

LUTECIA RIGUEIRA MEDINA

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE BACTÉRIAS NITRIFICANTES
HETEROTRÓFICAS/DESNITRIFICANTES AERÓBIAS VISANDO A
IDENTIFICAÇÃO DE GENES MARCADORES**

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*.

Orientadora: Cynthia Canêdo da Silva

Coorientador: Tiago Antônio de O. Mendes

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

M491c
2023
Medina, Lutecia Rigueira, 1996-
Caracterização genômica de bactérias nitrificantes heterotróficas/desnitrificantes aeróbias visando a identificação de genes marcadores / Lutecia Rigueira Medina. – Viçosa, MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (91 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Inclui apêndices.

Orientador: Cynthia Canêdo da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.280>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bactérias. 2. Águas residuais - Microbiologia. 3. Águas residuais - Purificação - Tratamento biológico. 4. Biomarcadores. 5. Petróleo - Prospecção. 6. Reação em cadeia de polimerase. I. Silva, Cynthia Canêdo da, 1978-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 579.3


LUTECIA RIGUEIRA MEDINA

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE BACTÉRIAS NITRIFICANTES
HETEROTRÓFICAS/DESNITRIFICANTES AERÓBIAS VISANDO A
IDENTIFICAÇÃO DE GENES MARCADORES**


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*.

APROVADA: 15 de março de 2023

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 LUTECIA RIGUEIRA MEDINA
Data: 29/05/2023 15:57:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Lutecia Rigueira Medina
Autora

Documento assinado digitalmente
 CYNTHIA CANEDO DA SILVA
Data: 29/05/2023 17:39:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Cynthia Canêdo da Silva
Orientadora

Dedico esta dissertação primeiramente a Deus, aos meus familiares e amigos.

Sem vocês não teria chegado até aqui!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar presente em meu coração iluminando todos os meus passos.

Aos meus santos protetores: Santo Expedito, São Judas e Nossa senhora Desatadora dos Nós.

Aos meus pais, Maria Aparecida e Beijamim que sempre apoiaram as minhas decisões, sendo sempre meu porto seguro. Gratidão por terem me ensinado a ser uma pessoa do bem e com um coração enorme. A minha força vem de vocês.

A minha irmã, Letícia, que é a minha segunda mãe, a qual sempre cuidou de mim, me amparou e esteve presente nos melhores e piores momentos da minha vida, e trouxe ao mundo a minha sobrinha Isabella enchendo ainda mais minha vida de felicidade, fazendo com que eu queira ser sempre uma pessoa melhor, por ela.

Ao meu cunhado Alex, que mesmo distante fisicamente sempre está presente na realização do meu trabalho.

A minha prima, Thaís, que sempre esteve comigo na minha caminhada, compartilhando bons e ruins momentos.

Ao Uédson que vem me mostrando o quanto a vida é leve e tranquila, obrigada por sempre me fazer lembrar de como sou capaz de realizar os meus sonhos.

A Andreia, por ter trilhado essa caminhada junto comigo, mesmo a distância. Sabemos como a nossa amizade é importante e verdadeira.

Aos meus amigos, que sempre procuram um jeito de estarem presentes na minha trajetória me apoiando e incentivando.

A minha orientadora Cynthia, que confiou no meu potencial e sempre esteve presente na minha trajetória, no qual vem sempre me apoiando e incentivando a buscar os meus sonhos, deixando assim todo medo pra trás.

A minha coorientadora Lívia, que esteve sempre me auxiliando em cada etapa do trabalho mesmo distante fisicamente e por sempre se preocupar comigo.

Ao Alex, que é um excelente técnico e que me amparou em diversos desafios que tive durante a realização do trabalho.

Aos meus amigos do laboratório, em especial Amanda, Bianca, Paulo, Nicolly, Paula, Helena, Alan, Wiane, Jessica, John e Karen por transformarmos o LAMAP em uma família, os dias com vocês são mais tranquilos. Bora tomar um café?

A Larissa, que me acolheu no laboratório me ensinando tudo, com amor e dedicação.

A Jildete, por ter me apresentado e ensinado muito sobre a área acadêmica, mostrando com amor a área da microbiologia.

Aos membros da banca, por aceitarem e terem disponibilidade e contribuir com o trabalho.

A Petrobras, pelo suporte financeiro e parceria no decorrer do projeto.

A Universidade Federal de Viçosa, por ter auxiliado em todo meu desenvolvimento profissional.

A toda equipe do programa de Microbiologia Agrícola Ambiental, como os professores, técnicos e secretária. Toda minha eterna gratidão por sempre estarem pendentes das demandas que foram surgindo e pelos ensinamentos durante esses anos.

A FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos

A todos vocês a minha eterna gratidão

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Tereza de Calcuta

RESUMO

MEDINA, Lutecia Rigueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2023. **Caracterização Genômica de bactérias Nitrificantes Heterotróficas/Desnitrificantes aeróbias visando a identificação de genes marcadores.** Orientadora: Cynthia Canedo da Silva. Coorientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

A extração do petróleo gera grande volume de água como subproduto, denominada água de produção (AP). O descarte da AP pode acarretar inúmeros efeitos negativos ao meio ambiente, devido principalmente à alta concentração de nitrogênio amoniacal, e, portanto, a AP deve ser tratada antes de ser descartada. A remoção biológica da amônia pode ocorrer por diferentes vias, entretanto, a nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia (NH/DA) se destaca, pois, um único microrganismo heterotrófico nitrifica e desnitrifica em condições aeróbias. Este, por sua vez, está se mostrando mais eficiente na remoção biológica de amônia de efluentes salinos, provenientes da exploração de petróleo na camada do pré-sal. Entretanto, pouco se sabe sobre este tipo de metabolismo e várias questões ainda precisam ser respondidas para melhor entendimento do processo. Desta forma, este estudo teve como objetivo a caracterização dos genomas de quatro linhagens bacterianas NH/DA: *Pseudomonas stutzeri* UFV5; *Rhodococcus ruber* UFV2; *Pseudomonas balearica* UFV3 e *Gordonia amicalis* UFV4, que foram submetidos à genômica comparativa para a identificação de genes envolvidos em vias metabólicas de nitrificação heterotrófica e desnitrificação aeróbia, seguido da síntese de *primers* para genes selecionados e validação dos mesmos por PCR convencional. Os resultados obtidos mostraram que as linhagens estudadas são bem distintas, exceto no caso das linhagens que pertencem ao gênero de *Pseudomonas*. A linhagem *Rhodococcus ruber* UFV2 foi a que apresentou um maior genoma e maior conteúdo GC (guanina e citosina), enquanto *Pseudomonas stutzeri* UFV5 apresentou o menor genoma (4.559.141 pb) e menor conteúdo GC (64%) em relação as demais linhagens. As linhagens que pertencem ao gênero *Pseudomonas* foram que apresentaram maior número de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio (60 genes). Nessas linhagens NH/DA não foram encontrados genes ligados ao processo de nitrificação autotrófica. A via metabólica do processo de NH/DA não é uma via comum para diferentes grupos microbianos, porém podem compartilhar genes envolvidos no

processo NH/DA que podem estar presentes nas demais linhagens. Os genes candidatos a participarem do processo NH/DA são: genes que codificam proteínas ribossomais que estão envolvidas no processo de tradução proteica, gene que codifica a proteína glutamina sintetase que converte amônia em glutamina, gene que codifica a proteína aminometiltransferase que catalisa a amônia para a porção aminometil da glicina, e gene que codifica uma proteína sem uma função definida. Os resultados obtidos bem como a validação do envolvimento desses genes na NH/DA possibilitarão além do conhecimento da via metabólica, a identificação de outros microrganismos que ainda não foram descritos pela literatura como NH/DA. O monitoramento desses microrganismos em amostras ambientais como reatores de tratamento de efluentes pode possibilitar a otimização do processo de remoção de amônia. Esta é uma linha de pesquisa que possui muitas etapas a serem desenvolvidas onde os resultados podem corroborar para inúmeros benefícios nos tratamentos biológicos em águas residuais para remoção de nitrogênio amoniacal.

Palavras-chave: Água de produção. Exploração de petróleo. Biomarcadores. PCR.

ABSTRACT

MEDINA, Lutecia Rigueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2023. **Genomic characterization of Heterotrophic Nitrifying/Aerobic Denitrifying bacteria aiming the identification of marker genes.** Advisor: Cynthia Canedo da Silva. Co-advisor: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Oil extraction generates a large volume of water as a by-product, called production water (PA). The disposal of PA can cause numerous negative effects to the environment, mainly due to the high concentration of ammoniacal nitrogen, and, therefore, the PA must be treated before being discarded. The biological removal of ammonia can occur through different ways, however, heterotrophic nitrification/aerobic denitrification (NH/DA) stands out, since a single heterotrophic microorganism nitrifies and denitrifies under aerobic conditions. This, in turn, is proving to be more efficient in the biological removal of ammonia from saline effluents from oil exploration in the pre-salt layer. However, little is known about this type of metabolism and several questions still need to be answered for a better understanding of the process. Thus, this study aimed to characterize the genomes of four NH/DA bacterial strains: *Pseudomonas stutzeri* UFV5; *Rhodococcus ruber* UFV2; *Pseudomonas balearica* UFV3 and *Gordonia amicalis* UFV4, which were submitted to comparative genomics to identify genes involved in metabolic pathways of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification, followed by the synthesis of primers for selected genes and their validation by conventional PCR. The obtained results showed that the studied lineages are very distinct, except in the case of the lineages that belong to the *Pseudomonas* genus. The *Rhodococcus ruber* UFV2 strain had the largest genome and the highest GC content (guanine and cytosine), while *Pseudomonas stutzeri* UFV5 had the smallest genome (4,559,141 bp) and the lowest GC content (64%) compared to the other strains. The strains belonging to the genus *Pseudomonas* showed the highest number of genes involved in nitrogen metabolism (60 genes). In these NH/DA strains, no genes linked to the autotrophic nitrification process were found. The metabolic pathway of the NH/DA process is not a common pathway for different microbial groups, but they may share genes involved in the NH/DA process that may be present in other strains. Candidate genes to participate in the NH/DA process are: genes that encode ribosomal proteins that are involved in the protein translation process, gene that encodes the glutamine synthetase protein that converts ammonia into glutamine, gene

that encodes the aminomethyltransferase protein that catalyzes ammonia to the aminomethyl portion of glycine, and a gene that encodes a protein without a defined function. The results obtained as well as the validation of the involvement of these genes in NH/AD will allow, in addition to the knowledge of the metabolic pathway, the identification of other microorganisms that have not yet been described in the literature as NH/AD. Monitoring these microorganisms in environmental samples such as effluent treatment reactors can enable the optimization of the ammonia removal process. This is a line of research that has many stages to be developed where the results can corroborate for innumerable benefits in biological treatments in wastewater for the removal of ammoniacal nitrogen.

Keywords: Production water. Oil exploration. Biomarkers. PCR.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
CAPÍTULO 1	15
REVISÃO DE LITERATURA	15
1. ÁGUA DE PRODUÇÃO.....	15
2. REMOÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO	17
2.2.1. Processo ANAMMOX (ANAEROBIC AMMONIUM OXIDATION)	17
2.2.2. Nitrificação Autotrófica e Desnitrificação Anaeróbica.....	18
2.2.3. Nitrificação Heterotrófica e Desnitrificação Aeróbia	19
2.2.4. Enzimas e rotas metabólicas propostas para o processo NH/DA.....	21
2.3. Linhagens Bacterianas Nitrificantes Heterotróficas e Desnitrificantes Aeróbicos	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
CAPÍTULO 2	33
CARACTERIZAÇÃO DE GENOMAS DAS LINHAGENS BACTERIANAS NITRIFICANTES HETEROTRÓFICAS E DESNITRIFICANTES AERÓBICAS	33
1. INTRODUÇÃO	34
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
2.1. Descrição das linhagens bacterianas nitrificantes heterotróficas e desnitrificantes aeróbicas.....	35
2.2. Trimagem das <i>reads</i>	36
2.3. Montagem dos Genomas	36
2.4. Anotação dos genes e depósito das sequências das linhagens nitrificantes heterotróficas/Desnitrificantes aeróbicas	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
3.1. Caracterização do genoma das linhagens nitrificantes heterotróficas/desnitrificantes aeróbicas	38
4. CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
CAPÍTULO 3	56
IDENTIFICAÇÃO DE GENES MARCADORES PARA O PROCESSO DE NITRIFICAÇÃO HETEROTRÓFICA/DESNITRIFICAÇÃO AERÓBICA EM GENOMAS BACTERIANOS	56
RESUMO.....	57
1. INTRODUÇÃO	58
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	59

2.1. Genômica comparativa de linhagens NH/DA e genes diferentemente expressos.....	59
2.2. Confirmação dos genes-chave <i>in-silico</i>	62
2.3. Validação <i>in-vivo</i>	62
2.3.1. Desenho dos <i>Primers</i>	62
2.3.1. Reativação das linhagens bacterianas NH/DA	63
2.3.2. Extração do DNA total das linhagens NH/DA	64
2.3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	64
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
3.1. Genômica Comparativa.....	65
3.2 Validação dos primers para os candidatos a biomarcadores	70
3.3 Validação por PCR.....	72
4. CONCLUSÕES	74
CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	86

INTRODUÇÃO GERAL

Durante a extração e processamento do petróleo um grande volume de água é gerado como subproduto, denominado água de produção. A composição da água de produção é bastante complexa, contendo além de compostos carbonáceos, íons em solução com concentrações variadas, como o cloreto, sódio, cálcio, magnésio, sulfeto, amônia, além de compostos químicos utilizados durante a extração. Portanto, despejos dessas águas podem ser prejudiciais ao meio ambiente, devido principalmente as altas concentrações de nitrogênio, podendo levar a depleção de oxigênio e eutrofização no meio aquático, afetando negativamente a qualidade da água. Dessa forma, esse efluente antes de ser despejado no corpo receptor, ou até mesmo reutilizado no processo de extração do óleo, deve ser tratado para se enquadrar dentro dos valores exigidos pela legislação do CONAMA 430/2011.

Entre os diversos tipos de tratamentos de efluentes, o biológico se destaca principalmente por sua alta eficiência e simplicidade no processo, quando comparados a métodos físico-químicos existentes. A remoção biológica de amônia ocorre por diferentes formas, e com a ação de diferentes grupos de microrganismos: Na nitrificação autotrófica, ocorre a oxidação da amônia a nitrito, por bactérias ou arqueias, que em seguida é oxidado a nitrato, ambas etapas em aerobiose. Na desnitrificação, o nitrato é reduzido a nitrogênio gasoso, por bactérias heterotróficas em anaerobiose. A nitrificação autotrófica seguida da desnitrificação anaeróbia são processos convencionais muito bem conhecidos e elucidados.

Entretanto um outro processo se destaca nas estações de tratamento de efluentes, denominado nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia, onde um único microrganismo heterotrófico nitrifica e desnitrifica em condições aeróbicas. Este por sua vez está se mostrando mais eficiente na remoção biológica de amônia, quando comparado ao processo convencional, visto que estes microrganismos são mais resistentes a altas salinidades e utilizam a matéria orgânica como fonte de carbono. Porém, pouco se sabe sobre este tipo de metabolismo e várias questões ainda precisam ser respondidas para melhor entendimento das vias envolvidas no processo de remoção, visando o monitoramento, otimização e modulação dos microrganismos

nitrificantes heterotróficos e desnitrificantes aeróbios (NH/DA) nas estações de tratamento de efluentes.

Portanto, visto a necessidade de obter informações mais aprofundadas sobre a NH/DA, o objetivo deste projeto foi caracterizar o genoma de 4 linhagens NH/DA, *Pseudomonas stutzeri* UFV5; *Rhodococcus ruber* UFV2; *Pseudomonas balearica* UFV3 e *Gordonia amicalis* UFV4 e investigar, por genômica comparativa, genes envolvidos neste processo, a fim de encontrar biomarcadores moleculares para esses microrganismos, possibilitando a identificação de outros microrganismos que ainda não foram descritos como NH/DA, bem como o monitoramento e otimização da remoção biológica de amônia nas estações de tratamento de efluentes.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. ÁGUA DE PRODUÇÃO

Assim como outros países, o Brasil depende do petróleo como fonte primária de energia (SALMAN; ABBAR, 2023), e as indústrias petrolíferas vem se destacando devido à grandes avanços na exploração do petróleo, sendo uma das atividades industriais mais importante do século XXI (OLIVEIRA; SANTELLI; CASSELLA, 2005). De acordo com o Plano Decenal de Expansão de Energia (2022), podemos acompanhar o aumento na exploração de campos petrolíferos comparando o ano de 2012 a 2022, no qual a produção de petróleo passou de 2,1 para 5,5 milhões de barris por dia (BRASIL, 2022).

Durante o processo de extração do petróleo e gás natural, uma etapa de perfuração é necessária, onde um amplo volume de água é injetado e é extraído simultaneamente com o petróleo (THOMAS, 2004). Essa água é conhecida como água de produção, a qual é trazida juntamente com o petróleo para a superfície (PATIN, 2000). A água de produção é um conjunto formado de água de formação do reservatório de petróleo, encontrada naturalmente na natureza, juntamente com a água de injeção, que é inserida durante o processo para controlar a pressão hidrostática nos poços durante a extração do petróleo e por fim alguns produtos químicos que são adicionados durante o processo de extração (AMINI et al., 2012; PATIN, 2000). Porém, à medida que os poços petrolíferos vão envelhecendo, a água de produção tende a aumentar seu volume durante a extração, podendo chegar a 10 vezes mais que o próprio petróleo extraído (FAKHURU et al., 2009; STEPHENSON, 1992).

De um modo geral, a água de produção tem uma composição bem complexa, sendo composta por compostos orgânicos e inorgânicos, incluindo principalmente elevados teores de NaCl (Cloro de sódio), óleo dissolvido, hidrocarbonetos, metais pesados, sólidos suspensos, íons em solução e materiais radioativos de difícil degradação. Além desses compostos, também são encontrados resíduos de produtos

químicos utilizados durante a extração (STEPHENSON, 1992; DANFORTH et al., 2020). Entretanto as propriedades físicas dos reservatórios podem mudar de acordo com a localidade geológica e a idade do mesmo, (TELLEZ; NIRMALAKHANDAN; GARDEA-TORRESDEY, 2002)

Devido a essa grande complexidade, a água de produção não pode ser simplesmente descartada ou reutilizada, uma vez que a presença de altas concentrações de amônia pode acarretar em inúmeros prejuízos ao meio ambiente e a vida aquática, como a eutrofização dos meio e morte de diversos organismos (KLEMZ et al., 2021). Portanto, a partir da resolução CONAMA 430/2011, ficou estabelecido que o descarte ou até mesmo a reutilização desses efluentes só pode acontecer quando as concentrações de amônia estiverem em níveis abaixo de 20 mgL⁻¹. Trabalhos descritos na literatura mostraram que as concentrações de nitrogênio amoniacal encontradas na água de produção nas indústrias petrolíferas podem variar de 22 a 800 mgL⁻¹, com média de 85,4 mgL⁻¹, valores esses acima dos permitidos pelo CONAMA (GABARDO, 2007; LIMA; WILDHAGEM; CUNHA, 2008). Portanto, essa água de produção antes de ser descartada ou reutilizada precisa ser devidamente tratada, pois seu descarte no ambiente é altamente tóxico a vida aquática (KLEMZ et al., 2021).

Além da presença de amônia, outro fator preocupante relacionado à água de produção são as altas concentrações salinas desses efluentes. Depois do início da exploração do petróleo na camada de pré-sal essa preocupação aumentou ainda mais, pois trata-se de acúmulo de petróleo em um conjunto de rochas, localizado em águas ultra profundas abaixo de uma extensa camada de sal, e a extração desse óleo gera como subproduto a água de produção com concentrações de salinidades mais altas, podendo variar de 15 a 300 g.L⁻¹. Diversos trabalhos já relataram que essas altas salinidades podem afetar negativamente o processo de remoção biológica de amônia, alterando significativamente a composição da microbiota (LEMA et al., 2002; QUARTAROLI et al., 2017; SILVA et al., 2018), podendo afetar o metabolismo dos microrganismos levando-os a plasmólise (LU et al., 2009).

Entre as tecnologias de tratamentos utilizadas para a remoção de amônia, o tratamento biológico se destaca, devido ao seu baixo custo, sendo assim o mais

utilizado entre as indústrias resultando em alta eficiência na remoção do carbono e do nitrogênio amoniacal (FREIRE et al., 2000; MOTTA et al., 2003; DA LUZ et al., 2018;).

2. REMOÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

No ambiente aquático o nitrogênio pode ser identificado de diversas formas, como amônia, íon amônio, nitrito, nitrato, algumas formas orgânicas (ureia, ureídeos e alguns aminoácidos) (SILVA et al., 2019). A amônia é uma importante fonte de nitrogênio para os seres vivos. Entretanto, elevadas concentrações podem acarretar graves problemas ambientais, como a eutrofização no ecossistema marinho (REINBOLD; PESCELLI, 1982).

O nitrogênio amoniacal pode estar presente nas formas de amônia livre (NH_3) ou ionizada (NH_4^+), dependendo da temperatura e do pH do ambiente inserido. Ambientes com pH ácido a um aumento da concentração de H^+ , sendo então encontrado como íon amônio. Já em ambientes com pH acima de 11, a amônia se encontra na forma gasosa, no qual é extremamente tóxica à vida aquática (METCAF; EDDY, 2007).

O tratamento biológico de remoção de amônia em águas residuais é o mais eficiente, no qual pode acontecer por diferentes processos, envolvendo diferentes vias metabólicas e grupos de microrganismos (OLIVEIRA et al., 2012). Esses processos serão descritos nos tópicos seguintes.

2.2.1. Processo ANAMMOX (ANAEROBIC AMMONIUM OXIDATION)

O processo ANAMMOX foi descoberto na década de 1990, a partir de lodo biológico de água de produção nas estações de tratamento (KUENEN, 2008). Nesse processo ocorre a oxidação da amônia a nitrogênio gasoso, utilizando como aceptor final de elétrons o nitrito em condições de anaerobiose (YANG et al., 2023).

