muitas espécies do domínio Archaea são extremófilas, conseguem sobreviver em condições extremas como alta temperatura, alta salinidade, alta acidez, dentre outros. Enquanto que bactérias são microrganismos mais sensíveis à variáveis ambientais devido às diferenças encontradas em sua composição química celular (Madigan et. al, 2009).

#### **5.4. Sequenciamento parcial da região RNAr 16S de bactéria e archaea**

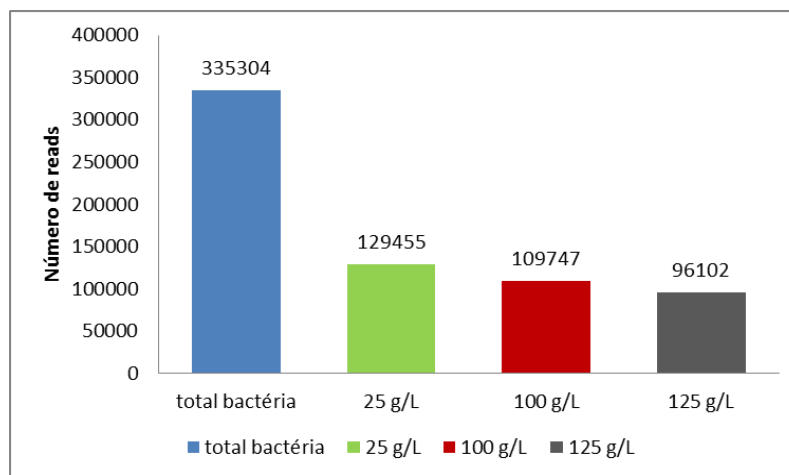
Após analisar os resultados obtidos com o DGGE, foram selecionados 3 pontos para construir bibliotecas do gene RNAr 16S. Os pontos foram escolhidos de acordo com a diversidade de bandas observadas no gel de DGGE ao longo do aumento de salinidade associado com a porcentagem de remoção de amônia de cada ponto. Foram selecionados os pontos 25, 100 e 125 g/L de NaCl. O ponto 25 g/L porque foi a concentração salina normalmente apresentada pelo efluente, onde se observava 100 % de eficiência na nitrificação, o ponto com 100 g/L, que foi a salinidade máxima com 100 % de eficiência na nitrificação, e que mostrou ter uma maior riqueza de bandas de acordo com o DGGE, e o ponto 125 g/l, onde a nitrificação foi inibida. Então, o DNA total dos pontos com 25, 100 e 125 g/L de NaCl foi extraído e enviado para sequenciamento massivo das regiões V1, V2 e V3 do RNAr 16S dos domínios Bacteria e Archaea através da plataforma MiSeq (Illumina).

Após o tratamento das sequências cruas, 205.834 sequências apresentando tamanho médio de 490 bases foram observadas para os “primers” 27f/338r, e 315.391 sequências com tamanho médio de 417 bases foram encontradas para os “primers” 349f/534r. Os dados gerados por estes “primers” foram sobrepostos para a análise da diversidade de procariotos. Os resultados obtidos individualmente para cada par de “primer” podem ser observados no material em anexo (Anexo I).

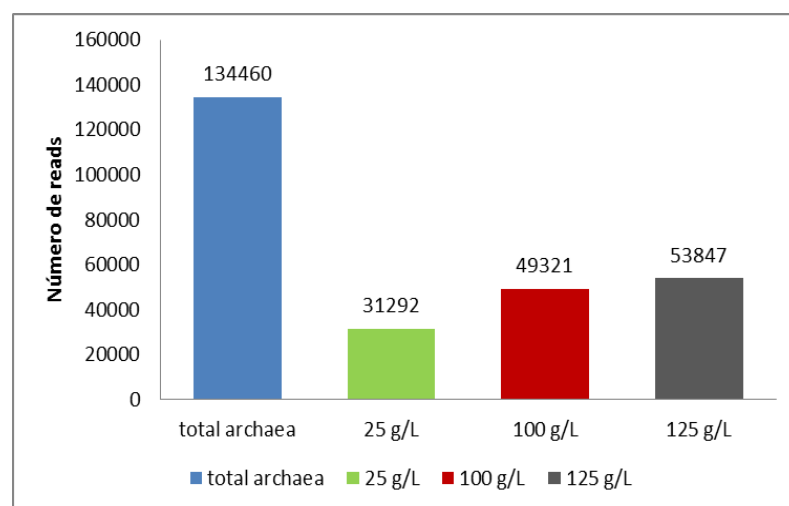
Os dados gerados pelos dois pares de “primers” foram processados usando o MR DNA *analysis pipeline* e um total de 469.764 sequências foram anotadas, destas 160.747 foram observadas na amostra com 25 g/L de NaCl, 159.068 na amostra com 100 g/L e 149.949 na amostra com 125 g/L. Dentre as

469.764 sequências, 335.304 pertenceram ao domínio Bacteria e 134.460 sequências ao domínio Archaea (Figuras 10A e 10B).

**A**



**B**



**Figura 10.** Número de sequências pertencentes aos Domínios: A) Bacteria e B) Archaea nas diferentes concentrações de NaCl.

De acordo com os dados observados na Figura 11, o número de sequências pertencentes ao domínio Bacteria foi diminuindo à medida que a concentração salina aumentava. Entretanto, para as sequências pertencentes ao domínio Archaea, se observou o oposto, o número de sequências aumentou com o aumento da salinidade. Esse comportamento, como discutido anteriormente, se deve ao fato de que muitos microrganismos representantes do domínio Archaea são extremófilos. Embora alguns gêneros de bactéria sejam halófilos, podendo crescer em concentrações salinas de até 30 %, o as



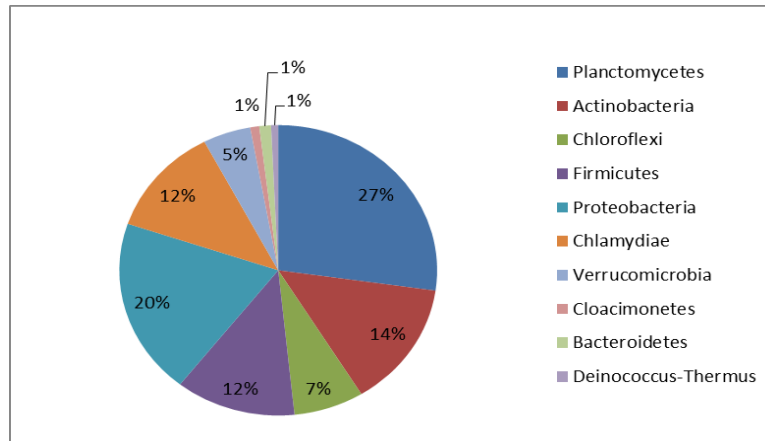
archaeas extremófilas, não apenas toleram, mas necessitam de uma alta temperatura, ou uma alta concentração salina para sobreviver (Woese, 1998), por isso o número de sequências de bactéria diminuiu e de archaea aumentou com o aumento da salinidade. Os microrganismos halofílicos são muito diversos, e segundo Ventosa (2010), microrganismos adaptados à altas concentrações salinas são encontrados nos três domínios da vida: Archaea, Bacteria e Eukarya. De acordo com Kushner (1978), os microrganismos halofílicos extremos crescem melhor em meio contendo 2,5 – 5,2 M de sal (150 – 300 g/L de NaCl), os halofílicos moderados em concentrações de 0,5 – 2,5 M de sal (30 – 150 g/L de NaCl), e os halotolerantes não possuem exigência, mas crescem bem em altas concentrações salinas.

#### **5.4.1. Composição da comunidade microbiana do lodo**

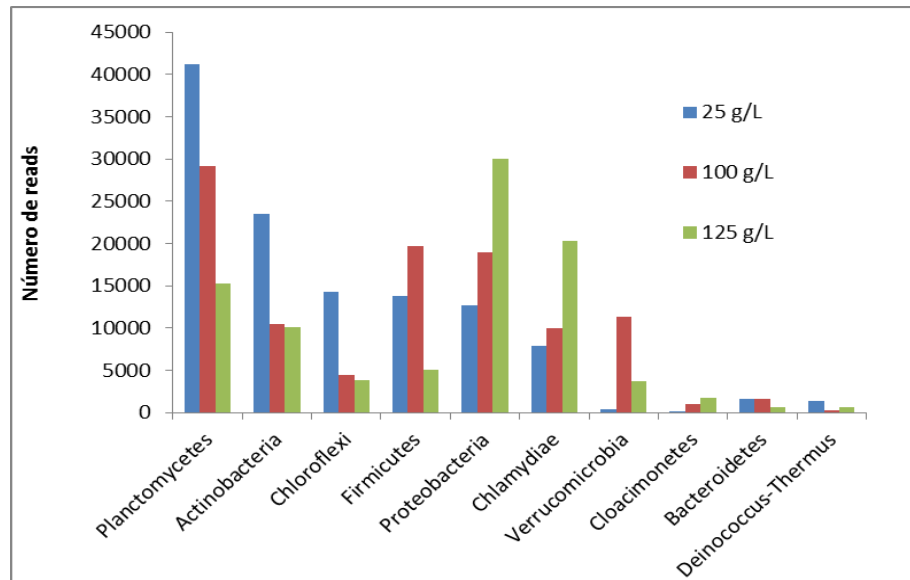
O sequenciamento parcial da sequência do gene RNAr 16S foi realizado com o objetivo de se conhecer e analisar a microbiota presente nas amostras de lodo durante o processo de aclimação ao sal. Após a sobreposição dos dados, as análises de diversidade foram realizadas levando em consideração os dois domínios: Bacteria e Archaea.

##### **5.4.1.1. Bactéria**

As 335.304 sequências pertencentes ao domínio Bacteria foram classificadas em 24 diferentes filos, 38 classes e 237 gêneros. Entre os 24 filos, a maioria pertenceu aos filos Planctomycetes, Actinobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, Proteobacteria, Chlamydiae, Verrucomicrobia, Cloacimonetes, Bacteroidetes e Deinococcus-Thermus. O filo mais abundante foi o Planctomycetes, representando 27 % das sequências, seguido do filo Proteobacteria, com 20 % (Figura 11). Todos os filos apresentaram diferenças na abundância com aumento da salinidade, para alguns filos a salinidade contribuiu para a diminuição da abundância, enquanto que para outros, como Proteobacteria, Chlamydiae e Cloacimonetes, o aumento da salinidade resultou no aumento da abundância (Figura 12).



**Figura 11.** Porcentagem de seqüências classificadas quanto aos filos bacterianos mais abundantes.

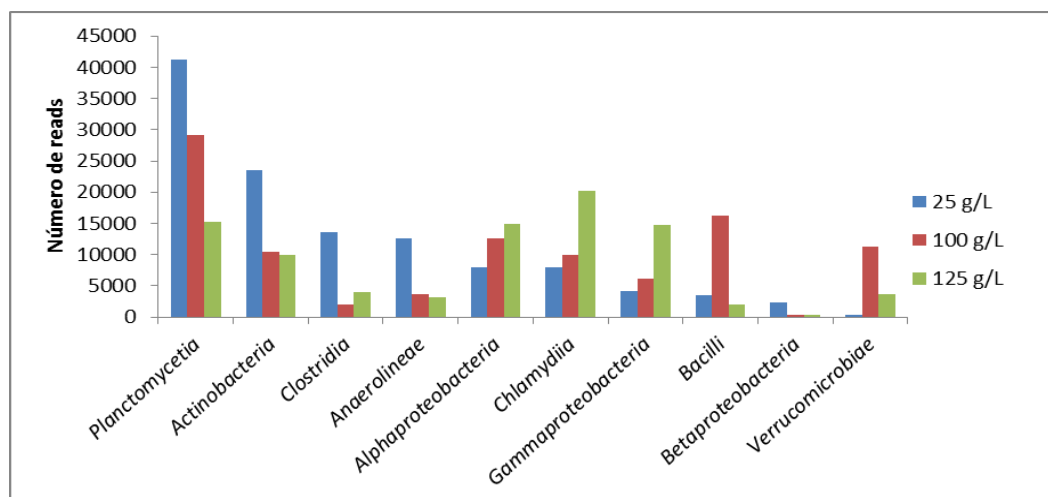


**Figura 12.** Proporção de filos bacterianos mais abundantes nas diferentes concentrações de NaCl.

Os dados encontrados para filo neste trabalho são corroborados por Zhang et. al. (2015), que em seus estudos de diversidade microbiana de lodo ativado que trata efluente industrial através do sequenciamento da região V4 do gene RNAr 16S pela plataforma MiSeq, encontrou entre os filos mais abundantes Proteobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes e Deinococcus-Thermus.

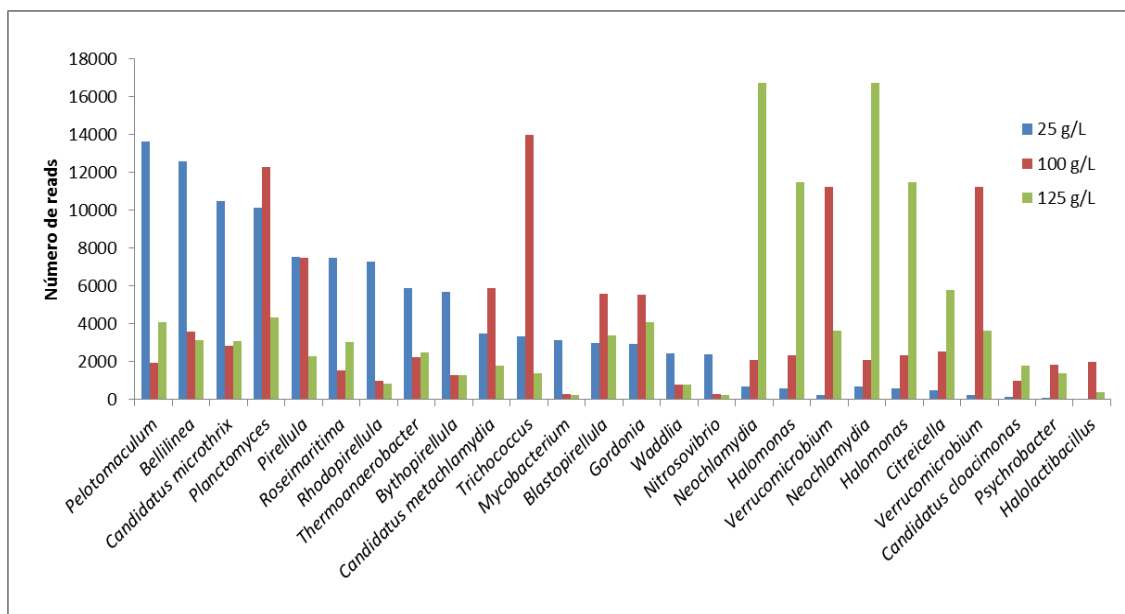
Em relação às classes do domínio Bacteria, das 38 observadas, 11 foram mais abundantes e variaram sua abundância ao longo do aumento da concentração de sal (Figura 13). Dentre estas, *Planctomycetia* representou 26

% das sequências, *Actinobacteria* 14 %, *Chlamydia* 12 %, *Alphaproteobacteria* 11 %, *Gammaproteobacteria* 8 %, *Bacilli* 7 %, *Anaerolineae* 6 %, *Clostridia* 6 %, *Verrucomicrobiae* 5 % e *Betaproteobacteria* apenas 1 %. As outras classes representaram menos de 1 % das sequências totais.



**Figura 13.** Classes mais abundantes pertencentes ao domínio Bacteria nas diferentes concentrações de NaCl.

Em relação à classificação em nível de gênero, entre os 237 que foram observados, 22 foram mais abundantes (Figura 14). A variação da abundância de cada gênero ao longo do aumento da concentração salina também foi notável. Alguns gêneros se tornaram menos abundantes, como *Pelotomaculum*, *Bellilinea*, *Candidatus microthrix*, *Rhodopirellula* e outros mais abundantes, como *Neochlamydia*, *Halomonas*, *Verrucomicrobium*, *Candidatus cloacimonas* entre outros.



