

LARISSA QUARTAROLI

**REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO
AMONÍACAL DE EFLUENTES COM ALTA SALINIDADE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016**

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

T

Quartaroli, Larissa, 1987-
Q19r Remoção biológica de nitrogênio amoniacal de efluente com
2016 alta salinidade / Larissa Quartaroli. – Viçosa, MG, 2016.
viii, 106f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Cláudio Mudado Silva.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Águas residuais - Purificação - Tratamento biológico.
2. Efluentes. 3. Petróleo. 4. Nitrificação. 5. Diversidade
microbiana. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Engenharia Florestal. Programa de Pós-graduação em
Engenharia Civil. II. Título.

CDD 22. ed. 628

LARISSA QUARTAROLI

**REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO
AMONIACAL DE EFLUENTES COM ALTA SALINIDADE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de abril de 2016

Sérgio Francisco de Aquino

Sérgio Oliveira de Paula

João Paulo Bassin
(Coorientador)

Cynthia Canêdo da Silva
(Coorientador)

Cláudio Mudadu Silva
(Orientador)

Aos meus pais, meus exemplos e heróis da vida

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pelo dom da vida e por guiar os meus caminhos. A Ele a glória, porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Aos meus pais, Carlos e Rosa, por todo esforço e carinho dedicados à minha criação. Aos meus amados irmãos, Jali e Matheus, pelo amor e amizade.

Ao meu namorado Dudu, pelo amor, carinho, companheirismo e o por me ajudar a ver o lado bom em tudo.

Ao meu orientador Prof. Cláudio Mudadu Silva pela excelente orientação durante o desenvolvimento desse trabalho, pelos ensinamentos transmitidos, pela sua paciência e por acreditar no meu potencial até nos momentos mais difíceis.

Aos meus coorientadores, Cynthia Canêdo da Silva e João Paulo Bassin, pelos aconselhamentos, orientações e apoio ao longo da realização deste trabalho.

Aos professores Sérgio Francisco de Aquino e Sérgio Oliveira de Paula por aceitarem o convite para participarem da minha banca e pelas contribuições.

À minha querida amiga Livia Fidelis pelos auxílios, ensinamentos e companheirismo dentro e fora do laboratório.

A minha amada equipe de apoio, Babi, Caci, Dari, Dé, Helo, Joi, Lais, Lud e Zaka que mesmo de longe estiveram tão presentes.

Aos meus prestativos estagiários, Raquel, Marlon, Fernanda, Carla, Gisele, Pâmela, obrigada pelo carinho que tiveram com meus experimentos.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Meio Ambiente pela amizade e momentos de descontração.

Aos colegas do laboratório de Imunovirologia Molecular da UFV.

Aos amigos, professores, e funcionários do Laboratório de Celulose e Papel pelos agradáveis momentos compartilhados.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil, pela oportunidade oferecida.

À Petrobras, pela disponibilização do material utilizado neste estudo e pela concessão da bolsa de estudo.

À CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1: Revisão Bibliográfica	3
CAPÍTULO 2: Nitrificação de água de produção de petróleo: avaliação do efeito de concentrações crescentes de sal sobre a atividade nitrificante	21
CAPÍTULO 3: Identificação de microrganismo responsáveis pela remoção de amônia em águas de produção de petróleo com elevada salinidade	40
CAPÍTULO 4: Efeito do aumento gradual de sal sobre a remoção de amônia e diversidade microbiana de lodo granular	72
CONSIDERAÇÕES FINAIS	105

RESUMO

QUARTAROLI, Larissa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2016. **Remoção biológica de nitrogênio amoniacal de efluentes com alta salinidade.** Orientador: Cláudio Mudadu Silva. Coorientadores: Cynthia Canêdo da Silva e João Paulo Bassin.

A presente tese teve como objetivo analisar os efeitos do sal na remoção de amônia e na diversidade da comunidade microbiana envolvida neste processo. O trabalho foi dividido em três etapas, descritas em três artigos técnico-científicos. O primeiro artigo abordou os efeitos da salinidade na remoção de amônia de águas de produção de petróleo, em reatores em batelada sequencial. Foram realizados ensaios de bancada com a construção de reatores biológicos com alimentação intermitente. Utilizou-se lodo e efluentes industriais provenientes de uma estação de tratamento de efluentes de um terminal de petróleo. Os experimentos mostraram que se pode alcançar uma remoção completa de amônia via nitrificação biológica a concentrações de sal de até 100 g NaCl L⁻¹. No entanto, a uma concentração de 125 g NaCl L⁻¹, os microrganismos nitrificantes foram inibidos e uma remoção muito baixa de amônia foi observada nessas condições. No segundo artigo avaliaram-se as mudanças do perfil da comunidade microbiana do lodo responsável pela remoção de amônia da água de formação de petróleo quando submetidas ao aumento gradual de sal (NaCl) na etapa anterior. Analisou-se amostras de lodo de dois reatores biológicos em batelada sequencial, que foram operados com adição semanal de 5 g L⁻¹ de NaCl, até a completa inibição do processo de remoção de amônia que ocorreu com uma concentração de 125 g L⁻¹. Durante o processo de aclimação do lodo ao sal, as amostras foram coletadas e tiveram seu DNA extraído. Realizou-se o PCR-DGGE e o sequenciamento massivo do gene rRNA 16S para análise da diversidade microbiana. Os perfis de bandas do PCR-DGGE mostraram que ocorreu uma mudança na comunidade microbiana à medida que se aumentou a concentração de sal no reator. Observou-se uma redução da presença de bactérias e concomitantemente um aumento das populações de *archaeas*. Os dados do sequenciamento revelaram que a remoção de amônia no reator é realizada por diferentes vias, através de bactérias nitrificantes autotróficas (*Nitrosococcus*, *Nitrosomonas*, *Nitrosovibrio*, *Nitrospira* e *Nitrococcus*), *Archaea* oxidante de amônia (*Candidatus nitrosoarchaeum*), microrganismos ANAMMOX (*Candidatus Brocardia*, *Candidatus Kuenenia* e *Candidatus Scalindua*) e potenciais nitrificantes heterotróficos (*Paracoccus* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp.,

Marinobacter sp., e *Alcaligenes* spp.). O terceiro trabalho investigou os efeitos do aumento gradual da concentração de NaCl na eficiência de remoção de amônia e na estrutura e diversidade da comunidade microbiana do grânulo aeróbio. Para tal, dois reatores biológico em batelada sequencial foram operados visando a formação de lodo granular aeróbio. Os reatores foram alimentados com efluente sintético, o qual foi enriquecido com NaCl, cuja concentração foi aumentada 5 g L⁻¹ de NaCl por semana. A remoção de amônia se manteve eficiente até salinidade de 40 g L⁻¹, sendo observado um leve decréscimo da eficiência com o aumento da salinidade. Não houve acúmulo de nitrito e nitrato no efluente tratado, a remoção de ambos aumentou com o acréscimo de NaCl. Tais resultados evidenciaram a ocorrência de nitrificação/desnitrificação simultânea. Com o aumento da concentração de sal nos reatores os grânulos diminuíram de tamanho até se desintegrarem. A granulação aeróbia foi desfavorecida em concentração de NaCl acima de 10 g L⁻¹. A abundância de bactéria e *archaea* aumentou com o acréscimo de NaCl. Diversos gêneros de microrganismos responsáveis pela remoção de nitrogênio foram identificados no sequenciamento, incluindo aqueles envolvidos nos processos de nitrificação e desnitrificação convencionais (*Nitrosomonas*, *Nitrosovibrio*, *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Denitromonas*, *Paracoccus*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Nitratireductor*, *Achromobacter*, *Thiobacillus*, *Azoarcus*, *Thauera*, *Alcaligenes*, *Hyphomicrobium*, *Rhodopseudomonas* e *Micrococcus*), os microrganismos ANAMMOX (*Candidatus kuenenia*) e os heterotróficos (*Paracoccus* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Alcaligenes* sp. e *Aeromonas* sp.).

ABSTRACT

QUARTAROLI, Larissa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2016. **Biological removal of ammoniacal nitrogen from high salinity wastewater.** Adviser: Cláudio Mudadu Silva. Co-advisers: Cynthia Canêdo da Silva and João Paulo Bassin.

This thesis aimed to analyze the effects of salt removal of ammonia and the diversity of the microbial community involved in this process. The work was divided into three chapters presented with three technical-scientific articles. The first article discusses the effects of salinity on the removal of ammonia from produced water from oil and gas production in sequential batch reactors. Lab-scale tests were carried out in three sequencing batch biological reactors. The wastewater and sludge used in study consisted of produced water from oil extraction collected at an industrial treatment plant from a Brazilian petroleum terminal. The experiments showed that complete of ammonia removal via biological nitrification was achieved at salt concentrations up to 100 g NaCl L⁻¹. However, at a concentration 125 g NaCl L⁻¹, the nitrifying microorganisms were inhibited and a very low ammonia removal was achieved under these conditions. In the second article it was evaluated the changes of the microbial community profile of sludge responsible for the ammonia removal from produced water when subjected to a gradual increase of salt (NaCl). The biological sludge samples from two sequential batch reactors which were operated with a weekly addition of 5 g L⁻¹ NaCl were analyzed, until the complete inhibition of the ammonia removal process, which occurred at a concentration of 125 g L⁻¹. During the sludge acclimation process, the samples were collected and had their DNA extracted. The PCR-DGGE and massive sequencing of 16S rRNA region were carried out for analysis of microbial diversity. The profiles bands of PCR-DGGE showed that there was a change in the microbial community as the increased salt concentration in the reactor. It was observed a reduction in the bacteria population while the population of *archaeas* had an increase. The data of the 16S rRNA gene sequencing revealed that the ammonia removal was performed in different routes. The main microorganisms observed were the conventional autotrophic nitrifying bacteria (*Nitrosococcus*, *Nitrosomonas*, *Nitrosovibrio*, *Nitrospira*, *Nitrococcus*), *archaea* oxidizing ammonia (*Candidatus nitrosoarchaeum*), ANAMMOX (*Candidatus Brocardia*, *Candidatus Kuenenia*, *Candidatus Scalindua*), and potential heterotrophic nitrifiers (*Paracoccus* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Marinobacter* sp., *Alcaligenes* spp.). The third paper investigated the effects of gradual increase of NaCl concentration in the ammonia

removal efficiency and the microbial structure and diversity of aerobic granular sludge. Two biological sequencing batch reactors were operated with aerobic granular sludge. The reactors were fed with a synthetic effluent enriched gradually with NaCl (5 g L⁻¹ of NaCl per week). The removal of ammonia remained effective within all salinities tested, but had a slight efficiency decline when salinity increased. There was no accumulation of nitrite and nitrate in the treated effluent. The nitrite and nitrate removal increased with the addition of NaCl. These results proved the occurrence of simultaneous nitrification/denitrification. As the salt concentration increased in the reactor, the aerobic granules size diminished until they completely disintegrated. The aerobic granulation was negatively affected in NaCl concentration above 10g L⁻¹. The abundance of bacteria and *archaea* increased with NaCl addition. Several genera of microorganisms responsible for removing ammonia were identified, including the conventional nitrification/denitrification (*Nitrosomonas*, *Nitrosovibrio*, *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Denitromonas*, *Paracoccus*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Nitrateductor*, *Achromobacter*, *Thiobacillus*, *Azoarcus*, *Thauera*, *Alcaligenes*, *Hyphomicrobium*, *Rhodopseudomonas* and *Micrococcus*), ANAMMOX (*Candidatus kuenenia*) and heterotrophic/aerobic nitrification denitrification microorganisms (*Paracoccus* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Alcaligenes* sp. and *Aeromonas* sp.).

INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente o planeta conta com diversas fontes de energia, esgotáveis e renováveis, ainda assim, o petróleo figura como a principal fonte de energia utilizada no mundo. Durante as atividades de exploração e produção de petróleo e gás natural são gerados resíduos sólidos e efluentes líquidos. A maior fonte de poluição relacionada à extração de petróleo denomina-se “água de produção”, presente naturalmente na formação geológica do reservatório de petróleo e transportada para superfície com o petróleo e o gás.

A água de produção proveniente da exploração de petróleo constitui de um efluente quimicamente complexo com rica composição (óleo, hidrocarbonetos, metais pesados, íons em solução, aditivos químicos e radioisótopos). Com a exploração do petróleo confinado na camada pré-sal do Brasil, os níveis de salinidade desse efluente podem ser elevados, o que poderia limitar o seu tratamento. Além da salinidade, a água de produção apresenta altas concentrações de amônia, proveniente da formação rochosa e processos biológicos envolvidos na formação do petróleo.

Os processos biológicos de tratamento são os mais usuais na remoção amônia de efluentes. Entretanto, efluentes contendo elevadas concentrações de sal podem prejudicar o processo biológico, podendo apresentar efeitos adversos sobre a microbiota e influenciar negativamente na taxa de remoção de amônia. Não se encontrou publicações técnico - científicas que estipulam quais as concentrações máximas de sal presentes nas águas de produção de exploração de petróleo que possam inibir os processos de tratamento biológico buscando a remoção da amônia.

O conhecimento das populações microbianas envolvidas no processo de remoção de amônia e suas possíveis alterações por influência dos elevados níveis de salinidade é de fundamental importância para o êxito do processo e manutenção da atividade microbiológica dentro dos reatores. Também há uma lacuna no conhecimento do perfil microbiológico que se encontra nos reatores durante a remoção de amônia em altas salinidades.

Uma nova morfologia de biomassa dos reatores biológicos denominada de lodo granular aeróbio vem se destacando no tratamento de efluentes salinos. Essencialmente a bibliografia cita as vantagens de se ter a estrutura do lodo granular aeróbio para promover conjuntamente a nitrificação e desnitrificação no mesmo reator.

Não existe nenhum estudo bibliográfico citando a possibilidade de se obter granulação aeróbia em altas salinidades e nem tampouco a capacidade de remoção de amônia de água de produção de petróleo por esse aglomerado microbiano.

Dessa forma, a presente tese foi dividida em quatro capítulos: uma revisão bibliográfica atualizada e três artigos científicos com objetivos específicos.

O primeiro artigo avalia os efeitos da salinidade sobre o processo de remoção biológica de amônia de águas de produção de petróleo e determina as concentrações de sal que limitam o processo de nitrificação nas água de produção de petróleo.

Buscando uma melhor compreensão da microbiota envolvida no processo de remoção biológica de amônia de águas de produção de petróleo em diferentes salinidades, o segundo artigo buscou determinar a diversidade de comunidades microbianas, de bactérias e *archaea*, envolvidas no processo, aplicando técnicas de biologia molecular. Este trabalho teve como coautoria a bioquímica Lívia Carneiro Fidélis Silva, sendo parte da pesquisa desenvolvida durante o período do seu mestrado em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa, sob a orientação da professora Cynthia Canêdo da Silva.

Conforme trabalhos reportados recentemente na literatura, uma nova morfologia de lodo, denominada lodo granular aeróbio, tem se mostrado uma alternativa promissora na área de tratamento de efluentes que difere dos processos convencionais de lodos ativados. Dessa forma, o terceiro artigo avaliou o uso de lodo granular aeróbio no processo de remoção de amônia em alta salinidade. Foi estudado a taxa de remoção de amônia, a estrutura e diversidade microbiana do lodo granular sob efeito da adição gradual de sal.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRAFICA

1. Água de Produção de Petróleo

No processo de exploração e produção de petróleo e gás natural estão envolvidas diversas atividades como extração, armazenamento, transporte, processamento, bem como a produção de derivados. Tais atividades são responsáveis pela geração de diferentes tipos de resíduos sólidos e efluentes líquidos, dentre os quais se destaca a água de produção.

A água de produção consiste basicamente de água de formação, naturalmente presente na formação geológica do reservatório de petróleo, água de injeção, inserida no reservatório para auxiliar a extração e a recuperação do petróleo, e alguns produtos químicos adicionados durante o processo de extração (Patin, 1999). A água de produção é também denominada de água produzida, água de formação de petróleo, água intersticial ou água associada ao petróleo (Neff, 2002).

Este efluente é o subproduto de maior volume associado à exploração e produção de petróleo e gás. Com o decorrer do tempo, pode exceder em dez vezes o volume de petróleo extraído, em campos de exploração mais antigos. Ao longo da vida econômica dos poços de exploração, a produção de petróleo diminui e o volume da água de produção aumenta (Ray e Engelhardt, 1992; Tibbetts et al.1992).

Além de volumes dessa magnitude, a composição da água de produção é bastante complexa, constituída por compostos variados, entre eles: íons em solução (Cl^- , Na^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , SO_4^{2-} , HCO_3^- , F^-), partículas de óleo em suspensão, sólidos dissolvidos, hidrocarbonetos, metais pesados (Cd, Cr, Cu, Pb, Hg, Ni, Ag, Zn) e materiais radioativos (Ra e Sr) (Stephenson, 1992).

As propriedades físicas e químicas da água de produção variam de acordo com a localização geográfica do poço, profundidade, formação geológica, produtos químicos utilizados na extração, composição química do petróleo extraído, tipo de produto de hidrocarboneto a ser produzido e idade do campo de exploração (Clark e Veil, 2009).

Gabardo (2007) realizou um monitoramento das plataformas que descartam água de produção no Oceano Atlântico, no período de 1996 a 2006. As médias de alguns constituintes que compõem a água de produção estão expostas na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização físico-química da água de produção da costa brasileira

Constituinte	Concentração média (mg.L ⁻¹)
Nitrogênio Amoniacal	85,4
Ba	1,3
B	31
Fe	7,4
²²⁶ Ra (Bq.L ⁻¹)	0,15
²²⁸ Ra (Bq.L ⁻¹)	0,09
Benzeno	1,653
Tolueno	1,917
Etilbenzeno	0,211
Xilenos	0,859
Σ BTEX	4,690
THP	28
Σ 24 Fenóis	1,42
Σ HPA	0,527

BTEX: Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos, HPA: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, THP: Total de Hidrocarbonetos de Petróleo.

FONTE: Gabardo, 2007.

As águas de formação provenientes da exploração de petróleo apresentam concentrações de nitrogênio amoniacal elevadas e acima do valor de descarte permitido pela legislação. Lima et al. (2008), com objetivo de remover amônio de águas de exploração de petróleo, observou a concentração média de 103 mg.L⁻¹ de NH₄⁺. Gabardo (2007), em estudo de caracterização de água produzida na costa brasileira ao longo de 10 anos, se deparou com concentrações de nitrogênio amoniacal de 22 a 800 mg.L⁻¹, com valor médio de 85,4 mg.L⁻¹. Andrade (2009), ao avaliar a toxicidade de água produzida após tratamento, encontrou valores de nitrogênio amoniacal de até 119 mg.L⁻¹.

A salinidade, comumente expressa em termos da concentração de íons, é um constituinte de bastante interesse da água de produção. Sódio e cloreto geralmente aparecem com mais abundância. A salinidade também pode ser representada na forma de condutividade elétrica ou de sólidos dissolvidos totais. Sua concentração na água de produção pode variar, chegando até 30% (300 g.L⁻¹), enquanto que na água do mar a concentração varia em torno de 3,2 a 3,6% (de 32 a 36 g.L⁻¹) (Neef et al. 2011).

O pré-sal é um conjunto de rochas com alto potencial de geração e acúmulo de petróleo, localizado em águas ultraprofundas, abaixo de uma extensa camada de sal com espessura de até 2000 m. A salinidade encontrada na água de produção oriunda dessa camada é extremamente alta, podendo variar de 15 a 300 g.L⁻¹, em termos de íon cloreto (Petrobras, 2012; Stephenson, 1992).

Durante a extração do petróleo, os fluidos produzidos passam por separadores na própria plataforma, geralmente hidrociclones e flotadores, onde ocorre a separação óleo/água. A água de produção é encaminhada para os terminais de petróleo onde passa por tratamento adequado, sendo então descartada no oceano ou reinjetada nos poços (Thomas, 2001).

Para água de produção ser descartada ou reinjetada, as condições e os padrões estabelecidos pela Resolução do CONAMA 393/2007, que dispõe sobre o descarte contínuo de água de processo ou de produção em plataformas marítimas de petróleo e gás natural, devem ser atendidos. Perante as restrições estabelecidas pelo CONAMA, faz-se necessário o tratamento adequado e eficaz da água de produção. Diferentes tecnologias vêm sendo utilizadas e estudadas para o tratamento desse efluente, tais como a coagulação e a floculação, flotação, tratamento biológico, filtração em membrana e processos de oxidação avançada. Contudo, diante da extrema complexidade dos componentes presentes nesse efluente e da elevada salinidade, alguns tratamentos convencionais não são suficientes para remover todos os contaminantes.

Os requisitos de tratamento estão se tornando cada vez mais complexos, de modo que a busca de novas tecnologias e técnicas de tratamento torna-se fundamental para melhorar a eficiência do tratamento e para se atingir os padrões de qualidade de água estabelecidos pela legislação.

2. Remoção biológica de nitrogênio

Nas águas residuárias o nitrogênio pode apresentar diversos estados de oxidação, sendo os compostos mais encontrados descritos a seguir: nitrogênio orgânico (ureia, alguns aminoácidos, poliaminas, ureídeos), amônio (NH₄⁺), amônia (NH₃) e nitrogênio gasoso (N₂). Eventualmente o nitrogênio é encontrado nas formas oxidadas, tais como nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻).

O nitrogênio amoniacal pode ocorrer na forma de amônia livre (NH_3) ou ionizada (NH_4^+), sendo que as proporções desses últimos dependem do pH e temperatura do meio (Figura 1). Em ambientes de pH ácido, há predominância do íon amônio, devido ao aumento da concentração de H^+ . Em pH básico, a concentração de H^+ diminui, sendo assim, a presença de amônia é maior. Em condições nas quais o pH do meio é maior que 11, a amônia se encontra na forma gasosa, extremamente tóxica às algas, zooplâncton e peixes. O equilíbrio entre amônia-amônio é representado pela Equação 1:

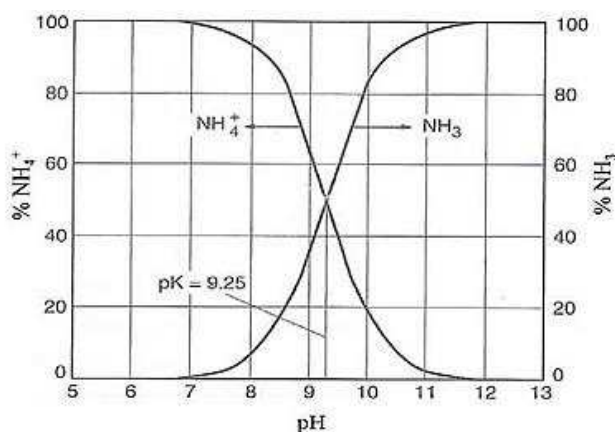


Figura 1. Equilíbrio entre amônia livre e íon amônio em função do pH do meio.

FONTE: Metcalf e Eddy, 2003.

As principais formas de contaminação por compostos nitrogenados nos corpos hídricos são oriundas de lançamentos de esgoto doméstico, águas residuárias industriais e lixiviados de aterros sanitários.

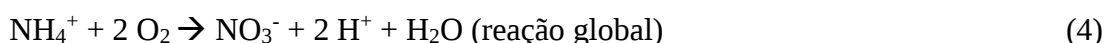
Segundo a resolução CONAMA 430/2011, o padrão de lançamento de nitrogênio nos efluentes, na forma de nitrogênio amoniacal total, é estabelecido em 20,0 mgN/L.

Nitrificação

A nitrificação é um processo chave no ciclo do nitrogênio, consistindo na conversão de compostos nitrogenados, principalmente nitrogênio amoniacal, em nitritos e nitratos.

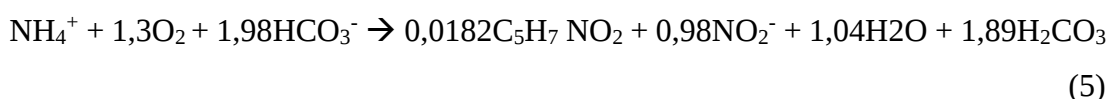
Trata-se de um processo biológico mediado pela ação de dois grupos de bactérias autotróficas nitrificantes, e ocorre naturalmente em ambientes aeróbios. Esses dois grupos de bactérias utilizam carbono inorgânico para síntese celular, na forma de dióxido de carbono, bicarbonato e carbonatos. Esses micro-organismos também são conhecidos como quimiolitotróficos, oxidando formas reduzidas de nitrogênio inorgânico, que atuam como doador de elétrons enquanto o oxigênio funciona como aceptor final na cadeia de transporte de elétrons para geração de energia (Sant'anna Junior, 2010; Metcalf e Eddy, 2003).

O processo de nitrificação envolve duas etapas subsequentes, a saber: (i) nitrificação, isto é, oxidação da amônia a nitrito, realizada por bactérias que oxidam amônia (BOA) e (ii) nitratação, isto é, oxidação do nitrito a nitrato, realizada por bactérias que oxidam o nitrito (BON). Ambas as etapas do processo nitrificante e a reação global estão descritas nas Equações 2, 3 e 4:

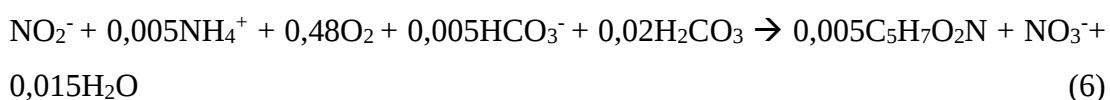


A liberação de energia livre na reação de nitritação é em torno de 68 Kcal por mol de amônia, enquanto que a nitratação libera 18 Kcal por mol de nitrito (Sant'anna Junior, 2010). São necessários 3,43 e 1,14 g de oxigênio, para oxidação de um mol de amônio e nitrito, respectivamente. As reações estequiométricas para oxidação de amônio e nitrito estão descritas nas Equações 5 e 6:

Oxidação do amônio:



Oxidação do nitrito:



Os gêneros mais comuns de BOA e BON são *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, respectivamente. Outros gêneros como *Nitrosococcus* e *Nitrospira* também podem estar vinculados à oxidação da amônia, assim como os gêneros *Nitrospira*, *Nitrospina* e *Nitrococcus* podem ser responsáveis pela oxidação do nitrito (Koops e Pommerening-Röser, 2005; Vanparys et al. 2006).

Estudos tem revelado que os microrganismos do domínio *archaea* também são capazes de realizar a oxidação do nitrogênio amoniacal. As *archaea* pertencentes ao Filo Thaumarchaeota são as principais responsáveis por esse processo (Limpiyakorn et al. 2013; Schleper e Nicol, 2010).

Fatores inibidores da nitrificação

As bactérias nitrificantes são sensíveis e de crescimento lento. Alguns fatores ambientais e operacionais podem trazer complicações ao sistema biológico e vir a influenciar a atividade microbiológica e o desempenho da nitrificação. Os fatores mais relevantes são: temperatura, alcalinidade, pH, concentração de oxigênio dissolvido, relação C/N (carbono/nitrogênio) e presença de compostos inibidores.

A temperatura apresenta um efeito significativo na taxa de crescimento dos organismos nitrificantes. A nitrificação pode acontecer em temperaturas entre 4 e 45°C, entretanto, a temperatura ótima para a atividade de *Nitrosomonas* é de 35°C, e de 35 a 42°C para as *Nitrobacter* (Painter, 1977).

A nitrificação trata-se de um processo aeróbio, portanto, a quantidade de oxigênio dissolvido (OD) tem influência direta na taxa de crescimento das bactérias nitrificantes. O valor de OD necessário para nitrificação em sistemas com biomassa de crescimento suspenso é de 0,5 a 2,5 mg.L⁻¹. Segundo a USEPA (1993), a concentração de OD necessária para atingir a taxa máxima de nitrificação e garantir oxigênio nos pontos de difícil acesso no reator deve ser superior a 2,0 mg.L⁻¹. As bactérias oxidadoras de nitrito são mais sensíveis às baixas concentrações de oxigênio dissolvido em comparação com as oxidadoras de amônia. Sendo assim sistemas operados em condições de oxigênio dissolvido limitante tendem a acumular nitrito (Campos et al. 2007).

O pH dos reatores biológicos tem efeito significativo na taxa nitrificação, a qual pode diminuir em pH abaixo do intervalo neutro. Uma larga faixa de pH tem sido

relatada como adequada para o processo de nitrificação, compreendida entre 6,5 e 8,0 (USEPA, 1993).

O processo de nitrificação também pode ser limitado pela alcalinidade. A etapa de nitrificação gera H^+ , portanto tende a consumir alcalinidade. Segundo a USEPA (1993) a quantidade de alcalinidade consumida durante o processo de nitrificação é de 7,14 gCaCO₃/gN-NH₄⁺ oxidado.

O efeito da relação carbono orgânico e nitrogênio (C/N) é um fator crítico que influencia o processo de nitrificação. Ambientes com alta concentração de matéria carbonácea (DQO) proporcionam condições favoráveis para o aumento da proporção de bactérias heterotróficas, que competem pelo oxigênio e nutrientes com as bactérias autotróficas nitrificantes. Como a taxa de produção das autotróficas nitrificantes é bem menor das heterotróficas, essas podem ser arrastadas do sistema em altos valores de DQO (Metcalf e Eddy, 2003).

A presença de sal nas estações de tratamento de efluentes é reconhecida como um fator de estresse. Efluentes com elevado teor de salinidade interferem diretamente no tratamento biológico e na remoção de matéria orgânica, podendo também inibir o processo de nitrificação (Uygur e Kargi, 2004). A salinidade afeta a atividade metabólica dos microrganismos nitrificantes, reduzindo seu crescimento e as taxas de oxidação de amônia (Moussa et al. 2006).

Em ambientes salino, parte do substrato consumido pelas bactérias acaba sendo gasto na síntese de “solutos compatíveis”, que são usados no balanceamento da pressão osmótica do meio celular, reduzindo assim a taxa de crescimento desses microrganismos. A salinidade também provoca perturbações no sistema biológico devido à variação da força iônica do meio, ocasionando plasmólise e perda da atividade metabólica (Uygur e Kargi, 2004).

Uygur e Kargi (2004) investigaram o efeito da salinidade no desempenho da remoção de nutrientes em um reator operado em batelada sequencial (RBS). A remoção de nitrogênio amoniacal caiu de 96% para 39% quando o teor de sal aumentou de 0% para 6%, fato justificado pela inibição da atividade celular pela salinidade.

Abu-Ghararah e Sherrard (1993), em estudo sobre a remoção biológica de nutrientes em alta salinidade, em sistema de lodos ativados, concluiu que salinidades de até 0,4% (4 g.L⁻¹ de NaCl) tem pouco efeito sobre a taxa de nitrificação.

Sánchez et al. (2004) analisou o efeito da concentração de sal (0 a 60 g.L⁻¹) sobre as etapas de nitrificação e relataram que as altas concentrações de sal afetam

mais a taxa de nitratação do que a taxa de nitrificação, podendo ocorrer acúmulo de nitrito no sistema biológico.

Desnitrificação

A desnitrificação é a etapa subsequente à nitrificação, onde o nitrato (NO_3^-) é transformado em nitrogênio gasoso (N_2) e lançado para atmosfera, sendo essa conversão realizada por bactérias heterotróficas desnitrificantes, em condições anóxicas, tendo o nitrato (ou nitrito) como acceptor de elétrons (Madigan et al. 2010).

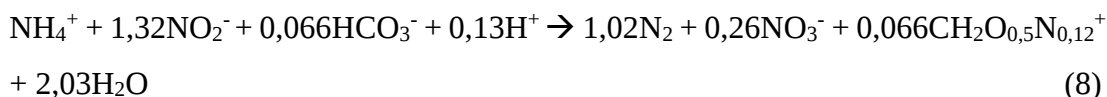
A oxidação do nitrato a nitrogênio gasoso ocorre em etapas sequenciais, representada pela Equação 7:



A eficiência da desnitrificação depende da disponibilidade de compostos de carbono orgânico, que são utilizados como fonte de energia para produção de ATP, assim como temperatura, pH, concentração de oxigênio dissolvido, concentração de nitrato, relação C/N, tempo de retenção celular e presença de substâncias inibidoras. Os principais gêneros de bactérias responsáveis pelo processo de desnitrificação são: *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Halobacterium*, *Hiphomicrobium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Rhodopseudomonas*, *Thiobacillus*, *Vibrio* e *Xanthomonas* (Rittman e Langeland, 1985).

