

LÍVIA CARNEIRO FIDÉLIS SILVA

**NITRIFICAÇÃO HETEROTRÓFICA/DESNITRIFICAÇÃO AERÓBIA:  
CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS E INVESTIGAÇÃO DAS VIAS  
METABÓLICAS**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2018

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

T

S586n  
2018  
Silva, Lívia Carneiro Fidélis, 1989-  
Nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia :  
caracterização de isolados e investigação das vias metabólicas /  
Lívia Carneiro Fidélis Silva. – Viçosa, MG, 2018.  
xi, 91f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Cynthia Canêdo da Silva.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Nitrificação. 2. Desnitrificação. 3. Petróleo - Prospecção.  
4. Amônia. 5. Resíduos industriais. 6. Águas residuais -  
Purificação - Processo de lodo ativado. 7. Expressão gênica.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Microbiologia Agrícola. Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 628.354

LÍVIA CARNEIRO FIDÉLIS SILVA

**NITRIFICAÇÃO HETEROTRÓFICA/DESNITRIFICAÇÃO AERÓBIA:  
CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS E INVESTIGAÇÃO DAS VIAS  
METABÓLICAS**

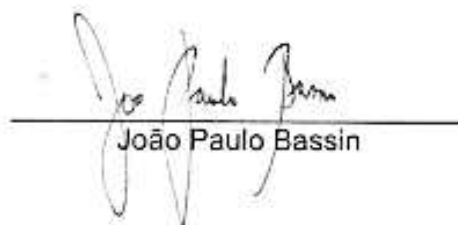
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

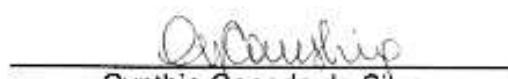
APROVADA: 18 de setembro de 2018.

  
Mauricio Dutra Costa  
(Coorientador)

  
Tiago Antonio de Oliveira Mendes  
(Coorientador)

  
Roberto Sousa Dias

  
João Paulo Bassin

  
Cynthia Canedo da Silva  
(Orientadora)

*Dedico esta tese aos meus pais, Ana Lúcia e Gilmar, e à minha irmã, Luísa.  
A eles, todo meu amor e minha gratidão.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser tão grandioso e tão presente em minha vida; por ter me permitido chegar até aqui, me abençoando e guiando meus passos, indicando sempre a melhor direção.

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

À minha irmã Luísa, pelo apoio e amor de sempre; pelas risadas e companheirismo nesses últimos dois anos morando juntas, que tornaram meus dias mais leves e divertidos.

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

Ao Igor, amor da minha vida, por todo amor, carinho, companheirismo e compreensão durante todos esses anos, desde o mestrado. Obrigada por tanto!

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Cynthia, pela oportunidade e confiança em mim depositada, desde a iniciação científica até aqui no doutorado. Sempre serei grata por todos esses anos de convivência e de orientação!

Ao Prof. Sérgio, por ter aberto as portas do LIVM para que eu pudesse começar a jornada na pesquisa e por todos os ensinamentos durante esses anos.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e pelas contribuições.

À Helena, minha amiga gaga preferida, sempre comigo nos melhores e piores experimentos. Obrigada por me aguentar todos os dias da semana e fazerem deles mais descontraídos e gordos.

À minha amiga Mariana, a pessoa mais divertida que conheço, que consegue transformar dias difíceis de trabalho em risadas na certa! Obrigada por estar comigo na graduação, no laboratório e na vida!

Aos amigos do LIVM, aos que já saíram e aos que ainda estão por lá, por terem feito parte dessa experiência maravilhosa, por tornar os dias mais

divertidos e contribuírem direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

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

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

À Universidade Federal de Viçosa e Departamento de Microbiologia pela oportunidade de realizar o doutorado.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia e de outros Departamentos da UFV que ministraram as disciplinas que cursei durante o doutorado, pelos ensinamentos durante este período.

Aos funcionários e técnicos da UFV, principalmente os do Departamento de Microbiologia, por toda disponibilidade e ajuda sempre que necessário.

À CAPES, pela bolsa concedida, e à FAPEMIG e à Petrobrás, pelo financiamento do projeto.

Enfim, o meu muito obrigado a todos que contribuíram para que esse trabalho fosse concluído!

## **BIOGRAFIA**

Lívia Carneiro Fidélis Silva, nascida em 11 de setembro de 1989, natural de Carangola, Estado de Minas Gerais, filha de Gilmar Fernandes da Silva e Ana Lúcia Carneiro Fidélis Silva. cursou o ensino fundamental na Escola Estadual Nascimento Leal, situada em Alvorada, distrito de Carangola. Em 2004 ingressou na Escola Estadual Emília Esteves Marques, localizada na mesma cidade, onde concluiu o ensino médio. Formou-se em Bacharel em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa (UFV) no ano de 2013. Durante a graduação, foi estagiária do Laboratório de Imunovirologia Molecular, onde teve bolsa de iniciação científica pela FUNARBE durante seis meses e bolsa de iniciação científica pela PETROBRÁS durante dois anos. No segundo semestre de 2013, ingressou no Mestrado no programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, UFV, obtendo o título de mestre em julho de 2015. Em agosto do mesmo ano, começou o Doutorado em Microbiologia Agrícola na mesma instituição. Os resultados obtidos durante a iniciação científica, mestrado e doutorado foram apresentados em diferentes congressos de âmbito regional, nacional e internacional, bem como em artigos científicos.