**Figura 14.** Gêneros mais abundantes pertencentes ao domínio Bacteria nas diferentes concentrações de NaCl.

Os gêneros mais abundantes representaram cada um, aproximadamente 6 % das sequências totais. O gênero *Pelotomaculum*, que sofreu uma forte influencia do sal, é um gênero pouco descrito pertencente ao filo Firmicutes e à classe *Clostridia*. Espécies desse gênero são anaeróbias, termofílicas e sintróficas, fermentadoras de citrato e piruvato, e já foram detectadas em abundância em lodo granular (Hiroyuki et. al, 2002). O gênero *Bellilinea* pertence ao filo Chloroflexi e à classe *Anaerolineae*, é representado por microrganismos termofílicos. Yamada e colaboradores (2007) isolaram bactérias deste gênero em lodo termofílico relacionado à degradação de propionato. O gênero *Candidatus microthrix* possui as espécies representantes '*Candidatus Microthrix calida*' e '*Candidatus Microthrix parvicella*', ambas isoladas de lodos ativados de estação de tratamento de efluente, e ambas são termofílicas (Levantesi et. al., 2006). O gênero *Planctomyces* pertence ao filo Planctomycetes, representado por bactérias aquáticas que podem ser encontradas em água doce ou marinha. Nesse gênero são encontradas bactérias que realizam o processo ANAMMOX, comumente encontrada em estudos de diversidade de lodos ativados (Neef et. al., 1998, Juretschko et. al. 2002). Os gêneros *Pirellula*, *Roseimaritima*, *Rhodopirellula*, *Bythopirellula* e *Blastopirellula*, assim como *Planctomyces*, também pertencem ao filo

Planctomycetes. Bactérias do gênero *Roseimaritima*, *Pirellula* e *Blastopirellula* são marinhas, aeróbias, heterotróficas, e estes dois últimos estão envolvidas com a degradação de macromoléculas complexas (Fuerst et. al., 1991; Bondoso, et. al., 2014).

Quanto aos gêneros pertencentes ao filo Firmicutes, *Thermoanaerobacter* se caracteriza por ser termofílico e aeróbio (Posada et. al., 2012). O gênero *Trichococcus* pertence ao filo Firmicutes, são aeróbios heterotróficos e fermentadores, e já foram encontrados em sistemas de lodos ativados (McIlroy et. al., 2015).

Dentre os gêneros do filo Actinobacteria, *Mycobacterium* é representado por bactérias aeróbias obrigatórias, imóveis e altamente patogênicas para humanos, que são capazes de utilizar amônia como fonte de nitrogênio, e glicerol e acetato como fonte de carbono e energia, e são característicos de microbiota de lodos ativados (Cordi et al., 2007). O gênero *Gordonia* inclui microrganismos aeróbios, e possuem a habilidade de degradar poluentes ambientais como hidrocarbonetos (Arenskötter, et. al., 2004). A espécie *Waddlia chondrophila*, do gênero *Waddlia* é um agente patogênico considerado um potencial agente capaz de provocar aborto em humanos e bovinos, além de estar relacionado com doenças respiratórias humanas (Codony et. al., 2012).

Os representantes do gênero *Nitrosovibrio* são bactérias autotróficas que oxidam amônia, portanto participam do processo de nitrificação biológica (Ida et. al., 2004). O gênero *Candidatus cloacimonas* tem como seu principal representante a espécie *Candidatus Cloacimonas acidaminovorans*, e pertence ao filo Cloacimonetes. Essa espécie ainda não foi cultivada, porém, estudos com sua sequência indicam que ela obtém energia através da fermentação de aminoácidos, e é um micro-organismo sintrófico, produz H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> a partir de formato (Pelletier et al., 2008). O gênero *Psychrobacter*, pertence à classe das *Gamaproteobacterias*, é representado por bactérias hiosmotolerantes, psicrófilicas ou psicrotolerantes, conseguem crescer em temperaturas moderadas, e associadas a ambientes marinhos (Bowman et al., 2006).

De todos os gêneros citados até o momento, para a maioria podemos observar uma forte influência do sal, uma vez que a abundância diminuiu ao longo do aumento da salinidade. Alguns sofreram uma maior influencia na transição de 25 para 100 g/L de NaCl, como *Pelotomaculum* e *Roseimaritima*,

conseguindo se reestabelecer e se adaptar às concentrações mais elevadas, enquanto para outros, como os gêneros *Planctomyces*, *Pirellula*, *Trichococcus* e *Mycobacterium* na transição de 100 para 125 g/L de NaCl, o aumento na concentração de sal foi prejudicial para a população.

Por outro lado, os gêneros *Neochlamydia*, *Halomonas*, *Verrucomicrobium*, e *Citreicella* tiveram um comportamento diferente dos discutidos acima. O aumento da salinidade resultou no aumento da abundância desses gêneros, mostrando uma maior adaptação desses microrganismos ao sal. O gênero *Neochlamydia*, assim como o gênero *Candidatus Metachlamydia* possui representantes parasitas intracelulares obrigatórios de amebas. A espécie *Neochlamydia hartmannellae* é parasita obrigatório da ameba *Hartmannella vermiformis*, que é amplamente encontrada em lodos ativados de estação de tratamento de efluentes (Horn et. al., 2000; Ramirez et. al., 2014). O gênero *Halomonas*, pertencente ao filo Proteobacteria, é representado por bactérias haloextremófilas, capazes de tolerar até 25 % de sal, isso explica o fato da abundância deste gênero ter aumentado tanto com o aumento da salinidade. As espécies desse gênero são normalmente isoladas de ambientes salinos e hipersalinos e algumas espécies são capazes de denitrificar (Ventosa et al., 1998; Arahal et al., 2002; Mata et al., 2002).

O gênero *Verrucomicrobium* pertencente ao filo Verrucomicrobia, um filo pouco descrito, têm seus representantes de vida livre, na maioria mesofílicos, anaeróbios obrigatórios ou facultativos, e já foram encontrados em lodos ativados (Juretschko et. al., 2002; Sangwan et al., 2004; Chin et al., 2001). O último gênero, *Citreicella*, é um membro da classe *Alphaproteobacteria* e até o momento, só possui duas espécies isoladas de ambientes marinhos, *C. thiooxidans* e *C. marina*. As duas espécies são moderadamente halofílicas e possuem a capacidade de oxidar tiosulfato a sulfato (Lai et al., 2010).

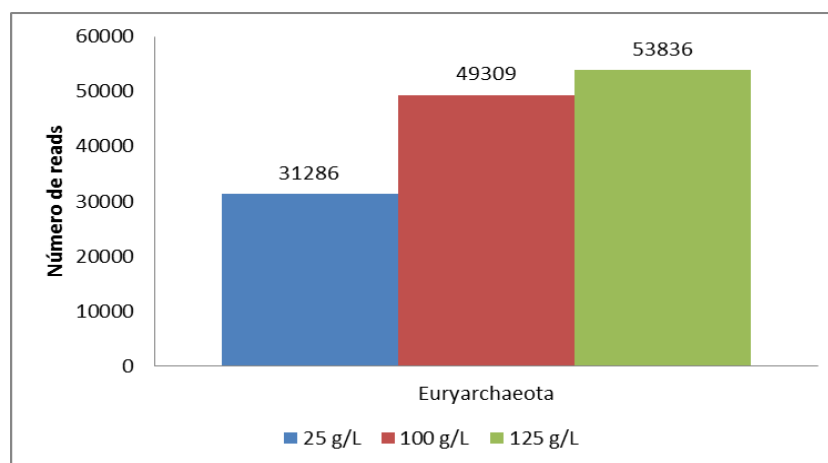
De maneira geral, os gêneros observados bacterianos observados neste trabalho são normalmente encontrados na microbiota de lodos ativados e/ou relacionados à microrganismos halófilos. Como o lodo passou por um processo de aclimação ao sal, bactérias halofílicas foram favorecidas.

Apesar de termos analisado um lodo microbiano proveniente de um reator aeróbio, observamos muitas sequências afiliadas a gêneros de bactéria anaeróbicas. Uma possível explicação está na composição dos flocos

microbianos que compõem o lodo ativado, que pode se comportar como um micro biorreator, onde na superfície encontra-se um ambiente aeróbio, mas em seu interior, a difusão de oxigênio dissolvido é dificultada, e se tornar anaeróbio, favorecendo o crescimento desses microrganismos.

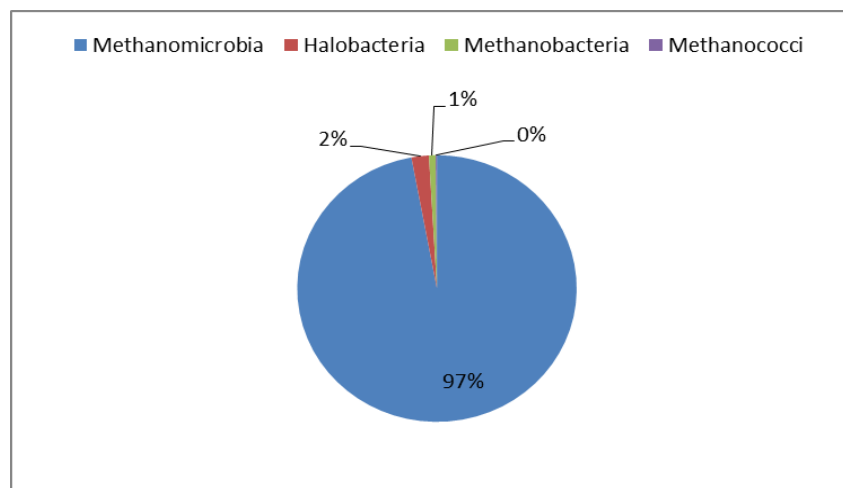
#### 5.4.1.2. Archaea

As 134.460 sequências pertencentes ao domínio Archaea foram classificadas em apenas dois filos, Euryarchaeota e Thaumarchaeota. Estes foram afiliados a 7 diferentes classes e 24 gêneros. Em relação à classificação quanto ao filo, a maioria das sequências foi classificada como Euryarchaeota, e o restante, 1 % como Thaumarchaeota. O aumento da salinidade favoreceu a abundância de Euryarchaeota (Figura 15). Para o filo Thaumarchaeota, o sal favoreceu a abundância até a concentração de 100 g/L, e acima desta concentração, o número de sequências permaneceu praticamente o mesmo (6 sequências para 25 g/L, 12 para 100 g/L e 11 para 125 g/L de NaCl).



**Figura 15.** Proporção das sequências pertencentes ao filo Euryarchaeota nas diferentes concentrações de NaCl.

Em relação às 7 classes observadas, 4 se destacaram. Dentre elas, a mais abundante foi *Methanomicrobia*, representando 97 % das sequências observadas. Os 3 % restantes foram distribuídos entre as classes Halobacteria, Methanobacteria e Methanococci (Figura 16).



**Figura 16.** Proporção das sequências afiliadas às classes pertencentes ao domínio Archaea.

Esses dados são corroborados por Fredriksson et al., (2012), que sequenciaram o gene RNAr 16S de diferentes amostras de lodo ativado e observaram que entre as classes predominantes de todas as amostras, foi encontrada a classe *Methanobacteria*

Em relação à classificação das sequências quanto ao gênero, dos 24 encontrados, 10 foram mais abundantes (Figura 17 A). E a abundância dos gêneros variou com o aumento da concentração salina. Ao contrário do observado para bactérias, a abundância da maioria dos gêneros de Archaea aumentou com a salinidade. O gênero *Candidatus nitrosoarchaeum*, é representado por espécies de archaeas que toleram pouco sal, e oxidantes de amônia, realizando a primeira etapa do processo de nitrificação (Moiser et al., 2012). Os demais gêneros são representados por espécies mesofílicas ou termofílicas e algumas metanogênicas, como *Methanococcus* (Sowers e Ferry, 1983; Wasserfallen et. al., 2000).

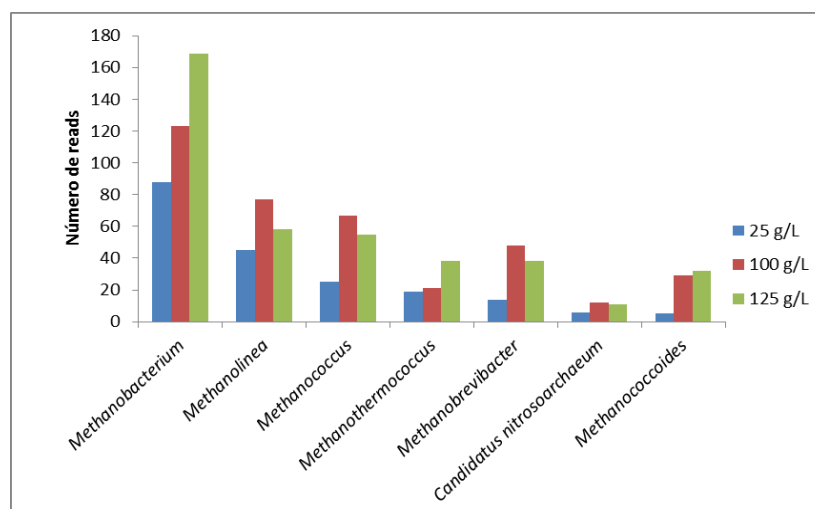
Dentre os 10 gêneros mais abundantes, três merecem destaque: *Methanosaeta*, *Halogramum* e *Methanothermobacter*, pois representaram a maior parte das sequências (Figura 17 B). As archaeas do gênero *Methanosaeta*, são umas das metanogênicas mais ativas em zonas húmidas, contribuindo para a produção de uma grande quantidade de metano no mundo. Elas usam o acetato como fonte de carbono para produzir metano. Elas têm sido encontradas em reatores anaeróbios com presença de microrganismos produtores de acetato, e em ambientes marinhos (Mori et. al., 2012). O gênero



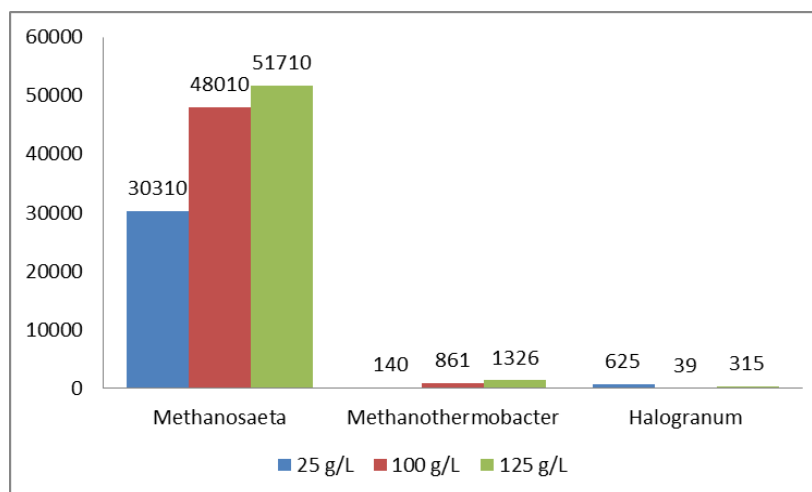
*Halogranum* é representado por espécies extremamente halofílicas, encontradas em ambientes inóspitos com elevadas salinidades (Cui et al., 2011). E o terceiro gênero mais abundante, *Methanothermobacter*, é composto por archaeas metanogênicas, que diferentemente dos outros gêneros observados, retiram sua fonte de carbono e energia de substratos gasosos, e são encontradas em ambientes extremos como elevadas temperaturas e salinidades (Schill et. al., 1996).