O processo ANAMMOX é realizado por bactérias autotróficas, sendo uma via quimioautotrófica (STROUS et al., 1997). Porém, substâncias orgânicas, presença de oxigênio dissolvido e altas salinidades causam a inibição do processo ANAMMOX (JETTEN et al., 1998).

2.2.2. Nitrificação Autotrófica e Desnitrificação Anaeróbica

A nitrificação autotrófica é realizada por diferentes tipos de bactérias e arqueias, em condições de aerobiose (FERREIRA, 2000; LIMPIYAKORN et al., 2013). Esses microrganismos envolvidos na via de nitrificação são considerados autotróficos, pois utilizam o CO₂ como fonte de carbono e possuem a característica de terem um crescimento lento, refletindo em um maior tempo para remoção de amônia nas estações de tratamento de efluentes (LIMPIYAKORN et al., 2013; VAN HAANDEL E MARAIS, 1999).

Trata-se de microrganismos quimiolitotróficos, no qual oxidam formas reduzidas de nitrogênio inorgânico, que atuam como doador de elétrons e como acceptor final na cadeia de transporte de elétrons utiliza o oxigênio (METCAF; EDDY, 2007). No processo de nitrificação acontece a oxidação da amônia a nitrito, que posteriormente é oxidado a nitrato. Essas duas etapas da nitrificação acontecem por diferentes bactérias e archaeas autotróficas em condições de aerobiose. Na primeira etapa da nitrificação o amônio é oxidado e transformado em nitrito pelas bactérias dos gêneros *Nitrosococcus*, *Nitrosospira* e *Nitrosomonas* e espécies de arqueias do filo Thaumarchaeota (UEMOTO; SAIKI, 1996; LIMPIYAKORN et al., 2013). Já a oxidação de nitrito a nitrato é realizada por bactérias dos gêneros *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrospina* e *Nitrococcus* (VANPARYS; BODELIER; DE VOS, 2006).

O nitrato que é produzido na nitrificação é utilizado como substrato para outros grupos de microrganismos no processo de desnitrificação. Nesse processo, diferentemente do processo de nitrificação, não há presença de oxigênio, ocorrendo em condições de anaerobiose, sendo realizado por bactérias heterotróficas (VAZOLLER et al., 2001). Na desnitrificação o nitrato é reduzido a nitrito, nitrito é reduzido a óxido nítrico, óxido nítrico é reduzido a óxido nitroso, que finalmente é reduzido a nitrogênio gasoso (WUNDERLIN et al., 2012). A desnitrificação ocorre pela ação de diversos gêneros de bactérias como: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Hiphomicrobium*, *Chromobacterium*, *Halobacterium*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Paracoccus*, *Azospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Thiobacillus*, *Vibrio*, *Xanthomonas* e *Klebsiella* (RITTMANN; LANGELAND, 1985).

Neste trabalho, iremos nos referir a estas vias como processo convencional de remoção biológica de amônia.

Tabela 1. Reações e grupos microbianos envolvidos nas diferentes etapas dos processos de nitrificação autotrófica e desnitrificação anaeróbia

Etapas	Fórmulas	Microrganismos
Nitrificação	$\text{NH}_4^+ + (3/2)\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + 2\text{H}^+$	<i>Nitrosococcus, Nitrospira e Nitrosomonas</i>
Nitratação	$\text{NO}_2^- + (1/2)\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$	<i>Nitrobacter, Nitrospira, Nitrospina e Nitrococcus</i>
Reação Global	$\text{NH}_4^+ + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	
Desnitrificação	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$	<i>Pseudomonas, Achromobacter, Alcaligenes, Bacillus, Micrococcus, Proteus, Hiphomicrobium, Chromobacterium, Halobacterium, Moraxella, Neisseria, Paracoccus</i>

2.2.3. Nitrificação Heterotrófica e Desnitrificação Aeróbia

A Nitrificação Heterotrófica/Desnitrificação Aeróbia (NH/DA) foi identificada pela primeira vez na década de 80, sendo um processo de remoção biológica de amônia, no qual um único microrganismo heterotrófico é capaz de converter amônia em nitrogênio gasoso em condições de aerobiose. Por se tratar de microrganismos heterotróficos, além da remoção da amônia ocorre também a remoção da matéria orgânica do efluente (ROBERTSOW et al., 1989).

Comparado ao processo convencional (nitrificação autotrófica e desnitrificação anaeróbia), a NH/DA apresenta diversas vantagens, pois o processo convencional ocorre em de aerobiose e anaerobiose, ocorrendo por meio de dois processos independentes e sequenciais, diferentemente do processo NH/DA que ocorre em uma única condição, de aerobiose, resultando assim em uma grande economia de espaço e simplificação do processo nas estações de tratamento (ZHAO et al., 2017). Outra vantagem é que por serem microrganismos heterotróficos utilizam a matéria orgânica como fonte de carbono e o crescimento é mais rápido comparado com os microrganismos nitrificantes autotróficos, refletindo diretamente no aumento da eficiência da remoção de amônia (SILVA, 2018). Além disso, na NH/DA não é

necessário a adição de alcalinizantes, pois a alcalinidade produzida pelo processo de desnitrificação é capaz de corrigir a acidificação causada pela nitrificação (MARAZIOTI; KORNAROS; LYBERATOS, 2003). Uma das grandes vantagens das bactérias que realizam o processo de NH/DA é sua resistência a altas salinidades, sendo mais eficientes no tratamento biológico de efluentes salinos comparadas com as bactérias envolvidas no processo convencional (QUARTAROLI et al., 2019). Trabalhos recentes mostram que as bactérias NH/DA são resistentes a diversas condições até mesmo a alguns antibióticos (WANG et al., 2020).

Por esses motivos, o processo NH/DA tem se destacando nos últimos anos, onde diversos estudos vêm sendo desenvolvidos para melhor compreender o processo (VANPARYS; BODELIER; DE VOS, 2006; ZHANG et al., 2012; CHEN et al., 2012; HUANG et al., 2020; PADHI et al., 2013; SHU et al., 2022; TRAN et al., 2022). Em função disso, várias espécies tem sido descritas como capazes de realizar o NH/DA, tais como: *Paracoccus denitrificans* (ROBERTSOW; KUENEN, 1983), *Alcaligenes faecalis* (JOO; HIRAI; SHODA, 2005), *Providencia rettgeri* (ZHAO et al., 2010), *Pseudomonas stutzeri* (ZHANG et al., 2011), *Agrobacterium sp. LAD9*, *Achromobacter sp. GAD3* e *Comamonas sp. GAD4* (PHILIPPOT et al., 2011), *Bacillus* spp. (ZHANG et al., 2012), *Rhodococcus* sp. (CHEN et al., 2012), *Halomonas campisalis* (GUO et al., 2013), *Chryseobacterium* sp. R31 (KUNDU et al., 2014), *Cupriavidus* sp. (SUN et al., 2016), *Zobellella taiwanenses* (LEI et al., 2016), *Serratia Marcescens* (HUANG et al., 2017), *Paracoccus versutus* (ZHANG et al., 2018), *Arthrobacter nicotianae* (CAI et al., 2019), *Acinetobacter* sp. (CHEN et al., 2012) *Pseudomonas mendocina* (HE et al., 2019), *Pseudomonas putida* (YANG et al., 2019), *Photobacterium* sp. (LIU et al., 2019), *Gordonia amicalis* UFV4 (SILVA et al., 2019), *Pseudomonas balearica* UFV3 (SILVA et al., 2019), *Pseudomonas stutzeri* UFV5 (SILVA et al., 2019; ZHANG et al., 2011) e *Sphingopyxis* sp (CHEN et al., 2022).

Todavia, pouco se sabe sobre os microrganismos que são capazes de realizar a NH/DA e as enzimas envolvidas nesse processo. O conhecimento acerca das bactérias que realizam NH/DA e suas rotas metabólicas se faz importante para um melhor entendimento do processo.

2.2.4. Enzimas e rotas metabólicas propostas para o processo NH/DA

Diferentemente do processo convencional, que está bem claro e descrito na literatura, o processo NH/DA ainda não está elucidado, pois pouco se sabe sobre o metabolismo e as enzimas que estão envolvidas neste processo. Devido a importância da NH/DA para a remoção de amônia, principalmente nas estações de tratamento de efluentes salinos, entender o metabolismo desses microrganismos é essencial para monitoramento do processo. Estudos que objetivam elucidar essa rota se baseiam nos conhecimentos já descritos dos processos convencionais, que envolvem três enzimas na etapa de nitrificação: AmoA - amônia monooxigenase, que atua na oxidação da amônia a hidroxilamina; a enzima - Hao - hidroxilamina óxido redutase, que atua na oxidação da hidroxilamina a nitrito; e Nar - nitrito óxido redutase, que atua na oxidação de nitrito a nitrato (HUANG et al., 2013; LIU et al., 2019). Porém, um estudo recente, realizado por nosso grupo mostrou que as enzimas envolvidas na nitrificação autotrófica não estão envolvidas no processo de NH/DA (SILVA et al., 2020).

No entanto, no processo de desnitrificação anaeróbia, algumas enzimas envolvidas neste processo também foram encontradas em microrganismos NH/DA. Na desnitrificação anaeróbia ocorrem várias reações para que o nitrato seja reduzido a nitrogênio gasoso. A primeira reação, onde o nitrato é reduzido a nitrito, é realizada pelo gene *nap*, que codifica a enzima nitrato redutase periplasmática, sendo codificada pelo operon *napFDAGHBC*, onde NapA é a unidade catalítica desta enzima, NapAB é a unidade funcional e NapC, responsável pela transferência de elétrons da quinona para NapAB. Estes genes, responsáveis pela redução de nitrato a nitrito foram encontrados em isolados que realizam NH/DA (OGUZ et al., 2007). Na segunda reação, a enzima nitrito redutase realiza a redução de nitrito para óxido nítrico, onde dois genes (*nirK* e *nirS*), que ficam enzimas localizadas no periplasma de bactérias gram-negativas, ou na membrana celular das bactérias gram-positivas, podem catalisar essa reação (JI; WANG; YANG, 2014). Tais genes já foram encontrados em bactérias NH/DA. Outro gene também identificados em microrganismos NH/DA foi o *nor*, que codifica a enzima óxido nítrico redutase, responsável pela redução do óxido nítrico para óxido nitroso (JI; WANG; YANG, 2014). E na última reação, o gene *nos*, que codifica enzima periplasmática óxido nitroso

reductase, responsável pela redução do óxido nitroso para nitrogênio gasoso, também já foi identificado no processo de NH/DA (KRAFT; STROUS; TEGETMEYER, 2011).

De acordo com estes estudos, observamos que não é possível identificar os genes envolvidos no processo de NH/DA tendo como base as enzimas envolvidas no processo convencional (SILVA et al., 2020). De acordo com o trabalho de Silva e colaboradores (2018; 2020), os genes envolvidos no processo de nitrificação autotrófica não foram encontrados em isolados que realizam NH/DA. Com isso foi sugerido que os processos metabólicos da NH/DA envolvessem enzimas distintas daquelas encontradas no processo convencional de remoção de amônia. Essa ideia foi corroborada por Silva e colaboradores (2020), visto que nenhum gene envolvido na nitrificação e desnitrificação convencionais tiveram sua expressão diferenciada na análise feita do transcriptoma do isolado *P. stutzeri* UFV5 em condições de indução da via de NH/DA. Além disso, vários genes com função desconhecida foram identificados, indicando um mecanismo não convencional envolvido neste processo.

Devido a importância da NH/DA e a falta de informações sobre o metabolismo dos microrganismos envolvidos no processo, estudos aprofundados são necessários para preencher essas lacunas, visando a elucidação do processo, identificação dos genes envolvidos, e com isso encontrar marcadores moleculares para os microrganismos envolvidos nessa via, a fim de monitorar e otimizar o processo de remoção biológica de nitrogênio na estações de tratamento, bem como identificar novos microrganismos capazes de realizar a NH/DA.

2.3. Linhagens Bacterianas Nitrificantes Heterotróficas e Desnitrificantes Aeróbicas

As bactérias NH/DA removem amônia pelo processo de nitrificação heterotrófica juntamente com desnitrificação em condições aeróbicas. Além de serem bactérias nitrificantes, são heterotróficas, que utilizam a matéria orgânica como fonte de carbono, tendo crescimento rápido comparado com os microrganismos nitrificantes autotróficos, refletindo diretamente no aumento da eficiência da remoção biológica de amônia (SILVA, 2018).

Este estudo é continuação do trabalhos desenvolvido em nosso laboratório, onde quatro bactérias NH/DA provenientes de amostra de lodo nitrificante do sistema de tratamento de lodos ativados do Terminal Marítimo de exploração de petróleo, foram identificadas taxonomicamente com 100 % de identidade como: *Pseudomonas stutzeri* UFV5 (número de acesso KY616652.1), *Pseudomonas balearica* UFV3 (número de acesso KX495190.2), *Rhodococcus ruber* UFV (número de acesso CP024890.1), *Gordonia amicalis* UFV4 (número de acesso KU904410.1)(Silva (2019),

As linhagens *Pseudomonas balearica* UFV3 e *Gordonia amicalis* UFV4 foram descritas como NH/DA pela primeira vez pelo nosso grupo de estudo em SILVA et al. (2018). *Pseudomonas stutzeri* foi descrita pela primeira vez como NH/DA por ZHANG (2011), e *Rhodococcus ruber* descrita como bactérias NH/DA por CHEN (2012). O trabalho de Silva (2019) mostrou que as quatro linhagens apresentaram ótimos resultados na eficiência na remoção de amônia com alto potencial para aplicação nas estações de tratamento de efluentes.

No trabalho de Silva e colaboradores (2020) foi estudado o transcriptoma da linhagem *P. stutzeri* UFV5 em condições de indução da via de NH/DA, que indicou que nenhum gene conhecidamente envolvido nos processos de nitrificação autotrófica e desnitrificação anaeróbica foram diferencialmente expressos, podendo assim indicar que esses genes não participam da via NH/DA. Todavia, houve um aumento na expressão de genes que codificam proteínas relacionadas com reações de oxirredução e em proteínas envolvidas no processo de tradução proteica, os quais podem estar envolvidas no processo de NH/DA. Portanto estudos subsequentes de caracterização dos genomas das quatro linhagens NH/DA foram necessários para validar se os genes diferencialmente expressos em *P. stutzeri* UFV5 (Silva et al., 2020) estão envolvidos com o processo de NH/DA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, Y. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1709–1721, 2006.

AMINI, S. et al. Chemical Engineering Research and Design Mathematical modelling of a hydrocyclone for the down-hole oil – water separation (DOWS). **Chemical Engineering Research and Design**, v. 90, n. 12, p. 2186–2195, 2012.

AZIZ, R. K. et al. The RAST Server : Rapid Annotations using Subsystems Technology. v. 15, p. 1–15, 2008.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Genome analysis Trimmomatic : a flexible trimmer for Illumina sequence data. v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BRASIL, M. DE M. E E. **Plano decenal de expansão de energia 2022**. [s.l: s.n.].

BURPO, F. J. A critical review of PCR primer design algorithms and cross-hybridization case study. **Biochemistry**, n. January 2001, 2001.

CAI, X. et al. Characteristics of Heterotrophic Nitrifying and Aerobic Denitrifying *Arthrobacter nicotianae* D51. **Water**, v. 11, p. 434, 2019.

CHEN, P. et al. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus* sp. CPZ24. **Bioresource Technology**, v. 116, n. April 2008, p. 266–270, 2012.

CHEN, P. et al. Characterization of a novel salt-tolerant strain *Sphingopyxis* sp. CY-10 capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. **Bioresource Technology**, v. 358, n. May, p. 127353, 2022.

DA LUZ, C. et al. A multiscale model for carbon adsorption of BTX compounds: Comparison of volume averaging theory and experimental measurements. **Chemical Engineering Science**, v. 184, p. 285–308, 2018.

DANFORTH, C. et al. An integrative method for identification and prioritization of constituents of concern in produced water from onshore oil and gas extraction. **Environment International**, v. 134, n. November 2019, p. 105280, 2020.

EISSENBERG, J. C. Molecular biology of the chromo domain : an ancient chromatin module comes of age. **Elsevier**, v. 275, p. 19–29, 2001.

FAKHURU, A. et al. Review of Technologies for Oil and Gas Produced Water Treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, p. 530–551, 2009.

FERREIRA, E. S. **I-121 - CINÉTICA QUÍMICA E FUNDAMENTOS DOS PROCESSOS DE**. [s.l: s.n.].

FICHOUX, Y. L. E. et al. Occurrence of *Leishmania infantum* Parasitemia in Asymptomatic Blood Donors Living in an Area of Endemicity in Southern France. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 37, n. 6, p. 1953–1957, 1999.

FINN, R. D. et al. The Pfam protein families database : towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. December 2015, p. 279–285, 2016.

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.

GABARDO, I. T. **Caracterização Química e Toxicológica da Água Produzida Descartada em Plataformas de Óleos e Gás na Costa Brasileira e seu Comportamento Dispersivo no Mar**. [s.l: s.n.].

GUO, Y. et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Halomonas campisalis*. **Biotechnol Lett (2013)**, v. 35, p. 2045–2049, 2013.

HE, X. et al. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification – aerobic denitrification of a novel halotolerant bacterium *Pseudomonas mendocina* TJPU04. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 5, p. 853–866, 2019.

HUANG, F. et al. Characterization of novel *Bacillus strain* N31 from mariculture water capable of halophilic heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 124, n. 5, p. 564–571, 2017.

HUANG, F. et al. Identification, interactions, nitrogen removal pathways and performances of culturable heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria from mariculture water by using cell culture and metagenomics. **Science of the Total**

Environment, v. 732, p. 139268, 2020.

HUANG, X. et al. Bioresource Technology Ammonium removal by a novel oligotrophic *Acinetobacter* sp . Y16 capable of heterotrophic nitrification – aerobic denitrification at low temperature. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 44–50, 2013.

JETTEN, M. S. M. et al. The anaerobic oxidation of ammonium. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, n. 5, p. 421–437, 1998.

JI, B.; WANG, H.; YANG, K. Tolerance of an aerobic denitrifier (*Pseudomonas stutzeri*) to high O₂ concentrations. **Biotechnology Letters**, v. 36, p. 719–722, 2014.

JOO, H.; HIRAI, M.; SHODA, M. Characteristics of Ammonium Removal by Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification by *Alcaligenes faecalis* No . 4. **JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING**, v. 100, n. 2, p. 184–191, 2005.

KLEMZ, A. C. et al. Oilfield produced water treatment by liquid-liquid extraction: A review. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 199, n. December 2020, 2021.

KRAFT, B.; STROUS, M.; TEGETMEYER, H. E. Microbial nitrate respiration – Genes , enzymes and environmental distribution. **Journal of Biotechnology**, v. 155, n. 1, p. 104–117, 2011.

KUENEN, J. G. Anammox bacteria: From discovery to application. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 320–326, 2008.

KUNDU, P. et al. Simultaneous Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification by *Chryseobacterium* sp . R31 Isolated from Abattoir Wastewater. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 12, 2014.

KUYPERS, M. M. M.; MARCHANT, H. K.; KARTAL, B. The microbial nitrogen-cycling network. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 16, p. 263–276, 2018.

LEI, Y. et al. A novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium , *Zobellella taiwanensis* DN-7 , can remove high-strength ammonium. **ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY A**, v. 2, n. 2, p. 4219–4229, 2016.

- LEMA, J. M. et al. Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit. **Water research**, v. 36, n. 10, p. 2555–60, 2002.
- LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows – Wheeler transform. v. 25, n. 14, p. 1754–1760, 2009.
- LIMA, R. M. G.; WILDHAGEM, G. R. DA S.; CUNHA, J. W. S. D. Remoção do Íon Amônio de Águas Produzidas na Exploração de Petróleo em Áreas Offshore por Adsorção em Clinoptilolita. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1237–1242, 2008.
- LIMPIYAKORN, T. et al. amoA -encoding archaea in wastewater treatment plants : a review. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 1425–1439, 2013.
- LIU, Y. et al. Photobacterium sp. NNA4, an efficient hydroxylamine-transforming heterotrophic nitrifier/aerobic denitrifier. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 128, n. 1, p. 64–71, 2019.
- LU, M. et al. International Biodeterioration & Biodegradation Biological treatment of oilfield-produced water: A field pilot study. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 316–321, 2009.
- 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 Research**, v. 37, p. 1239–1251, 2003.
- MAURER-STROH, S. et al. The Tudor domain ‘ Royal Family ’: **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 2, p. 69–74, 2003.
- METCAF; EDDY. Wastewater Engineering. In: **Environmentally Conscious Materials and Chemicals Processing**. [s.l: s.n.]. p. 207–235.
- MOORE, E. R. B. et al. **Nonmedical: Pseudomonas**. [s.l: s.n.].
- MOTTA, A. R. P. et al. Tratamento de água produzida de petróleo para remoção de óleo por processos de separação por membranas : revisão. **Eng Sanit Ambien**, v. 18, p. 15–26, 2013.
- MOTTA, M. D. et al. Estudos do Funcionamento de Estações de Tratamento de

Esgotos por Análise de Imagem: Validações e Estudos de Caso. **engenharia sanitária e ambiental** **171**, v. 8, p. 170–181, 2003.

NIERMAN, W.; EISEN, J. A.; FRASER, C. M. Microbial genome sequencing 2000 : new insights into physiology , evolution and expression analysis. **Res. Microbio**, v. 151, n. 15, p. 79–84, 2000.

OGUZ, M. T. et al. Concurrent nitrite oxidation and aerobic denitrification in activated sludge exposed to volatile fatty acids. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 6, p. 1562–1572, 2007.

OKAMURA-IKEDA, K. et al. Crystal Structure of Aminomethyltransferase in Complex with Dihydrolipoyl-H-Protein of the Glycine Cleavage System IMPLICATIONS FOR RECOGNITION OF LIPOYL PROTEIN SUBSTRATE , DISEASE-RELATED. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 24, p. 18684–18692, 2010.