## RESUMO

SILVA, Livia Carneiro Fidélis, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2018. **Nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia: caracterização de isolados e investigação das vias metabólicas.** Orientadora: Cynthia Canedo da Silva. Coorientadores: Sérgio Oliveira de Paula, Mauricio Dutra Costa e Tiago Antonio de Oliveira Mendes.

A água de produção proveniente do processo de extração de petróleo contém elevadas concentrações de amônia. Despejos desses efluentes podem ser prejudiciais ao meio ambiente e, por isso, antes de ser descartado, o efluente deve ser tratado. A remoção biológica de amônia pode ocorrer por diferentes vias: a nitrificação autotrófica aeróbia, seguida da desnitrificação anaeróbia (processos convencionais), que é uma via bem conhecida e consolidada, onde cada etapa é realizada por diferentes microrganismos, e a nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia (NH/DA), onde um único microrganismo heterotrófico é capaz de realizar as duas etapas em condições de aerobiose, conferindo vantagens em relação à nitrificação e à desnitrificação convencionais para aplicação em estações de tratamento de efluentes. Porém, pouco se sabe sobre esse processo e sobre os microrganismos que o realizam. Assim, visando à otimização da remoção de amônia nas estações de tratamento, os objetivos deste trabalho foram isolar e identificar microrganismos capazes de realizar o processo de NH/DA de amostra de lodo ativado, avaliar a influência de fatores físico-químicos sobre a remoção de amônia, e investigar as possíveis vias de remoção de amônia através do estudo do transcriptoma de um dos isolados capazes de realizar a NH/DA. Foram identificados seis isolados bacterianos nitrificantes heterotróficos/desnitrificantes aeróbios capazes de converter 100 % de amônia em  $N_2$  em até 72 horas. Dos seis isolados, três foram identificados como *Pseudomonas balearica*, e os outros como *Rhodococcus ruber*, *Pseudomonas stutzeri* e *Gordonia amicalis*. Eles apresentaram perfil de resposta diferente em relação aos fatores físico-químicos estudados, porém, todos exibiram alta eficiência de remoção de amônia em diferentes fontes de carbono, relação C/N, concentrações salinas, pH e temperatura. O balanço de nitrogênio mostrou que, aproximadamente, 55 % de toda a amônia removida pelos isolados foi perdida na forma de  $N_2$ , e 45 % foi

assimilada na biomassa microbiana. Não foi possível detectar por PCR e genômica comparativa, os genes envolvidos no processo de nitrificação autotrófica no genoma dos isolados, entretanto, os genes do processo de desnitrificação anaeróbia foram detectados nas espécies do gênero *Pseudomonas*, que também realizam esse processo, sugerindo o envolvimento de outras enzimas na via de NH<sub>4</sub>DA. O estudo do transcriptoma do isolado *P. stutzeri* 2v em condição de indução das vias de remoção de amônia mostrou que os genes envolvidos nos processos convencionais não estão envolvidos na NH<sub>4</sub>DA, e que houve mudança na maquinaria de biossíntese e tradução proteica da célula, indicando que outros genes foram expressos durante o processo, possivelmente aqueles envolvidos na NH<sub>4</sub>DA. Foi observado também aumento na expressão de genes envolvidos em processos de óxido-redução, que podem estar diretamente envolvidas na NH<sub>4</sub>DA. Este trabalho mostrou que os isolados identificados possuem potencial para aplicação em estações de tratamento de efluentes visando a otimização do processo biológico de remoção de amônia, e que as enzimas envolvidas no processo de NH<sub>4</sub>DA são diferentes daquelas observadas nos processos convencionais.

## ABSTRACT

SILVA, Livia Carneiro Fidélis, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2018. **Heterotrophic nitrification/aerobic denitrification: isolated characterization and investigation of metabolic pathways.** Adviser: Cynthia Canedo da Silva. Co-advisers: Sérgio Oliveira de Paula, Mauricio Dutra Costa and Tiago Antonio de Oliveira Mendes.

Production water from oil extraction process contains high concentrations of ammonium. Discards of these effluents can be harmful to the environment and, therefore, before being discarded, the effluent must be treated. The biological removal of ammonium can occur through different routes: aerobic autotrophic nitrification, followed by anaerobic denitrification (conventional processes), which is a well known and consolidated route, where each stage is performed by different microorganisms, and the heterotrophic nitrification/aerobic denitrification (HN/AD), where a single heterotrophic microorganism is able to perform the two steps under aerobic conditions, conferring advantages over conventional nitrification and denitrification for application in effluent treatment plants. However, little is known about this process and the microorganisms that perform it. The aim of this work was to isolate and identify microorganisms capable of performing the HN/AD process from activated sludge sample, evaluate the influence of physicochemical factors on ammonium removal and investigate possible routes of ammonium removal by studying the transcriptome of one of the isolates capable of performing HN/AD. Six bacterial isolates HN/AD capable of converting 100% of ammonium into  $N_2$  within 72 hours were identified. Of the six isolates, three were identified as *Pseudomonas balearica*, and the others were *Rhodococcus ruber*, *Pseudomonas stutzeri* and *Gordonia amicalis*. They showed a different response profile in relation to the studied physicochemical factors, however, all showed high efficiency of ammonium removal in different carbon sources, C/N ratio, salt concentrations, pH and temperature. Nitrogen balance showed that approximately 55% of all the ammonium removed by the isolates was lost as  $N_2$ , and 45% was assimilated into the microbial biomass. It was not possible to detect by PCR and comparative genomics the genes involved in the autotrophic nitrification process in the genome of the isolates, although the genes of the anaerobic