Processo ANAMMOX (*Anaerobic Ammonium Oxidation*)

No processo ANAMMOX os microrganismos oxidam a amônia e o nitrito simultaneamente sob condições anaeróbias. O íon amônio é oxidado diretamente a nitrogênio gasoso, e o nitrito é utilizado como acceptor final de elétrons. Além do nitrogênio gasoso, o nitrato representa também é um subproduto do processo ANAMMOX e representa cerca de 10% do nitrogênio removido. O processo é realizado por bactérias autotróficas, que utilizam o CO_2 como única fonte de carbono. (Strous et al. 1997). A reação estequiométrica do processo está apresentada na Equação 8 (Van de Graaf, et al. 1996):



O processo ANAMMOX é baseado nos microrganismos pertencentes ao filo Planctomicetos, onde cinco foram denominados provisoriamente de *Candidatus Brocadia anammoxidans*, *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*, *Candidatus Scalindua wagneri*, *Candidatus Anammoxoglobus propionicus* (Kartal et al. 2007) e *Candidatus Jettenia asiatica* (Quan et al. 2008).

Concentrações de nitrito acima de 0,1 g L⁻¹ pode vir a inibir completamente o processo ANAMMOX, além de substâncias orgânicas como piruvato, metanol, etanol, glicose e alanina. (Strous et al. 1997; Jetten, et al. 1999). O processo ainda pode sofrer inibição devido a presença de oxigênio dissolvido, portanto o ANAMMOX deverá ocorrer sob condições de limitação de oxigênio.

Nitrificação heterotrófica/Desnitrificação aeróbia

Além das vias clássicas de remoção de amônia um novo processo vem se destacando, a nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia. Neste processo os microrganismos são capazes de oxidar a amônia via nitrito e nitrato, e também reduzir o nitrito a nitrogênio gasosos em condições aeróbias. O oxigênio e o nitrato são utilizados simultaneamente como aceptor final de elétrons (Matsuzaka et al. 2003; Robertson e Kuenen 1983).

A amônia é inicialmente oxidada a hidroxilamina. A hidroxilamina, sob condições anóxicas, é oxidada a óxido nitroso, ou, sob condições aeróbias, é oxidada para nitrato e/ou óxido nítrico. Esse processo apresenta vantagens em relação ao processo de nitrificação tradicional realizado por autotróficas, tais como a remoção simultânea de carbono e nitrogênio e a tolerância à presença de oxigênio em todas as etapas do processo (Robertson e Kuenen 1983).

Diversas bactérias com essa propriedade já foram descritas, como: *Arthrobacter* sp. (Verstrae e Alexande 1972), *Paracoccus denitrificans* (Robertson e Kuenen 1983), *Alcaligenes faecalis* (Joo et al., 2005), *Bacillus* sp. (Yang et al. 2011), *Pseudomonas* sp. (Wan et al. 2011), *Pseudomonas stutzeri* (Zhang et al. 2011),

Bacillus methylotrophicus (Zhang et al. 2012), *Acinetobacter* sp. (Yao et al. 2013), *Halomonas campisalis* (Guo et al. 2013) e *Aeromonas* sp. (Chen et al. 2014).

3. Estudo da diversidade microbiana

Nas últimas décadas, observou-se um grande avanço tecnológico na área de microbiologia, o que permitiu um melhor entendimento da composição das comunidades microbianas em diversos ambientes.

Convencionalmente, os estudos de ecologia microbiana eram realizados através de microscopia e técnicas dependentes de cultivo de micro-organismos, em meios de cultura enriquecidos. Contudo, apenas de 1-10% das espécies do total de microrganismos podem ser facilmente cultiváveis através de práticas comuns de laboratório. As demais espécies acabam sendo inacessíveis devido à dificuldade de simular as condições ambientais específicas requeridas para seu cultivo (Amann et al. 1995; Muyzer et al. 1993)

Quando se refere a estudos da diversidade microbiana de organismos associados a determinado ambiente, como o caso dos lodos ativados, as limitações das técnicas tradicionais de cultivo se tornam ainda maiores na detecção de identificação de micro-organismos (Amann et al. 1995).

Dessa forma, considerando as limitações das técnicas dependentes de cultivo tradicionalmente aplicadas nos estudos de ecologia microbiana, diversas técnicas independentes de cultivo têm sido desenvolvidas para a obtenção de dados mais completos e confiáveis sobre a estrutura e composição de espécies de comunidades bacterianas extraídas diretamente de amostras coletadas no ambiente (Amann et al. 1995, Head et al. 1998).

Essas técnicas são normalmente baseadas nas análises de sequência dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), mais precisamente o gene DNA ribossomal (16S rRNA). O gene de rDNA são geneticamente estáveis e altamente conservadas entre os organismos que participam a mesma espécie (rRNA), são considerados a “impressão digital” de um organismo. Dessa forma, é possível realizar comparações gênicas de organismos dentro de um único domínio, caracterizar estirpes da mesma espécie e classificar de forma filogenética a diversidade microbiana (Woese, 1987; Dezotti, et al. 2011).

Dentre as técnicas baseadas em biologia molecular utilizadas nos estudos de diversidade microbiana de amostras ambientais, destacam-se: técnicas de amplificação de alvos-específicos (PCR, PCR competitiva, PCR-transcriptase reversa/RT-PCR e PCR em tempo real), eletroforese em gel de gradiente desnaturante e temperatura (DGGE/TGGE), análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (RFLP/ARDRA), polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminais (T-RFLP), técnica de hibridização *in situ*, análise por hibridização do tipo *dot/blot*, construção de biblioteca de genes (Rosado e Duarte, 2002).

Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

No final da década de 1980, Kary Mullis desenvolveu um método de clonagem *in vitro* chamada de técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR), um marco que revolucionou a pesquisa e a prática da biologia molecular (Rahman et al. 2013).

A PCR é umas das técnicas mais aplicadas nas diferentes áreas de diagnóstico e melhoramento genético, e visa a identificação de micro-organismos em diversas amostras (Bartlett e Stirling, 2003).

A técnica da PCR permite à amplificação *in vitro* do DNA de fragmentos específicos, utilizando quantidades mínimas de DNA. A região a ser amplificada é definida por um par de iniciadores (*primers*), construídos artificialmente para complementar a região do gene (16S do rDNA) de interesse. O fragmento de DNA de interesse é replicado múltiplas vezes por meio da enzima DNA polimerase, a fita molde é pareada com o *primer* e as cópias de DNA são formadas (Bartlett e Stirling, 2003; Arnheim e Erlich, 1992; Mullis, 1990).

Cada ciclo da PCR envolve três etapas básicas que ocorrem de forma sucessível: desnaturação, anelamento (hibridização dos oligonucleotídeos iniciadores) e amplificação. Na desnaturação ocorre a separação da dupla fita de DNA através da elevação da temperatura (normalmente entre 90 a 95°C). No anelamento, a temperatura é reduzida entre 45 e 60°C (podendo variar de acordo com o par de *primer*), e ocorre o pareamento do par de *primers* com as fitas resultantes da etapa anterior. Finalmente, na amplificação, sob temperatura aproximadamente de 70 a 72°C, a enzima DNA-polimerase liga os nucleotídeos entre si ocorrendo a síntese da nova fita de DNA, uma cópia da sequência alvo.

Os ciclos da PCR são repetidos cerca de 25 a 40 vezes, ocorrendo uma reação em cadeia. As fitas recém-formadas e as originais servem de molde para a montagem de novas fitas, como uma amplificação exponencial, produzindo em pouco tempo milhões de cópias de DNA específico (Mullis, 1990).

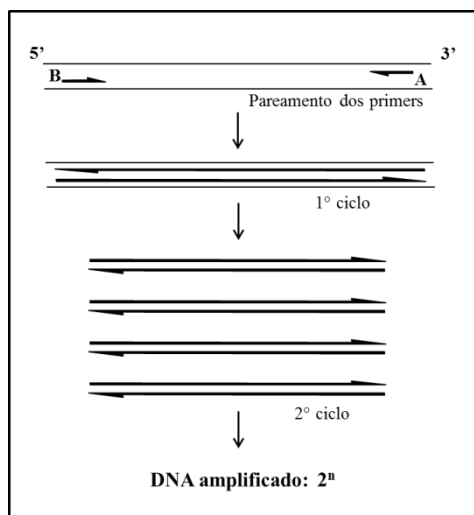


Figura 2. Esquema representativo da reação da PCR

Todo o procedimento da PCR pode ser realizado de forma cíclica e automática, sem que haja necessidade de transferência manual de banhos de temperatura, através de um equipamento eletrônico denominado “termociclador”.

Para a consolidação da reação de PCR são necessários alguns componentes básicos, entre eles: água, DNA molde, oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), Taq DNA-polimerase, desoxirribonucleotídeos fosfatados, cloreto de magnésio e um tampão. Tipicamente o volume de reação utilizado está entre 15 a 100µL, a depender do material utilizado (Rahman et al. 2013).

Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

A técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante, o DGGE, vem sendo amplamente utilizada para o monitoramento da diversidade microbiana de diferentes grupos, nos mais variados ambientes.

O método permite separar os fragmentos amplificados de DNA de mesmo tamanho, mas com sequências de nucleotídeos diferentes, baseado na mobilidade eletroforética de uma molécula de DNA parcialmente desnaturada, em géis de

poliacrilamida contendo um gradiente linear de agentes desnaturantes (ureia e formamida) (Muyzer et al. 1993; Muyzer e Smalla, 1998).

A sequência de bases do fragmento de DNA ocupará sua posição no gradiente em que o DNA de dupla fita helicoidal irá desnaturar-se, passando a fita simples, nesse momento sua migração no gel é interrompida. Moléculas com sequências de pares de bases diferentes apresentam variações de gradiente de desnaturação, interrompendo sua migração em distintas posições do gel, separando as mesmas. Cada banda representa uma população ou espécie distinta de micro-organismo presente na amostra (Muyzer et al. 1993).

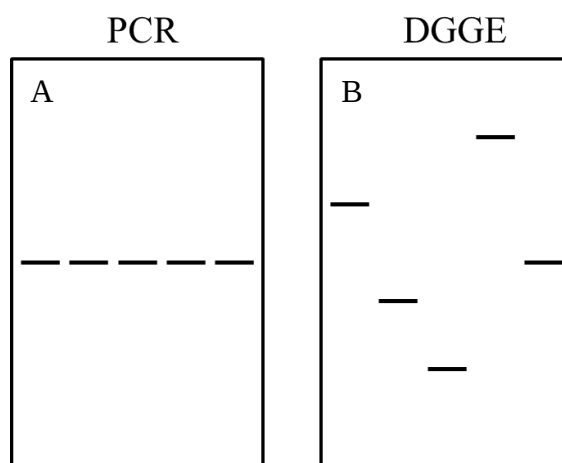


Figura 3. Esquema ilustrativo mostrando produtos de PCR com sequência nucleotídica diferentes analisados através de eletroforese em gel de agarose (A) e em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (B) (adaptado de Rosado e Duarte, 2002).

A partir do DGGE é possível analisar o perfil das populações microbianas complexas de amostras ambientais, examinando as espécies predominantes e o comportamento das comunidades microbianas ao longo do tempo e sobre efeito de determinados estresse ou perturbação antropogênica (Muyzer e Smalla, 1998).

Como toda técnica, o DGGE também possui vantagens e desvantagens. Dentre as vantagens pode-se citar: metodologia simples e sem uso de radioativos, taxa de detecção e sensibilidade elevada, os fragmentos podem ser isolados a partir do gel e usados no sequenciamento, possibilidade a análise simultânea de amostras múltiplas. Entre as limitações podemos citar: a compra de equipamento específico, genes excepcionalmente ricos em GC não são facilmente analisados, o método envolve o uso

de formamida (substância tóxica), a técnica não é quantitativa, apenas fragmentos menores que 500pb podem ser separados no gel (Muyzer e Smalla, 1998; Myers et al. 1986).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu-Ghararah, Z. H., Sherrard, J. H. (1993) Biological nutrient removal in high salinity wastewater. *J. Environ. Sci. Health.*, 28, 599-613.

Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169

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

Arnheim, N., Erlich, H. (1992) Polymerase Chain Reaction Strategy. *Ann. Rev. Biochem.*, 61, 131-156.

Bartlett, J. M. S., Stirling, D. A. (2003) Short history of the Polymerase Chain Reaction. *Methods Mol. Biol.*, 226, 3-6.

Campos, J. L., Garrido, J. M., Mosquera-Corral, A., Méndez, R. (2007) Stability of a nitrifying activated sludge reactor. *Biochem. Eng. J.*, 35, 87-92.

Chen, M., Wang, W., Feng, Y., Zhu, X., Zhou, H., Tan, Z., Li, X. (2014) Impact resistance of different factors on ammonia removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium *Aeromonas* sp. HN-02. *Bioresour. Technol.*, 167, 456-461.

Clark, C. E., Veil, J. A. Produced water volumes and management practices in the United States. ANL/EVS/R-09/1. Environmental Science Division, Argonne National Laboratory, Chicago, 64p, 2009.

Dezotti, M., Sant'anna Jr, G. L., Bassin, J. P. Processos biológicos avançados para tratamento de efluentes e técnicas de biologia molecular para o estudo da diversidade microbiana. Rio de Janeiro: Editora Interciência. 2011.

Gabardo, I. T. (2007) Caracterização química e toxicológica da água produzida descartada em plataformas de óleo e gás na costa brasileira e seu comportamento

dispersivo no mar. Tese (Doutorado em Química) Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brasil.

Guo, Y., Zhou, X., Li, Y., Li, K., Wang, C., Liu, J., Yan, D., Liu, Y., Yang, D., Xing, J. (2013) Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Halomonas campisalis*. *Biotechnol. Lett.*, 35(12), 2045-2049.

Head, I. M., Saunders, J. R., Pickup, R. W. (1998) Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial. Ecology.*, 35, 1-21.

Jetten, M. S. M., Strous, M., van de Pas-Schoonen, K. T., Schalk, J., van Dongen, U. G. J. M. van de Graaf, A. A., Logemann, S., Muyzer, M. van Loosdrecht, M. C. M., Kuenen, J. G. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiol. Rev.*, 22, 421-37.

Joo, H. S., Hirai, M., Shoda, M. (2005) Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification–aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis*. *J. Biosci. Bioeng.*, 100(2), 184-191.

Kartal, B., Rattray, J., van Niftrik, L., van de Vossenberg, J., Schmid, M. C., Webb, R. I., Schouten, S., Fuerst, J. A., Damsté, J. S. S., Jetten, M. S. M., Strous, M. (2007) Candidatus “*Anammoxoglobus propionicus*” gen. nov., sp. Nov., a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, 30(1), 39-49.

Koops, H-P., Pommerening-Röser, A. The Lithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria. In: BRENNER, D. J. et al., eds. *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, v. 2, Part A. Springer-Verlag, New York. 2005.

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

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

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

Matsuzaka, E., Nomura, N., Nakajima-Kambe, T., Okada, N., Nakahara, T. (2003) A Simple Screening Procedure for Heterotrophic Nitrifying Bacteria with OxygenTolerant Denitrification Activity. *J. Biosci Bioeng.*, 95(4), 409- 411.

Metcalf and Eddy. *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, Reuse*. 4th ed. McGraw- Hill, New York. 2003.

Moussa, M. S., Sumanasekera, D. U., Ibrahim, S. H., Lubberding, H. J., Hooijmans, C. M., Gijzen, H.J., van Loosdrecht, M. C. M. (2006) Long term effects of salt on activity, population struture ond floc characteristics in enriched bacterial cultures of nitrifiers. *Water Res.*, 40, 1377-1388.

Mullis, K. B. (1990) The Unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci. Am.*, 262(4), 56-61, 64-65.

Muyzer, G., Smalla, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73(1), 127-141.

Muyzer, G., Waal, E. C., Uitterlinden, A. G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(3), 695-700.

Myers, R. M., Fischer, S. G., Lerman, L. S., Maniatis, T. (1985) Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.*, 13(9), 3131-3145.

Neff, J.; Lee, K.; DeBlois, E. M. Produced water: Overview of composition, fates, and effects. Chapter 1 in: Lee, K.; Neff, J. (Eds). *Produced Water*, Springer, New York, pp. 3- 54, 2011.

Neef, J. M. Bioaccumulation in marine organisms. Effects of contaminants from oil well produced water. Elsevier, Amsterdam, 452 pp, 2002.

Painter, H. A. (1977) Microbial transformations of inorganic nitrogen. *Prog. Water Technol.*, 8, 3-29.

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

PETROBRAS, 2012. Relatório de Sustentabilidade 2011. Rio de Janeiro, 2012. 88p. Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br/rs2011>>. Acesso em 15 jan. 2013.

Quan, Z. X., Rhee, S. K., Zuo, J. E., Yang, Y., Bae, J. W., Park, J. R., Lee, S.. T., Park, Y. H. (2008) Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge

anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor. *Environ. Microbiol.*, 10(11), 3130-3139.

Rahman, M. T., Uddin, M. S., Sultana, R., Moue, A., Setu, M. (2013) Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Mod. Med. Coll. J.*, 4(1), 30-36.

Rittmann, B. E., Langeland, W. E. (1985) Simultaneous denitrification with nitrification in single channel oxidation ditches. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 45(2), 249 – 260.

Ray, J. P., Engelhardt, F. R. *Produced Water: Technological Environmental Issues and Solutions*, Plenum Press: New York, 1992.

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

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

Sánchez, O., Aspé, E., Martí, M. C., Roeckel, M. (2004) The effect of Sodium Chloride on the two-step kinetics of the nitrifying process. *Water Environ. Res.*, 76(1), 73-80.

Sant'anna Junior, G. L. *Tratamento biológico de efluentes: Fundamento e Aplicações*. 1. Ed, Rio de Janeiro: Editora Interciência. v.1, 418 p, 2010.

Schleper, C., Nicol, G. W. (2010) Ammonia-oxidising archaea-physiology, ecology and evolution. *Adv. Microb. Physiol.*, 57, 1-41.

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

Strous, M., van Gerven, E., Kuenen, J. G., Jetten, M. (1997) Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(6), 2446-2448.

Thomas, J. E. *Fundamentos de Engenharia de Petróleo*, 2 ed. Rio de Janeiro, Interciência: Petrobras, 2001.

Tibbetts, P. J. C., Buchanan, I. T., Gawel, L. J., Large, R. (1992). A comprehensive determination of produced water composition. In: Ray, J. P., and

Engelhardt, F. R. (eds.). Produced Water: Technological Environmental Issues and Solutions. Plenum Press, New York.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Manual for Nitrogen control. EPA/625/R-93/010. Washington, DC: U. S. Government Printing Office, 1993

Uygur, A., Kargi, F. (2004). Salt inhibition on biological nutrient removal from saline wastewater in a sequencing batch reactor. *Enzyme Microb. Technol.*, 34 (3-4), 313-318.

van de Graaf, A. A., Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M. S. M., Kuenen, J. G. (1996). Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*. 142, 2187-2196.

Vanparys, B., Bodelier, P., De Vos, P. (2006) Validation of the correct start codon of *norX/nxrX* and universality of the *norAXB/nxrAXB* gene cluster in *Nitrobacter* species. *Curr. Microbiol.*, 53(3), 255-257.

Verstrae, W., Alexande, M. (1972) Heterotrophic nitrification by *Arthrobacter* sp. *J. Bacteriol.*, 110(3), 955-961.

Wan, C., Yang, X., Lee, D.J., Du, M., Wan, F., Chen, C. (2011) Aerobic denitrification by novel isolated strain using as nitrogen source. *Bioresour. Technol.* 102(15), 7244-7248.

Woese, C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 51(2), 221-271.

Yang, X. P., Wang, S. M., Zhang, D. W., Zhou, L. X. (2011) Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1. *Bioresour. Technol.*, 102(2), 854-862.

Yao, S., Ni, J., Ma, T., Li, C. (2013) Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. HA2. *Bioresour. Technol.*, 139, 80-86.

Zhang, J., Wu, P., Hao, B., Yu, Z. (2011) Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. *Bioresour. Technol.*, 102(21), 9866-9869.

Zhang, Q. L., Liu, Y., Ai, G. M., Miao, L. L., Zheng, H. Y., Liu, Z. P. (2012) The characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotrophicus* strain L7. *Bioresour. Technol.*, 108, 35-44.

CAPÍTULO 2

NITRIFICATION OF PETROLEUM EXTRACTION PRODUCED WATER: EVALUATING THE EFFECT OF INCREASING SALT CONCENTRATIONS ON THE NITRIFYING ACTIVITY

Larissa Quartaroli¹, Claudio Mudadu Silva^{2*}, Sergio Oliveira de Paula³, Cynthia Canedo da Silva⁴, Rodrigo Suhett de Souza⁵, João Paulo Bassin⁶

¹ Department of Civil Engineering, Universidade Federal de Vicosa, Vicosa, Minas Gerais, Brazil.

² Department of Forest Engineering, Universidade Federal de Vicosa, Vicosa, Minas Gerais, Brazil.

³ Department of General Biology, Universidade Federal de Vicosa, Vicosa, Minas Gerais, Brazil

⁴ Department of Microbiology, Universidade Federal de Vicosa, Vicosa, Minas Gerais, Brazil

⁵ Treatment Technologies and Water Reuse, Petrobras, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁶ Chemical Engineering Program - COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

*Autor Correspondente: Av. Peter Henry Rolfs, s/n - Campus Universitário, Laboratório de Celulose e Papel, Viçosa - MG, 36570-900, Tel.: +55 31 3899-2717. E-mail: mudado@ufv.br.

ABSTRACT

Oil and gas exploration activities generate a considerable amount of wastewater, among which *produced water* is the most relevant. The chemical complexity of this stream (high ammonium and salt concentrations) adversely affects biological treatment and can be detrimental sensitive organisms such as the nitrifiers. This study addressed the nitrification of *produced water* from a Brazilian oil extraction platform. Lab-scale experiments have shown that nitrification activity could not be sustained with raw *produced water* in the long term. Nevertheless, when the *produced water* was appropriately diluted, the detrimental effects on nitrification were significantly reduced. The experiments evaluating the effect of increasing salt concentrations on nitrification have shown that complete ammonium removal could be achieved even at very high salt concentrations (up to 100 g NaCl L⁻¹). At 125 g NaCl L⁻¹, however, nitrifiers were completely inhibited and a negligible ammonium removal was observed. Additional tests with no biomass and under similar operational conditions to those applied in previous experiments confirmed that biological nitrification was the most important mechanism of ammonium removal.

Keywords: nitrification, produced water, high salinity, inhibition, pre-salt.

1. INTRODUCTION

Oil and gas exploration and production industries are responsible for the generation of a considerable amount of wastewater (Stephenson 1992). The greatest source of pollution resulting from these activities consists of produced water. Produced water naturally exists in the geological formation of oil reservoirs, and, along with the

oil and gas exploration, is transported to the surface of the oil well. Many contaminants, such as hydrocarbons, heavy metals, and chemical additives are found in the produced water composition. During oil exploration, the volume of this produced water can reach around 10 times the volume of extracted oil (Stephenson 1992). Due to its origin, the produced water contains ions in solution at variable concentrations. Chloride, sodium, calcium, magnesium, sulphide, and ammonium are among the ions present in highest concentrations (Fakhru'l-Razi et al. 2009; Stephenson 1992).

Recently in Brazil, oil reserves were found in the so-called pre-salt region. The pre-salt region consists of a set of rocks with a high potential for the generation and accumulation of petroleum, located in ultra-deep waters under an extensive layer of salt with a thickness of up to 2000 m. The pre-salt was created around 160 million years ago, when the supercontinent Gondwana began to break apart, giving place for the South American and African continents. The deposition of sediments between the two continents created a low energy and high salinity environment. (Formigli et al. 2009; Magalhaes et al. 2014). Produced waters in pre-salt region are known to have high concentrations of chloride. Depending on the exploration field and age of the oil well, the salinity level can reach $200 \text{ gCl}^- \text{ L}^{-1}$. In addition to salinity, these waste streams present high concentrations of nitrogen in the form of ammonium, which is generated during the natural geological formation of the petroleum reservoir or by means of biological activity (Swan et al. 1994; Tibbetts et al. 1992).

Ammonium is an important source of nitrogen for living beings and is found in throughout the environment in the air, soil, and water. Its presence in water bodies can cause numerous negative effects on the environment and aquatic life. High levels of nitrogen induce the occurrence of eutrophication, during which proliferation of harmful cyanobacteria blooms may take place. Loss of species diversity in the affected ecosystem as well as degradation of recreational resources are also potential consequences of the eutrophication. In addition to the negative consequences arising from this process, the toxicity posed by free ammonia (NH_3) is an important aspect that should be considered in nitrogen-rich wastewaters (Reinbold and Pescitelli 1982, Bhavender Sharma and Ahlert, 1977, Fakhru'l-Razi et al. 2009).

Given the importance of avoiding the discharge of nitrogen compounds into the environment to minimize their associated problems in the aquatic ecosystems, nitrogen removal from wastewaters is often implemented in the wastewater treatment

plants. One of most sustainable and cost-efficient approach to achieve such a goal involves the use of microorganisms in the so-called biological wastewater treatment processes. Conventionally, the biological nitrogen removal process is accomplished in two sequential stages: nitrification and denitrification. In the first step, ammonium is oxidized to nitrate with intermediate formation of nitrite. Subsequently, denitrifying organisms reduce the nitrate to nitrogen gas in an anoxic environment (Metcalf and Eddy 2003). Nitrification is regarded as the rate-limiting step in the overall biological nitrogen removal process. This autotrophic process is very vulnerable to several environmental conditions (e.g., pH, dissolved oxygen and temperature) (Kaplan et al. 2000) and wastewater characteristics different (Pagga et al. 2006; Bassin et al. 2012). Hence, it has been frequently reported to be the cause of failure of many wastewater treatment plants.

High salt concentration, a common characteristic of many industrial wastewaters (Dahl et al. 1997), is known to adversely affect the metabolic activity of nitrifiers, provoking a reduction in both the microbial growth and ammonium conversion rates (Moussa et al. 2006). Hence, the effect of salt on the nitrification process has been subject of study in several previous investigations. Most of the research undertaken within this topic involves the use of synthetic saline wastewater prepared in the laboratory (Uygur and Kargi 2004; Moussa et al. 2006; Pronk et al. 2014). Although this approach allows for more well-controlled experimental conditions, it does not take into account the complexity and variability of real wastewaters. In this sense, the use of real wastewaters provides a more representative picture of the challenges faced in reality. In fact, the treatment of high salinity wastewater coming from a wide range of industrial processes by biological means has also been reported previously (Tellez et al. 2002; Lefebvre et al. 2004; Lima et al. 2009). From the aforementioned studies, only Lima et al. (2009) investigated the removal of ammonium from produced waters. However, these authors made use of an electrolytic process to achieve such a goal, while the use of biological process to mediate this conversion was not investigated. The importance of the pre-salt region and the increasing exploitation of the oil reserves located in this region motivated this work, whereby the effect of increasing salt concentrations on biological nitrification of produced water from the pre-salt region was addressed. Several experiments were conducted to determine the most appropriate conditions for the establishment of a

nitrifying consortium capable of removing ammonium from this complex waste stream.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Wastewater source

The wastewater under study consisted of *produced water* from oil extraction collected at a treatment plant located at a Petroleum Terminal in the Brazilian Coast. The treatment process in the Petroleum Terminal comprises of a dissolved air flotation unit, where oil is separated from the water; an equalization tank, where pH is adjusted to 7 and sodium tripolyphosphate is dosed as a phosphorus source to ensure a COD:P ratio of 100:1; three independent activated sludge reactors run in sequencing-batch mode with a hydraulic retention time of 8 h. A schematic representation of Industrial Wastewater Treatment Plant is shown in Figure 1. In order to better understand the effect of increasing salt concentrations on nitrification of the produced water arisen from the oil extraction activities, a more systematic laboratory-scale experiment was designed. The wastewater used in this study was collected downstream of the equalization tank (Fig. 1).

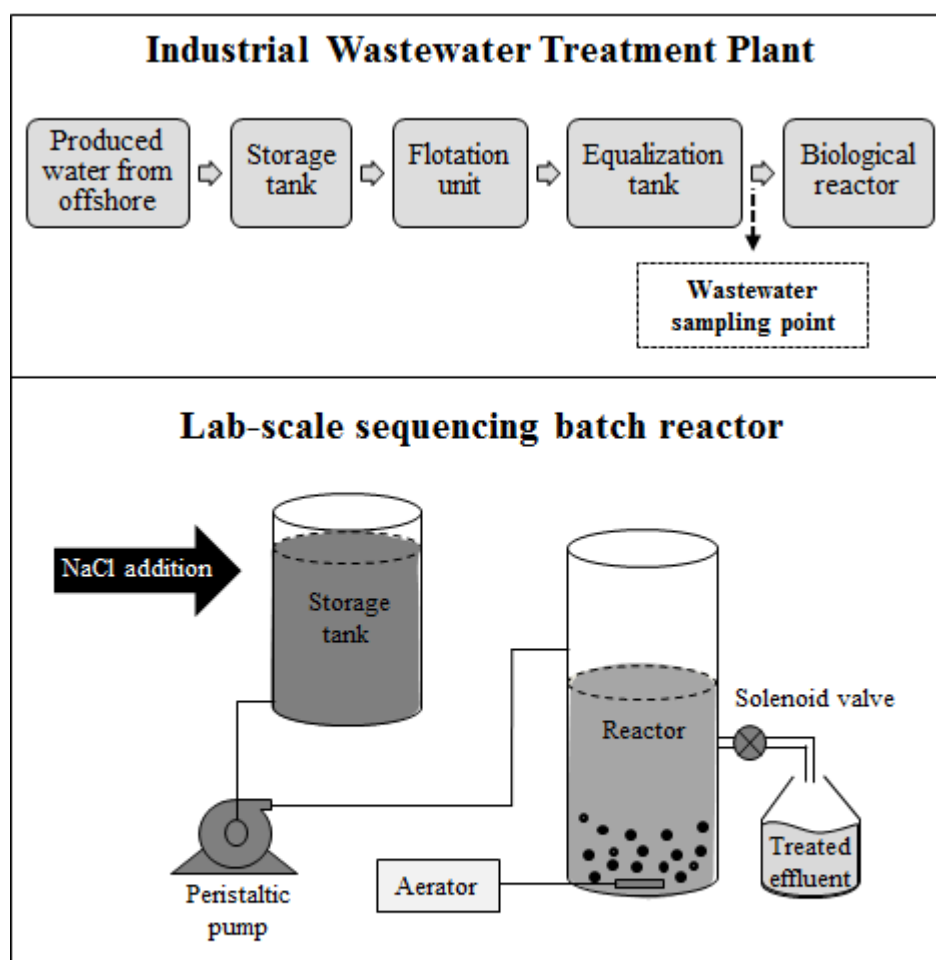


Fig. 1. Schematic flow-diagram of the industrial treatment plant of produced water generated during oil extraction activities and lab-scale experimental apparatus.

The wastewater was transported to the laboratory located at the Federal University of Vicosa (Vicosa, Minas Gerais, Brazil), and stored at 4°C until use, in order to maintain its original characteristics. The lab-scale experiments were conducted in two identical sequencing-batch reactors with 8 h cycle. Salt was artificially added to investigate its impact on the nitrification performance. The pre-salt production water can reach chloride concentration up to 200g L⁻¹. Table 1 presents the average values obtained for several physicochemical parameters analysed during the characterization of produced water collected over the entire experiment.

Table 1: Physicochemical characterization of the produced water used in this study. Both the raw and diluted waste stream composition are shown. The 1:2 dilution ratio was determined in a preliminary experiment, as will be explained further on.

Parameters	Raw Wastewater	Diluted Wastewater 1:2 (effluent:distilled water)
COD (mg L ⁻¹)	1,487 ± 99	420 ± 57
Ammonium (mg L ⁻¹)	108 ± 24	38 ± 7
Nitrite (mg L ⁻¹)	< 0.6	< 0.6
Nitrate (mg L ⁻¹)	< 5.0	< 0.6
Color (mg L ⁻¹)	1,020 ± 48	250 ± 35
Turbidity (NTU)	32 ± 7	12 ± 4
Total Suspended Solids (mg L ⁻¹)	106 ± 26	30 ± 10
Total Dissolved Solids (mg L ⁻¹)	80,990 ± 8018	27,954 ± 159
pH	7.60 ± 0.1	7,7 ± 0.1
Alkalinity (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	1273 ± 125	490 ± 68
NaCl (mg L ⁻¹)	73,400 ± 2380	24,690 ± 986

2.2 Preliminary experiments with produced water

Preliminary experiments were conducted to investigate the adaptation of microorganisms to the produced water. During approximately one month, two identical lab-scale sequencing-batch reactors (SBR) were fed with produced water. Sludge from the full-scale aerobic tanks (Fig. 1) was used as inoculum for the lab-scale SBRs. Due to operational problems, such as floc malformation, sludge washout, microorganism growth inhibition (oxygen uptake rate extremely low), additional tests were conducted. A second round of experiments were completed, the raw wastewater was diluted in order to determine the minimum dilution that would enable adaptation of microorganisms within the reactor systems. Distilled deionized water was used for dilution to keep only the constituents of the produced water without the addition of other organic and inorganic compounds. The following wastewater:distilled water ratios were used: 1:4, 1:3, 1:2, and 1:1. Raw undiluted wastewater was also used as a comparison and for confirmation of the results obtained in the previous experiments. Furthermore, two reactors were operated to confirm the reproducibility of the results.