De maneira geral, os dois filios que representaram o domínio Archaea apresentaram duas funções distintas. A maior parte das sequências, classificadas como Euryarchaeota, foi associada à archaeas metanogênicas, que produzem metano a partir de CO<sub>2</sub> ou compostos metilados, estas são mais tolerantes ao sal. E o restante, classificados como Thaumarchaeota, foi afiliada à archaeas oxidantes de amônia, que são mais sensíveis ao sal, provavelmente este seja o motivo de estarem representadas em menor quantidade.

**A**



**B**



**Figura 17.** Proporção de sequências afiliadas aos gêneros pertencentes ao domínio Archaea em diferentes salinidades. A) Gêneros mais abundantes e B) Gêneros *Methanosaeta*, *Halogranum* e *Methanothermobacter*.

#### 5.4.2. Remoção biológica de nitrogênio

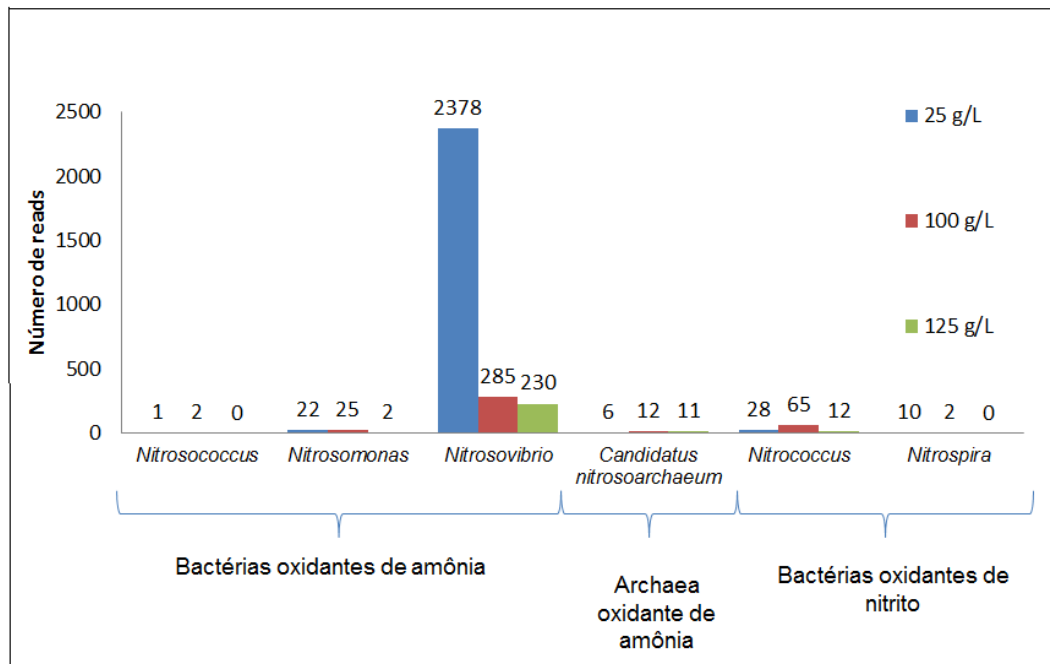
Como descrito anteriormente, um grande problema encontrado no tratamento biológico de efluentes associados à exploração de petróleo, é a salinidade, que afeta todos os processos biológicos das células microbianas envolvidos na remoção de matéria orgânica e nutrientes do efluente (Dalmacija et al., 1996).

A remoção biológica de nitrogênio pode ocorrer de três diferentes formas: nitrificação convencional, processo ANAMMOX e, a descoberta recentemente, nitrificação heterotrófica. Nesta parte da dissertação, serão apresentados os resultados da diversidade microbiana envolvida no processo de remoção biológica de nitrogênio, ao longo do aumento da salinidade.

##### 5.4.2.1. Microrganismos nitrificantes convencionais

Os dados de sequenciamento mostraram a presença dos gêneros *Nitrosococcus*, *Nitrosomonas* e *Nitrosovibrio*, representados por bactérias oxidantes de amônia, e do gênero *Candidatus Nitrosoarchaeum*, representado pelas archaeas oxidantes de amônia. Os gêneros *Nitrococcus* e *Nitrospira*, que

participam da segunda etapa da nitrificação, conversão de nitrito a nitrato, também foram observados (Figura 18).

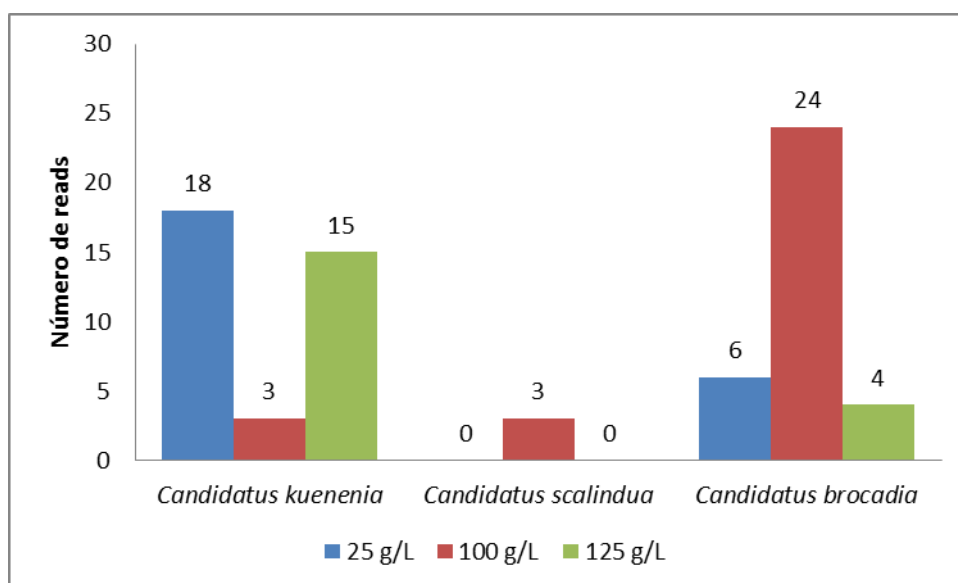


**Figura 18.** Proporção de gêneros de bactérias e archaeas envolvidos no processo de nitrificação biológica nas diferentes concentrações de sal.

Na Figura 18 podemos notar que a abundância das bactérias envolvidas no processo de nitrificação diminui muito com o aumento da salinidade, chegando a zero para os gêneros como *Nitrosococcus* e *Nitrospira*. Esses resultados são condizentes com a literatura, uma vez que a salinidade interfere diretamente no processo de nitrificação, e como visto anteriormente, até a concentração de 100 g/L de NaCl a taxa de remoção de amônia foi constante e igual a 100 %. Acima desta salinidade, a taxa de remoção caiu gradualmente até sua completa inibição, na concentração de 125 g/L de NaCl. Para o gênero *Candidatus Nitrosoarchaeum* a salinidade refletiu na abundância até a concentração de 100 g/L de NaCl, cima disso, a abundância foi aproximadamente a mesma, possivelmente por se tratar de uma archaea e sua melhor adaptação à ambientes extremos, como a salinidade.

#### 5.4.2.2. Microrganismos ANAMMOX

O processo ANAMMOX é realizado por microrganismos do grupo dos Planctomicetos, pertencentes às espécies *Candidatus Brocadia anammoxidans*, *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*, *Candidatus Scalindua wagneri*, *Candidatus Anammoxoglobus propionicus* e *Candidatus Jettenia asiática*. Destes cinco descritos, três foram encontrados (Figura 19). A abundância dos gêneros *Candidatus Scalindua* e *Candidatus Brocadia* diminuiu acima de 100 g/L, o que pode ter refletido na taxa de remoção de amônia.



**Figura 19.** Proporção de espécies de bactérias envolvidas no processo ANAMMOX nas diferentes concentrações de sal.

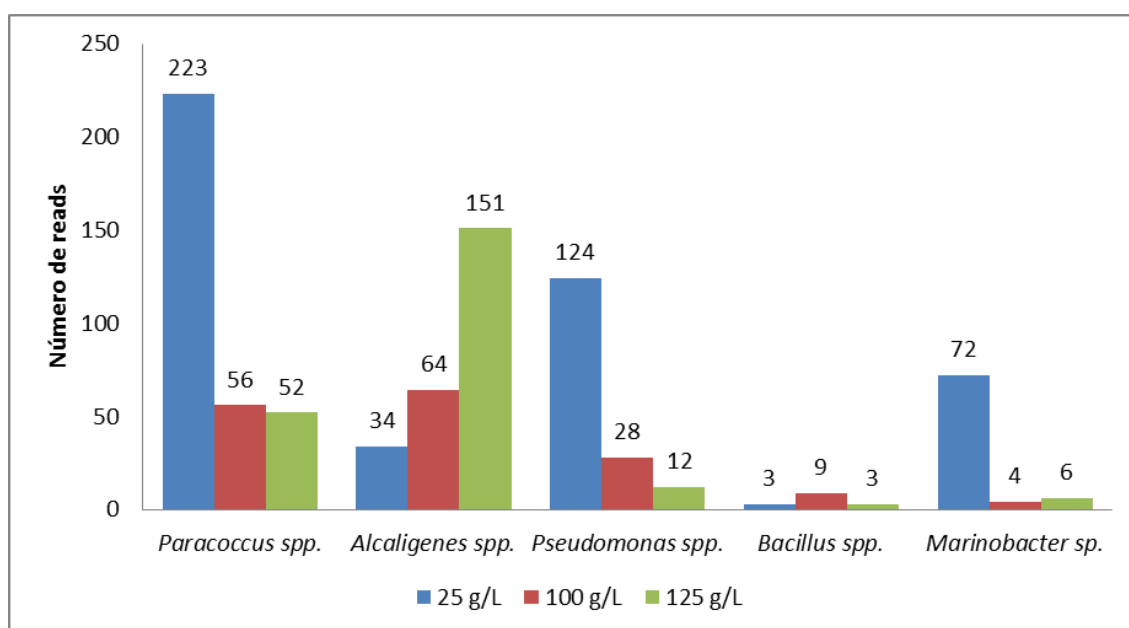
O processo ANAMMOX ocorre em anaerobiose, entretanto o processo de lodos ativados é aeróbio. Acreditamos que estes microrganismos estão presentes porque além do fato do interior do floco microbiano ser anaeróbio, durante a etapa de decantação do lodo, as regiões mais afastadas da superfície também ficam com deficiência de oxigênio dissolvido, favorecendo o crescimento dos microrganismos anaeróbios.

#### 5.4.2.3. Microrganismos nitrificantes heterotróficos

A nitrificação heterotrófica, ao contrario da convencional, ocorre por microrganismos heterotróficos que realizam simultaneamente, a nitrificação e a

desnitrificação, sob condições aeróbias. Dentre as espécies descritas até o momento estão *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Halomonas*, *Acinetobacter* sp, *Bacillus methylotrophicus*, *Marinobacter* sp., *Paracoccus* sp. e *Pseudomonas stutzeri*.

Embora ainda não se tenha realizado uma análise filogenética para checar se as sequências encontradas neste estudo, afiliadas a estas espécies, são filogeneticamente relacionadas, várias espécies potencialmente nitrificantes heterotróficas foram observadas como mostrado na Figura 20.



**Figura 20.** Proporção de potenciais bactérias nitrificantes heterotróficas encontradas nas diferentes concentrações de sal.

Observando estes resultados verificamos que a remoção biológica de nitrogênio não ocorre apenas por um grupo, ou até mesmo domínio de microrganismos. Bactérias e archaeas trabalham juntas no processo de remoção. Embora seja um trabalho em conjunto, alguns gêneros se mostraram mais adaptados e resistentes ao sal, apresentando uma maior abundância com o aumento da salinidade. Na concentração salina de 100 g/L, que foi a salinidade limite para que o processo de remoção de nitrogênio ocorresse com taxa de 100 %, o gênero bacteriano associado à nitrificação convencional mais abundante foi o *Nitrosovibrio*, que participa da primeira etapa da nitrificação. Outro gênero que se destacou foi o *Alcaligenes*, potencialmente envolvido na

nitrificação heterotrófica, e sofreu uma influência positiva da salinidade. Embora estejam em menor abundância, os outros gêneros envolvidos com a remoção de amônia que foram encontrados neste estudo possivelmente contribuem significativamente para a eficiência do processo.

Outro ponto a ser observado, é que os resultados do sequenciamento em relação aos microrganismos relacionados com a remoção biológica do nitrogênio estão de acordo com os resultados do processo de aclimação, uma vez que o aumento da salinidade interferiu diretamente na nitrificação até a completa inibição do processo, e a abundância dos microrganismos envolvidos com a remoção de nitrogênio foi afetada negativamente pelo aumento da salinidade.

### **5.4.3. Análise da diversidade microbiana**

Além da anotação, os dados de sequências foram analisados quanto aos índices de diversidade.

Após o agrupamento das sequências por OTUs foi possível notar uma diferença na cobertura entre os pares de *primers* utilizados em relação aos domínios Bacteria e Archaea. O par de *primer* 27f/338r foi melhor para acessar a diversidade do domínio Bacteria, enquanto que o par 349f/534r foi melhor para acessar a diversidade do domínio Archaea. Dessa maneira, a análise da diversidade do domínio Bacteria foi realizada utilizando o par de “primer” 27f/338r, e do domínio Archaea com o par 349f/534r. A análise da diversidade com cada par de *primer* para os domínios Bacteria e Archaea pode ser consultada no Anexo II.

#### **5.4.3.1. Índices de diversidade**

Foram calculados os índices de Shannon, Berger-Parker, e Chao para estimar a diversidade, dominância e riqueza, respectivamente. Para a análise da diversidade de procariotos total (tabela 3), podemos observar através da estimativa de riqueza do índice de Chao 1, que a amostra com 100 g/L é a mais rica em número de espécies. Os valores obtidos de OTUs para cada amostra foram próximos aos valores estimados pelo índice de Chao1,

forneendo uma cobertura de aproximadamente 90 % para as três amostras. De acordo com Good (1953) e Lemos e colaboradores (2011), uma cobertura mínima de 90 % significa que os índices de diversidade calculados são os mais próximos possíveis da realidade.

O índice de Shannon diminuiu ao longo do aumento da concentração salina, indicando que a amostra 25 g/L é mais diversa, e a menos diversa é a amostra com 125 g/L. A dominância é inversamente proporcional à diversidade, sendo assim, a amostra com 125 g/L apresentou uma maior dominância de espécies. De acordo com Magurran (2004), os valores encontrados a partir de dados empíricos para o índice de Shannon variam entre 1,5 e 3,5, raramente passa de 4, mostrando que as amostras nas três salinidades estudadas apresentaram uma diversidade elevada, acima de 3. A diminuição da diversidade era esperada, uma vez que o sal é um fator na maioria das vezes negativo para o metabolismo dos microrganismos. Entretanto, mesmo apresentando uma diversidade menor quando comparada aos demais pontos, a concentração 125 g/L mostrou um elevado índice de Shannon, evidenciando assim a importância do processo de aclimação no sistema de tratamento para remoção de poluentes em efluentes salinos.

**Tabela 3.** Índices de diversidade microbiana de procariotos nas diferentes concentrações de sal.

<b>Amostra</b>	<b>Total de OTUs</b>	<b>Chao 1</b>	<b>Shannon</b>	<b>Berger-Parker</b>	<b>Cobertura %</b>
<b>25 g/L</b>	739	804,2	3,595	0,2918	91,0
<b>100 g/L</b>	789	853,7	3,137	0,3975	92,0
<b>125 g/L</b>	764	851	3,019	0,4491	89,0

Além do cálculo dos índices de diversidade total, foram calculados os índices de diversidade individuais de cada domínio, Bactéria e Archaea usando os “primers” 27f/338r e 349f/534r, respectivamente. Nas tabelas 4 e 5 observamos os valores dos índices para cada domínio.