denitrification process were detected in the species of the genus *Pseudomonas*, which also perform this process, suggesting the involvement of other enzymes in the HN/AD pathway. The study of the transcriptome of the isolate *P. stutzeri* 2v in condition of ammonium removal pathway induction showed that the genes involved in the conventional processes are not involved in HN/AD and that there was a change in the biosynthesis machinery and protein translation of the cell, indicating that other genes were expressed during the process, possibly those involved in HN/AD. It has also been observed an increase in the expression of genes involved in oxide-reduction processes, which may be directly involved in HN/AD process. This work showed that the identified isolates have potential for application in effluent treatment plants, aiming at the optimization of the biological process of ammonium removal, and that the enzymes involved in the HN/AD process are different from those observed in the conventional processes.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 1.....	3
Revisão de literatura.....	3
1. Água de Produção.....	3
2. Remoção biológica do nitrogênio .....	5
2.1. Nitrificação autotrófica .....	6
2.2. Desnitrificação .....	7
2.3. Nitrificação heterotrófica por fungos.....	8
2.4. Nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia .....	9
2.5. Enzimas e rotas metabólicas propostas para o processo NH/DA.....	10
2.6. Fatores físico-químicos que afetam a NH/DA .....	15
3. Referências bibliográficas .....	17
CAPÍTULO 2.....	26
Caracterização de isolados bacterianos nitrificantes heterotróficos/ desnitrificantes aeróbicos e investigação dos possíveis genes envolvidos no processo.....	26
1. Introdução .....	28
2. Materiais e Métodos .....	31
2.1. Isolamento bacteriano.....	31
2.2. Identificação taxonômica dos isolados .....	32
2.3. Avaliação da remoção de amônia .....	33
2.4. Avaliação da nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia .....	34
2.5. Caracterização dos isolados quanto aos fatores físico-químicos .....	34
2.6. Balanço de Nitrogênio.....	35
2.7. Detecção de genes envolvidos na nitrificação autotrófica e desnitrificação anaeróbia .....	36
2.8. Genômica Comparativa .....	37
2.9. Análises estatísticas .....	38
3. Resultados e Discussão.....	38
3.1. Identificação taxonômica dos isolados bacterianos.....	38
3.2. Avaliação da remoção de amônia .....	40
3.3. Validação do processo de NH/DA.....	41
3.4. Efeito dos fatores físico-químicos na remoção de amônia via NH/DA.....	42
3.5. Balanço de Nitrogênio.....	51

3.6. Detecção dos genes envolvidos na remoção de amônia convencional ....	52
3.7. Genômica comparativa .....	54
4. Conclusões .....	57
Referências Bibliográficas .....	59
Material Suplementar .....	67
CAPÍTULO 3.....	69
Elucidação dos genes envolvidos na via de nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia do isolado <i>Pseudomonas stutzeri</i> 2v por transcriptômica .....	69
1. Introdução .....	71
2. Materiais e Métodos .....	73
2.1. <i>Pseudomonas stutzeri</i> 2v.....	73
2.2. Padronização das condições para o estudo do transcriptoma .....	73
2.3. Indução da via NH/DA para obtenção do RNA.....	74
2.4. Análises dos dados do RNAseq.....	74
2.5. Análises estatísticas .....	75
3. Resultados e Discussão .....	76
3.1. Padronização das condições para o estudo do transcriptoma .....	76
3.2. Indução da via NH/DA .....	77
3.3. Análise dos transcriptomas .....	78
4. Conclusão .....	84
Referências Bibliográficas .....	85
Material Suplementar .....	89
CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	91

## INTRODUÇÃO GERAL

Durante o processo de extração e processamento do petróleo, grande volume de água é consumido, apresentando elevada relação de volume de água utilizado por volume de petróleo processado. Ao petróleo extraído, existe uma grande quantidade de água associada, que precisa ser separada antes da distribuição do óleo para as refinarias, denominada água de produção. Esta água consiste basicamente de água de formação que está presente naturalmente na formação geológica do reservatório de petróleo e é transportada para superfície junto com o óleo. Sua composição é complexa, contendo além de compostos carbonáceos, íons em solução com concentrações variadas, como o cloreto, sódio, cálcio, magnésio, sulfeto e amônia. Despejos de águas residuais contendo altas concentrações de nitrogênio podem ser tóxicos à vida aquática, causar a eutrofização e a depleção de oxigênio no meio ambiente afetando negativamente a qualidade da água. Dessa forma, de acordo com as exigências ambientais, a água de produção, antes de ser despejada no corpo receptor, ou reutilizada no processo de extração, deve ser tratada.