OLIVEIRA, E. P.; SANTELLI, R. E.; CASSELLA, R. J. Direct determination of lead in produced waters from petroleum exploration by electrothermal atomic absorption spectrometry X-ray fluorescence using Ir – W permanent modifier combined with hydrofluoric acid. v. 545, p. 85–91, 2005.

OVERBEEK, R. et al. The Subsystems Approach to Genome Annotation and its Use in the Project to Annotate 1000 Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 17, p. 5691–5702, 2005.

PADHI, S. K. et al. Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of wastewater. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 78, p. 67–73, 2013.

PATIN, S. Environmental Impact of the Offshore Oil and Gas Industry. In: **Environmental Pollution**. [s.l: s.n.]. v. 110p. 7491.

PHILIPPOT, L. et al. Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous oxide reductase for N₂O emissions from soil. **Global Change Biology**, v. 17, n. 3, p. 1497–1504, 2011.

QUARTAROLI, L. et al. Ammonium removal from high-salinity oilfield-produced water:

assessing the microbial community dynamics at increasing salt concentrations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 2, p. 859–870, 2017.

QUARTAROLI, L. et al. Effect of the gradual increase of salt on stability and microbial diversity of granular sludge and ammonia removal. **Journal of Environmental Management**, v. 248, n. April, 2019.

REINBOLD, K. A.; PESCIPELLI, S. M. **Effects of Exposure to Ammonia on Sensitive Life Stages of Aquatic Organisms**. [s.l: s.n.].

RITTMANN, B. E.; LANGELAND, W. E. Simultaneous denitrification with nitrification in single-channel oxidation ditches. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, v. 57, n. 4, p. 300–308, 1985.

ROBERTSOW, L. A. et al. Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers. v. 56, n. 1984, p. 289–299, 1989.

ROBERTSOW, L. A.; KUENEN, G. Thiosphwra pantotropha gen. nov. sp. nov., a Facultatively Anaerobic, Facultatively Autotrophic Sulphur Bacterium. **Journal of General Microbiology (1983)**, v. 129, p. 2847–2855, 1983.

SAH, S.; SINGH, R. Phylogenetical coherence of Pseudomonas in unexplored soils of Himalayan region. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1–10, 2016.

SALMAN, R. H.; ABBAR, A. H. Chemical Engineering and Processing - Process Intensification Optimization of a combined electrocoagulation-electro-oxidation process for the treatment of Al-Basra Majnoon Oil field wastewater : Adopting a new strategy. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 183, n. September 2022, p. 109227, 2023.

SHU, H. et al. Nitrogen removal characteristics and potential application of the heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria Pseudomonas mendocina S16 and Enterobacter cloacae DS'5 isolated from aquaculture wastewater ponds. **Bioresource Technology**, v. 345, p. 126541, 2022.

SILVA, L. C. F. et al. Effect of salinity in heterotrophic nitrification/aerobic denitrification performed by acclimated microbiota from oil-produced water biological treatment

system. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 130, n. February, p. 1–7, 2018.

SILVA, L. C. F. **Nitrificação Heterotrófica/Desnitrificação Aeróbia: Caracterização de Isolados e Investigação das Vias Metabólicas**. [s.l: s.n.].

SILVA, L. C. F. et al. Heterotrophic nitrifying/aerobic denitrifying bacteria: Ammonium removal under different physical-chemical conditions and molecular characterization. **Journal of Environmental Management**, v. 248, n. April, 2019.

SILVA, L. C. F. et al. Physicochemical characterization of *Pseudomonas stutzeri* UFV5 and analysis of its transcriptome under heterotrophic nitrification/aerobic denitrification pathway induction condition. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.

STEPHENSON, M. T. **Components of Produced Water : A Compilation of Industry StudiesJPT**. [s.l: s.n.].

STROUS, M. et al. Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 6, p. 2446–2448, 1997.

SUN, Z. et al. Bioresource Technology Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a novel metal resistant bacterium *Cupriavidus* sp . S1. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 142–150, 2016.

TELLEZ, G. T.; NIRMALAKHANDAN, N.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Performance evaluation of an activated sludge system for removing petroleum hydrocarbons from oilfield produced water. **Elsevier**, v. 6, n. 470, p. 455–470, 2002.

TRAN, T. T. et al. Comparative Genome Analysis of Two Heterotrophic Nitrifying *Pseudomonas putida* Strains Isolated from Freshwater Shrimp Ponds in Soc Trang Province. **Fermentation**, v. 8, p. 336, 2022.

UEMOTO, H.; SAIKI, H. Nitrogen Removal by Tubular Gel Containing *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans*. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 62, n. 11, p. 4224–4228, 1996.

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, n. 3, p. 255–257, 2006.

VAZOLLER, R. F. et al. Biodegradability potential of two experimental landfills in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 87–92, 2001.

WALKER, B. J. et al. Pilon : An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly Improvement. **PLOS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

WANG, H. et al. Bioresource Technology Deciphering pollutants removal mechanisms and genetic responses to ampicillin stress in simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification (SHNAD) process treating seawater-based wastewater. **Bioresource Technology**, v. 315, n. July, p. 123827, 2020.

WUNDERLIN, P. et al. Mechanisms of N₂O production in biological wastewater treatment under nitrifying and denitrifying conditions. **Water Research**, v. 46, n. 4, p. 1027–1037, 2012.

YANG, L. et al. Bioresource Technology Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a metal resistant bacterium *Pseudomonas putida* strain NP5. **Bioresource Technology**, v. 285, n. April, p. 121360, 2019.

YANG, Y. et al. Insights into the mechanism of the deterioration of mainstream partial nitrification/anammox under low residual ammonium. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 126, p. 29–39, 2023.

YU, Z. et al. A Comprehensive Analysis of Structural and Sequence Conservation in the TetR Family Transcriptional Regulators. **Journal of Molecular Biology**, v. 400, n. 4, p. 847–864, 2010.

ZHANG, H. et al. Bioresource Technology *Paracoccus versutus* KS293 adaptation to aerobic and anaerobic denitrification : Insights from nitrogen removal , functional gene abundance , and proteomic profiling analysis. **Bioresource Technology**, v. 260, n. February, p. 321–328, 2018.

ZHANG, J. et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium

Pseudomonas stutzeri YZN-001. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 21, p. 9866–9869, 2011.

ZHANG, Q. et al. Bioresource Technology The characteristics of a novel heterotrophic nitrification – aerobic denitrification bacterium , *Bacillus methylotrophicus* strain L7. **Bioresource Technology**, v. 108, p. 35–44, 2012.

ZHAO, B. et al. Heterotrophic nitrogen removal by *Providencia rettgeri* strain YL. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 6, p. 609–616, 2010.

ZHAO, J. et al. Development of simultaneous nitrification-denitrification (SND) and organics removal in biofilm reactors with partially coupled a novel biodegradable carrier for nitrogen-rich water purification. **Bioresource Technology**, 2017.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO DE GENOMAS DAS LINHAGENS BACTERIANAS NITRIFICANTES HETEROTRÓFICAS E DESNITRIFICANTES AERÓBICAS

1. INTRODUÇÃO

Durante as atividades de exploração e produção de petróleo e gás natural são gerados efluentes chamados de água de produção (AP). Todavia, o descarte da AP pode acarretar inúmeros efeitos negativos ao meio ambiente, devido principalmente pela alta concentração de nitrogênio amoniacal, podendo então causar a depleção de oxigênio no meio, acarretando assim a morte dos animais aquáticos (AHN, 2006). Diante disso, esta AP deve ser tratada, tendo que atender a resolução do CONAMA, no qual somente concentrações abaixo de 20 mgL^{-1} são permitidas para a reutilização e descarte de efluente nos corpos hídricos CONAMA 430/2011. Entre os processos de tratamento de efluentes como: físico, químico e biológico, o tratamento biológico se destaca devido à sua alta eficiência e simplicidade, quando comparados a métodos físico-químicos já existentes (MOTTA et al., 2013).

A remoção biológica da amônia pode ocorrer por diferentes vias. Entretanto a via da nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia (NH/DA) vem se destacando devido a capacidade dos microrganismos de tolerância o oxigênio, serem resistentes a altas salinidades e utilizarem matéria orgânica como fonte de carbono, onde um único microrganismo heterotrófico nitrifica e desnitrifica em condições aeróbicas.

Bactérias nitrificantes autotróficas obtêm energia através da oxidação de compostos inorgânicos de nitrogênio denominados então de quimiolitotróficos (KUYPERS; MARCHANT; KARTAL, 2018), todavia ainda não se sabe o porquê dos microrganismos NH/DA utilizarem amônia. Estes microrganismos diferentes dos autotróficos, utilizam a matéria orgânica como fonte de carbono, assim possuem crescimento mais rápido comparado com os microrganismos nitrificantes autotróficos, refletindo diretamente no aumento da eficiência da remoção de amônia (SILVA, 2018). As bactérias NH/DA removem amônia pelo processo de nitrificação heterotrófica juntamente com desnitrificação em condições aeróbicas. Todavia, pouco se sabe sobre esses microrganismos, assim como o metabolismo da via.

Diante dessa importância, várias espécies tem sido descritas como capazes de realizar o NH/DA, tais como: *Paracoccus denitrificans* (ROBERTSOW; KUENEN, 1983), *Alcaligenes faecalis* (JOO; HIRAI; SHODA, 2005), *Providencia rettgeri* (ZHAO et al., 2010), *Pseudomonas stutzeri* (ZHANG et al., 2011), *Agrobacterium sp. LAD9*, *Achromobacter sp. GAD3* e *Comamonas sp. GAD4* (PHILIPPOT et al., 2011), *Bacillus*

spp. (ZHANG et al., 2012), *Rhodococcus* sp. (CHEN et al., 2012), *Halomonas campisalis* (GUO et al., 2013), *Chryseobacterium* sp. R31 (KUNDU et al., 2014), *Cupriavidus* sp. (SUN et al., 2016), *Zobellella taiwanenses* (LEI et al., 2016), *Serratia Marcescens* (HUANG et al., 2017), *Paracoccus versutus* (ZHANG et al., 2018), *Arthrobacter nicotianae* (CAI et al., 2019), *Acinetobacter* sp. (CHEN et al., 2012) *Pseudomonas mendocina* (HE et al., 2019), *Pseudomonas putida* (YANG et al., 2019), *Photobacterium* sp. (LIU et al., 2019), *Gordonia amicalis* (SILVA et al., 2019), *Pseudomonas balearica* (SILVA et al., 2019), *Pseudomonas stutzeri* (SILVA et al., 2019; ZHANG et al., 2011) e *Sphingopyxis* sp (CHEN et al., 2022).

Entretanto várias questões ainda precisam ser respondidas para melhor entendimento das vias envolvidas neste processo, o que facilitaria a identificação de novos microrganismos NH/DA, e uma maior eficiência no monitoramento e modulação da via NH/DA nas estações de tratamento de efluentes. Com intuito de caracterizar esses microrganismos, o trabalho teve como objetivo realizar a montagem, anotação, depósito e caracterização dos genomas de quatro linhagens bacterianas NH/DA, *Pseudomonas stutzeri* UFV5, *Pseudomonas balearica* UFV4, *Rhodococcus ruber* UFV UFV2, *Gordonia amicalis* UFV3 isoladas de estação de tratamento de efluentes provenientes da exploração de petróleo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Descrição das linhagens bacterianas nitrificantes heterotróficas e desnitrificantes aeróbicas

Foram estudadas quatro linhagens bacterianas identificadas como: *Pseudomonas stutzeri* UFV5 (número de acesso KY616652.1), *Pseudomonas balearica* UFV3 (número de acesso KX495190.2), *Rhodococcus ruber* UFV2 (número de acesso CP024890.1), *Gordonia amicalis* UFV4 (número de acesso KU904410.1).

As linhagens foram isoladas de amostra de lodo de sistema de tratamento de efluentes por lodos ativados do Terminal Marítimo de exploração de petróleo e identificadas taxonomicamente em trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo (Silva et al., 2019). Posteriormente, o material genético das mesmas foi extraído e enviado para sequenciamento para então serem analisados neste trabalho.

2.2. Trimagem das *reads*

As *reads* obtidas do sequenciamento passaram por uma avaliação de qualidade, utilizando o *software* FastQC na versão 0.11.9 (<https://github.com/s-andrews/FastQC>), que permitiu visualizar e avaliar a qualidade das mesmas. As sequências adaptadoras foram detectadas e removidas dos dados do sequenciamento usando a configuração de “detecção automática” do *software* TrimGalore versão 0.6.7 (KRUEGER et al.; 2021). Em seguida, foi feita uma trimagem das *reads*, incluindo diversas etapas de corte e filtragem para a eliminação daquelas de baixa qualidade (*Phred* < 25), para isso foi utilizado o algoritmo Phred para obter um *score* que avaliou a probabilidade de erro de cada uma das bases das *reads*. Quanto maior o valor de Phred, maior a probabilidade das bases terem sido adicionadas corretamente nas *reads*. Neste trabalho, o valor de corte utilizado foi Phred = 25, onde valores abaixo de 25 foram removidos. Os adaptadores foram removidos, usando *software* Trimmomatic na versão 0.39 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014), no qual foram selecionados os seguintes parâmetros: HEADCROP:15, CROP:135, SLIDINGWINDOW:4:20 e MINLEN:100. Após os cortes das regiões de baixa qualidade, as *reads* foram utilizadas para a montagem dos *contigs* do genoma.

2.3. Montagem dos Genomas

Após a retirada das sequências de baixa qualidade foi feita a montagem dos genomas utilizando a montagem “de novo”, no qual um conjunto de softwares é utilizado para gerar *contigs* maiores. A montagem do genoma foi realizada pelo método “isolar” do SPAdes versão 3.15.3 (BANKEVICH et al.;2012), utilizando os *k-mers* ímpares entre 21 e 127. Essa etapa consistiu em ordenar as milhares de *reads* para formação de *contigs* confiáveis e de alta qualidade, permitindo agrupá-los para obtenção dos *scaffolds*, que consiste em uma sequência de DNA que contém vários *contigs* na orientação correta, porém contém lacunas entre eles.

Os *scaffolds* foram obtidos pelo método “*scaffold*” do RagTag 2.1.0 (<https://github.com/malonge/RagTag>), seguido por um genoma de referência. Assim, os *scaffolds* foram alinhados com eficiência contra grandes sequências de referências

e corrigidos mapeamento das leituras pareadas usando o *software* Burrows-Wheeler Alignment (BWA) na versão 0.7.17, (LI; DURBIN, 2009), Picard toolkit versão 2.26.2 (<https://github.com/broadinstitute/picard>).

Para garantir uma boa qualidade nas montagens, foi utilizado o *software* Pilon versão 1.24 (WALKER et al., 2014), até cinco interações de polimento, no qual foi corrigido bases e montagens incorretas, produzindo genomas mais contíguos, permitindo então a identificação de genes. Essas etapas foram realizadas para melhorar a qualidade da montagem e fechar as lacunas onde foram colocadas as letras N nos *contigs*. Os arquivos "scaffolds" correspondem às sequências obtidas após a execução do SPAdes.

A montagem foi avaliada usando a versão *assembly-stats* 1.0.1 (<https://github.com/sanger-pathogens/assembly-stats>) e a cobertura de *scaffolds* foi calculada usando o pacote BBMap na versão 38.76 (<https://sourceforge.net/projects/bbmap>).

2.4. Anotação dos genes e depósito das sequências das linhagens nitrificantes heterotróficas/Desnitrificantes aeróbicas

Após passar por toda montagem e controle de qualidade, os genomas das linhagens NH/DA, *Pseudomonas stutzeri* UFV5, *Pseudomonas balearica* UFV3, *Rhodococcus ruber* UFV2 e *Gordonia amicalis* UFV4, foram enviadas para depósito no banco de dados National Center for Informações sobre Biotecnologia (NCBI), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/howto/submit-data>).

A anotação dos genomas foi realizada pelo servidor da *Web Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST) (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>) (AZIZ et al., 2008), no qual as anotações são comparadas com uma coleção FIGfam (famílias de proteínas), que atribui a função dos genes. O RAST pode permitir uma reconstrução metabólica que permite uma visão geral dos subsistemas do genoma anotado pelo visualizador SEED (<http://rast.nmpdr.org/>) (OVERBEEK et al., 2005).

Para avaliar se houve uma boa montagem do genoma e qualidade na anotação do genoma das linhagens, foi utilizado métricas estatísticas para avaliar o número total

em pb na montagem e a quantidade de *contigs* que foram gerados em cada linhagem bacteriana. O N50 avalia a contiguidade dos *contigs*, enquanto o L50 apresenta a quantidade de *contigs*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização do genoma das linhagens nitrificantes heterotróficas/desnitrificantes aeróbicas

Para se ter uma boa caracterização dos genomas, é importante obter uma boa montagem dos genomas após o sequenciamento. Desta maneira, é possível obter informações sobre os sistemas encontrados nos genomas, sobre a diversidade gênica, estrutura e função dos genes (NIERMAN; EISEN; FRASER, 2000). A montagem dos genomas acontece por meio de vários programas de bioinformática, na qual ajudam a preencher lacunas e retirar sequências de baixas qualidades, fazendo com que mantenha a integridade do genoma, não perdendo nenhuma informação. Como resultado de uma boa montagem, o genoma das linhagens NH/DA podem ser enviados para um repositório gênico, como “National Center for Informações sobre Biotecnologia (NCBI)”. A partir daí várias análises podem ser realizadas, como a realizar a caracterização, obtendo informações dos genomas das linhagens bacterianas NH/DA.

A caracterização das quatro linhagens bacterianas NH/DA provenientes de amostra de lodo nitrificante do sistema de tratamento de efluentes do Terminal de exploração de petróleo foi possível observar que se trata de linhagens bacterianas, porém de filos diferentes, exceto no caso de duas linhagens, que são do gênero *Pseudomonas*: *Pseudomonas stutzeri* UFV5 e *Pseudomonas balearica* UFV3 (Tabela 1). As *pseudomonas* são bactérias encontradas em diversos ambientes sendo bem versáteis, estando envolvidas em estudos desde as áreas médicas como nas áreas ambientais (MOORE et al., 2005). Pertencem à classe Gamaproteobacteria, são anaeróbicas facultativas e Gram-negativas, possuindo formato de bastonete (SAH; SINGH, 2016). A linhagem *Pseudomonas balearica* UFV3 foi descrita como NH/DA pela primeira vez por SILVA et al. (2019).

As outras duas linhagens bacterianas, *Rhodococcus ruber* UFV2 e *Gordonia amicalis* UFV4 são aeróbicas e Gram-positivas e, de acordo com a literatura, bactérias que tem a capacidade de remoção NH/DA são a grande maioria Gram-negativas (ZHANG et al., 2011). As linhagens *Rhodococcus ruber* UFV2 e *Gordonia amicalis* UFV4 pertencem ao filo pertence ao filo Actinomycetota, a classe Actinomycete e a ordem Mycobacteriale. Porém a linhagem *Rhodococcus ruber* UFV2 pertence à família Nocardiaceae do gênero *pseudomonas*, sendo bactérias patogênicas oportunistas e foram descritas como bactérias NH/DA por CHEN (2012). Já a linhagem *Gordonia amicalis* UFV4, pertence à família Gordoniaceae e a ordem *Gordonia*, sendo descrita pela primeira vez como NH/DA por nosso grupo de estudo no trabalho de SILVA et al. (2019). Estas linhagens são filogeneticamente distantes, porém as duas são mais próximas entre elas que de *Pseudomonas*.

As sequências das linhagens bacterianas NH/DA: *Pseudomonas stutzeri* UFV5, *Pseudomonas balearica* UFV3, *Rhodococcus ruber* UFV2 e *Gordonia amicalis* UFV4, foram anotadas tanto no NCBI, como no servidor Web RAST (Tabela 1).

Os genomas das linhagens bacterianas NH/DA foram depositados no NCBI no projeto intitulado “Genômica comparativa de nitrificantes heterotróficos para detecção e caracterização de genes envolvidos na via metabólica NH/DA”, número de acesso do projeto: JANJEW000000000. Os genomas foram então depositados e estão disponíveis nos números: JANJEW000000000 - *Pseudomonas stutzeri* UFV5, JANIEO000000000 - *Pseudomonas balearica* UFV3, JANJEU000000000 - *Rhodococcus ruber* UFV2 e JANJEV000000000 - *Gordonia amicalis* UFV4.

De acordo com as métricas estatísticas (N50 e L50) todas as linhagens apresentaram ótima qualidade na montagem e na anotação, no qual o N50 resultou em um número bem mais alto comparado ao valor de L50, que é o desejado. Então, em *P. stutzeri* UFV5 temos que 50% do total de bases que foram montadas estão contidas em 3 *contigs* de tamanho 740.842 pb, onde o L50 apresenta a quantidade de *contigs* e o N50 o tamanho dos *contigs* em pb. Em *P. balearica* UFV3 o N50 foi de 740.852 pb e L50 de 2 *contigs*, em *R. ruber* UFV2 o N50 foi de 432.576 pb e L50 de 4 *contigs*, e por fim *G. amicalis* UFV4 o N50 foi de 190.949 pb e L50 de 10 *contigs*.

Tabela 1. Informações gerais das linhagens das bactérias NH/DA provenientes de amostra de lodo nitrificante de estação de tratamento de efluentes de exploração de petróleo.