**Tabela 4.** Índices de diversidade para o domínio Bacteria nos diferentes concentrações de sal.

<b>Amostra</b>	<b>Total de OTUs</b>	<b>Chao 1</b>	<b>Shannon</b>	<b>Berger-Parker</b>	<b>Cobertura %</b>
<b>25 g/L</b>	676	732,3	4,137	0,1153	92,0
<b>100 g/L</b>	702	761,2	3,951	0,2422	92,0
<b>125 g/L</b>	674	755,6	4,084	0,1133	89,0

**Tabela 5.** Índices de diversidade para o domínio Archaea nos diferentes concentrações de sal

<b>Amostra</b>	<b>Total de OTUs</b>	<b>Chao 1</b>	<b>Shannon</b>	<b>Berger-Parker</b>	<b>Cobertura %</b>
<b>25 g/L</b>	63	70,58	0,45	0,9222	90,0
<b>100 g/L</b>	87	91,58	0,6885	0,8623	95,0
<b>125 g/L</b>	90	94	0,635	0,8813	96,0

Para o domínio Bacteria, de acordo com o número de OTUs obtidas e com o índice de Chao1, a amostra mais rica em termos de número de espécies é o lodo com 100 g/L de NaCl. A amostra mais diversa é a com 25g/L de sal, apresentando uma menor dominância de espécies, e a menos diversa é a com 100 g/L de sal, onde a dominância de espécies foi maior.

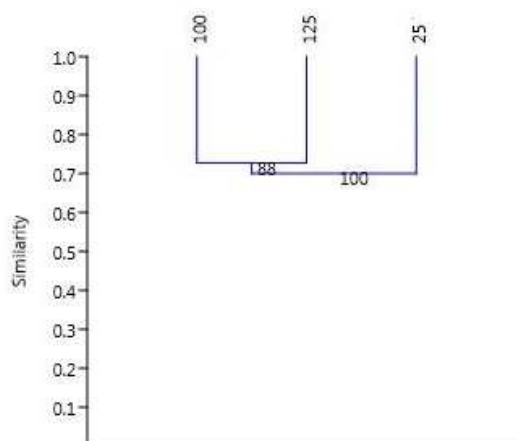
Ao contrário dos resultados encontrados para o domínio Bacteria, para o domínio Archaea a amostra mais rica foi a 125 g/L de sal, e a mais diversa e com menor dominância foi a com 100 g/L de sal.

A diferença dos resultados entre os dois domínios se dá pelo fato de archaeas serem microrganismos extremófilos e mais resistentes à elevadas salinidades, enquanto que a maioria das bactérias são mais sensíveis, exceto aquelas que são halofílicas extremas.

#### **5.4.3.2. Análise de similaridade**

A similaridade das três amostras foi observada através do cálculo do índice de similaridade de Jaccard seguido de um agrupamento UPGMA. O dendograma originado do agrupamento está representado na Figura 21.





**Figura 21.** Dendrograma das três amostras de lodo, 25 g/L, 100 g/L e 125 g/L, calculado por meio do índice de similaridade de Jaccard e agrupamento UPGMA.

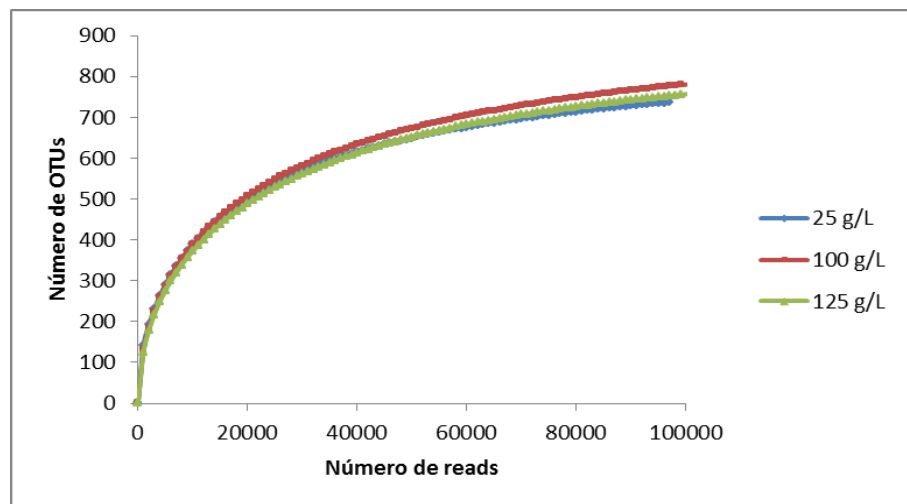
Os resultados do agrupamento mostraram que as amostras com 100 e 125 g/L de sal são mais semelhantes entre si, apresentando um índice de similaridade de aproximadamente 0.73. O índice de similaridade das amostras 100 e 125 g/L com a amostra 25 g/L foi aproximadamente 0.68. Acreditamos que este comportamento seja explicado pelo processo de aclimação, uma vez que a diferença de salinidade de 25 para 100 g/L é muito maior que 100 para 125 g/L. Isto resulta em uma maior alteração na microbiota do lodo, além de 25 g/L ser o período em que a microbiota estava começando a receber maiores concentrações de sal, tendo que se adaptar às novas condições.

#### 5.4.3.3. Curvas de rarefação

Também chamada de curva coletora ou curva de acumulação de espécies, a curva de rarefação é utilizada para indicar se a amostragem realizada foi suficiente para atingir o número de espécies total da comunidade. Ela fornece um gráfico com o número acumulado de espécies encontradas em função do esforço amostral, que no nosso caso, é o número de sequências obtidas no sequenciamento (Magurran, 2004). As curvas de rarefação também são uma medida de comparação entre diferentes amostras baseado na riqueza

de espécies que cada uma apresenta. A cobertura completa do conjunto de dados é esperada quando a curva atinge um platô.

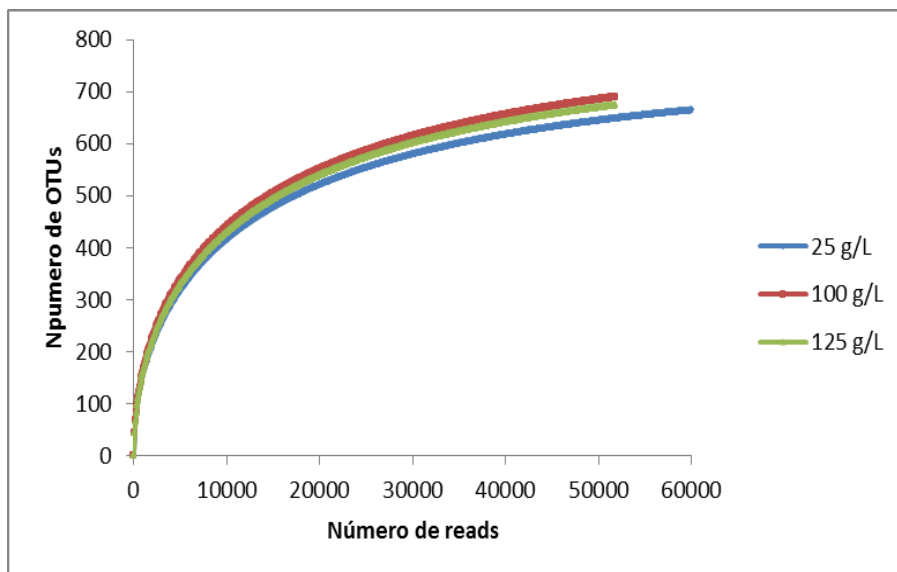
As Figuras 22, 23 e 24 representam respectivamente os gráficos das curvas de rarefação para os procariotos (Bacteria + Archaea), para o domínio Bacteria e para o domínio Archaea, respectivamente.



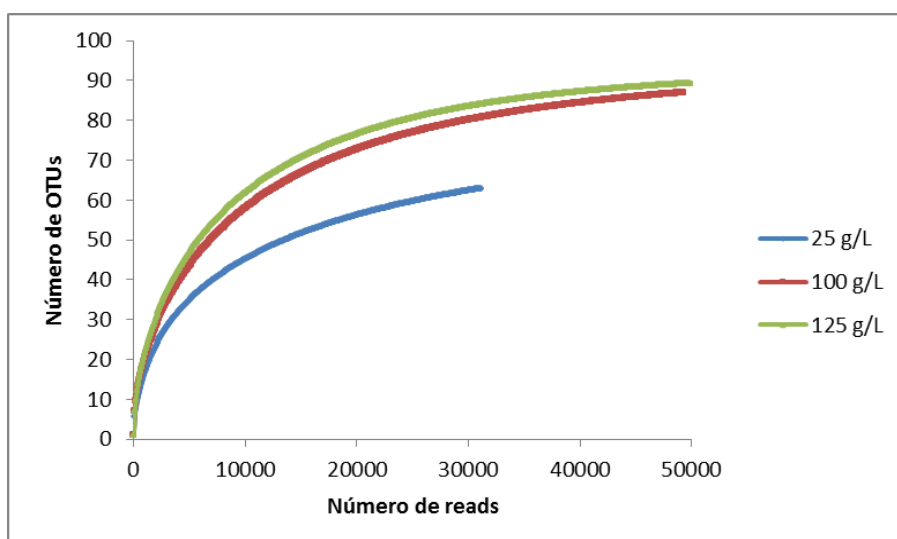
**Figura 22.** Curva de rarefação observada para as OTUs de procariotos (bacteria + archaea) (*cutoff* de 3 %) nas diferentes concentrações de sal.

Como podemos notar, as curvas ainda não atingiram o platô, indicando que um número maior de sequências precisaria ser amostrado para que todas as espécies fossem observadas. De acordo com a porcentagem de cobertura, faltaram aproximadamente 10 % de esforço amostral para que toda a diversidade fosse acessada.

As curvas de rarefação de cada domínio também reforçaram os resultados obtidos com os índices de diversidade. Nenhuma amostra de nenhuma das duas curvas chegou ao platô, embora as amostras 100 e 125 g/L do domínio Archaea tenham apresentado uma cobertura de 95 e 96 % respectivamente, indicando que faltaram aproximadamente 5 % de esforço amostral para que toda a diversidade de Archaea fosse acessada.



**Figura 23.** Curva de rarefação para o conjunto de OTUs do domínio Bacteria (cutoff de 3 %) nas diferentes concentrações de sal.



**Figura 24.** Curva de rarefação para o conjunto OTUs do domínio Archaea (cutoff de 3 %) nas diferentes concentrações de sal.

#### 5.4.4. Flow-FISH

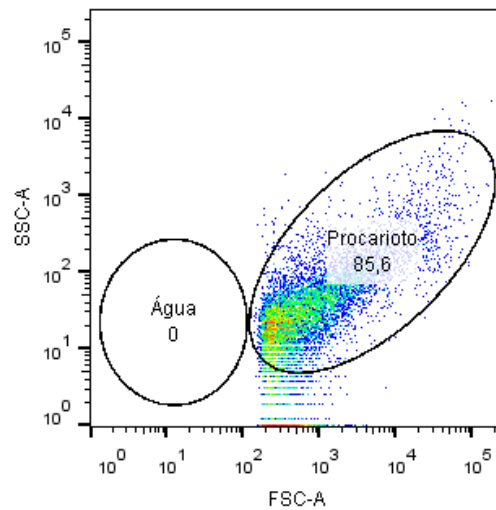
A hibridização fluorescente *in situ* acoplada com a citometria de fluxo – Flow FISH - foi realizada com intuito de quantificar a proporção das populações dos domínios Bacteria e Archaea metabolicamente ativas presentes no lodo ao longo do aumento da salinidade. Para tal, as amostras 25, 100 e 125 g/L de NaCl submetidas à hibridização com as sondas de nucleotídeos marcadas

com fluoróforos complementares ao RNAr 16S dos domínios Bacteria e Archaea. Esta sonda marcada se liga ao alvo específico dentro da célula, e quando a sonda é excitada, emite fluorescência que é captada e quantificada pelo citômetro. Então, quanto maior for o número de RNAr 16S dentro da célula, uma maior quantidade de sonda irá se ligar, e uma maior quantidade de fluorescência irá ser emitida e captada.

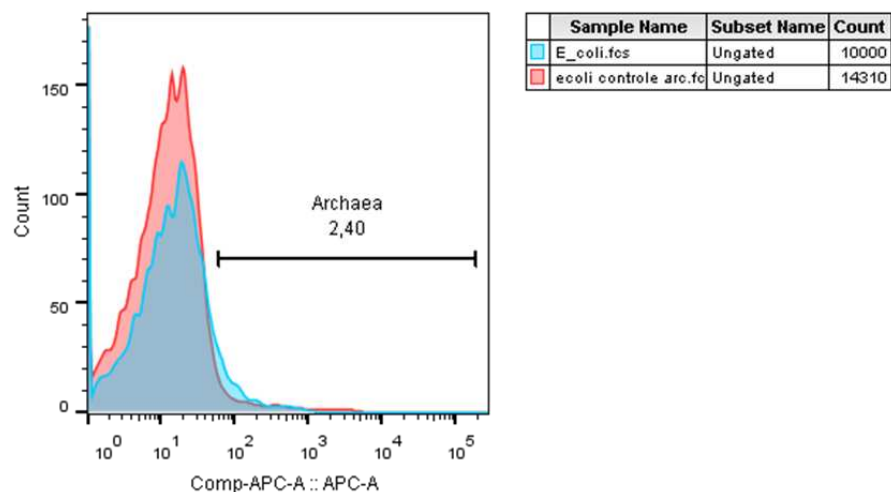
As sondas para o domínio Bacteria foram marcadas com o fluoróforo FITC, e as sondas para o domínio Archaea com o Cy5. Na primeira vez que o experimento foi realizado, nenhum resultado foi obtido para Bacteria. Acreditamos que o problema seja o fluoróforo da sonda para bactéria, sendo necessária a síntese da sonda com um novo fluoróforo. Diferente da sonda para o domínio Bacteria, a sonda para o domínio Archaea foi eficiente. Dessa maneira, optamos por quantificar os procariotos totais e as archaeas, e inferir a proporção de bactéria presentes na amostra.

Utilizamos dois controles para definição do “gate”, o primeiro foi a água, para retirada de qualquer interferência de pequenas moléculas e “debris” celulares, e o segundo foram células de *Escherichia coli*, para selecionar o fenótipo a ser detectado, pois bactérias e archaeas possuem características de superfície e tamanho semelhantes. Assim ao final deste processo definimos dois “gates” (Figura 25).

Além desses dois *gates*, foram realizados vários controles para o experimento. Para cada amostra hibridizada (25, 100 e 125 g/L) uma amostra sem a sonda foi utilizada como controle de autofluorescência. Também foi realizado um controle para garantir a especificidade da sonda de archaea colocando-a em contato com uma célula de *E. coli* permeabilizada, para verificar a presença ou ausência de hibridização (Figura 26).



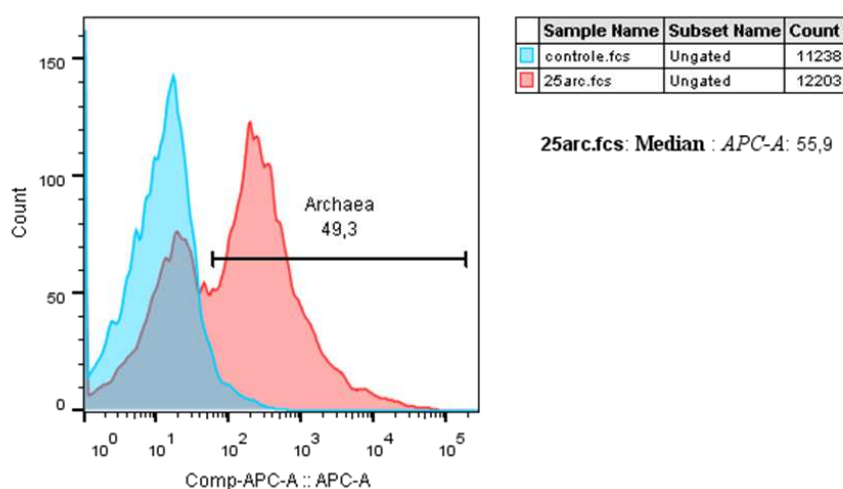
**Figura 25.** Gráfico mostrando as regiões das *gates* para água e procariotos (células de *E. coli*) definidas pelo citômetro.



