

JOÃO VICTOR SOARES BARCELOS ROCHA

**NITRIFICAÇÃO HETEROTRÓFICA E DESNITRIFICAÇÃO AERÓBICA PARA
REMOÇÃO DE NITROGÊNIO AMONIACAL EM CONDIÇÕES DE ALTA
SALINIDADE**

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

Orientador: Cynthia Canêdo da Silva

Coorientadores: Larissa Quartaroli
Sergio Oliveira de Paula

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

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

T

R672n
2021
Rocha, João Victor Soares Barcelos, 1996-
Nitrificação heterotrófica e desnitrificação aeróbica para
remoção de nitrogênio amoniacal em condições de alta
salinidade / João Victor Soares Barcelos Rocha. – Viçosa, MG,
2021.

1 dissertação eletrônica (50 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Cynthia Canêdo da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2021.

Referências bibliográficas: f. 43-50.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.138>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Genética molecular. 2. Genes de RNAr. 3. Reação em
cadeia de polimerase. 4. Citometria de fluxo. I. Silva, Cynthia
Canêdo da, 1978-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 576.0282

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

JOÃO VICTOR SOARES BARCELOS ROCHA

NITRIFICAÇÃO HETEROTRÓFICA E DENITRIFICAÇÃO AERÓBICA PARA
REMOÇÃO DE NITROGÊNIO AMONÍACAL EM CONDIÇÕES DE ALTA
SALINIDADE

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

APROVADA: 08 de setembro de 2021

Assentimento:


João Victor Soares Barcelos Rocha
Autor


Cynthia Cândido da Silva
Orientadora

*A **Deus**, por me conceder força e perseverança.
Ao meu avô **Sebastião Lopes de Barcelos** por todos os
ensinamentos e por todo carinho para comigo.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Santa Rita de Cássia por todo o amparo durante mais esta caminhada que se encerra após dois anos e meio.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Departamento de Microbiologia Agrícola, por todo subsidio e por toda contribuição necessária para a minha formação profissional dentro do programa.

Aos integrantes do LAMAP por todo o apoio e companheirismos durante todos estes anos.

Em especial à Larissa Quartarolli, por toda orientação e ensinamentos transmitidos durante estes dois anos e meio de mestrado, por toda paciência e companheirismos durante toda esta jornada.

À Lívia Carneiro Fidélis Silva, por todo carinho e por toda valiosa ajuda prestada nos momentos de dificuldade, pelos diversos incentivos de grande importância durante todo este período.

À Deborah Romaskevis, por todo seu auxílio e pelos inúmeros momentos de descontração que aliviavam e muito os momentos de dificuldade.

À Helena Santiago Lima por todo apoio e ensinamentos durante a realização análises e por ser uma grande amiga.

Aos companheiros Allan Emanuel e Alex Gazolla, por toda amizade, ensinamentos e assistência prestada durante estes anos.

Aos meus professores Shamoel Evangelista e Carlos Lopes por toda amizade, incentivo e inúmeras cobranças que sempre me incentivaram a melhorar cada vez mais.

À Leonardo de Souza, Romeu Robson e Rafael Marques por sempre estarem presentes nos momentos de dificuldade.

À Bruna Leão e Tiago Guedes por toda amizade e por todo carinho para comigo durante todos estes anos.

Aos meus familiares em especial as minhas tias Maria da Consolação Rocha e Maria das Graças por todo auxílio incondicional prestado durante toda a minha vivencia em Viçosa.

À minha orientadora Cynthia Canêdo, pelos ensinamentos e pela oportunidade de desenvolver este trabalho ao seu lado.

Agradeço também pelo apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

ROCHA, João Victor Soares Barcelos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2021. **Nitrificação heterotrófica e desnitrificação aeróbica para remoção de nitrogênio amoniacal em condições de alta salinidade.** Orientadora: Cynthia Canedo da Silva. Coorientadores: Larissa Quartaroli e Sergio Oliveira de Paula.

A água de produção proveniente do processo de extração de petróleo contém além de outros poluentes, elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal. O descarte inadequado desse efluente pode desencadear sérios danos ambientais incluindo a eutrofização em ambientes aquáticos, assim o tratamento biológico tem sido uma das melhores alternativas para remoção biológica de nitrogênio amoniacal (NH_4^+) de efluentes. A remoção de NH_4^+ pode ocorrer por diferentes vias e uma delas é a nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia (NH/DA), onde um único microrganismo heterotrófico é capaz de realizar, em aerobiose, a remoção de amônia, o que representa vantagens operacionais na área de tratamento de efluentes. Entretanto, pouco se sabe sobre esse processo e os microrganismos que o realizam, mas por serem heterotróficos, acreditamos que sejam mais tolerantes à altas salinidades que os nitrificantes autotróficos. Desta forma o presente trabalho teve como objetivo favorecer a ocorrência do processo de NH/DA para remoção de amônia em altas salinidades pela inoculação de lodo biológico em meio de enriquecimento para NH/DA (meio HNM) e em efluente hipersalino (meio EF). Para isso, o lodo biológico foi adaptado ao NaCl e neste período a microbiota e a taxa de remoção de amônia foram monitoradas e quantificadas. A microbiota levou 46 dias para se adaptar a 240 g. L^{-1} de NaCl com 97% de eficiência de remoção NH_4^+ , no meio HNM, enquanto no meio EF, levou 117 dias para se adaptar à 230 g. L^{-1} de NaCl, com 60% de remoção de nitrogênio amoniacal. Nas análises moleculares, como a citometria de fluxo, observou-se uma grande instabilidade na contagem total de células. Nos resultados oriundos do sequenciamento do 16S rRNA, percebeu-se uma diminuição da diversidade de espécies provocada pelo aumento da salinidade, mas os gêneros bacterianos descritos como capazes de realizarem o processo de NH/DA estavam presentes em elevadas salinidades.

Palavras-chave: Genes RNAr 16S. Gene *amoA*. PCR digital. Citometria de fluxo

ABSTRACT

ROCHA, João Victor Soares Barcelos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2021. **Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification to remove ammoniacal nitrogen under conditions of high salinity.** Adviser: Cynthia Canedo da Silva. Co-advisers: Larissa Quartaroli and Sérgio Oliveira de Paula.

The production water from the petroleum extraction process contains, in addition to other pollutants, high concentrations of ammoniacal nitrogen. Improper disposal of this effluent can trigger serious environmental damage, including eutrophication in aquatic environments, so biological treatment has been one of the best alternatives for biological removal of ammonia nitrogen (NH_4^+) from effluents. The removal of NH_4^+ can occur through different ways and one of them is heterotrophic nitrification/aerobic denitrification (NH/DA), where a single heterotrophic microorganism is able to perform, in aerobiosis, the removal of ammonia, which represents operational advantages in the area of effluent treatment. However, little is known about this process and the microorganisms that carry it out, but because they are heterotrophic, we believe that they are more tolerant to high salinities than autotrophic nitrifiers. Thus, the present work aimed to favor the occurrence of the NH/DA process for the removal of ammonia in high salinities through the inoculation of biological sludge in an enrichment medium for NH/DA (HNM medium) and in hypersaline effluent (EF medium). For this, the biological sludge was adapted to NaCl and during this period the microbiota and the ammonia removal rate were monitored and quantified. The microbiota took 46 days to adapt to 240 g. L⁻¹ of NaCl with 97% NH_4^+ removal efficiency, in HNM medium, while in EF medium, it took 117 days to adapt to 230 g. L⁻¹ of NaCl, with 60% removal of ammonia nitrogen. In molecular analyses, such as flow cytometry, a great instability in the total cell count was observed. The results from the sequencing of 16S rRNA showed a decrease in species diversity caused by the increase in salinity, but the bacterial genera described as capable of carrying out the NH/DA process were present in high salinities.

Keywords: 16S rRNA gene. *amoA* gene. digital PCR. Flow cytometry.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.2. REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	10
2.2.1. NITRIFICAÇÃO AUTOTRÓFICA E DESNITRIFICAÇÃO ANAERÓBIA	10
2.2.2. NITRIFICAÇÃO HETEROTRÓFICA E DESNITRIFICAÇÃO AERÓBICA (NH/DA)	11
2.2.3. FATORES INIBIDORES DA NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO.....	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1. COLETA DAS AMOSTRAS E ACLIMATAÇÃO DO LODO BIOLÓGICO	14
4.2. MÉTODOS ANALÍTICOS	15
4.3. EXTRAÇÃO DE DNA.....	16
4.4. SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS	17
4.5. QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS NITRIFICANTES AUTOTRÓFICAS.....	17
4.6. CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE NITROGÊNIO AMONIAL E CARBONO ...	18
4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5.1. ACLIMATAÇÃO DO LODO BIOLÓGICO AO SAL.....	19
5.2. CONTAGEM DE CÉLULAS TOTAIS	22
5.3. CINÉTICA DE ALTERAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO AMONIAL E DE CARBONO ORGÂNICO E INORGÂNICO.....	24
6. DIVERSIDADE MICROBIANA DURANTE O PERÍODO DE ACLIMATAÇÃO AO SAL EM MEIOS EF e HNM.....	29
6.1. COMPARAÇÃO DAS COMUNIDADES MICROBIANAS	29
6.2. DIVERSIDADE E COMPOSIÇÃO DE GÊNEROS	32
6.3. QUANTIFICAÇÃO DOS NITRIFICANTES AUTOTRÓFICOS.....	38
6.4. REDE DE CORRELAÇÃO	39
7. CONCLUSÕES.....	41
8. REFERÊNCIAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

O processo de exploração de petróleo e de gás natural gera uma grande quantidade de resíduo líquido, denominado água de produção, que é extraído até a superfície juntamente com o óleo. A água de produção apresenta uma composição complexa, como metais pesados, íons em solução, hidrocarbonetos, nitrogênio amoniacal, sais e por vezes compostos radioativos. Em alguns casos, dependendo da origem da água, devemos considerar também uma alta salinidade e/ou elevada concentração de nitrogênio amoniacal. Altas concentrações de nitrogênio amoniacal impossibilitam o descarte de águas residuais no meio ambiente, porque pode ser tóxico à vida aquática e causar eutrofização do meio, afetando negativamente a qualidade da água. Por isso, antes de ser descartada no meio, a água de produção precisa ser tratada para remoção do nitrogênio amoniacal, em que o processo de remoção biológico tem sido o mais aplicado no tratamento de águas residuárias.

A remoção biológica de amônia convencional é dividida em duas etapas: a nitrificação e a desnitrificação. A nitrificação é realizada por microrganismos autotróficos na presença de oxigênio, onde um grupo de microrganismos (oxidantes de amônia) convertem a amônia a nitrito e posteriormente, um segundo grupo (oxidantes de nitrito) convertem o nitrito à nitrato. Já a desnitrificação é realizada por microrganismos heterotróficos, que em condições anaeróbicas reduzem o nitrato à nitrogênio gasoso.

Nos anos 80, um novo processo biológico para a remoção de nitrogênio amoniacal foi conhecido através do isolamento de uma bactéria pertencente ao gênero *Paracoccus denitrificans*. Este foi o primeiro isolado bacteriano capaz de realizar o processo de nitrificação heterotrófica e desnitrificação aeróbica (NH/DA). No contexto de tratamento de efluentes, a NH/DA apresenta algumas vantagens em relação aos processos convencionais: o processo de NH/DA tem capacidade de tolerar a presença de oxigênio na etapa de desnitrificação (exigindo assim apenas uma condição operacional), os microrganismos que promovem o processo NH/DA são heterotróficos, capazes de remover matéria orgânica além do nitrogênio amoniacal e possuem um tempo de geração menor em relação a microrganismos autotróficos, ausência da necessidade de correção de pH no processo de tratamento, uma vez que a alcalinidade produzida na etapa de desnitrificação é capaz equilibrar o pH do meio para a ocorrência do processo nitrificação.

Com a descoberta da camada de pré-sal em 2006 e com a contínua demanda pelo petróleo para formação de seus produtos secundários (como a gasolina por exemplo), as

concentrações salinas observadas nas águas residuais provenientes dessa exploração estão cada vez mais elevadas do que as normalmente encontradas em efluentes de petróleo.

E sabendo que o sal é um grande inibidor dos processos biológicos, a hipótese deste trabalho foi que os microrganismos NH/DA são mais eficientes na remoção de amônia em altas salinidades. Assim, objetivo deste trabalho foi caracterizar e monitorar a microbiota do lodo biológico, bem como verificar a eficiência da remoção biológica de nitrogênio amoniacal quando inoculado em meio de enriquecimento para nitrificantes heterotróficos e em efluentes salinos acrescidos de sal.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ÁGUA DE PRODUÇÃO

O processo de exploração do petróleo tem como subproduto a água de produção (AP), composta basicamente pela água de formação (que está naturalmente presente na formação geológica do reservatório de petróleo), água de injeção (água inserida no reservatório para que o petróleo seja recuperado), e os produtos químicos adicionados durante o processo de extração (Patin, 1999; Amini *et al.*, 2012). Em 2018, houve um aumento de 2,2 milhões de barris de petróleo por dia na produção mundial, o que representou um aumento de 2,4% em toda a produção mundial no período de 10 anos, conseqüentemente, aumentou a quantidade de AP produzida globalmente (BP *et al.*, 2019). Segundo a ANP, em janeiro de 2020 apenas no Brasil foram produzidos 3,17 milhões de barris de petróleo por dia, sendo assim o maior volume já produzido pelo país (ANP *et al.*, 2020).

A AP é uma solução heterogênea onde encontram-se compostos como: partículas de óleo, hidrocarbonetos, compostos aromáticos, compostos alifáticos, metais pesados e íons em solução (Cl^- , Na^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , SO_4^{2-} , HCO_3^- , Fe^-). Dentre os íons encontrados na AP, vale ressaltar a elevada concentração de íons amônio, podendo variar de 22 a 800 mg.L^{-1} dependendo da proveniência da água. O descarte de efluentes que apresentam concentrações de amônia acima do permitido pela legislação (20 mg.L^{-1}) pode acarretar na eutrofização e a depleção de oxigênio presente no meio (Reinbold *et al.*, 1982; Gabardo *et al.*, 2007, Lima *et al.*, 2008, Andrade *et al.*, 2009). Assim, devido à grande heterogeneidade de compostos, incluído a presença de elevadas concentrações de amônia, a AP deve ser tratada até que sejam atingidos os padrões de qualidade de água estabelecido pela legislação antes de ser reintroduzida nos corpos hídricos naturais.

2.2. REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

Altas concentrações de amônia podem ser tóxicas à vida aquática e causar eutrofização afetando negativamente a qualidade da água (Ahn, 2006; Smith & Schindler *et al.*, 2009). Segundo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA 430/2011), o padrão de lançamento de nitrogênio nos efluentes, na forma de amônia total, é definido em 20,0 mg N.L⁻¹. O nitrogênio pode ser encontrado de diversas formas nos efluentes, como amônia, íon amônio, nitrito, nitrato, algumas formas orgânicas (ureia, alguns aminoácidos e ureídeos) (Silva *et al.*, 2019). O nitrogênio amoniacal pode ocorrer de duas formas a amônia livre (NH₃) ou ionizada (NH₄⁺), sendo que as proporções de cada um dependem do pH e da temperatura que o meio está submetido. Em pH ácido, há predominância do íon amônio. Já em pH básico, a concentração de amônia é maior. Caso o pH do meio seja maior que 11, a amônia se encontra na forma gasosa, extremamente tóxica às algas, zooplâncton e peixes (Metcalf e Eddy *et al.*, 2003).

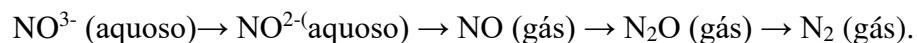
Dentre os processos de remoção de amônia, o biológico tem sido o mais aplicado, devido aos seus baixos custos operacionais e à sua grande eficiência. De modo geral, o tratamento de efluentes tem como objetivo potencializar as reações dos ciclos biogeoquímicos, como por exemplo as reações que envolvem o ciclo do nitrogênio. A remoção biológica dos compostos nitrogenados pode ocorrer através de diferentes processos e grupos microbianos, sendo o mais comum, a nitrificação autotrófica e desnitrificação anaeróbia (Oliveira *et al.*, 2012).