Entre os tratamentos biológicos de efluentes, os sistemas aeróbios têm ganhado destaque devido à alta eficiência do processo, que consegue remover grande parte dos principais poluentes. A remoção biológica de nitrogênio acontece pela conversão do nitrogênio em sua forma encontrada no efluente para nitrogênio molecular ( $N_2$ ), que posteriormente é incorporado ao ar atmosférico, por meio da ação de diferentes grupos de microrganismos por diferentes vias metabólicas. A nitrificação autotrófica é a oxidação da amônia a nitrito, o qual é posteriormente oxidado a nitrato, por diferentes grupos de microrganismos autotróficos, bactérias e arqueias, em condições de aerobiose. O nitrato gerado é utilizado, em anaerobiose, como acceptor final de elétrons por microrganismos heterotróficos desnitrificantes.

Outro processo de remoção biológica de amônia, que ainda é pouco estudado, mas que vem ganhando destaque para aplicação em sistemas de tratamento de efluentes (ETE) é a nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia (NH/DA). Neste processo um microrganismo heterotrófico realiza

simultaneamente a nitrificação e a desnitrificação em condições de aerobiose. Comparado aos outros processos convencionais anteriormente descritos, a NH/DA é vantajosa, pois as duas etapas ocorrem em aerobiose, economizando espaço físico nas estações de tratamento, e como microrganismos heterotróficos crescem mais rápido que os autotróficos, haverá economia de tempo, pois tornarão o processo mais rápido. Outra vantagem é que os microrganismos NH/DA removem matéria orgânica, além da amônia. Por isso, o conhecimento a cerca dos microrganismos NH/DA e suas rotas metabólicas se fazem necessários a fim de encontrar marcadores moleculares para modular e monitorar essas populações em comunidades microbianas presentes no lodo biológico de ETE. Conhecendo a dinâmica dessas populações dentro da comunidade, bem como suas necessidades metabólicas, será possível otimizar a remoção de amônia nas estações de tratamento de efluentes.

Acreditamos que os microrganismos capazes de realizar o processo de nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia apresentam uma via metabólica comum para converter amônia em  $N_2$ , composta por enzimas diferentes das que conhecidamente estão envolvidas nos processos de nitrificação autotrófica e desnitrificação anaeróbia. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bactérias capazes de realizar o processo de nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia de amostra de lodo biológico, e investigar os genes envolvidos nessa via de remoção de amônia, a fim de otimizar esse processo nas estações de tratamento de efluentes.

# CAPÍTULO 1

## Revisão de literatura

### 1. Água de Produção

A água de produção (AP) é um subproduto gerado durante a produção de petróleo e gás durante o processamento primário (processo de separação óleo e gás). A AP é trazida à superfície juntamente com o petróleo e o gás e é 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). O volume de AP gerada com a extração do petróleo aumenta com a idade do reservatório, podendo atingir, à medida que o campo vai sendo explorado, um volume 10 vezes superior ao de petróleo extraído, representando aproximadamente 98 % do volume total de fluido que sai do poço (Stephenson, 1992; Igunnu et al., 2012; Alzahrani et al., 2014).

Ela representa a corrente de efluentes líquidos de maior volume entre as atividades envolvidas na produção de petróleo, com uma estimativa global de 3 vezes a quantidade de água produzida para 1 de petróleo (Amini et al., 2012). Entre 2006 e 2016, a produção mundial do petróleo aumentou 11 %, passando de 82,5 para 92,2 milhões de barris de petróleo por dia. Só no Brasil, essa produção subiu 44 %, aumentando assim a quantidade de água de produção gerada (BP, 2017).

A composição da AP é bastante complexa, incluindo hidrocarbonetos, metais pesados, sólidos suspensos, materiais de natureza radioativa e nutrientes dissolvidos como fósforo e nitrogênio. Portanto o seu descarte no ambiente ou o seu reuso, devem atender às condições e padrões estabelecidos da Resolução do CONAMA 393/2007, específica para o

descarte contínuo de água de processo ou de produção e plataformas marítimas de petróleo e gás natural.

As águas de produção provenientes da exploração de petróleo apresentam concentrações de nitrogênio amoniacal elevada e acima do valor permitido pela legislação. Alguns estudos mostram que essas concentrações podem variar de 22 a 800 mgL<sup>-1</sup>, com média de 85,4 mgL<sup>-1</sup>, e de acordo com a resolução do CONAMA, somente concentrações abaixo de 20 mgL<sup>-1</sup> são permitidas para que o efluente possa ser descartado (Gabardo 2007, Lima 2008, Andrade 2009). O excesso de amônia no corpo hídrico pode acarretar inúmeros efeitos negativos ao meio ambiente e à vida aquática, desde a eutrofização de rios e lagos até a morte de organismos devido à sua toxicidade (Reinbold et al., 1982). Por isso, antes de ser descartada ou até mesmo re-utilizada para extração do petróleo, a AP deve ser tratada com a finalidade de remoção de diversos poluentes, incluindo a amônia.

Diferentes tecnologias são empregadas, como a coagulação e a floculação, flotação, filtração em membrana e processos de oxidação avançada. Para a remoção de amônia, o processo biológico tem sido o mais utilizado, devido à boa qualidade do efluente tratado e alta eficiência de remoção (Van Haandel & Marais, 1999). Entre os tratamentos biológicos de efluentes, os sistemas aeróbios se destacam, devido à alta eficiência do processo, que consegue remover grande parte dos principais poluentes encontrados. Entre os sistemas aeróbios, destacam-se os sistemas de lodos ativados por possuírem grande flexibilidade de configurações, o que lhe permite maior eficiência na remoção de matéria orgânica e de nutrientes, como o nitrogênio (Freire et al., 2000; Da Motta et al., 2003).