	<i>P. stutzeri</i> UFV5	<i>P. balearica</i> UFV3	<i>R. ruber</i> UFV2	<i>G. amicalis</i> UFV4
Domínio	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria
Filo	Pseudomonadota	Pseudomonadota	Actinomycetota	Actinomycetota
Classe	Gamaproteobacteria	Gamaproteobacteria	Actinomycete	Actinomycete
Ordem	Pseudomonadales	Pseudomonadales	Mycobacteriales	Mycobacteriales
Família	Pseudomonadaceae	Pseudomonadaceae	Nocardiaceae	Gordoniaceae
Gênero	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Gordonia</i>
Características Gerais				
Forma	Bastonete	Bastonete	Bastonete e coco	Bastonete
Coloração de Gram	negativa	negativa	positiva	positiva
Banco de dados				
ID do projeto	PRJNA851409	PRJNA851409	PRJNA851409	PRJNA851409
ID da amostra	SAMN29246072	SAMN29248101	SAMN29222687	SAMN29222818
ID do genoma	JANJEW000000000	JANIEO000000000	JANJEU000000000	JANJEV000000000
Origem	Marinho	Marinho	Marinho	Marinho
Metabolismo	Anaeróbico facultativo	Anaeróbico facultativo	Aeróbico	Aeróbico

O genoma de *Pseudomonas stutzeri* UFV5 foi a linhagem que apresentou menor genoma (4.559.141 pb) e menor conteúdo %GC (guanina e citosina) com 64% em relação as demais, enquanto *Rhodococcus ruber* UFV2 foi a de maior genoma (5.563.789 pb) e maior conteúdo %GC (70,5 %) (Tabela 2). Foram detectadas sequências de plasmídeos somente na linhagem *Pseudomonas stutzeri* UFV5 e presença de fagos somente nas linhagens do gênero de *Pseudomonas*. Apesar de menor genoma, as duas linhagens de *Pseudomonas* apresentaram maior quantidade de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio (60 genes) e maior quantidade de genes ligados a resposta ao estresse (81 genes) (Figuras 1 e 2).

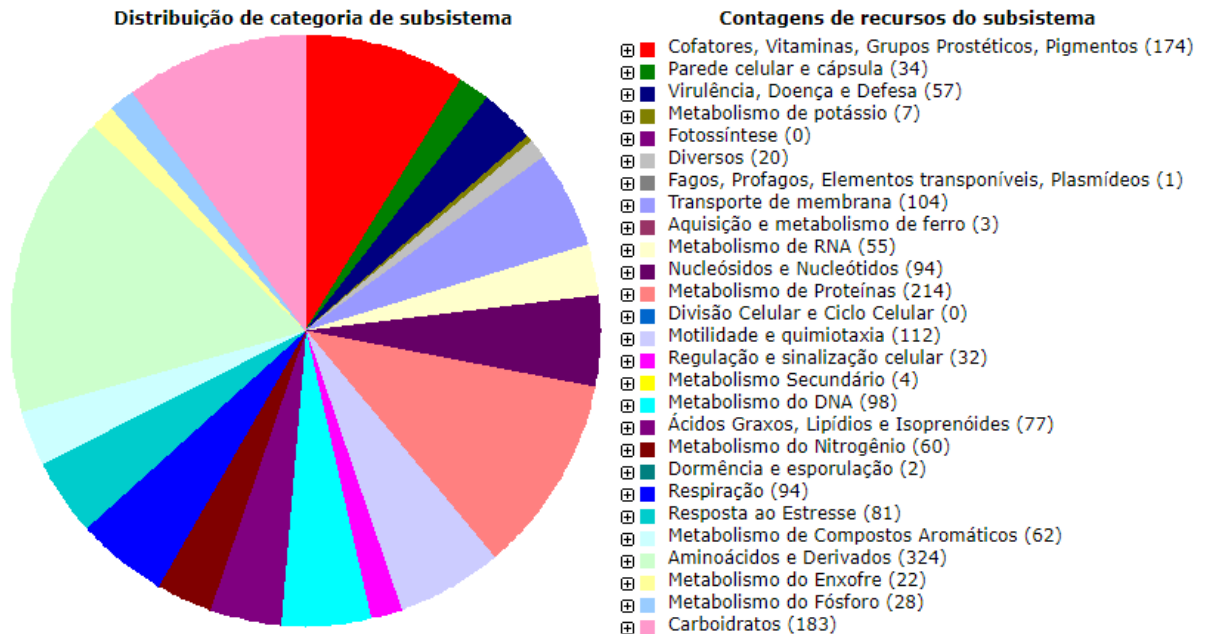
Tabela 2. Caracterização e comparação das anotações dos genomas das linhagens bacterianas NH/DA provenientes de amostra de lodo nitrificante de estação de tratamento de efluentes de exploração de petróleo.

	<i>P. stutzeri</i> UFV5	<i>P. balearica</i> UFV3	<i>R. ruber</i> UFV2	<i>G. amicalis</i> UFV4
Tamanho (pb)	4.559.141	4.554.350	5.563.789	5.080.713
GC (%) ¹	64	64	70,5	67,3
CDS ²	4.237	4.305	5.287	4.761
RNAs	66	59	63	62
Pseudo Genes	29	30	69	208
RNA _t	55	55	53	48
Subsistemas ³	340	341	301	291
Metabolismo do Nitrogênio	60	60	29	32
Resposta ao Estresse	81	81	42	39
Plasmídeos	1	-	-	-
Fagos	1	2	-	-
N50 (pb)	740842	742452	432576	190949
L50	3	2	4	10

¹ Porcentagem (%) de G+C no nucleotídeo total de uma sequência. ² Número de sequências de DNA codificadoras de proteínas (CDS). ³ Categorias dos subsistemas dos genes codificadores de proteínas baseados no RAST *Annotation Server* no SEED.

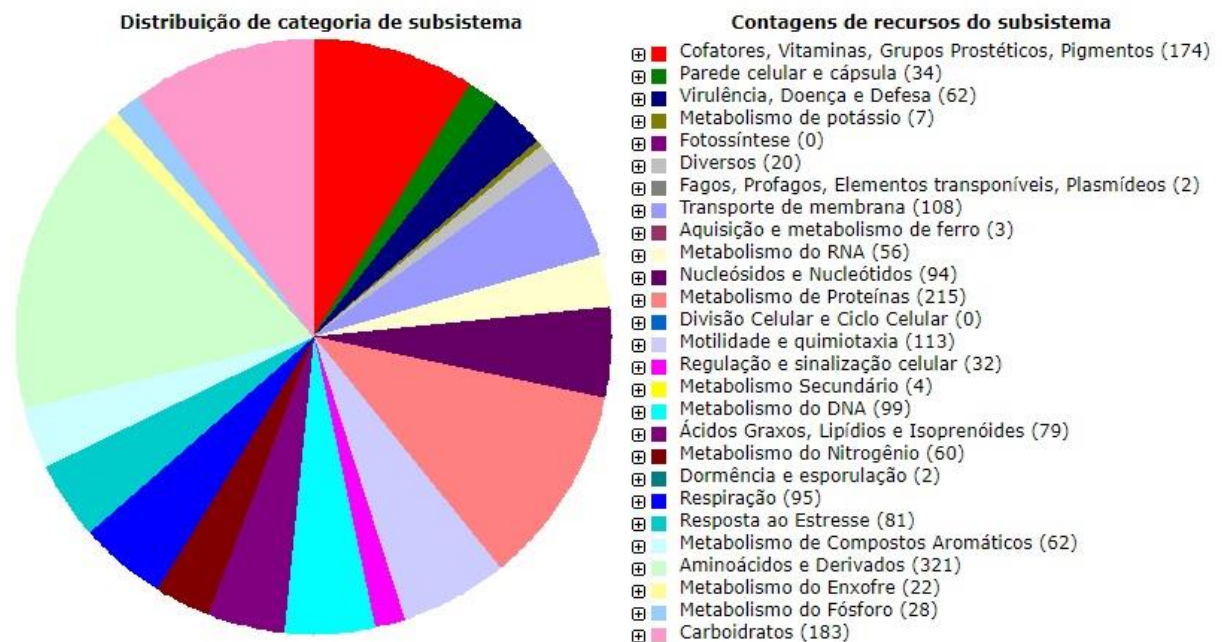
De acordo com a análise de subsistemas SEED, a linhagem *Pseudomonas stutzeri* UFV5 obteve um total de 4.293 CDS (sequência de DNA codificante), com 1.336 sequências (32%) atribuídas a funções distribuídas entre 340 subsistemas (Figura 1), sendo os mais abundantes “aminoácidos e derivados” (324 genes), seguidos de “metabolismo de proteínas” (214 genes), “carboidratos” (183 genes), “Cofatores, Vitaminas, Grupos Prostéticos, Pigmentos” (174 genes) e “Motilidade e quimiotaxia” (112 genes). Já os genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio, foram 60 e ligados a resposta ao estresse foram 81.

Figura 1. Uma visão geral dos subsistemas do genoma anotado de *Pseudomonas stutzeri* UFV5 usando o *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST). O gráfico mostra as categorias dos subsistemas dos genes codificadores de proteínas. Entre parênteses representa o número de genes atribuídos a cada categoria funcional.



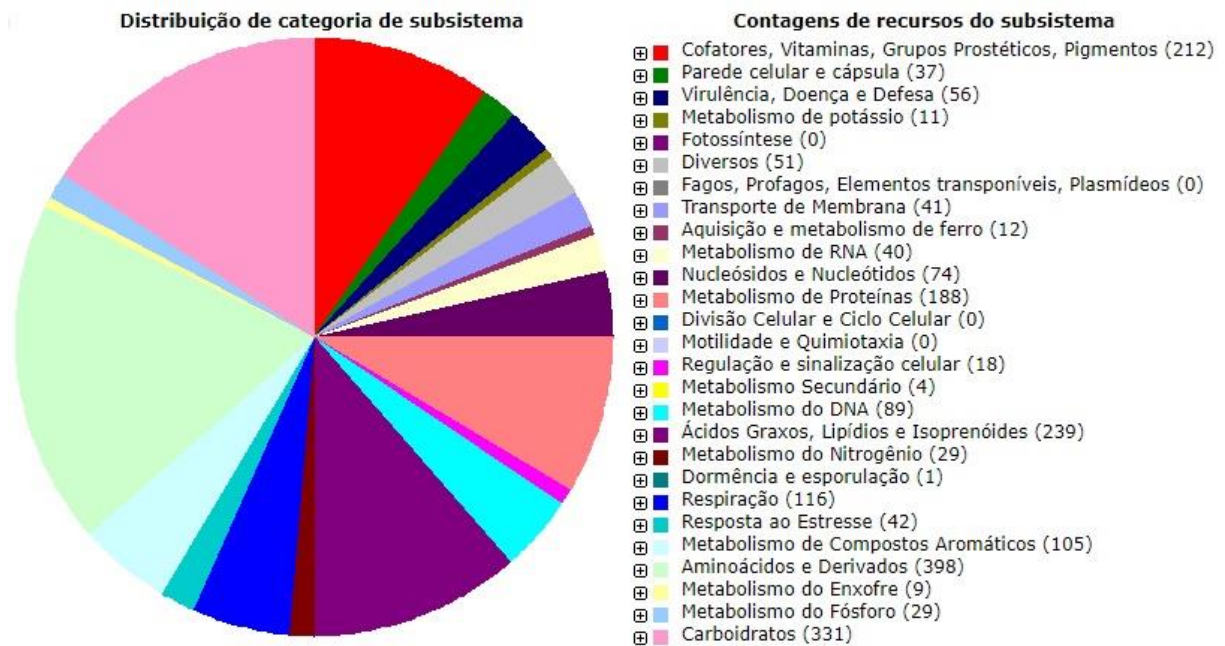
A linhagem *Pseudomonas balearica* UFV3, apresentou um total de 4.305 CDS, com 1.351 sequências (32%), no qual 69 genes estão relacionados a proteínas hipotéticas e o restante atribuídas a funções distribuídas entre 341 subsistemas (Figura 2), sendo os mais abundantes “aminoácidos e derivados” (321 genes), seguidos de “metabolismo de proteínas” (215 genes), “carboidratos” (183 genes), “Cofatores, Vitaminas, Grupos Prostéticos, Pigmentos” (174 genes) e “Motilidade e quimiotaxia” (113 genes). Já os genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio, foram 60 e ligados a resposta ao estresse foram 81. A mesma quantidade de genes encontrados em *Pseudomonas stutzeri* UFV5.

Figura 2. Uma visão geral dos subsistemas do genoma anotado de *Pseudomonas balearica* UFV3 usando o *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST). O gráfico mostra as categorias dos subsistemas dos genes codificadores de proteínas. Entre parênteses representa o número de genes atribuídos a cada categoria funcional.



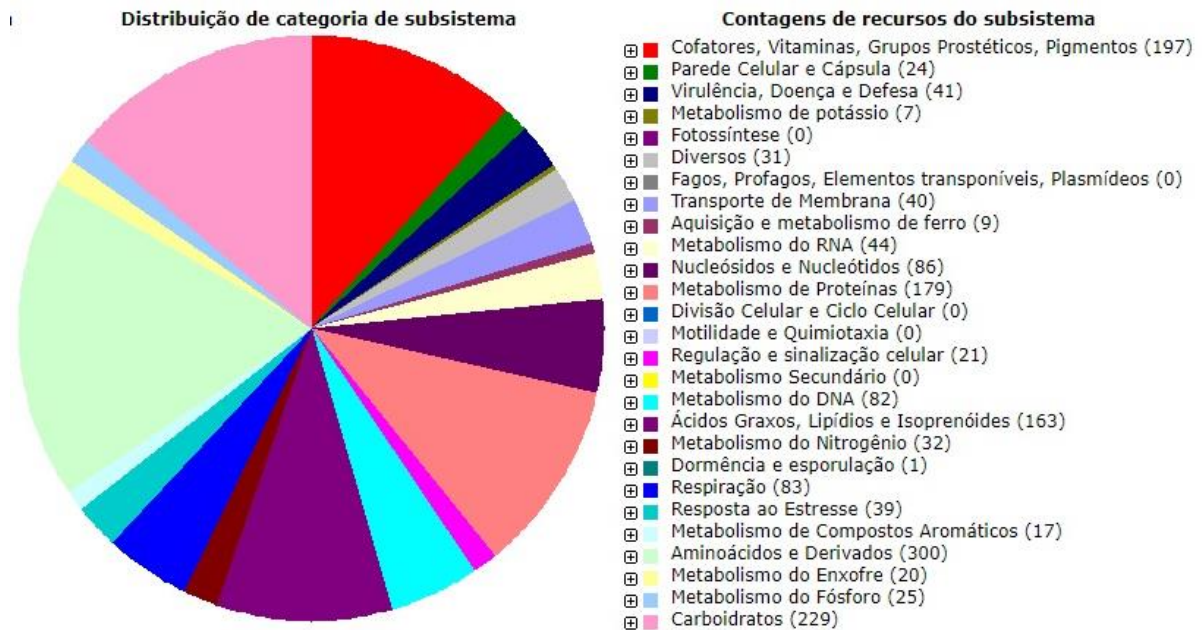
A linhagem *Rhodococcus ruber* UFV2, apresentou um total de 5.287 CDS, com 1.250 sequências (24%) atribuídas a funções distribuídas entre 301 subsistemas (Figura 3), sendo os mais abundantes “aminoácidos e derivados” (398 genes), seguidos de “metabolismo de carboidratos” (331 genes), “Ácidos Graxos, Lipídios e Isoprenóides” (239), “Cofatores, Vitaminas, Grupos Prostéticos, Pigmentos” (212 genes) e “Metabolismo de proteínas” (188 genes). Já os genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio, foram identificados 29 e ligados a resposta ao estresse foram 42.

Figura 3. Uma visão geral dos subsistemas do genoma anotado de *Rhodococcus ruber* UFV2 usando o Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST). O gráfico mostra as categorias dos subsistemas dos genes codificadores de proteínas. Entre parênteses representa o número de genes atribuídos a cada categoria funcional.



A linhagem *Gordonia amicalis* UFV4, apresentou um total de 4.761 CDS, com 1.042 sequências (22%) atribuídas a funções distribuídas entre 291 subsistemas (Figura 4), sendo os mais abundantes “aminoácidos e derivados” (300 genes), seguidos de “metabolismo de carboidratos” (229 genes), “Cofatores, Vitaminas, Grupos Prostéticos, Pigmentos” (197 genes), “Metabolismo de proteínas” (179 genes), “Ácidos Graxos, Lipídios e Isoprenóides” (163). Já os genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio, foram 32 e ligados a resposta ao estresse foram 39.

Figura 4. Uma visão geral dos subsistemas do genoma anotado de *Gordonia amicalis* UFV4, usando o *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST). O gráfico mostra as categorias dos subsistemas dos genes codificadores de proteínas. Entre parênteses representa o número de genes atribuídos a cada categoria funcional.



Portanto 60 genes foram identificados como envolvidos no metabolismo do nitrogênio nas duas linhagens do gênero de *Pseudomonas*, destes, 32, estão relacionados à etapa de desnitrificação. As outras duas linhagens apresentaram menos genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio, 29 genes em *Rhodococcus ruber* UFV2 e 32 genes em *Gordonia amicalis* UFV4, sendo que em ambos 4 genes estão envolvidos na desnitrificação.

Dentre as quatro linhagens, a quantidade de proteínas hipotéticas encontradas entre elas foi quase a mesma. Nas duas linhagens de *Pseudomonas* 39 genes, 40 em *Rhodococcus ruber* UFV2 e 41 genes em *Gordonia amicalis* UFV4.

Dentre as quatro linhagens, as de *Pseudomonas* apresentaram um número significativo de genes envolvidos a resposta ao estresse, sendo mais da metade envolvidos no estresse oxidativo. Os genes envolvidos na motilidade e quimiotaxia foi um dos subsistemas mais abundantes neste gênero e não foram encontrados em *Rhodococcus ruber* UFV2 e nem em *Gordonia amicalis* UFV4.

Os genomas das linhagens NH/DA foram depositados no NCBI e estão disponíveis nos números SUB11715879 - *Pseudomonas stutzeri* UFV5, SUB11715788 - *Pseudomonas balearica* UFV3, SUB11715992 - *Rhodococcus ruber* UFV2 e SUB11715916 - *Gordonia amicalis* UFV4.

4. CONCLUSÃO

Dentre os genomas das quatro linhagens bacterianas estudadas nesse trabalho, a linhagem *Rhodococcus ruber* UFV2 foi a que apresentou o maior genoma e maior conteúdo %GC. Entretanto, a linhagem *Pseudomonas stutzeri* UFV5, apresentou maior quantidade de genes codificadores de proteínas. Portanto, de acordo com a caracterização do genoma pode-se identificar que as linhagens do gênero de *Pseudomonas* apresentaram um maior número de genes envolvidos nos subsistemas principalmente no metabolismo de nitrogênio e de genes ligados a resposta ao estresse.

Esse trabalho mostrou que as quatro linhagens bacterianas NH/DA apresentam características genômicas bem diversas, no qual houve um envolvimento dos genes em 300 a 340 subsistemas. Tal resultado demonstra que houve a diminuição de genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio em algumas linhagens que não pertencem ao mesmo gênero que foi o caso das Gram-positivas comparadas com as Gram-negativas, no qual as *pseudomonas* apresentou um maior número de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio. Portanto, a via NH/DA pode envolver genes diferentes para grupos microbianos distintos e que possam estar ligados a outros subsistemas além do que estão descritos no metabolismo do nitrogênio.

Entretanto, estudos ainda precisam ser feitos para propor a via ou rotas de NH/DA e assim identificar as características comuns entre estes microrganismos, o que contribuirá para o melhor conhecimento deste processo e facilitará a identificação de novos microrganismos NH/DA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, Y. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1709–1721, 2006.
- AMINI, S. et al. Chemical Engineering Research and Design Mathematical modelling of a hydrocyclone for the down-hole oil – water separation (DOWS). **Chemical Engineering Research and Design**, v. 90, n. 12, p. 2186–2195, 2012.
- AZIZ, R. K. et al. The RAST Server : Rapid Annotations using Subsystems Technology. v. 15, p. 1–15, 2008.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Genome analysis Trimmomatic : a flexible trimmer for Illumina sequence data. v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.
- BRASIL, M. DE M. E E. **Plano decenal de expansão de energia 2022**. [s.l: s.n.].
- BURPO, F. J. A critical review of PCR primer design algorithms and cross-hybridization case study. **Biochemistry**, n. January 2001, 2001.
- CAI, X. et al. Characteristics of Heterotrophic Nitrifying and Aerobic Denitrifying *Arthrobacter nicotianae* D51. **Water**, v. 11, p. 434, 2019.
- CHEN, P. et al. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus* sp. CPZ24. **Bioresource Technology**, v. 116, n. April 2008, p. 266–270, 2012.
- CHEN, P. et al. Characterization of a novel salt-tolerant strain *Sphingopyxis* sp. CY-10 capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. **Bioresource Technology**, v. 358, n. May, p. 127353, 2022.
- DA LUZ, C. et al. A multiscale model for carbon adsorption of BTX compounds: Comparison of volume averaging theory and experimental measurements. **Chemical Engineering Science**, v. 184, p. 285–308, 2018.
- DANFORTH, C. et al. An integrative method for identification and prioritization of constituents of concern in produced water from onshore oil and gas extraction. **Environment International**, v. 134, n. November 2019, p. 105280, 2020.

EISSENBERG, J. C. Molecular biology of the chromo domain : an ancient chromatin module comes of age. **Elsevier**, v. 275, p. 19–29, 2001.

FAKHURU, A. et al. Review of Technologies for Oil and Gas Produced Water Treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, p. 530–551, 2009.

FERREIRA, E. S. **I-121 - CINÉTICA QUÍMICA E FUNDAMENTOS DOS PROCESSOS DE**. [s.l: s.n.].

FICHOUX, Y. L. E. et al. Occurrence of *Leishmania infantum* Parasitemia in Asymptomatic Blood Donors Living in an Area of Endemicity in Southern France. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 37, n. 6, p. 1953–1957, 1999.

FINN, R. D. et al. The Pfam protein families database : towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. December 2015, p. 279–285, 2016.

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.

GABARDO, I. T. **Caracterização Química e Toxicológica da Água Produzida Descartada em Plataformas de Óleos e Gás na Costa Brasileira e seu Comportamento Dispersivo no Mar**. [s.l: s.n.].

GUO, Y. et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Halomonas campisalis*. **Biotechnol Lett (2013)**, v. 35, p. 2045–2049, 2013.