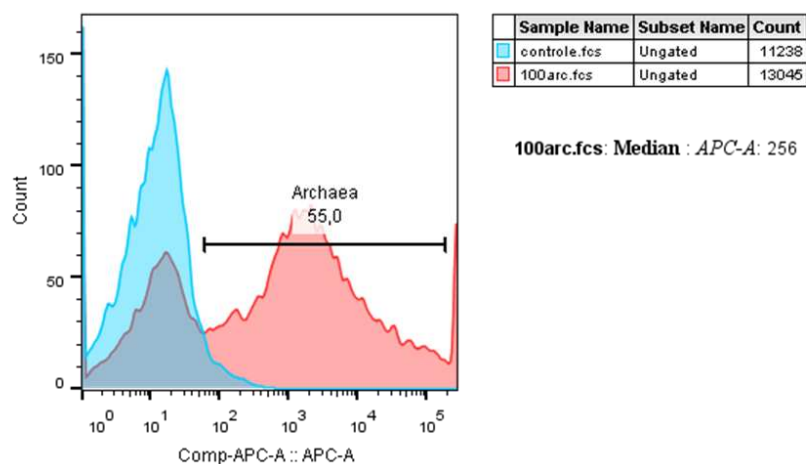
**Figura 26.** Gráfico do controle da especificidade da sonda de Archaea obtido pelo *Flow-FISH*. A região azul representa a autofluorescência de células de *E. coli* sem a sonda e a região rosa as células de *E. coli* hibridizadas com a sonda.

A Figura 26 nos mostra que a sonda para o domínio Archaea é altamente específica, uma vez que nenhum sinal positivo de fluorescência foi detectado na hibridização de *E. coli* usando sondas para archaea, indicando que não houve hibridização inespecífica.

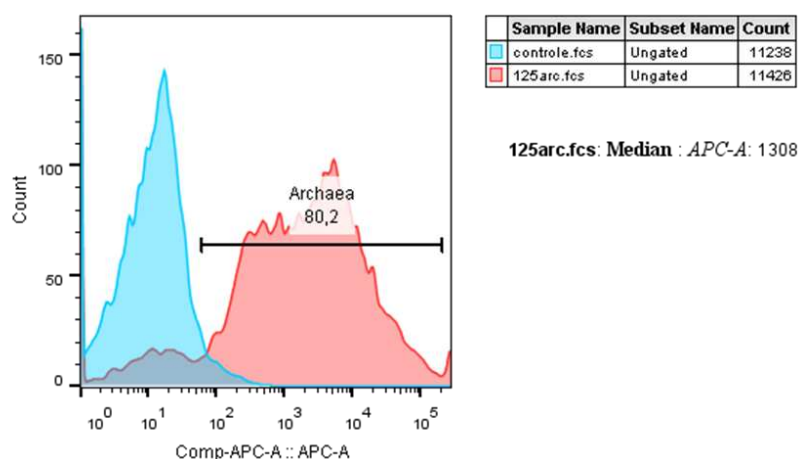
Dessa maneira, com a sonda de Archaea altamente específica, e o “gate” para quantificação de procariotos, definimos a proporção de archaeas e inferimos a porcentagem de bactéria. As Figuras 27, 28 e 29 mostram os resultados obtidos para a quantificação de archaeas nas amostras com 25 g/L, 100 g/L e 125 g/L de NaCl, respectivamente. O aparelho foi configurado e padronizado para que o número de células a cada contagem fosse o mesmo. O número de eventos estipulado foi de 10.000. Isso significa que a cada leitura, para cada amostra, o citômetro contará 10.000 células dentro da “gate” estipulada. As figuras mostram, em azul, o controle da autofluorescência do lodo, sem a sonda, e em rosa, é a amostra do lodo marcada com a sonda específica para archaea. O eixo Y mostra o número de células que foram contadas para que as 10.000 células dentro da “gate” fossem quantificadas. O eixo X representa a quantidade de fluorescência que foi emitida pelas células marcadas. E a região onde o pico azul e o pico rosa se sobrepõe,  $10^2$ , é subtraída, e toda fluorescência acima deste ponto é quantificada como sendo o alvo da sonda.



**Figura 27.** Gráfico representando a quantificação de archaea na amostra com 25 g/L de sal obtido pelo *Flow-FISH*. Região azul representa a autofluorescência da amostra e região rosa a amostra hibridizada com a sonda.



**Figura 28.** Gráfico representando a quantificação de archaea na amostra com 100 g/L de sal obtido pelo *Flow-FISH*. Região azul representa a autofluorescência da amostra e região rosa a amostra hibridizada com a sonda.



**Figura 29.** Gráfico representando a quantificação de archaea na amostra com 125 g/L de sal obtido pelo *Flow-FISH*. Região azul representa a autofluorescência da amostra e região rosa a amostra hibridizada com a sonda.

Os resultados da hibridização fluorescente *in situ* seguido da citometria de fluxo mostraram que na concentração de 25 g/L, as populações estavam equilibradas, com 49 % de archaea e 51 % de bactéria. Na amostra de 100 g/L de sal, a população de archaea aumentou para 55 % e a de bactéria diminuiu para 45 %. E na concentração salina mais elevada, de 125 g/L, a população de

archaea representou 80 % e de bactéria 20 %. Houve assim uma diminuição no número de bactérias com o aumento da salinidade, ao passo que o número de archaeas aumentou. Esses dados corroboram com os dados obtidos com o DGGE e o sequenciamento, que mostraram a abundância das populações bacterianas diminuindo com o aumento da salinidade, e a de archaea aumentando.

Outra informação que podemos obter desses resultados, é a mediana APC-A, que é uma média da intensidade de fluorescência por célula. Quanto maior APC-A, maior é o número de sonda se ligando ao alvo. Uma vez que o alvo é o RNAr 16S, permite inferir na atividade metabólica das células. Os valores médios de APC-A foram 55,9, 256 e 1308 para as amostras com 25, 100 e 125 g/L de sal, respectivamente, indicando que as archaeas aumentaram sua atividade metabólica ao longo do aumento da salinidade.



## 6. Conclusões

- A remoção biológica de nitrogênio no lodo ativado ocorre por um conjunto de microrganismos, bactérias e archaeas, envolvidas nos processos de nitrificação autotrófica, heterotrófica e ANAMMOX;
- A abundância de bactérias envolvidas na remoção biológica do nitrogênio diminuiu com o aumento da salinidade, embora o gênero *Nitrosovibrio*, que participa da primeira etapa da nitrificação convencional, tenha sido o mais abundante em 100 g/L de sal;
- O DGGE, o sequenciamento e o *Flow-FISH* mostraram que a populações de Archaea aumenta ao longo do aumento da salinidade, e a populações de Bacteria diminui;
- O sequenciamento do gene RNAr 16S dos domínios Bacteria e Archaea utilizando a plataforma MiSeq se mostrou eficiente e os “primers” 27f/338r foram melhores para acessar a diversidade de bactérias, enquanto que os “primers” 349f/534r foram melhores para acessar a diversidade de Archaea;
- Os índices de diversidade mostraram que a amostra com 25 g/l de sal apresentou maior diversidade procariótica que as demais;
- Apesar de archaeas e bactérias trabalharem juntas na remoção de amônia, e um maior numero de populações de archaeas conseguirem sobreviver em concentrações superiores a 100 g/L, o processo de nitrificação foi inibido em concentrações superiores a 100 g/L de NaCl, evidenciando que a salinidade interfere na nitrificação;

## 7. Referências

**Ahn**, Y. H. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry*, v.41, p.1709-1721, 2006.

**Amann**, R. I., Krumholz L., Stahl, D.A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Jornal of Bacteriology*. 172:762-770.1990.

**Amini**, S.; Mowla, D.; Golkar, M.; Esmaeilzadeh, F. Mathematical modelling of a hydrocyclone for the down-hole oil-water separation (DOWS). *Chemical Engineering Research and Design*, v. 90, p. 2186-2195, 2012.

**Andrade**, V. T. Avaliação da toxicidade de água produzida tratada por processo evaporativo com a finalidade de reúso em solo. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ. 2009.

**Arahal** D. R., Ludwig W., Schleifer K. H., Ventosa A. Phylogeny of the family Halomonadaceae based on 23S and 16S rDNA sequence analyses. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 241–249.[PubMed]. 2002.

**Arenskötter** M., Bröker D., Steinbüchel A. Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 70 no. 6 3195-3204. 2004.

**Bondoso**, J., Balagué, V., Gasol, J. M. and Lage, O. M. Community composition of the *Planctomycetes* associated with different macroalgae. *FEMS Microbiology Ecology*, 88: 445–456. doi: 10.1111/1574-6941.12258. 2014.

**Bowman**, J. P. The genus *Psychrobacter*. *The prokaryotes*. pp 920-930. 2006.

**BP**. British petroleum statistical review of world energy. Disponível em: <<http://www.bp.com/statisticalreview>>. Acesso em: 15 out. 2014, 2012.

**Braile**, P. M.; Cavalcanti, J. E. Manual de tratamento de águas residuárias industriais, CETESB, São Paulo, 1993.

**Bowman**, J. P., Cavanagh, J., Austin, J. J. & Sanderson, K. Novel Psychrobacter species from Antarctic ornithogenic soils. Int J Syst Bacteriol 46, 841–848. 1996.

**Bowman**, J. P., McCammon, S. A., Brown, M. V., Nichols, D. S. & McMeekin, T. A. Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. Appl Environ Microbiol 63, 3068–3078. 1997.

**Burggraf**, S., T. Mayer, R. Amann, S. Schadhauer, C. R. Woese, and K. O. Stetter. Identifying members of the domain Archaea with rRNA-targeted oligonucleotide probes. Appl. Environ. Microbiol. 60:3112–3119. 1994.

**Campos**, J. L.; Mosquera-Corral, A.; Sanchez, M.; Mendez, R.; Lema, J.M. Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in activated sludge unit. Water Research, v. 36, pp. 2555-2560, 2002.

**Chen** M., Wang W., Feng Y., Zhu X., Zhou H., Tan Z., Li X.. Impact resistance of different factors on ammonia removal by heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacterium *Aeromonas* sp. HN-02. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu, China, Bioresource Technology 167 456–461, 2014.

**Chin** K. J., Liesack W., Janssen P. H. *Opiritatus terrae* gen. nov., sp. nov., to accommodate novel strains of the division “*Verrucomicrobia*” isolated from rice paddy soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.;51:1965–1968. 2001.

**Codony** F., Fittipaldi M., López E., Morató J., Agustí G. Well water as a possible source of *Waddlia chondrophila* infections. Microbes Environmental. 27(4):529-32. 2012.

**Cordi**, L.; Almeida, E. S.; Assalin, M. R.; Durán, N. Intumescimento filamentoso no processo de lodos ativados aplicado ao tratamento de soro de queijo: caracterização e uso de floculantes para melhorar a sedimentabilidade. *Engenharia Ambiental: pesquisa e tecnologia*, v. 4, p. 3, 2007.

**Costa**, A. M. Avaliação da influência da salinidade na nitrificação biológica. Dissertação de mestrado em Tecnologia de e Bioquímicos da Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2014.

**Cui** H. L., Yang X., Gao X., Xu X. W. *Halogranum gelatinilyticum* sp.nov. and *Halogranum amylolyticum* sp. nov., isolated from a marine solar saltern, and emended description of the genus *Halogranum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61:911–915. 2011.

**Da Motta**, M. et al., Estudo do funcionamento de estações de tratamento de esgotos por análise de imagem: validações e estudo de caso. *Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 8, n. 3, p. 170-181, 2003.

**Dahl**, C., Sund, C., Kristensen, G.H., Vredendregt, L. Combined biological nitrification and denitrification of high-salinity wastewater, *Water Science and Technology*, v. 36, p. 345-352, 1997.

**Dalmacija**, B., Karlovic, E., Tamas, Z., Miskovic, D. Purification of high salinity wastewater by activated sludge process, *Water Research*, v. 30, n. 2, p. 295-298, 1996.

**Ercolini**, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiology Methods*, v. 56, p. 297- 314. 2004.

**Ferreira**. S. Eduardo. Cinética química e fundamentos dos processos de Nitrificação e denitrificação biológica, 2000.

**Fogel**, G. B., C. R. Collins, J. Li, and C. F. Brunk. 1999. Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microb. Ecol.* 38:93–113

**Fortis**, R. M. et al., Análise Computacional Comparativa da Dispersão da Pluma do Efluente dos Emissários Submarinos do Tebar, Petrobrás. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, v. 12, p. 117-132, 2007.

**Fredriksson** N. J., Hermansson M., Wilén B. M., Diversity and dynamics of Archaea in an activated sludge wastewater treatment plant. *BMC Microbiology* p 12:140. 2012.

**Freire**, R.S. et al., Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. *Química Nova*, v. 23, n. 4, p. 504-511, 2000.

**Fuerst**, John A., Sharan K. Sambhi, Janette L. Paynter, John A. Hawkins, and John G. Atherton. Isolation of a bacterium resembling *Pirellula* species from primary tissue culture of the giant tiger prawn (*Penaeus monodon*). *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 57, no. 11. p. 3127-3134 American Society for Microbiology. 1991.

**Gabardo**, I. T. Caracterização química e toxicológica da água produzida descartada em plataformas de óleo e gás na costa brasileira e seu comportamento dispersivo no mar. Tese de Doutorado, UFRN, Natal, RN, Brasil. 2007.

**Gao**, J. F., Luo, X., Wu, G. X., Li, T., Peng, Y. Z. Quantitative analyses of the composition and abundance of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in eight full-scale biological wastewater treatment plants. College of Environmental and Energy Engineering, Beijing University of Technology, China, 2013.

**Good** I. J. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, Vol. 40, No. 3/4. pp. 237-264. 1953.

**Grommen**, R., Dauw, L., Verstraete, W. Elevated salinity selects for a less diverse ammonia-oxidizing population in aquarium biofilters, *FEMS*, 2005.

**Günther** S, Trutnau M, Kleinsteuber S, Hause G, Bley T, Röske I, et al: Dynamics of polyphosphate-accumulating bacteria in wastewater treatment plant microbial communities detected via DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) and tetracycline labeling. *Appl Environ Microbiol*, 75:2111 – 2121. 2009.

**Guo** Y.; Zhou X.; Li Y.; Li K.; Wang C.; Liu J.; Yan D.; Liu Y.; Yang D.; Xing J.; Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Halomonas campisalis*. Chinese Academy of Sciences, Beijing, 2013.

**Hammer**, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm). 2001.

**Henze**, M., Harre, P., Jansen, J.C., Arqin, E. Wastewater treatment – biological and chemical process. Springer Verlag, 2<sup>a</sup> edição, Alemanha, 1997.

**Hermansson**, A., Lindgren, P. E. Quantification of ammonia oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. *Applied Environmental Microbiology*. 67, 972–976, 2001.

**Hiroyuki** I. Yuji S. Yoichi K. Satoshi H. Akiyoshi O., Hideki H. *Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, syntrophic propionate-oxidizing bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. vol. 52 (5), pp. 1729-1735. 2002.

**Horn** M., Wagner M., Muller K. D., Schmid E. N., Fritsche T. R., Schleifer K. H., Michel R. *Neochlamydia hartmannellae* gen. nov., sp. nov.

(*Parachlamydiaceae*), an endoparasite of the amoeba *Hartmannella vermiformis*. Microbiology, 146, 1231–1239. 2000.

**Hugenholtz**, P., Goebel, B.M., Pace, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. Journal of Bacteriology 180, 4765-4774, 1998.