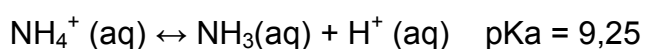
Devido à complexidade dos componentes do efluente, alguns processos de remoção de poluentes podem ser prejudicados. A presença de compostos como hidrocarbonetos e amônia, em altas concentrações, pode ser prejudicial para microrganismos envolvidos em diversos processos biológicos que ocorrem no lodo, além disso, o sal presente no efluente interfere negativamente nos processos biológicos, como a remoção de amônia. Por isso, a busca de novas tecnologias de tratamento de efluentes

tem crescido e se tornou fundamental para a melhoria do processo, uma vez que a produção do petróleo vem aumentando consideravelmente ao longo dos anos (Measures, 1975; BP, 2017).

## 2. Remoção biológica do nitrogênio

O nitrogênio pode ser encontrado em diferentes formas nos efluentes industriais, sendo as formas amoniacais (íon amônio e amônia) e orgânicas, tais como a uréia, alguns aminoácidos, poliaminas e ureídeos as mais comuns. Raramente são encontrados nitritos e nitratos.

O nitrogênio amoniacal pode ocorrer na forma de amônia livre ( $\text{NH}_3$ ) ou ionizada ( $\text{NH}_4^+$ ), onde suas proporções dependem do pH e temperatura do meio. Em ambientes de pH ácido há predominância do íon amônio, devido ao aumento da concentração de  $\text{H}^+$ . Em pH básicos, a concentração de  $\text{H}^+$  diminui, predominando a amônia (Butler, 1998).



A amônia livre, em comparação à amônia ionizada, é muito mais tóxica. No processo de remoção, o substrato para a enzima que realiza a primeira etapa da nitrificação autotrófica, amônia monooxigenase, é a amônia. Porém, o íon amônio predomina em grande parte dos ambientes, e a medida que a amônia vai sendo consumida, o equilíbrio da reação se desloca de maneira que o íon amônio seja convertido em amônia. Em condições nas quais o pH do meio é maior que 11, a amônia se encontra na forma gasosa (Metcalf e Eddy, 2003; Pereira e Mercante, 2005).

A remoção de amônia pode ser realizada biologicamente por diferentes grupos de microrganismos, incluindo bactérias, arqueias e fungos, por meio do metabolismo autotrófico, heterotrófico, em condições de aerobiose e anaerobiose. Esses diferentes processos serão descritos nos tópicos posteriores.

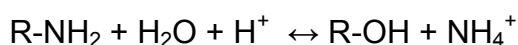
## 2.1. Nitrificação autotrófica

A nitrificação é um processo biológico, mediado por bactérias e arqueias, que ocorre naturalmente em sistemas onde existem condições aeróbias e a presença de nitrogênio amoniacal (Ferreira, 2000; Limpiyakorn 2013). As bactérias e arqueias envolvidas na nitrificação são autotróficas, ou seja, utilizam o CO<sub>2</sub> como fonte de carbono. Tais microrganismos realizam a nitrificação em condições aeróbias e são caracterizados por possuir um crescimento lento, ou seja, são microrganismos fastidiosos (van Haandel e Marais, 1999; Limpiyakorn, 2013).

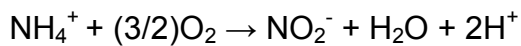
Uma das formas em que o nitrogênio pode ser encontrado nos efluentes é na forma orgânica. O nitrogênio na forma orgânica é transformado em amônia por um processo mediado por bactérias, denominado amonificação.

Uma vez que a amônia está presente no meio, ela é inicialmente oxidada a nitrito e, posteriormente, a nitrato no processo chamado nitrificação. Esta etapa é realizada pela ação de diferentes grupos de microrganismos, incluindo bactérias e arqueias, em aerobiose. Na primeira etapa da nitrificação, ocorre a oxidação da amônia a nitrito por bactérias dos gêneros *Nitrosococcus*, *Nitrosospira* e *Nitrosomonas* e por algumas espécies de arqueias do filo Thaumarchaeota (Uemoto e Saiki, 2000; Limpiyakorn, 2013; Madigan et al., 2016). Na segunda etapa, ocorre a oxidação de nitrito a nitrato, realizada por bactérias dos gêneros *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrospina* e *Nitrococcus* (Vanparys, 2006). Recentemente, Kits e colaboradores (2017) isolaram uma linhagem de *Nitrospira inopinata* capaz de realizar as duas etapas da nitrificação. Esses autores atribuíram ao processo o nome: *Complete ammonia oxidation* (COMAMMOX), oxidação completa da amônia a nitrato. As reações envolvidas nos processos de amonificação e nitrificação estão descritas abaixo:

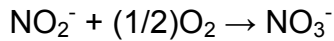
### 1. Amonificação



## 2. Produção de nitrito - Nitritação



## 3. Produção de nitrato - Nitratação



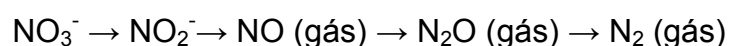
## 4. Reação global



A etapa de produção de nitrito (nitritação) gera  $\text{H}^+$  como produto, ocasionando diminuição do pH, e uma vez que a nitrificação ocorre em condições alcalinas, a alcalinidade deve ser fornecida ao sistema por fontes externas, ou pode ser retirada da combinação da nitrificação com outros processos biológicos, como a desnitrificação, os quais fornecem alcalinidade ao meio (Van Haandel e Marais, 1999).