2.2.1. NITRIFICAÇÃO AUTOTRÓFICA E DESNITRIFICAÇÃO ANAERÓBIA

Nitrificação é o processo microbiológico onde compostos nitrogenados são oxidados a nitrito (NO₂⁻) e posteriormente a nitrato (NO₃⁻). Esse processo é constituído de duas etapas: na primeira etapa, a nitrificação, o nitrogênio amoniacal é oxidado a nitrito por bactérias ou arqueias, que oxidam amônia (BOA e AOA, respectivamente). Este processo é realizado principalmente por bactérias dos gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrococcus* e *Nitrosospira*. Já na segunda etapa, denominada nitratação, o nitrito é oxidado a nitrato, por bactérias que oxidam nitrito (BON), bactérias estas pertencentes aos gêneros *Nitrospira*, *Nitrospina* e *Nitrococcus* (Koops e Pommerening-Röser *et al.*, 2005; Vanparys *et al.*, 2006). Essas etapas são realizadas por microrganismos autotróficos em condições de aerobiose.

A primeira reação do processo de nitrificação é catalisada pela enzima amônia monooxigenase (AMO). Além da presença de oxigênio neste processo, um par de elétrons é necessário para a oxidação de amônia a hidroxilamina. O segundo passo é uma reação catalisada pela hidroxilamina oxidoreductase (HAO), em que a hidroxilamina é oxidada em nitrito usando oxigênio da água e um oxigênio molecular adicional como acceptor de elétrons. O nitrito é então oxidado a nitrato pela ação da enzima nitrito oxido reductase, última etapa do processo de nitrificação autotrófica (Wunderlin *et al.*, 2012).

O nitrato formado no processo de nitrificação é o substrato utilizado para a desnitrificação. Esse processo é realizado principalmente por bactérias heterotróficas como *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Halobacterium*, *Hiphomicrobium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Rhodopseudomonas*, *Thiobacillus*, *Vibrio* e *Xanthomonas* (Rittman e Langeland, 1985), que utilizam o nitrato como acceptor final de elétrons em seu metabolismo, desta forma propiciando a redução do nitrato a formas de nitrogênio gasoso, como representado a seguir:



A eficiência da desnitrificação está relacionada a disponibilidade de carbono orgânico presente no meio, uma vez que as bactérias responsáveis por este processo são heterotróficas, desta forma o seu metabolismo depende de compostos orgânicos para a obtenção de energia na forma de ATP.

2.2.2. NITRIFICAÇÃO HETEROTRÓFICA E DESNITRIFICAÇÃO AERÓBICA (NH/DA)

Embora tenha sido descrito na década de 80, pouco se sabe sobre os microrganismos que são capazes de realizar a NH/DA e qual ou quais mecanismos estão envolvidos nessa via de remoção. A primeira cepa bacteriana capaz de realizar esse processo, *Paracoccus denitrificans*, foi isolada e descrita por Robertson & Kuenen (1983). Desde então outros isolados tem sido descritos como NH/DA: *Alcaligenes faecalis* (Joo *et al.*, 2005), *Bacillus* sp. (Yang *et al.*, 2011), *Pseudomonas* sp. (Wan *et al.*, 2011), *Agrobacterium* sp. (Chen e Ni, 2012); *Rhodococcus* sp. (Chen *et al.*, 2012), *Bacillus methylotrophicus* (Zhang *et al.*, 2012), *Pseudomonas aeruginosa* (Kathiravan, 2014), *Klebsiella* sp. (Padhi *et al.*, 2013), *Acinetobacter* sp. (Yao *et al.*, 2013), *Halomonas campisalis* (Guo *et al.*, 2013), *Aeromonas*

sp. (Chen *et al.*, 2014), *Vibrio diabolicus* (Duan *et al.*, 2015), *Pseudomonas fluorescens* (Zhang *et al.*, 2015), *Zobellella taiwanenses* (Lei *et al.*, 2015), *Serratia marcescens* (Huang *et al.*, 2017) *Enterobacter cloacae* (Padhi *et al.*, 2017), *Pseudomonas putida* (Xu *et al.*, 2017), *Paracoccus versutus* (Zhang *et al.*, 2018), *Photobacterium sp.* (Liu *et al.*, 2019) *Gordonia amicalis* (Silva *et al.*, 2019), *Pseudomonas balearica* (Silva *et al.*, 2019), *Pseudomonas stutzeri* (Zhang *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2020), *Exiguobacterium mexicanum* (Cui *et al.*, 2021), *Pseudomonas mendocina* (Xie *et al.*, 2021).

Diferente da nitrificação autotrófica e desnitrificação anaeróbia que são realizados por grupos distintos de microrganismos e em diferentes condições de oxigenação, na NH/DA um único microrganismo heterotrófico é capaz de transformar a amônia em nitrogênio gasoso em aerobiose. Diferentes vias metabólicas já foram propostas para diferentes microrganismos NH/DA, mas ainda não há uma rota definida para esse metabolismo. Acredita-se que esse metabolismo envolve a oxidação da amônia a hidroxilamina, que posteriormente é oxidada a nitrito. O nitrito é então reduzido a nitrogênio gasoso passando por óxido nítrico e nitroso, ou para alguns isolados, passando só por óxido nítrico (Verstrae & Alexande, 1972; Robertson & Kuenen, 1983; Joo *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2014).

Os estudos que tentam elucidar a via metabólica envolvida na NH/DA são baseados nas enzimas e intermediários produzidos nos processos convencionais, nitrificação autotrófica e desnitrificação anaeróbia (Zhang *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2016). Porém, como na NH/DA todas as etapas acontecem em aerobiose, é pouco provável que as enzimas envolvidas nesse processo sejam as mesmas da nitrificação e desnitrificação anaeróbia. Silva e colaboradores (2019 e 2020) mostraram que os genes que codificam as enzimas da nitrificação autotrófica não estão presentes em isolados NH/DA *Pseudomonas balearica*, *Pseudomonas stutzeri*, *Rhodococcus ruber* e *Gordonia amicalis* e ao analisar o transcriptoma do isolado *P. stutzeri* UFV5 em condições de indução da via de NH/DA, nenhum gene envolvido na nitrificação e desnitrificação convencionais tiveram sua expressão diferenciada, sugerindo que a via metabólica do processo de NH/DA é composta por enzimas diferentes das convencionalmente descritas.

O processo de NH/DA vem ganhando destaque nas pesquisas envolvendo tratamento de efluentes, pois o processo de NHDA é mais vantajoso que o convencional, pelos vários motivos: i) utilização de substrato orgânico, removendo além da amônia, a matéria orgânica do efluente; ii) tolerância ao oxigênio em ambas as etapas do processo de nitrificação e

desnitrificação, fazendo com que o tratamento possa ocorrer em um único reator, podendo diminuir o espaço físico necessário para construção das estações de tratamento de efluentes e consequentemente diminuindo os custos para implantação de novas estações de tratamento; iii) otimização no processo de remoção de amônia, uma vez que esses microrganismos são heterotróficos, eles crescem muito mais rápido que os autotróficos; iv) não se faz necessária a adição de alcalinizantes, uma vez que a alcalinidade gerada pelo processo de desnitrificação é capaz de equilibrar a mudança de pH no reator, corrigindo a acidificação causada pela nitrificação (Marazioti *et al.*, 2003; Third *et al.*, 2005); v) grande adaptabilidade a elevadas concentrações de matéria orgânica e a altos níveis de salinidade (Wang *et al.*, 2017).

2.2.3. FATORES INIBIDORES DA NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO

Apesar de sua grande importância para o ciclo biogeoquímico do nitrogênio, o processo de nitrificação é facilmente reprimido por fatores externos, como por exemplo: pH, temperatura, alcalinidade, relação carbono/ nitrogênio (C/N) e presença de compostos inibidores no meio (Quartarolli *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2018).

A temperatura pode afetar os microrganismos de duas formas distintas. O aumento gradual de temperatura faz com que as atividades enzimáticas aumentem a sua atividade no metabolismo microbiano, aumentando assim a obtenção de energia e diminuindo o tempo de geração destes microrganismos. Outra influência provocada pela temperatura é a desnaturação de proteínas e DNA, que podem provocar a morte celular (Brock *et al.*, 2016). A nitrificação pode acontecer entre temperaturas de 4 a 45 °C (Painter *et al.*, 1977), mas os NH/DA apresentam uma faixa ótima variando de 25 a 37 °C (Joo *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2018).

O pH presente no meio onde o processo de nitrificação está ocorrendo deve ser monitorado e mantido próximo a 6,5 e 7,5. Para as bactérias que oxidam o nitrito, o ótimo de pH é em torno de 7,2 a 7,6 (Spinola *et al.*, 2009). Em situações onde o pH se encontra abaixo da neutralidade, se tem a formação de ácido nitroso e em pH acima de 8,0, formação de amônia livre (Oliveira *et al.*, 2012). Na NH/DA, a nitrificação acidifica o meio, porém a desnitrificação alcaliniza, deixando o pH próximo do neutro.

Segundo Bitton e colaboradores (2005) substâncias como metais pesados, presentes em água de produção, podem provocar a inibição do processo de nitrificação podendo afetar tanto os grupos de *Nitrosomonas* como de *Nitrobacter*.

A presença de elevadas cargas de salinidade ao meio de cultivo pode afetar inúmeros processos microbianos, como por exemplo a taxa de crescimento e processos metabólicos,

como na oxidação de amônia (Dalmacija *et al.*, 1996). Quando os microrganismos se encontram em um meio com elevadas concentrações de sal, estes podem conseguir manter o equilíbrio osmótico através da importação de íons inorgânicos presentes no meio ou através da produção de solutos compatíveis, que geralmente são moléculas orgânicas altamente solúveis em água, incluindo açúcares, álcoois ou derivados de aminoácidos (Measures, 1975; Brock *et al.*, 2016). De acordo com a literatura, os microrganismos que realizam o processo de NH/DA removem amônia com alta eficiência em concentrações salinas em torno de 3 %, podendo chegar até 6 %, e são mais resistentes ao sal do que os nitrificantes autotróficos (Duan *et al.*, 2015; Lei *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2020).

Outro fator que é muito importante para estes processos é a relação C/N, os microrganismos conhecidos por fazerem o processo de NH/DA são heterotróficos, assim uma baixa relação C/N resultará na diminuição do crescimento microbiano, enquanto uma concentração muito alta pode inibir o crescimento. A relação C/N observada para os microrganismos NH/DA é maior que dos desnitrificantes anaeróbios, podendo variar entre 5 a 10, ou até valores mais elevados, dependendo do microrganismo (Ji *et al.*, 2014).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido em três etapas: na **Etapa 1** foi realizada a aclimação dos microrganismos presentes no lodo ativado a altas salinidades em meio de cultivo HNM (*Heterotrophic Nitrification Medium*) e em EF (água de produção hipersalina); na **Etapa 2** foi realizada a cinética da remoção de nitrogênio amoniacal para determinar a taxa de remoção nos diferentes meios de cultivo e na **Etapa 3**, foi extraído o DNA metagenômico para monitoramento do gene *amoA* e caracterização da diversidade microbiana encontrada em diferentes salinidades dos meios de cultivo HNM e EF.

4.1. COLETA DAS AMOSTRAS E ACLIMATAÇÃO DO LODO BIOLÓGICO

A amostra de lodo biológico foi coletada em uma estação de tratamento de efluentes por lodos ativados situada em um terminal de petróleo na costa brasileira no município de São Paulo.

A aclimação do lodo foi realizada em dois meios distintos, água de produção hipersalina (EF) e um meio de enriquecimento para nitrificantes heterotróficos (HNM-

Heterotrophic Nitrification Medium) (Zhang *et al.*, 2012). A água de produção hipersalina (EF) utilizada no estudo foi coletada de uma unidade flutuante de produção, armazenamento e transferência de petróleo situada na costa brasileira em São Paulo. O EF foi previamente caracterizado quanto as concentrações de matéria orgânica e amônia e diluído em uma proporção de 2:1 (água: efluente), devido a elevada salinidade/concentração de nitrogênio amoniacal presente no efluente hipersalino bruto, e ao longo da aclimação foi suplementado com etanol, quando observou-se uma baixa eficiência de remoção presente no sistema. A aclimação foi realizada submetendo a microbiota a um aumento gradativo da concentração salina, onde foram adicionadas 5 g.L⁻¹ de NaCl a cada depleção total de amônia no meio. Alíquotas de 10 mL foram inoculadas em *Erlenmeyers* contendo 40 mL de meio HNM ou EF, os quais foram mantidos a 150 rpm e 30°C. O experimento foi realizado em triplicata, juntamente com um controle (sem adição de inóculo) e um *backup* (meio com concentração salina menor, para caso a microbiota morresse após o acréscimo de sal, este inóculo poderia ser utilizado para continuação dos experimentos). Ambos os meios de cultivo foram iniciados com 50 g.L⁻¹ de NaCl em sua constituição.

	HNM	Efluente Hipersalino
DQO (mg.L ⁻¹)	2145	1342
Nitrogênio Amoniacal (mg.L ⁻¹)	150	100
Salinidade (g.L ⁻¹)	50	50
pH	7,50	6,78

Tabela 1: Composição de ambos os meios de cultivo. Sendo meio HNM e EF.

A remoção de nitrogênio amoniacal foi avaliada a cada 24 horas durante todo o período de aclimação do lodo biológico. Após cada quantificação, 50% do meio de cultivo era trocado por um novo e adicionados mais 5 g.L⁻¹ de NaCl. A adaptação à novas concentrações de sal foi cessada após a concentração de nitrogênio residual superior a 20 mg.L⁻¹, assim como previsto pelo (CONAMA) 430/2011.

4.2. MÉTODOS ANALÍTICOS

O EF diluído foi caracterizado por meio dos seguintes parâmetros: nitrogênio total, nitrogênio amoniacal, nitrato, nitrito, demanda química de oxigênio (DQO), fósforo total, pH,

alcalinidade e salinidade. Para a avaliação do processo de remoção de amônia nos dois diferentes meios ao longo do processo de aclimação ao sal, foram monitorados os parâmetros nitrogênio amoniacal, nitrato, nitrito e DQO.

Ao longo do processo de aclimação, a concentração de amônia, de nitrito, de nitrato, de DQO, carbono residual e biomassa microbiana foram determinadas a cada nova salinidade.

A concentração de amônia foi avaliada através do método colorimétrico descrito por Chaney e Marbach (1962), com modificações. As análises foram realizadas em microplacas de 96 poços, contendo em cada poço: 5 µl de cultura, 100 µL de reagente de fenol e 100 µL de reagente de hipoclorito. As placas foram incubadas por 20 minutos a 39 °C, e então a absorvância foi lida no comprimento de onda de 630 nm no espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Scientific, país).

Os procedimentos para determinação de nitrato, nitrito e DQO foram realizados através dos *Kits Hach* TNT 835, 839 e 821, respectivamente. Os demais parâmetros, carbono residual e biomassa microbiana, foram determinados seguindo os procedimentos padrões do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998).

A cada concentração salina, uma alíquota de 2 ml do lodo aclimatado foi coletada e preservada (resfriamento a -20 °C) para extração do DNA, e outra alíquota de 1 ml foi fixada em paraformaldeído 3,7% (proporção 3:1) e preservada (resfriamento a 4°C) para contagem de células totais no Citômetro de Fluxo (BioRad *Cell Sorter* S3e).

4.3. EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA das amostras de lodo biológico foi extraído conforme 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 6.000 g. O procedimento de lavagem foi realizado cinco vezes. Após lavagem, a amostra de lodo foi suspensa em 500 µL de tampão SET e homogeneizada em *vórtex*. As amostras de DNA extraídas foram quantificadas usando espectrofotômetro Qubit (Invitrogen) e visualizadas em gel de agarose 1 % e armazenadas a -20 °C para análises futuras.