**Ida T.**, Satoh M., Yabe R., Takahashi R., Tokuyama T. Identification of genus *Nitrosovibrio*, ammonia-oxidizing bacteria, by comparison of N-terminal amino acid sequences of phosphoglycerate kinase. J Biosci Bioeng.;98(5):380-3. 2004.

**Jetten**, M. S. M. et al., The anaerobic oxidation of ammonium. FEMS Microbiology, v.22, p.421-37, 1999.

**Joo**, H.S., Hirai, M., Shoda, M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification–aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 100, 184–191, 2005

**Jordão**, E.P; Pessoa, C.A. Tratamento de Esgotos Domésticos. 4<sup>a</sup> ed. ABES-RJ, 682p. 2005

**Juretschko** S., Loy A., Lehner A., Wagner M. The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. Syst Appl Microbiol. 25(1):84-99. 2002.

**Kartal** B., Rattray, J., Van Niftrik, L., Van De Vossenberg J., Schmid M., Webb R.I., Schouten S., Fuerst, J.A., Sinnighe Damsté, J.S., Jetten M.S.M., Strous M. Candidatus “*Anammoxoglobus propionicus*” gen. nov., sp. Nov., a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. Applied Microbiology 30: 39-49, 2007.

**Khin**, T. E Annachhatre, A. P. Novel Microbial Nitrogen Removal Processes. *Biotechnology Advances*, 22 (7): 519-532, 2004.

**Koch** C., Günther S., Desta A. F., Hübschmann T., Müller S.: Cytometric fingerprinting for analyzing microbial intracommunity structure variation and identifying subcommunity function. *Nat Protoc* 2013, 8:190 – 202.

**Kushner** D. J. Life in high salt and solute concentrations. In: Kushner DJ, editor. *Microbial life in extreme environments*. London: Academic Press; pp. 317–368. 1978.

**Lai**, Q., Qiao, N., Wu, C., Sun, F., Yuan, J. & Shao, Z. *Stappia indica* sp. nov., isolated from deep seawater of the Indian Ocean. *Int J. Syst Evol Microbiol* 60, 733–736. 2010.

**Lane**, D. J., Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin, and N. R. Pace. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of sciences, U. S. A.* 82: 6955-6959. 1985.

**Lemos** L. N., Fulthorpe R. R., Triplett E. W., Roesch L. F. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. *J Microbiol Methods*. 86(1):42-5. 2011.

**Levantesi** C., Rossetti S., Thelen K., Kragelund C., Krooneman J., Eikelboom D., Nielsen P. H., Tandoi V. Phylogeny, physiology and distribution of '*Candidatus Microthrix calida*', a new *Microthrix* species isolated from industrial activated sludge wastewater treatment plants. *Environ Microbiol. Sep*;8(9):1552-63. 2006.

**Lima**, R. M. G.; Wildhagen, G. R. S.; Cunha, J. W. S. D. Remoção do íon amônio de águas produzidas na exploração de petróleo em áreas *offshore* por adsorção em clinoptilolita. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1237-1242, 2008.



**Limpiyakorn**, T., Fürhacker, M., Haberl, R., Chodanon, T., Srithep, P., Sonthiphand, P. AmoA-encoding Archaea in wastewater treatment plants: a review. Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Thailand, 2013.

**Madigan**, T.M., Martinko, J.M., Parker, J., Brock Biology of Microorganisms, Prentice Hall, 8ª edição, New York, 1997.

**Madigan**, T.M., Martinko, J.M., Parker, J., Brock Biology of Microorganisms, Prentice Hall, 12ª edição, New York, 2010.

**Magurran**, A.E. Measuring biological diversity. Oxford, Blackwell Science, 256p. 2004.

**Marazioti**, C., Kornaros, M., Lyberatos, G. Kinetic modeling of a mixed culture of *Pseudomonas denitrificans* and *Bacillus subtilis* under aerobic and anoxic operating conditions. Water Res. 37, 1239–1251, 2003.

**Mata** J. A., Martínez-Cánovas J., Quesada E., Béjar V. A detailed phenotypic characterization of the type strains of *Halomonas* species. Syst Appl Microbiol 25, 360–375..2002.

**Mc Carty** P. L. Anaerobic waste treatment fundamentals. Public Works. 95(9): 91-99.1964.

**McIlroy** S.J., Saunders A.M., Albertsen M., Nierychlo M., McIlroy B., Hansen A.A., Karst S.M., Nielsen J.L., Nielsen P.H. (2015) MiDAS: the field guide to the microbes of activated sludge. Database, Vol. 2015.

**Measures**, J.C. Role of amino acids in osmoregulation of nonhalophilic bacteria, Nature, v. 257, pp. 398-400, 1975.

**Metcalf & Eddy** . Wastewater engineering: treatment, disposal, reuse. 4<sup>a</sup> edição, New York. 1819p, 2003.

**Mosier** A. C., Allen E. E., Kim M., Ferriera S., Francis C. A. Genome sequence of "*Candidatus Nitrosoarchaeum limnia*" BG20, a low-salinity ammonia-oxidizing archaeon from the San Francisco Bay estuary. J Bacteriol. Apr;194(8):2119-20. 2012.

**Mori** k., Iino T., Suzuki K. I. , Yamaguchi k., Kamagata Y. Aceticlastic and NaCl- Requiring Methanogen "*Methanosaeta pelagica*" sp. nov., Isolated from Marine Tidal Flat Sediment. Appl. Environ. Microbiol. vol. 78 no. 9 3416-3423. 2012.

**Moussa**, M.S., Sumanasekera, D.U., Ibrahim, S.H., Lubberding, H.J., Hooijmans, C.M., Gijzen, H.J., Van Loosdrecht, M.C.M. Long term effects of salt on activity, population structure and floc characteristics in enriched bacterial cultures of nitrifiers, Water Research, v. 40, n. 7, p. 1377-1388, 2006.

**Mulder**, A., Vandegraaf, A.A., Robertson, L.A., Kuenen, J.G., and Qn. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized-bed reactor. FEMS Microbiology Ecology 16: 177-183, 1995.

**Muyzer**, G.; Wall, E. C.; Uitterlinden, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

**Muyzer** G., Brinkhoff T., Nubel U., Santegoeds C., Schafer H., Wawer C. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: Akkermans ADL, van Elsas JD & de Bruijn FJ (Eds) Molecular Microbial Ecology Manual (3.4.4: pp. 1–27) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 1997.

**Muyzer, G.;** Smalla, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 73, p. 127-141. 1998.

**Muyzer, G.** DGGE/TGGE: a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 2, 317–322. 1999.

**Myers, E. W.** Toward simplifying and accurately formulating fragment assembly. *Journal of Computational Biology*, 2(2), 275--290. 1995.

**Neef, A.,** Amann, R., Schlesner, H., Schleifer, K.-H.: Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of *planctomycetes* with RNAr 16S-targeted probes. *Microbiology*. 144, 3257–3266, 1998.

**Neves, S. M. N.,** Guedes, R. M. C. Hibridização in situ fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, v.79, n.4, p.627-632, out./dez, 2012.

**Nettman E.,** Fröhling A., Heeg K., Klocke M., Schlüter O., Mumme J. Development of a flow-fluorescence in situ hybridization protocol for the analysis of microbial communities in anaerobic fermentation liquor. *BMC Microbiology* 13:278. 2013.

**Nogueira, R.,** Melo, L.F., Purkhold, U., Wuertz, S., Wagner, M. Nitrifying and heterotrophic population dynamics in biofilm reactors: effects of hydraulic retention time and the presence of organic carbon, *Water Research*, v. 36, n. 2, p. 469-481, 2002.

**Nunes, G.C.** Water treatment in brown fields. In: international seminar on oilfield water management, Rio de Janeiro, 2010.

**Oren, A.** Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and*

Biotechnology, 28:56-63, 2002.

**Patin**, S. Environmental impact of the offshore oil and gas industry. New York: Ecomonitor Publishing. 401 p. 1999.

**Pelletier** E., Kreymeyer A., Bocs S., Rouy Z., Gyapay G., Chouari R., Riviere D., Ganesan A., Daegelen P., Sghir A., Cohen G. N., Medigue C., Weissenbach J., Paslier D. L. “*Candidatus Cloacamonas acidaminovorans*”: genome sequence reconstruction provides a first glimpse of a new bacterial division. J Bacteriol 190:2572–2579. 2008.

**PETROBRAS**, 2015. Disponível em: <http://www.petrobras.com.br/pt/>. Acesso em 20 de julho de 2015.

**Posada**, Y., Pachón, L., Agudelo, A., Álvarez, E., Díaz, C., Fardeau, M., L. Joulían, C., Olivier.,B., Baena, S. Cuantificación, aislamiento e identificación de comunidades anaerobias amilolíticas de un manantial termomineral de Paipa, Boyacá Revista Colombiana de Biotecnología. 2015.

**Quan**, Z.X. et al. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor. Environmental Microbiology, v. 10, n. 11, p. 3130-3139, 2008.

**Ramirez** E., Robles E., Martinez B., Ayala R., Sainz G., Martinez M. E., Gonzalez M. E. Distribution of free-living amoebae in a treatment system of textile industrial wastewater. Experimental Parasitology 145 S34–S38. 2014.

**Rittmann**, B.E. & Langeland, W.E. Simultaneous denitrification with nitrification in single channel oxidation ditches. Journal Water Pollution Control. Federation Washington, v.45, n.2, p.249 – 260, 1985.

**Robertson**, L.A., Kuenen, J.G. *Thiosphaera pantotropha* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulfur bacterium. J. Gen. Microbiol. V. 129, p. 2847–2855, 1983.

**Rosado**, A. S.; Duarte, G. F. Utilização da eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) e gel com gradientes de temperatura (TGGE) para estudar diversidade microbiana. In: MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C.; NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C. Recursos genéticos e melhoramento – microrganismos. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2002.

**Rufer** N., Dragowska W., Thornbury G., Roosnek E., Lansdrop P. M.: Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat Biotechnol*, 16:743 – 747. 1998.

**Sangwan** P., Chen X., Hugenholtz P., Janssen P. H. *Chthoniobacter flavus* gen. nov., sp. nov., the first pure-culture representative of subdivision two, Spartobacteria classis nov., of the phylum Verrucomicrobia. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:5875–5881. 2004.

**Santos**, A. F. Descarte de Água Produzida na Bacia de Campos: Uma Análise Econômica. Tese de M.Sc., PPE/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 1999.

**Sanz** J. L, Köchling T. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: an overview. *Process Biochem*; 42:119–33. 2007.

**Schill** N., Gulik W.M. van, Voisard D., Stockar U. Von. Continuous cultures limited by a gaseous substrate: development of a simple, unstructured mathematical model and experimental verification with *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biotechnol Bioeng*, 51 pp. 645–658. 1996.

**Schloss**, P.D., Larget, B.R., and Handelsman, J. Integration of Microbial Ecology and Statistics: a Test To Compare Gene Libraries. *Applied Environmental Microbiology*, v. p. 70, 5485-5492, 2004.

**Sheffield**, V. C.; Cox, D. R.; Myers, R. M. Attachment of a 40bp G+C rich sequence (GC-Clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the USA, Washington, v. 86, n. 1, p. 232-236, Jan. 1989.

**Silva**, C. C.; Viero, A. F.; Dias, A. C. F.; Andreote, F. D.; Jesus, E. C.; De Paula, S. O.; Torres, Ana Paula R.; Santiago, V. M. J.; Oliveira, Valéria Maia de. Monitoring the bacterial community dynamics in a petroleum refinery wastewater membrane bioreactor fed with a high phenolic load. *Journal of Microbiology and Biotechnology (Print)*, v. 20, p. 29-29, 2010.

**Sowers**, K. R., Ferry, J. G. Isolation and characterization of a methylotrophic marine methanogen, *Methanococcoides methylutens* gen. nov. , sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:684-690. 1983.

**Stahl**, D. A., Amann R. Development and application of nucleic acid probes. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. E. Stackebrandt and M. Goodfellow, editors. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK. 205-248. 1991.

**Stephenson**, M. T. Components of produced water: a compilation of industry studies. *Journal of Petroleum Technology*, p. 548-603, 1992.

**Strous** M., van Gerven, E., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M. Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 63, p. 2446-2448, 1997

**Strous**, M., Fuerst, J.A., Kramer, E.H.M., Logemann, S., Muyzer, G., van De Pas-achoonen K.T., Webb, R., Kuenen, J.G. Jetten M.S.M. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* v. 400, p. 446-449, 1999.

**Strous**, M., Pelletier, E., Mangenot, S., Rattei, T., Lehner A., Taylor, M.W., Horn, M., Daims, H., Bartol-Mavel, D., Wincker, P., Barbe V., Fonknechten, N., Vallenet, D., Segurens, B., Schenowitz-Tuong, C., Medigue, C., Collingro, A., Snel, B., Dutilh, B.E. et al. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature* v. 440, p.790-794, 2006.

**Stubner S.** Quantification of gram-negative sulphate-reducing bacteria in rice field soil by 16S rRNA gene-targeted real-time PCR. *J Microbiol Methods* v.57, p.219–230, 2004.

**Third, K.A., Gibbs, B., Newland, M., Cord-Ruwisch, R.** Long-term aeration management for improved N-removal via SND in a sequencing batch reactor. *Water Research* v. 39, p.3523–3530, 2005.

**Torsvik, V., Goksoyr, J., and Daae, F.L.** High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* v.56, p.782-787, 1990.

**Torsvik, V., Øvreås, L., and Thingstad, T.F.** Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* v.296, p.1064-1066, 2002.

**Uemoto, H., Saiki, H.,** Nitrogen removal by tubular gel containing *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans*, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 11, pp. 4224-4228, 2000.

**Uygur, A.; Kargi, F..** Biological nutrient removal from pre-treated landfill leachate in a sequencing batch reactor. *Environmental Management*, v.21, p.9-14, 2004.

**Van Haandel, A. C., Marais, G. v. R.** O comportamento do sistema de lodo ativado: teoria e aplicações para projetos e operações. *Campina Grande: epgraf*, p. 472, 1999.

**Van't Riet, K., Tramper, J.,** Basic bioreactor design, Marcel Dekker, NewYork, 1991.

**Vazoller, R. F.; Gomes, L. P.; Villas-Boas, D. M.; Baldochl, V. M. Z.; Badra, R. J.; Povinelli, J.** Biodegradability potential of two experimental landfills in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 32, p. 87-92, 2001.

**Vanparys** B., Bodelier P., De Vos P. Validation of the correct start codon of norX/nxrX and universality of the norAXB/nxrAXB gene cluster in *Nitrobacter* species. *Current Microbiology*. v.53, p.255-257, 2006.

**Ventosa** A., Nieto J. J., Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 504–544.[PubMed] . 1998.

**Ventosa**, A; Yanhe, M; Galinski, E; Grant,W; Oren, A; Halophiles 2010: Life in Saline Environments. meeting review. *applied and environmental microbiology*, p. 6971–6981 v. 76, No. 21, 2010.

**Verstrae**, W., Alexande, M. Heterotrophic nitrification by *Arthrobacter* sp. *Journal of. Bacteriology*, v.110, p.955–959, 1972.

**Wallner** G., Amann R., Beisker W.: Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*, 14:136 – 143. 19993.

**Wan**, C., Yang, X., Lee, D.-J., Du, M., Wan, F., Chen, C. Aerobic denitrification by novel isolated strain using as nitrogen source. *Bioresource Technology*, v.102, p.7244–7248, 2011.

**Wasserfallen** A., Nölling J., Pfister P., Reeve J., Conway de Macario E.: Phylogenetic analysis of 18 thermophilic *Methanobacterium* isolates supports the proposals to create a new genus, *Methanothermobacter* gen. nov., and to reclassify several isolates in three species, *Methanothermobacter thermautotrophicus* comb. nov., *Methanothermobacter wolfeii* comb. nov. and *Methanothermobacter marburgensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 50, 43-53. 2000.