## 2.2. Desnitrificação

O nitrato gerado pelo processo de nitrificação autotrófica é utilizado como substrato por outro grupo de microrganismos no processo de desnitrificação. Este processo consiste na redução do nitrato a nitrogênio gasoso pela ação das bactérias desnitrificantes. Quando o ambiente se torna anaeróbio e há presença de nitrato no meio, o nitrato é utilizado como acceptor final de elétrons (Vazoller, 2001). O nitrato é reduzido a nitrito, que é reduzido a óxido nítrico, que é posteriormente reduzido a óxido nitroso, que é finalmente reduzido a nitrogênio gasoso. A sequência de reações do processo de desnitrificação está mostrada abaixo



Bactérias heterotróficas anaeróbias facultativas são as responsáveis pela desnitrificação. Elas utilizam o oxigênio como acceptor final de elétrons

em ambientes aeróbios, e em ambientes anóxicos utilizam o nitrato. A desnitrificação pode ser realizada por diversos gêneros de bactérias como: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Hiphomicrobium*, *Chromobacterium*, *Halobacterium*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Paracoccus*, *Azospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Thiobacillus*, *Vibrio*, *Xanthomonas* e *Klebsiella* (Rittman & Langeland, 1985; Madigan, et al., 2016). A desnitrificação é o último passo para a completa remoção do nitrogênio por via biológica.

### 2.3. Nitrificação heterotrófica por fungos

A nitrificação heterotrófica pode ocorrer por diversas espécies de bactérias e fungos. Ela não está associada ao crescimento celular como na nitrificação autotrófica, nem está acoplada à síntese de ATP, portanto, não produz energia.

A fungo *Aspegillus flavus* foi o primeiro isolado com a capacidade de nitrificar heterotroficamente, em 1954. Recentemente, outras espécies como *Penicillium* sp. L1 e *Paecilomyces variotii* também foram descritas como nitrificantes heterotróficas (Liu et al., 2016; Liu et al., 2017). A via proposta para o metabolismo de nitrificação dos fungos é orgânica e limitada somente a estes microrganismos. Ela envolve a oxidação de compostos orgânicos nitrogenados, como aminas e amidas, a uma hidroxilamina substituída, que é oxidada a um composto do tipo nitroso que finalmente é oxidado a um composto do tipo nitro (Paul, 2014). A sequência de reações está descrita a seguir:



A remoção biológica de amônia por fungos ainda é pouco estudada, porém, sabe-se que esse grupo tem uma contribuição significativa no ciclo do nitrogênio em ambientes como o solo. Além disso, o processo de nitrificação realizado por fungos é menos afetado por fatores físico-químicos

do que o realizado por bactérias, uma vez que os fungos são mais tolerantes à variações ambientais, como temperatura, umidade e pH.

#### **2.4. Nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia**

Embora tenha ganhado destaque há pouco tempo, o processo de nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia (NH/DA) foi primeiramente identificado na década de 80. Diferente da remoção biológica de amônia convencional (nitrificação autotrófica seguida da desnitrificação anaeróbia), neste processo a amônia é oxidada por microrganismos heterotróficos, que simultaneamente realizam a desnitrificação em condições aeróbias.

Em 1972 foi isolada de esgoto a primeira bactéria heterotrófica capaz de nitrificar, a *Arthrobacter* sp. (Verstrae e Alexande, 1972). Alguns anos depois, em 1983, uma linhagem de *Paracoccus denitrificans* isolada de amostra de lodo ativado de uma estação de tratamento, foi descrita como capaz de realizar, simultaneamente, a nitrificação heterotrófica e desnitrificação aeróbica (Robertson e Kuenen, 1983).

Recentemente, maior atenção se voltou sobre essas bactérias capazes de realizar este processo e seu potencial para aplicação em estações de tratamento de efluentes. Na última década, diversas espécies bacterianas foram descritas como capazes de realizar a NH/DA, como: *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), *Aeromonas* sp. (Chen et al., 2014), *Zobellella taiwanenses* (Lei et al., 2016) e *Pseudomonas putida* (Xu et al., 2017).

Comparada com o processo de remoção de amônia convencional, a NH/DA apresenta diversas vantagens: utilização de substrato orgânico, removendo além da amônia, a matéria orgânica do efluente; tolerância ao oxigênio tanto na etapa da nitrificação quanto na desnitrificação, fazendo com que o tratamento possa ocorrer em um único reator, podendo diminuir o

espaço físico necessário para construção das estações de tratamento; otimização no processo de remoção de amônia, uma vez que esses microrganismos, por serem heterotróficos, crescem muito mais rápido que os autotróficos; 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).