4.4. SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

O DNA metagenômico dos pontos com 50, 65, 70, 75, 90, 100, 215, 220, 225 e 230 g.L⁻¹ de NaCl do tratamento EF e os pontos 50, 70, 240 e 250 do tratamento HNM foi liofilizado e enviado para sequenciamento parcial do gene 16S rRNA na empresa *Molecular Research DNA* (www.mrdnalab.com, Shallowater, Texas, USA) pela plataforma Illumina MiSeq. As sequências obtidas foram processadas, os *barcodes* foram retirados, os *contigs* foram montados e as sequências menores que 150 bp e quimeras foram removidas. As OTUs foram definidas pelo agrupamento sob 3% de divergência (97% de similaridade) e uma sequência representativa de cada OTU foi classificada taxonomicamente usando BLASTn contra um banco de dados com curadoria derivada de *GreenGenes* (<http://greengenes.lbl.gov/>), RDPII (<http://rdp.cme.msu.edu>) e NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). As análises multivariadas e cálculo dos índices de diversidade foram realizadas utilizando o *software* PAST (“Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis”) (Hammer *et al.*, 2001). Já a rede de interações foi realizada através do *software* RStudio.

4.5. QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS NITRIFICANTES AUTOTRÓFICAS

As bactérias nitrificantes autotróficas foram quantificadas por PCR digital em gota ou ddPCR (*droplet digital PCR- BioRad, pais*) utilizando os *primers* AmoA1F e AmoA2R (Rotthauwe *et al.*, 1997) específicos para o gene *amoA*. Essa metodologia envolveu quatro etapas: (1) montagem da reação, (2) formação das gotas, (3) amplificação do DNA por PCR, e (4) leitura das gotas. Para a PCR, utilizou-se 10 µl de *QX200 ddPCR EvaGreen Supermix* (Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos); 2,0 µl de cada *primer* (*reverse* e *foward*) na concentração final de 100 nM; 1,0 µl de DNA-molde na concentração de até 66 ng/µl; e 5,0 µl de água ultrapura. Os 20 µl finais da reação foram transferidos para suportes juntamente com 40 µl de óleo para a geração de gotas no equipamento gerador de gotas. As gotas formadas foram cuidadosamente transferidas para uma placa de 96 poços, a qual foi vedada com um filme plástico apropriado e colocada no termociclador para a PCR (marca, país). O programa da PCR utilizado foi: 95 °C por 5 min; 40 ciclos de 95 °C por 30 s e 50 °C por 1 min; 4 °C por 5 min; e por último 90 °C por 5 min. E em todos os passos, foram adicionados uma rampa de ±2 °C/segundo. Após a finalização da PCR, a placa foi transferida para o leitor de gotas

(marca, país) para quantificação das gotas positivas (com o gene *amoA*) e negativas (sem o gene *amoA*).

4.6. CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE NITROGÊNIO AMONIACAL E CARBONO

A cinética de degradação de nitrogênio amoniacal e carbono foram realizados após o término do período de aclimação da amostra de lodo ao sal. Foi utilizada a última concentração salina da etapa de aclimação, ou seja, 245 e 225 g.L⁻¹ de NaCl, para os tratamentos com meio HNM e EF, respectivamente.

Os volumes das triplicatas de cada meio foram transferidos para um único *Erlemeyer* de 1000 ml e acrescidos 50 mL dos respectivos meios de cultura, água de produção hipersalina ou meio HNM, resultando no volume final de 200 mL (meio de cultura + biomassa). Esses foram mantidos sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30 °C durante 30 dias, a fim de proporcionar uma melhor adaptação (ou aumento da biomassa) da microbiota, e a cada 24 horas, a biomassa era decantada e 50% do volume do meio de cultivo era trocado por um novo meio.

Corridos 30 dias, os ensaios de cinética foram realizados em batelada, com duração de 24 h, onde o nitrogênio amoniacal, o carbono total dissolvido (CT), carbono orgânico total (COT) e carbono inorgânico (CI) foram quantificados a cada 1 hora. A biomassa inicial foi quantificada por meio da concentração de Sólidos Solúveis Voláteis (SSV) (APHA *et al.*, 2012). Os experimentos de cinética foram realizados em duplicata.

4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Após da avaliação da distribuição normal dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk, a comparação das médias foi realizada no MiniTab® 17.1.0 (Minitab, Inc., Quality Plaza, 1829 Pine Hall Road, State College, Pennsylvania 16801, USA) por ANOVA seguida do teste de Tukey. Valores de *p*-valor menores que 0.05 foram considerados significantes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ACLIMATAÇÃO DO LODO BIOLÓGICO AO SAL

Observou-se que em meio HNM os microrganismos se aclimataram a maiores concentrações de NaCl do que em meio EF, sem perder a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal (Figura 1).

O processo de aclimação em EF foi mais lento, o intervalo entre as trocas de meio/acréscimos salinos era de aproximadamente 7 dias até a salinidade de 100 g.L^{-1} , ou seja, a microbiota levava 7 dias para remover todo nitrogênio amoniacal do meio. Quando comparado ao meio HNM, a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal em EF teve grandes variações, permanecendo acima de 70% por volta do 50º dia de aclimação, voltando a variar novamente após o 100º dia. Acreditamos que tal resultado seja pelo fato do meio EF ser um meio complexo e que possivelmente apresenta inibidores do crescimento microbiano em sua composição, como por exemplo metais pesados e compostos recalcitrantes (Vendramel *et al.*, 2015; Rasheed *et al.*, 2011; Asatekin *et al.*, 2009). Entretanto, após o período de aclimação, este sistema alcançou a eficiência de 93% em 225 g. L^{-1} de NaCl, caindo para 73% quando a salinidade foi aumentada para 230 g. L^{-1} .

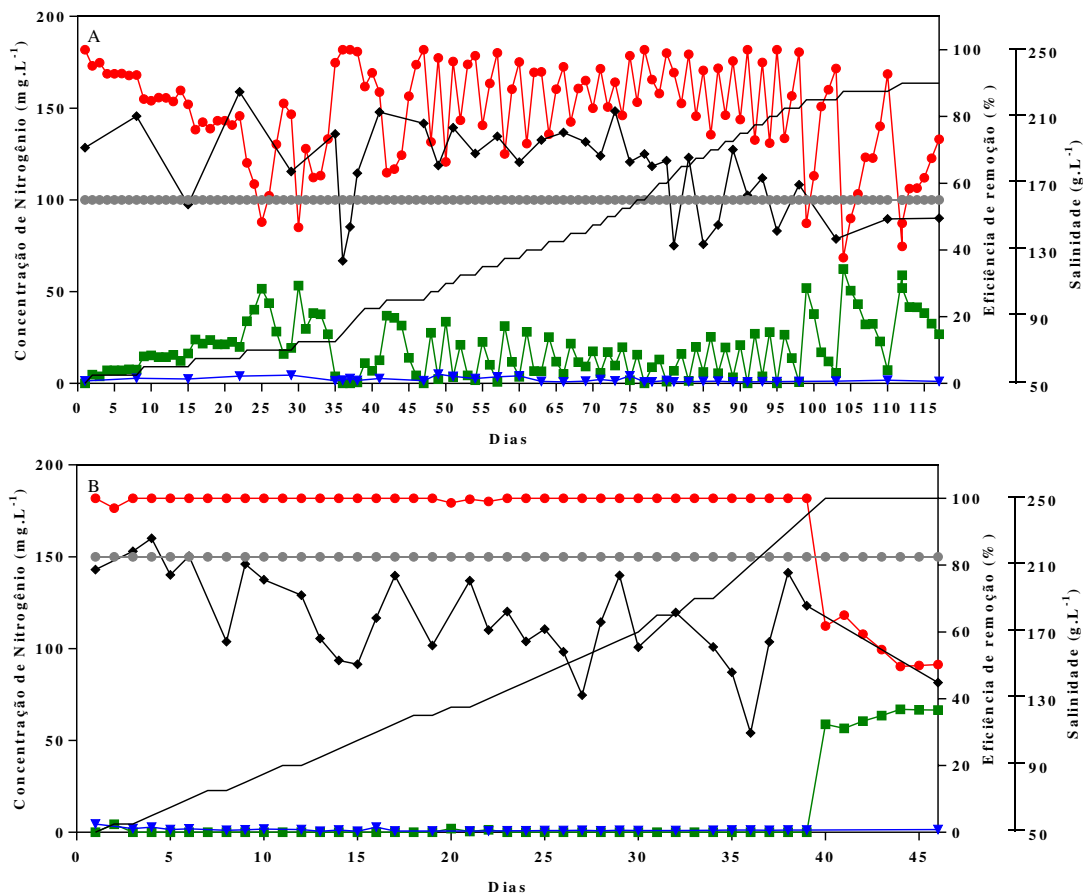


Figura 1: Concentrações dos compostos nitrogenados, eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal e DQO nos ensaios de aclimação do lodo ao sal com os meios de cultivo água produção hipersalina (A) e HNM (B), nas diferentes salinidades. Legenda: (—) salinidade, (●) NH_4^+ no meio bruto (EF e HNM), NH_4^+ (■) e NO_3^- (▼) no efluente tratado, (●) eficiência de remoção de NH_4^+ e (◆) eficiência de remoção de DQO.

Desde o início da aclimação, a cada 24 horas, foi observada a remoção da maior parte do nitrogênio amoniacal presente no meio HNM com eficiência média de 99,72%. O lodo microbiológico não teve atividade de nitrificação e desnitrificação inibida pelo aumento da concentração salina até 240 g.L^{-1} de NaCl, entretanto, acima dessa salinidade, a microbiota não conseguiu atingir 80% de remoção de nitrogênio amoniacal. No entanto, o lodo biológico inoculado em meio HNM conseguiu se aclimatar a 240 g.L^{-1} de NaCl em menos de 50 dias (Figura 1B).

Estes resultados comprovam nossa hipótese de que o meio HNM favorece os microrganismos nitrificantes heterotróficos/desnitrificantes aeróbios. Estes apresentam maior taxa de crescimento que os autotróficos, portanto são capazes de remover o nitrogênio

amoniaco em menor tempo (Zhao *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2013). Além disso, os nitrificantes heterotróficos são mais resistentes e adaptáveis às elevadas concentrações de sal em relação aos nitrificantes convencionais, tendo em vista a diferença metabólica entre estes grupos, o que explica o menor tempo de aclimação com alta eficiência de remoção, uma vez que, os microrganismos heterotróficos obtêm mais energia metabólica do que um microrganismo autotrófico (Marazioti *et al.*, 2003; Third *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017; Xia *et al.*, 2020).

A eficiência na remoção de DQO durante o período de aclimação teve grande variação em ambos os tratamentos, com eficiência média de 63,74% para o meio EF e 64,48 % para o meio HNM (Figura 1), corroborando Belkin *et al.*, que em 1993 observou uma variação inversa entre a remoção de carbono orgânico dissolvido com a salinidade do efluente.

A baixa concentração de nitrato residual (<5 mg.L⁻¹) durante todo o período de aclimação em ambos os tratamentos sugere a ocorrência do processo de NH/DA, uma vez que o nitrogênio amoniacal está sendo consumido (nitrificação) e o nitrato não está sendo acumulado na presença de oxigênio (desnitrificação aeróbia) (Figura 1).

Durante o processo de aclimação, a relação DQO/NH₄⁺ foi monitorada nos dois sistemas. A relação DQO/NH₄⁺ média do meio HNM foi de 16, enquanto do meio EF variou de 13 a 55. Neste último, foi necessário realizar alguns ajustes na dosagem de carbono (DQO/NH₄⁺), a fim de aumentar a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal pelos microrganismos NH/DA e consequentemente inibir a ação de microrganismos nitrificantes convencionais (BOA e BON) (Zhu *et al.*, 2014). A relação DQO/NH₄⁺ no EF foi aumentada devido a adição de carbono nos dias 9, 30 e 104, nas salinidades 60, 75 e 225 g.L⁻¹, respectivamente.

Durante o período em que a salinidade foi de 100 g.L⁻¹ de NaCl em EF, houve a adição de carbonato de sódio na tentativa de aumentar o pH do meio e, consequentemente, melhorar a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal. Tal adição resultou na diminuição do intervalo de acréscimos de sal, passando de 7 dias para 2 dias (Figura 1A). Como observado por Radelyuk *et al.* (2019) e Hayat *et al.* (2002), efluentes oriundos de refinarias de petróleo podem conter elevadas concentrações de íon cálcio em solução, favorecendo a formação de carbonato de cálcio, fazendo com que o carbonato originado do metabolismo das bactérias NH/DA, não consiga alcalinizar o meio de cultivo. Esta reação, explica o baixo valor de pH observado no meio EF antes da adição exógena de alcalinizante (carbonato de sódio) a partir da salinidade de 100 g.L⁻¹ de NaCl.

salinidade 55 g.L^{-1} de NaCl (Figura 3). Este resultado mais uma vez correlaciona os dados com a nossa hipótese, de que o meio HNM favorece a microbiota nitrificante heterotrófica, que é mais resistente a altas concentrações de sal como observado por (Silva *et al.*, 2018).

Observou-se que na salinidade de 100 g.L^{-1} no meio EF, houve um aumento significativo no número de células, o que acreditamos ter sido reflexo da adição de carbonato de sódio, que aumentou o pH do meio (Figura 3). Como descrito na literatura, a faixa de pH ótima para a maioria dos microrganismos é por volta de 7,0-7,5 (Silva *et al.*, 2018), acreditamos que os baixos níveis de pH no meio EF estavam comprometendo a microbiota, portanto após sua correção houve o aumento no número de células totais, inclusive dos microrganismos nitrificantes, que refletiu no aumento da eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal no meio, e na diminuição do intervalo de acréscimo de sal durante a aclimação.

Em ambos os meios de cultivo foi observada uma diminuição na contagem total de células a partir da salinidade de 210 g.L^{-1} de NaCl (Figura 3), tal salinidade pode ter afetado diretamente os processos microbiológicos, reduzido e até mesmo inibido o crescimento dos microrganismos. Entretanto, a remoção de nitrogênio amoniacal nesta mesma salinidade não foi inibida, ambos os tratamentos conseguiram remover todo o nitrogênio amoniacal presente nos meios de cultivo (Figura 1). Desta forma podemos observar que mesmo com a diminuição de células totais em ambos os tratamentos, os microrganismos responsáveis pela remoção de nitrogênio amoniacal se aclimataram e conseguiram manter uma alta eficiência de remoção.

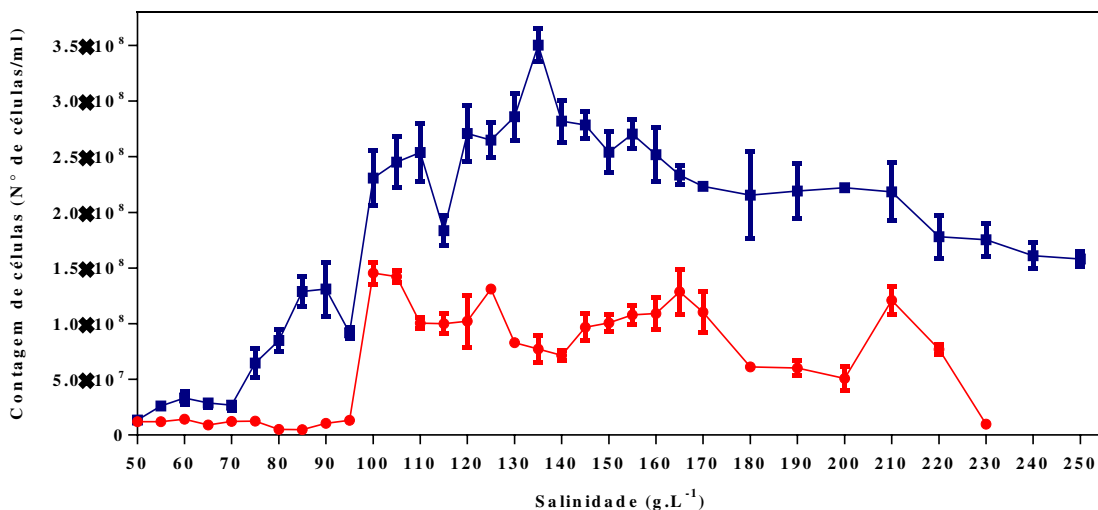


Figura 3: Comparação da citometria de fluxo dos tratamentos HNM e EF. Concentração de células presente no meio efluente hipersalino (●) e Concentração de células presente no meio HNM (■).