**Whitman**, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* v.95, p.6578-6583, 1998.



**Woese**, C., The Universal Ancestor, Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 6854-6859 1998.

**Yamada** T., Imachi H., Ohashi A., Harada H., Hanada S., Kamagata Y., Sekiguchi Y. *Bellilinea caldifistulae* gen. nov., sp. nov. and *Longilinea arvoryzae* gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum Chloroflexi isolated from methanogenic propionate-degrading consortia. Int J Syst Evol Microbiol. Oct;57(Pt 10):2299-306. 2007.

**Yang**, X. P., Wang, S. M., Zhang, D. W., Zhou, L. X. Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1. Bioresource Technology, v.102, p.854–862, 2011.

**Yao** S.; Ni J.; Ma T.; Li C. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. HA2. Department of Environmental Engineering, Peking University, China, Bioresource Technology v.139, p. 80–86 2013.

**Zhang** J.; Wu P.; Hao B.; Yu Z. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. Bioresource Technology v.102, p.9866–9869, 2011.

**Zhang** Q. L.; Liu Y.; Ai G. M.; Miao L. L.; Zheng, H. Y.; Liu Z. P. The characteristics of a novel heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotrophicus* strain L7. Bioresource Technology, v.108 p. 35–44, 2012.

**Zhang** X., Qu Y., Ma Q., Zhang Z., Li D., Wang J. Illumina miseq sequencing reveals diverse microbial communities of activated sludge systems stimulated by different aromatics for indigo biosynthesis from indole. PLoS ONE 10(4): e0125732. doi:10.1371/journal.pone.0125732. 2015.

## 8. Anexos

### ANEXO I

Classificação das sequências obtidas a partir dos “primers” 27f/338r e 349f/534r e suas abundâncias ao longo do aumento da concentração salina:

- “Primers” 27f/338r – Bacteria

**Tabela 6.** Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 27f/338r pertencentes ao domínio Bacteria quanto ao Filo, e a abundância ao longo do aumento da salinidade.

FILO	Número de reads		
	25 g/L	100 g/L	125 g/L
Actinobacteria	23523	10468	10029
Chloroflexi	14258	4398	3761
Proteobacteria	12653	18904	30014
Firmicutes	9478	19678	5101
Planctomycetes	4283	2040	1446
Bacteroidetes	1576	1590	581
Deinococcus_thermus	1316	285	659
Cyanobacteria	404	136	119
Acidobacteria	24	26	5
Candidatus saccharibacteria	18	10	9
Spirochaetes	13	2	11
Nitrospirae	10	2	0
Ignavibacteriae	7	0	3
Thermotogae	6	58	49
Fusobacteria	5	23	6
Thermodesulfobacteria	2	2	1
Synergistetes	1	15	4
Bacteria	0	3	0
Lentisphaerae	0	4	4
Verrucomicrobia	0	12	5

**Tabela 7.** Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 27f/338r pertencentes ao domínio Bacteria quanto à Classe, e a abundância ao longo do aumento da salinidade.

CLASSE	Número de reads		
	25 g/L	100 g/L	125 g/L
<i>Actinobacteria</i>	23523	10468	10029
<i>Anaerolineae</i>	12611	3614	3155
<i>Alphaproteobacteria</i>	8017	12530	14928
<i>Clostridia</i>	5956	3377	3106
<i>Gammaproteobacteria</i>	4090	6061	14732
<i>Planctomycetia</i>	4075	1908	1360
<i>Bacilli</i>	3494	16226	1947
<i>Deinococci</i>	1316	285	659
<i>Sphingobacteriia</i>	909	654	188
<i>Chloroflexia</i>	717	285	99
<i>Flavobacteriia</i>	602	924	385
<i>Caldilineae</i>	583	350	257
<i>Betaproteobacteria</i>	459	205	291
<i>Cyanobacteria</i>	404	136	119
<i>Thermomicrobia</i>	345	147	248
<i>Phycisphaerae</i>	208	132	86
<i>Deltaproteobacteria</i>	77	108	63
<i>Cytophagia</i>	53	9	3
<i>Negativicutes</i>	28	75	48
<i>Acidobacteriia</i>	24	26	5
<i>Candidatus saccharibacteria</i>	18	10	9
<i>Spirochaetia</i>	13	2	11
<i>Bacteroidetes</i>	12	0	0
<i>Epsilonproteobacteria</i>	10	0	0
<i>Nitrospira</i>	10	2	0
<i>Ignavibacteria</i>	7	0	3
<i>Thermotogae</i>	6	58	49
<i>Fusobacteriia</i>	5	23	6
<i>Thermodesulfobacteria</i>	2	2	1
<i>Dehalococcoidia</i>	2	2	2
<i>Synergistia</i>	1	15	4
<i>Bacteroidia</i>	0	3	5
<i>Lentisphaeria</i>	0	4	4
<i>Bacteria</i>	0	3	0
<i>Verrucomicrobiae</i>	0	12	5

**Tabela 8.** Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 27f/338r pertencentes ao domínio Bacteria quanto ao Gênero, e a abundância ao longo do aumento da salinidade.

GÊNERO	Número de reads		
	25 g/L	100 g/L	125 g/L
<i>Bellilinea</i>	12572	3576	3116
<i>Candidatus microthrix</i>	10480	2846	3112
<i>Thermoanaerobacter</i>	5864	2228	2466
<i>Trichococcus</i>	3320	13986	1389
<i>Mycobacterium</i>	3144	291	266
<i>Gordonia</i>	2920	5542	4066
<i>Actinomyces</i>	1932	401	877
<i>Halochromatium</i>	1666	689	661
<i>Pirellula</i>	1559	466	274
<i>Nitratireductor</i>	1458	1715	2146
<i>Truepera</i>	1125	256	643
<i>Paracoccus</i>	1033	993	409
<i>Iamia</i>	1004	92	62
<i>Roseovarius</i>	1004	864	1155
<i>Roseimaritima</i>	931	96	468
<i>Lewinella</i>	897	626	147
<i>Xylanimicrobium</i>	863	149	26
<i>Nocardia</i>	772	36	35
<i>Chloroflexus</i>	716	281	96
<i>Planctomyces</i>	650	408	188
<i>Halomonas</i>	609	2343	11482
<i>Caldilinea</i>	582	347	257
<i>Thioalkalivibrio</i>	504	264	100
<i>Lutimaribacter</i>	489	974	1371
<i>Nitriliruptor</i>	486	280	395
<i>Citreicella</i>	482	2562	5774
<i>Blastopirellula</i>	477	701	343
<i>Ilumatobacter</i>	428	57	51
<i>Aciditerrimonas</i>	418	49	54
<i>Dietzia</i>	408	377	871
<i>Rhodobacter</i>	403	789	490
<i>Alkalilimnicola</i>	378	151	580
<i>Rhodopirellula</i>	365	122	31
<i>Spirulina</i>	360	68	43
<i>Marinicella</i>	333	255	145
<i>Aeromicrobium</i>	300	32	28
<i>Methyloceanibacter</i>	296	179	126
<i>Massilia</i>	271	55	64
<i>Oceanicola</i>	259	356	213

<i>Saccharibacter</i>	248	78	74
<i>Rhizobium</i>	244	112	97
<i>Algisphaera</i>	206	103	82
<i>Thermomicrobium</i>	204	63	3
<i>Thermus</i>	191	29	16
<i>Formosa</i>	189	259	176
<i>Rhodocista</i>	181	35	117
<i>Defluviicoccus</i>	169	489	115
<i>Sphaerobacter</i>	141	84	245
<i>Marinobacter</i>	129	72	147
<i>Bizionia</i>	128	391	92
<i>Pseudomonas</i>	126	28	15
<i>Marivita</i>	125	246	70
<i>Rhodobium</i>	125	89	91
<i>Psychrobacter</i>	111	1846	1411
<i>Limnobacter</i>	96	39	12
<i>Roseobacter</i>	93	205	212
<i>Rhodococcus</i>	90	3	10
<i>Muricauda</i>	87	63	71
<i>Vitellibacter</i>	84	12	8
<i>Hoeflea</i>	83	98	60
<i>Thiohalospira</i>	81	41	4
<i>Thermoflavimicrobium</i>	77	10	3
<i>Tepidamorphus</i>	66	28	19
<i>Filomicrobium</i>	63	122	65
<i>Novosphingobium</i>	63	535	334
<i>Mesorhizobium</i>	63	67	79
<i>Sediminibacter</i>	59	93	8
<i>Devosia</i>	58	41	43
<i>Albidovulum</i>	48	19	15
<i>Pseudanabaena</i>	44	68	76
<i>Clostridiisalibacter</i>	44	362	182
<i>Flavobacterium</i>	43	41	19
<i>Sphingomonas</i>	43	22	8
<i>Erythrobacter</i>	43	17	19
<i>Chelatococcus</i>	43	38	18
<i>Roseibacterium</i>	42	33	49
<i>Microvirga</i>	41	49	42
<i>Enhygromyxa</i>	41	0	0
<i>Cytophaga</i>	40	9	0
<i>Bythopirellula</i>	38	54	29
<i>Salinicoccus</i>	37	93	139
<i>Sneathiella</i>	36	16	13
<i>Alcaligenes</i>	34	64	151
<i>Leisingera</i>	34	426	125

<i>Pseudonocardia</i>	33	15	18
<i>Hyphomonas</i>	33	6	6
<i>Defluviimonas</i>	32	11	14
<i>Phenylobacterium</i>	32	4	3
<i>Leucobacter</i>	32	19	32
<i>Lutibacterium</i>	32	27	6
<i>Pedomicrobium</i>	30	6	5
<i>Donghicola</i>	30	95	236
<i>Anaerolinea</i>	30	17	9
<i>Conexibacter</i>	29	38	9
<i>Acidaminococcus</i>	28	75	48
<i>Singulisphaera</i>	28	13	6
<i>Nitrococcus</i>	28	65	12
<i>Bordetella</i>	27	19	60
<i>Sphingosinicella</i>	26	365	161
<i>Rhodovulum</i>	25	22	37
<i>Nocardioides</i>	25	6	9
<i>Roseivivax</i>	25	14	99
<i>Parvularcula</i>	25	109	141
<i>Maritalea</i>	24	18	3
<i>Nitrosomonas</i>	22	25	2
<i>Bauldia</i>	22	26	7
<i>Ornithinimicrobium</i>	22	21	11
<i>Sphingopyxis</i>	21	25	16
<i>Dongia</i>	20	20	21
<i>Halolactibacillus</i>	20	1997	367
<i>Acidobacterium</i>	20	26	5
<i>Microbulbifer</i>	19	82	46
<i>Candidatus saccharimonas</i>	18	10	9
<i>Afifella</i>	18	2	4
<i>Candidatus kueningenia</i>	18	3	15
<i>Thiopfundum</i>	18	34	11
<i>Sulfitobacter</i>	18	94	81
<i>Thalassococcus</i>	17	8	4
<i>Euzebya</i>	17	8	24
<i>Roseicyclus</i>	16	21	28
<i>Phyllobacterium</i>	16	11	23
<i>Leifsonia</i>	15	5	3
<i>Exiguobacterium</i>	15	10	2
<i>Pelagibaca</i>	15	11	15
<i>Lutibaculum</i>	14	24	10
<i>Desulfovibrio</i>	14	19	2
<i>Dechloromarinus</i>	14	2	3
<i>Amorphus</i>	13	59	52
<i>Solirubrobacter</i>	13	5	4

<i>Citromicrobium</i>	13	25	16
<i>Spirochaeta</i>	13	2	11
<i>Flexibacter</i>	13	0	3
<i>Alcanivorax</i>	12	15	7
<i>Tistlia</i>	12	15	1
<i>Rubricoccus</i>	12	0	0
<i>Vallitalea</i>	11	458	115
<i>Streptomyces</i>	11	48	13
<i>Hyphomicrobium</i>	11	6	2
<i>Actinomycetospora</i>	11	5	0
<i>Parvibaculum</i>	10	14	17
<i>Nitrospira</i>	10	2	0
<i>Haliea</i>	10	13	2
<i>Desulfuromusa</i>	10	51	38
<i>Helicobacter</i>	10	0	0
<i>Sporichthya</i>	10	15	20
<i>Haliscomenobacter</i>	9	28	9
<i>Tindallia</i>	9	78	95
<i>Maricaulis</i>	9	14	11
<i>Sanguibacter</i>	9	0	0
<i>Microbacterium</i>	9	2	5
<i>Rhodobaca</i>	8	10	53
<i>Pseudoalteromonas</i>	8	3	3
<i>Achromobacter</i>	8	1	0
<i>Oceanibacterium</i>	8	17	3
<i>Poseidonocella</i>	8	2	9
<i>Ectothiorhodospira</i>	8	5	0
<i>Planococcus</i>	8	14	15
<i>Francisella</i>	7	1	0
<i>Gemmobacter</i>	6	18	64
<i>Amaricoccus</i>	6	2	2
<i>Peptoclostridium</i>	6	19	7
<i>Fodinicurvata</i>	6	13	156
<i>Isoptericola</i>	6	55	3
<i>Shimia</i>	6	2	1
<i>Levilinea</i>	6	12	15
<i>Nisaea</i>	6	13	1
<i>Gemmata</i>	5	2	3
<i>Fusobacterium</i>	5	23	6
<i>Hippea</i>	5	0	0
<i>Rhodovibrio</i>	5	11	3
<i>Mycoplana</i>	5	32	18
<i>Caenispirillum</i>	5	0	3
<i>Cryobacterium</i>	5	5	4
<i>Albimonas</i>	5	7	0

<i>Amycolatopsis</i>	5	3	5
<i>Tateyamaria</i>	5	1	10
<i>Spongiobacter</i>	5	0	0
<i>Marinobacterium</i>	5	49	16
<i>Kitasatospora</i>	4	26	0
<i>Acetivibrio</i>	4	12	2
<i>Zavarzinella</i>	4	40	3
<i>Natronocella</i>	4	10	9
<i>Propionibacterium</i>	4	0	1
<i>Cucumibacter</i>	4	19	9
<i>Ignavibacterium</i>	4	0	2
<i>Eubacterium</i>	4	0	0
<i>Magnetospirillum</i>	4	6	7
<i>Thiorhodospira</i>	4	12	2
<i>Bacillus</i>	4	10	4
<i>Clostridium</i>	4	49	52
<i>Mesotoga</i>	4	8	25
<i>Corynebacterium</i>	4	0	0
<i>Meridianimaribacter</i>	4	2	0
<i>Prosthecomicrobium</i>	4	0	0
<i>Candidatus koribacter</i>	4	0	0
<i>Vulcanibacillus</i>	4	0	0
<i>Marmoricola</i>	4	5	3
<i>Geoalkalibacter</i>	3	0	0
<i>Polaribacter</i>	3	2	0
<i>Spongiibacter</i>	3	11	0
<i>Gracilimonas</i>	3	0	32
<i>Desulfofustis</i>	3	6	2
<i>Melioribacter</i>	3	0	1
<i>Owenweeksia</i>	3	4	2
<i>Cryptosporangium</i>	3	0	0
<i>Dichotomicrobium</i>	3	8	28
<i>Stappia</i>	3	1	6
<i>Ornatilinea</i>	3	3	3
<i>Kordiimonas</i>	3	1	8
<i>Salimicrobium</i>	2	97	13
<i>Planomicrobium</i>	2	2	0
<i>Demequina</i>	2	0	1
<i>Micavibrio</i>	2	7	5
<i>Dehalococcoides</i>	2	2	2
<i>Halanaerobium</i>	2	6	122
<i>Camnicella</i>	2	7	1
<i>Methylococcus</i>	2	2	1
<i>Sphingobium</i>	2	10	0
<i>Kosmotoga</i>	2	42	22