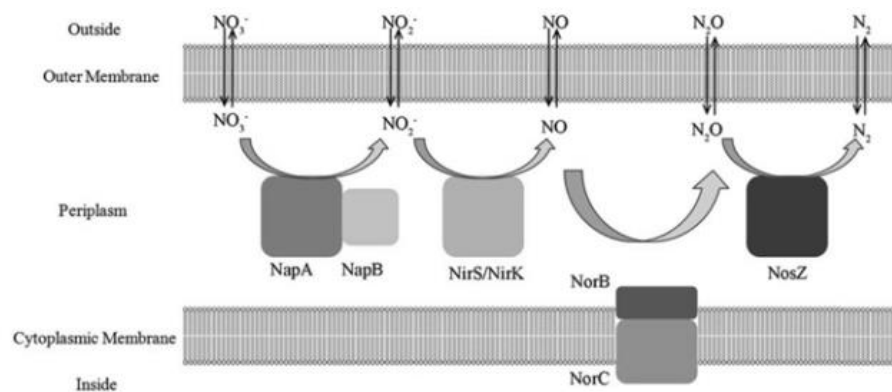
## **2.5. Enzimas e rotas metabólicas propostas para o processo NH/DA**

Embora a NH/DA seja um processo descrito na década de 80 e de elevado potencial para aplicação nas estações de tratamento, pouco se sabe sobre os microrganismos envolvidos neste processo, bem como seu mecanismo. Estudos na literatura que tentam desvendar essa rota tem se baseado no que se conhece dos processos convencionais de nitrificação autotrófica e desnitrificação anaeróbia. Uma estratégia utilizada pelos pesquisadores tem sido procurar pelos intermediários metabólicos (hidroxilamina, nitrito, nitrato, óxido nítrico, óxido nitroso) conhecidamente pertencentes à via da nitrificação autotrófica/desnitrificação anaeróbia, realizada pelo sintrofismo de dois grupos microbianos. Assim, pela detecção ou não destes compostos no meio, infere-se quais são as enzimas envolvidas no metabolismo do processo de NH/DA (Huang et al., 2013; Ren et al., 2014; Liu et al., 2015). Outra estratégia utilizada é buscar no genoma do isolado de interesse, por PCR (Reação em cadeia da polimerase), os genes que codificam as enzimas conhecidas envolvidas no processo de nitrificação autotrófica/desnitrificação anaeróbia, considerando que são as mesmas enzimas envolvidas em ambos os processos (Chen e Ni, 2012; Yang et al., 2015; Huang et al., 2017).

Tendo como base o processo de remoção de amônia convencional, sabe-se que três enzimas estão envolvidas na etapa de nitrificação: AmoA - amônia monooxigenase, que catalisa a oxidação de amônia a hidroxilamina; Hao - hidroxilamina óxido redutase, que catalisa a oxidação da hidroxilamina a nitrito, e Nar - nitrito oxido redutase, que catalisa a oxidação de nitrito a

nitrito. A presença ou ausência dessas enzimas pode ser inferida pelo consumo de amônia, produção dos intermediários hidroxilamina, nitrito e do produto final nitrito.

O processo de desnitrificação anaeróbia, que é a redução do nitrito a nitrogênio gasoso ocorre por uma sequência de reações envolvendo diferentes enzimas que também são utilizadas nos estudos da via de NH/DA (Figura 1).



**Figura 1.** Enzimas envolvidas na desnitrificação anaeróbia. NapA/NapB: nitrato redutase periplasmática - redução do nitrato a nitrito; NirS/NirK: nitrito redutase - redução do nitrito a óxido nítrico; NorB/NorC: óxido nítrico redutase - redução do óxido nítrico a óxido nitroso; NosZ: óxido nitroso redutase - redução do óxido nitroso a nitrogênio gasoso. FONTE: Ji et al. (2014).

A enzima Nap - nitrato redutase periplasmática, que catalisa a redução de nitrato a nitrito, é encontrada quase que majoritariamente no filo Proteobacteria, é codificada pelo operon *napFDAGHBC*, onde NapA é a unidade catalítica da enzima. A unidade funcional da enzima é NapAB, enquanto que NapC é associada a membrana para mediar a transferência de elétrons da quinona para NapAB. O gene *nap* foi detectado em isolados que realizam NH/DA, indicando que ele é possivelmente utilizado nesse metabolismo (Oguz et al., 2007).

A segunda reação, a redução de nitrito para óxido nítrico, é catalisada pela enzima nitrito redutase. Duas enzimas não homólogas podem catalisar essa reação, uma que contém cobre e outra que contém um citocromo C, codificadas pelos genes *nirK* e *nirS*, respectivamente. Ambas ficam

localizadas no periplasma de bactérias gram-negativas, ou na membrana celular das gram-positivas. Os dois genes já foram encontrados em microrganismos desnitrificantes aeróbios, e podem estar envolvidos no processo NH/DA, porém, um microrganismo só possui uma ou outra (Ji et al., 2014).

Outro gene já detectado em desnitrificantes aeróbios é o *nor*, que codifica a enzima Nor - óxido nítrico redutase. Esta enzima, ligada à membrana, é responsável pela redução do óxido nítrico para óxido nitroso, a terceira etapa da desnitrificação (Ji et al., 2014).