2.3 Reactor set-up and operating conditions

The experiments were carried out in two sequencing-batch reactors (R1 and R2), operated in parallel, with a volume of 1 L. The reactors were equipped with air diffusers for aeration and mixing and were inoculated with 500 mL of activated sludge from the full-scale activated sludge system (shown in Fig. 1). The reactors were continuously fed with the produced water. The lab-scale bioreactors were kept at 30°C and were operated in 8-h cycles, which consisted of 2.5 h of aerated feeding, 4.5 h of reaction under aerobic conditions, 55 min of sedimentation and 5 min of effluent discharge. The pH in R1 and R2 was corrected to 6.5. After sedimentation, 200 mL of the supernatant (treated effluent) was withdrawn from the reactors and the cycles were restarted. Therefore, the hydraulic retention time of each reactor was 40 h. The dissolved oxygen (DO) levels were always kept above 2 mg L⁻¹. In addition, 4 mg L⁻¹ of phosphoric acid was added to the influent diluted wastewater to ensure sufficient phosphorus for microbial metabolism.

Figure 2 shows a schematic representation of the experimental conditions applied in this study, which was divided in two stages. The nitrification potential was evaluated at different salinity levels. Three reactors (R1, R2, and R3) were operated in parallel. R1 and R2 were subjected to gradual increase of salt (NaCl) concentrations, whereas R3 acted as a control (no additional salt was added). The background salt concentration in R3 was 25 g L⁻¹. Salinity concentrations in R1 and R2 were increased by 5 g L⁻¹ per week until nitrification inhibition was detected. Based on the prediction that biomass loss could occur due to salt addition, R1 received the extra load of salt first, while R2 received it after one week of operation. In this sense, salt addition was alternated between R1 and R2. The initial goal of this research was to reach a final NaCl concentration of 200 g L⁻¹, which is similar to the concentration expected in the Brazilian pre-salt produced water. A single aerated reactor (R4) containing no biomass was also operated to evaluate the removal of ammonium by other means than by biological nitrification (Figure 2). Because ammonia volatilization is dependent on pH, the incoming wastewater pH was corrected to 6.5. Raw wastewater was used as feeding medium to this reactor. The pH, dissolved oxygen (DO), ammonium, nitrite, and nitrate were monitored hourly for 8 h.

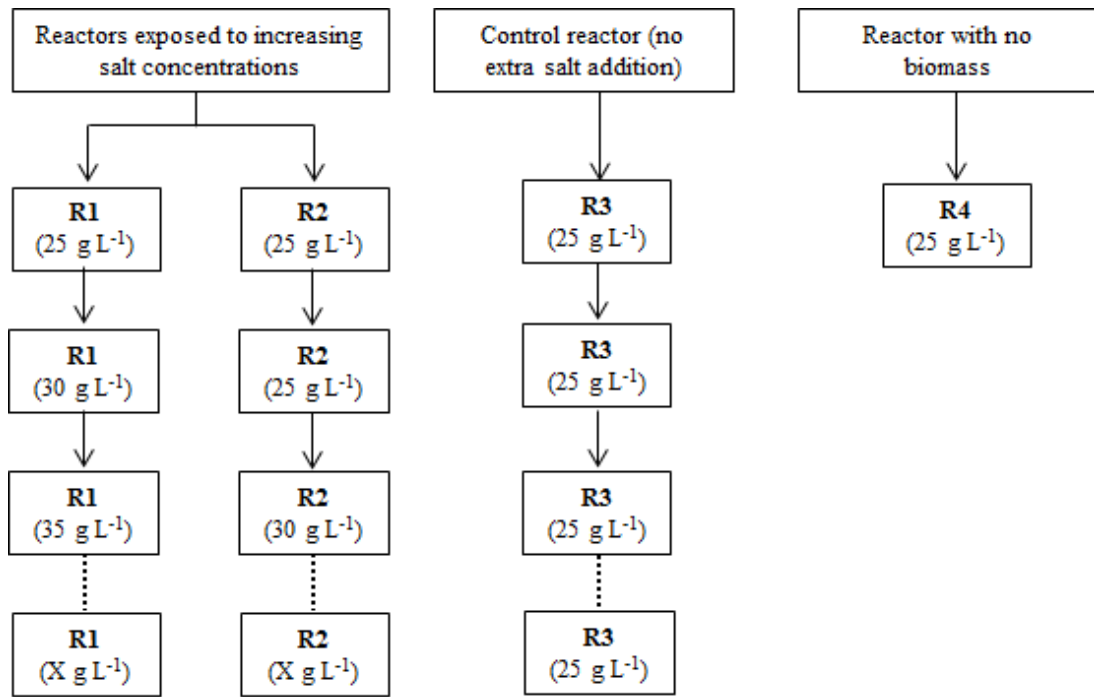


Fig. 2. Flowchart showing the experimental conditions applied to each reactor. “X” refers to the maximum salt concentration under which no nitrification activity was observed in R1 and R2. R3 (control experiment) was not supplied with extra salt. R4 was operated to observe if nitrification occurred by other means than through biological nitrification.

2.4 Analytical methods

The raw wastewater was characterized by means of the following parameters: chemical oxygen demand (COD), ammonium, nitrite, nitrate, colour, turbidity, total suspended solids (TSS), total dissolved solids (TDS), pH, alkalinity, and salinity. The evaluation of nitrification performance over time was performed through the assessment of ammonium, nitrite, and nitrate concentrations in the input and output streams. Commercial analytical kits (Hack TNT 836 and 840) were used to evaluate the nitrate and nitrite concentrations, respectively. The remaining determinations were carried out according to the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA 1998) as showed in Table 2.

Table 2: Specific method for each of the parameters studied.

Parameters	Specific method
COD	Standard Methods 5220 D (APHA, 1999)
Nitrogen (Ammonia)	Standard Methods 4500 – NH ₃ C (APHA, 1999)
Color	Standard Methods 2120 C (APHA, 1999)
Turbidity	Standard Methods 2130 B (APHA, 1999)
TSS	Standard Methods 2540 D (APHA, 1999)
TDS	Standard Methods 2540 C (APHA, 1999)
pH	Standard Methods 2550 B (APHA, 1999)
Alkalinity	Standard Methods 2320 B (APHA, 1999)
Salinity	Standard Methods 2520 B (APHA, 1999)

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Preliminary experiments with produced water

The first set of nitrification experiments with produced water from the Petroleum Terminal was conducted in two lab-scale SBRs (Fig. 3). In both reactors, which were operated under the same conditions, ammonium removal was observed to gradually increase from the beginning of the experiment until day 14. Concurrently, nitrate concentrations were observed to increase, confirming the occurrence of nitrification. Full ammonium removal was observed after the first two weeks of operation. However, from this period onwards, operational problems such as sludge deflocculation occurred, leading to massive biomass washout. The sharp reduction in the concentration of volatile suspended solids (VSS) observed from the beginning of the third week onwards coincided with the decrease in the ammonium removal efficiency. Consequently, less nitrate was observed in the effluent of the reactors. On day 28, no nitrate formation was noticed and the relatively low ammonium removal (%) was attributed to heterotrophic biomass growth.

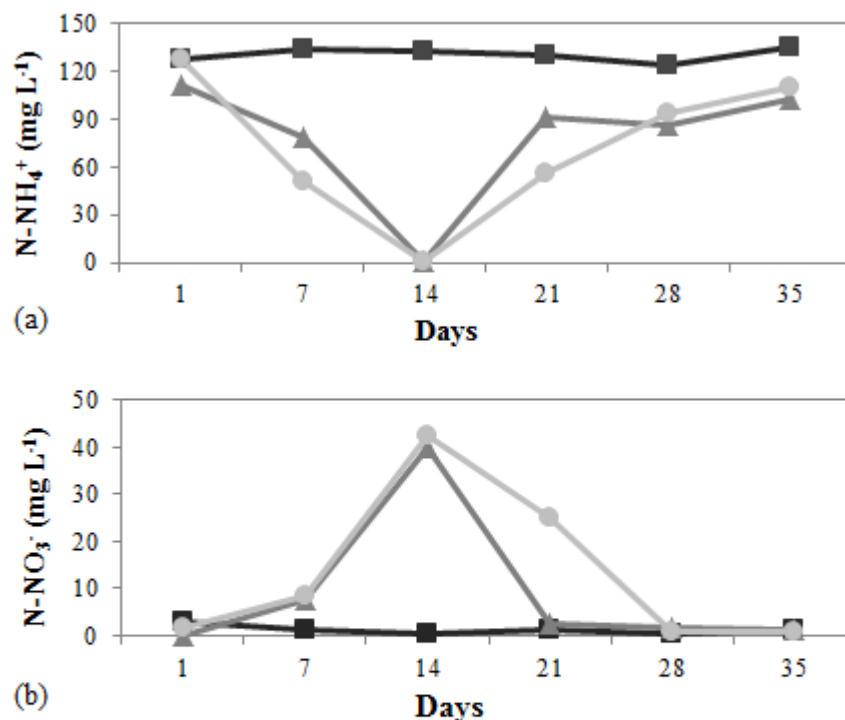


Fig. 3. (a) Ammonium concentrations in the influent (■) and effluent of R1 (●) and R2 (▲); and (b) nitrate concentrations in the influent (■) and effluent of R1 (●) and R2 (▲) over the preliminary experiment in which raw wastewater was fed to the reactors. This test was conducted until no nitrification was observed in the reactors (i.e., 35 days).

The results therefore showed that, similarly to what is observed in the industrial scale plant, the microorganisms in the lab-scale set-up could not adapt well to the raw wastewater. It may also be possible that some substances present in the incoming wastewater inhibited the nitrification process. As the results obtained in the two reactors were practically the same, it seems that only two weeks of continuous reactor operation is enough to completely lose the nitrifying activity. In an attempt to observe if the constituents of the produced water were indeed provoking inhibition to nitrifying bacteria, the influent wastewater was diluted with pure distilled water. The pure distilled water was selected as the dilution medium to avoid any other interference to the lab-scale biological treatment than that caused by the produced water constituents. In this set of experiments, the rate dilution (i.e., wastewater : distilled water ratio) was gradually increased from 1:4 to undiluted raw wastewater.

Taking into account that nitrate is the main product of nitrification, its concentration was determined in the subsequent assays to evaluate the nitrification

efficiency at different dilution ratios of the incoming wastewater. The effluent nitrate concentration increased as the ratio of influent : distilled water decreased from 1:4 to 1:1 (Fig. 4). This result was expected because a smaller dilution factor implies a greater concentration of ammonium in the influent, and, therefore, a greater amount of nitrate formed. This trend was clearly observed until day 28, in which a dilution factor of 1:1 was used. Afterwards, a significant reduction in nitrate formation was observed as a result of the decreasing amount ammonium that was oxidized by nitrifiers.

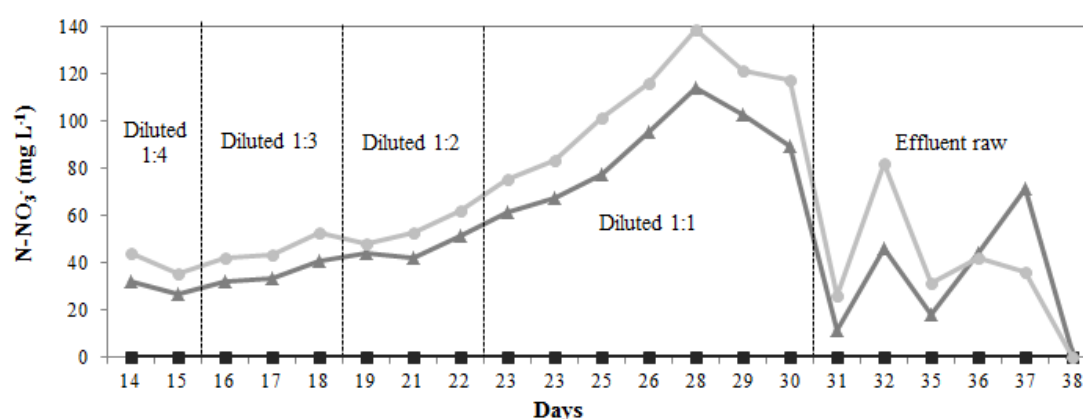


Fig. 4. Nitrification assessment by the quantification of nitrate in the tests carried at different dilution rates of the produced water. Nitrate concentrations over time were measured in the influent (■) and effluent of R1 (●) and R2 (▲).

The concentration of total suspended solids (TSS) was measured throughout the entire experiment in which the dilution rate was varied. The average TSS concentrations for all dilution ratios were similar and varied from 3500 mg L⁻¹ in R1 and 2500 mg L⁻¹ in R2. However, a severe drop in the amount of TSS was observed in both reactors when they were fed with undiluted effluent. After seven days of operation under these conditions, the TSS concentrations amounted to only 390 mg L⁻¹ and 830 mg L⁻¹ in R1 and R2, respectively. This corresponds to a decrease of 88% in R1 and 67% in R2.

The significant washout of TSS from the reactors is possibly a consequence of biomass decay. Furthermore, the results obtained with undiluted wastewater were consistent with the previous results and stresses the difficulties encountered for establishing an effective nitrifying consortium with this particular waste stream. In fact, the nitrification process can be inhibited by several organic compounds, by ammonia when present in high concentrations, especially in the non-ionized form (NH₃), and by nitrous acid (HNO₂) (Carrera et al. 2004; Sheintuch et al. 1995).

Hydrogen sulphide, total dissolved solids, and petroleum hydrocarbons, in their individual or combined forms, were reported to be the possible causes of toxicity posed by produced waters from oil production (Stephenson 1992). Gabardo (2007) found values in the range of 0.05 to 6.8 mg L⁻¹ for sulphides, 4 to 251 mg L⁻¹ for petroleum hydrocarbons, and 81 to 91 mg L⁻¹ for total dissolved solids in a study on chemical and toxicological characteristics of produced waters discharged over 10 years along the Brazilian coast.

3.2 Nitrification performance under increasing salt concentrations

In order to determine the most appropriate conditions for the establishment of a nitrifying consortium capable of removing ammonium in high salinity, the nitrification potential was evaluated at different salinity levels. Taking into account the results obtained previously, the wastewater dilution ratio used in further experiments was chosen to be 1:2. The ammonium profiles in the two reactors (R1 and R2) subjected to gradual increase in the salt concentration for over 9 weeks is shown in Figure 5. Overall, the ammonium concentrations in the influent of the reactors ranged from 21.8 to 50 mg L⁻¹, while the effluent ammonium concentrations were lower than 5 mg L⁻¹. The average ammonium removal efficiency was determined to be approximately 86%.

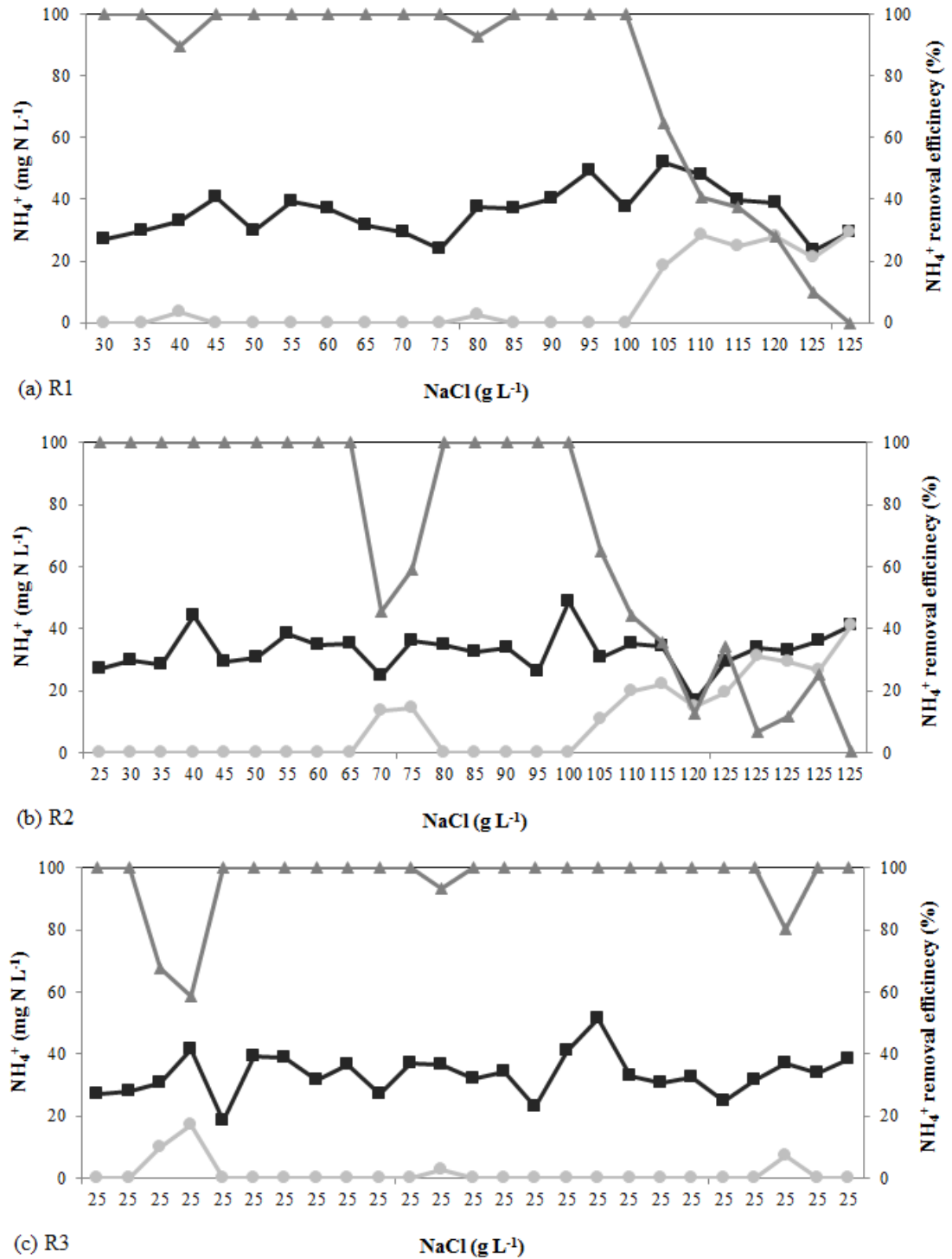


Fig. 5. Influent (■) and effluent (●) ammonium concentrations in R1 (a), R2 (b) and R3 (c) at different salt concentrations. The ammonium removal efficiency (▲) obtained in the different salinity levels is shown in the right y-axis.

The ammonium concentrations in the influent and effluent of R1 as well as the ammonium removal efficiency at various levels of salinity are shown in Figure 5a. The initial salt concentration in the feeding of R1 was approximately 25 g NaCl L⁻¹,

whereas the concentration of ammonium ranged from 23.5 to 52.1 mg L⁻¹. At salt concentrations up to 100 g L⁻¹, ammonium was almost fully removed. However, when the salinity concentration reached 105 g NaCl L⁻¹, the ammonium removal percentage dropped to around 65%. At greater than 105 g NaCl L⁻¹, the percentage of ammonium removal gradually decreased. At 125 g L⁻¹ of salt, nitrification was observed to be negligible. A similar behaviour was observed in R2, in which the removal percentage remained nearly 100% at salt concentrations up to 100 g L⁻¹ (Figure 5b). A decline in the efficiency was observed at salt concentrations of 70 and 75 g L⁻¹, when the ammonium removal was approximately 50%. Such a drop in performance, however, was attributed to oxygen limitation caused by problems with the aeration device in this particular reactor. As already observed for the concurrent reactor (R1), ammonium removal efficiency decreased considerably when the salt content was increased to 105 g L⁻¹, reaching only 65%. From this concentration onwards, the removal percentage gradually decreased until reaching values close to zero at salt concentrations of 125 g L⁻¹.

High salinity causes disruptions in biological systems due to the variation in the medium's ionic strength, resulting in plasmolysis of microorganisms and loss of metabolic activity (Uygur and Kargi 2004). Nevertheless, this study showed that the microbial biomass within the system could well withstand considerably high salinity concentrations (up to 100 g L⁻¹), as indicated by the high ammonium removal efficiencies. The gradual adaptation of the nitrifying microorganisms to salt was shown to be a good strategy to select for high salt-tolerant organisms. Actually, the gradual adaptation of nitrifying bacteria to salt has been employed by several researchers as a strategy to obtain high ammonium removal efficiency at high salt concentrations. Pansward and Anan (1999) found that acclimatization is an important factor in the nitrification of effluents with high concentrations of salt. These authors observed that nitrifying organisms show greater inhibition when subjected to shocks of high salinity. However, the nitrifying organisms were capable of adapting to high salinity levels when gradually acclimated to increasing salt levels over time. These authors also report that the microorganisms can recover from inhibition after such stressful condition. However, their study was limited to stress concentrations of 70 g L⁻¹ NaCl. Moussa et al. (2006) did not observe a significant effect on the activity of nitrifying bacteria submitted to gradual salinity increase in sludge adapted to 10 g of NaCl per L⁻¹ during one year. In both adapted and non-adapted sludge conditions, the salinity

stress at 40 g NaCl per L⁻¹ inhibited in 95% the activity of ammonia and nitrite oxidizing bacteria. Campos et al. (2002) were able to sustain nitrification efficiency of an activated sludge system fed with high ammonium concentrations and submitted to concentrations of 30.7 g NaCl per L⁻¹ or less. Above this concentration, the system began to accumulate ammonia at inhibitory concentrations, dramatically reducing the system efficiency due to the combined effect of high concentrations of salt and ammonia.

In the present study, the maximum salt concentration was almost twice that applied by Pansward and Anan (1999) and more than three times that used in the work conducted by Moussa et al. (2006). Here, the concentration of salinity that caused complete nitrification inhibition was determined to be approximately 125 g L⁻¹, which is much higher than those observed by Moussa et al. (2006) and Campos et al. (2002). Furthermore, the reactors were fed with produced water from an oil extraction company, whereas the aforementioned studies employed synthetic medium prepared in laboratory (Sudarno et al. 2011; Aslan and Simsek 2012). Lefebvre et al. (2004) investigated how the nitrification process behaves at a the salinity concentration of 120 g L⁻¹ by inoculating halophilic bacteria and using as influent a wastewater from a tartaric acid production plant. In the current study, high ammonium removal rates were observed at similar salt concentration without employing bio-augmentation of particular organisms. In fact, such performance was achieved by simply using sludge from the full-scale activated sludge reactors as inoculum, which was adapted to a high salinity environment. This specific biomass can be employed to bio-augment reactors treating various types of industrial wastewater with high salt concentrations in order to enhance the nitrification potential. It should be noted that, although the nitrifying activity of this particular biomass is hampered if it is subjected to the raw produced water under study on a long term basis, the results indicated that high nitrification performance could be achieved if the wastewater is diluted. In the full-scale industrial plant, the combination of produced water with other type of waste stream may be an alternative to achieve sufficient nitrification.

The percentage of ammonium removal in the control reactor (R3), in which salt concentration was kept constant (no extra salt was added) remained at the same level (around 95%) during the entire operation (4 weeks). Only minor oscillations in the system performance were observed during the operating period (Figure 5c). This

implies that high nitrifying activity was sustained on a long term basis at the same salt concentration (25 g L^{-1}).

To investigate whether ammonium removal was only attributed to biological activity of nitrifying bacteria and not to physical or chemical processes, an aerated reactor was operated without biomass. The percentage of ammonium removal and formation of nitrite and nitrate in R4 at different pH values ranging from 7 to 8 (normal operating conditions) is shown in Figure 6.

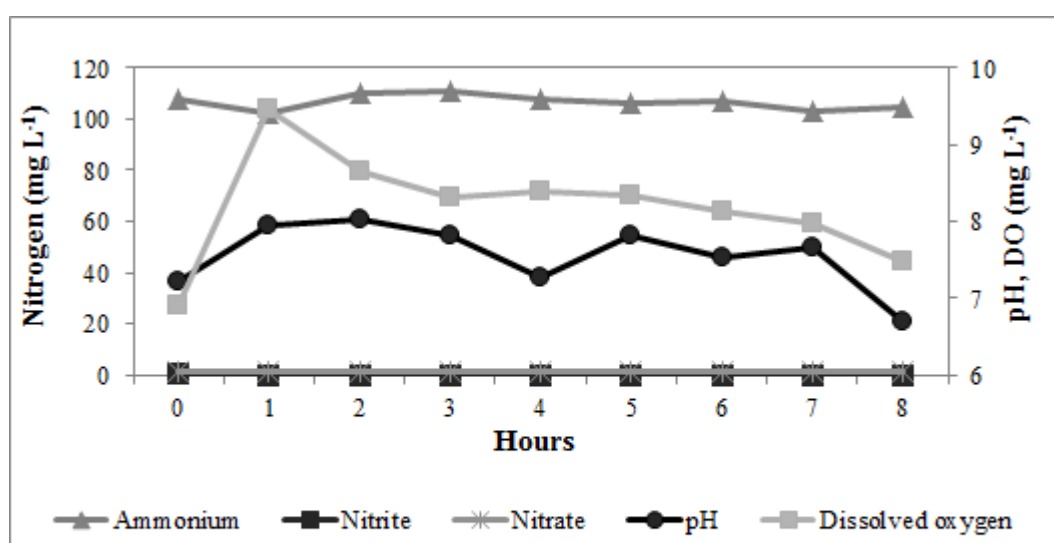


Fig. 6. Experiment during which ammonium, nitrite and nitrate concentrations were monitored during 8 hours. No biomass was present inside the reactor. DO and pH over time are indicated in the right y-axis.

The results showed that the pH did not affect the removal of ammonium when it was kept at values below 8. The concentrations of ammonium, nitrite, and nitrate did not change in the reactor during 8 h of test. The ammonium concentration amounted to 106 mg L^{-1} whereas nitrite and nitrate concentrations were below 0.5 and 5 mg L^{-1} , respectively.

4. CONCLUSIONS

This study has stressed the difficulties in achieving high nitrification performance during the long-term treatment of raw produced water from an oil extraction platform. Nevertheless, when the wastewater was diluted, the negative impact of the compounds present in the wastewater on the nitrification process was

minimized and high ammonium removal could then be achieved. After selecting the most appropriate dilution ratio (1:2), the sequencing-batch reactors operated in this study were capable of withstanding high salinity concentrations up to 100 g NaCl L⁻¹. Under these conditions, full ammonium removal was observed. For higher salt concentrations, nitrification performance gradually declined. Ammonium removal was observed to be negligible at 125 g NaCl L⁻¹, condition under which complete inhibition of nitrifiers occurred. Additional tests in an aerated system with no biomass and at the same pH levels observed under normal operating conditions of the reactors subjected to increasing salinity levels confirmed that ammonium removal was only attributed to biological activity of nitrifiers.

REFERENCES

American Public Health Association. (1998). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed. American Public Health Association, Washington, DC, USA.

Aslan, S., Simsek, E. (2012). Influence of salinity on partial nitrification in a submerged biofilter. *Bioresour. Technol.*, 118, 24-29.

Bassin, J. P., Kleerebezem, R., Rosado, A. S., van Loosdrecht, M. C., Dezotti, M. (2012). Effect of different operational conditions on biofilm development, nitrification, and nitrifying microbial population in moving-bed biofilm reactors. *Environ Sci Technol.*, 46 (3), 1546-1555.

Bhavender Sharma, Ahlert, R. C. (1977). Nitrification and nitrogen removal. *Water Res.*, 11 (10), 897-925.

Campos, J. L., Mosquera-Corral, A., Sánchez, M., Méndez, R., Lema, J. M. (2002). Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit. *Water Res.*, 36 (10), 2555-2560.

Carrera, J., Jubany, I., Carvallo, L., Chamy, R., Lafuente, J. (2004). Kinetic models for nitrification inhibition by ammonium and nitrite in a suspended and an immobilised biomass systems. *Process Biochem.*, 39 (9), 1159-1165.

Dahl, C., Sund, C., Kristensen, G. H., and Vredenburg, L. (1997). Combined biological nitrification and denitrification of high-salinity wastewater. *Water Sci. Technol.*, 36 (2-3), 345-352.

Fakhru'l-Razi, A., Pendashteh, A., Abdullah, L. C., Biak, D. R. A., Madaeni, S. S., Abidin, Z.Z. (2009). Review of technologies for oil and gas produced water treatment. *J. Hazard. Mater.*, 170 (1-3), 530-551.

Formigli, J. M., Pinto, A. C. C., Almeida, A. S. (2009). Santos Basin's Pre-Salt Reservoirs Development – The Way Ahead. In: *Offshore Technology Conference*, Houston/USA.

Gabardo, I. T. (2007). Caracterização química e toxicológica da água produzida descartada em plataformas de óleo e gás na costa brasileira e seu comportamento dispersivo no mar. [PhD dissertation]. Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Brazil.

Kaplan, D., Wilhelm, R., Abeliovich, A. (2000). Interdependent environmental factors controlling nitrification in waters. *Water Sci. Technol.*, 42 (1–2), 167–172.

Lefebvre, O., Habouzit, F., Bru, V., Delgenes, J. P., Godon, J. J., Moletta, R. (2004). Treatment of hypersaline industrial wastewater by a microbial consortium in a sequencing bath reactor. *Environ. Technol.*, 25 (5), 543-553.

Lima, R. M. G., Wildhagen, G. R. S., Cunha, J. W. S. D., Afonso, J. C. (2009) Removal of ammonium ion from produced waters in petroleum offshore exploitation by a batch single-stage electrolytic process. *J. Hazard. Mater.*, 161 (2-3), 1560-1564.

Magalhaes, A. S., Domingues, E. P. (2014). Blessing or curse: Impacts of the Brazilian Pre-Salt oil exploration. *Economia.*, 15, 343-362.

Metcalf and Eddy. *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, Reuse*. 4th ed. McGraw- Hill, New York. 2003.

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

Pagga, U., Bachner, J., Strotmann, U. (2006). Inhibition of nitrification in laboratory test and model wastewater treatment plants. *Chemosphere*, 65, 1-8.

Pansward, T., Anan, C. (1999). Specific oxygen ammonia, and nitrate uptake rates of a biological nutrient removal process treating elevated salinity wastewater. *Bioresour. Technol.*, 70 (3), 237-243.

Pronk, M. A., Bassin, J. P., Kreuk, M. K., Kleerebezem, R., Van Loosdrecht, M. C. M. (2014). Evaluating the main and side effects of high salinity on aerobic granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98 (3), 1339-1348.

Reinbold, K. A., Pescitelli, S. M. (1982). Effects of exposure to ammonia on sensitive life stages of aquatic organisms. Project Report, Contract No. 68-01-5832, Illinois: Illinois Natural History Survey, Champaign, IL.

Sheintuch, M., Tartakovsky, B., Narkis, N., Rebhun, M. (1995). Substrate inhibition and multiple states in a continuous nitrification process. *Water Res.*, 29 (3), 953-963.

Stephenson, M. T. (1992). Components of produced water: a compilation of industry studies. *J. Petrol. Technol.*, 44 (5), 548-603.

Sudarno, U., Winter, J., Gallert, C. (2011). Effect of varying salinity, temperature, ammonia and nitrous acid concentrations on nitrification of saline wastewater in fixed-bed reactors. *Bioresour. Technol.*, 102 (10), 5665-5673.

Swan, J. M., Neff, J. M., Young, P. C. (1994). Environmental implications of offshore oil and gas development in Australia: the findings of an independent scientific review. Australian Petroleum Exploration Association, Sydney.

Tellez, G. T., Nirmalakhandan, N., Gardea-Torresdey, J. L. (2002). Performance evaluation of an activated sludge system for removing petroleum hydrocarbons from oilfield produced water. *Adv. Environ. Res.*, 6 (4), 455-470.

Tibbetts, P. J. C., Buchanan, I. T., Gawel, L. J., Large, R. (1992). A comprehensive determination of produced water composition. In: Ray, J. P., and Engelhardt, F. R. (eds.). *Produced Water: Technological Environmental Issues and Solutions*. Plenum Press, New York.

Uygur, A., Kargi, F. (2004). Salt inhibition on biological nutrient removal from saline wastewater in a sequencing batch reactor. *Enzyme Microb. Technol.*, 34 (3-4), 313-318.