HE, X. et al. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification – aerobic denitrification of a novel halotolerant bacterium *Pseudomonas mendocina* TJPU04. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 5, p. 853–866, 2019.

HUANG, F. et al. Characterization of novel *Bacillus* strain N31 from mariculture water capable of halophilic heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 124, n. 5, p. 564–571, 2017.

HUANG, F. et al. Identification, interactions, nitrogen removal pathways and performances of culturable heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria from mariculture water by using cell culture and metagenomics. **Science of the Total**

Environment, v. 732, p. 139268, 2020.

HUANG, X. et al. Bioresource Technology Ammonium removal by a novel oligotrophic *Acinetobacter* sp . Y16 capable of heterotrophic nitrification – aerobic denitrification at low temperature. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 44–50, 2013.

JETTEN, M. S. M. et al. The anaerobic oxidation of ammonium. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, n. 5, p. 421–437, 1998.

JI, B.; WANG, H.; YANG, K. Tolerance of an aerobic denitrifier (*Pseudomonas stutzeri*) to high O₂ concentrations. **Biotechnology Letters**, v. 36, p. 719–722, 2014.

JOO, H.; HIRAI, M.; SHODA, M. Characteristics of Ammonium Removal by Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification by *Alcaligenes faecalis* No . 4. **JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING**, v. 100, n. 2, p. 184–191, 2005.

KLEMZ, A. C. et al. Oilfield produced water treatment by liquid-liquid extraction: A review. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 199, n. December 2020, 2021.

KRAFT, B.; STROUS, M.; TEGETMEYER, H. E. Microbial nitrate respiration – Genes, enzymes and environmental distribution. **Journal of Biotechnology**, v. 155, n. 1, p. 104–117, 2011.

KUENEN, J. G. Anammox bacteria: From discovery to application. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 320–326, 2008.

KUNDU, P. et al. Simultaneous Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification by *Chryseobacterium* sp . R31 Isolated from Abattoir Wastewater. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 12, 2014.

KUYPERS, M. M. M.; MARCHANT, H. K.; KARTAL, B. The microbial nitrogen-cycling network. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 16, p. 263–276, 2018.

LEI, Y. et al. A novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium, *Zobellella taiwanensis* DN-7, can remove high-strength ammonium. **ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY A**, v. 2, n. 2, p. 4219–4229, 2016.

- LEMA, J. M. et al. Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit. **Water research**, v. 36, n. 10, p. 2555–60, 2002.
- LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows – Wheeler transform. v. 25, n. 14, p. 1754–1760, 2009.
- LIMA, R. M. G.; WILDHAGEM, G. R. DA S.; CUNHA, J. W. S. D. Remoção do Íon Amônio de Águas Produzidas na Exploração de Petróleo em Áreas Offshore por Adsorção em Clinoptilolita. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1237–1242, 2008.
- LIMPIYAKORN, T. et al. amoA -encoding archaea in wastewater treatment plants : a review. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 1425–1439, 2013.
- LIU, Y. et al. *Photobacterium* sp. NNA4, an efficient hydroxylamine-transforming heterotrophic nitrifier/aerobic denitrifier. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 128, n. 1, p. 64–71, 2019.
- LU, M. et al. International Biodeterioration & Biodegradation Biological treatment of oilfield-produced water: A field pilot study. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 316–321, 2009.
- 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 Research**, v. 37, p. 1239–1251, 2003.
- MAURER-STROH, S. et al. The Tudor domain ‘ Royal Family ’: **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 2, p. 69–74, 2003.
- METCAF; EDDY. Wastewater Engineering. In: **Environmentally Conscious Materials and Chemicals Processing**. [s.l: s.n.]. p. 207–235.
- MOORE, E. R. B. et al. **Nonmedical: Pseudomonas**. [s.l: s.n.].
- MOTTA, A. R. P. et al. Tratamento de água produzida de petróleo para remoção de óleo por processos de separação por membranas : revisão. **Eng Sanit Ambien**, v. 18, p. 15–26, 2013.
- MOTTA, M. D. et al. Estudos do Funcionamento de Estações de Tratamento de

Esgotos por Análise de Imagem: Validações e Estudos de Caso. **engenharia sanitária e ambiental** **171**, v. 8, p. 170–181, 2003.

NIERMAN, W.; EISEN, J. A.; FRASER, C. M. Microbial genome sequencing 2000 : new insights into physiology , evolution and expression analysis. **Res. Microbio**, v. 151, n. 15, p. 79–84, 2000.

OGUZ, M. T. et al. Concurrent nitrite oxidation and aerobic denitrification in activated sludge exposed to volatile fatty acids. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 6, p. 1562–1572, 2007.

OKAMURA-IKEDA, K. et al. Crystal Structure of Aminomethyltransferase in Complex with Dihydrolipoyl-H-Protein of the Glycine Cleavage System IMPLICATIONS FOR RECOGNITION OF LIPOYL PROTEIN SUBSTRATE , DISEASE-RELATED. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 24, p. 18684–18692, 2010.

OLIVEIRA, E. P.; SANTELLI, R. E.; CASSELLA, R. J. Direct determination of lead in produced waters from petroleum exploration by electrothermal atomic absorption spectrometry X-ray fluorescence using Ir – W permanent modifier combined with hydrofluoric acid. v. 545, p. 85–91, 2005.

OVERBEEK, R. et al. The Subsystems Approach to Genome Annotation and its Use in the Project to Annotate 1000 Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 17, p. 5691–5702, 2005.

PADHI, S. K. et al. Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of wastewater. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 78, p. 67–73, 2013.

PATIN, S. Environmental Impact of the Offshore Oil and Gas Industry. In: **Environmental Pollution**. [s.l: s.n.]. v. 110p. 7491.

PHILIPPOT, L. et al. Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous oxide reductase for N₂O emissions from soil. **Global Change Biology**, v. 17, n. 3, p. 1497–1504, 2011.

QUARTAROLI, L. et al. Ammonium removal from high-salinity oilfield-produced water:

assessing the microbial community dynamics at increasing salt concentrations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 2, p. 859–870, 2017.

QUARTAROLI, L. et al. Effect of the gradual increase of salt on stability and microbial diversity of granular sludge and ammonia removal. **Journal of Environmental Management**, v. 248, n. April, 2019.

REINBOLD, K. A.; PESCIPELLI, S. M. **Effects of Exposure to Ammonia on Sensitive Life Stages of Aquatic Organisms**. [s.l: s.n.].

RITTMANN, B. E.; LANGELAND, W. E. Simultaneous denitrification with nitrification in single-channel oxidation ditches. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, v. 57, n. 4, p. 300–308, 1985.

ROBERTSOW, L. A. et al. Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers. v. 56, n. 1984, p. 289–299, 1989.

ROBERTSOW, L. A.; KUENEN, G. Thiosphwra pantotropha gen. nov. sp. nov., a Facultatively Anaerobic, Facultatively Autotrophic Sulphur Bacterium. **Journal of General Microbiology (1983)**, v. 129, p. 2847–2855, 1983.

SAH, S.; SINGH, R. Phylogenetical coherence of Pseudomonas in unexplored soils of Himalayan region. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1–10, 2016.

SALMAN, R. H.; ABBAR, A. H. Chemical Engineering and Processing - Process Intensification Optimization of a combined electrocoagulation-electro-oxidation process for the treatment of Al-Basra Majnoon Oil field wastewater : Adopting a new strategy. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 183, n. September 2022, p. 109227, 2023.

SHU, H. et al. Nitrogen removal characteristics and potential application of the heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria Pseudomonas mendocina S16 and Enterobacter cloacae DS'5 isolated from aquaculture wastewater ponds. **Bioresource Technology**, v. 345, p. 126541, 2022.

SILVA, L. C. F. et al. Effect of salinity in heterotrophic nitrification/aerobic denitrification performed by acclimated microbiota from oil-produced water biological treatment

system. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 130, n. February, p. 1–7, 2018.

SILVA, L. C. F. **Nitrificação Heterotrófica/Desnitrificação Aeróbia: Caracterização de Isolados e Investigação das Vias Metabólicas**. [s.l: s.n.].

SILVA, L. C. F. et al. Heterotrophic nitrifying/aerobic denitrifying bacteria: Ammonium removal under different physical-chemical conditions and molecular characterization. **Journal of Environmental Management**, v. 248, n. April, 2019.

SILVA, L. C. F. et al. Physicochemical characterization of *Pseudomonas stutzeri* UFV5 and analysis of its transcriptome under heterotrophic nitrification/aerobic denitrification pathway induction condition. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.

STEPHENSON, M. T. **Components of Produced Water : A Compilation of Industry StudiesJPT**. [s.l: s.n.].

STROUS, M. et al. Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 6, p. 2446–2448, 1997.

SUN, Z. et al. Bioresource Technology Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a novel metal resistant bacterium *Cupriavidus* sp . S1. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 142–150, 2016.

TELLEZ, G. T.; NIRMALAKHANDAN, N.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Performance evaluation of an activated sludge system for removing petroleum hydrocarbons from oilfield produced water. **Elsevier**, v. 6, n. 470, p. 455–470, 2002.

TRAN, T. T. et al. Comparative Genome Analysis of Two Heterotrophic Nitrifying *Pseudomonas putida* Strains Isolated from Freshwater Shrimp Ponds in Soc Trang Province. **Fermentation**, v. 8, p. 336, 2022.

UEMOTO, H.; SAIKI, H. Nitrogen Removal by Tubular Gel Containing *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans*. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 62, n. 11, p. 4224–4228, 1996.

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, n. 3, p. 255–257, 2006.

VAZOLLER, R. F. et al. Biodegradability potential of two experimental landfills in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 87–92, 2001.

WALKER, B. J. et al. Pilon : An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly Improvement. **PLOS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

WANG, H. et al. Bioresource Technology Deciphering pollutants removal mechanisms and genetic responses to ampicillin stress in simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification (SHNAD) process treating seawater-based wastewater. **Bioresource Technology**, v. 315, n. July, p. 123827, 2020.

WUNDERLIN, P. et al. Mechanisms of N₂O production in biological wastewater treatment under nitrifying and denitrifying conditions. **Water Research**, v. 46, n. 4, p. 1027–1037, 2012.

YANG, L. et al. Bioresource Technology Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a metal resistant bacterium *Pseudomonas putida* strain NP5. **Bioresource Technology**, v. 285, n. April, p. 121360, 2019.

YANG, Y. et al. Insights into the mechanism of the deterioration of mainstream partial nitrification/anammox under low residual ammonium. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 126, p. 29–39, 2023.

YU, Z. et al. A Comprehensive Analysis of Structural and Sequence Conservation in the TetR Family Transcriptional Regulators. **Journal of Molecular Biology**, v. 400, n. 4, p. 847–864, 2010.

ZHANG, H. et al. Bioresource Technology Paracoccus versutus KS293 adaptation to aerobic and anaerobic denitrification : Insights from nitrogen removal , functional gene abundance , and proteomic profiling analysis. **Bioresource Technology**, v. 260, n. February, p. 321–328, 2018.

ZHANG, J. et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium

Pseudomonas stutzeri YZN-001. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 21, p. 9866–9869, 2011.

ZHANG, Q. et al. Bioresource Technology The characteristics of a novel heterotrophic nitrification – aerobic denitrification bacterium , *Bacillus methylotrophicus* strain L7. **Bioresource Technology**, v. 108, p. 35–44, 2012.

ZHAO, B. et al. Heterotrophic nitrogen removal by *Providencia rettgeri* strain YL. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 6, p. 609–616, 2010.

ZHAO, J. et al. Development of simultaneous nitrification-denitrification (SND) and organics removal in biofilm reactors with partially coupled a novel biodegradable carrier for nitrogen-rich water purification. **Bioresource Technology**, 2017.

CAPÍTULO 3

IDENTIFICAÇÃO DE GENES MARCADORES PARA O PROCESSO DE NITRIFICAÇÃO HETEROTRÓFICA/DESNITRIFICAÇÃO AERÓBICA EM GENOMAS BACTERIANOS

Lutecia Rigueira Medina^a, Alex Gazolla de Castro^b, Lívia Carneiro Fidélis Silva^c, Pedro Marcus Pereira Vidigal^d, Helena Santiago Lima^e Tiago Antônio de Oliveira Mendes^f, Cynthia Canêdo da Silva^{g*}

^aPós-graduação, Estudante, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. (lutecia.medina@ufv.br)

^bPh. D., Técnico-administrativo de Nível Superior, do Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. (alex.gazolla@ufv.br)

^cPh. D., Pesquisadora, Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia (livia.silva@ufv.br)

^dPh. D., Pesquisador, ocupando o cargo de Biólogo, Servidor Técnico-administrativo de Nível Superior, no Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBiomol), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. (pedro.vidigal@ufv.br)

^eM. Sc., Estudante, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. (hsantiagolima@gmail.com)

^fPh. D., Professor, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. (tiagoaomendes@ufv.br)

^gPh. D., Professora, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. (ccanedo@ufv.br)

*Autor correspondente: e-mail: ccanedo@ufv.br Av. Peter Henry Rolfs, s/n - Campus Universitário, Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos, Viçosa - MG, 36570-900, Tel.: +55-31-38992973.

RESUMO

No tratamento biológico de efluentes, a remoção biológica da amônia pode ocorrer por diferentes vias metabólicas, entretanto, a via de nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia (NH/DA) vem se destacando, devido às vantagens para o tratamento de efluentes, quando comparadas aos outros processos biológicos. Na NH/DA um único microrganismo nitrifica e desnitrifica em uma única condição de aerobiose, possibilitando a otimização de espaços e simplificação no processo de remoção de amônia. Por serem heterotróficos, eles utilizam a matéria orgânica como fonte de carbono, portanto removem amônia e carbono simultaneamente. Porém, pouco se sabe sobre essa via e várias questões ainda precisam ser respondidas para melhor entendimento do processo.

Visando a busca dos genes envolvidos nesta via metabólica, o objetivo deste trabalho foi identificar, por genômica comparativa, genes que possam estar envolvidos no processo de NH/DA, propondo assim possíveis biomarcadores moleculares para populações que realizam o processo de NH/DA. Portanto, pode-se inferir que a via metabólica do processo de Nitrificantes Heterotróficas/ Desnitrificantes Aeróbicos não é uma via comum para todos os microrganismos, porém apresentam alguns genes em comum para os diferentes grupos, porém apresentam genes que estão envolvidos na via NH/DA que estão presentes nas demais linhagens. São as proteínas que tem as seguintes funções: ribossomais que codificam proteínas envolvidas no processo de tradução proteica, glutamina sintetase, converte amônia em glutamina, aminometiltransferase, que catalisa a amônia para a porção aminometil da glicina, e uma delas não tem uma função definida. Essas por sua vez são candidatas a estarem envolvidas na via NH/DA.

A validação do envolvimento desses genes gera perspectivas como a identificação de vias NH/DA de outros microrganismos que ainda não foram descritos pela literatura, o monitoramento dessas bactérias em amostras ambientais como reatores de tratamento de efluentes, bem como a otimização do processo de remoção de amônia.

Palavras-chave: remoção de amônia, biomarcadores moleculares, PCR.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os tratamentos: físico, químico e biológico utilizados para remoção de amônia de efluentes domésticos e industriais, o tratamento biológico é o mais utilizado, devido a sua simplicidade e baixo custo comparado com os tratamentos físico-químicos (MOTTA et al., 2003). A remoção biológica da amônia pode ocorrer por diferentes vias metabólicas pela ação de diferentes grupos de microrganismos. A via da nitrificação autotrófica é realizada por diferentes tipos de bactérias e arqueias, em condições de aerobiose, no qual ocorre a oxidação da amônia em nitrito que em seguida é oxidado a nitrato (FERREIRA, 2000; LIMPIYAKORN et al., 2013). Na desnitrificação, o processo ocorre por bactérias heterotróficas em anaerobiose, onde o nitrato produzido da nitrificação é reduzido a nitrito, nitrito é reduzido a óxido nítrico, óxido nítrico é reduzido a óxido nitroso, que finalmente é reduzido a nitrogênio gasoso (WUNDERLIN et al., 2012). A nitrificação autotrófica seguida da desnitrificação anaeróbia são processos convencionais muito bem elucidados.

Outra via é a nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia (NH/DA), onde um único microrganismo é capaz de nitrificar e desnitrificar transformando a amônia diretamente em nitrogênio gasoso, em condições de aerobiose. Está por sua vez, vem se destacando nas estações de tratamento de efluentes. Por serem microrganismos heterotróficos, utilizam o carbono orgânico como fonte de energia, o que é muito interessante para aplicação nas estações de tratamento de efluentes, pois um único microrganismo remove carbono e amônia, que são extremamente prejudiciais ao meio ambiente. Tais características do processo também resultam em simplificação operacional e economia de espaço nas estações de tratamento de efluentes, visto que esse processo só requer a condição de aerobiose (QUARTAROLI et al., 2019).

Em função disso, várias espécies tem sido descritas como capazes de realizar o NH/DA, tais como: *Paracoccus denitrificans* (ROBERTSOW; KUENEN, 1983), *Alcaligenes faecalis* (JOO; HIRAI; SHODA, 2005), *Providencia rettgeri* (ZHAO et al., 2010), *Pseudomonas stutzeri* (ZHANG et al., 2011), *Agrobacterium sp. LAD9*, *Achromobacter sp. GAD3* e *Comamonas sp. GAD4* (PHILIPPOT et al., 2011), *Bacillus* spp. (ZHANG et al., 2012), *Rhodococcus* sp. (CHEN et al., 2012), *Halomonas*

campisalis (GUO et al., 2013), *Chryseobacterium* sp. R31 (KUNDU et al., 2014), *Cupriavidus* sp.(SUN et al., 2016), *Zobellella taiwanenses* (LEI et al., 2016), *Serratia Marcescens* (HUANG et al., 2017), *Paracoccus versutus* (ZHANG et al., 2018), *Arthrobacter nicotianae* (CAI et al., 2019), *Acinetobacter* sp. (CHEN et al., 2012) *Pseudomonas mendocina* (HE et al., 2019), *Pseudomonas putida* (YANG et al., 2019), *Photobacterium* sp. (LIU et al., 2019), *Gordonia amicalis* UFV4 (SILVA et al., 2019), *Pseudomonas balearica* UFV3 (SILVA et al., 2019), *Pseudomonas stutzeri* UFV5 (SILVA et al., 2019; ZHANG et al., 2011) e *Sphingopyxis* sp (CHEN et al., 2022).

Entretanto, por mais que a NH/DA seja uma via ou rota importante nas estações de tratamento de efluentes, ainda é pouco estudada, no qual não se conhece os genes envolvidos na sua via metabólica. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi identificar, por genômica, genes que possam estar envolvidos no processo de NH/DA, propondo assim os conhecimentos destes genes, bem como a busca por biomarcadores moleculares para populações que realizam o processo de NH/DA, visando um melhor conhecimento do ponto de vista ecológico e monitoramento desses microrganismos em estações de tratamento de efluentes e em amostras ambientais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Genômica comparativa de linhagens NH/DA e genes diferentemente expressos

A genômica comparativa foi realizada com o objetivo de identificar genes que codificam enzimas chave do processo de remoção de amônia da via NH/DA. Para isso utilizou-se 4 linhagens de bactérias NH/DA já descritas no trabalho de SILVA e colaboradores (2019) e no Capítulo 2 desta dissertação: *Rhodococcus ruber* UFV2 (número de acesso CP024890.1); *Pseudomonas balearica* UFV3 (número de acesso KX495190.2), *Gordonia amicalis* UFV4 (número de acesso número de acesso KU904410.1); e *Pseudomonas stutzeri* UFV5 (número de acesso KY616652.1).

A genômica foi realizada utilizando os genomas destas linhagens contra genes diferentemente expressos, descritos no trabalho de Silva et al. (2020). Estes autores fizeram um estudo do transcriptoma da linhagem *Pseudomonas stutzeri* UFV5 e

selecionaram genes que foram diferencialmente expressos em condição de indução da via NH/DA (Tabela 1). Adicionalmente a estas dados, foram incluídos a sequências genômicas disponíveis em banco de dados, como da bactéria *Nitrosomonas europaea* (número de acesso AL954747.1), que está envolvida do processo convencional de remoção de amônia e o genoma da bactéria *Micrococcus luteus* (número de acesso CP082331.1), uma bactéria que não remove amônia, que foi utilizada como controle negativo.

Tabela 1. Genes que foram diferencialmente expressos com o aumento da concentração de amônia na linhagem de *Pseudomonas stutzeri* UFV5 no trabalho de SILVA et al. (2019).

Código do gene no proteoma	Anotação do Pfam	Fold Change	p-value
WP_003294452.1	Alanine-zipper, major outer membrane lipoprotein	16,78	0,003064
WP_013982298.1	CsbD like - protein (ptna de resposta ao stress)	15,64	0,000306
WP_013983005.1	Protein of unknown function	8,30	0,000331
WP_011912999.1	Sulfurtransferase TusA	8,26	0,001586
WP_003293518.1	50S ribosomal protein L32	7,70	5,16E-05
WP_003298367.1	50S ribosomal protein L35	7,09	9,45E-05
WP_011911750.1	Phosphate-starvation-inducible E	4,35	0,004822
WP_003281814.1	50S ribosomal protein L36	4,08	0,002248
WP_013982283.1	Protein of unknown function	3,87	0,012064
WP_041771783.1	(Na ⁺)-NQR maturation NqrM	3,75	0,000266
WP_011912416.1	Protein of unknown function	3,54	0,00057
WP_011912373.1	30S ribosomal protein S16	3,52	0,009666
WP_013982479.1	Protein of unknown function	3,39	0,014046
WP_003284185.1	50S ribosomal protein L33	3,36	0,0011
WP_013982009.1	DNA-binding protein	3,29	0,004046
WP_011913664.1	Heme exporter protein D	3,23	0,001508
WP_041771612.1	50S ribosomal protein L28	2,93	0,006981
WP_003282211.1	'Cold-shock' DNA-binding domain	2,81	0,000332
WP_003246255.1	'Cold-shock' DNA-binding domain	2,60	7,47E-05
WP_003281834.1	50S ribosomal protein L29	2,59	5,17E-05
WP_013984129.1	Protein of unknown function	2,56	0,000175
WP_013983373.1	BFD-like [2Fe-2S] binding domain	2,42	8,85E-05
WP_003283670.1	NADH dehydrogenase	2,26	0,001049
WP_003300856.1	Protein of unknown function	1,94	0,001923
WP_026006463.1	Putative quorum-sensing-regulated virulence factor	1,90	0,000654

Fonte: Silva (2019)

Foi realizado uma genômica comparativa contrastando o genoma das quatro linhagens NH/DA, no qual posteriormente também foi realizada com todas sequencias

das enzimas conhecidamente envolvidas no processo convencional de remoção biológica de amônia obtidas no KEGG (KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

A ferramenta utilizada para realizar a genômica comparativa foi o BLAST da base de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), que confere as sequências de nucleotídeo obtidas das bactérias que foram analisadas contra os genes que foram diferentemente expressos na linhagem de *P. stutzeri* UFV5 no trabalho de SILVA e colaboradores (2018). Após análise do BLASTn, foi feito o BLASTp das proteínas das bactérias estudadas contra as proteínas que foram diferentemente expressas.