Em ambos os meios de cultivo foi observada uma instabilidade no número de células, foi observada uma instabilidade no número de células, mostrando desta forma que o número de células não se correlaciona com a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal presente em ambos os meios de cultivo.

5.3. CINÉTICA DE ALTERAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO AMONIAICAL E DE CARBONO ORGÂNICO E INORGÂNICO

Após aclimação da biomassa a altas concentrações de sal, foi realizado o ensaio de cinética para determinar a taxa de remoção de nitrogênio amoniacal e carbono (Figura 4). Em ambos os tratamentos, EF e HNM, foi observada uma diminuição significativa na concentração de nitrogênio amoniacal durante as primeiras 2 horas. Resultados semelhantes foram reportados em Silva e colaboradores (2020), que sugerem que esta diminuição na concentração de nitrogênio amoniacal possa estar relacionada ao fato deste ser tóxico aos microrganismos, levando a sua rápida remoção do meio para que os microrganismos consigam sobreviver e crescer em condições menos estressantes.

Ademais outro ponto de suma importância é o fato de que a microbiota utilizada nos ensaios de cinética, estavam aclimatadas a estas condições impostas por ambos os meios. Desta forma o maior consumo de poluentes pode ser devido ao fato de que a comunidade aclimatada à estas condições estão muito bem adaptadas a utilizar nitrogênio amoniacal, e assim, a sua utilização ser mais intensa no período em que a sua concentração estiver maior.

No sistema EF, após a primeira hora, não houve uma expressiva remoção do nitrogênio amoniacal até 18 h de ensaio (Figura 4A). No intervalo de 2 a 18h, observamos uma menor velocidade de remoção de N e C, que só foi aumentar após um repouso de 6h de amostragem da microbiota, acreditamos que isso tenha ocorrido em resposta ao estresse térmico sofrido pela microbiota durante sua retirada do *shaker* para amostragem.

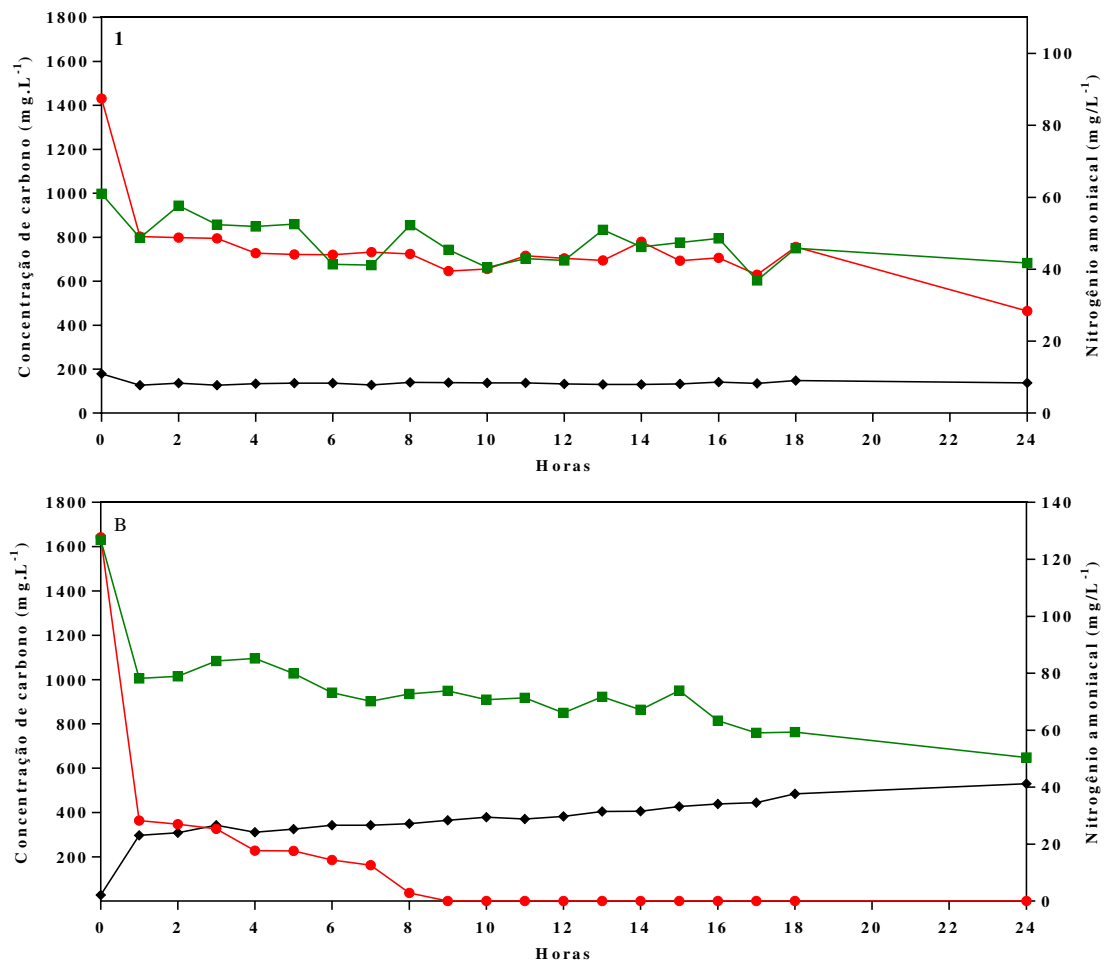


Figura 4: Cinética de alteração das concentrações de nitrogênio amoniacoal e de carbono orgânico e inorgânico nos meios de cultivo EF (A) e HNM (B). Legenda: (●) Nitrogênio amoniacoal, (◆) Carbono inorgânico e (■) Carbono orgânico.

Já no meio HNM, o nitrogênio amoniacoal foi totalmente removido em 9 horas (Figura 4B). Corroborando com os resultados observados na etapa de aclimação, acreditamos que a rápida remoção de nitrogênio amoniacoal se deve ao favorecimento dos microrganismos que realizam o processo de NH/DA, pois ao inocularmos em meio HNM, este grupo funcional foi capaz de remover o nitrogênio amoniacoal com maior velocidade. Em contra partida no meio EF, provavelmente teve a presença de microrganismos que realizam o processo de NH/DA, mas por estar na água de produção, um meio complexo, podem existir compostos que inibam o processo de nitrificação (Bitton *et al.*, 2005; Asatekin *et al.*, 2009; Rasheed *et al.*, 2011 Vendramel *et al.*, 2015).

Portanto, como percebemos dois momentos distintos no ensaio de cinética de remoção, optamos por calcular a velocidade de remoção para dois intervalos, 1 a 2 horas e 3 a 24 h para o tratamento EF e 3 a 9 horas, no intervalo 2 do tratamento HNM (Tabela 1). Ao

analisarmos o intervalo 1 de cada curva foi observado que no meio HNM, a taxa de eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal foi de $45,00 \text{ mgNH}_4^+ \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, cerca de quatro vezes maior que a eficiência de remoção do meio EF, $10,94 \text{ mgNH}_4^+ \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Tabela 2: Taxa específica de degradação de nitrogênio amoniacal e carbono. Onde pode ser definida como a quantidade de nitrogênio amoniacal removida (mg) por unidade de tempo (h) por unidade de sólidos suspensos (g). Intervalo 1 (HMN e Efluente, 0 a 2 horas). Intervalo 2 (Efluente: 3 a 24 horas). Intervalo 2 (HNM: 3 a 9 horas).

	Intervalo 1		Intervalo 2	
	HNM	EF	HNM	EF
Nitrogênio amoniacal	45,00	10,94	3,53	0,27
Carbono Orgânico	275,00	15,43	26,97	3,38
Carbono Inorgânico	125,00	12,17	5,16	0,20

Em relação a remoção de carbono orgânico, a taxa de remoção foi 17x maior em HNM que em EF (Tabela 1). Em EF atingiu uma taxa de remoção igual a $26,97 \text{ mgCOT} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Em contrapartida, o carbono inorgânico apresentou uma taxa de remoção igual a $12,17 \text{ mgCI} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Tabela 1). Como discutido anteriormente, acredita-se que a menor taxa de remoção observadas no meio EF, estejam associadas à componentes inibidores que possam estar presentes neste meio, associados ao estresse térmico ao qual a microbiota foi exposta durante a amostragem do experimento. Já a remoção de carbono orgânico no meio HNM foi de $275,00 \text{ mgCOT} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e a taxa de remoção para carbono inorgânico no meio HNM foi equivalente a $125,00 \text{ mgCI} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Tabela 1).

Tal resultado possivelmente reforça a hipótese de que o efeito do estresse térmico devido a metodologia empregada durante a cinética de remoção de nitrogênio amoniacal e carbono aliado a possível presença de fatores inibitórios, possa ter resultado na queda da taxa de remoção de nitrogênio amoniacal e carbono no sistema EF, pois mesmo que este meio não favoreça o processo NH/DA e que tenha concentrações de outros poluentes nocivos à microbiota, esta respondeu positivamente nas primeiras 2 horas de experimento e depois estagnou, só voltando a responder novamente após não ser perturbada por 6 horas. Durante o período de aclimação ao sal, foram necessárias 72 horas de aclimação no EF para alcançar uma eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal de 56,7%. Após os 30 dias de adaptação, antes dos ensaios de cinética, o EF alcançou 50% de eficiência de remoção de nitrogênio

amoniacoal em 18 horas. Este resultado evidencia a melhoria da eficiência do sistema após um determinado tempo de adaptação.

Após analisarmos o ensaio de cinética de degradação em dois momentos distintos, observamos que durante as três horas iniciais do experimento, foi onde ocorreu a maior eficiência de remoção de nitrogênio amoniacoal e carbono, quando analisamos o segundo momento do ensaio de cinética (3-24horas), observamos uma queda vertiginosa nos valores das eficiências de remoção em ambos os tratamentos, o meio HNM teve uma diminuição de $41,47 \text{ mgNH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em sua eficiência de remoção, assim como os parâmetros carbono orgânico e inorgânico onde ocorreu uma diminuição de $258,49 \text{ mgCO} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e $119,84 \text{ mgCI} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ respectivamente, onde o último valor está relacionado ao aumento na concentração de carbono inorgânico presente no meio HNM.

Ao analisarmos o meio EF, observamos o mesmo comportamento onde do intervalo 1 para o intervalo 2 tivemos uma diminuição na eficiência de remoção de $10,94$ para $0,27 \text{ mgNH}_4^+ \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, já o carbono orgânico teve uma diminuição na sua eficiência de remoção de $15,43$ para $3,38 \text{ mgCO} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e por último a eficiência de remoção para o carbono inorgânico variou de $12,17$ para $0,20 \text{ mgCI} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Desta forma conseguimos perceber através dos dados dispostos pela (tabela 1) juntamente com o auxílio da (figura 5) que o meio EF teve alguma interferência devido ao estresse térmico sofrido durante a cinética de degradação devido a metodologia empregada para a avaliação deste.

Quanto ao aumento do carbono inorgânico no meio HMN, acredita-se que seja devido a sua composição. O citrato, fonte de carbono disponível neste meio, é permeável a membrana citoplasmática, pela ação da enzima citrato permease, e posteriormente convertido à ácido oxalacético, um importante constituinte do ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs), resultando em gás carbônico e água. O CO_2 liberado pode reagir com o excesso de sódio presente no meio de cultivo e formar compostos alcalinizantes, como carbonato e bicarbonato de sódio, justificando assim o aumento de (CI) durante a realização do ensaio de cinética (Figura 5).

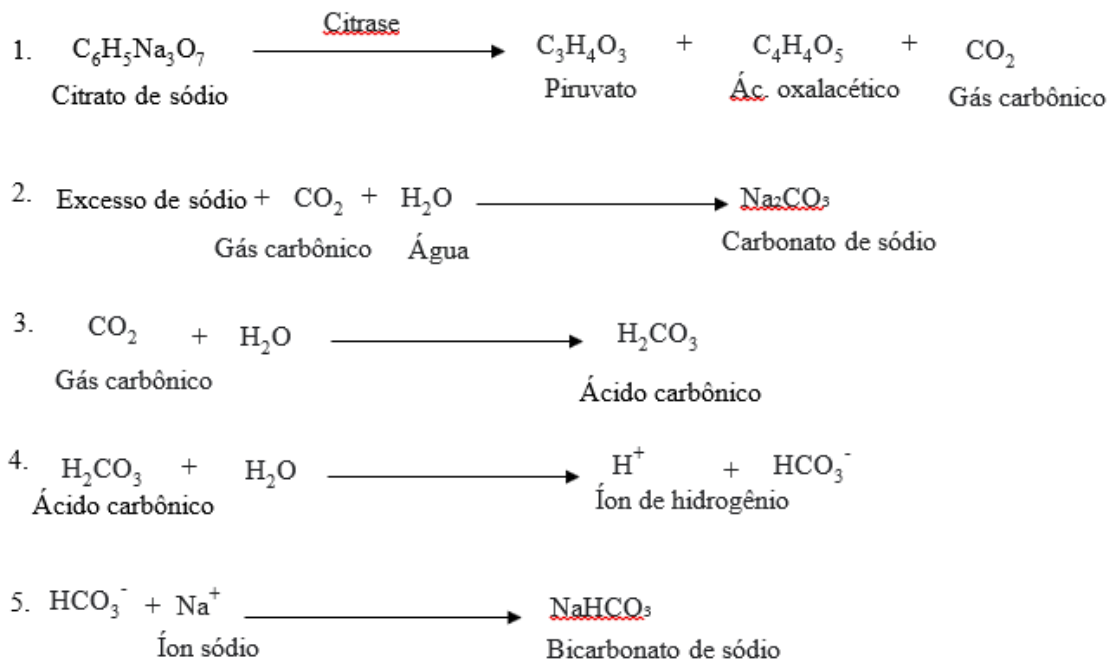


Figura 5: Possíveis reações envolvidas no metabolismo do citrato de sódio identificadas pelos números de 1 a 5. Nas reações 2 e 5 observamos as possíveis reações para formação de carbonato de sódio e bicarbonato de sódio respectivamente, importantes compostos alcalinizantes.

O etanol foi escolhido como fonte de carbono para o meio EF uma vez que é uma fonte mais barata em relação a outras fontes de carbono disponíveis no mercado, outro motivo é que o etanol é um subproduto da cadeia produtiva de petróleo, sendo assim de fácil acesso as estações de tratamento de efluentes.

Como podemos observar em todos os momentos do ensaio de cinética de degradação de nitrogênio amoniacal, a eficiência de remoção no meio HNM sempre foi estatisticamente superior ao meio EF (Figura 6). Isso provavelmente se deve ao fato do meio HNM proporcionar condições ótimas para o metabolismo de NH/DA, mais uma vez este resultado corroborou com nossa hipótese.