CAPÍTULO 3

IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS RESPONSÁVEIS PELA REMOÇÃO DE AMÔNIA DE ÁGUAS DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO COM ALTA SALINIDADE

Larissa Quartaroli¹, Livia Carneiro Fidélis Silva², Claudio Mudadu Silva³, Helena Santiago Lima⁴, Sergio Oliveira de Paula⁵, Valéria Maia de Oliveira⁶, Marliane de Cássia Soares da Silva⁷, Maria Catarina Megumi Kasuya⁸, Máira Paula de Sousa⁹, João Paulo Bassin¹⁰, Cynthia Canêdo da Silva^{11*}

¹ Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

² Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

³ Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

⁴ Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

⁵ Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

⁶ Divisão de Recursos Microbianos, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Universidade de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

⁷ Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

⁸ Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

⁹ Centro de P&D da Petrobras, Petrobras, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. (mpsousa@petrobras.com.br)

¹⁰ Programa de Engenharia Química - COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

¹¹ Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

*Endereço para correspondência: ccanedosilva@yahoo.com.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

A água de produção gerada durante a exploração do petróleo é quimicamente complexa, tendo em sua composição elevadas concentrações de amônia e sais. A forma mais comum de remoção de amônia de efluentes líquidos consiste nos processos biológicos, podendo ser realizado por diferentes vias e diversos grupos de microrganismos. A presença de sais nos efluentes pode ser um fator de inibição para os processos biológicos, interferindo diretamente no tratamento. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as mudanças no perfil da comunidade microbiana envolvida no processo de remoção de amônia, quando submetida a um aumento gradual de sal (NaCl). Analisou-se amostras de lodo de dois reatores sequenciais biológicos em batelada, que foram operados com adição semanal de 5 g L⁻¹ de NaCl, até a completa inibição do processo de remoção de amônia, que ocorreu a 125 g L⁻¹ de NaCl. Durante o processo de aclimação do lodo, as amostras foram coletadas e tiveram seu DNA extraído. Realizou-se PCR-DGGE e o sequenciamento massivo da região rRNA 16S para análise da diversidade microbiana. Os perfis de bandas do PCR-DGGE mostraram que ocorreu uma mudança na comunidade microbiana à medida em que se aumentou a concentração de sal no reator. Observou-se uma redução da presença de populações de bactérias e um aumento das populações de *archaeas*. Os dados de sequenciamento sugerem que a remoção de amônia no reator foi realizado por diferentes vias, através de bactérias nitrificantes autotróficas (*Nitrosococcus*, *Nitrosomonas*, *Nitrosovibrio*, *Nitrospira* e *Nitrococcus*), de *Archaea* oxidante de amônia (*Candidatus nitrosoarchaeum*), de microrganismos ANAMMOX (*Candidatus Brocardia*, *Candidatus Kuenenia* e *Candidatus Scalindua*) e de microrganismos nitrificantes

heterotróficos (*Paracoccus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Marinobacter sp.*, e *Alcaligenes spp.*).

Palavras-chave: Água de produção, remoção de amônia, diversidade microbiana, PCR-DGGE, sequenciamento massivo.

1. INTRODUÇÃO

A maior fonte de poluição relacionada ao processo de exploração e produção de petróleo *offshore* consiste na água de produção, formada pela água contida naturalmente no reservatório geológico que é extraída juntamente com o petróleo e o gás e pela água injetada durante a exploração (Stephenson, 1992). A água de produção apresenta uma composição quimicamente complexa, possuindo concentrações variadas de hidrocarbonetos, óleos, metais, aditivos químicos, íons que conferem elevadas concentrações de sal e amônia, gerada devido a formação rochosa e por processos biológicos (Tibbetts et al. 1992).

A amônia é uma importante fonte de nitrogênio para todos os seres vivos, no entanto, seu excesso no corpo hídrico pode causar inúmeros efeitos negativos ao meio ambiente e à vida aquática, como por exemplo a eutrofização de corpos d'água (Reinbold and Pescitelli 1982).

Diversas estratégias de gerenciamento dessa água residuária têm sido adotadas, tais como a reinjeção no próprio reservatório de petróleo, o descarte ou o reaproveitamento. Entretanto, para alguns fins o efluente deve ser tratado adequadamente, através de tratamentos físicos, químicos e/ou biológicos (Stephenson 1992; Swan et al. 1994; Ahmadun et al. 2009).

O processo biológico tem sido o mais comumente utilizado para remoção de amônia, através da nitrificação, que consiste na conversão da amônia em nitritos e nitratos sob condições aeróbias. Inicialmente ocorre a oxidação da amônia a nitrito, que pode ser realizada por bactérias autotróficas dos gêneros *Nitrosococcus*, *Nitrospira* e *Nitrosomonas*, e por *archaeas* do filo Thaumarchaeota (Venter et al. 2004; Limpiyakorn et al. 2013; Gao et al. 2013). A oxidação de nitrito a nitrato é realizada posteriormente por bactérias autotróficas dos gêneros *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrospina* e *Nitrococcus* (Vanparys et al. 2006).

Outro processo biológico para a remoção de amônia denomina-se ANAMMOX, que consiste na oxidação da amônia diretamente a nitrogênio gasoso,

usando o nitrito como aceptor final de elétrons sob condições anaeróbias estritas (Strous et al. 1997). O processo é realizado por microrganismos autotróficos, que utilizam o CO₂ como única fonte de carbono (Strous et al. 1999). Os organismos ANAMMOX estão classificados no grupo dos Planctomicetos, cinco dos quais foram denominados provisoriamente de *Candidatus Brocadia anammoxidans*, *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*, *Candidatus Scalindua wagneri*, *Candidatus Anammoxoglobus propionicus* (Kartal et al. 2007) e *Candidatus Jettenia asiatica* (Quan et al. 2008).

Por mais de cem anos acreditou-se que o processo de nitrificação era realizado apenas por microrganismos autotróficos. Porém, a partir dos anos 70 descobriu-se que um novo grupo de bactérias também contribuem na remoção de nitrogênio. São bactérias nitrificantes heterotróficas/desnitrificantes aeróbias, que são capazes de realizar, simultaneamente, a nitrificação heterotrófica e a desnitrificação aeróbia (Robertson e Kuenen 1983). Esse processo apresenta vantagens em relação ao processo de nitrificação tradicional realizado por autotróficas, tais como a remoção simultânea de carbono e nitrogênio e a tolerância à presença de oxigênio em todas as etapas do processo. Diversas bactérias com essa propriedade já foram descritas, como: *Arthrobacter* sp. (Verstrae e Alexande 1972), *Paracoccus denitrificans* (Robertson e Kuenen 1983), *Alcaligenes faecalis* (Joo et al., 2005), *Bacillus* sp. (Yang et al. 2011), *Pseudomonas* sp. (Wan et al. 2011), *Pseudomonas stutzeri* (Zhang et al. 2011), *Bacillus methylotrophicus* (Zhang et al. 2012), *Acinetobacter* sp. (Yao et al. 2013), *Halomonas campisalis* (Guo et al. 2013) e *Aeromonas* sp. (Chen et al. 2014).

O processo biológico de remoção de amônia é sensível a diversos fatores ambientais, entre eles a salinidade (Uygur e Kargi 2004; Moussa et al. 2006). A alta salinidade pode dificultar o transporte de componentes químicos entre o meio e a célula, alterando seu metabolismo, diminuindo a taxa de remoção dos compostos, além de causar a desidratação e lise celular, e influenciar negativamente na taxa de oxidação da amônia (Dalmacija et al. 1996; Moussa et al. 2006).

Com a descoberta e exploração de petróleo da camada Pré-sal na costa brasileira, a água de produção alcançou valores muito elevados de sal o que traz um novo desafio para seu tratamento biológico.

O acesso ao conhecimento da diversidade de microrganismos presentes nos biorreatores biológicos para tratamento de efluentes tem sido importante para uma melhor compreensão e aperfeiçoamento dos processos biológicos, visando obter

melhor desempenho. O PCR-DGGE tem sido uma técnica molecular muito utilizada para avaliar as comunidades microbianas de áreas ambientais, bem como as mudanças ocorridas quando submetidas às condições de estresse, e para o monitoramento de microrganismos específicos (Dong e Reddy 2010; Aydin et al. 2015; Fu e Zhao 2015; Bassin et al. 2015; Liang et al. 2015). Outra metodologia que vem se tornando cada vez mais acessível é o sequenciamento de nova geração (NGS), que tem permitido uma completa identificação dos microrganismos presentes numa comunidade pelo sequenciamento massivo do seu metagenoma ou de um gene, como o gene marcador taxonômico rRNA 16S (Loman et al. 2012).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as mudanças no perfil da comunidade microbiana envolvida no processo de remoção de amônia quando submetidas ao aumento gradual de sal (NaCl), visando assim, o melhor entendimento da ecologia dos microrganismos relacionados a este processo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Experimento e condições operacionais

Dois reatores biológicos aeróbios (R1 e R2), operados em paralelo, foram montados em escala de bancada (Figura 1) para avaliar a nitrificação em diferentes níveis de salinidade. Os reatores, com volume útil de 1 litro, foram operados em batelada sequencial, com ciclos de 8 horas com as seguintes fases: tempo de alimentação/aeração de 2,5 horas, tempo de aeração de 4,5 horas, sedimentação de 55 minutos e tempo de descarte de 5 minutos. O pH dos reatores foram mantidos dentro da faixa de 6,5 a 7,5 com a adição de HSO_4 ou NaOH, a temperatura mantida a 30°C através de termostato. Os níveis de oxigênio dissolvido foram mantidos superiores a 2 mg L^{-1} , através de aeração por bomba de ar e difusores localizados no fundo dos reatores. O efluente utilizado no estudo e o lodo inoculado (500 ml em cada reator) foram provenientes de uma estação de tratamento de efluente situada em um terminal de petróleo na costa brasileira.

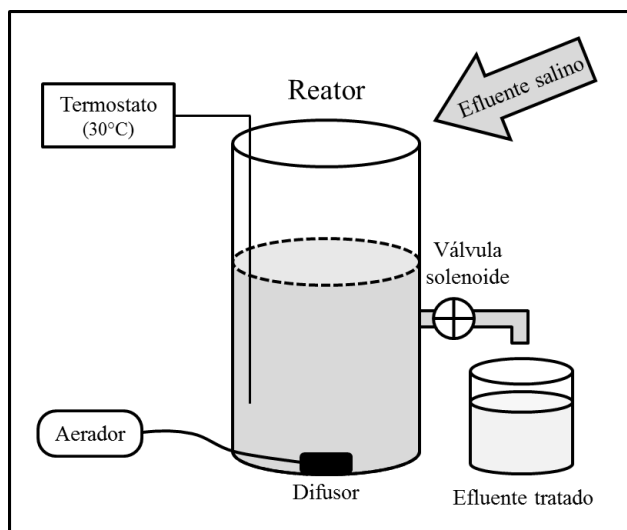


Figura 1. Esquema do reator biológico

O lodo biológico dos reatores R1 e R2 foi aclimatado a altas salinidades a partir da adição de NaCl. Foram adicionados, semanalmente, 5 g L⁻¹ de NaCl em cada um dos reatores até inibição total da nitrificação.

Os procedimentos para determinação da concentração de amônia foram realizados seguindo os padrões do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998).

2.2 Amostragem

Amostras de lodo dos reatores foram coletadas ao final de sete dias após a dosagem das seguintes concentrações salinas: 25, 50, 75, 100, 105, 115 e 125 g L⁻¹ de NaCl. As amostras foram coletadas em triplicata de cada reator, armazenadas em tubos Falcon de 15 mL e mantidas sob resfriamento (-20°C) até extração do DNA.

2.3 Extração de DNA

Os reatores R1 e R2 estavam submetidos a uma mesma condição operacional, portanto, possuíam a mesma composição microbiológica. Assim foi realizada a extração da amostra composta das triplicatas dos dois reatores, para cada salinidade estudada.

O DNA total da comunidade microbiana presente no lodo foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Silva et al. (2010) com as seguintes modificações:

antes de iniciar a extração do DNA, uma alíquota de 4 mL da amostra de lodo congelado foi lavada com 10 mL de tampão SET (20 mM de Tris, 75 mM de NaCl e 25 mM de EDTA), seguido de centrifugação por 10 minutos a 3.000 g. Tal procedimento foi repetido 5 vezes. Depois de lavada, a amostra de lodo foi suspensa em 600 µL de tampão SET, homogeneizada no agitador de tubo e só então iniciada a extração. O DNA extraído foi armazenado a uma temperatura de -20°C.

2.4 PCR e DGGE

Após a extração de DNA, as amostras foram submetidas à amplificação dos genes que codificam a região RNA ribossomal 16S dos Domínios Bactéria e *Archaea*, e da classe Betaproteobactéria nitrificante. As amplificações de DNA foram realizadas em triplicata, para maior representatividade dos dados. Os pares de *primers* utilizados para amplificação estão dispostos na Tabela 1.

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

Primers	Sequências (5' - 3')	Alvo	Referência
968-CG-F 1401-R	GCAACGCGAAGAACCTTAC GGTGTGTACAAGGCCCGGGA ACG	Domínio Bactéria	Heuer et al. 1997
CTO-A-F CTO-B-F	CCGCCGCGCGGCGGGCGGGG CGGGGGCACGGGGGGAGRAA AGCAGGGGATCG	AOB β- proteobacteria (Nested-PCR, First)	Kowalchuk et al. 1997
CTOC-F	CGCCCGCCGCGCGGCGGGCG GGGCGGGGGCACGGGGGGAG GAAATAGGGGATCG		
CTO-R	CTAGCYTTGTAGTTTCAAACG C		
341-GC-F 518-R	CGCCCGCCGCGCGCGGCGGG CGGGGCGGGGGCACGGGGGG CCTACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCG GCTGCTGG	AOB β- proteobacteria (Nested-PCR, Second)	Muyzer et al. 1993
344-GC-F 915-R	ACGGGGTGCAGGCGCGA GTGCTCCCCGCCAATTCCT	Domínio <i>Archaea</i>	Casamayor et al. 2000

As reações ocorreram em volumes de 50 µL, contendo 10,0 µL de tampão da enzima 5X, 3 µL MgCl₂ (25mM), 0,5 µL de cada *primer* (200 µM), 1,0 µL de dNTP (10 mM), 2,5 µL de albumina de soro bovino (BSA 2,5 mg/µL), 0,2 µL de enzima *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (5,0 u/µL) e, aproximadamente 50 ng de amostra de

DNA. As reações de PCR foram realizadas em termociclador modelo Veriti (*Applied Biosystem*). Os programas de amplificação para os genes estudados estão descritos a seguir:

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

Gene AOB β -proteobacteria (primeiro-PCR): 1 minuto a 93°C; 35 ciclos de 30 segundos a 92°C, 1 minuto a 57°C e 45 segundos a 68°C e, finalmente, 5 minutos a 68°.

Gene AOB β -proteobacteria (segundo-PCR): 5 minutos a 94°C; 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 57°C e 3 minutos a 72°C e, finalmente, 30 minutos a 72°.

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

A observação dos amplicons e verificação do seu tamanho, foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) com marcador de peso molecular de 1 kb (InvitrogenTM).

Os fragmentos de DNA obtidos por PCR foram analisados por DGGE (Modelo DCodeTM Systems – BioRad). Foram utilizados 3 μ L de marcador de peso molecular de 100 pares de base (Roche). As condições do gel e da corrida para cada gene testado estão descritas a seguir:

Gene RNAr 16S de Bactéria: 300 ng dos produtos de PCR de bactérias foram aplicados em gel de poliacrilamida de 6% (p/v) em tampão TAE 1 X, com gradiente desnaturante variando de 45 a 65% (onde 100% de desnaturação significam a concentração de 7 M de uréia e 40% de formamida) e submetido à eletroforese vertical por 12 h a 100 V à temperatura de 60 °C.

Gene RNAr 16S AOB β -proteobacteria: 300 ng dos produtos do Nested PCR de AOB β -proteobacteria, foram aplicados em gel de poliacrilamida de 6% (p/v) em tampão TAE 1 X, preparado com gradiente desnaturante variando de 35 a 65% (onde 100% de desnaturação significam a concentração de 7 M de uréia e 40% de formamida) e submetido à eletroforese vertical por 16 h a 100 V à temperatura de 60 °C.

Domínio RNAr 16S de *Archaea*: 300 ng dos produtos de PCR de *archaea* foram aplicadas em gel de poliacrilamida de 6% (w/v) em tampão TAE 1 X, preparado com gradiente desnaturante variando de 35 a 80% (onde 100% de desnaturação significam a concentração de 7 M de uréia e 40% de formamida) e submetido à eletroforese vertical por 12 h a 100 V à temperatura de 60 °C.

Após corrida, os géis foram corados por 1 hora com *SYBR Gold* (1X) (Molecular Probes, Leiden, Holanda) e fotografado sob luz UV no fotodocumentador.

2.5 Análises estatísticas

Os perfis de banda do DGGE obtidos foram analisados e comparados em programa específico (BioNumerics, Versão 5.1) (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), onde foi gerado uma matriz baseada na presença, ausência e intensidade de bandas. A intensidade referente a cada banda foi calculada e utilizada para permitir a comparação entre amostras diferentes.

As análises multivariadas foram conduzidas utilizando o *software* Canoco (Canoco v 4.5; Biometrics, Wageningen, Holanda - Free Trial.). Os dados de entrada consistiram em combinar a tabela que contém a intensidade relativa de cada banda com a tabela que contém os valores de salinidade e de remoção de amônia. As bandas foram consideradas como grupos de bactérias e suas intensidades relativas consideradas como abundância de ocorrência grupo.

2.6 Sequenciamento massivo do gene RNAr 16s de Bactéria e Archaea

Após as análises do perfil dos géis do DGGE, três pontos, dentre os sete analisados, foram selecionados para construção da biblioteca. Os pontos selecionados foram 25 g L⁻¹ de NaCl, no início do processo de aclimação com 100 % de remoção de amônia, 100 g L⁻¹ de NaCl, concentração salina máxima com 100% de remoção de amônia, e 125 g L⁻¹ de NaCl, concentração salina onde ocorreu a completa inibição da nitrificação.

O DNA genômico destes três pontos foi enviado para NGS (*Next Generation Sequencing*) da região variável V1-V2 e V3 do gene 16S rRNA, utilizando os primers 27f/338r e 349f/534r, para bactéria e *archaea*, respectivamente, na *Molecular*

Research DNA (www.mrdnalab.com, Shallowater, TX, USA) pela plataforma MiSeq (Illumina).

2.7 Análise dos dados de sequência

Os dados de sequência foram processados usando o “MR DNA analysis pipeline” (MR DNA, Shallowater, TX, USA). Os *barcodes* foram retirados, sequências menores que 150 bp e quimeras foram removidas. Os *contigs* foram montados e um arquivo de OTU (Unidade Taxonômica Operacional) foi gerado. As OTUs foram definidas pelo agrupamento em 3% divergência. Uma sequência representativa de cada OTU foi classificada taxonomicamente usando BLASTn contra um banco de dados, com curadoria derivado de *GreenGenes*, RDP II e NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov, DeSantis et al. 2006, <http://rdp.cme.msu.edu>). As análises de diversidade foram realizadas utilizando o *software* PAST (Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis) (Hammer et al. 2001).

3. RESULTADOS

3.1 Monitoramento da aclimação e remoção de amônia dos reatores

Os resultados de remoção de amônia nos reatores, R1 e R2, submetidos as diferentes concentrações de sal estão resumidos na Figura 2.

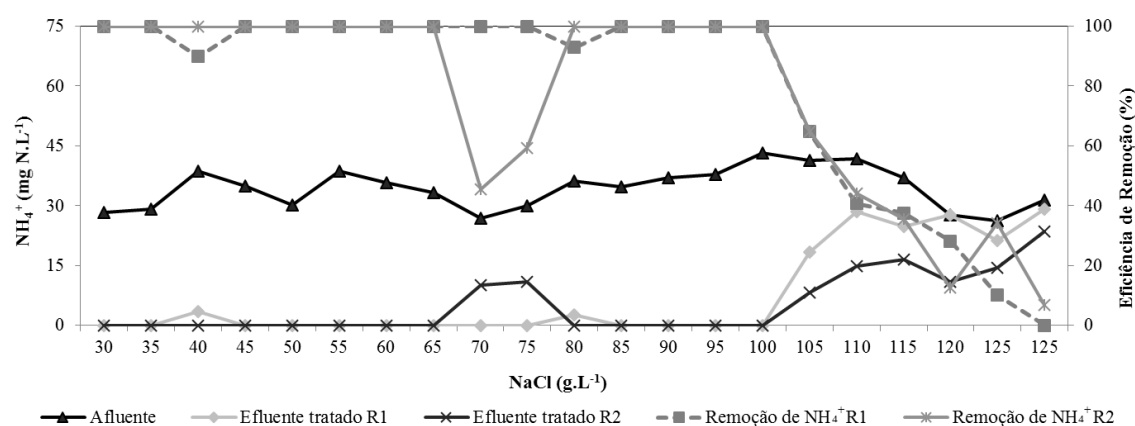


Figura 2. Resultados de NH_4^+ nos Reatores 1 e 2 durante diferentes regimes de salinidade.

Pode-se observar, na Figura 2, que houve praticamente remoção total da amônia até salinidade de 100 g L⁻¹, com exceção nas salinidades de 65 a 80 g L⁻¹ devido a problemas operacionais observados no sistema de aeração do reator R2. A partir da dose de 100 g L⁻¹ de NaCl, o percentual de remoção de amônia decresceu até a inibição completa da nitrificação, na dose 125 g L⁻¹ de NaCl. Já se sabe que soluções altamente salinas podem resultar em plasmólise celular, afetando a atividade metabólica das bactérias e, conseqüentemente, a taxa de oxidação da amônia (Moussa et al. 2006; Bassin et al. 2012; Campos et al. 2002).

3.2 Monitoramento da diversidade microbiana – DGGE

O perfil da diversidade microbiana nas amostras de lodo ao longo do aumento da salinidade foi investigada por DGGE. Os géis com os padrões de banda obtidos para o Domínio Bactéria, AOB β -proteobactéria e Domínio *Archaea* estão apresentados nas Informações Suplementares, Figuras S1, S2 e S3, respectivamente. O DGGE indicou que os resultados obtidos para as triplicadas de cada amostra foram semelhantes (Figuras S1 e S2). De modo geral, os perfis de banda para os genes analisados representaram uma comunidade microbiana diversa em todas concentrações salinas analisadas. Para os genes de Bactéria e AOB β -proteobactéria observou-se uma redução na quantidade e intensidade das bandas a partir da concentração de 100 g L⁻¹ de NaCl. Entretanto, muitas bandas ainda foram observadas nas concentrações acima de 100 g L⁻¹ de NaCl, mostrando que o processo de aclimação permitiu o estabelecimento de muitas populações. Apesar de alguns microrganismos terem se adaptado a 125 g L⁻¹ de NaCl, possivelmente os nitrificantes perderam sua capacidade de remoção de amônia, como verificado pela baixa eficiência na remoção (Figura 2).

Ao contrário do observado em bactéria e AOB β -proteobactéria, o perfil de bandas do Domínio *Archaea* aumentou principalmente em intensidade com o aumento da salinidade. No entanto, aumento na abundância das espécies já era esperada para esse grupo, visto que as *archaeas* possuem características morfo-metabólicas distintas, que permitem se adaptar a ambientes com condições extremas (Madigan et al. 2010). Apesar do aumento na intensidade das bandas, a eficiência de remoção de amônia ficou baixa. Acredita-se que as espécies de bactérias e *archaea* nitrificantes foram inibidas a 125 g L⁻¹ de NaCl.

Ao relacionar o perfil de bandas observado (variação da diversidade das espécies) com a remoção de amônia e a salinidade através da Análise de Componentes Principais (PCA) observou-se que os fatores salinidade e remoção de amônia explicaram 91,2%, 89,3% e 93,3% da variação da comunidade microbiana para os grupos bactéria, AOB β -proteobactéria e *archaea*, respectivamente (Figura 3).

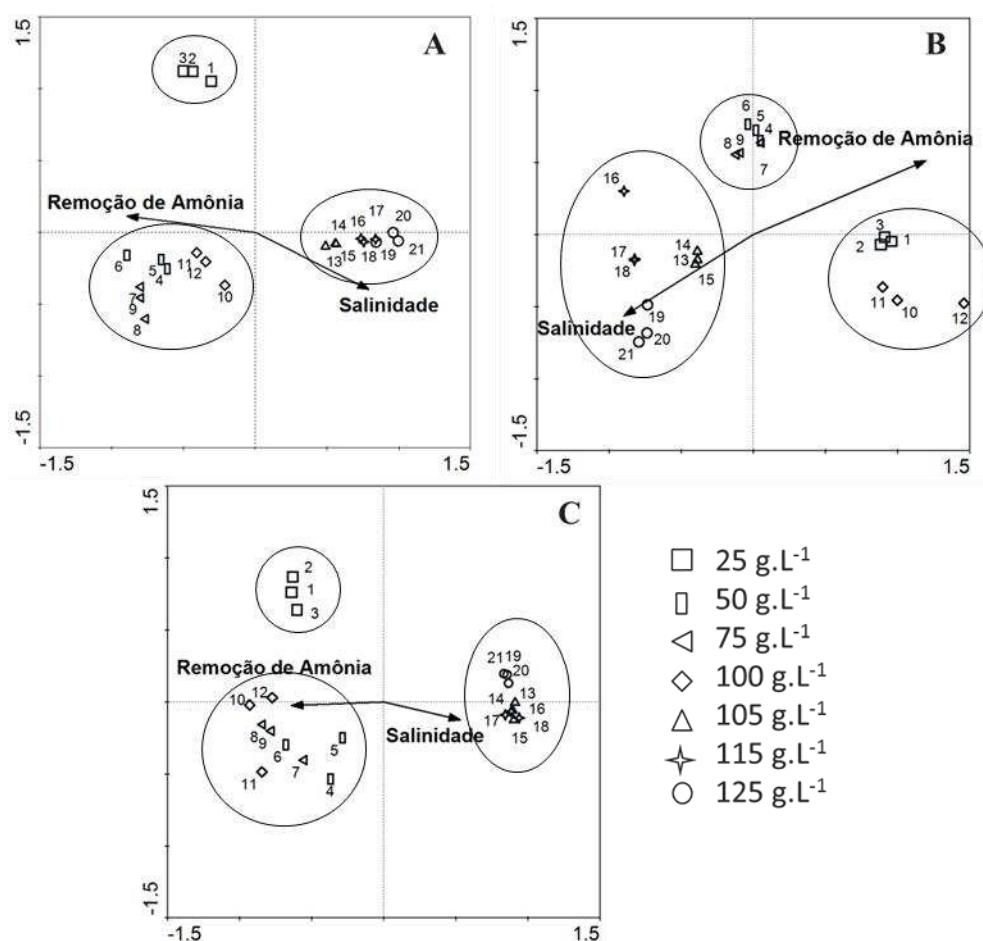


Figura 3. Análise de Componentes Principais com base nos perfis de DGGE para Domínio Bactéria (A), AOB β -proteobactéria (B) e Domínio *Archaea* (C) e nos fatores ambientais, Remoção de amônia e Salinidade.

As análises mostraram três agrupamentos para Bactéria, *Archaea* e AOB β -proteobactéria. Para bactéria e *Archaea* (Figura 3A e 3C), um grupo formado pelos pontos com 25 g L⁻¹ de NaCl, outro pelos pontos de 50, 75 e 100 g L⁻¹ e um terceiro grupo pelos pontos de 105 a 125 g L⁻¹ de NaCl. Os mesmos agrupamentos podem ser observados para AOB β -proteobactéria (Figura 3B), exceto no primeiro grupo em que as amostras de salinidade de 25 g L⁻¹ de NaCl se agruparam com as de maior

salinidade, 100 g L⁻¹ de NaCl, fato que pode ser explicado pela inibição das populações e redução da comunidade na salinidade de 100 g L⁻¹, aproximando-a da amostra de menor salinidade, onde também foi observado, através do gel de DGGE, uma menor riqueza de populações.

3.3 Dados do sequenciamento NGS da região RNAr 16S

Baseado nas taxas de remoção de amônia, foram selecionados um ponto de cada agrupamento para uma análise detalhada da diversidade de bactéria e de *archaea* pelo sequenciamento NGS do gene RNAr 16S. Os pontos selecionados foram 25 g L⁻¹ de NaCl, concentração salina inicial do efluente e com 100% de eficiência na nitrificação; 100 g L⁻¹ salinidade máxima onde ainda se observou 100% de eficiência na nitrificação; e 125 g L⁻¹ de NaCl, onde a nitrificação foi completamente inibida.

Após o tratamento das sequências, 205.834 sequências de tamanho médio de 490 bases foram observadas para os *primers* 27f/338r (bactéria), e 315.391 sequências com tamanho médio de 417 pb para os *primers* 349f/534r (*archaea*). Os dados de sequência foram processados usando um *pipeline* disponibilizado pela MR DNA. Um total de 469.764 sequências foram anotadas. Destas, 160.747 foram observadas em 25 g L⁻¹ de NaCl, 159.068 em 100 g L⁻¹ e 149.949 em 125 g L⁻¹. Dentre as 469.764 sequências, 335.304 pertenceram ao domínio Bactéria e 134.460 ao domínio *Archaea*.

3.4 Diversidade de procariotos nas amostras de lodo

Após definir as OTUs (Unidade Taxonômica Operacional), os índices de Shannon, Berger-Parker, e Chao foram calculados para estimar a diversidade de espécies, dominância e riqueza, respectivamente, das bibliotecas de genes RNAr 16S (Tabela S1).

As 335.304 sequências pertencentes ao domínio Bacteria foram classificadas em 24 filos. Os mais abundantes foram Planctomycetes (27%), Actinobacteria (14%), Chloroflexi (7%), Firmicutes (12%), Proteobacteria (20%), Chlamydiae (12%), Verrucomicrobia (5%), Cloacimonetes (1%), Bacteroidetes (1%), e Deinococcus-Thermus (1%) (Figura 4).

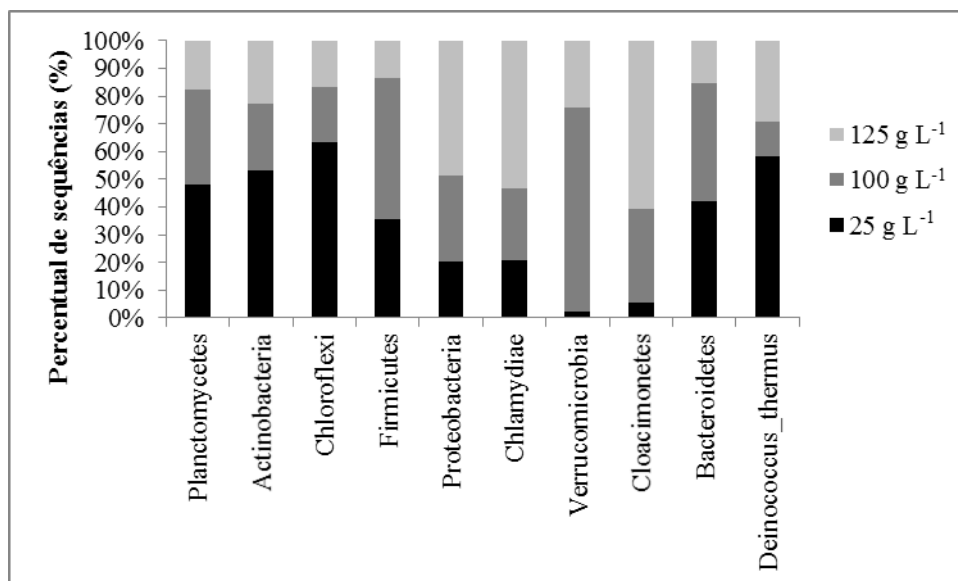


Figura 4. Percentagem relativa dos filos bacterianos mais abundantes nas diferentes concentrações de NaCl.

Foram observados 237 gêneros, onde a maioria apresenta espécies que já foram observadas na microbiota de lodos ativados e/ou relacionados à ambientes salinos (Hiroyuki et al. 2002; Levantesi et al. 2006, McIlroy et al. 2015). Como observado em filo, o aumento da salinidade influenciou a abundância dos diferentes gêneros, alguns se tornaram menos abundantes, como *Pelotomaculum*, *Bellilinea*, *Candidatus Microthrix*, *Rhodopirellula* e outros mais abundantes, como *Neochlamydia*, *Halomonas*, *Verrucomicrobium*, *Candidatus Cloacimonas* (Figura 5).