Primeiramente, foi realizado o BLASTn, no qual os genes das proteínas que foram diferencialmente expressas foram comparados com as sequências de nucleotídeos das bactérias a serem analisadas e posteriormente para garantir que não teve nenhum erro no processo de tradução foi realizado o BLASTp no qual as sequências dos aminoácidos dessas bactérias a serem analisadas comparadas com a sequência dos aminoácidos dos genes que foram diferencialmente expressos. Dessa forma, é possível identificar se houve algum erro durante a tradução proteica, sendo que contrastando contra somente a sequência de nucleotídeo não seria possível.

Posteriormente ao BLAST foram selecionadas as proteínas que obtiveram a identidade $\geq 30\%$, considerando assim que as sequências analisadas são as mesmas sequências das proteínas. A cobertura $\geq 70\%$ que significa quanto da proteína que o genoma cobriu e o valor estatístico *e-value* $\geq 10^{-5}$, onde resultados abaixo desse valor pode gerar resultado falso positivo. Os possíveis candidatos a marcadores serão selecionados obedecendo a três critérios: i) 30 % de identidade, ii) 70 % de cobertura e iii) *e-value* $\leq 10^{-5}$. A cobertura foi calculada dividindo o tamanho da *query* pelo tamanho da proteína e multiplicando por 100, gerando assim o resultado em porcentagem. Assim, as proteínas que atenderam esses critérios passaram para a etapa de anotação para determinar a sua função utilizando o PFAM (<http://pfam.xfam.org/>) (FINN et al., 2016).

2.2. Confirmação dos genes-chave *in-silico*

Os genes diferencialmente expressos do transcriptoma de *P. stutzeri* UFV5 (Silva et al., 2019) que foram encontrados nas linhagens NH/DA investigadas, estão sendo considerados neste trabalho como possíveis candidatos gênicos envolvidos no processo de NH/DA.

Assim, para confirmação dos genes diferencialmente expressos encontrados nas linhagens NH/DA estudadas, foi realizada uma genômica comparativa desses candidatos contra o genoma de outras bactérias descritas na literatura como capazes de realizar a NH/DA, de bactérias envolvidas no processo convencional de remoção de amônia e de bactérias que não são capazes de realizar a remoção de amônia. Todos os genomas foram baixados do banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (Anexo 1).

Seguindo as etapas descritas no item anterior, os possíveis candidatos a marcadores foram selecionados obedecendo a três critérios: i) pelo menos 30 % de identidade, ii) pelo menos 70 % de cobertura e iii) *e-value* $\leq 10^{-5}$. Os genes que atenderam esses critérios passaram para a etapa de anotação para determinar a sua função utilizando o PFAM (<http://pfam.xfam.org/>) (FINN et al., 2016).

Com essa análise foi possível verificar se os candidatos à genes envolvidos no processo de NH/DA também estavam presentes nos genomas das bactérias NH/DA descritas na literatura e se não estavam presentes nos microrganismos que não removem amônia.

2.3. Validação *in-vivo*

2.3.1. Desenho dos *Primers*

Para a confirmação dos genes candidatos a biomarcadores do processo NH/DA identificados *in silico* foram desenhados *primers* específicos para estes genes. Para o desenho dos *primers* foi preciso ter as sequências de interesse em formato FASTA e armazenadas em arquivo .txt, que foi utilizado no alinhamento pelo programa Clustal

Omega (LI; DURBIN, 2009). Feito isso, as sequências foram selecionadas de acordo com as regiões conservadas de cada linhagem.

Como duas das linhagens tratam do mesmo gênero e as outras duas são de gênero diferentes, o alinhamento foi realizado de acordo com a suas taxonomias, pois achar uma região conservada entre as quatro linhagens não foi possível. Identificando as regiões conservadas de acordo com as quatro linhagens os *primers* foram desenhados utilizando a ferramenta *GenScript*.

A plataforma *online* GenScript trata-se de uma plataforma *online* e customizável sendo capaz de determinar a temperatura média do par de *primers*, na qual se pode colocar a temperatura máxima desejada. Também determina a porcentagem de pares G+C e o tamanho do produto da amplificação dos primers. Além de possibilitar o desenho de *primers* para serem testados em q-PCR (PCR em Tempo Real. O desenho dos primers foi realizado obedecendo alguns parâmetros para assegurar o desempenho dos *primers*: em relação a quantidade de conteúdo de Guanina e Citosina contido na sequência, sendo normalmente de 40% a 60% (BURPO, 2001), pois pode ocorrer ligação mais forte entre essas regiões com alto conteúdo GC, interferindo na amplificação; os *primers* desenhados entorno de 18 a 20 pares de bases (pb) e a temperatura de anelamento em média de 65°C. Posteriormente, com as sequencias dos primers, estes foram enviados para síntese.

2.3.1. Reativação das linhagens bacterianas NH/DA

Para avaliar a presença dos genes candidatos nos genomas das linhagens NH/DA estudadas, *R. ruber* UFV2; *P. balearica* UFV3, *G. amicalis* UFV4 e *P. stutzeri* UFV5, as linhagens foram reativadas. Para isso, 5 µL das bactérias preservadas a -80°C foram inoculadas em 15 mL de meio Luria Bertani - LB (por litro: 10,0 g Peptona de caseína; 5,0 g de extrato de levedura; 10,0 g de NaCl; 15,0 g de Ágar, pH 6,8) em um tubo Falcon de 50 mL novo. Os tubos foram incubados a 30°C sob agitação de 150 rpm por 24 horas.

Para avaliar se não houve contaminação das linhagens o mesmo meio utilizado posteriormente foi feito :meio Luria Bertani - LB (por litro: 10,0 g Peptona de caseína; 5,0 g de extrato de levedura; 10,0 g de NaCl; 15,0 g de Ágar, pH 6,8). O meio foi

transferido para as placas de petri e posteriormente foi feita estria simples para garantir que as mesmas estavam puras.

2.3.2. Extração do DNA total das linhagens NH/DA

Para extração do DNA total das bactérias, 5,0 mL da cultura foi centrifugado a 6.000 *g* por 10 minutos. A extração do DNA foi feita utilizando o kit *NucleoSpin Soil* (MACHEREY-NAGEL) seguindo as instruções do fabricante com algumas modificações. Após ressuspender as células em tampão de extração do kit, as mesmas foram submetidas a uma etapa de lise enzimática, com adição de 100 mg. mL⁻¹ de Lisozima (sigma), incubadas em banho-maria a 37 °C por 30 minutos, e homogenizadas a cada 10 minutos. Logo após, seguiu-se a metodologia proposta pelo protocolo do kit.

A qualidade do DNA extraído das quatro linhagens foi avaliada em gel de agarose 1%, o qual foi corado com *GelRed* (Biotium, USA) e após eletroforese, visualizado em transluminador (*Applied Biosystems*, USA). A quantificação das amostras foi realizada em *Nanodrop* (*Nanodrop ND-1000*, *Nanodrop Technologies Inc.*, USA).

2.3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Após a extração do DNA total das linhagens, a confirmação dos genes candidatos foi realizada por PCR. Portanto, na primeira reação de PCR, foram utilizados os *primers* universais: 10f e 1100r (20 µM) (Lane et al., 1985), específicos para regiões conservadas do gene RNAr 16S do Domínio Bacteria. A reação utilizada para esse par de *primer* foi a mesma que foi utilizada para os primers construídos, utilizado 1 µl do DNA das amostras. Em seguida, a reação foi conduzida nas seguintes condições: desnaturação inicial 95° C por 5 min, seguida por 30 ciclos: 95° C por 1 min; anelamento do primer a 57 °C por 0:25 segundos; 72° C por 1 min e uma extensão final a 72° C por 5 min. Essa etapa foi realizada somente para confirmar se o material genético extraído estava com boa qualidade para amplificação.

Posteriormente, foram realizadas diversas reações de PCR convencionais para validar os *primers* construídos (Tabela S1). As reações foram realizadas conforme o quadro com as quantidades de: desoxinucleotídeos (dNTP), MgCl₂, tampão, Taq DNA

polimerase, água milli-Q autoclavada, os primers que foram desenhados e o DNA alvo. Em seguida, essa reação foi submetida a uma série de ciclos de amplificação com três temperaturas diferentes que identifica as etapas de: desnaturação da fita dupla do DNA, anelamento e extensão dos primers. Todas as reações de PCR estão descritas abaixo e foram realizadas de acordo com as condições descritas por Le Fichoux e colaboradores (1999), com as seguintes modificações no programa: desnaturação inicial 95° C por 5 min, seguida por 30 ciclos: 95° C por 1 min; os primers são anelados em diferentes temperaturas de acordo com os pares de primers (57 °C a 67° C) por 1 min; 72° C por 1 min e uma extensão final a 72° C por 5 min.

Quantidade dos componentes utilizados na reação de PCR:

Reação de PCR (25 µL)
5 µL de Tampão <i>Green</i>
1,5 µL de MgCl ₂ (25mM)
1 µL de dNTP (10mM)
0,5 µL de <i>primer (forward)</i> - 20 µM
0,5 µL de <i>primer (reverse)</i> 20 µM
2 µl de DNA
0,125 µL de Taq DNA Polimerase (2,5 U/µl)
12,87 µL de de água <i>milli-q</i> autoclavada

Os *amplicons* foram verificados em gel de agarose 2%, corado com *UniSafe Dye* (uniscience) e visualizados em transluminador (*Applied Biosystems*, USA).

A reação de PCR foi realizada para as linhagens de interesse (*Rhodococcus ruber* UFV2, *Pseudomonas balearica* UFV3, *Gordonia amicalis* UFV4 e *Pseudomonas stutzeri* UFV5), para uma amostra ambiental (lodo nitrificante) e bactérias que não estão envolvidas na NH/DA usadas como controle negativo (*Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* e *Pseudomonas aeruginosa*).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Genômica Comparativa

Na genômica comparativa avaliamos *in silico* quais dos genes diferencialmente expressos na linhagem *P. stutzeri* UFV5 e quais dos genes envolvidos no processo

convencional estavam presentes nos genomas das quatro linhagens NH/DA estudadas, *Pseudomonas stutzeri* UFV5, *Pseudomonas balearica* UFV3, *Rhodococcus ruber* UFV2 e *Gordonia amicalis* UFV4.

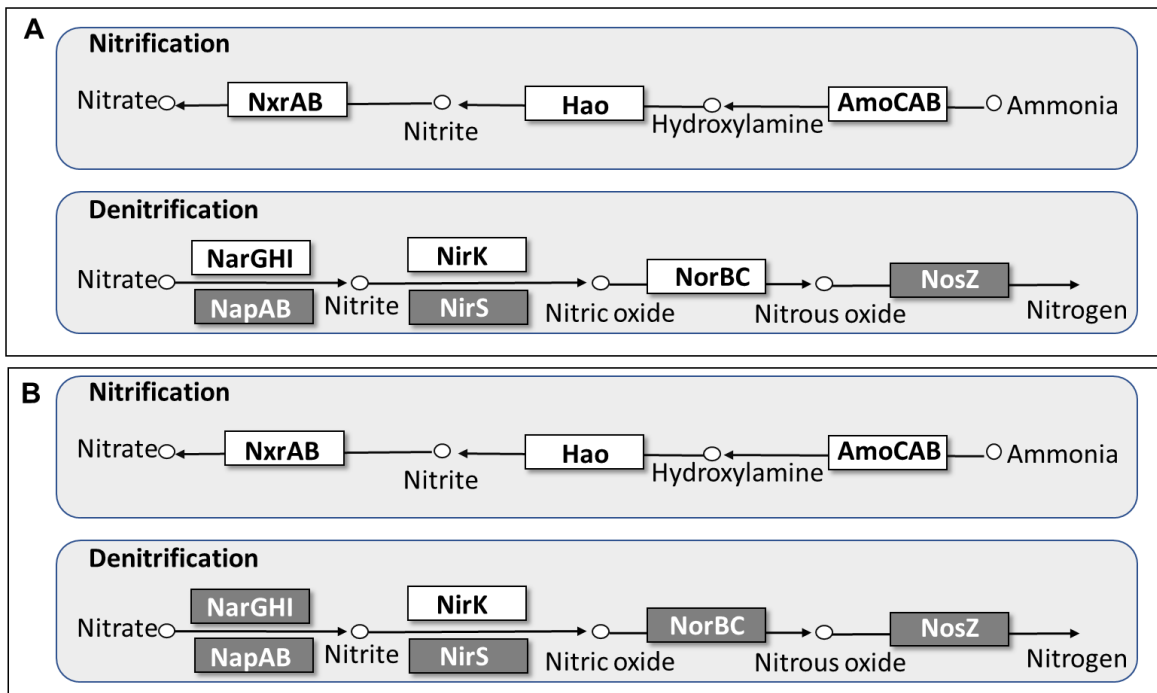
O BLASTp realizado com a sequência traduzida dos genes que codificam as enzimas envolvidas na nitrificação autotrófica e desnitrificação anaeróbica contra as sequências *Pseudomonas stutzeri* UFV5 e *Pseudomonas balearica* UFV evidenciou que nenhum dos genes envolvidos na nitrificação autotrófica foram observados nestas linhagens, todavia foram encontrados genes envolvidos na desnitrificação aeróbica, mas esse resultado por sua vez já era esperado, pois espécies do gênero *Pseudomonas* são descritas como desnitrificantes anaeróbicos (RITTMANN; LANGELAND, 1985) (Figuras 1 A e B).

O trabalho de Silva e colaboradores (2019) testou por PCR os genes envolvidos no processo convencional nas quatro linhagens NH/DA avaliadas, todavia não foi feito *in silico* como neste estudo. Entretanto, Silva et al. (2019) acreditam que por mais que os genes da desnitrificação anaeróbica estejam presentes nas linhagens estudadas, não significa que estejam envolvidos no processo de NH/DA, visto que as bactérias NH/DA realizam a desnitrificação aeróbica. Estudos futuros de RT-PCR e transcriptoma serão realizados para testar esta hipótese.

Já para as linhagens *Rhodococcus ruber* UFV2 e *Gordonia amicalis* UFV4 não foi encontrado nenhum dos genes envolvidos no processo de remoção de amônia convencional. Estes dados também corroboram com os resultados observados em Silva et al. (2019).

A análise da genômica do genoma das linhagens NH/DA e das bactérias *Micrococcus luteus* e *Nitrosomonas europaea* contra os genes que foram diferentemente expressos em *Pseudomonas stutzeri* UFV5 (Silva e colaboradores, 2020) mostrou que cinco das proteínas codificadas pelos genes diferencialmente expressos, que são: WP_013982320.1, WP_013982283.1, WP_013983347.1, WP_010594313.1 e WP_005260096.1, foram observadas em pelo menos três linhagens NH/DA estudadas e não foram observados em *M. luteus* ou *N. europaea*. Portanto são fortes candidatas a estarem envolvidas no processo de NH/DA e, portanto, selecionadas para o desenho de *primer* (Tabela 1).

Figura 1. Genômica das linhagens NH/DA: *Pseudomonas stutzeri* UFV5 (A) e *Pseudomonas balearica* UFV3 (B), contra genes envolvidos na via nitrificação autotrófica e desnitrificação anaeróbica de acordo com KEEG. Os genes preenchidos com (■) foram encontrados na linhagem NH/DA deste estudo.



A proteína identificada por WP_013982320.1 tem a função desconhecida e a WP_013982283.1 é uma proteína do domínio DUF2945 que pertence o domínio Tudor, incluindo domínios chromo, MBT e PWWP (MAURER-STROH et al., 2003). Todavia a função ainda não é clara, porém está envolvida na função da regulação da transcrição, positiva e negativa (EISSENBERG, 2001). Já a WP_013983347.1 tem como função ser reguladores transcricionais (TFRs) (YU et al., 2010), sendo já descritas para os gêneros das *Pseudomonas* e *Gordonia*. A WP_010594313.1 glutamina sintetase, no qual converte amônia em glutamina (BLANCO, 2017) e a WP_005260096.1 aminometiltransferase que catalisa a amônia para a porção aminometil da glicina (OKAMURA-IKEDA et al., 2010), ambas proteínas foram encontradas somente nas quatro linhagens bacterianas NH/DA deste estudo.

De acordo com trabalho de TRAN e colaboradores (2022) as proteínas glutamina sintetase e aminometiltransferase foram encontradas nas linhagens NH/DA *Pseudomonas* TT321 e *Pseudomonas* TT322. Porém este estudo é o primeiro que

observou genes que codificam essas enzimas (glutamina sintetase e aminometiltransferase) em linhagens NH/DA do gênero *Gordonia* e *Rhodococcus*.

Além destas cinco, as proteínas encontradas em pelo menos três das linhagens bacterianas NH/DA estudadas também foram selecionadas, exceto WP_013983005.1 pois, não apresentou uma região bem conservada entre as três linhagens estudadas, isso dificultaria muito o *designer* dos *primers* não resultando assim em um bom alinhamento. Os resultados do BLAST podem ser observados na tabela 1.

Três das proteínas candidatas a estarem envolvidas na NH/DA foram encontradas nas quatro linhagens NH/DA, que são as proteínas: WP_003282211.1, ligadas ao choque térmico, WP_011912146.1 proteína ribossomal 50S L27 e WP_003281834.1 proteína ribossomal 50S L29. Todavia, também foram encontradas no genoma da bactéria que está envolvida no processo convencional. Os genes que foram encontrados também nas bactérias envolvidas no processo convencional não foram descartados, pois como não se sabe quais genes estão envolvidos na via NH/DA e principalmente pelo fato de que o gene ter sido encontrado nas linhagens não indica que o mesmo está sendo expresso durante a via.

E as duas últimas, WP_011912146.1 e WP_003281834.1, que são proteínas ribossomais envolvidas no processo de tradução proteica, que foram selecionadas com base na conclusão de SILVA et al. (2020). Neste trabalho envolvendo o estudo do transcriptoma de *P. stutzeri* UFV5 em via NH/DA induzida, os autores concluíram que houve um aumento na expressão de proteínas da maquinaria de tradução celular, portanto estes alvos também foram selecionados como possíveis candidatos.

Tabela 1. Presença ou ausência dos genes nas linhagens NH/DA (*Rhodococcus ruber* UFV2; *Pseudomonas balearica* UFV3, *Gordonia amicalis* UFV4 e *Pseudomonas stutzeri* UFV5), *Nitrosomonas europaea* e *Micrococcus luteus*, contra genes que foram diferencialmente expressos na linhagem *P. stutzeri* UFV5. Os quadrados que estão (■) significa que foram encontrados os genes que codificam a proteínas no genoma das linhagens avaliadas neste estudo.

Proteínas	Linhagens					
	<i>P. stutzeri</i> UFV5	<i>P. balearica</i> UFV3	<i>R. ruber</i> UFV2	<i>G. amicalis</i> UFV4	<i>N. europaea</i>	<i>M. luteus</i>
WP_013982320.1						
WP_003246255.1						
WP_013983373.1						
WP_003283670.1						
WP_003293422.1						
WP_041771612.1						
WP_026006463.1						
WP_013983644.1						
WP_013983005.1						
WP_013982942.1						
WP_013982283.1						
WP_013982024.1						
WP_011912999.1						
WP_011912373.1						
WP_003298367.1						
WP_003284185.1						
WP_003282211.1						
WP_003281814.1						
WP_041771783.1						
WP_013984129.1						
WP_013983984.1						
WP_013983347.1						
WP_013982479.1						
WP_013982009.1						
WP_011913772.1						
WP_011913664.1						
WP_011913223.1						
WP_011912146.1						
WP_011911750.1						
WP_003294452.1						
WP_003293518.1						
WP_003290642.1						
WP_003281834.1						
WP_010594313.1						
WP_005260096.1						

Foi selecionada WP_013982024.1, uma proteína hipotética presente somente nas linhagens de *Pseudomonas* (*Pseudomonas stutzeri* UFV5 e *Pseudomonas balearica* UFV3) avaliadas neste estudo. Ao todo foram selecionados nove genes com potencial e testados.

3.2 Validação dos primers para os candidatos a biomarcadores

Pelo fato das quatro linhagens bacterianas NH/DA pertencente a três gêneros diferentes, verificou-se que identificar uma região conservada entre elas seria difícil, portanto, foram alinhadas de acordo com a ordem das linhagens NH/DA. Assim, foram construídos *primers* de acordo com os grupos bacterianos, *P. stutzeri* UFV5 e *P. balearica* UFV3, e *primers* para *R. ruber* UFV2 e *G. amicalis* UFV4. Ao final foram desenhados 31 pares de *primers* para os genes que codificam as nove proteínas selecionadas presentes nas 4 linhagens NH/DA (Tabela 2).