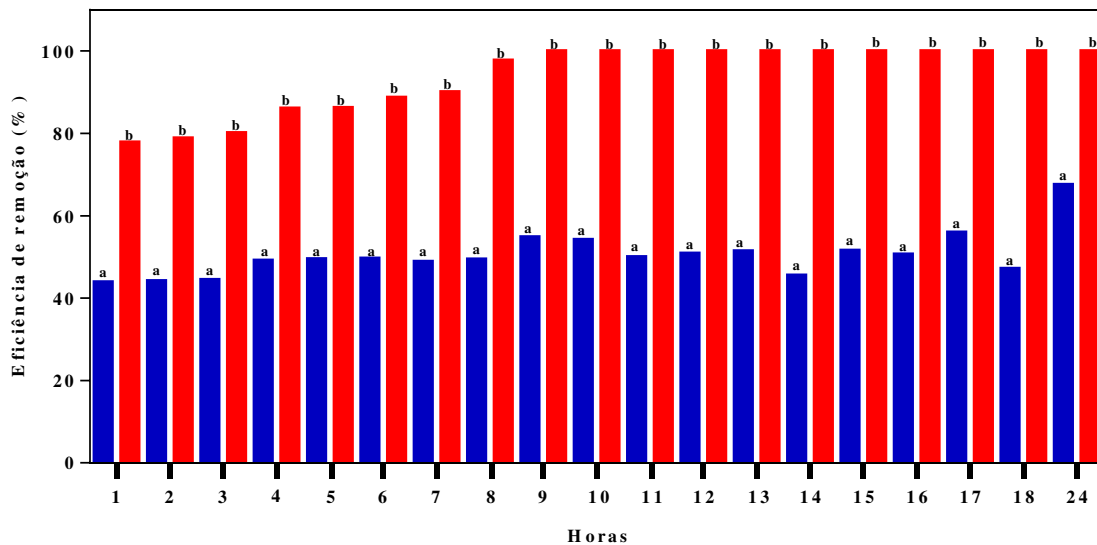


Figura 6: Comparação da taxa de remoção de nitrogênio amoniacal entre os meios de cultivo EF (■) e HNM (■) durante o ensaio de cinética. Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença estatística a 95% de confiança obtido por ANOVA seguida de teste de Tukey.

6. DIVERSIDADE MICROBIANA DURANTE O PERÍODO DE ACLIMATAÇÃO AO SAL EM MEIOS EF e HNM

6.1. COMPARAÇÃO DAS COMUNIDADES MICROBIANAS

A análise da PCoA foi realizada para compararmos a dinâmica das comunidades durante o gradual aumento da salinidade nos dois tratamentos (Figura 7).

No tratamento EF observou-se dois agrupamentos distintos com 76,69% de explicação da variação dos dados, onde só eixo X explicou 67% (Figura 7A). O primeiro agrupamento foi composto pelas amostras das comunidades com salinidade abaixo de 100 g.L⁻¹ de NaCl, que apresentaram uma maior dissimilaridade entre si, que o segundo agrupamento formado pelas amostras das comunidades que apresentaram a salinidade de 100 a 230 g.L⁻¹ de NaCl.

Já na PCoA referente ao tratamento HNM, o primeiro agrupamento foi formado somente pela triplicata da comunidade de 50 g.L⁻¹ de NaCl, seguido de um agrupamento formado pelas demais comunidades aclimatadas de 70 g.L⁻¹ a 250 g.L⁻¹ de NaCl (Figura 7B). Tal resultado mostrou que mesmo após a adição de sal, as comunidades microbianas ficaram menos dissimilares entre si, de forma que as triplicatas das diferentes concentrações se misturaram, não apresentando um padrão como observado no tratamento EF, onde as

triplicatas ficaram agrupadas próximas umas das outras (Figura 7A). Segundo Magurran (2004), quanto maior a dissimilaridade, maior a diferença na composição de espécies entre locais.

E os diagramas de *Venn* mostraram resultados semelhantes ao observado na análise de PCoA, verificou-se que a maioria das espécies presentes no tratamento HMN foi preservada durante o aumento da salinidade (Figura 8), enquanto no tratamento EF foi observado somente 6 espécies comuns quando comparamos as salinidades 50, 100 e 230 g.L⁻¹ de NaCl (Figura 8 e 9).

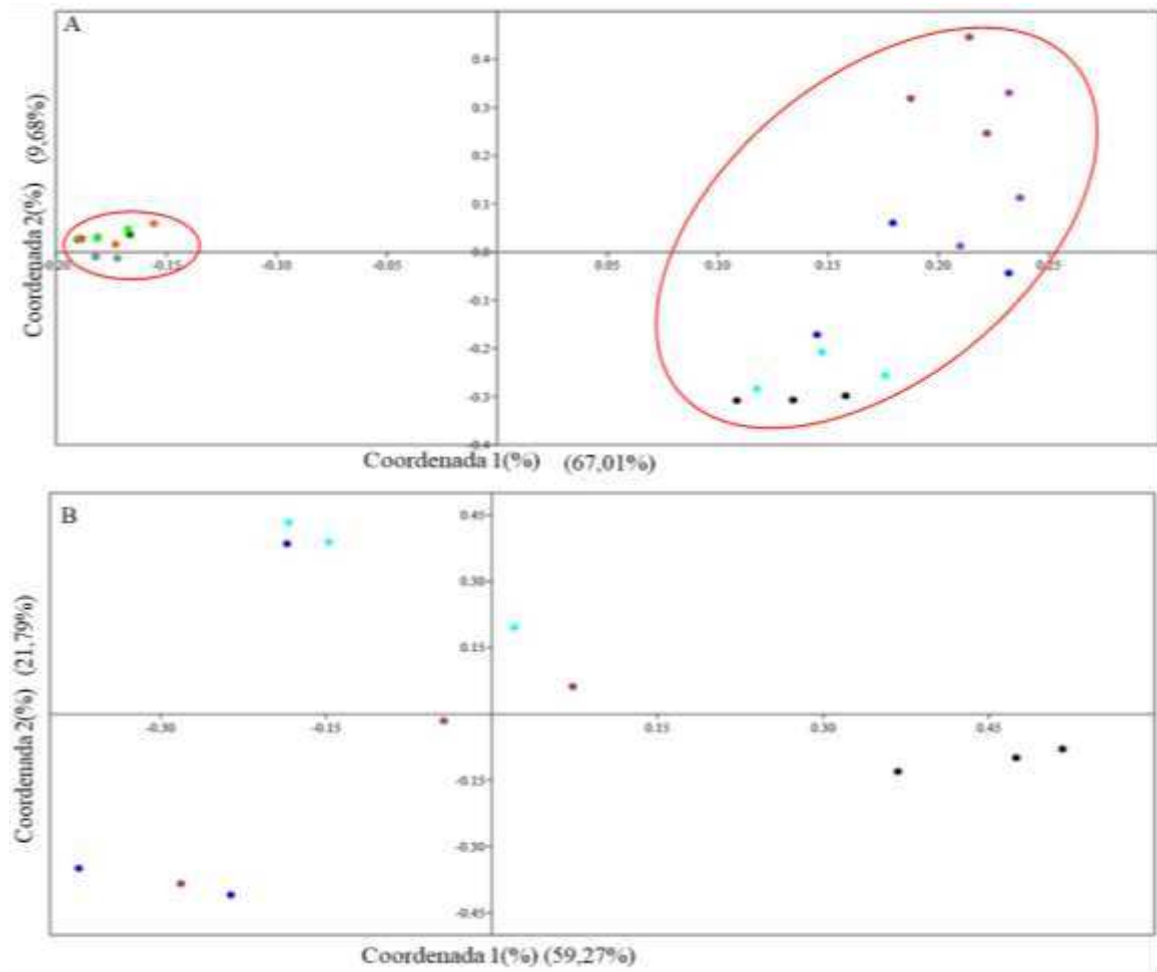


Figura 7: Análise de Coordenada Principal (PCoA) representando as relações entre as comunidades microbianas durante o processo de aclimação a nível de gênero 95%. A) Tratamento EF, sendo: (■) EF 50g.L⁻¹; (■) EF 65g.L⁻¹; (■) EF 70g.L⁻¹; (■) EF 75g.L⁻¹; (■) EF 90g.L⁻¹; (■) EF 100g.L⁻¹; (■) EF 215g.L⁻¹; (■) EF 220g.L⁻¹; (■) EF 225g.L⁻¹; (■) EF 230g.L⁻¹ NaCl. B) Meio HMN, sendo: (■) HNM 50g.L⁻¹; (■) HNM 70g.L⁻¹; (■) HNM 240g.L⁻¹; (■) HNM 250g.L⁻¹ NaCl.

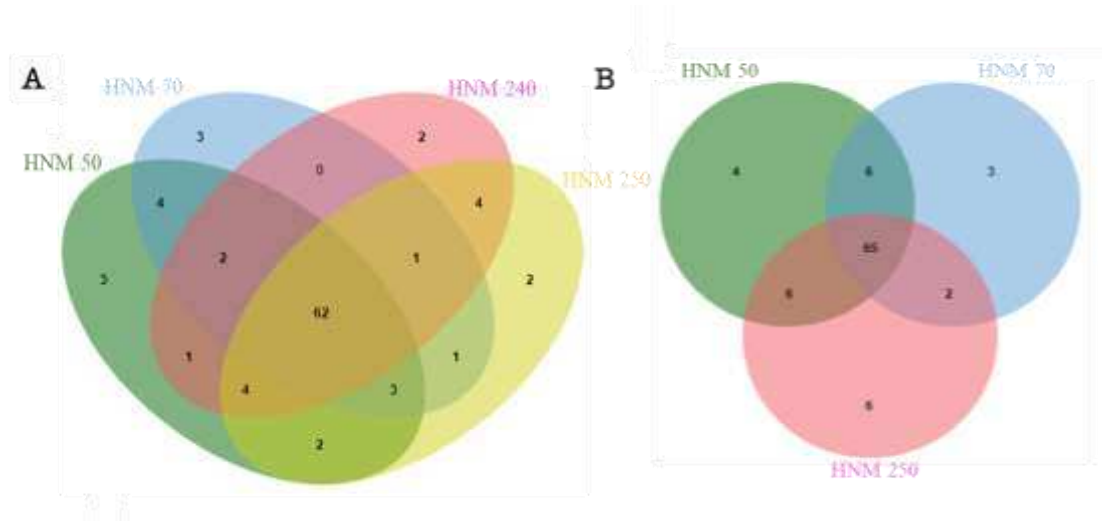


Figura 8: Diagrama de Venn das espécies bacterianas presentes em diferentes salinidades do meio HNM. **A)** (■) HNM 50g.L⁻¹; (■) HNM 70g.L⁻¹; (■) HNM 240g.L⁻¹; (■) 250g.L⁻¹ de NaCl. **B)** (■) HNM 50g.L⁻¹; (■) HNM 70g.L⁻¹; (■) HNM 250g.L⁻¹ de NaCl.

No tratamento HMN observou-se o compartilhamento de 62 espécies em todas as salinidades analisadas (Figura 8), acreditamos que isso se deva à estabilidade/ favorecimento promovido por este meio e a ausência de inibidores de crescimento, fator este que possivelmente favoreceu a manutenção destas espécies em todas as salinidades analisadas.

Enquanto no tratamento EF, é interessante observamos o compartilhamento de espécies entre as salinidades 50 a 90 g.L⁻¹ de NaCl (Figura 9 A) e entre as salinidades 100 a 230 g.L⁻¹ de NaCl (Figura 9 B). Entretanto, percebe-se que o número de espécies compartilhadas dentro das salinidades iniciais (Figura 9 A) é cinco vezes maior que nas salinidades maiores (Figura 9 B), mostrando que no meio EF o aumento da salinidade diminuiu consideravelmente a riqueza de espécies. O que já é observado na literatura quando vários autores colocam que o aumento da salinidade e a presença de inúmeros inibidores de crescimento no efluente são fatores que podem reduzir a diversidade de espécies presentes no lodo microbiano (Vendramel *et al.*, 2015; Rasheed *et al.*, 2011; Asatekin *et al.*, 2009).

Todavia, é fundamental ressaltar a capacidade que as espécies bacterianas encontradas nas salinidades 100 a 230 g.L⁻¹ de NaCl possuíram em se adaptar às condições adversas, onde ainda assim, conseguiram remover o nitrogênio amoniacal presente nas condições de cultivo utilizadas neste estudo. Dentre estas, destacaram-se gêneros bacterianos, que segundo a literatura são capazes de realizar o processo de NH/DA como, *Halomonas*, *Pseudomonas*,

Marinobacterium, *Marinobacter*, *Rizhobium* e *Cobetia* corroborando mais uma vez com nossa hipótese de que os microrganismos NH/DA são mais resistentes às condições adversas, como a elevada salinidade e a presença de inibidores de crescimento (Chen *et al.*, 2014, Zou *et al.*, 2016, Silva *et al.*, 2019, Huang *et al.*, 2020).

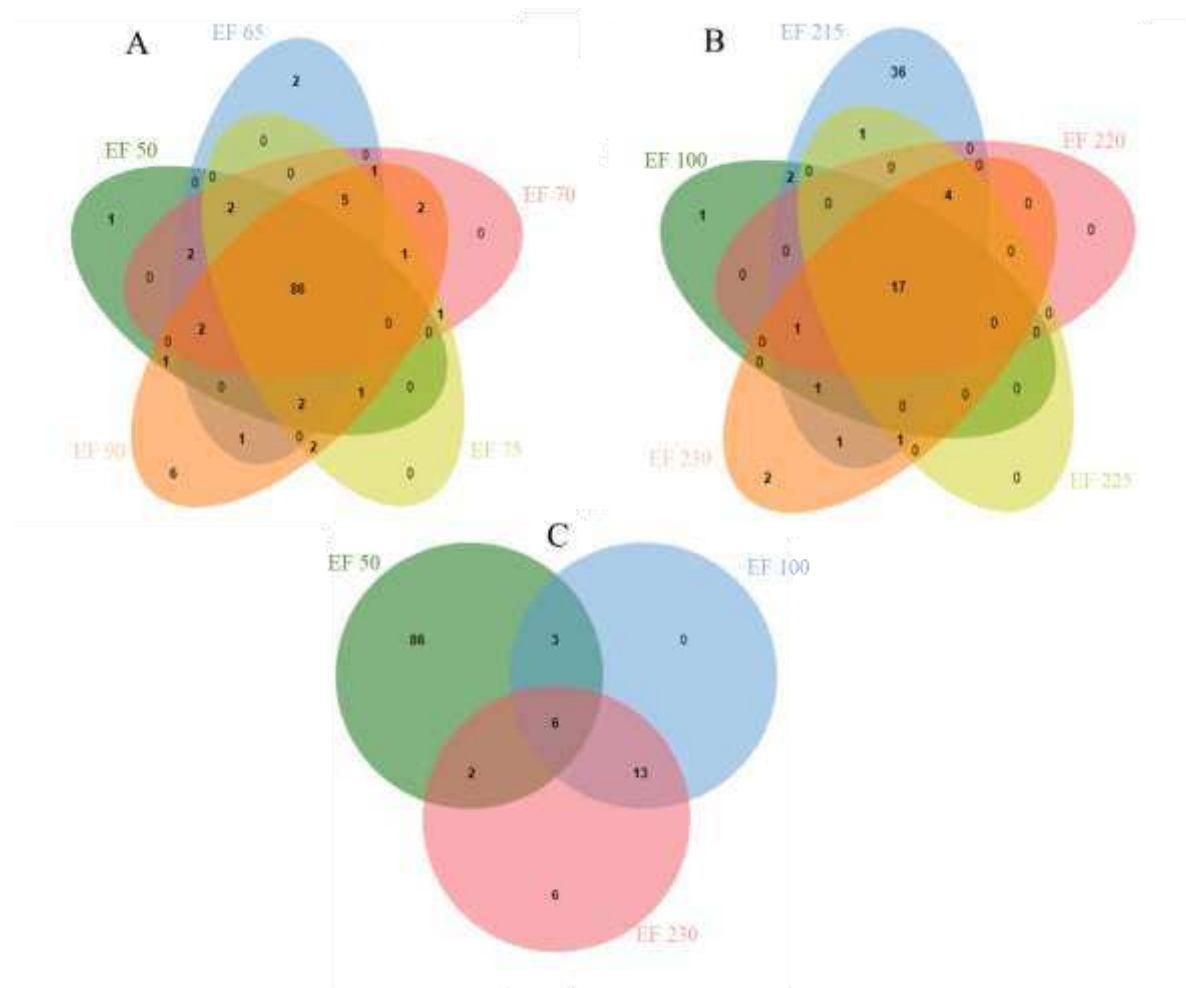


Figura 9: Diagrama de Venn das espécies bacterianas presentes em diferentes salinidades do meio EF. **A)** (■) EF 50 g.L⁻¹; (■) EF 65 g.L⁻¹; (■) EF 70 g.L⁻¹; (■) EF 75 g.L⁻¹; (■) EF 90 g.L⁻¹ de NaCl; **B)** (■) EF 100 g.L⁻¹; (■) EF 215 g.L⁻¹; (■) EF 220 g.L⁻¹; (■) EF 225 g.L⁻¹; (■) EF 230 g.L⁻¹ de NaCl; **C)** (■) EF 50 g.L⁻¹; (■) EF 100 g.L⁻¹; (■) EF 230 g.L⁻¹ de NaCl.