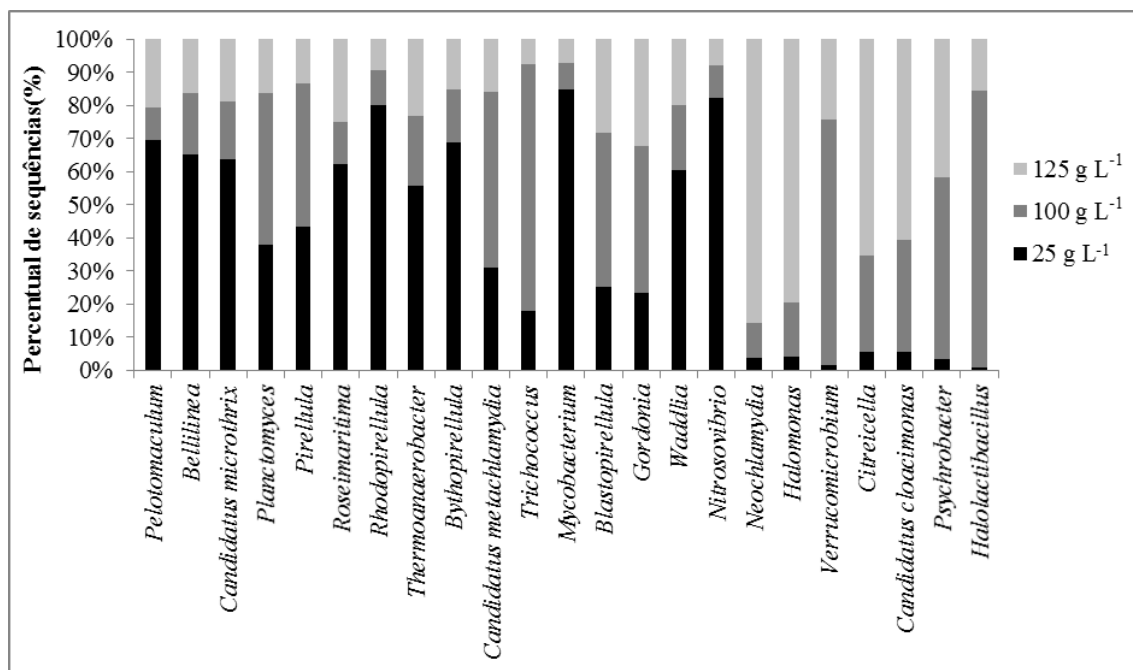


Figura 5. Percentagem relativa de gêneros predominantes do domínio Bactéria nas diferentes concentrações de NaCl.

Dentre os gêneros que responderam de forma positiva ao aumento da salinidade de 25 para 100 g L⁻¹, estão *Pirellula*, *Blastopirellula* e *Planctomyces*. Estes são pertencentes ao filo Planctomycetes, que também é representado por espécies envolvidas no processo ANAMMOX, que transformam amônia diretamente em nitrogênio gasoso sob condições anaeróbias (Neef et al. 1998, Juretschko et al. 2002). Entre os gêneros que realizam o processo ANAMMOX, foram observados a presença de *Candidatus Scalindua*, *Candidatus Kuenenia* e *Candidatus Brocadia* nas amostras, e todos eles tiveram sua abundância reduzida acima de 100 g L⁻¹ (Figura S4). Tal queda pode ter contribuído para a baixa eficiência de remoção da amônia observada acima de 100 g L⁻¹ (Figura 2).

Gêneros que sabidamente realizam nitrificação heterotrófica também foram observados em menor abundância, como *Paracoccus* spp., *Alcaligenes* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. e *Marinobacter* sp. (Figura S5). Sendo que o número de *reads* afiliadas aos gêneros *Alcaligenes* e *Bacillus* aumentou, com o incremento de salinidade, mostrando que podem estar envolvidos na remoção de amônia em condições salinas.

Os gêneros tradicionalmente descritos pela literatura como responsáveis pelo processo de nitrificação autotrófica também foram observados, entretanto em menor

abundância (Figura 6). Apesar do maior número de *reads* observado em 25 g L⁻¹ de NaCl, os gêneros *Nitrosococcus*, *Nitrosomonas* e *Nitrosovibrio* foram observados em todas as concentrações salinas, indicando o potencial de espécies destes gêneros estarem envolvidas no processo de remoção de amônia, principalmente *Nitrosovibrio*, que apresentou maior abundância. Os gêneros *Nitrospira* e *Nitrococcus*, que oxidam nitrito a nitrato, também foram observados, não podendo deixar de notar o aumento no número de *reads* afiliadas a este último gênero em 100 g L⁻¹ de NaCl. De modo geral, a diminuição da abundância desses *reads*, chegando a zero em 125 g L⁻¹ de NaCl para alguns gêneros como *Nitrosococcus* e *Nitrospira*, mostraram que a nitrificação responde de forma negativa ao aumento de sal. Porém as *reads* afiliadas a nitrificantes autotróficas estavam presentes em 100 g L⁻¹ de NaCl, cuja salinidade foi observada ainda uma eficiência de remoção de amônia de 100% (Figura 1).

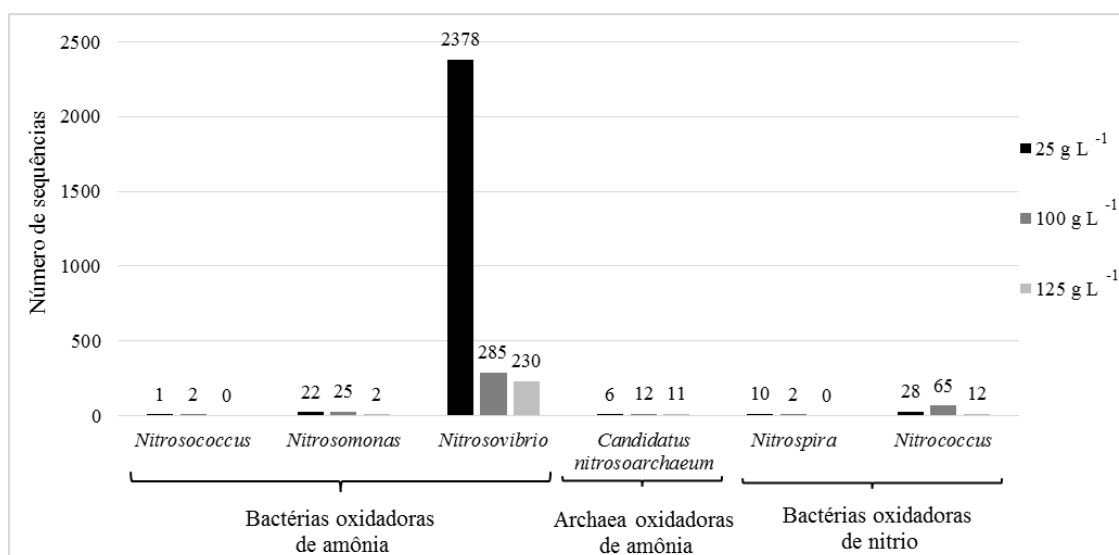


Figura 6. Proporção de gêneros de bactérias e *archaeas* envolvidos no processo de nitrificação biológica nas diferentes concentrações de sal.

Diferente do observado para o domínio Bactéria, as *archaea* tiveram um aumento na sua abundância nas concentrações salinas de 100 e 125 g L⁻¹, como observado previamente no gel de DGGE. As *reads* de *archaea* foram classificadas em dois filos, a maioria Euryarchaeota (99%), e o restante Thaumarchaeota. Espécies pertencentes à Euryarchaeota estão associada à produção de metano a partir de CO₂ ou compostos metilados, e são mais tolerantes ao sal, como *Halogranum*, *Methanothermobacter* e *Methanosaeta* (Schill et al. 1996; Cui et al. 2011) (Figura 7).

Methanosaeta foi o gênero mais representado dentre as *archaea*. Espécies deste gênero são responsáveis pela produção de grande parte do metano encontrado no mundo (Mori et al. 2012). Além da remoção destes compostos, as *Archaea* também podem ter auxiliado na remoção da amônia, como confirmado pela presença de *reads* afiliadas ao gênero *Candidatus Nitrosoarchaeum* pertencentes ao filo Thaumarchaeota, que dobrou sua abundância a partir de 25 g L⁻¹ de NaCl (Figura 6 e 7). Entretanto por serem mais sensíveis ao sal que Euryarchaeota (Mußmann et al. 2011), foram encontradas em baixa abundância nos três pontos analisados.

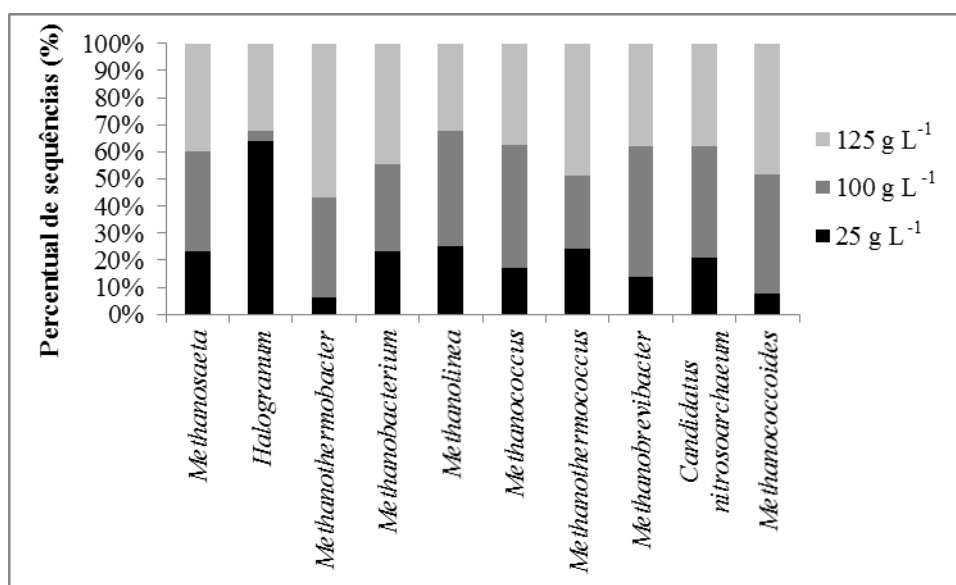


Figura 7. Abundância relativa dos gêneros do domínio *Archaea* mais abundantes nas diferentes concentrações de NaCl.

4. DISCUSSÃO

4.1 Efeito da salinidade sobre o perfil da diversidade microbiana

As elevadas concentrações de sal alteraram significativamente a composição da comunidade microbiana dos reatores contudo, a remoção de 100% da amônia pode ser alcançada em concentrações de NaCl de até 10 g L⁻¹. Autores como Moussa et al. (2006) e Campos et al. (2002) tiveram inibição dos processos biológicos de remoção de amônia em concentrações salinas acima de 40 g L⁻¹.

Os agrupamentos do DGGE foram reflexos do gradiente de salinidade e de remoção de amônia, que como observado pelos vetores são inversamente

proporcionais entre si. Os pontos de salinidade até 100 g L⁻¹ de NaCl apresentaram uma relação positiva com a remoção de amônia e, conseqüentemente, negativa com o aumento da salinidade (NaCl). Resultado oposto foi observado para os pontos de 105 a 125 g L⁻¹ de NaCl.

Apesar de a salinidade afetar o metabolismo dos microrganismos, este fator não alterou os índices de diversidade de espécies nos três pontos estudados, onde os índices Shannon foram 3.595, 3.137 e 3.019, para os pontos 25, 100 e 125 g L⁻¹ de NaCl, respectivamente. A razão entre os valores de OTUs observados e índice de Chao forneceu a cobertura amostral, que foi de aproximadamente 90% para as três amostras. De acordo com Good (1953) e Lemos et al. (2011), uma cobertura $\geq 90\%$ significa que o esforço amostral foi representativo, aproximando-se da realidade.

4.2 Diversidade microbiana

O aumento da salinidade influenciou de diferentes maneiras a comunidade microbiana. Planctomycetes e Actinobacteria diminuíram o número de *reads* com o aumento da salinidade, ao passo que Proteobacteria aumentou. Zhang e colaboradores (2015) ao estudarem a diversidade de lodo ativado por sequenciamento do gene RNAr 16S, observaram filos de Proteobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes e Deinococcus-Thermus como os mais abundantes.

Os gêneros *Pelotomaculum* e *Roseimaritima* apresentaram um comportamento interessante, sua abundância diminuiu na transição de 25 para 100 g L⁻¹, mas aumentou de 100 para 125 g L⁻¹ de sal. Várias hipóteses podem ser formuladas para explicar o reestabelecimento da população. Pode ser que durante o processo de aclimação, tais microrganismos tenham desenvolvido mecanismos de adaptação, ou mesmo, uma ocupação de um nicho que até então era ocupado por outra espécie.

O gênero *Halomonas* merece atenção, pois teve um aumento considerável da abundância com o aumento da salinidade. Este gênero é representado por bactérias halo-extremófilas, capazes de tolerar até 25 % de sal (Ventosa et al. 1998) e há relatos de existirem espécies com capacidade de realizar a nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia (Guo et al. 2013). Portanto, também podem ter tido um relevante papel na remoção de amônia do reator até 100 g L⁻¹ de NaCl.

Os gêneros responsáveis pela nitrificação autotrófica foram encontrados em todas as salinidades estudadas, dentre esses gêneros, o *Nitrococcus* se destacou por

aumentar sua abundância na concentração de 100g L⁻¹ de NaCl. Segundo Ghai e colaboradores (2011), apesar das espécies de *Nitrococcus* não serem halofílicas, o genoma deste grupo apresenta um padrão de aminoácidos com preferência por arginina ao invés de lisina, característica comum em bactérias marinhas halofílicas.

De forma geral, o processo de aclimação ao sal foi um passo essencial para manutenção do metabolismo nitrificante em altas concentrações salinas, visto que a literatura tem mostrado que concentrações de NaCl superiores a 2 % já provocam uma queda drástica na eficiência da nitrificação em reatores com efluentes salinos (Uygur e Kargi 2004; Bassin et al. 2012; Costa 2014; She, et al. 2016).

Apesar dos reatores terem sido operados em ambiente aeróbio, gêneros associados ao processo ANAMMOX, que são anaeróbios, também foram identificados. Ambientes anaeróbios são passíveis de ocorrerem em lodos ativados, devido a estrutura do floco. No interior do floco forma-se um micro-ambiente anaeróbio (Zeng et al. 2003). Adicionalmente, durante a etapa de decantação do lodo, as regiões mais afastadas da superfície também ficam com deficiência de oxigênio dissolvido, favorecendo o crescimento dos microrganismos anaeróbios (Hobson 2009).

A presença de *archaeas* metanogênicas nos reatores mostra mais uma vez, que apesar do ambiente aeróbio dos reatores, muitos microrganismos anaeróbios podem estar ativos e realizando importantes funções na degradação de compostos carbonáceos do efluente.

Ao final deste trabalho foi possível observar que a remoção biológica de amônia em sistemas de lodos ativados em batelada sequencial não é realizada apenas pelas bactérias autotróficas. Esta remoção envolve uma ação conjunta de vários grupos microbianos com diferentes características metabólicas (Figura 8). Ressalta-se também, que apesar da nitrificação ser afetada pela salinidade, a etapa de aclimação foi essencial para a eficiência da remoção biológica de amônia em altas concentrações salinas.

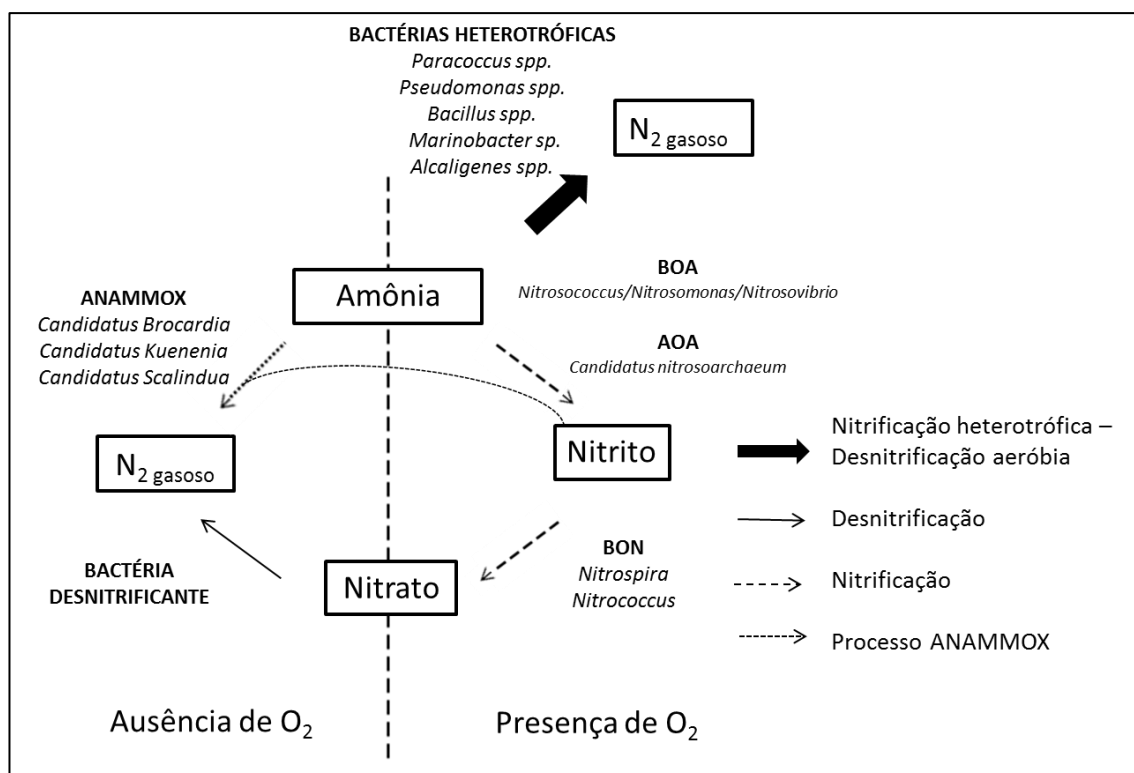


Figura 8. Esquema das reações de remoção biológica de nitrogênio que ocorrem nos processos de lodos ativados. Os gêneros encontrados neste trabalho estão indicados em cada etapa na figura. BOA – Bactérias oxidadoras de amônia; AOA – Archaea oxidadoras de amônia; BON – Bactérias oxidadoras de nitrito; N₂ – nitrogênio gasoso.

5. CONCLUSÕES

Os resultados mostraram um aumento da população de *archaeas* com acréscimo de sal na água de produção de petróleo e ao mesmo tempo uma redução no número de bactérias.

A partir dos dados do sequenciamento massivo do gene rRNA 16S, concluiu-se que a remoção de amônia no reator foi realizada por diferentes grupos de microrganismos, bactérias oxidadoras de amônia (*Nitrosococcus*, *Nitrosomonas*, *Nitrosovibrio*, *Nitrospira* e *Nitrococcus*), archaeas oxidadoras de amônia (*Candidatus nitrosoarchaeum*), microrganismos ANAMMOX (*Candidatus Brocardia*, *Candidatus Kuenenia* e *Candidatus Scalindua*) e potenciais nitrificantes heterotróficos (*Paracoccus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Marinobacter sp.*, e *Alcaligenes spp.*).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmadun, F. L., Pendashteh, A., Abdullah, L. C., Biak, D. R. A., Madaeni, S. S., Abidin, Z. Z. (2009) Review of technologies for oil and gas produced water treatment. *J. Hazard. Mater.*, 170(2-3), 530-551.

APHA. (1998) American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed. American Public Health Association, Washington, DC, USA, 1998.

Aydin, S., Shahi, A., Ozbayram, E. G., Ince, B., Ince, O. (2015) Use of PCR-DGGE based molecular methods to assessment of microbial diversity during anaerobic treatment of antibiotic combinations. *Bioresour. Technol.*, 192, 735-740.

Bassin, J. P., Kleerebezem, R., Muyzer, G., Rosado, A. S., van Loosdrecht, M. C. M., Dezotti, M. (2012) Effect of different salt adaptation strategies on the microbial diversity activity, and settling of nitrifying sludge in sequencing batch reactors. *Appl Microbiol. Biotechnol.*, 93(3), 1281-1294.

Bassin, J. P., Abbas, B., Vilela, C. L. S., Kleerebezem, R., Muyzer, G., Rosado, A. S., van Loosdrecht, M. C. M., Dezotti, M. (2015) Tracking the dynamics of heterotrophs and nitrifiers in moving-bed biofilm reactors operated at different COD/N ratios. *Bioresour Technol* 192, 131-141.

Campos, J. L., Mosquera-Corral, A., Sánchez, M., Méndez, R., Lema, J. M. (2002) Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit. *Water Res.*, 36(10), 2555-2560.

Casamayor, E. O., Schäfer, H., Bañeras, L., Pedrós-Alió, C., Muyzer, G. (2000) Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: Comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(2), 499–508.

Chen, M., Wang, W., Feng, Y., Zhu, X., Zhou, H., Tan, Z., Li, X. (2014) Impact resistance of different factors on ammonia removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium *Aeromonas* sp. HN-02. *Bioresour. Technol.*, 167, 456–461.

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

Cui, H. L., Yang, X., Gao, X., Xu, X. W. (2011) *Halogranum gelatinilyticum* sp.nov. and *Halogranum amylolyticum* sp. nov., isolated from a marine solar saltern, and emended description of the genus *Halogranum*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 61(4), 911–915.

Dalmacija, B., Karlovic, E., Tamas, Z., Miskovic, D. (1996) Purification of high salinity wastewater by activated sludge process. Water Res., 30(2), 295-298.

Dong, X., Reddy, G. B. (2010) Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR-DGGE technique. Bioresour. Technol., 101(4), 1175-1182.

Fu, Z., Zhao, J. (2015) Impact of quinolone on activity and microbial culture of partial nitrification process. Bioresour. Technol., 197, 113-119.

Ghai, R., Pašić, L., Fernández, A. B., Martin-Cuadrado, A. B., Mizuno, C. M., McMahon, K. D., Papke, R. T., Stepanauskas, R., Rodriguez-Brito, R., Rohwer, F., Sánchez-Porro, C., Ventosa, A., Rodríguez-Valera, F. (2011) New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments. Sci. Rep., 1(135).

Gao, J. F., Luo, X., Wu, G. X., Li, T., Peng, Y.Z. (2013) Quantitative analyses of the composition and abundance of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in eight full-scale biological wastewater treatment plants. Bioresour. Technol., 138, 285-296.

Good, I. J. (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. Biomet., 40(3/4), 237-264.

Guo, Y., Zhou, X., Li, Y., Li, K., Wang, C., Liu, J., Yan, D., Liu, Y., Yang, D., Xing, J. (2013) Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Halomonas campisalis*. Biotechnol. Lett., 35(12), 2045-2049.

Hammer, Ø., Harper, D. A. T., Ryan, P. D. (2001) Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontol. Electron., 4(1), 9.

Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., Wellington, E. M. H. (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. Appl. Environ. Microbiol., 63(8), 3233–3241.

Hiroyuki, I., Yuji, S., Yoichi, K., Satoshi, H., Akiyoshi, O., Hideki, H. (2002) *Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic,

syntrophic propionate-oxidizing bacterium. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52(5), 1729-1735.

Hobson, T. (2009) Activated Sludge - Evaluating and Controlling Your Process (Seventh Edition). Kansas, EUA: Hobson's Choice Press.

Joo, H. S., Hirai, M., Shoda, M. (2005) Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification–aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis*. J. Biosci. Bioeng., 100(2), 184–191.

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

Kartal, B., Rattray, J., van Niftrik, L., van de Vossenberg, J., Schmid, M. C., Webb, R. I., Schouten, S., Fuerst, J. A., Damsté, J. S. S., Jetten, M. S. M., Strous, M. (2007) Candidatus “*Anammoxoglobus propionicus*” gen. nov., sp. Nov., a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. Syst. Appl. Microbiol., 30(1), 39-49.

Kowalchuk, G. A., Stephen, J. R., De Boer, W., Prosser, J., Embley, T. M., Woldendorp, J. W. (1997) Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR amplified 16S ribosomal DNA fragments. Appl. Environ. Microb., 63, 1489-1497.

Lemos, L. N., Fulthorpe, R. R., Triplett, E. W., Roesch, L. F. (2011) Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. J. Microbiol. Methods, 86(1), 42-51.

Levantesi, C., Rossetti, S., Thelen, K., Kragelund, C., Krooneman, J., Eikelboom, D., Nielsen, P. H., Tandoi, V. (2006) Phylogeny, physiology and distribution of 'Candidatus *Microthrix calida*', a new *Microthrix* species isolated from industrial activated sludge wastewater treatment plants. Environ. Microbiol., 8(9), 1552-1563.

Liang, Y., Li, D., Zhang, X., Zeng, H., Yang, Z., Cui, S., Zhang, J. (2015) Stability and nitrite-oxidizing bacteria community structure in different high-rate CANON reactors. Bioresour. Technol., 175, 189-194.

Limpiyakorn, T., Fühacker, M., Haberl, R., Chodanon, T., Srithep, P., Sonthiphand, P. (2013) AmoA-encoding Archaea in wastewater treatment plants: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97(4), 1425-1439.

Loman, N. J., Misra, R. V., Dallman, T. J., Constantinidou, C., Gharbia, S. E., Wain, J., Pallen, M. J. (2012) Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nature biotechnol.*, 30, 434-439.

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

McIlroy, S. J., Saunders, A. M., Albertsen, M., Nierychlo, M., McIlroy, B., Hansen, A. A., Karst, S. M., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H. (2015) MiDAS: the field guide to the microbes of activated sludge. *Database (Oxford)* 2015, bav062.

Mori, K., Iino, T., Suzuki, K. I., Yamaguchi, K., Kamagata, Y. (2012) Aceticlastic and NaCl-Requiring Methanogen “*Methanosaeta pelagica*” sp. nov., Isolated from Marine Tidal Flat Sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(9), 3416-3423.

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

Mußmann, M., Brito, I., Pitcher, A., Damsté, J. S. S., Hatzenpichler, R., Richter, A., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H., Müller, A., Daims, H., Wagner, M., Head, I. M. (2011) Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express amoA but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 108(40), 16771-16776.

Muyzer, G., Wall, E. C., Uitterlinden, A. G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(3), 695-700.

Neef, A., Amann, R., Schlesner, H., Schleifer, K. H. (1998) Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of *planctomycetes* with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology*, 144(12), 3257–3266.

Quan, Z. X., Rhee, S. K., Zuo, J. E., Yang, Y., Bae, J. W., Park, J. R., Lee, S. T., Park, Y. H. (2008) Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge

anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor. *Environ. Microbiol.*, 10(11), 3130-3139.

Reinbold, K. A., Pescitelli, S. M. (1982) Effects of exposure to ammonia on sensitive life stages of aquatic organisms. Project Report, Contract No. 68-01-5832, Illinois: Illinois Natural History Survey, Champaign, IL.

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

Schill, N., van Gulik, W. M., Voisard, D., von Stockar, U. (1996) Continuous cultures limited by a gaseous substrate: development of a simple, unstructured mathematical model and experimental verification with *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biotechnol. Bioeng.*, 51(6), 645-658.

She, Z., Zhao, L., Zhang, X., Jin, C., Guo, L., Yang, S., Zhao, Y., Gao, M. (2016) Partial nitrification and denitrification in a sequencing batch reactor treating high-salinity wastewater. *Chem. Eng. J.*, 288, 207-215.

Silva, C. C., Jeus, E. C., Torres, A. P. R., Sousa, M. P., Santiago, V. M. J., Oliveira, V. M. (2010) Investigation of bacterial diversity in membrane bioreactor and conventional activated sludge processes from petroleum refineries using phylogenetic and statistical approaches. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20(3), 447-459.

Stephenson, M. T. (1992) Components of produced water: a compilation of industry studies. *J. Petrol. Technol.*, 44(5), 548-603.

Strous, M., van Gerven, E., Kuenen, J. G., Jetten, M. (1997) Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(6), 2446-2448.

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

Swan, J. M., Neff, J. M., Young, P. C. (1994) Environmental Implications of Offshore Oil and Gas Development in Australia – The Findings of an Independent Scientific Review. Australian Petroleum Exploration Association, Sydney, 696p.

Tibbetts, P. J. C., Buchanan, I. T., Gawel, L. J., Large, R. (1992) A comprehensive determination of produced water composition. In: Ray, J. P.; Engelhardt, F.R. (eds) *Produced Water: Technological Environmental Issues and Solutions.*, Plenum Press, New York, 97-112.

Uygur, A., Kargi, F. (2004) Salt inhibition on biological nutrient removal from saline wastewater in a sequencing batch reactor. *Enzyme Microb. Tech.*, 34(3-4), 313-318.

Vanparrys, B., Bodelier, P., De Vos, P. (2006) Validation of the correct start codon of *norX/nxrX* and universality of the *norAXB/nxrAXB* gene cluster in *Nitrobacter* species. *Curr. Microbiol.*, 53(3), 255-257.

Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K. E., Nelson, W., Fouts, D. E., Levy, S., Knap, A. H., Lomas, M. W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y. H., Smith, H. O. (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science.*, 304(5667), 66-74.

Ventosa, A., Nieto, J. J., Oren, A. (1998) Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(2), 504-544.

Verstrae, W., Alexande, M. (1972) Heterotrophic nitrification by *Arthrobacter* sp. *J. Bacteriol.*, 110(3), 955-961.

Wan, C., Yang, X., Lee, D.J., Du, M., Wan, F., Chen, C. (2011) Aerobic denitrification by novel isolated strain using as nitrogen source. *Bioresour. Technol.* 102(15), 7244-7248.

Yang, X. P., Wang, S. M., Zhang, D. W., Zhou, L. X. (2011) Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1. *Bioresour. Technol.*, 102(2), 854-862.

Yao, S., Ni, J., Ma, T., Li, C. (2013) Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. HA2. *Bioresour. Technol.*, 139, 80-86.

Zeng, R. J., Lemaire, R., Yuan, Z., Keller, J. (2003) Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal in a lab-scale sequencing batch reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 84(2), 170-178.

Zhang, J., Wu, P., Hao, B., Yu, Z. (2011) Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. *Bioresour. Technol.*, 102(21), 9866-9869.

Zhang, Q. L., Liu, Y., Ai, G. M., Miao, L. L., Zheng, H. Y., Liu, Z. P. (2012) The characteristics of a novel heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotrophicus* strain L7. *Bioresour. Technol.*, 108, 35-44.

Zhang, X., Qu, Y., Ma, Q., Zhang, Z., Li, D., Wang, J., Shen, W., Shen, E., Zhou, J. (2015) Illumina MiSeq sequencing reveals diverse microbial communities of activated sludge systems stimulated by different aromatics for indigo biosynthesis from indole. PLoS. One. 10(4), e0125732.

INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES

Tabela S1. Índices de diversidade microbiana de procariotos nas diferentes concentrações de sal calculado na distância evolutiva de 0,03.

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

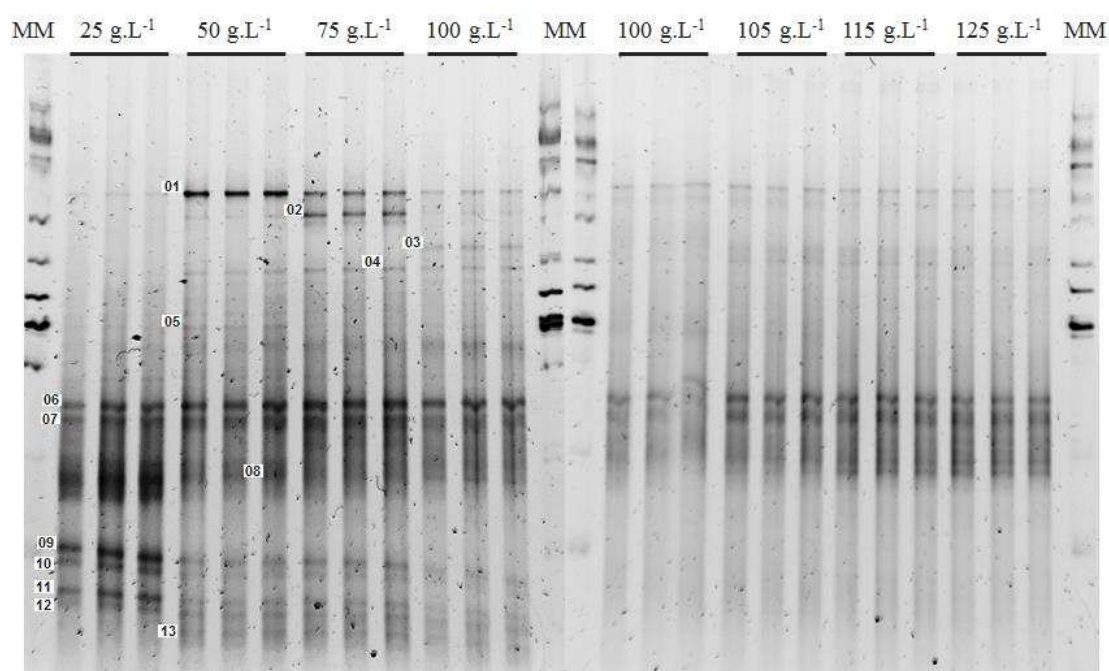


Figura S1. Perfil de bandas do gel de DGGE para o gene de rRNA 16S de Bactéria. Ordem do gel: MM: marcador molecular 100 pb, amostras de 25 a 125 g L⁻¹ de NaCl em triplicata, MM: marcador molecular de 100 pb.