Os *primers* desenhados possuem de 18 a 20 pares de bases (pb) (Material suplementar) e o tamanho dos fragmentos a serem amplificados (*amplicon*) variaram de 56 a 200 nucleotídeos. Os *primers* já foram desenhados pensando no q-PCR (PCR quantitativo), por isso o tamanho dos *amplicons*. Para assegurar o desempenho dos *primers* alguns parâmetros foram seguidos. Nos primers desenhados a quantidade de conteúdo de Guanina e Citosina contido na sequência, foi entre 40% a 60% e a temperatura entorno de 60°C a 67°C.

Tabela 2. *Primers* construídos a partir das proteínas selecionadas por transcriptoma e comparadas com as quatro linhagens NH/DA estudadas neste trabalho.

	<i>Primer</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	<i>Alvo</i>	<i>Tm</i>
WP_013982320.1	1.1	CACGCCTGGCTGATCATTCG	GCCGCTTGACCTTCTGGTTT	A, B, C e D	66 °C
	1.2	ATCGCGATCTGGCATTGTCTG	GTAGCGTTGGCCTGTTGC		
WP_013982024.1	3.1	TGGCAGATCCTTTTCGAGCGT	CGCAGCTGTGCCATAACTC		
	3.2	GTCATCGGCAGTGGTTGCAC	CTGAATCGCACGGCACCTG		
WP_013982283.1	2	GTTCAAGGTCGGCGATCACG	GGGTCCGGCCCATGAACTC	A e B	63 °C
	P1_2283.1	CACCGCAGTACGAGATCAAG	GTCAGCGCCGACTCTTTATG		
	P2_2283.1	GTGAGCTGGAACCTCGGAAG	GTGTGCACCCGAGTGATG		
	R_2283.1	TCATCATCGCAAAGCACACC	GATCGGTCTTGTCTGCTCTTG	C	
WP_003282211.1	P1_2211.2	ACCGGTACCGTTAAGTGGTT	CCTGAACTTCCTCAGCTTGC	A e B	64 °C
	P2_2211.2	AAAGGCTTCGGCTTCATCAC	GAATGGCACGGAAGTGACG		
	RG1_2211.1	GAAGGGCTTCGGCTTCATTG	ATCTCGGAGAAGTGACGAA	C e D	
	RG2_2211.1	GGACGTCTTCGTGCACTTC	TCAGCCGATGACGGTGAC		
WP_013983347.1	P1_83347.1	GCTCAACACCGCAGAGAATC	AGCTCGTCCTTGACTTGAA	A e B	64 °C
	P2_83347.1	AAGTCCAAGGACGAGCTGAT	ATCGTTGCCGTGAATCATCC		
	G1_83347.1	AGAGCTCCGAGGAGAACTG	GCCTCTTTGCTGCGGTAG	D	
	G2_83347.1	CAGATCCTCGTGTGGTCA	GATGAGTGTCTGCGGATCT		
WP_011912146.1	P1_12146.1	CTTGGCGTGAAGATGTACGG	GCTGACGCACGATGATGTTG	A e B	64 °C
	P2_12146.1	AAAGCTGGCGTTCTACCC	CATCTTCACGCCAAGTCGTT		
	RG1_12146.1	ATTCCAACGCCAAGCGTCT	AACGATGTTGACCGTCTTGC	C e D	
	RG2_12146.1	CACAAGAAGGGTGCATCCAG	CTTGACGCCGAGACGCTT		
WP_003281834.1	P1_1834.1	CGTATGCAGAAAGCGACTGG	TGCTGGTTGAGCACAGTCTT	A e B	63 °C
	P2_1834.1	TTGAGCAGCTGAACGAGCAA	TGCATACGCAGATTGAACTGG		
	RG1_1834.1	CGAGCTGACCGAGGAAGAG	GTGGCCATCTGGAACGAAG	C e D	
	RG2_1834.1	AACCTTCGTTTCCAGATGGC	CGCAGCACCGTGTAGATG		
WP_003303577.1	Enz1	ATGGACGTCTTCGAGCAGAT	GGATCGGAGATCGACTGGTT	C e D	64 °C
	Enz2	TTCGAGTACTACGGGCTCAC	ATCAGTCCGGTGATCTCCAC		
	Enz3	CAGATCCTGGTGTTCAGCG	TCATCGGCTTTGCCATGAAG	A e B	
	Enz4	AGATGGGCAACCTATCGAG	CATCTTCAGCACACGCTTGA		
WP_005260096.1	Enz5	GTTGACGTCAGTCATCTGG	CCTCGTCGGAGACGTAGTAG	C e D	63 °C
	Enz6	GTCTCCGACGAGGAAGTGT	AAGCTCATGTAGCCAGGTC		
	Enz7	CTCCTACGCTTGGCAAATCC	CACTTGCCACGAATCTCCAC	A e B	

As letras A, B, C e D no alvo indicam respectivamente: *P. stutzeri* UFV5, *P. balearica* UFV3, e *primers* para *R. ruber* UFV2 e *G. amicalis* UFV4.

3.3 Validação por PCR

Para confirmação dos *primers* desenhados para os candidatos gênicos envolvidos no processo NH/DA e se poderiam ser usados como marcadores moleculares dos microrganismos NH/DA, foi realizada a reação de PCR. Alguns dos pares de *primers* apresentaram temperaturas de anelamento bem altas como 66 °C, quanto mais alta é a temperatura de anelamento dos *primers*, maior é a especificidade do mesmo com a região alvo. Porém alguns pares de *primers* amplificaram somente em temperaturas mais baixas como 57 °C.

Os pares de primers que foram desenhados para as proteínas WP_013982283.1, WP_011912146.1, WP_003281834.1, WP_003303577.1 e WP_005260096.1 foram todos amplificados para as quatro linhagens bacterianas NH/DA (Figura 2). Para essas cinco proteínas, foi realizado diversos testes diluindo mais o DNA e os *primers*, abaixando a quantidade de magnésio e diminuindo a temperatura de anelamento, que possibilitou a amplificação nas linhagens de estudo. Porém para amplificação de *R. ruber* UFV2, por apresentar maior conteúdo %GC, foi necessária uma etapa adicional em relação as demais linhagens, precisou de aquecer a 95 °C a alíquota de DNA por 10 min antes da adição do mix. As bactérias *E.coli*, *Micrococcus luteus* e *Pseudomonas aeruginosa* usadas como controle negativo não amplificaram em nenhuma das condições testadas, comprovando a especificidade dos *primers* desenhados.

Os pares de *primers* que amplificaram para todas as linhagens NH/DA foram: 2 e 3.2. E como esperado, o *primer* P2_2146.1 amplificou para as linhagens do gênero de *Pseudomonas* e o par RG1_2146.1 amplificou para *R. ruber* UFV2 e *G. amicalis* UFV4, ambos foram desenhados para regiões gênicas da mesma proteína. Os pares de *primers* P1_1834.1 e P2_1834.1 também amplificaram em todas as linhagens NH/DA. E os pares de *primers* Enz1 amplificou somente para *G. amicalis* UFV4, o par Enz2 amplificou para *R. ruber* UFV2 e *G. amicalis* UFV4, e os pares de *primers* Enz3 e Enz4 amplificaram para *Pseudomonas*.

Figura 2. Resultado da reação do PCR de acordo com os primers desenhados entre as linhagens NH/DA estudadas, *Rhodococcus ruber* UFV2; *Pseudomonas balearica* UFV3, *Gordonia amicalis* UFV4 e *Pseudomonas stutzeri* UFV5. Lodo biológico nitrificante como controle positivo e como controle negativo: *E.coli*, *Micrococcus luteus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A cor cinza entre os quadrinhos representa a amplificação positiva para os pares de *primers* desenhados neste estudo.

Primers	Linhagens NH/DA					<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	Lodo nitrificante	<i>P. stutzeri</i> UFV5	<i>P. balearica</i> UFV3	<i>R. ruber</i> UFV2	<i>G. amicalis</i> UFV4			
1.1								
1.2								
2								
3.1								
3.2								
P1_2283.1								
P2_2283.1								
P1_2211.2								
RG1_2211.1								
P1_83347.1								
G2_83347.1								
P2_2146.1								
RG1_2146.1								
P1_1834.1								
P2_1834.1								
Enz1								
Enz2								
Enz3								
Enz4								
Enz7								

O par de *primers* P1_2211.2 e RG1_2211.1 amplificaram para as três linhagens bacterianas NH/DA, *P. stutzeri* UFV5 e *P. balearica* UFV3 e *G. amicalis* UFV4. O mesmo ocorreu para os pares de *primers* P1_2211.2 e RG1_2211.1, porém neste caso, o resultado era esperado, pois a proteína WP_003282211.1 não foi identificada na sequência genômica de *R. ruber* UFV2.

Entretanto, algumas proteínas WP_013982320.1 e WP_013982283.1, no quais foram desenhados pares de *primers* só amplificaram para as linhagens do gênero de *Pseudomonas*, nem os pares de primers que foram desenhados para *R. ruber* UFV2 amplificou nesse caso, visto que as proteínas (WP_013982320.1 e WP_013982283.1) não foram encontradas *in-silico* em *G.amicalis* UFV4. E para confirma se esses *primers* seria bons marcadores moleculares para as linhagens de NH/DA deste gênero, foi realizada a reação de PCR com *Pseudomonas aeruginosa*, que não é uma bactéria NH/DA e o resultado foi negativo. Tais testes indicaram que os pares de *primers* 1.1, 1.2, P1_2283.1 e P2_2283.1, podem ser bons marcadores moleculares para detectar bactérias do gênero *Pseudomonas* capazes de realizar o processo NH/DA.

Em todos os primers desenhados e que amplificaram para as linhagens do gênero de *Pseudomonas* (*P. stutzeri* UFV5 e *P. balearica* UFV3), amplificaram para a amostra ambiental do lodo nitrificante. Todavia, a amostra ambiental não amplificou para os primers que foram desenhados para as outras duas linhagens (*R. ruber* UFV2 e *G.amicalis* UFV4).

Os demais primers que não amplificaram para nenhuma linhagem NH/DA, não são considerados regiões boas para a amplificação para os alvos de interesse, então um novo designer tem que ser feito nesse caso, visto que ambos os casos foram testados em diversas condições.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos por meio da genômica comparativa feita com as proteínas que foram diferencialmente expressa na linhagem de *Pseudomonas stutzeri* UFV5 mostrou que entre as 34 proteínas que foram diferencialmente expressas, somente 9 foram selecionadas a partir da similaridade das quatro linhagens bacterianas NH/DA. Então podemos inferir que a via metabólica do processo de Nitrificantes Heterotróficas/Desnitrificantes Aeróbicos não é uma via comum para todos os microrganismos, porém pode ter genes envolvidos na via NH/DA que estão presentes em todas as linhagens, podendo assim serem utilizados como marcadores moleculares, permitindo identificar e monitorar esses grupos em amostras ambientais.

Os pares de primers desenhados para as três proteínas que foram indentificadas *in silico* nas linhagens NH/DA e na bactéria envolvida no processo convencional, não foram amplificados nas linhagens NH/DA. Todavia as proteínas WP_013982283.1, WP_011912146.1, WP_003281834.1, WP_003303577.1 e WP_005260096.1, são proteínas candidatas a estarem envolvidas na via NH/DA entre diferentes grupos de microrganismos que realizam a via de NH/DA. As sequências, WP_011912146.1 e WP_003281834.1, são proteínas ribossomais que codificam proteínas envolvidas no processo de tradução proteica. Já a proteína WP_010594313.1 é uma glutamina sintetase, que converte amônia em glutamina e a proteína WP_005260096.1 é uma aminometiltransferase que catalisa a amônia para a porção aminometil da glicina. Todavia a proteína WP_013982283.1, não tem uma função putativa. Essas por sua vez são candidatas a estarem envolvidas na via NH/DA, porém como muitas proteínas são hipotéticas isso dificulta a elucidação da via. Portanto, primers foram desenhados e validados para essas proteínas. Para confirmar se esses genes estão envolvidos realmente na via NH/DA, estudos ligados a mutação terão que ser feitos com essas cinco enzimas, no quais serão silenciados para validar o envolvimento dos mesmos no processo de NH/DA.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho caracterizou as quatro linhagens bacterianas NH/DA: (*P. stutzeri* UFV5, *P. balearica* UFV3, *R. ruber* UFV2 e *G.amicalis* UFV4). Dentre os genomas das quatro linhagens bacterianas estudadas, pode-se observar que poucos genes foram identificados envolvidos no metabolismo do nitrogênio. Portanto, o processo de NH/DA não é um processo comum para diferentes grupos microbianos, porém compartilham genes, estes por sua vez podem ser utilizados como marcadores moleculares para o processo.

Portanto, foram selecionadas quatro proteínas: proteínas ribossomais, glutamina sintetase, aminometiltransferase e proteínas com função não definida. Essas por sua vez são candidatas a estarem envolvidas na via NH/DA. Todavia, para confirmar se esses genes estão envolvidos realmente na via NH/DA, estudos ligados a mutação terão que ser feitos.

A validação do envolvimento desses genes gera perspectivas como a identificação de vias NH/DA de outros microrganismos que ainda não foram descritos pela literatura, o monitoramento dessas bactérias em amostras ambientais como reatores de tratamento de efluentes, bem como a otimização do processo de remoção de amônia. Esta é uma linha de pesquisa que possui muitas etapas a serem descobertas e podem corroborar para inúmeros benefícios nos tratamentos biológicos para remoção de nitrogênio amoniacal em efluentes, não só para remoção de amônia, mas também para outros contaminantes, visto que a produção do petróleo vem aumentando consideravelmente ao longo dos anos.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento a FAPEMIG, CNPQ e CAPES pelo suporte financeiro e pela bolsa de estudos do primeiro autor desse trabalho. Agradecemos também, a PETROBRÁS pela parceria e a disponibilização das amostras de lodo da linha de estudo desse projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMURA-IKEDA, K. et al. Crystal Structure of Aminomethyltransferase in Complex with Dihydrolipoyl-H-Protein of the Glycine Cleavage System IMPLICATIONS FOR RECOGNITION OF LIPOYL PROTEIN SUBSTRATE , DISEASE-RELATED. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 24, p. 18684–18692, 2010.

AHN, Y. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1709–1721, 2006.

AMINI, S. et al. Chemical Engineering Research and Design Mathematical modelling of a hydrocyclone for the down-hole oil – water separation (DOWS). **Chemical Engineering Research and Design**, v. 90, n. 12, p. 2186–2195, 2012.

AZIZ, R. K. et al. The RAST Server : Rapid Annotations using Subsystems Technology. v. 15, p. 1–15, 2008.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Genome analysis Trimmomatic : a flexible trimmer for Illumina sequence data. v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BRASIL, M. DE M. E E. **Plano decenal de expansão de energia 2022**. [s.l: s.n.].

BURPO, F. J. A critical review of PCR primer design algorithms and cross-hybridization case study. **Biochemistry**, n. January 2001, 2001.

CAI, X. et al. Characteristics of Heterotrophic Nitrifying and Aerobic Denitrifying *Arthrobacter nicotianae* D51. **Water**, v. 11, p. 434, 2019.

CHEN, P. et al. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus* sp. CPZ24. **Bioresource Technology**, v. 116, n. April 2008, p. 266–270, 2012.

CHEN, P. et al. Characterization of a novel salt-tolerant strain *Sphingopyxis* sp. CY-10 capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. **Bioresource Technology**, v. 358, n. May, p. 127353, 2022.

DA LUZ, C. et al. A multiscale model for carbon adsorption of BTX compounds: Comparison of volume averaging theory and experimental measurements. **Chemical Engineering Science**, v. 184, p. 285–308, 2018.

DANFORTH, C. et al. An integrative method for identification and prioritization of constituents of concern in produced water from onshore oil and gas extraction. **Environment International**, v. 134, n. November 2019, p. 105280, 2020.

EISSENBERG, J. C. Molecular biology of the chromo domain : an ancient chromatin module comes of age. **Elsevier**, v. 275, p. 19–29, 2001.

FAKHURU, A. et al. Review of Technologies for Oil and Gas Produced Water Treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, p. 530–551, 2009.

FERREIRA, E. S. **I-121 - CINÉTICA QUÍMICA E FUNDAMENTOS DOS PROCESSOS DE**. [s.l: s.n.].

FICHOUX, Y. L. E. et al. Occurrence of Leishmania infantum Parasitemia in Asymptomatic Blood Donors Living in an Area of Endemicity in Southern France. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 37, n. 6, p. 1953–1957, 1999.

FINN, R. D. et al. The Pfam protein families database : towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. December 2015, p. 279–285, 2016.

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.

GABARDO, I. T. **Caracterização Química e Toxicológica da Água Produzida Descartada em Plataformas de Óleos e Gás na Costa Brasileira e seu Comportamento Dispersivo no Mar**. [s.l: s.n.].

GUO, Y. et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel Halomonas campisalis. **Biotechnol Lett (2013)**, v. 35, p. 2045–2049, 2013.

HE, X. et al. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification – aerobic denitrification of a novel halotolerant bacterium Pseudomonas mendocina TJPU04. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 5, p. 853–866, 2019.

HUANG, F. et al. Characterization of novel Bacillus strain N31 from mariculture water capable of halophilic heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 124, n. 5, p. 564–571, 2017.

HUANG, F. et al. Identification, interactions, nitrogen removal pathways and performances of culturable heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria from mariculture water by using cell culture and metagenomics. **Science of the Total Environment**, v. 732, p. 139268, 2020.

HUANG, X. et al. Bioresource Technology Ammonium removal by a novel oligotrophic *Acinetobacter* sp . Y16 capable of heterotrophic nitrification – aerobic denitrification at low temperature. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 44–50, 2013.

JETTEN, M. S. M. et al. The anaerobic oxidation of ammonium. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, n. 5, p. 421–437, 1998.

JI, B.; WANG, H.; YANG, K. Tolerance of an aerobic denitrifier (*Pseudomonas stutzeri*) to high O₂ concentrations. **Biotechnology Letters**, v. 36, p. 719–722, 2014.

JOO, H.; HIRAI, M.; SHODA, M. Characteristics of Ammonium Removal by Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification by *Alcaligenes faecalis* No . 4. **JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING**, v. 100, n. 2, p. 184–191, 2005.

KLEMZ, A. C. et al. Oilfield produced water treatment by liquid-liquid extraction: A review. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 199, n. December 2020, 2021.

KRAFT, B.; STROUS, M.; TEGETMEYER, H. E. Microbial nitrate respiration – Genes , enzymes and environmental distribution. **Journal of Biotechnology**, v. 155, n. 1, p. 104–117, 2011.

KUENEN, J. G. Anammox bacteria: From discovery to application. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 320–326, 2008.

KUNDU, P. et al. Simultaneous Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification by *Chryseobacterium* sp . R31 Isolated from Abattoir Wastewater. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 12, 2014.

KUYPERS, M. M. M.; MARCHANT, H. K.; KARTAL, B. The microbial nitrogen-cycling network. **Nat. Rev. Microbiol**, v. 16, p. 263–276, 2018.

LEI, Y. et al. A novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium , *Zobellella taiwanensis* DN-7 , can remove high-strength ammonium. **ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY A**, v. 2, n. 2, p. 4219–4229, 2016.

LEMA, J. M. et al. Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit. **Water research**, v. 36, n. 10, p. 2555–60, 2002.

LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows – Wheeler transform. v. 25, n. 14, p. 1754–1760, 2009.

LIMA, R. M. G.; WILDHAGEM, G. R. DA S.; CUNHA, J. W. S. D. Remoção do Íon Amônio de Águas Produzidas na Exploração de Petróleo em Áreas Offshore por Adsorção em Clinoptilolita. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1237–1242, 2008.

LIMPIYAKORN, T. et al. amoA -encoding archaea in wastewater treatment plants : a review. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 1425–1439, 2013.

LIU, Y. et al. *Photobacterium* sp. NNA4, an efficient hydroxylamine-transforming heterotrophic nitrifier/aerobic denitrifier. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 128, n. 1, p. 64–71, 2019.

LU, M. et al. International Biodeterioration & Biodegradation Biological treatment of oilfield-produced water: A field pilot study. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 316–321, 2009.

MARAZIOTI, C.; KORAROS, M.; LYBERATOS, G. Kinetic modeling of a mixed culture of *Pseudomonas Denitrificans* and *Bacillus subtilis* under aerobic and anoxic operating conditions. **Water Research**, v. 37, p. 1239–1251, 2003.

MAURER-STROH, S. et al. The Tudor domain ‘ Royal Family ’: **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 2, p. 69–74, 2003.

METCAF; EDDY. Wastewater Engineering. In: **Environmentally Conscious Materials and Chemicals Processing**. [s.l: s.n.]. p. 207–235.

MOORE, E. R. B. et al. **Nonmedical: Pseudomonas**. [s.l: s.n.].

MOTTA, A. R. P. et al. Tratamento de água produzida de petróleo para remoção de

óleo por processos de separação por membranas : revisão. **Eng Sanit Ambien**, v. 18, p. 15–26, 2013.

MOTTA, M. D. et al. Estudos do Funcionamento de Estações de Tratamento de Esgotos por Análise de Imagem: Validações e Estudos de Caso. **engenharia sanitária e ambiental** **171**, v. 8, p. 170–181, 2003.

NIERMAN, W.; EISEN, J. A.; FRASER, C. M. Microbial genome sequencing 2000 : new insights into physiology , evolution and expression analysis. **Res. Microbio**, v. 151, n. 15, p. 79–84, 2000.

OGUZ, M. T. et al. Concurrent nitrite oxidation and aerobic denitrification in activated sludge exposed to volatile fatty acids. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 6, p. 1562–1572, 2007.

OKAMURA-IKEDA, K. et al. Crystal Structure of Aminomethyltransferase in Complex with Dihydrolipoyl-H-Protein of the Glycine Cleavage System IMPLICATIONS FOR RECOGNITION OF LIPOYL PROTEIN SUBSTRATE , DISEASE-RELATED. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 24, p. 18684–18692, 2010.