6.2 DIVERSIDADE E COMPOSIÇÃO DE GÊNEROS

A diversidade é composta pelo número de espécies em um local definido e o quanto similar as espécies são em abundância e, em um ambiente estabilizado, a tendência é que haja similaridade de abundância entre as diferentes espécies (Magurran *et al.*, 2004).

Em todos os pontos analisados observou-se uma grande porcentagem de *reads* pertencentes ao gênero *Halomonas* em comparação com os demais gêneros observados (Figuras 10, 11 e 12). Assim, no tratamento EF, a abundância deste gênero pode ser refletida no índice de diversidade de Simpson, que diminuiu a partir da salinidade de 100 g.L⁻¹ de NaCl, evidenciando a dominância de *Halomonas* nas comunidades bacterianas de salinidades mais elevadas (Tabela 2). Tal dominância, também foi sentida pelo índice de Shannon, onde a partir da salinidade de 100 g.L⁻¹ de NaCl observou-se uma diminuição do índice, ou seja, a diminuição da diversidade microbiana com o aumento da salinidade. Esta diminuição na diversidade era esperada devido aos elevados valores de salinidade e à presença de inibidores de crescimento que se encontram no meio de cultivo EF. O mesmo comportamento foi observado para os valores de riqueza de espécies observada e estimada, Taxa e Chao 1, respectivamente (Tabela 2).

O meio HNM, por proporcionar um ambiente mais estável e ausente de inibidores de crescimento em sua constituição, permitiu um melhor crescimento e manutenção das populações bacteriana. Tal estabilidade foi observada nos índices de diversidade e riqueza, que não apresentaram diferenças estatísticas entre as salinidades avaliadas (Tabela 2).

Em menor abundância, mas presente em todos os pontos analisados nos tratamentos EF e HMN, observou-se a presença de gêneros bacterianos capazes de realizarem o processo de NH/DA, como *Halomonas*, *Marinobacter*, *Marinobacterium*, *Paracoccus* e *Bosea* (Huang *et al.*, 2020). Junto com *Halomonas*, estes gêneros ficaram dentre os mais abundantes nas salinidades analisadas, considerando que o meio EF não era um meio de enriquecimento para NH/DA, fica evidente a relevância deste grupo para a remoção de nitrogênio amoniacal em condições de alta salinidade.

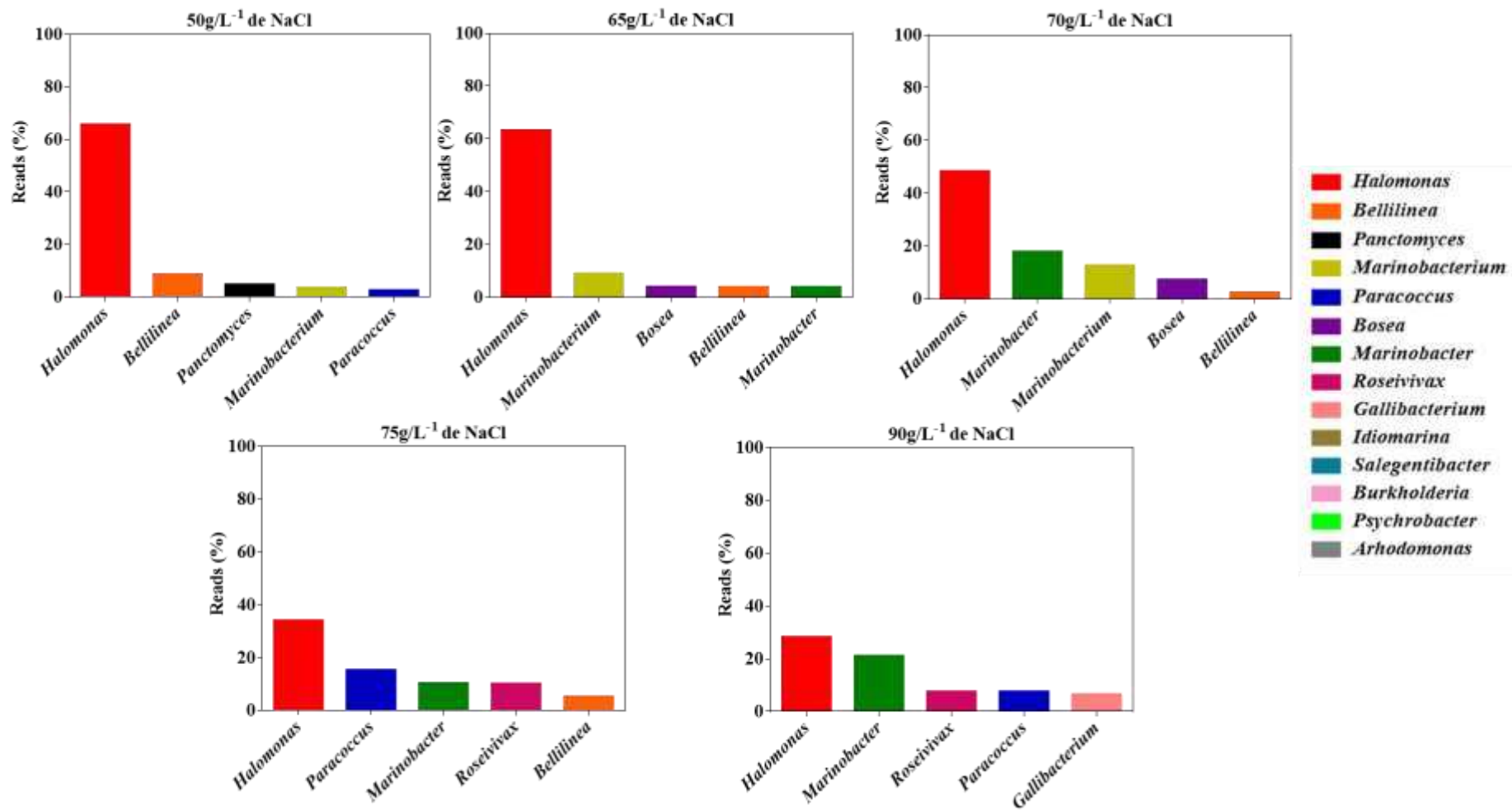


Figura 10: Abundância relativa dos cinco gêneros mais abundantes presentes nas comunidades microbianas nas salinidades de 50 a 90 g.L⁻¹ de NaCl do tratamento EF.

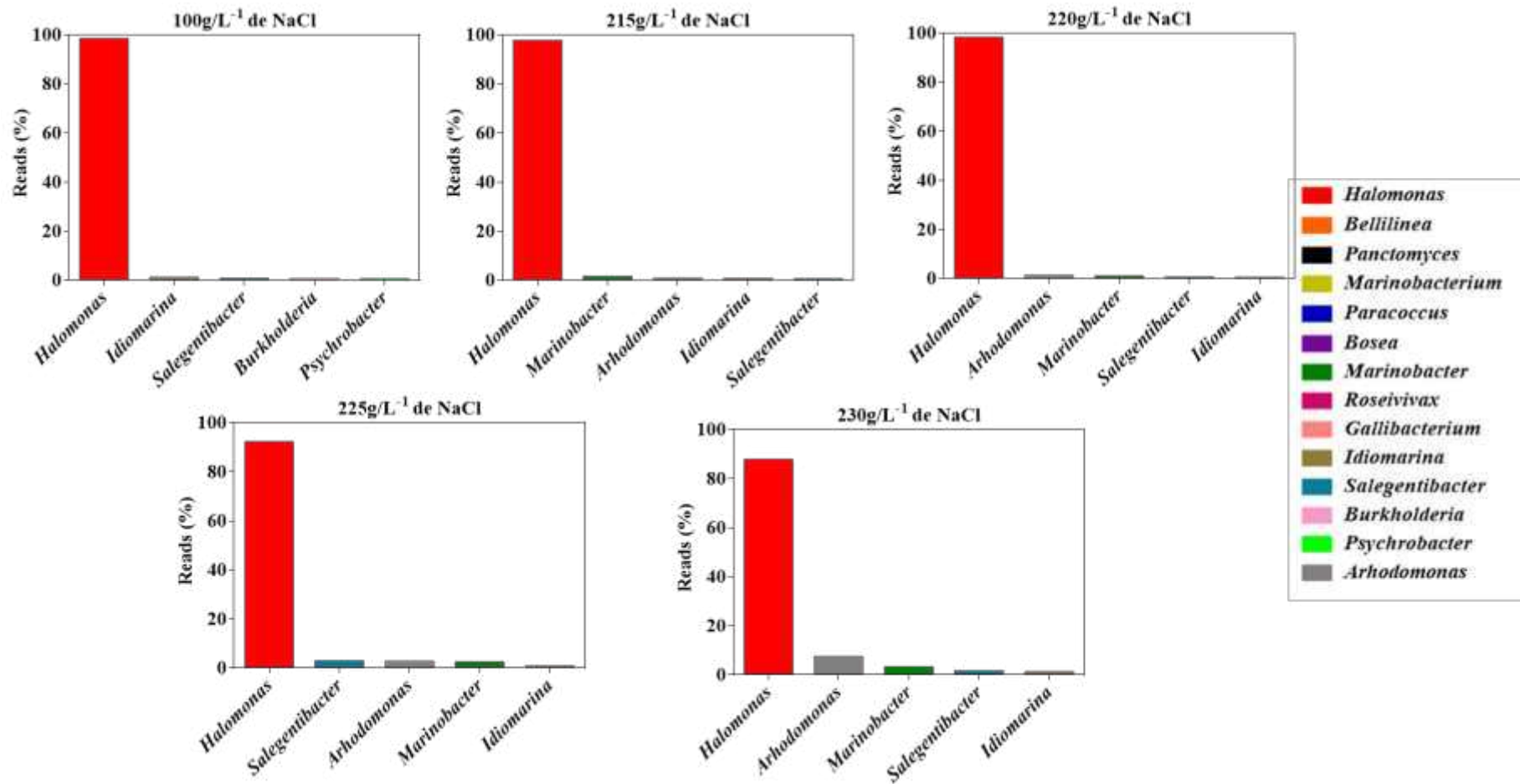


Figura 11: Abundância relativa dos cinco gêneros mais abundantes presentes nas comunidades microbianas nas salinidades de 100 a 230 g.L⁻¹ de NaCl do tratamento EF.

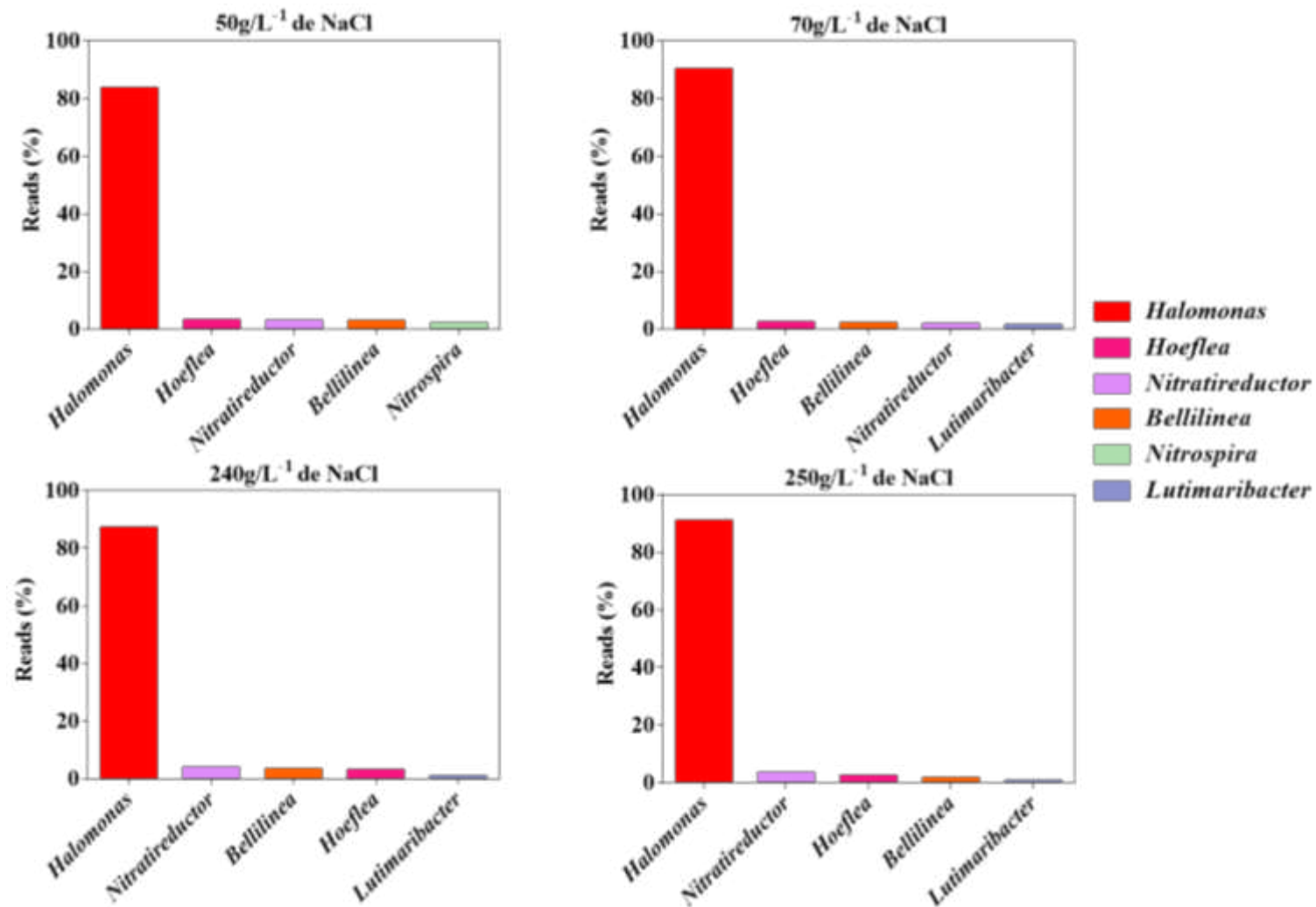


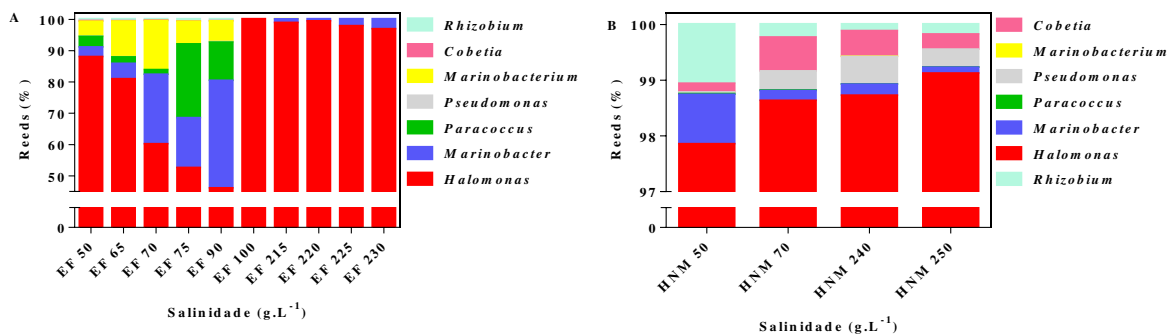
Figura 12: Abundância relativa dos cinco gêneros mais abundantes presentes nas comunidades microbianas em diferentes salinidades do tratamento HNM.