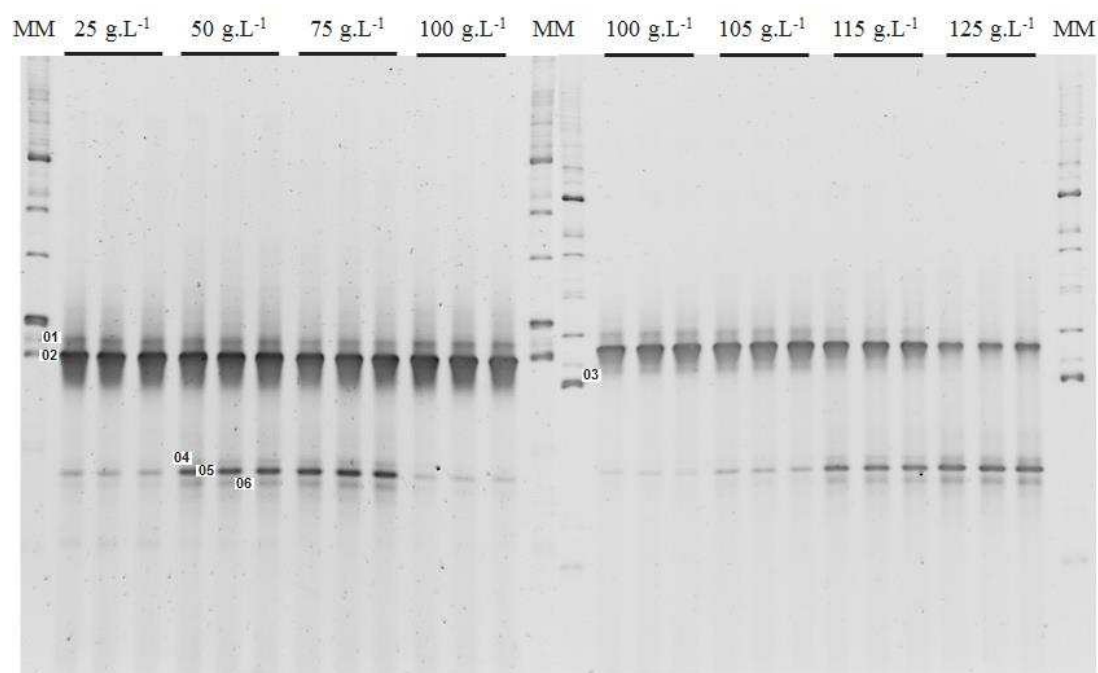


Figura S2. Perfil de bandas do gel de DGGE para o gene de rRNA 16S de AOB β -proteobacteria. Ordem do gel: MM: marcador molecular 100 pb, amostras de 25 a 125 g L⁻¹ de NaCl em triplicata, MM: marcador molecular de 100 pb.

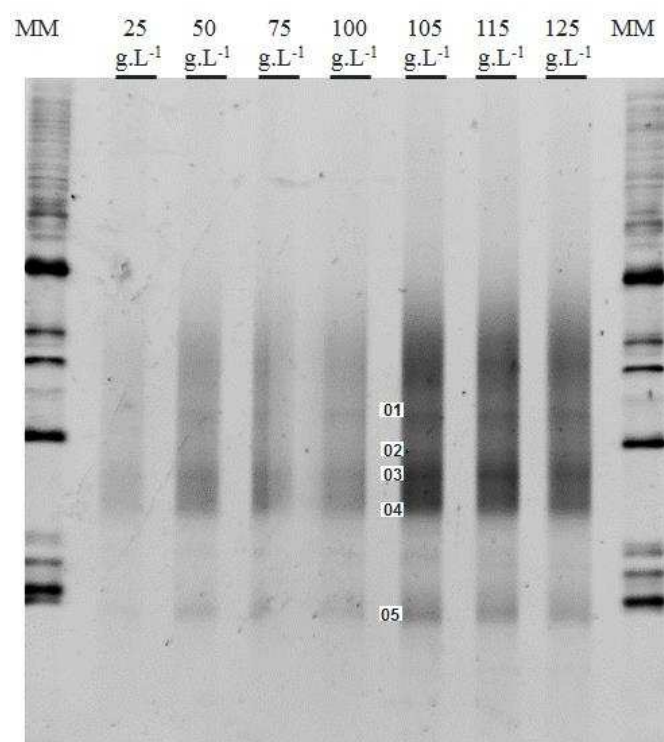


Figura S3. Perfil de bandas do gel de DGGE para o gene de rRNA 16S de *Archaea* Total. Ordem do gel: MM: marcador molecular 100 pb, amostras de 25 a 125 g L⁻¹ de NaCl, MM: marcador molecular de 100 pb.

*Gel reproduzido a fim de melhor sua resolução. Portanto não apresenta replicata das amostras.

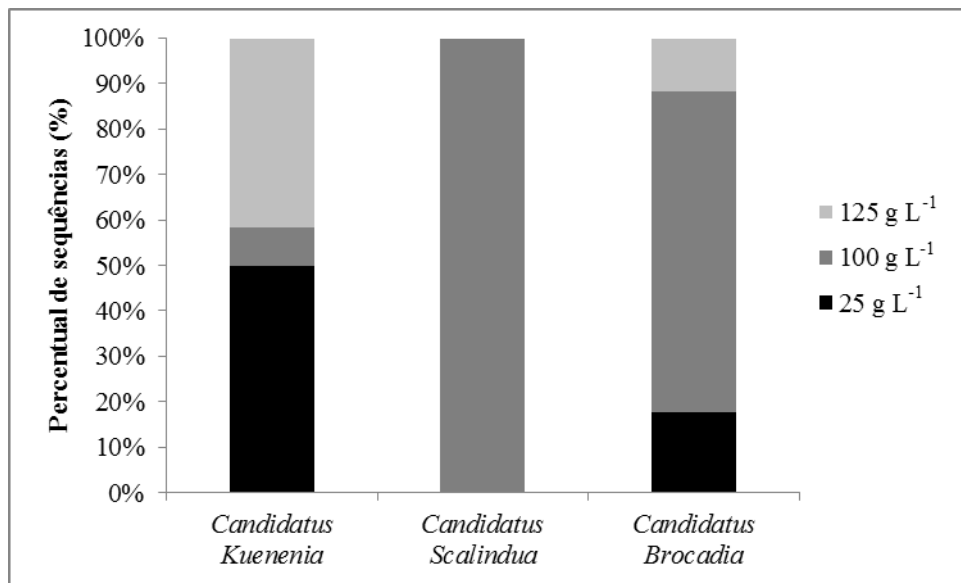


Figura S4. Abundância relativa de espécies de bactérias envolvidas no processo ANAMMOX nas diferentes concentrações de sal.

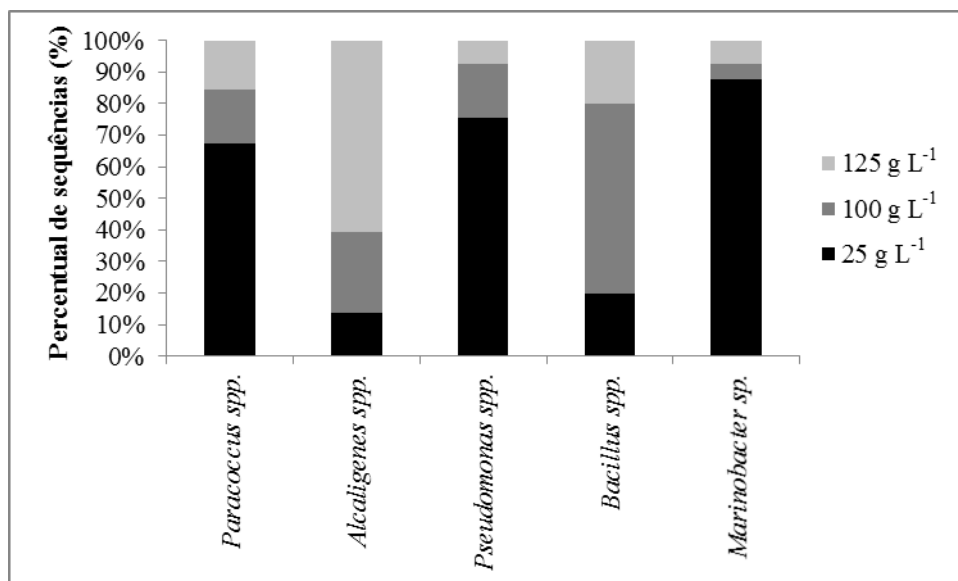


Figura S5.2 Abundância relativa de potenciais bactérias nitrificantes heterotróficas encontradas nas diferentes concentrações de sal.

CAPÍTULO 4

EFEITO DO AUMENTO GRADUAL DE SAL NA REMOÇÃO DE AMÔNIA E DIVERSIDADE MICROBIANA DE LODO GRANULAR AERÓBIO

Larissa Quartaroli¹, Claudio Mudadu Silva^{2*}, Livia Carneiro Fidélis Silva³, Sergio Oliveira de Paula⁴,
Valéria Maia de Oliveira⁵, Maíra Paula de Sousa⁶, João Paulo Bassin⁷, Cynthia Canêdo da Silva⁸

¹ Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

² Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

³ Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

⁴ Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

⁵ Divisão de Recursos Microbianos, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Universidade de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

⁶ Centro de P&D da Petrobras, Petrobras, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. (mpsousa@petrobras.com.br)

⁷ Programa de Engenharia Química - COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁸ Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

*Corresponding author e-mail: mudado@ufv.br Av. Peter Henry Rolfs, s/n - Campus Universitário, Laboratório de Celulose e Papel, Viçosa - MG, 36570-900, Tel.: +55-31-38992717.

RESUMO

Os efeitos do aumento gradual da concentração de NaCl sobre a eficiência de remoção de amônia e sobre a estrutura e a diversidade microbiana de grânulo aeróbio foram investigados neste trabalho. Dois reatores biológicos em batelada sequencial foram operados visando a formação de lodo granular aeróbio. Os reatores foram alimentados com efluente sintético, o qual foi enriquecido com NaCl, uma concentração de 5 g L⁻¹ de NaCl por semana. Foi observado que com o aumento da concentração de sal, os grânulos diminuíram de tamanho até se desintegrar. Entretanto, a remoção de amônia se manteve eficiente em todas as salinidades analisadas. Não houve acumulação de nitrito, nem de nitrato no efluente tratado, a remoção de ambos aumentou com o acréscimo de NaCl. Tal observação pôde ser corroborada com o acesso e análise da estrutura da comunidade microbiana por sequenciamento massivo pela plataforma Illumina, que permitiu verificar a presença de diversos gêneros afiliados à microrganismos que realizam a nitrificação heterotrófica e desnitrificação aeróbia (*Paracoccus* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Alcaligenes* sp. e *Aeromonas* sp.), além daqueles envolvidos no processo de nitrificação (*Nitrosomonas*, *Nitrosovibrio*, *Nitrospira*, *Nitrobacter*) e desnitrificação convencional (*Denitromonas*, *Paracoccus*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Nitratireductor*, *Achromobacter*, *Thiobacillus*, *Thauera*, *Alcaligenes*, *Hyphomicrobium*, *Rhodopseudomonas* e *Micrococcus*) e processo ANAMMOX (*Candidatus kuenenia*). O índice de Shannon mostrou que a diversidade de espécies pertencentes aos Domínios Bactéria e Archaea aumentaram com o acréscimo de NaCl.

Palavras chave: Lodo granular aeróbio, salinidade, sequenciamento rRNA de 16S, nitrificação heterotrófica.

1. INTRODUÇÃO

Uma nova tecnologia baseada na granulação aeróbia vem se destacando no tratamento de águas residuárias. Tal processo consiste em uma nova morfologia do lodo biológico, diferente do sistema de lodos ativados convencional, onde os microrganismos não mais se apresentam na forma de flocos dispersos (lodo floculento), e sim organizados em grânulos (Liu e Tay, 2004).

Os grânulos aeróbios possuem diâmetro maior do que dos flocos convencionais de lodos ativados, uma estrutura regular, forte e compacta, o que facilitam a sua sedimentabilidade. Os biogrânulos aeróbios tem se mostrado capazes de resistir a altas cargas orgânicas e serem menos vulneráveis à cargas tóxicas. Devido as suas dimensões e maiores limitações na difusão do oxigênio dissolvido para o interior do grânulo, este possui zonas aeróbias e anaeróbias, que contribuem com a presença de microrganismos que podem efetuar simultaneamente alguns processos biológicos (Liu e Tay, 2004; Beun et al. 2001; Gao et al. 2012). A estrutura de lodo granular aeróbio cria condições favoráveis para remoção de nitrogênio amoniacal, onde o processo de nitrificação/desnitrificação ocorre de forma conjunta.

Além do processo convencional de remoção de amônia, novos processos têm sido evidenciados nos últimos anos, como o ANAMMOX e a nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia. No processo ANAMMOX a remoção de amônia ocorre sobre condições anaeróbias, onde tanto a amônia como o nitrito são convertidos a nitrogênio gasoso (Mulder et al. 1995; Strous et al. 1997). Na nitrificação heterotrófica e desnitrificação aeróbia, os microrganismos são capazes de realizar simultaneamente a nitrificação e a desnitrificação em condições aeróbias. (Robertson e Kuenen, 1988; van Niel et al. 1992). Na superfície do grânulo, onde a presença do oxigênio dissolvido está em abundância, pode ocorrer os processos de nitrificação convencional e nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia. No interior do grânulo, onde a concentração de oxigênio dissolvido é limitante, ocorre os processos de desnitrificação anaeróbia e ANAMMOX (Pochana e Keller, 1999; Liu e Tay, 2004). Estudos realizados por diversos autores (Li et al. 2005; Wang et al. 2009; Yang et al. 2003; Lochmatter et al. 2014; Li-Long et al. 2014), constataam a nitrificação/desnitrificação conjunta em sistemas com lodo granular aeróbio.

Os reatores de lodo granular aeróbio também tem tido sucesso no tratamento de águas salinas. Existe uma diversidade de setores responsáveis pela geração de

efluentes ricos em concentrações de íons inorgânicos, principalmente o cloreto de sódio. São exemplos as indústrias de produção de fertilizantes e pesticidas, exploração de petróleo, processamento de frutos do mar e peixes de água salgada, conservas e farmacêutica. Além dos efluentes industriais, os efluentes doméstico de regiões costeiras têm aumentado seu índice de salinidade, devido a substituição da água potável pela água do mar em usos menos nobres, como por exemplo, nas descargas dos vasos sanitários. A salinidade é conhecida por influenciar negativamente os processos de tratamento biológico, restringindo espécies microbianas e afetando o desempenho do sistema (Moussa et al. 2006; Figueroa et al, 2008; Pronk et al. 2014). Embora a salinidade tenha efeito negativo para diversos processos biológicos, a estrutura robusta do biogrânulo aeróbio têm se mantido estável a elevadas salinidades. Wang et al. (2015) adaptaram com êxito o lodo granular aeróbio em condições de até 80 g L⁻¹ de NaCl. Assim, o lodo granular aeróbio apresenta-se como uma excelente alternativa na remoção de nitrogênio amoniacal de efluentes salinos (Van Den Akker et al. 2015; Corsino et al. 2015).

Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do aumento gradual da salinidade na estabilidade do grânulo, no processo de remoção de amônia, e na diversidade de bactérias e *archaeas* presentes no grânulo aeróbio.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Protocolo experimental e condições operacionais

Para realização dos experimentos foram montados três reatores de bancada, paralelos, com alimentação intermitente. Um dos reatores foi operado como controle, com parâmetros típicos de lodos ativados convencional, biomassa floculenta. Os outros dois reatores foram operados de forma a estimular a formação de lodo granular aeróbio.

Cada reator possuía um tanque de aeração com volume útil de 1,4 litros, sendo que em cada ciclo eram removidos 700 ml de efluente tratado e completado o volume novamente com efluente sintético, de tal modo, que a troca volumétrica dos reatores foi de 50 % em cada ciclo. Os reatores foram operados em ciclos de operação de 12 horas. A alimentação dos reatores ocorria em conjunto a fase de reação e teve tempo de 2 horas. Antes de completar as 12 horas de reação, a aeração era cessada para

possibilitar a sedimentação do lodo biológico. O tempo de decantação do reator operado com lodo floculento foi de 1 hora. Nos demais reatores, a fim de estimular a formação dos grânulos, o tempo de sedimentação se iniciou com 1 hora e foi reduzido de forma progressiva até 1 minuto, conforme a Tabela 1. Após a sedimentação, o sobrenadante (efluente tratado) era descartado, tempo de descarte de 2 minutos.

Tabela 1. Redução do tempo de decantação para formação do grânulo aeróbio

Dia	Tempo de decantação (min)
0	60
2	50
4	40
6	35
8	30
10	25
15	20
20	15
25	10
30	8
35	5
40	2
45	1

Em todos os reatores a temperatura foi mantida em 30 °C e o pH na faixa entre 6,5 a 7,5, por meio de adição de NaOH ou HCl. Os reatores eram providos de difusores de ar para o fornecimento de oxigênio e revolvimento do lodo biológico, a concentração de oxigênio dissolvido nos reatores foi mantida acima de 4 mg L⁻¹.

Após a formação dos biogrânulos aeróbios, foram adicionados, semanalmente, 5 g L⁻¹ de NaCl nos reatores R1 e R2, e observado a remoção de amônia, tamanho dos grânulos e comunidade microbiana.

2.2 Efluente e lodo biológico

Os reatores foram inoculados com 500 mL de lodo floculento oriundo de um sistema de lodos ativados de uma estação de tratamento de efluentes situada em um terminal de petróleo na costa brasileira. O lodo estava submetido a uma condição de salinidade de aproximadamente 55 g L⁻¹ de NaCl. Para a alimentação dos reatores foi utilizado um efluente sintético, preparado com componentes orgânicos e inorgânicos, baseado em Campos et al. (2007), com modificações. A composição do efluente

sintético está descrita na Tabela 2. Uma solução de micronutrientes foi adicionada junto ao efluente sintético na proporção de 0,5 mL L⁻¹, conforme descrito por Campos et al. (2007), com alterações (Tabela 3).

Tabela 2. Composição do efluente sintético

Composto	Concentração
NH ₄ Cl	305 mg L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	444 mg L ⁻¹
MgSO ₄	106 mg L ⁻¹
NaHCO ₃	900 mg L ⁻¹
C ₆ H ₁₂ O ₆	600 mg L ⁻¹

Tabela 3. Composição da solução de micronutrientes

Composto	Concentração
EDTA	50000 mg L ⁻¹
(NH ₄) ₂ MO ₇ O ₂₄	1036 mg L ⁻¹
MnSO ₄	3859 mg L ⁻¹
ZnSO ₄	12354 mg L ⁻¹
CaCl ₂	5540 mg L ⁻¹
CoCl ₂	1004 mg L ⁻¹
FeCl ₃	2917 mL L ⁻¹

2.3 Métodos analíticos

A fim de avaliar o desempenho dos reatores quanto a remoção de amônia, foram monitorados os parâmetros: pH, oxigênio dissolvido, condutividade, amônia, nitrito, nitrato.

Os procedimentos para determinação de nitrato e nitrito foram realizados através de kits da HACH TNT 836 e 840, respectivamente.

O pH, temperatura, oxigênio dissolvido e condutividade foram medidos com auxílio de sonda multiparâmetro (modelo multi HQ40d – HACH), devidamente calibrada. O nitrogênio amoniacal foi analisado segundo os procedimentos padrões do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998).

2.4 Microscopia eletrônica de varredura

Com o intuito de avaliar a estrutura do biogrânulo aeróbio, realizou-se microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de biomassa granular com

concentrações de sal de 0, 10, 20 e 30 g L⁻¹ de NaCl. Realizou-se análise de amostras compostas dos reatores R1 e R2.

Para realização das microscopias, as amostras, após coletadas, foram lavadas duas vezes por imersão em PBS 0,2 M pH 7,4 e fixados com formaldeído 3,7% e mantidas refrigeradas (4 °C) por 24 horas. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes por imersão em tampão PBS 0,2 M pH 7,4 e reservadas em temperatura em 4°C. As amostras de biomassa granular foram submetidas à desidratação em série de concentração crescente de etanol (30 a 100% v/v) por 10 minutos cada, à temperatura ambiente. A desidratação em etanol 100% foi repetida por três vezes a fim de obter máxima retirada da água. Imediatamente após a última etapa de desidratação, as amostras foram submetidas à secagem no ponto crítico (Critical Point Dryer - CPD®, Bal-tec, modelo 030). Posteriormente foram fixados em porta-espécimes (stubs) com fita dupla face e cobertos com aproximadamente 15 nm de ouro em metalizador (Sputtercoater, Balzers, modelo FDU 010). Por fim as amostras foram examinadas no Microscópio Eletrônico de Varredura Leo 1430 VP do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, operando a 20 kV para a obtenção das imagens (DIAS, 2014).

2.5 Análise da comunidade microbiana

2.5.1 Amostragem

Amostras de lodo granular dos dois reatores biológicos foram coletadas nas seguintes concentrações de 0, 10, 20 e 30 g L⁻¹ de NaCl. Todas as amostras de lodo foram coletadas em triplicata de cada reator, armazenadas em tubos Falcon de 15 mL e congeladas a -18 °C.

2.5.2 Extração de DNA

Pressupondo que a composição microbiológica dos dois reatores contendo lodo granular fossem semelhantes, devido à similar operação, o DNA foi extraído da amostra composta das triplicatas dos dois reatores. Foi realizada uma extração de DNA para cada salinidade estudada.

A extração do DNA total da comunidade microbiana foi realizada segundo o protocolo descrito por Silva et al. (2010) com as seguintes modificações: antes de iniciar a extração do DNA, uma alíquota de 4 mL da amostra de lodo foi lavada com 10 mL de tampão SET (20 mM de Tris, 75 mM de NaCl e 25 mM de EDTA) e

centrifugado por 10 minutos a 3,000 *g*. O procedimento de lavagem foi realizado cinco vezes. Após lavagem, a amostra de lodo foi suspendida em 600 μ L de tampão SET e homogeneizada no agitador de tubo e então iniciada a extração. O DNA extraído foi armazenado a -18 °C.

2.5.3 Sequenciamento massivo do gene RNAr 16S de Bactéria e *Archaea*

Para a construção das bibliotecas, o DNA genômico dos pontos com 0, 10, 15 e 20 g L⁻¹ de NaCl foi enviado para sequenciamento da região variável V1-V2 e V3 do gene 16S rRNA, utilizando os primers 27f/338r e 349f/534r, respectivamente. O sequenciamento foi realizado na “Molecular Research DNA” (www.mrdnalab.com, Shallowater, TX, USA) pela plataforma MiSeq (Illumina).

2.5.4 Análise de dados

Os dados das sequências foram processados utilizando o “MR DNA analysis pipeline” (MR DNA, Shallowater, TX, USA). Os *barcodes*, as sequências menores que 150 bp e as quimeras foram extraídas. Os *contigs* foram montados e um arquivo de OTU (Unidade Taxonômica Operacional) foi gerado. As OTUs foram definidas pelo agrupamento em 3% divergência. Uma sequência representativa de cada OTU foi classificada taxonomicamente usando-se da ferramenta BLASTn contra um banco de dados, com curadoria derivado de *GreenGenes*, RDPII e NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov, DeSantis et al 2006, <http://rdp.cme.msu.edu>). As análises de diversidade das sequências foram realizadas por meio o software PAST (Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis) (HAMMER et al., 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desempenho do reator

As concentrações dos compostos nitrogenados (amônia, nitrito e nitrato) obtidas ao longo do experimento nos reatores R1 e R2, contendo biomassa granular aeróbia, estão mostradas na Figura 1. Em detalhe, a Figura 1 A expõe as concentrações de amônia no afluente e efluente, e as eficiências de remoção em todas as salinidades

estudadas. Na Figura 1 B, as concentrações de nitrito e nitrato são relatadas no afluente e efluente ao longo das salinidades.

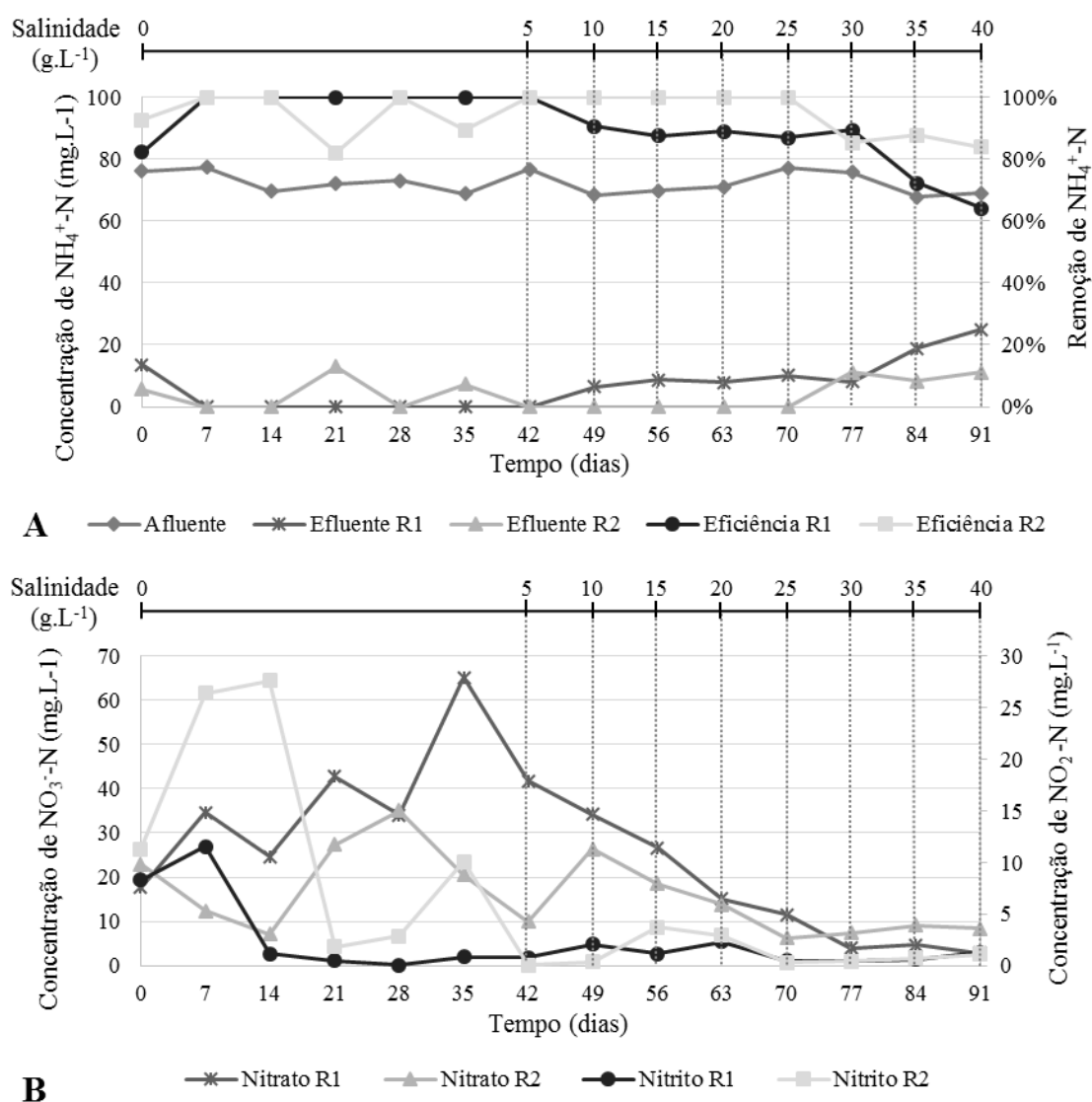


Figura 1. Concentrações e remoções de NH₄⁺ (A); concentração de NO₂⁻ e NO₃⁻ (B) no efluente tratado dos reatores R1 e R2, contendo biomassa granular aeróbia.

Como se pode observar, a concentração de amônia no afluente foi mantida em torno de 72 mg L⁻¹, enquanto que as concentrações de nitrito e o nitrato eram iguais a zero. Após o tratamento a concentração de amônia no efluente não passou de 11,2 mg L⁻¹ no reator R1 e 24,8 mg L⁻¹ no reator R2. A eficiência de remoção de amônia mostrou uma leve queda ao longo das salinidades, se acentuando nas concentrações de NaCl acima de 30 g L⁻¹. Assim, a eficiência de remoção se manteve acima de 85 %, com picos de 100 %, até concentração de 30 g L⁻¹ de NaCl. Nas concentrações de sal

superior a 30 g L⁻¹ de NaCl, a eficiência de remoção de amônia do reator R1 foi mais afetada, sofrendo redução de 89 para 64%. O reator R2 não sofreu alterações, mantendo sua eficiência em torno de 84%. De forma geral, os resultados mostram que a remoção de amônia não foi severamente prejudicada com o aumento da salinidade até concentração de 40 g L⁻¹ de NaCl, com eficiência média de remoção de 74%, entre os dois reatores estudados (Figura 1A). As condições operacionais e o aumento gradual da salinidade não foram limitantes para o processo de oxidação da amônia.

As concentrações de nitrito no efluente tratado se mantiveram altas apenas nas primeiras três semanas de operação, onde a salinidade ainda era desprezível, a partir de então as concentrações caíram e se mantiveram abaixo de 4 mg L⁻¹, durante todas as concentrações de sal analisadas no experimento. Até mesmo na salinidade de 40 g L⁻¹ de NaCl não foi observado inibição das bactérias oxidadoras de nitrito (BON), nesta salinidade as concentrações de nitrito foram menores que 1,5 mg L⁻¹, nos dois reatores com biomassa granular aeróbia (Figura 1B). Bassin et al. (2011) e Pronk et al. (2014) relataram inibição das bactérias oxidadoras de nitrito (BON) atribuídos à inibição por concentrações salinas semelhantes as estudadas. No entanto, neste presente trabalho não foi constatado acúmulo de nitrito nos reatores.

O nitrato foi o principal composto resultante da oxidação de amônia no efluente, com concentrações de até 65 mg L⁻¹ quando a salinidade era nula. Ao analisar os resultados experimentais, pode-se notar uma redução da concentração do nitrato no efluente à medida que a salinidade foi aumentada (Figura 1B). As concentrações finais de nitrato foram de 2,8 e 8,4 mg L⁻¹.

Estudos recentes de Corsino et al. (2016) e Wang et al. (2015), mostram a possibilidade da nitrificação/desnitrificação simultânea em reatores com lodo granular aeróbio com alta salinidade em virtude das zonas anóxicas e ricas em substrato no interior do grânulo.

Beun et al. (2000) em estudo com lodo granular aeróbio em reator *airlift*, totalmente aeróbio, também observou a ocorrência de nitrificação e desnitrificação. A presença de acetatos no efluente serviu de fonte de substrato para as bactérias desnitrificantes. A concentração de substrato no efluente de alimentação e a concentração de oxigênio dissolvido na massa líquida controlam a nitrificação e desnitrificação simultânea no reator.

Mosquera-Corral et al. (2006), relacionou a remoção simultânea de amônia, nitrito, nitrato com as taxas de concentração de oxigênio dissolvido dentro do reator

de lodo granular aeróbio. A fim de otimizar a remoção de amônia de um reator granular aeróbio, os autores reduziram as concentrações de oxigênio dissolvido do reator e observaram uma queda da taxa de nitrificação e maior capacidade de desnitrificação do meio. De fato, concentrações mais baixas de oxigênio dissolvido no reator reduzem a penetração de oxigênio no grânulo, criando uma maior quantidade de ambientes anóxicos, favoráveis à desnitrificação convencional, no interior do grânulo aeróbio.

Pronk et al. (2014) não observaram problemas na oxidação de amônia ao aumentar a concentração salina de um reator aeróbio granular de 0,2 a 20 g L⁻¹ de Cl⁻; entretanto a oxidação de nitrito foi severamente afetada com a salinidade e inibida na concentração de 20 g L⁻¹ de Cl⁻.

Bassin et al. (2011) também não relataram problemas com a eficiência de remoção biológica de amônia, em um reator com lodo granular aeróbio, pelo aumento das concentrações de NaCl até 33 g L⁻¹. No entanto, a oxidação de nitrito foi prejudicada pela ação do sal, com acúmulo de nitrito em concentrações salinas a partir de 22 g L⁻¹ de NaCl.

Autores como Figueroa et al. (2008) e Moussa et al. (2006) também relataram o acúmulo de nitrito em efluente com elevadas concentrações de sal, devido a sensibilidade das bactérias oxidadoras de nitrito ao estresse salino.

Wang et al. (2015), ao estudar os efeitos da salinidade sobre o desempenho de um reator aeróbio granular observou uma leve queda da eficiência de remoção de amônia de 93% para 80% com aumento da salinidade de 0 a 40 g L⁻¹, contudo quando a salinidade foi acrescida para 80 g L⁻¹ a eficiência de remoção caiu de 80% para 21%. O aumento gradual da salinidade de 0 a 80 g L⁻¹ acarretou em um impacto na oxidação da amônia, principalmente nas concentrações de NaCl acima de 40 g L⁻¹. As concentrações de nitrito e nitrato no efluente diminuíram ao longo da formação dos grânulos, e mantiveram próximo a zero mesmo com o aumento a salinidade de 0 para 80 g L⁻¹.