<i>Marinococcus</i>	2	0	1
<i>Candidatus phaeomarinobacter</i>	2	1	0
<i>Bradyrhizobium</i>	2	5	1
<i>Acetobacterium</i>	2	39	8
<i>Azospirillum</i>	2	6	70
<i>Legionella</i>	2	8	0
<i>Alkalibacter</i>	2	80	23
<i>Rubrobacter</i>	2	0	4
<i>Thermodesulfobacterium</i>	2	2	1
<i>Halobacillus</i>	2	3	4
<i>Phycisphaera</i>	2	29	4
<i>Labrys</i>	2	0	9
<i>Martelella</i>	2	10	19
<i>Salinisphaera</i>	2	9	3
<i>Pelagicola</i>	1	4	15
<i>Bacteriovorax</i>	1	2	0
<i>Winogradskyella</i>	1	47	3
<i>Shinella</i>	1	1	1
<i>Falsirhodobacter</i>	1	0	6
<i>Achromatium</i>	1	6	5
<i>Pseudoruegeria</i>	1	8	21
<i>Alkalibacterium</i>	1	2	1
<i>Loktanella</i>	1	4	1
<i>Ketogulonicigenium</i>	1	6	4
<i>Oscillochloris</i>	1	4	3
<i>Gaiella</i>	1	19	1
<i>Litoreibacter</i>	1	3	1
<i>Citreimonas</i>	1	6	5
<i>Serinicoccus</i>	1	1	4
<i>Salegentibacter</i>	1	6	6
<i>Propioniferax</i>	1	1	2
<i>Carboxydocella</i>	1	2	0
<i>Synergistes</i>	1	10	4
<i>Dethiosulfatibacter</i>	1	10	0
<i>Leucothrix</i>	1	0	8
<i>Sinorhizobium</i>	1	2	1
<i>Ralstonia</i>	1	2	2
<i>Litorilinea</i>	1	3	0
<i>Verrucomicrobium</i>	0	12	5
<i>Bartonella</i>	0	0	3
<i>Nonlabens</i>	0	4	0
<i>Tumebacillus</i>	0	2	9
<i>Geotoga</i>	0	4	2
<i>Magnetococcus</i>	0	38	12

<i>Acidaminobacter</i>	0	3	0
<i>Nakamurella</i>	0	11	0
<i>Moraxella</i>	0	3	2
<i>Pelobacter</i>	0	6	1
<i>Labrenzia</i>	0	4	2
<i>Saccharophagus</i>	0	8	0
<i>Shewanella</i>	0	7	2
<i>Proteiniborus</i>	0	0	4
<i>Bdellovibrio</i>	0	0	3
<i>Bacteroides</i>	0	2	2
<i>Anaeromyxobacter</i>	0	13	1
<i>Thioclava</i>	0	1	2
<i>Arhodomonas</i>	0	7	0
<i>Lentisphaera</i>	0	4	4
<i>Desulfomicrobium</i>	0	6	6
<i>Halocella</i>	0	0	14
<i>Candidatus scalindua</i>	0	3	0
<i>Kangiella</i>	0	0	32
<i>Marinilabilia</i>	0	1	3
<i>Thiothrix</i>	0	3	0
<i>Dethiosulfovibrio</i>	0	5	0
<i>Thiohalocapsa</i>	0	3	0
<i>Halothiobacillus</i>	0	1	15
<i>Longilinea</i>	0	6	12
<i>Thalassobius</i>	0	2	1
<i>Halorhodospira</i>	0	0	4
<i>Caldithrix</i>	0	3	0
<i>Ruminococcus</i>	0	3	1
<i>Desulfuromonas</i>	0	1	4
<i>Desulforhabdus</i>	0	3	0
<i>Soehngenia</i>	0	21	14
<i>Rhodanobacter</i>	0	13	4
<i>Thermosipho</i>	0	4	0
<i>Candidatusabela</i>	0	1	6

- “Pimers” 27f/338r – Archaea

**Tabela 9.** Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 27f/338r pertencentes ao domínio Archaea quanto ao Filo, e a abundância ao longo do aumento da salinidade.

FILO	Número de reads		
	25 g/L	100 g/L	125 g/L
Thaumarchaeota	6	12	11

**Tabela 10.** Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 27f/338r pertencentes ao domínio Archaea quanto à Classe, e a abundância ao longo do aumento da salinidade.

CLASSE	Número de reads		
	25 g/L	100 g/L	125 g/L
<i>Thaumarchaeota</i>	6	12	11

**Tabela 11.** Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 27f/338r pertencentes ao domínio Archaea quanto ao Gênero, e a abundância ao longo do aumento da salinidade.

GÊNERO	Número de reads		
	25 g/L	100 g/L	125 g/L
<i>Candidatus nitrosoarchaeum</i>	6	12	11

- “Primers” 349f/534r – Bacteria

**Tabela 12.** Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 349f/534r pertencentes ao domínio Bacteria quanto ao Filo, e a abundância ao longo do aumento da salinidade.

FILO	Número de reads		
	25 g/L	100 g/L	125 g/L
Planctomycetes	41244	29211	15198
Firmicutes	13730	1960	4108
Chlamydiae	7905	9944	20258
Proteobacteria	2570	563	604
Verrucomicrobia	317	11299	3665
Cloacimonetes	158	982	1766
Actinobacteria	37	94	50
Bacteroidetes	17	9	4
Acidobacteria	13	13	33
Deinococcus_thermus	9	1	4
Cyanobacteria	1	0	4
Spirochaetes	0	0	3

**Tabela 13.** Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 349f/534r pertencentes ao domínio Bacteria quanto à Classe, e a abundância ao longo do aumento da salinidade.

CLASSE	Número de reads		
	25 g/L	100 g/L	125 g/L
<i>Planctomycetia</i>	41230	29206	15197
<i>Clostridia</i>	13662	1936	4071
<i>Chlamydiia</i>	7905	9944	20258
<i>Betaproteobacteria</i>	2383	317	259
<i>Verrucomicrobiae</i>	317	11299	3665
<i>Cloacimonetes</i>	158	982	1766
<i>Epsilonproteobacteria</i>	133	188	155
<i>Bacilli</i>	68	24	37
<i>Deltaproteobacteria</i>	48	56	190
<i>Actinobacteria</i>	37	94	50
<i>Cytophagia</i>	14	4	0
<i>Phycisphaerae</i>	14	5	1
<i>Holophagae</i>	11	6	29
<i>Deinococci</i>	9	1	4
<i>Gammaproteobacteria</i>	6	2	0
<i>Bacteroidetes</i>	3	5	4
<i>Acidobacteriia</i>	2	7	4
<i>Cyanobacteria</i>	1	0	4
<i>Spirochaetia</i>	0	0	3

**Tabela 14.** Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 349f/534r pertencentes ao domínio Bacteria quanto ao Gênero, e a abundância ao longo do aumento da salinidade.

GÊNERO	Número de reads		
	25 g/L	100 g/L	125 g/L
<i>Pelotomaculum</i>	13633	1922	4070
<i>Planctomyces</i>	10121	12268	4332
<i>Pirellula</i>	7533	7490	2292
<i>Roseimaritima</i>	7505	1521	3020
<i>Rhodopirellula</i>	7275	970	839
<i>Bythopirellula</i>	5690	1292	1269
<i>Candidatus metachlamydia</i>	3477	5901	1796
<i>Blastopirellula</i>	2987	5562	3401
<i>Waddlia</i>	2448	787	808
<i>Nitrosovibrio</i>	2378	285	230
<i>Simkania</i>	1111	1019	765
<i>Neochlamydia</i>	703	2068	16703
<i>Verrucomicrobium</i>	243	11234	3655
<i>Candidatus cloacimonas</i>	158	982	1766
<i>Helicobacter</i>	133	188	155
<i>Roseibacillus</i>	74	65	5
<i>Chlamydia</i>	70	109	96
<i>Rubripirellula</i>	63	28	10
<i>Candidatus fritschea</i>	57	34	20
<i>Oxalophagus</i>	44	9	27
<i>Isosphaera</i>	43	46	24
<i>Nitriliruptor</i>	28	93	47
<i>Moorella</i>	22	5	0
<i>Pasteuria</i>	21	11	10
<i>Parachlamydia</i>	19	11	9
<i>Syntrophus</i>	19	32	150
<i>Cytophaga</i>	14	4	0
<i>Desulfovibrio</i>	14	2	29
<i>Algisphaera</i>	12	4	0
<i>Desulforegula</i>	11	21	9
<i>Holophaga</i>	11	6	29
<i>Chlamydophila</i>	9	0	1
<i>Thermus</i>	9	1	4
<i>Zavarzinella</i>	7	5	6
<i>Thermacetogenium</i>	7	1	0
<i>Candidatus protochlamydia</i>	6	13	50
<i>Candidatus brocadia</i>	6	24	4
<i>Kitasatospora</i>	5	0	1
<i>Candidatus rhabdochlamydia</i>	5	2	10

<i>Undibacterium</i>	5	32	29
<i>Thiothrix</i>	5	0	0
<i>Streptomyces</i>	4	0	0
<i>Bilophila</i>	4	0	0
<i>Anoxybacillus</i>	3	4	0
<i>Rhodothermus</i>	3	5	4
<i>Phycisphaera</i>	2	1	1
<i>Acidobacterium</i>	2	7	4
<i>Nitrosococcus</i>	1	2	0
<i>Prochlorococcus</i>	1	0	4
<i>Ruminococcus</i>	0	2	1
<i>Prostheco bacter</i>	0	0	5
<i>Acetivibrio</i>	0	6	0
<i>Treponema</i>	0	0	3
<i>Geobacter</i>	0	1	2
<i>Conexibacter</i>	0	1	2

- “Primers” 349f/534r – Archaea

**Tabela 15.** Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 349f/534r pertencentes ao domínio Archaea quanto ao Filo, e a abundância ao longo do aumento da salinidade.

FILO	Número de reads		
	25 g/L	100 g/L	125 g/L
Euryarchaeota	31286	49309	53836

**Tabela 16.** Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 349f/534r pertencentes ao domínio Archaea quanto à Classe, e a abundância ao longo do aumento da salinidade.

CLASSE	Número de reads		
	25 g/L	100 g/L	125 g/L
<i>Methanomicrobia</i>	30366	48145	51866
<i>Halobacteria</i>	630	42	318
<i>Methanobacteria</i>	242	1032	1537
<i>Methanococci</i>	44	88	93
<i>Thermococci</i>	4	1	12
<i>Thermoplasmata</i>	0	1	10



**Tabela 17.** Classificação das sequências obtidas pelos “primers” 349f/534r pertencentes ao domínio Archaea quanto ao Gênero, e a abundância ao longo do aumento da salinidade.

<b>GÊNERO</b>	<b>Número de reads</b>		
	<b>25 g/L</b>	<b>100 g/L</b>	<b>125 g/L</b>
<i>Methanosaeta</i>	30310	48010	51710
<i>Halogramum</i>	625	39	315
<i>Methanothermobacter</i>	140	861	1326
<i>Methanobacterium</i>	88	123	169
<i>Methanolinea</i>	45	77	58
<i>Methanococcus</i>	25	67	55
<i>Methanothermococcus</i>	19	21	38
<i>Methanobrevibacter</i>	14	48	38
<i>Methanococcoides</i>	5	29	32
<i>Haladaptatus</i>	5	0	3
<i>Thermococcus</i>	4	1	12
<i>Methanlobus</i>	4	9	34
<i>Methanofollis</i>	1	2	7
<i>Methanoculleus</i>	1	13	10
<i>Thermogymnomonas</i>	0	1	3
<i>Methanocalculus</i>	0	2	1
<i>Halobacterium</i>	0	3	0
<i>Methanosphaera</i>	0	0	4
<i>Methanomassiliicoccus</i>	0	0	7
<i>Methanoplanus</i>	0	0	4
<i>Methanogenium</i>	0	0	4
<i>Methanosarcina</i>	0	3	6

## ANEXO II

Análise dos índices de diversidade de procariotos e das curvas de rarefação para cada par de “primer” utilizado, individualmente:

- Índices de Diversidade

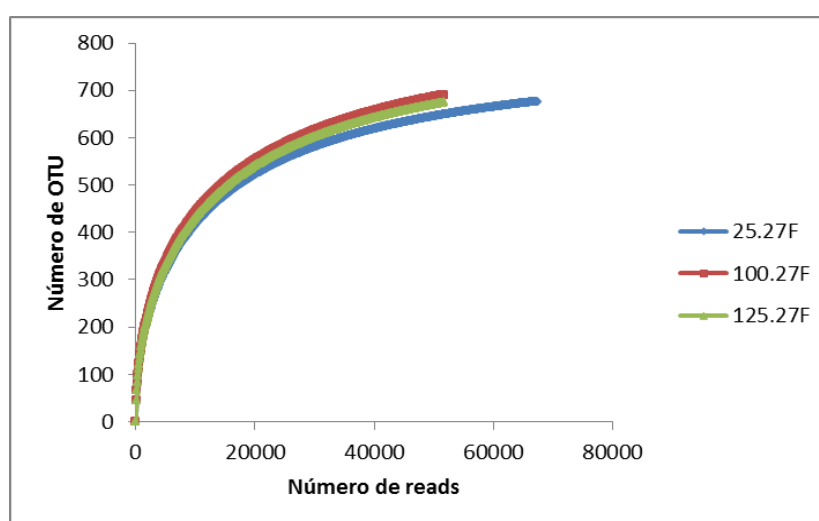
**Tabela 18.** Índices de diversidade microbiana de procariotos nas diferentes concentrações de sal a partir dos resultados obtidos com os “primers” 27f/338r.

Amostra	Total de OTUs	Chao 1	Shannon	Berger-Parker	Cobertura %
25 g/L	677	733	4,14	0,1153	92
100 g/L	703	762	3,95	0,2422	92
125 g/L	675	757	4,09	0,1132	89

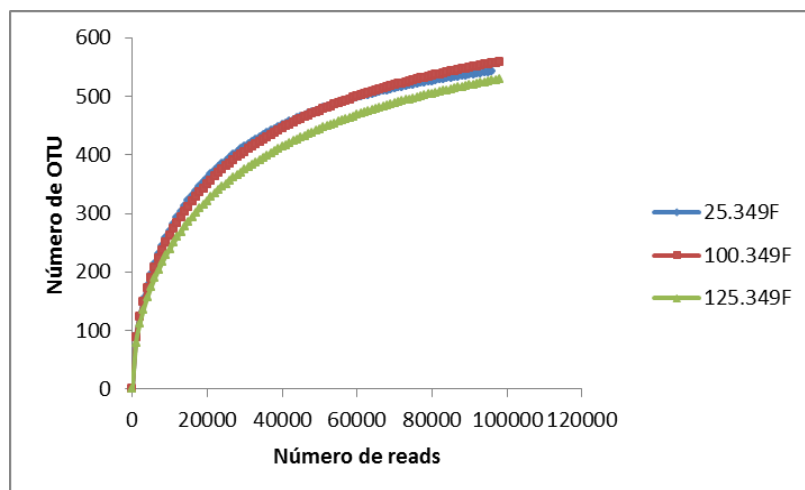
**Tabela 19.** Índices de diversidade microbiana de procariotos nas diferentes concentrações de sal a partir dos resultados obtidos com os “primers” 349f/534r.

Amostra	Total de OTUs	Chao 1	Shannon	Berger-Parker	Cobertura %
25 g/L	543	594	3,13	0,2965	91
100 g/L	564	634	2,74	0,4112	88
125 g/L	531	624	2,41	0,4766	85

- Curvas de Rarefação



**Figura 30.** Curva de rarefação observada para as OTUs de procariotos (bacteria + archaea) (*cutoff* de 3 %) nas diferentes concentrações de sal a partir dos resultados obtidos com os “primers” 27f/338r.



**Figura 31.** Curva de rarefação observada para as OTUs de procariotos (bacteria + archaea) (*cutoff* de 3 %) nas diferentes concentrações de sal a partir dos resultados obtidos com os "primers" 349f/534r.