Tabela 2: Índices de diversidade microbiana a nível de espécie com 97% de similaridade.

Salinidade (g.L ⁻¹ NaCl)	Shannon	Simpson	Chao 1	Taxa
EFLUENTE				
50	2,64 ± 0,17	0,86 ± 0,03	90,07 ± 11,54	83,33 ± 7,23
65	2,66 ± 0,12	0,86 ± 0,02	100,67 ± 8,40	92,33 ± 8,02
70	2,77 ± 0,11	0,89 ± 0,02	97,34 ± 8,23	91,33 ± 2,08
75	2,82 ± 0,28	0,88 ± 0,05	104,64 ± 12,10	90,67 ± 2,52
90	2,90 ± 0,07	0,90 ± 0,01	97,32 ± 9,11	87,33 ± 8,50
100	0,99 ± 0,20**	0,42 ± 0,11**	19,67 ± 2,52**	19,00 ± 2,00**
215	0,98 ± 0,20**	0,45 ± 0,05**	43,81 ± 39,25**	33,33 ± 24,09**
220	0,88 ± 0,09**	0,42 ± 0,03**	17,92 ± 1,66**	16,67 ± 3,21**
225	1,16 ± 0,32**	0,51 ± 0,10**	22,17 ± 2,31**	21,00 ± 1,73**
230	1,21 ± 0,36**	0,55 ± 0,12**	23,67 ± 3,21**	22,00 ± 2,65**
HNM				
50	2,09 ± 0,12	0,79 ± 0,02	75,06 ± 4,56	67,33 ± 5,13
70	2,07 ± 0,00	0,81 ± 0,01	72,73 ± 5,62	61,00 ± 3,00
240	2,04 ± 0,09	0,80 ± 0,04	69,13 ± 11,67	60,00 ± 4,58
250	1,99 ± 0,14	0,80 ± 0,03	71,42 ± 4,39	62,67 ± 3,51

** Valores estatisticamente distintos a 95% de significância pelo teste Tukey.

Como dito anteriormente, em ambos os tratamentos se observou a presença dos gêneros *Halomonas*, *Cobetia*, *Marinobacterium*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Marinobacter* e *Rhizobium* (Figura 13). Esses gêneros são conhecidos pela capacidade de realizarem o processo de NH/DA, além da sua resistência a fatores físicos como pH extremo, baixa temperatura, metais pesados e alta salinidade (Chen *et al.*, 2014).

**Figura 13:** Abundância de gêneros capazes de realizarem o processo de NH/DA.

A) Tratamento efluente hipersalino (EF) e B) Tratamento HNM.

Em ambos os tratamentos, observou-se uma grande porcentagem de *reads* pertencentes ao gênero *Halomonas*. No meio EF, este gênero representou 45% do total de *reads* em todas as salinidades, aumentando ainda mais a partir da salinidade 100 g.L⁻¹ NaCl, e no meio HNM representou cerca de 98% de todas as *reads*.

A diminuição da diversidade de NH/DA é nítida durante o aumento da salinidade em ambos os tratamentos, mas percebe-se uma maior perda da diversidade no meio EF em relação ao meio HNM (Tabela 2).

Alguns gêneros de microrganismos NH/DA naturalmente apresentam ampla distribuição em ambientes salinos, o que possibilita a melhor adaptação deste grupo à altas concentrações de sal, sendo desta forma importantes recursos para o biotratamento de efluentes salinos (Ventosa *et al.*, 1998). Adicionalmente, Huang *et al.* (2020) mostraram que um dos possíveis motivos para se explicar a eficiência na remoção de nitrogênio amoniacal e a resistência destes microrganismos às condições adversas estão nas relações positivas desempenhadas entre eles. Estes pesquisadores observaram que algumas espécies dos gêneros *Halomonas*, *Cobetia* e *Marinobacterium*, gêneros estes também observados neste trabalho. Estes gêneros podem desenvolver relações positivas que auxiliam sua manutenção no meio de cultivo em que se encontram e assim, conseguir manter os níveis de remoção de nitrogênio amoniacal.

6.3. QUANTIFICAÇÃO DOS NITRIFICANTES AUTOTRÓFICOS

Na ausência de um marcador molecular para o metabolismo de NH/DA que nos pudesse confirmar o papel deste grupo na remoção de nitrogênio amoniacal em alta salinidades, foi utilizado o gene *amoA*, marcador dos microrganismos capazes de realizar a nitrificação autotrófica. Partimos da hipótese que com o aumento da salinidade ocorreria uma diminuição na abundância dos nitrificantes autotróficos nos meios EF e HNM.

Assim, como esperado o número de cópias para o gene *amoA* foi baixo em todas as amostras avaliadas, exceto na salinidade 100 g.L⁻¹ NaCl do tratamento EF. Este ponto obteve o maior número de cópias do gene analisado (1867 cópias), apesar de 64 vezes inferior ao número de cópias observado no controle positivo. Acreditamos que este aumento se deva a adição de carbonato de sódio ao meio de cultivo no dia 42 da aclimação, em que a contagem de células no tratamento EF teve um aumento no número de células total devido a adição deste alcalinizante (Figura 3). Apesar de não termos observado gêneros de nitrificantes autotróficos nesta amostra, foram encontradas duas famílias *Bradyrhizobiaceae* e *Chromatiaceae* que podem estar relacionadas ao processo convencional de nitrificação.

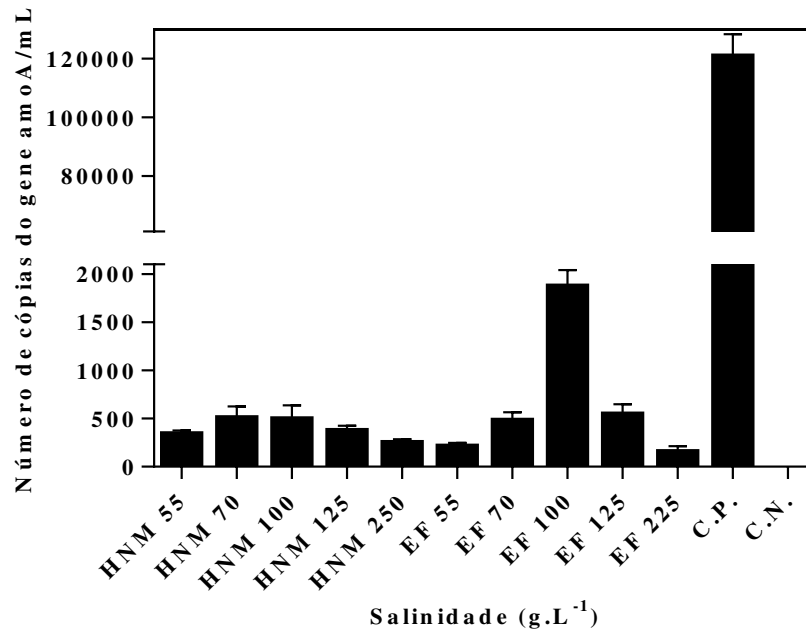


Figura 14: PCR digital dos tratamentos HNM e EF para a quantificação do número de cópias do gene *amoA* em mililitros. Onde: C.N.: controle negativo; C.P.: controle positivo.

Embora observado este alto número de cópias para *AmoA* na amostra de 100 g.L⁻¹ NaCl do tratamento EF, este número foi muito abaixo que o controle e não se manteve nas salinidades posteriores, nos levando a concluir que os nitrificantes autotróficos estão presentes, mas que não apresentam um papel relevante na remoção de nitrogênio amoniacal em altas salinidades.

6.4. REDE DE CORRELAÇÃO

As redes de correlação mostraram que o tratamento EF apresentou um baixo número de interações dentro das salinidades 50 a 70g/L⁻¹ de NaCl (A) e 70 a 90 g/L⁻¹ de NaCl (B) quando comparadas com a salinidade 100 a 230 g/L⁻¹ de NaCl. Na salinidade 100 a 230 g/L⁻¹ de NaCl (C) também foi possível observamos um maior número de nós pertencentes a gêneros NH/DA (Figura 15).

Os índices de diversidade mostraram a perda da diversidade de espécies presentes no meio EF. Após a salinidade de 100 g/L⁻¹ de NaCl, percebe-se que apesar da diminuição da riqueza de espécies (figura 10 A, B e C), as espécies que permaneceram ativas dentro das salinidades elevadas desenvolveram um número maior de interações entre si, o que provavelmente favoreceu a sua manutenção às condições de salinidade extrema.

O baixo número de interações em A e B possivelmente ocorreu devido às interações espécies-espécies do interior da comunidade, e não somente às variações provenientes do meio de cultivo, o que possivelmente provocou perda de interações devido a flutuação da diversidade de espécies (Ju *et al.*, 2015).

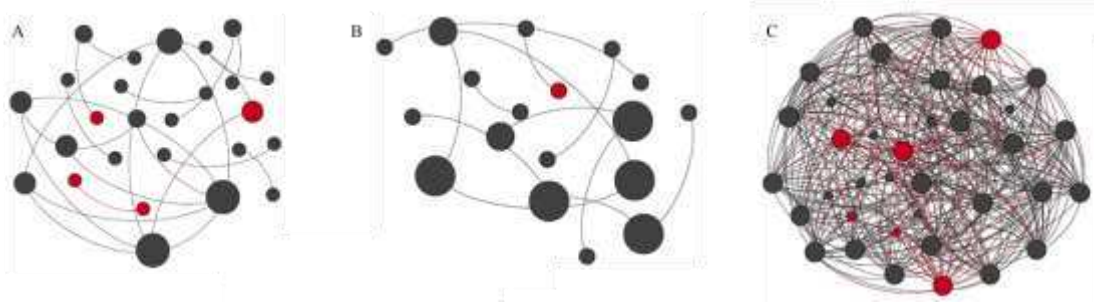


Figura 15: Rede de interações do tratamento EF. A) Salinidades de 50 a 70g/L⁻¹ de NaCl; B) Salinidades de 70 a 90 g/L⁻¹ de NaCl; C) Salinidades de 100 a 230g/L⁻¹ de NaCl. Gêneros capazes de realizarem NH/DA (●); Gêneros que não realizam o processo de NH/DA (●). Os respectivos tamanhos estão relacionados aos números de interações que cada gênero desempenha. Quanto maior o nó, maior o número de interações.

O número de interações positivas no meio EF (Figura 15) foi 64 vezes superior ao número de interações negativas presentes no mesmo, já no meio HNM (figura 16) o número de interações positivas foi o dobro do número de interações negativas. Indicando desta forma que as condições impostas pelos respectivos meios favoreceram a ocorrência de interações positivas entre os gêneros presentes nos meios utilizados.

Ao verificarmos o grande aumento de correlações entre os gêneros bacterianos observados na condição 100 a 230g/L⁻¹ de NaCl, acreditamos que possivelmente os gêneros que se mantiveram nesta condição estabeleceram interações positivas entre si para conseguirem sobreviver nesta condição adversa imposta pelo menos EF. Como observado por Huang *et al.* (2020), as relações cooperativas desempenhadas entre diferentes gêneros podem favorecer a manutenção destes e aumentar a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal do meio. Os gêneros *Marinobacterium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*, capazes de realizar o processo de NH/DA, incluindo os demais gêneros que se adaptaram a esta condição, mostraram um maior número de correlação entre si no meio EF (Figura 15C),

indicando que apesar da baixa abundância relativa (Figura 13), estes desempenharam relações com vários outros gêneros presentes neste meio.

Ademais, destaca-se a importância do processo de cooperação metabólica, processo este que pode ser desenvolvido por uma variedade de microrganismos, onde diferentes tipos de metabolismos bacterianos dependem um dos outros para a degradação de um certo tipo de substrato, através da transferência de um ou mais intermediários metabólicos (Moreira *et al.*, 2006).

Já no meio HMN, a ausência de condições estressantes, como inibidores de crescimento e compostos nocivos para a crescimento da microbiota, permitiu que os gêneros presentes não precisassem estabelecer correlações entre si para sobreviverem, resultando no baixo número de interações nitidamente observado na rede (Figura 16).

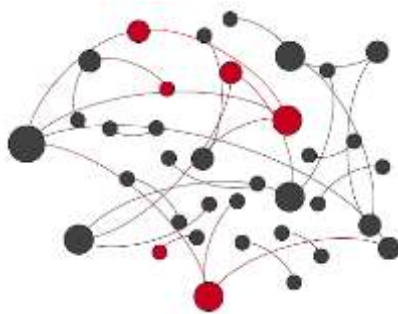


Figura 16: Rede de interações meio HNM nas salinidades 50 a 250g/L⁻¹. Onde: (●) representam gêneros capazes de realizarem NH/DA. Gêneros que não realizam o processo de NH/DA (●) e os seus respectivos tamanhos estão relacionados aos números de interações que cada gênero desempenha, quanto maior o nó maior o número de interações.

7. CONCLUSÕES

- Os resultados comprovaram a hipótese de que os microrganismos NH/DA são capazes de remover nitrogênio amoniacal em condições de alta salinidades que os nitrificantes autotróficos.

- A aclimação em batelada do lodo biológico em efluente do pré-sal (EF) com diluição de 1:2 (efluente:água) alcançou salinidade de 225 g.L⁻¹ de NaCl e eficiência média de remoção de nitrogênio amoniacal de 90%. A aclimação em batelada do lodo biológico em meio sintético específico para bactérias nitrificantes heterotróficas (meio de cultivo HNM)

alcançou, em menor tempo que EF, a salinidade de 245 g.L⁻¹ de NaCl e eficiência média de remoção de nitrogênio amoniacal de 98%.

- Os ensaios de cinética demonstraram a maior taxa de remoção de nitrogênio amoniacal no meio HNM que no meio EF, como esperado, visto a menor interferência do meio HNM, quando comparado ao efluente, além desse favorecer os microrganismos heterotróficos nitrificantes.

- A caracterização da diversidade da comunidade microbiana nos tratamentos EF e HNM foi realizada por microrganismos NH/DA, uma vez que não foram observados gêneros tipicamente relacionados a nitrificação autotrófica. Reforçando a maior capacidade de adaptação dos gêneros NH/DA, como *Halomonas*, *Paracoccus*, *Marinobacter*, *Marinobacterium*, *Cobetia* em ambientes com elevada salinidade. O gênero *Halomonas* foi predominante em todos os pontos avaliados.

- Devido o baixo número de cópias do gene *amoA* observado nos pontos avaliados pelo PCR digital, juntamente à baixa concentração de nitrato observada em ambos os tratamentos, pode-se concluir que a remoção de nitrogênio amoniacal presente em ambos os meios de cultivo foi realizada por microrganismos capazes de realizarem o processo de NH/DA.

8. REFERÊNCIAS

1. Ahn, Y. H. (2006). Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry*, v.41, p.1709-1721.
2. Amini, S.; Mowla, D.; Golkar, M.; Esmailzadeh, F. (2012). Mathematical modelling of a hydrocyclone for the down-hole oil-water separation (DOWS). *Chemical Engineering Research and Design*. 90, 2186-2195,
3. 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.
4. APHA, 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th ed. American Public Health Association, Washington, DC.
5. Asatekin, A., & Mayes, A. M. (2009). Oil industry wastewater treatment with fouling resistant membranes containing amphiphilic comb copolymers. *Environmental science & technology*, 43(12), 4487-4492.
6. Atlas, R. M. T. (1993). *Microbial ecology: fundamentals and applications*/Ronald M. Atlas and Richard Bartha.
7. Belkin, Shimshon, Asher Brenner, and Aharon Abeliovich. (1993). "Biological treatment of a high salinity chemical industrial wastewater." *Water Science and Technology* 27.7-8: 105-112.
8. BP. *British Petroleum Statistical Review of World Energy*. (2019). by solid-phase denitrification process. *Biotechnology Adv.*, 34, 1103-1112.
9. Chaney, A.L., Marbach, E.P., (1962). Modified Reagents for Determination of Urea and Ammonium, *Clinical chemistry*. 8, 130-132.
10. Charley, R. C., D. G. Hooper, and A. G. McLee. (1980). "Nitrification kinetics in activated sludge at various temperatures and dissolved oxygen concentrations." *Water Research* 14.10: 1387-1396.
11. 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*. *Bioresource. Technology*, 167, 456-461.
12. Chen, P., Li, J., Li, Q. X., Wang, Y., Li, S., Ren, T., & Wang, L. (2012). Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus sp. CPZ24*. *Bioresource Technology*, 116, 266-270.