OLIVEIRA, E. P.; SANTELLI, R. E.; CASSELLA, R. J. Direct determination of lead in produced waters from petroleum exploration by electrothermal atomic absorption spectrometry X-ray fluorescence using Ir – W permanent modifier combined with hydrofluoric acid. v. 545, p. 85–91, 2005.

OVERBEEK, R. et al. The Subsystems Approach to Genome Annotation and its Use in the Project to Annotate 1000 Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 17, p. 5691–5702, 2005.

PADHI, S. K. et al. Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of wastewater. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 78, p. 67–73, 2013.

PATIN, S. Environmental Impact of the Offshore Oil and Gas Industry. In: **Environmental Pollution**. [s.l: s.n.]. v. 110p. 7491.

PHILIPPOT, L. et al. Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous

oxide reductase for N₂O emissions from soil. **Global Change Biology**, v. 17, n. 3, p. 1497–1504, 2011.

QUARTAROLI, L. et al. Ammonium removal from high-salinity oilfield-produced water: assessing the microbial community dynamics at increasing salt concentrations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 2, p. 859–870, 2017.

QUARTAROLI, L. et al. Effect of the gradual increase of salt on stability and microbial diversity of granular sludge and ammonia removal. **Journal of Environmental Management**, v. 248, n. April, 2019.

REINBOLD, K. A.; PESCIPELLI, S. M. **Effects of Exposure to Ammonia on Sensitive Life Stages of Aquatic Organisms**. [s.l: s.n.].

RITTMANN, B. E.; LANGELAND, W. E. Simultaneous denitrification with nitrification in single-channel oxidation ditches. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, v. 57, n. 4, p. 300–308, 1985.

ROBERTSOW, L. A. et al. Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers. v. 56, n. 1984, p. 289–299, 1989.

ROBERTSOW, L. A.; KUENEN, G. *Thiosphwra pantotropha* gen. nov. sp. nov., a Facultatively Anaerobic, Facultatively Autotrophic Sulphur *Bacterium*. **Journal of General Microbiology (1983)**, v. 129, p. 2847–2855, 1983.

SAH, S.; SINGH, R. Phylogenetical coherence of *Pseudomonas* in unexplored soils of Himalayan region. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1–10, 2016.

SALMAN, R. H.; ABBAR, A. H. Chemical Engineering and Processing - Process Intensification Optimization of a combined electrocoagulation-electro-oxidation process for the treatment of Al-Basra Majnoon Oil field wastewater : Adopting a new strategy. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 183, n. September 2022, p. 109227, 2023.

SHU, H. et al. Nitrogen removal characteristics and potential application of the heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria *Pseudomonas mendocina* S16 and *Enterobacter cloacae* DS'5 isolated from aquaculture wastewater ponds. **Bioresource**

Technology, v. 345, p. 126541, 2022.

SILVA, L. C. F. et al. Effect of salinity in heterotrophic nitrification/aerobic denitrification performed by acclimated microbiota from oil-produced water biological treatment system. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 130, n. February, p. 1–7, 2018.

SILVA, L. C. F. **Nitrificação Heterotrófica/Desnitrificação Aeróbia: Caracterização de Isolados e Investigação das Vias Metabólicas**. [s.l: s.n.].

SILVA, L. C. F. et al. Heterotrophic nitrifying/aerobic denitrifying bacteria: Ammonium removal under different physical-chemical conditions and molecular characterization. **Journal of Environmental Management**, v. 248, n. April, 2019.

SILVA, L. C. F. et al. Physicochemical characterization of *Pseudomonas stutzeri* UFV5 and analysis of its transcriptome under heterotrophic nitrification/aerobic denitrification pathway induction condition. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.

STEPHENSON, M. T. **Components of Produced Water : A Compilation of Industry StudiesJPT**. [s.l: s.n.].

STROUS, M. et al. Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 6, p. 2446–2448, 1997.

SUN, Z. et al. Bioresource Technology Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a novel metal resistant bacterium *Cupriavidus* sp . S1. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 142–150, 2016.

TELLEZ, G. T.; NIRMALAKHANDAN, N.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Performance evaluation of an activated sludge system for removing petroleum hydrocarbons from oilfield produced water. **Elsevier**, v. 6, n. 470, p. 455–470, 2002.

TRAN, T. T. et al. Comparative Genome Analysis of Two Heterotrophic Nitrifying *Pseudomonas putida* Strains Isolated from Freshwater Shrimp Ponds in Soc Trang Province. **Fermentation**, v. 8, p. 336, 2022.

UEMOTO, H.; SAIKI, H. Nitrogen Removal by Tubular Gel Containing *Nitrosomonas*

europaea and *Paracoccus denitrificans*. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 62, n. 11, p. 4224–4228, 1996.

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, n. 3, p. 255–257, 2006.

VAZOLLER, R. F. et al. Biodegradability potential of two experimental landfills in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 87–92, 2001.

WALKER, B. J. et al. Pilon : An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly Improvement. **PLOS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

WANG, H. et al. Bioresource Technology Deciphering pollutants removal mechanisms and genetic responses to ampicillin stress in simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification (SHNAD) process treating seawater-based wastewater. **Bioresource Technology**, v. 315, n. July, p. 123827, 2020.

WUNDERLIN, P. et al. Mechanisms of N₂O production in biological wastewater treatment under nitrifying and denitrifying conditions. **Water Research**, v. 46, n. 4, p. 1027–1037, 2012.

YANG, L. et al. Bioresource Technology Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a metal resistant bacterium *Pseudomonas putida* strain NP5. **Bioresource Technology**, v. 285, n. April, p. 121360, 2019.

YU, Z. et al. A Comprehensive Analysis of Structural and Sequence Conservation in the TetR Family Transcriptional Regulators. **Journal of Molecular Biology**, v. 400, n. 4, p. 847–864, 2010.

ZHANG, H. et al. Bioresource Technology *Paracoccus versutus* KS293 adaptation to aerobic and anaerobic denitrification : Insights from nitrogen removal , functional gene abundance , and proteomic profiling analysis. **Bioresource Technology**, v. 260, n. February, p. 321–328, 2018.

ZHANG, J. et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium

Pseudomonas stutzeri YZN-001. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 21, p. 9866–9869, 2011.

ZHANG, Q. et al. Bioresource Technology The characteristics of a novel heterotrophic nitrification – aerobic denitrification bacterium , *Bacillus methylotrophicus* strain L7. **Bioresource Technology**, v. 108, p. 35–44, 2012.

ZHAO, B. et al. Heterotrophic nitrogen removal by *Providencia rettgeri* strain YL. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 6, p. 609–616, 2010.

ZHAO, J. et al. Development of simultaneous nitrification-denitrification (SND) and organics removal in biofilm reactors with partially coupled a novel biodegradable carrier for nitrogen-rich water purification. **Bioresource Technology**, 2017.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1: *Primers* construídos a partir das proteínas selecionadas por genômica comparativa.

Identificação	Primer	Sequência (5'-3')	pb	Amplicom	Temperatura
WP_013982320.1	1.1 F	CACGCCTGGCTGATCATTCTG	20	136	66°C
	1.1 R	GCCGCTTGACCTTCTGGTTT			
	1.2 F	ATCGCGATCTGGCATTGTCTG	20	140	
	1.2 R	GTAGCGTTGGGCCTGTTGC	19		
WP_013982283.1	2 F	GTTCAAGGTCGGCGATCACG	20	104	66°C
	2 R	GGGTCCGGCCCATGAACTC	19		
WP_013982024.1	3.1 F	TGGCAGATCCTTTTCGAGCGT	20	142	66°C
	3.1 R	CGCAGCTGTGCCATAACTC			
	3.2 F	GTCATCGGCAGTGGTTGCAC	20	127	
	3.2 R	CTGAATCGCACGGCACCTG	19		
WP_013982283.1	P1F_2283.1	CACCGCAGTACGAGATCAAG	20	67	63°C
	P1R_2283.1	GTCAGCGCCGACTCTTTATG			
	P2F_2283.1	GTGAGCTGGAACCTCGGAAG	19	56	
	P2R_2283.1	GTGTGCACCCGAGTGATG	18		
	RF_2283.1	TCATCATCGCAAAGCACACC	20	102	
	RR_2283.1	GATCGGTCTTGTCGCTCTTG			
WP_003282211.1	P1F_2211.2	ACCGGTACCGTTAAGTGGTT	20	187	64°C
	P1R_2211.2	CCTGAACTTCTCAGCTTGC			
	P2F_2211.2	AAAGGCTTCGGCTTCATCAC	20	64	
	P2R_2211.2	GAATGGCACGGAAGTGACG			
	RG1F_2211.1	GAAGGGCTTCGGCTTCATTG	20	66	
	RG1R_2211.1	ATCTCGGAGAAGTGCACGAA			
	RG2F_2211.1	GGACGTCTTCGTGCACTTC	19	133	
	RG2R_2211.1	TCAGCCGATGACGGTGAC	18		
WP_013983347.1	P1F_83347.1	GCTCAACACCGCAGAGAATC	20	126	64°C
	P1R_83347.1	AGCTCGTCCTTGGACTIONGAA			
	P2F_83347.1	AAGTCCAAGGACGAGCTGAT	20	150	
	P2R_83347.1	ATCGTTGCCGTGAATCATCC			
	G1F_83347.1	AGAGCTCCGAGGAGAACTG	20	142	
	G1R_83347.1	GCCTCTTTGCTGCGGTAG			
	G2F_83347.1	CAGATCCTCGTCGTGGTCA	19	99	
	G2R_83347.1	GATGAGTGTGTCGTCGATCT	20		

Identificação	Primer	Sequência (5'-3')	pb	Amplicom	Temperatura
WP_011912146.1	P1F_12146.1	CTTGGCGTGAAGATGTACGG	20	61	64°C
	P1R_12146.1	GCTGACGCACGATGATGTTG			
	P2F_12146.1	AAAGCTGGCGGTTCTACCC	19	63	
	P2R_12146.1	CATCTTCACGCCAAGTCGTT	20		
	RG1F_12146.1	ATTGAACGCCAAGCGTCT	19	200	
	RG1R_12146.1	AACGATGTTGACCGTCTTGC	20		
RG2F_12146.1	CACAAGAAGGGTGCATCCAG	20	66		
RG2R_12146.1	CTTGACGCCGAGACGCTT	18			
WP_003281834.1	P1F_1834.1	CGTATGCAGAAAGCGACTGG	20	95	63°C
	P1R_1834.1	TGCTGGTTGAGCACAGTCTT			
	P2F_1834.1	TTGAGCAGCTGAACGAGCAA	20	61	
	P2R_1834.1	TGCATACGCAGATTGAACTGG	21		
	RG1F_1834.1	CGAGCTGACCGAGGAAGAG	19	81	
	RG1R_1834.1	GTGGCCATCTGGAAACGAAG	20		
RG2F_1834.1	AACCTTCGTTTCCAGATGGC	20	95		
RG2R_1834.1	CGCAGCACCGTGTAGATG	18			
WP_003303577.1	Enz1F	ATGGACGTCTTCGAGCAGAT	20	194	64°C
	Enz1R	GGATCGGAGATCGACTGGTT	20		
	Enz2F	TTCGAGTACTACGGGCTCAC	20	179	
	Enz2R	ATCAGTCCGGTGATCTCCAC			
	Enz3F	CAGATCCTGGTGTTCAAGCG	20	82	
	Enz3R	TCATCGGCTTTGCCATGAAG			
Enz4F	AGATGGGCAACCCTATCGAG	20	59		
Enz4R	CATCTTCAGCACACGCTTGA				
WP_005260096.1	Enz5F	GTTGACGTCAGTCATCTGG	20	182	63°C
	Enz5R	CCTCGTCGGAGACGTAGTAG			
	Enz6F	GTCTCCGACGAGGAACTGT	19	200	
	Enz6R	AAGCTCATGTAGCCCAGGTC	20		
	Enz7F	CTCCTACGCTTGGCAAATCC	20	85	
	Enz7R	CACCTGCCACGAATCTCCAC			

Figura S1. Gel de agarose evidenciando a amplificações dos pares de primers ENZ3 e ENZ4. A amplificação foi positiva nas linhagens de *Pseudomonas stutzeri* UFV5 (canaleta A), *Pseudomonas balearica* UFV3 (canaleta B) e o controle positivo lodo nitrificante (canaleta E).

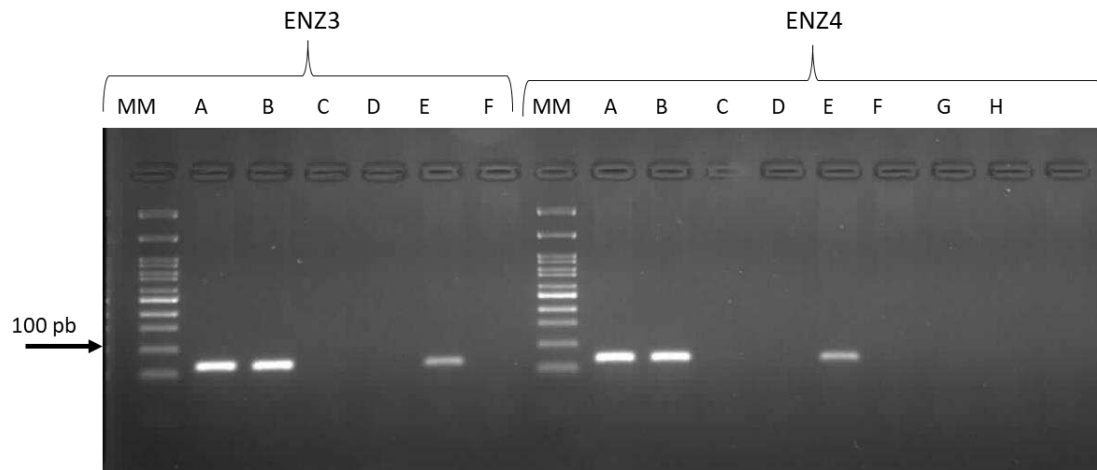


Figura S2. Gel de agarose evidenciando a amplificações do par de primer P1_2211.1. A amplificação foi positiva nas linhagens de *Pseudomonas stutzeri* UFV5 (canaleta A), *Pseudomonas balearica* UFV3 (canaleta B) e o controle positivo lodo nitrificante (canaleta E).

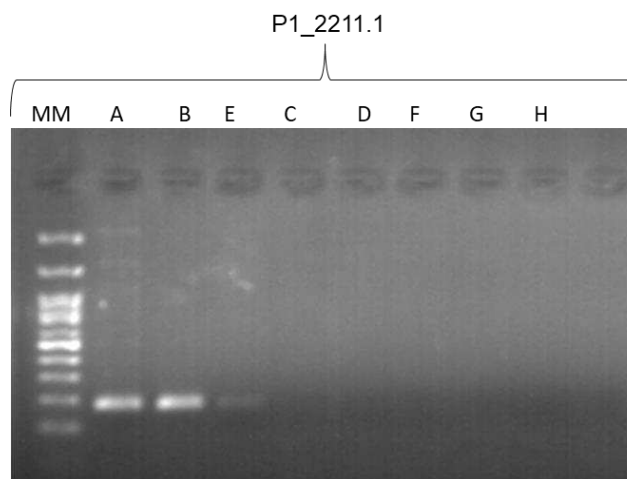


Figura S3. Gel de agarose evidenciando a amplificação do par de primer RG1_2211.1. A amplificação foi positiva na linhagem *Gordonia amicalis* UFV4 (canaleta D).

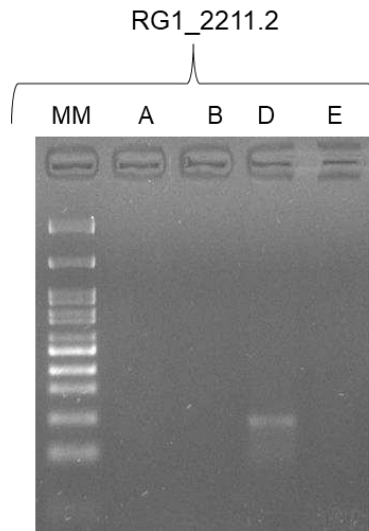


Figura S4. Gel de agarose evidenciando a amplificações dos pares de primers 2, 3.2 P_11834 e enz7. A amplificação foi positiva somente em *Rhodococcus ruber* UFV2 (C) e *Gordonia amicalis* UFV4 (D)

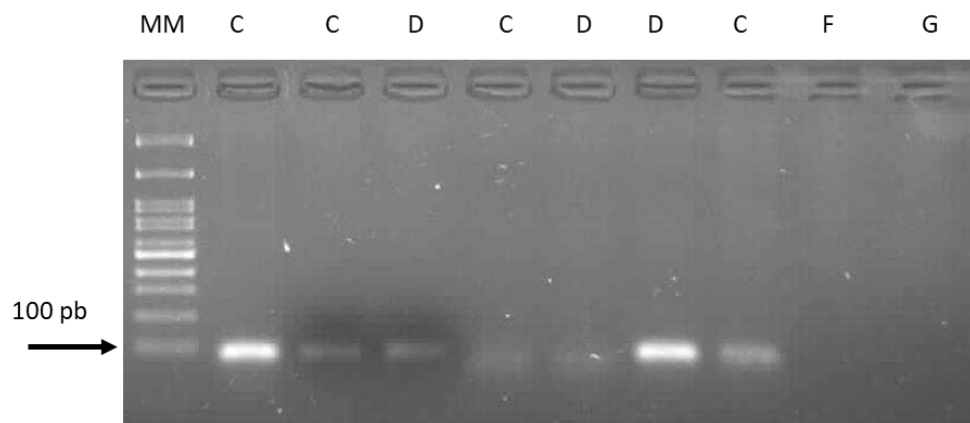


Figura S4. Gel de agarose evidenciando a ampliações dos pares de primers ENZ1, ENZ2 e G2_83347.1. A amplificação ocorreu somente na linhagem *Gordonia amicalis* UFV4 (canaleta D).

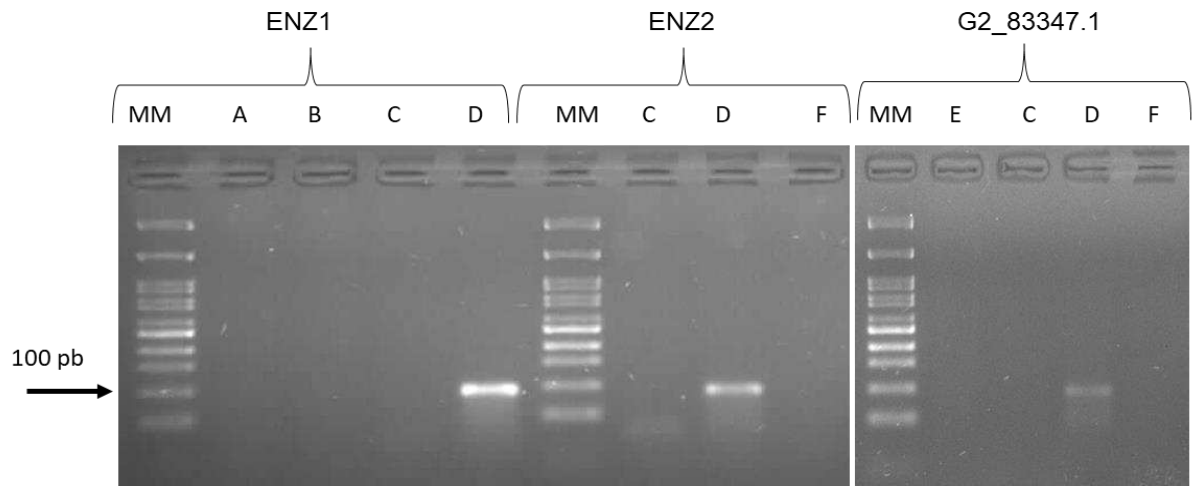
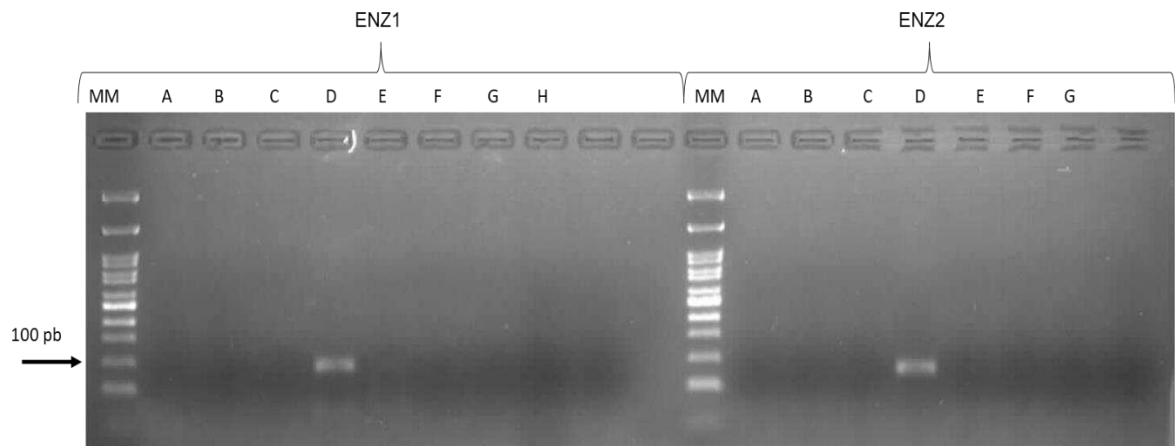


Figura S4. Gel de agarose evidenciando a ampliações dos pares de *primers* ENZ1 e ENZ2. A amplificação ocorreu somente na linhagem *Gordonia amicalis* UFV4 (canaleta D)



Anexo

Anexo 1: Número de acesso das linhagens utilizadas no BLAST

Linhagem	Número de acesso
<i>Pseudomonas stutzeri</i> UFV5	KY616652.1
<i>Pseudomonas balearica</i> UFV3	KX495190.2
<i>Rhodococcus ruber</i> UFV2	CP024890.1
<i>Gordonia amicalis</i> UFV4	KU904410.1
<i>Nitrosomonas europaea</i>	AL954747.1
<i>Micrococcus luteus</i>	CP082331.1