A Figura 2 apresenta as concentrações de amônia, nitrito e nitrato na saída do reator R3 e a eficiência de remoção de amônia. Lembrando que o reator R3 foi operado com parâmetros típicos de lodos ativados convencional, ou seja, sem alterações no tempo de sedimentação e com biomassa floculenta. O reator R3 foi alimentado com efluente sintético sem adição de NaCl.

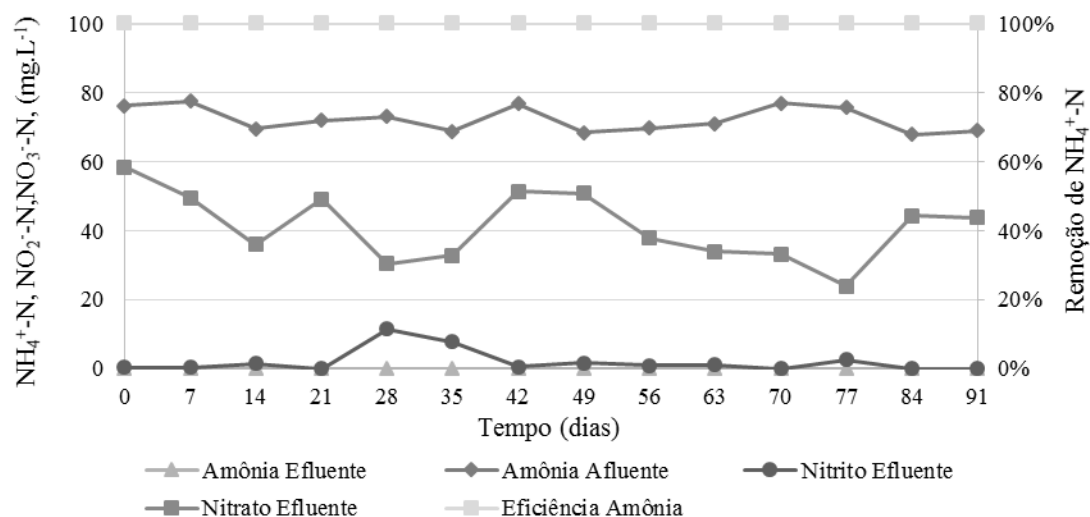


Figura 2. Concentrações de NH_4^+ , NO_2^- e NO_3^- e eficiência de remoções de NH_4^+ no reator R3, contendo biomassa floculenta.

A eficiência de remoção de amônia no reator R3 se manteve em 100% durante todo o experimento, afirmando a eficiência absoluta do reator R3 na remoção de amônia. A concentração de nitrito no efluente apresentou oscilação, entretanto manteve-se relativamente baixa, com apenas dois picos de 11,5 e 7,8 mg L^{-1} , indicando que não houve acúmulo desse composto no sistema. A concentração de nitrato na saída do reator apresentou pouca variabilidade, mantendo-se em média 41 mg L^{-1} . De forma geral, pode-se afirmar que o reator R3 operou de forma eficiente. No balanço de nitrogênio, observou-se que cerca de 30% não foi detectada nos fluxos de saída medidos, possivelmente por essa parcela ter sido assimilada pelos microrganismos presentes no sistema ou por ter sido reduzido a nitrogênio gasoso. Vale destacar que dificilmente esse balanço é perfeito, já que existem demais compostos nitrogenados que são formados nos processos intermediários a nitrificação, os quais não foram quantificados, além da proporção nitrogenada destinada ao crescimento celular (Metcalf e Eddy, 2003).

3.2 Estrutura dos Grânulos

O aumento da concentração de sal nos reatores R1 e R2 ocasionou uma mudança na morfologia do grânulo, que ficou evidente por microscopia e a olho nu. Alguns autores também observaram mudança na estrutura e no tamanho do grânulo em decorrência da variação operacional e composição do efluente (Li e Wang, 2008;

Liu e Tay, 2008; Weber et al., 2007). No início do experimento os grânulos apresentavam estrutura densa e homogênea. A partir da salinidade de 10 g L⁻¹, os grânulos começaram a diminuir de tamanho. Nas salinidades acima de 20 g L⁻¹, a quantidade de biomassa reduziu e foram observados flocos e filamentos dispersos no meio líquido e uma elevação na turbidez do sobrenadante. O aumento da salinidade afetou diretamente a concentração de sólidos no interior do reator, acarretando em perda de granulação e arraste de lodo no efluente tratado. O aumento da salinidade, além de aumentar a pressão osmótica e provocar plasmólise e desidratação dos microrganismos, promovem a desintegração das células (Wang et al., 2015; Kargi e Dinçer, 1997).

Autores como Ramos et al. (2015), Pronk et al. (2014) e Bassin et al. (2011), relataram perda da integridade dos grânulos, redução da concentração de sólidos suspensos e turbidez do efluente à medida que as concentrações de salinidade aumentavam nos reatores. Ao contrário, Li e Wang (2008) observaram melhor crescimento de grânulos sob maior salinidade, principalmente para concentrações de 50 g L⁻¹, onde os grânulos apresentaram maior tamanho e compactação. A partir das micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura foi possível observar efetivamente as variações na estrutura do grânulo (Figura 3).

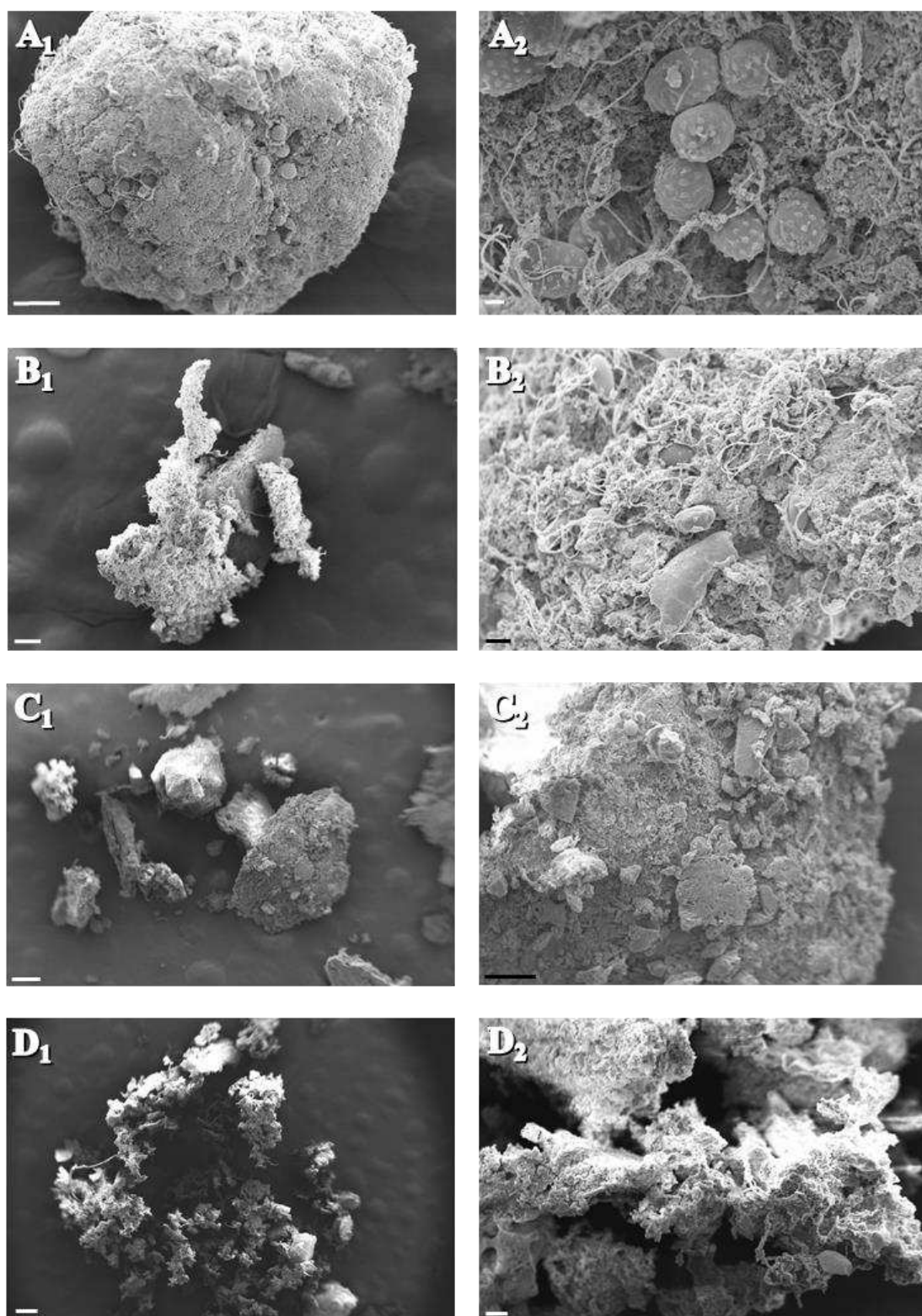


Figura 3. Micrografias eletrônicas de varredura dos grânulos em função da salinidade onde: A = 0g L⁻¹ de NaCl; B = 10g L⁻¹ de NaCl; C = 20g L⁻¹ de NaCl e D = 30g L⁻¹ de NaCl. As barras C₁ e D₁ representam 200 μm. As barras A₁, B₁ e C₂ representam 100 μm. As barras B₂ e D₂ representam 20 μm. A barra A₂ representa 10 μm.

A partir da comparação destes resultados, pode-se concluir que o acréscimo da concentração de NaCl teve impacto adverso sobre a morfologia do grânulo e consequentemente na concentração de sólidos dentro do reator. Na concentração de 0 g L⁻¹ é possível verificar a estrutura densa, lisa e integra do grânulo, a presença de esporos de fungo, bactérias, filamentos e substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (Figura 3A). Weber et al. (2007) ao analisarem a estrutura de grânulos aeróbios por meio de microscopia eletrônica de varredura, também observaram aglomerados de bactérias, EPS, protozoários e alguns fungos. Na salinidade de 10 g L⁻¹ é possível verificar fendas na superfície do grânulo, alterando sua estrutura; contudo ainda são observados EPS. Os EPS facilitam a aderência das bactérias junto ao grânulo, exercendo assim em um papel importante na formação dos grânulos (Ramos et al, 2015). Nas concentrações de 20 e 30 g L⁻¹ os grânulos começaram a se desintegrar, gerando alguns fragmentos (Figura 3C). Nas salinidades acima de 10 g L⁻¹ as quantidades de bactérias e EPS se limitaram.

De modo geral a salinidade influenciou negativamente na morfologia dos grânulos, até sua ruptura. Os sais inorgânicos podem influenciar negativamente na morfologia e propriedade dos grânulos biológicos. Elevadas concentrações salinas reduzem a quantidade de bactérias filamentosas do sistema, as quais desempenham um papel fundamental na formação e estrutura dos grânulos (Lefebvre e Moletta, 2006).

3.3 Diversidade microbiana

A composição microbiana dos grânulos nas diferentes salinidades foi acessada por meio do sequenciamento parcial do gene RNAr 16S de Bactéria e de *Archaea* pela plataforma Illumina.

O sequenciamento gerou aproximadamente 218.201 sequências cruas de bactérias (*primers* 27f/338r), com tamanho médio de 490 pares de base (pb) e, 193.647 sequências cruas de *Archaea* (*primers* 349f/534r), com tamanho médio de 275 pares de base (pb).

Após o processamento das sequências pelo programa MR DNA *analylis pipeline*, obteve-se um total de 187.491 sequências, destas 182.632 são pertencentes ao domínio Bactéria e 4.859 sequências ao domínio *Archaea* (Figura 4).

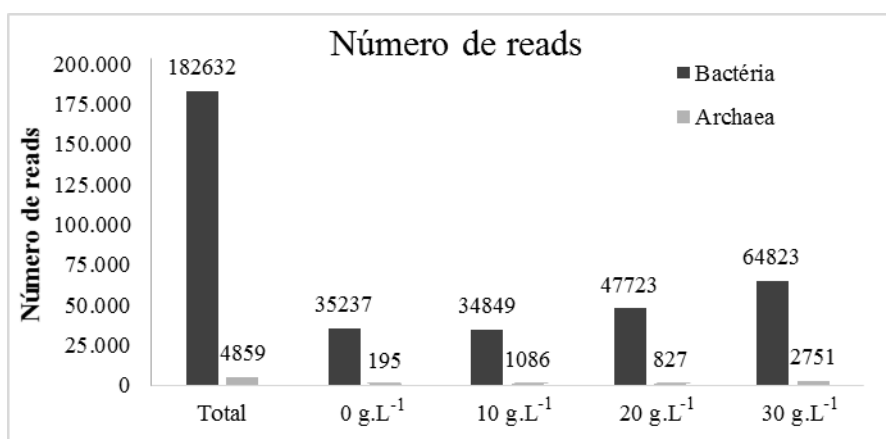


Figura 4. Número de sequências pertencentes ao Domínio Bactéria e *Archaea* nas diferentes concentrações de NaCl.

De modo geral, o número de sequências pertencentes aos dois domínios, Bactéria e *Archaea*, aumentou a medida que a concentração de NaCl foi incrementada. O aumento da abundância a partir da adição de sal pode ter relação com a origem do lodo utilizado como inóculo. Este era proveniente de uma planta industrial que operava com salinidade próxima a 55 g L⁻¹ de NaCl. Muitos microrganismos presentes nesse lodo já estavam adaptados a alta salinidade. Com a redução da concentração de sal para 0 g L⁻¹, no início do experimento, a abundância pode ter reduzido devido a mudança de ambiente, mas ao adicionar sal (na forma de NaCl), a abundância voltou a aumentar. Entretanto, quando a diversidade de espécies é calculada pelo índice de Shannon, verificamos que ela foi afetada pela salinidade, os valores encontrados reduziram de 4,14 em 0 g L⁻¹ de NaCl, para 2,56 na concentração de 30 g L⁻¹ de NaCl (Informações suplementares - Tabela S1). Provavelmente devido ao aumento da dominância de espécies a 30 g L⁻¹.

O aumento do número de sequências de *Archaea* com o acréscimo da salinidade era esperado, uma vez que o domínio *Archaea* é representado por microrganismos adaptados à ambientes extremos, com por exemplo elevadas salinidade, temperatura, acidez/alcalinidade (You et al., 2009).

Em relação ao domínio Bactéria, observou-se que as sequências foram afiliadas a 21 diferentes filos (Figura 5). O filo Proteobacteria foi o mais abundante, representando 46,9% das sequências totais, seguido dos Bacteroidetes com 28,9% e Planctomycetes com 9%. A grande maioria dos filos de Bactéria estiveram presentes durante todo o processo, exceto o Fusobacteria, Spirochaetes e Verrucomicrobia.

O número de sequências de cada filo variou ao longo do aumento da concentração salina. Alguns filios, como Chloroflexi, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Fibrobacteres, Candidatus saccharibacteria, Planctomycetes entre outros, foram afetados negativamente pelo sal e parcialmente lavados do sistema com o aumento da concentração salina para 10g L⁻¹ de NaCl. Supostamente esses filios estavam contribuindo com a granulação do lodo, uma vez que a redução do número de sequência coincidiu com a desagregação do grânulo.

Os filios Bacteroidetes, Proteobacteria e Thermotogae, que iniciaram em baixa abundância no sistema, aumentaram o número de sequências com o incremento de sal. A presença e o aumento da abundância desses filios não ajudaram a manter a estrutura granular nos reatores. Zhang et al. (2011) e Li et al. (2014) observaram que os Bacteroidetes são lavados dos sistemas de tratamento a curto tempo de sedimentação, e realmente não contribuem com a formação do grânulo.

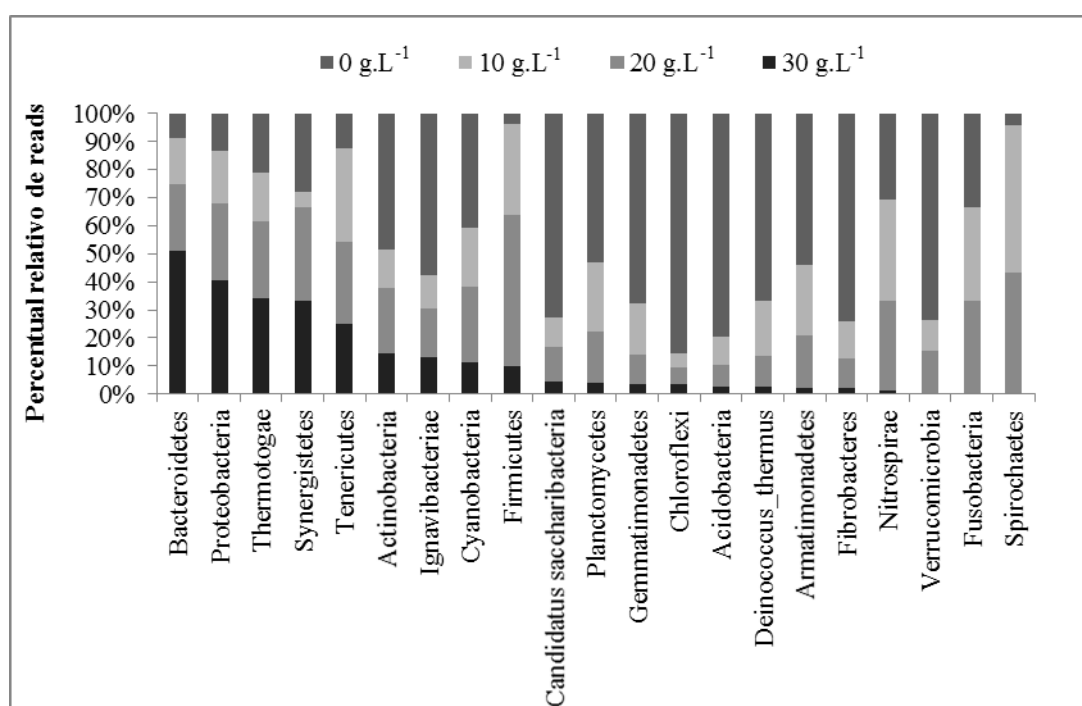


Figura 5. Porcentagem relativa de sequências afiliadas a diferentes Filos do domínio Bactéria nas diferentes salinidades.

Bassin et al, (2012) encontraram microrganismos pertencentes aos filios Proteobacteria e Bacteroidetes em flocos de dois reatores aeróbios de batelada sequencial submetidos a concentrações crescentes de sal, afirmando a resistência desses filios ao sal.

Os Planctomycetes são representados por bactérias anaeróbias oxidantes de amônia, envolvidas no processo ANAMMOX. Uma vez que o interior do grânulo forma um ambiente anaeróbio, o processo ANAMMOX tem condições de ocorrer. Até o momento, são conhecidos seis gêneros que realizam este processo, *Candidatus Brocadia* (Strous et al, 1999; Kuenen e Jetten, 2001), *Candidatus Kuenenia* (Schmid et al, 2000), *Candidatus Scalindua* (Schmid et al, 2003), *Candidatus Anammoxoglobus* (Kartal et al, 2007), *Candidatus Jettenia* (Quan et al., 2008) e *Candidatus Anammoximicrobium* (Khramenkov et al, 2013). A medida que o sal foi adicionado, os grânulos foram se desagregando e as zonas anaeróbias se restringindo, consequentemente o número de Planctomycetes diminuiu (Figura 5).

Foram observados 286 gêneros para o domínio bactéria, os mais abundantes estão apresentados na Figura 6. Os gêneros que apareceram em maior abundância foram os *Empedobacter*, seguido do *Azoarcus* e *Planctomyces*, os quais representam cerca de 20, 9 e 7% das sequências totais, respectivamente. Os gêneros *Klebsiella*, *Azoarcus*, *Denitromonas*, *Empedobacter* e *Limnobacter* aumentaram para mais de 60% quando adicionado 30 g L⁻¹ de NaCl, gêneros associados a salinidade. Alguns autores também encontraram predominância desses gêneros em ambientes com elevada concentração de NaCl, afirmando a afinidade desses pela salinidade (Cui et al., 2014; Osaka et al, 2008; Bassin et al, 2011; Vedler et al, 2013).

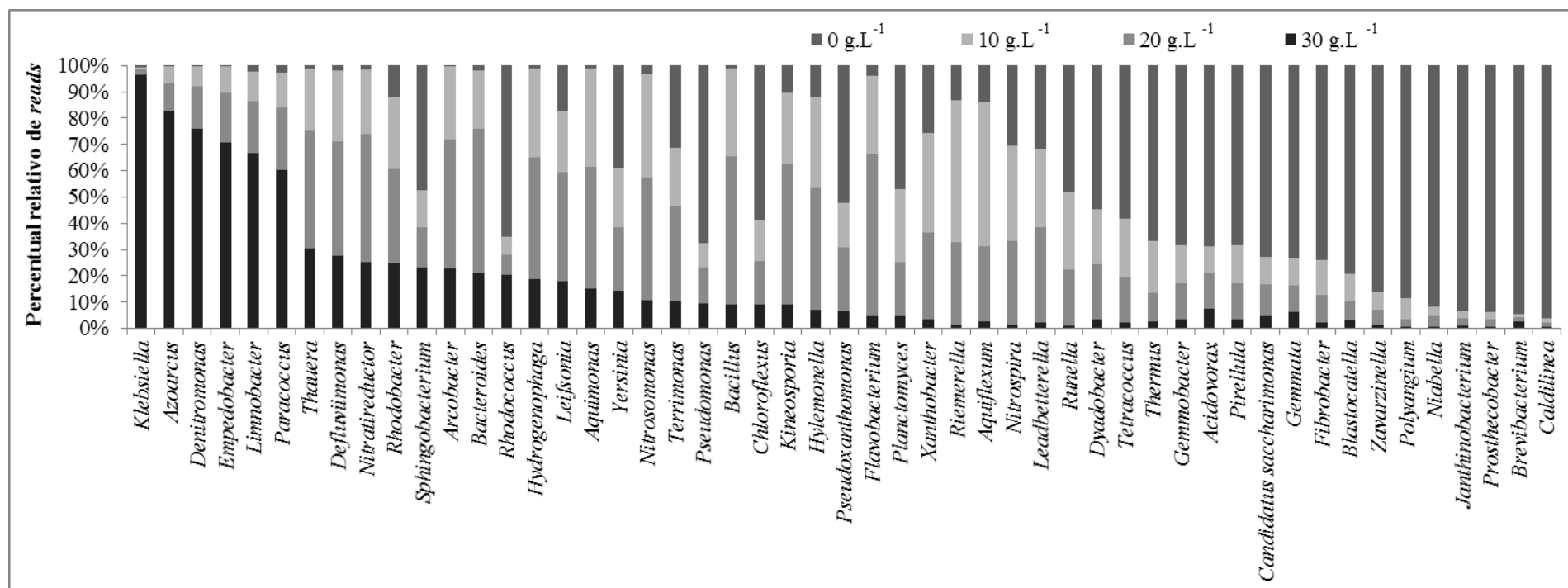


Figura 6. Porcentagem relativa de sequências afiliadas aos gêneros mais abundantes do domínio Bactéria nas diferentes salinidades.

Os gêneros *Caldilinea*, *Brevibacterium*, *Janthinobacterium*, *Prostheco bacter* e *Niabella* foram os que mais sofreram com a adição de sal, reduzindo mais de 90% de sua abundância nas condições salinas. Dada sua eminência de comunidade ao acréscimo de sal e, em consequência, a ruptura dos grânulos, pode se concluir que provavelmente esses gêneros desempenham um papel importante na formação e estabilização da estrutura granular.

Bactérias como *Thauera*, *Pseudomonas* e *Nitrospira*, responsáveis pelo processo de nitrificação-desnitrificação, foram reportadas na literatura como populações significativas em grânulos aeróbios (Li et al., 2008; Zhang et al., 2011; Li et al., 2014). As *Pseudomonas* e as *Flavobacterium* são conhecidas pela produção de polímeros extracelulares e portanto são grandes formadoras de grânulo (Gerardi, 2006; Li et al., 2014). Foi observado uma queda de 67% do número total de sequências de *Pseudomonas* ao adicionar sal no afluente, fato que coincide com o princípio da quebra dos grânulos.

Todas as sequências referentes ao domínio *Archaea* foram classificadas no filo Euryarchaeota, o qual sofreu um efeito positivo com o incremento salino. Houve um aumento da abundância junto com a expansão da concentração de NaCl, o percentual de sequências totais aumentou de 4% (0 gL⁻¹ de NaCl) para 57 % (30 gL⁻¹ de NaCl). Yi et al. (2016) também encontraram dominância desse filo em estudos da estrutura da comunidade microbiana de lodo granular anaeróbio envolvidos no processo de desnitrificação/metanogênese simultâneos. Demais autores relatam a presença desse filo em estruturas granulares aeróbias (WU et al, 2015; NELSON et al, 2011).

O Euryarchaeota é um importante filo do domínio *Archaea* e, em sua maioria, é representado por microrganismos metanogênicos. Os metanogênicos são um grupo estritamente anaeróbios, que produzem metano como produto principal catabólico e são comuns em ambientes de extremas temperaturas, salinidade e pH (LIU e WHITMAN, 2008). Foram identificados 12 gêneros deste filo, *Methanobrevibacter* foi o mais abundante, com 4.827 sequências identificadas, correspondendo por 99,3% do total de sequências obtidas. Os demais gêneros tiveram pouca relevância quando comparados com os valores do *Methanobrevibacter*, que são encontradas em ambientes extremos com elevada salinidade e temperatura (Schill et al., 1996). Verificou-se que a abundância de alguns gêneros foi influenciada negativamente pelo sal, como *Methanosaeta*, *Methanoplanus* e *Thermogynomonas* (Figura 7). A fragmentação do grânulo pode estar contribuindo com a redução de abundância dessas populações, uma vez que esses gêneros

estão associados a ambientes anaeróbios e, com a ruptura dos grânulos, as zonas anaeróbias que os abrigavam diminuíram.

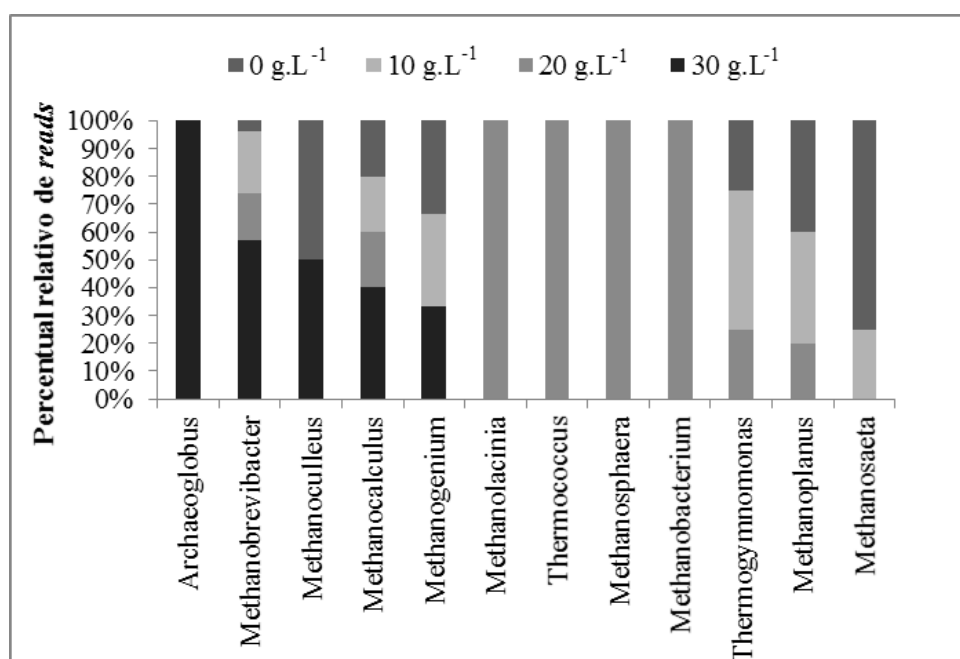


Figura 7. Porcentagem relativa de sequências afiliadas aos diferentes gêneros do domínio *Archaea* nas diferentes salinidades.

O Diagrama de Venn (Figura 8) evidencia a composição de gêneros de Bactéria e *Archaea* presentes em cada condição salina estudada. Com o diagrama foi possível constatar que a riqueza de gêneros de bactérias e *archaea* foram semelhantes em todas as salinidades. Verificou-se uma sobreposição de espécies entre as salinidades estudadas. O número de gêneros de bactérias exclusivas em cada salinidade foi maior em 0 g L⁻¹, onde houve presença de 20 gêneros, que podem estar relacionados com a formação e estabilidade do grânulo. Dos 238 gêneros de bactérias 67% foram encontrados em todas as salinidades. Os gêneros de *archaea* exclusivos em cada salinidade foram maiores na salinidade de 20 g L⁻¹ com a presença de 4 gêneros. Dos 8 gêneros de *archaea* nenhum foi comum a todas as salinidades. Os gêneros encontrados nas salinidades de 0 e 10 g L⁻¹, e na sua interação, possivelmente são os que tem relação com a estabilidade do grânulo aeróbio. Os gêneros respectivos de cada condição estão dispostos em informações suplementares (Tabelas S2 e S3).

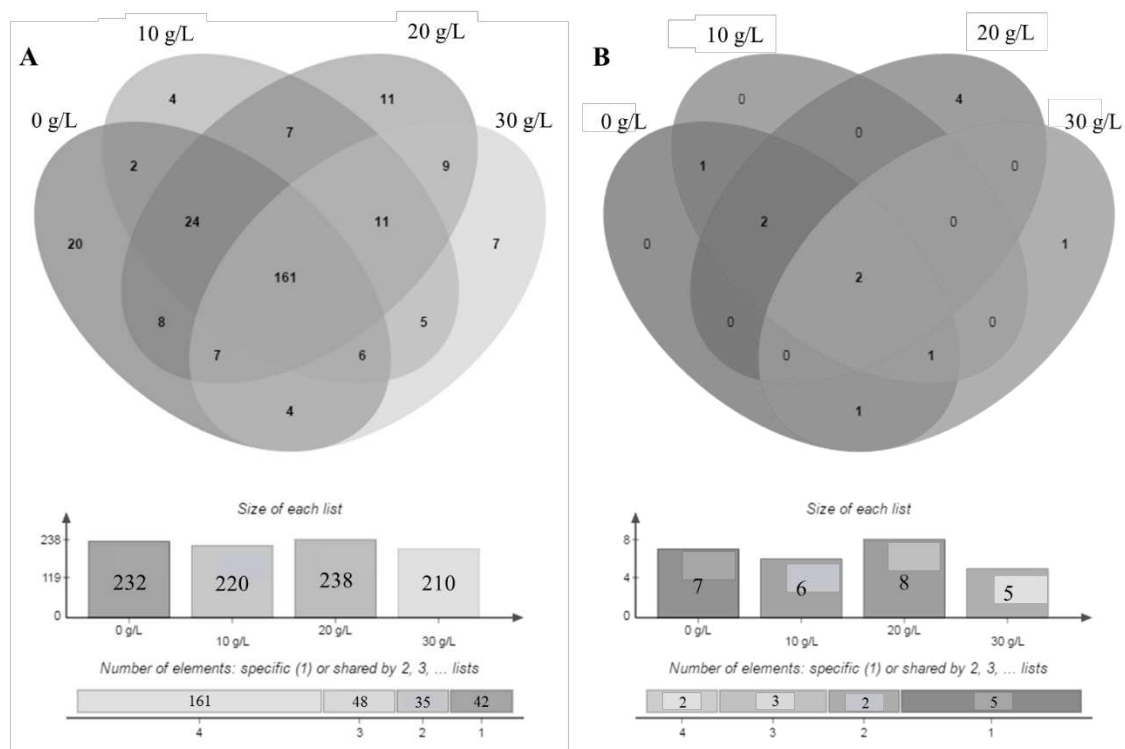


Figura 8. Diagrama de Venn comparando os gêneros de Bactéria (A) e Archaea (B) encontrados nas condições salinas estudadas.

3.4 Remoção biológica de Nitrogênio

Os dados do sequenciamento mostraram a presença de diversos gêneros associados ao processo de remoção de nitrogênio. Foram observados aqueles envolvidos na primeira etapa (oxidação da amônia a nitrito) do processo de nitrificação autotrófica, como *Nitrosomonas* e *Nitrosovibrio*, *Nitrospira* e *Nitrobacter*, envolvidos na segunda etapa (oxidação do nitrito a nitrato). As bactérias responsáveis pela primeira etapa da nitrificação foram observadas em maior número, o gênero *Nitrosomonas* foi responsável por 60,9% do total de sequências dos gêneros nitrificantes (Figura 9).