13. Chen, Q., & Ni, J. (2011). Heterotrophic nitrification–aerobic denitrification by novel isolated bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(9), 1305-1310.
14. Chen, Q. and Ni J (2012). Ammonium removal by *Agrobacterium* sp. LAD9 capable of heterotrophic nitrification - aerobic denitrification. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 113, 619-623.
15. Corsino, S. F., Capodici, M., Di Pippo, F., Tandoi, V., & Torregrossa, M. (2019). Comparison between kinetics of autochthonous marine bacteria in activated sludge and granular sludge systems at different salinity and SRTs. *Water research*, 148, 425-437.
16. Dalmacija, B., Karlovic, E., Tamas, Z., Miskovic, D., (1996). Purification of high salinity wastewater by activated sludge process, *Water Research*. 2, 295-298.
17. Duan, J., Fang, H., Su, B., Chen, J., & Lin, J. (2015). Characterization of a halophilic heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacterium and its application on treatment of saline wastewater. *Bioresource technology*, 179, 421-428.
18. Eberl, L., & Vandamme, P. (2016). Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. *F1000Research*, 5.
19. Ferreira, B. (2016) Estudo dos processos de tratamento de água produzida de petróleo. BS Thesis. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
20. 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 de Doutorado, UFRN, Natal, RN, Brasil.
21. Guo, Y., Zhou, X., Li, Y., Li, K., Wang, C., Liu, J., ... & Xing, J. (2013). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Halomonas campisalis*. *Biotechnology letters*, 35(12), 2045-2049.
22. HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electrônica* 4(1): 9pp. 2001.
23. Hayat, S., *et al.* "Effect of long-term application of oil refinery wastewater on soil health with special reference to microbiological characteristics." *Bioresource Technology* 84.2 (2002): 159-163.
24. Huang, G., Ou, L., Pan, F., Wang, Y., Fan, G., Liu, G., & Wang, W. (2017). Isolation of a novel heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacterium *Serratia marcescens* *CL1502* from deep-sea sediment. *Environmental Engineering Science*, 34(6), 453-459.

25. Huang, X., Li, W., Zhang, D., & Qin, W. (2013). Ammonium removal by a novel oligotrophic *Acinetobacter* sp. Y16 capable of heterotrophic nitrification–aerobic denitrification at low temperature. *Bioresource technology*, 146, 44-50.
26. Huang, F., Pan, L., He, Z., Zhang, M., & Zhang, M. (2020). Identification, interactions, nitrogen removal pathways and performances of culturable heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria from mariculture water by using cell culture and metagenomics. *Science of The Total Environment*, 732, 139268.
27. Joo, H. S., Hirai, M., & Shoda, M. (2005). Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(2), 184-191.
28. Ju, F., & Zhang, T. (2015). Bacterial assembly and temporal dynamics in activated sludge of a full-scale municipal wastewater treatment plant. *The ISME journal*, 9(3), 683-695.
29. Kathiravan, V., & Krishnani, K. K. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* sp.: nitrifying aerobic denitrifiers have a plasmid encoding for denitrifying functional genes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(4), 1187-1198.
30. Khin, T., & Annachhatre, A. P. (2004). Novel microbial nitrogen removal processes. *Biotechnology advances*, 22(7), 519-532.
31. Lee, Y. W., Ong, S. K., & Sato, C. (1997). Effects of heavy metals on nitrifying bacteria. *Water Science and Technology*, 36(12), 69-74.
32. Lefebvre, O., & Moletta, R. (2006). Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: a literature review. *Water research*, 40(20), 3671-3682.
33. Lei, Y., Wang, Y., Liu, H., Xi, C., Song, L. (2015) A novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium, *Zobellella taiwanensis* DN-7, can remove high-strength ammonium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(9), 4219-4229.
34. Li, Y.T., Fu, L., Gao, Y.Z., Zhao, H.X., Zhou, W.Z., (2017). Aerobic-heterotrophic nitrogen removal through nitrate reduction and ammonium assimilation by marine bacterium *Vibrio* sp YI-5. *Bioresource technology*. 242, 334-343.
35. Lima, R. M. G. D., Wildhagen, G. R. D. S., Cunha, J. W. S. D. D., & Afonso, J. C. (2008). Remoção do íon amônio de águas produzidas na exploração de petróleo em áreas offshore por adsorção em clinoptilolita. *Química Nova*, 31, 1237-1242.

36. Liu, Y., Ai, G. M., Wu, M. R., Li, S. S., Miao, L. L., & Liu, Z. P. (2019). Photobacterium sp. NNA4, an efficient hydroxylamine-transforming heterotrophic nitrifier/aerobic denitrifier. *Journal of bioscience and bioengineering*, 128(1), 64-71.
37. Marazioti, C., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2003). Kinetic modeling of a mixed culture of *Pseudomonas denitrificans* and *Bacillus subtilis* under aerobic and anoxic operating conditions. *Water Research*, 37(6), 1239-1251.
38. Marazioti, C., Kornaros, M., Lyberatos, G., (2003). Kinetic modeling of a mixed culture of *Pseudomonas denitrificans* and *Bacillus subtilis* under aerobic and anoxic operating conditions. *Water Res.* 37, 1239–1251.
39. Measures, J.C., (1975). Role of amino acids in osmoregulation of nonhalophilic bacteria, *Nature*. 257, 398-400.
40. Metcalf, W. (2003). *Metcalf and Eddy wastewater engineering: treatment and reuse*. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse McGraw Hill. New York, NY, 384.
41. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2016). *Microbiologia de Brock-14ª Edição*. Artmed Editora.
42. Moreira, F. D. S., & Siqueira, J. O. (2006). *Microbiologia e bioquímica do solo*. UFLA, Lavras.
43. Narkis, N., Rebhun, M., & Sheindorf, C. H. (1979). Denitrification at various carbon to nitrogen ratios. *Water Research*, 13(1), 93-98.
44. Oliveira, A. C. D. G. (2012). Bactérias heterotróficas e autotróficas envolvidas na remoção de nitrogênio de lixiviado de aterro sanitário em reator de leito móvel (Doctoral dissertation, Dissertação de mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Edificações e Saneamento do Centro de Tecnologia e Urbanismo. Universidade Estadual de Londrina–UEL).
45. Padhi, S. K., Tripathy, S., Mohanty, S., & Maiti, N. K. (2017). Aerobic and heterotrophic nitrogen removal by *Enterobacter cloacae* CF-S27 with efficient utilization of hydroxylamine. *Bioresource Technology*, 232, 285-296.
46. Pan, Z., Zhou, J., Lin, Z., Wang, Y., Zhao, P., Zhou, J., ... & He, X. (2020). Effects of COD/TN ratio on nitrogen removal efficiency, microbial community for high saline wastewater treatment based on heterotrophic nitrification-aerobic denitrification process. *Bioresource Technology*, 301, 122726.
47. Patin, S. A. (1999). *Environmental impact of the offshore oil and gas industry* (Vol. 1). East Nortport, NY: EcoMonitor Pub.

48. Quartaroli, L., Silva, L. C. F., Silva, C. M., Lima, H. S., de Paula, S. O., de Oliveira, V. M., ... & da Silva, C. C. (2017). Ammonium removal from high-salinity oilfield-produced water: assessing the microbial community dynamics at increasing salt concentrations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(2), 859-870.
49. Rasheed Q.J., Pandian K. and Muthukumar K. (2011), Treatment of petroleum refinery wastewater by ultrasound-dispersed nanoscale zero-valent iron particles, *Ultrason. Sonochem.*, 18, 1138-1142.
50. Radelyuk, I., Tussupova, K., Zhapargazinova, K., Yelubay, M., & Persson, M. (2019). Pitfalls of wastewater treatment in oil refinery enterprises in Kazakhstan—a system approach. *Sustainability*, 11(6), 1618.
51. Ray, J. P. (Ed.). (1992). *Technological-Environmental Issues and Solutions*. Plenum Press.
52. Reinbold, K. A., & Pescitelli, S. M. (1982). Effects of exposure to ammonia on sensitive life stages of aquatic organisms. INHS Center for Aquatic Ecology.
53. Robertson, L. A., & Kuenen, J. G. (1984). Aerobic denitrification: a controversy revived. *Archives of Microbiology*, 139(4), 351-354.
54. Robles-Porchas, G. R., Gollas-Galván, T., Martínez-Porchas, M., Martínez-Cordova, L. R., Miranda-Baeza, A., & Vargas-Albores, F. (2020). The nitrification process for nitrogen removal in biofloc system aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 12(4), 2228-2249.
55. Rothauwe, J. H., Witzel, K. P., & Liesack, W. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and environmental microbiology*, 63(12), 4704-4712.
56. Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591-611.
57. Shoda, M., & Ishikawa, Y. (2014). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification of high-strength ammonium in anaerobically digested sludge by *Alcaligenes faecalis* strain No. 4. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(6), 737-741.
58. Silva, L. C. F., Lima, H. S., de Oliveira Mendes, T. A., Sartoratto, A., de Paula Sousa, M., de Souza, R. S., ... & da Silva, C. C. (2019). Heterotrophic nitrifying/aerobic denitrifying bacteria: Ammonium removal under different physical-chemical conditions and molecular characterization. *Journal of Environmental Management*, 248, 109294.

59. Silva, L. C. F., Lima, H. S., de Oliveira Mendes, T. A., Sartoratto, A., Sousa, M. P., de Souza, R. S., ... & Silva, C. C. (2020). Physicochemical characterization of *Pseudomonas stutzeri* UFV5 and analysis of its transcriptome under heterotrophic nitrification/aerobic denitrification pathway induction condition. *Scientific Reports*, 10(1), 1-13.
60. Silva, Lívia Carneiro Fidelis. (2019) "Heterotrophic nitrifying/aerobic denitrifying bacteria: Ammonium removal under different physical-chemical conditions and molecular characterization." *Journal of environmental management* 248: 109294.
61. Smith, V. H., & Schindler, D. W. (2009). Eutrophication science: where do we go from here?. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(4), 201-207.
62. Spínola, A. L. G. (2015). Biofilmes aeróbios para remoção de nitrogênio em células de fluxo, submetidos a diferentes velocidades superficiais e taxas de carregamento (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
63. Third, K. A., Gibbs, B., Newland, M., & Cord-Ruwisch, R. (2005). Long-term aeration management for improved N-removal via SND in a sequencing batch reactor. *Water Research*, 39(15), 3523-3530.
64. United States Environmental Protection Agency (USEPA) (1993). Manual for Nitrogen control. EPA/625/R-93/010. Washington, DC: U. S. Government Printing Office.
65. Uygur, A., & Kargı, F. (2004). Biological nutrient removal from pre-treated landfill leachate in a sequencing batch reactor. *Journal of Environmental Management*, 71(1), 9-14.
66. Vendramel, S., Bassin, J. P., Dezotti, M., & Sant'Anna Jr, G. L. (2015). Treatment of petroleum refinery wastewater containing heavily polluting substances in an aerobic submerged fixed-bed reactor. *Environmental Technology*, 36(16), 2052-2059.
67. Ventosa, A., Nieto, J.J., Oren, A., (1998). Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*. 62 (2), 504–544.
68. Verstraete, W., & Alexander, M. (1972). Heterotrophic nitrification by *Arthrobacter sp.* *Journal of Bacteriology*, 110(3), 955-961.
69. Vieira, V. (2011). Água, produzida no Segmento onshore de petróleo—caracterização de cenários na Bahia e prospecção de soluções para gerenciamento. Apresentado como dissertação de mestrado do Centro de pesquisa em geofísica e geologia, Instituto de Geociências. Salvador: Universidade Federal da Bahia (UFBA).

70. Wan, C., Yang, X., Lee, D.J., Du, M., Wan, F., Chen, C. (2011) Aerobic denitrification by novel isolated strain using as nitrogen source. *Bioresource Technology*. 102(15), 7244-7248.
71. Wang, J., & Chu, L. (2016). Biological nitrate removal from water and wastewater by solid-phase denitrification process. *Biotechnology Advances*, 34(6), 1103-1112.
72. Wang *et al.*, 2017 J.L. Wang, B.Z. Gong, W. Huang, Y.M. Wang, J. Zhou (2017) Bacterial community structure in simultaneous nitrification, denitrification and organic matter removal process treating saline mustard tuber wastewater as revealed by 16S rRNA sequencing. *Bioresource Technology*. 228, 31-38.
73. Wang, J., Gong, B., Wang, Y., Wen, Y., Zhou, J., & He, Q. (2017). The potential multiple mechanisms and microbial communities in simultaneous nitrification and denitrification process treating high carbon and nitrogen concentration saline wastewater. *Bioresource Technology*, 243, 708-715.
74. Watson, S. W. (1974). In “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” (R. E. Buchanan and N. E. Gibbons, eds.), 8th edn, pp. 450-456. Williams and Wilkins, Baltimore.
75. Wunderlin P, Mohn J, Joss A, Emmenegger L, Siegrist H (2012) Mechanisms of N₂O production in biological wastewater treatment under nitrifying and denitrifying conditions. *Water Research*, 46: 1027–1037.
76. Xia, L., Li, X., Fan, W., & Wang, J. (2020). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Acinetobacter* sp. ND7 isolated from municipal activated sludge. *Bioresource technology*, 301, 122749.
77. Xu, Y., He, T., Li, Z., Ye, Q., Chen, Y., Xie, E., Zhang, X. (2017). Nitrogen removal characteristics of *Pseudomonas putida* Y-9 capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature. *BioMed Research International*.
78. 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. *Bioresource technology*., 102(2), 854-862.
79. 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. *Bioresource technology*., 139, 80-86.

80. Yao, S., Ni, J.R., Chen, Q., Borthwick, A.G.L., (2013). Enrichment and characterization of a bacteria consortium capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature. *Bioresource technology*. 127, 151- 157.
81. Zhang, H., Zhao, Z., Chen, S., Kang, P., Wang, Y., Feng, J., ... & Xu, L. (2018). *Paracoccus versutus* KS293 adaptation to aerobic and anaerobic denitrification: Insights from nitrogen removal, functional gene abundance, and proteomic profiling analysis. *Bioresource technology*, 260, 321-328.
82. Zhang, J., Wu, P., Hao, B., Yu, Z. (2011) Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. *Bioresource technology*, 102(21), 9866-9869.
83. 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. *Bioresource technology*., 108, 35-44.
84. Zhang, S., Sha, C., Jiang, W., Li, W., Zhang, D., Li, J., ... & Piao, Y. (2015). Ammonium removal at low temperature by a newly isolated heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas fluorescens* wsw-1001. *Environmental technology*, 36(19), 2488-2494.
85. Zhao J, Wang X, Li X, Jia S, Wang Q, Peng Y (2019) Improvement of partial nitrification endogenous denitrification and phosphorus removal system: balancing competition between phosphorus and glycogen accumulating organisms to enhance nitrogen removal without initiating phosphorus removal deterioration. *Bioresource Technology* 281: 382–391.
86. Zhao, B., He, Y.L., Hughes, J., Zhang, X.F., (2010). Heterotrophic nitrogen removal by a newly isolated *Acinetobacter calcoaceticus* HNR. *Bioresource technology*. 101, 5194-5200.
87. Zhu, H., Yan, B., Xu, Y., Guan, J., & Liu, S. (2014). Removal of nitrogen and COD in horizontal subsurface flow constructed wetlands under different influent C/N ratios. *Ecological Engineering*, 63, 58-63.