O número de sequências afiliadas a organismos nitrificantes aumentou até a concentração de 20 g L⁻¹, após este ponto foi observado uma queda brusca do número de sequências, confirmando o efeito negativo da salinidade, para os microrganismos responsáveis pelo processo de nitrificação convencional.

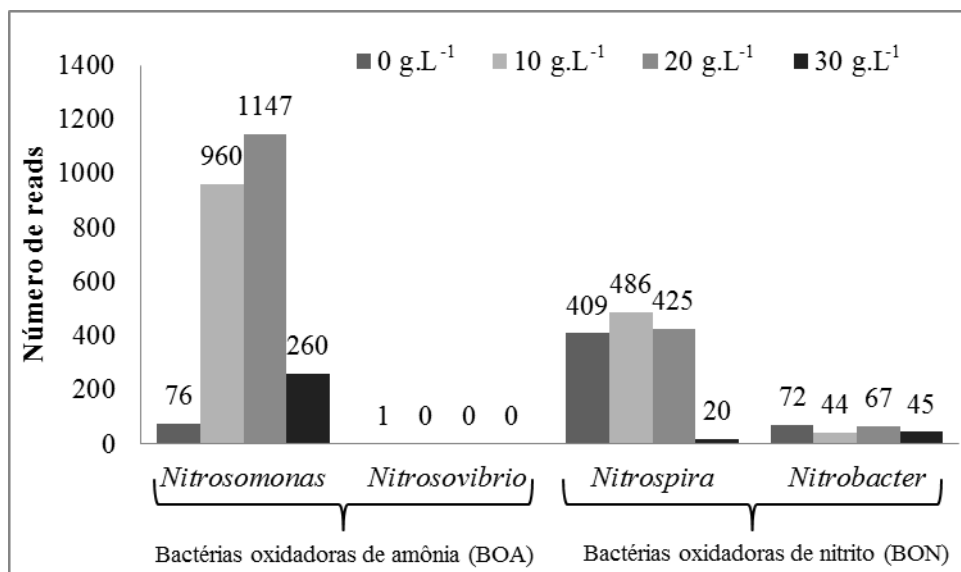


Figura 9. Número de sequências pertencentes aos gêneros envolvidos no processo de nitrificação nas diferentes salinidades.

Também foram verificados gêneros responsáveis pelo processo de desnitrificação como as *Denitromonas*, *Paracoccus*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Nitrateductor*, *Achromobacter*, *Thiobacillus*, *Azoarcus*, *Thauera*, *Alcaligenes*, *Hyphomicrobium*, *Rhodopseudomonas* e *Micrococcus* (Figura 10). Alguns desses gêneros, como as *Pseudomonas*, *Hyphomicrobium*, *Rhodopseudomonas* e *Micrococcus*, tiveram uma redução da abundância com o aumento da salinidade. Entretanto, a maioria dos gêneros foram favorecidos com o acréscimo de salinidade. O número total de sequências dos microrganismos desnitrificantes aumentou com o acréscimo de sal, chegando a 57,8% do total de sequências na concentração de NaCl de 30 g L⁻¹.

Esses resultados corroboram com os resultados de remoção de nitrato dos reatores biológicos, já que a eficiência de remoção de nitrato aumentou com o acréscimo salino.

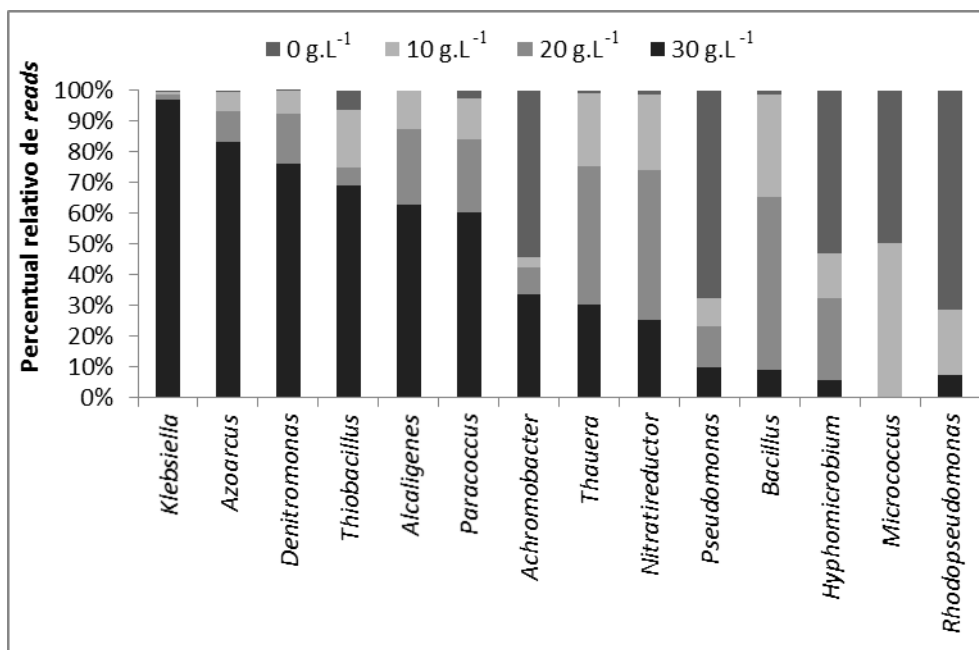


Figura 10. Percentual relativo de seqüências pertencentes aos gêneros envolvidos no processo de desnitrificação nas diferentes salinidades.

Foi identificado um gênero responsável pelo processo ANAMMOX, o *Candidatus kuenenia*. Este foi representado por 6 seqüências, sendo 3 a 0g L⁻¹ de NaCl, 2 a 10g L⁻¹ de NaCl e 4 seqüências na concentração de 30g L⁻¹ de NaCl.

Gêneros relacionados com a nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia também foram observados (Figura 11), um total de 15.799 seqüências entre os seguintes microrganismos potencialmente nitrificantes heterotróficos, *Paracoccus sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Alcaligenes sp.* e *Aeromonas sp.*. O gênero *Bacillus sp.* foi o mais abundante, representando 65% das seqüências totais.

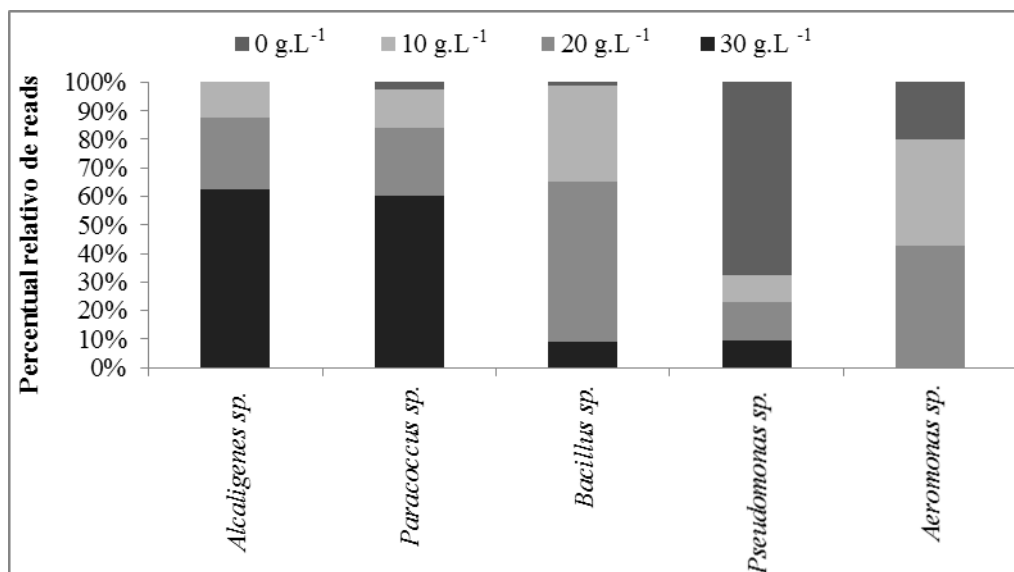


Figura 11. Percentual relativo de sequências pertencentes aos gêneros envolvidos no processo de nitrificação heterotrófica nas diferentes salinidades.

Os gêneros correlacionados com a nitrificação heterotrófica aumentaram sua abundância com o incremento da concentração de NaCl, exceto para *Pseudomonas sp.*.

A remoção de nitrogênio pode não estar ocorrendo apenas por um grupo restrito de microrganismos e sim por diferentes grupos e vias de remoção. Os resultados do sequenciamento estão de acordo com o que foi observado nos reatores biológicos, uma vez que os microrganismos responsáveis pela oxidação de amônia diminuíram com a salinidade, enquanto que os responsáveis pela redução de nitrato aumentaram.

4. CONCLUSÕES

A remoção de amônia se manteve eficiente em todas as salinidades avaliadas.

O aumento da concentração de sal prejudicou alguns microrganismos que auxiliam no processo de granulação, resultando na fragmentação do grânulo. Nas salinidades acima de 10 g L⁻¹ os grânulos reduziram consideravelmente de tamanho, prejudicando a sedimentação.

Não houve acúmulo de nitrito e nitrato no sistema, sugerindo a ocorrência de nitrificação/desnitrificação simultânea.

Os resultados demonstraram que diversos microrganismos estão comprometidos com a remoção de amônia, desde aqueles envolvidos no processo de nitrificação e

desnitrificação convencional, ANAMMOX e nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA - American Public Health Association. (1998) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed. American Public Health Association, Washington, DC, USA.

Bassin, J. P., Kleerebezem, R., Muyzer, G., Rosado, A. S., van Loosdrecht, M. C. M., Dezotti, M. (2012) Effect of different salt adaptation strategies on the microbial diversity, activity, and settling of nitrifying sludge in sequencing batch reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93, 1281-1294.

Bassin, J. P., Pronk, M., Muyzer, G., Kleerebezem, R., Dezotti, M., van Loosdrecht, M. C. M. (2011) Effect of elevated salt concentrations on the aerobic granular sludge process: linking microbial activity with microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(22), 7942-7953.

Beun, J. J., Heijnen, J. J., van Loosdrecht, M. C. M. (2001) N-removal in a granular sludge sequencing batch airlift reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 75(1), 82-92.

Campos, J. L., Garrido, J. M. Mosquera-Corral, A., Méndez, R. (2007) Stability of a nitrifying activated sludge reactor. *Biochem. Eng. J.*, 35, 87-92.

Corsino, S. F., Campo, R., Bella, G. D., Torredrossa, M., Viviani, G. (2015) Cultivation of granular sludge with hypersaline oily wastewater. *Int. Biodeterioration Biodegrad.*, 105, 192-202.

Cui, D., Li, G., Zhao, M., Han, S. Decolourization of azo dyes by a newly isolated *Klebsiella* sp. strain Y3, and effects of various factors on biodegradation. *Biotechnol. Biotechnol Equip.*, 28(3), 478-486.

Dias, R. S. (2014) Controle de biofilmes em membranas de osmose inversa através de bacteriófagos. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa-MG.

Figuerola, M., Mosquera-Corral, A., Campos, J. L., Mendez, R. (2008) Treatment of saline wastewater in SBR aerobic granular reactors. *Water Sci. Technol.*, 58(2), 479-485.

Gao, D., Liu, L., Liang, H., Wu, W. M. (2011) Aerobic granular sludge: characterization, mechanism of granulation and application to wastewater treatment. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 31(2), 137-152.

Gerardi, M. H. (2006) *Wastewater Bacteria*. Vol. 5, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA.

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

Kargi, F., Dinçer, A. R. (1997) Biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 69(2), 167-172.

Kartal, B., Rattray, J., van Niftrik, L. A., van de Vossenberg, J. L., Schmid, M. C., Fuerst, J. A., Sinninghe Damsté, J., Jetten, M. S. M., Strous, M. (2007) Candidatus ‘*Anammoxoglobus propionicus*’ a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, 30, 39-49.

Khramenkov, S. V., Kozlova, M. N., Kevbrina, M. V., Dorofeev, A. G., Kazakova, E. A., Grachev, V. A., Kuznetsov, B. B., Polyakov, D. Y., Nikolaev, Y. A. (2013) A novel bacterium carrying out anaerobic ammonium oxidation in a reactor for biological treatment of the filtrate of wastewater fermented sludge. *Microbiology (Moscow)*, 82(5), 628–636.

Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M. (2001) Extraordinary anaerobic ammonium oxidising bacteria. *ASM News*, 67, 456-463.

Lefebvre, O., Moletta R. (2006) Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: a literature review. *Water Res.*, 40(20), 3671-3682.

Li, A., Yang, S., Li, X., Gu, J. (2008) Microbial population dynamics during aerobic sludge granulation at different organic loading rates. *Water Res.*, 42(13), 3552-3560.

Li, J., Ding, L., Cai, A., Huang, G., Horn, H. (2014) Aerobic sludge granulation in full-scale sequencing batch reactor. *Biomed. Res. Int.*, 2014.

Li, X. M., Yang, G. J., Yang, Q., Zeng, G. M., Liao, D. X., Hu, M. F., Wu, Y. M. (2005) Simultaneous phosphorus and nitrogen removal by aerobic granular sludge in single SBR system. In: *Aerobic Granular Sludge. Water and Environmental Management Series*, IWA Publishing. Munich, 71-78.

Li, Z. H., Wang, X. C. (2008) Effects of salinity on the morphological characteristics of aerobic granules. *Water Sci. Technol.*, 58(12), 2421-2426.

Li-Long, Y., Yu, L., Yuan, R., Ying, Z. (2014) Analysis of the characteristics of short-cut nitrifying granular sludge and pollutant removal processes in a sequencing batch reactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 37(2), 125–132.

Liu, Y., Tay, J. H. (2004) State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Bioechnol. Adv.*, 22, 533-563.

Liu, Y., Whitman, W. (2008) Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic *archaea*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1125, 171-189.

Lochmatter, S., Maillard, J., Holliger, C. (2014) Nitrogen removal over nitrite by aeration control in aerobic granular sludge sequencing batch reactors, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 11(7), 6955-6978.

Metcalf and Eddy. *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, Reuse*. 4th ed. McGraw- Hill; New York. 2003.

Moussa, M. S., Sumanasekera, D. U., Irahim, S. H., Lubberding, H. J., Hooijmans, C. M., Gijzen, H. J., van Loosdrecht, M. C. M. (2006) Long term effects of salt on activity, population structure and floc characteristics in enriched bacterial cultures of nitrifiers. *Water Res.*, 40(7), 1377-1388.

Mulder, A.; van de Graaf, A. A., Robertson, L. A., Kuenen, J.G. (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 16(3), 177-183.

Nelson, M. C., Morrison, M., Yu, Z. (2011) A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. *Bioresour. Technol.*, 102, 3730-3739.

Osaka, T., Shirotani, K., Yoshie, S., Tsuneda, S. (2008) Effects of carbon source on denitrification efficiency and microbial community structure in a saline wastewater treatment process. *Water Res.*, 42(14), 3709-3718.

Panswad, T., Anan, C. (1999) Impact of high chloride wastewater on an anaerobic/anoxic/aerobic process with and without inoculation of chloride acclimated seeds. *Water Res.*, 33(5), 1165-1172.

Pochana, K., Keller, J. (1999) Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND). *Water Sci. and Technol.*, 39(6), 61-68.

Pronk, M. A., Bassin, J. P., Kreuk, M. K., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M. C. M. (2014) Evaluating the main and side effects of high salinity on aerobic granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98(3), 1339-1348.

Quan, Z. X., Rhee, S. K., Zuo, J. E., Yang, Y., Bae, J. W., Park, J. R., Lee, S. T., Park Y. H. (2008) Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge

anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor. *Environ. Microbiol.*, 10(11), 3130-3139.

Ramos, C., Ojeda, M. E. S., Carrera, J. (2015) Long-term impact of salinity on the performance and microbial population of an aerobic granular reactor treating a high-strength aromatic wastewater. *Bioresour. Technol.*, 198, 8844-851.

Robertson, L. A., Kuenen, J. G. (1988) Heterotrophic nitrification in *Thiosphaera pantotropha* – oxygen uptake and enzyme studies. *J. Gen. Microbiol.*, 134, 857-863.

Schmid, M.; Twachtmann, U.; Klein, M.; Strous, M.; Juretschko, S.; Jetten, M.; Metzger, J. W.; Schleifer, K. H.; Wagner, M. (2000) Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Syst. Appl. Microbiol.*, 23, 93-106.

Schmid, M., Walsh, K., Webb, R., Irene, W., Rijpstra, C., van de Pas-Schoonen, K., Verbruggen, M. J., Hill, T., Moffett, B., Fuerst, J., Schouten, S., Sinninghe Damsté, J. S., Harris, J., Shaw, P., Jetten, M., Strous, M. (2003) *Candidatus 'Scalindua brodae'*, sp nov., *Candidatus 'Scalindua wagneri'*, sp nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, 26, 529–538.

Silva, C. C., Jeus, E. C., Torres, A. P. R., Sousa, M. P., Santiago, V. M. J., Oliveira, V. M. (2010) Investigation of bacterial diversity in membrane bioreactor and conventional activated sludge processes from petroleum refineries using phylogenetic and statistical approaches. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20(3), 447-459.

Strous, M., Fuerst, J. A., Kramer, E. H. M., Logemann, S., Muyzer, G., van De Pas-Schoonen, K. T., Weeb, R., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M. (1999) Missing lithotroph identified as new Planctomycete. *Nature*, 400, 446-449.

Strous, M., van Gerven, E., Kuenen, J. G., Jetten, M. (1997) Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(6), 2446-2448.

van Den Akker, B., Reid, K., Middlemiss, K., Krampe, J. (2015) Evaluation of granular sludge for secondary treatment of saline municipal sewage. *J. Environ. Manage.*, 157, 139-145.

van Niel, E. W. J., Braber, K. J., Robertson, L. A., Kuenen, J. G. (1992) Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Alcaligenes faecalis* strain TUD. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 62, 231-237.

Vedler, E., Heinaru, E., Jutkina, J., Viggor, S., Koressaar, T. (2013) *Limnobacter* spp. as newly detected phenol-degraders among Baltic Sea surface water bacteria

characterised by comparative analysis of catabolic genes. Syst. Appl. Microbiol., 36(8), 525-532.

Ventosa, A., Nieto, J. J., Oren, A. (1998) Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62(2), 504-544.

Wang, F., Lu, S., Wei, Y., Ji, M. (2009) Characteristics of aerobic granule and nitrogen and phosphorus removal in a SBR. J. Hazard. Mater., 164(2-3), 1223-1227.

Wang, Z., Gao, M., She, Z., Wang, S., Jin, C., Zhao, Y., Yang, S., Guo, L. (2015) Effects of salinity on performance, extracellular polymeric substances and microbial community of an aerobic granular sequencing batch reactor. Sep. Purif. Technol., 144, 223-231.

Weber, S. D., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Fried, J. (2007) Microbial composition and structure of aerobic granular sewage biofilms. Appl. Environ. Microbiol., 73(19), 6233-6240.

Wu, S., Dang, Y., Qiu, B., Liu, Z., Sun, D. (2015) Effective treatment of fermentation wastewater containing high concentration of sulfate by two-stage expanded granular sludge bed reactors. Int. Biodeterior. Biodegrad., 104, 15-20.

Yang, S. F., Liu, Y., Tay, J. (2003) H. A novel granular sludge sequencing batch reactor for removal of organic and nitrogen from wastewater. J. Biotechnol., 106(1), 77-86.

Yi, X .H., Wan, J., Ma, T., Wang, Y. (2016) Characteristics and dominant microbial community structure of granular sludge under the simultaneous denitrification and methanogenesis process. Biochem. Eng. J., 107, 66-74.

You, J., Das, A., Dolan, E. M., Hu, Z. (2009) Ammonia-oxidizing *archaea* in nitrogen removal. Water Res., 43(7), 1801-1809.

Zhang, B., Ji. M., Qiu, Z., Liu, H., Wang, J., Li, J. (2011) Microbial population dynamics during sludge granulation in an anaerobic-aerobic biological phosphorus removal system. Bioresour. Technol., 102(3), 2474-2480.

INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES

Tabela S1. Índices de diversidade microbiana de procariotos nas diferentes concentrações de sal.

Amostra	OTUs total	Chao 1	Shannon	Berger-Parker	Cobertura %
0 g/L	603	728	4,138	0,1299	82,8
10 g/L	660	809,4	3,912	0,0954	81,5
20 g/L	734	841,9	3,814	0,1188	87,2
30 g/L	598	799,1	2,555	0,378	74,8

Tabela S2. Gêneros de bactérias presentes em cada condição salina estudada, segundo Diagrama de Venn.

Concentração de NaCl	Gêneros de bactérias
0 g L ⁻¹	<i>Prevotella</i> , <i>Aetherobacter</i> , <i>Desulfocaldus</i> , <i>Ferruginibacter</i> , <i>Saccharibacter</i> , <i>Brachybacterium</i> , <i>Cloacibacterium</i> , <i>Gelria</i> , <i>Geothermobacter</i> , <i>Succinivibrio</i> , <i>Niastella</i> , <i>Blastopirellula</i> , <i>Cytophaga</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Thermovirga</i> , <i>Caminicella</i> , <i>Cryocola</i> , <i>Celeribacter</i> , <i>Nitrosovibrio</i> , <i>Desulfuromonas</i>
10 g L ⁻¹	<i>Mariniphaga</i> , <i>Geodermatophilus</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Fervidobacterium</i>
20 g L ⁻¹	<i>Desulfomicrobium</i> , <i>Sulfurospirillum</i> , <i>Desulfotignum</i> , <i>Ktedonobacter</i> , <i>Meniscus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Acidaminococcus</i> , <i>Thiomicrospira</i> , <i>Francisella</i> , <i>Oleomonas</i> , <i>Pseudorhodoferax</i>
30 g L ⁻¹	<i>Sporichthya</i> , <i>Parvibaculum</i> , <i>Pseudanabaena</i> , <i>Candidatus odysella</i> , <i>Paludibacter</i> , <i>Acidaminobacter</i> , <i>Desulfofaba</i>
0 g L ⁻¹ /10 g L ⁻¹	<i>Labrys</i> , <i>Micrococcus</i>
0 g L ⁻¹ /20 g L ⁻¹	<i>Wolinella</i> , <i>Luteimonas</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Chthoniobacter</i> , <i>Ilumatobacter</i> , <i>Phycococcus</i> , <i>Aquaspirillum</i> , <i>Oceanobacillus</i>
0 g L ⁻¹ /30 g L ⁻¹	<i>Ruminococcus</i> , <i>Sorangium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Herbaspirillum</i>
10 g L ⁻¹ /20 g L ⁻¹	<i>Roseomonas</i> , <i>Tyzzera</i> , <i>Hyphomonas</i> , <i>Sphaerochaeta</i> , <i>Stella</i> , <i>Candidatus competibacter</i> , <i>Succinispira</i>
10 g L ⁻¹ /30 g L ⁻¹	<i>Aminobacter</i> , <i>Lautropia</i> , <i>Dechloromonas</i> , <i>Thermoanaerobacter</i> , <i>Dongia</i>
20 g L ⁻¹ /30 g L ⁻¹	<i>Dysgonomonas</i> , <i>Inquilinus</i> , <i>Magnetospirillum</i> , <i>Rhodovulum</i> , <i>Sedimentibacter</i> , <i>Rhodoblastus</i> , <i>Marteella</i> , <i>Azovibrio</i> , <i>Marinobacter</i>
0 g L ⁻¹ /10 g L ⁻¹ /20 g L ⁻¹	<i>Phyllobacterium</i> , <i>Opitutus</i> , <i>Afipia</i> , <i>Schlesneria</i> , <i>Labilithrix</i> , <i>Rhodomicrobium</i> , <i>Variovorax</i> , <i>Curvibacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Thermomonas</i> , <i>Ferrovum</i> , <i>Sinorhizobium</i> , <i>Chelativorans</i> , <i>Lysobacter</i> , <i>Kaistia</i> , <i>Pedosphaera</i> , <i>Altererythrobacter</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Methylobacterium</i> , <i>Novispirillum</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Thiorhodospira</i> , <i>Spirochaeta</i> , <i>Levilina</i>
0 g L ⁻¹ /10 g L ⁻¹ /30 g L ⁻¹	<i>Longilinea</i> , <i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Candidatus kuenenia</i> , <i>Sphingosinicella</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Methylocystis</i>
0 g L ⁻¹ /20 g L ⁻¹ /30 g L ⁻¹	<i>Aciditerrimonas</i> , <i>Cupriavidus</i> , <i>Bauldia</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Ralstonia</i> , <i>Kosmotoga</i> , <i>Anaerobaculum</i>
10 g L ⁻¹ /20 g L ⁻¹ /30 g L ⁻¹	<i>Thermanaerotherix</i> , <i>Shewanella</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Erythrobacter</i> , <i>Planifilum</i> , <i>Gelidibacter</i> , <i>Leptothrix</i> , <i>Amaricoccus</i> , <i>Nesiotobacter</i> , <i>Magnetococcus</i> , <i>Halothermothrix</i>
0 g L ⁻¹ /10 g L ⁻¹ /20 g L ⁻¹ /30 g L ⁻¹	<i>Planctomyces</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Caldilinea</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Zavarzinella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Fibrobacter</i> , <i>Niabella</i> , <i>Rhodobacter</i> , <i>Janthinobacterium</i> , <i>Thermus</i> , <i>Prostheobacter</i> , <i>Leadbetterella</i> , <i>Runella</i> , <i>Pirellula</i> , <i>Candidatus saccharimonas</i> , <i>Pseudoxanthomonas</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Sphingobacterium</i> , <i>Riemerella</i> , <i>Gemmobacter</i> , <i>Nitrospira</i> , <i>Tetracoccus</i> , <i>Gemmata</i> , <i>Terrimonas</i> , <i>Polyangium</i> , <i>Acidovorax</i> , <i>Chloroflexus</i> , <i>Dyadobacter</i> , <i>Blastocatella</i> , <i>Leifsonia</i> , <i>Aeromicrobium</i> , <i>Empedobacter</i> , <i>Pseudolabrys</i> , <i>Dokdonella</i> , <i>Devosia</i> , <i>Hylemonella</i> , <i>Sphaerobacter</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Xanthobacter</i> , <i>Aquiflexum</i> , <i>Gordonia</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Isosphaera</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Defluviimonas</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Kineosporia</i> , <i>Pseudacidovorax</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Reyranella</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Verrucomicrobium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Prosthecomicrobium</i> , <i>Azoarcus</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Nitrosomonas</i> , <i>Chitinophaga</i> , <i>Nitrobacter</i> , <i>Fimbriimonas</i> , <i>Ignavibacterium</i> , <i>Hyphomicrobium</i> , <i>Parabacteroides</i> , <i>Bosea</i> , <i>Oceanotoga</i> , <i>Ohtaekwangia</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Shinella</i> , <i>Phenylobacterium</i> , <i>Xenophilus</i> , <i>Denitromonas</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Dexia</i> , <i>Fluviicola</i> , <i>Ochrobactrum</i> , <i>Proteiniphilum</i> , <i>Singulisphaera</i> , <i>Arcobacter</i> , <i>Chryseobacterium</i> , <i>Spirulina</i> , <i>Sediminibacterium</i> , <i>Candidatus aquiluna</i> , <i>Petrogla</i> , <i>Delftia</i>

Methylocella, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas*,
Aquimonas, *Sphingopyxis*, *Bellilinea*, *Haematobacter*,
Mycobacterium, *Nordella*, *Gemmatimonas*, *Achromobacter*,
Ideonella, *Beijerinckia*, *Limnobacter*, *Clostridiisalibacter*,
Methylosinus, *Diaphorobacter*, *Hydrogenophaga*, *Propionicimonas*,
Gaiella, *Phascolarctobacterium*, *Acetobacterium*, *Anabaena*,
Rhizobium, *Bacteroides*, *Thauera*, *Flexibacter*, *Bradyrhizobium*,
Sphingobium, *Nitratireductor*, *Enterobacter*, *Marinobacterium*,
Methylibium, *Pseudoruegeria*, *Ectothiorhodospira*, *Armatimonas*,
Leucobacter, *Desulfococcus*, *Mesotoga*, *Rhodoplanes*, *Iamia*,
Steroidobacter, *Conexibacter*, *Aquamicrobium*, *Fusibacter*,
Tindallia, *Halanaerobium*, *Bdellovibrio*, *Nocardioides*, *Rhodocyclus*,
Raoultella, *Petrimonas*, *Lewinella*, *Acholeplasma*, *Synergistes*,
Trichococcus, *Klebsiella*, *Paenirhodobacter*, *Zoogloea*, *Cronobacter*,
Methyloversatilis, *Geotoga*, *Anaerophaga*, *Burkholderia*, *Thioclava*,
Sanguibacter, *Thiobacillus*, *Croceobacterium*, *Geobacter*,
Cryobacterium, *Algisphaera*, *Anaerofilum*, *Pelobacter*, *Candidatus*,
Microthrix

Tabela S3. Gêneros de *archaeas* presentes em cada condição salina estudada, segundo Diagrama de Venn.

Concentração de NaCl	Gêneros de <i>archaeas</i>
20 g L ⁻¹	<i>Methanobacterium</i> , <i>Methanolacinia</i> <i>Methanosphaera</i> , <i>Thermococcus</i> ,
30 g L ⁻¹	<i>Archaeoglobus</i>
0 g L ⁻¹ /10 g L ⁻¹	<i>Methanosaeta</i>
0 g L ⁻¹ /30 g L ⁻¹	<i>Methanoculleus</i>
0 g L ⁻¹ /10 g L ⁻¹ /20 g L ⁻¹	<i>Thermogymnomonas</i> , <i>Methanoplanus</i>
0 g L ⁻¹ /10 g L ⁻¹ / 30 g L ⁻¹	<i>Methanogenium</i>
0 g L ⁻¹ /10 g L ⁻¹ /20 g L ⁻¹ /30 g L ⁻¹	<i>Methanobrevibacter</i> , <i>Methanocalculus</i>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente tese buscou estudar os efeitos da salinidade sobre a remoção biológica de amônia em efluentes salinos provenientes da extração de petróleo e determinar a diversidade da comunidade microbiana envolvida no processo.

O primeiro capítulo realizou-se uma revisão bibliográfica atualizada sobre o assunto. O artigo apresentado no Capítulo 2, avaliou-se os efeitos do sal sobre a remoção biológica de nitrogênio, sobretudo na forma de amônia, de águas de produção de petróleo. Os resultados mostraram a excelente capacidade do sistema em remover completamente a amônia, em concentrações de NaCl de até 100 g L⁻¹. Concentrações acima de 125 gNaCl L⁻¹ provocaram inibição completa dos microrganismos responsáveis pelo processo de remoção de amônia.

Com o intuito de compreender melhor o perfil da comunidade microbiana de bactérias e *archaeas* envolvida no processo de remoção de amônia em águas de produção de petróleo com alta salinidade, o artigo apresentado no Capítulo 3 determinou a diversidade microbiana e seu comportamento quanto às diferentes concentrações de NaCl. Foi observado um aumento da população de *archaea* com o acréscimo de sal e ao concomitantemente houve uma redução no número de bactérias. A partir dos dados do sequenciamento massivo do gene rRNA 16S, foi possível observar que a remoção de amônia no reator foi realizada por diferentes grupos de microrganismos, bactérias e *archaeas* oxidantes de amônia, microrganismos ANAMMOX e potenciais nitrificantes heterotróficos.

Buscando-se melhorar ainda mais eficiência de remoção biológica de amônia em altas salinidades, o trabalho do Capítulo 4 avaliou a viabilidade técnica da utilização do processo de lodo granular aeróbio em efluentes salinos. Dessa forma, foram investigados os efeitos do aumento da salinidade sobre a remoção de amônia e sobre a estrutura e diversidade microbiana do grânulo aeróbio. A remoção de amônia, nesse sistema, se manteve eficiente em todas as salinidades avaliadas. Contudo, o aumento da concentração de sal prejudicou sobremaneira a manutenção dos grânulos aeróbios. Possivelmente houve um efeito negativo aos microrganismos que auxiliam no processo de granulação, resultando na fragmentação do grânulo. Nas salinidades acima de 10 g L⁻¹ os grânulos reduziram-se consideravelmente de tamanho, prejudicando a sua sedimentação. Nos experimentos com grânulos aeróbios, constatou-se baixas concentrações de nitrito e nitrato na saída do sistema, sugerindo que estava ocorrendo os processos de nitrificação

e desnitrificação simultaneamente. Os resultados demonstraram que diversos microrganismos estão comprometidos com a remoção de amônia, desde aqueles envolvidos no processo de nitrificação e desnitrificação convencional, ANAMMOX e nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia. Apesar das vantagens da tecnologia de granulação aeróbia e sua eficiência quanto a remoção de amônia, sua aplicação em ambientes salinos não apresentou grandes benefícios, uma vez que a salinidade interferiu na estrutura física do grânulo.