A última reação, redução do óxido nitroso para nitrogênio gasoso, é mediada pela enzima periplasmática nos - óxido nitroso redutase, e assim como as outras, também já foi detectada em alguns microrganismos desnitrificantes aeróbios (Kraft et al., 2011).

De acordo com os trabalhos encontrados na literatura, e tendo como base os genes envolvidos na nitrificação autotrófica/desnitrificação anaeróbia, pode-se observar que não é possível estabelecer um padrão entre os microrganismos já isolados e identificados como NH/DA (Tabela 1). Essa ausência de padrão pode ser reflexo de duas possibilidades: as enzimas responsáveis pela NH/DA serem diferentes daquelas envolvidas nos processos convencionais, e/ou as enzimas que realizam este processo são diferentes para diferentes microrganismos.

Um estudo realizado por Zhang e colaboradores (2012) propôs uma via para o isolado *Bacillus methylotrophicus* L7: amônia sendo oxidada a hidroxilamina, pela enzima Amo, a hidroxilamina sendo oxidada a nitrito, pela enzima Hao. O Nitrito sendo reduzido a nitrogênio gasoso passando por óxido nitroso. Não foi detectada a produção de nitrato, porém, quando ele está presente no meio, é reduzido a nitrogênio gasoso (Figura 2).

Em 2013, Huang e colaboradores propuseram também através da presença e ausência dos intermediários e amplificação de genes envolvidos desnitrificação, uma via metabólica para o processo de NH/DA para o isolado *Acinetobacter* sp. Y16: amônia sendo oxidada a hidroxilamina, pela enzima Amo, a hidroxilamina sendo oxidada a nitrito, pela enzima Hao. Diferente da via proposta para o isolado *B. methylotrophicus* L7, o nitrito é

reduzido a nitrogênio gasoso passando por óxido nítrico e nitroso. O nitrato também não foi detectado no meio, porém, quando o mesmo é adicionado, é reduzido a nitrogênio gasoso (Figura 3).

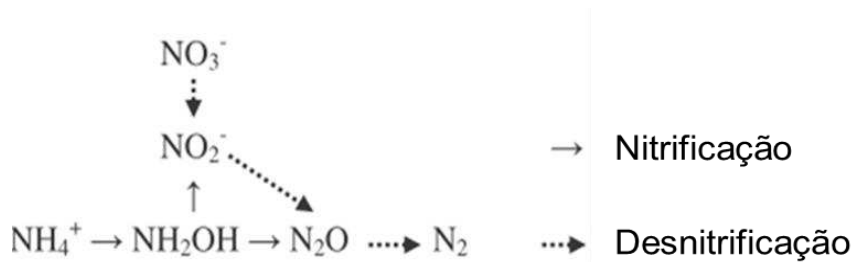
**Tabela 1.** Enzimas envolvidas nos processos de remoção de amônia convencionais que já foram investigadas, por amplificação no genoma ou atividade enzimática, nos isolados descritos como nitrificantes heterotróficos/desnitrificantes aeróbios descritos na literatura.

Isolado	Metodologia	Enzimas envolvidas na nitrificação autotrófica e desnitrificação anaeróbia						Referência
		Amo	Hao	Nap	NirS	Nor	Nos	
<i>Acinetobacter junii</i>	PCR		+	+	+			Yang et al., 2015
<i>Acinetobacter junii</i> YB	AE		+	+	+			Ren et al., 2014
<i>Acinetobacter</i> sp.	AE	+	+	+	+			Huang et al., 2013
<i>Acinetobacter</i> sp. Y1	AE		+	+	+			Liu et al., 2015
<i>Agrobacterium</i> sp. LAD9	PCR			+	+			Chen e Ni, 2012
<i>Alcaligenes faecalis</i> NR	AE		+	-	-			Zhao et al., 2012
<i>Bacillus</i> sp. N31	PCR		+	+	+			Huang et al., 2017
<i>Enterobacter cloacae</i> CF-S27	AE		+	-	-			Padhi et al., 2017
<i>Halomonas campisalis</i>	PCR			+	+	+	+	Guo et al., 2013
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CF-S9	PCR e AE		+	+	+			Padhi et al., 2013
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PCR	-		-		-	+	Kathiravan, 2013
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	AE	+	+	+	+			Zhang et al., 2015
<i>Pseudomonas</i> sp. ADN-42	PCR						+	Jin et al., 2015
<i>Pseudomonas stutzeri</i> YG-24	PCR			+	+			Li et al., 2015
<i>Vibrio diabolicus</i>	PCR			+				Duan et al., 2015
<i>Zobellella taiwanensis</i> DN-7	AE			+	+			Lei et al., 2015
<i>Pseudomonas balearica</i> 1.35*	PCR	-	-	+	+	+	+	Silva et al., 2018
<i>Pseudomonas balearica</i> 2.22*	PCR	-	-	+	+	+	+	Silva et al., 2018
<i>Pseudomonas balearica</i> 2.23*	PCR	-	-	+	+	+	+	Silva et al., 2018
<i>Rhodococcus ruber</i> 1.27*	PCR	-	-	-	-	-	-	Silva et al., 2018
<i>Gordonia amicalis</i> 2.26*	PCR	-	-	-	-	-	-	Silva et al., 2018
<i>Pseudomonas stutzeri</i> 2v*	PCR	-	-	+	+	+	+	Silva et al., 2018

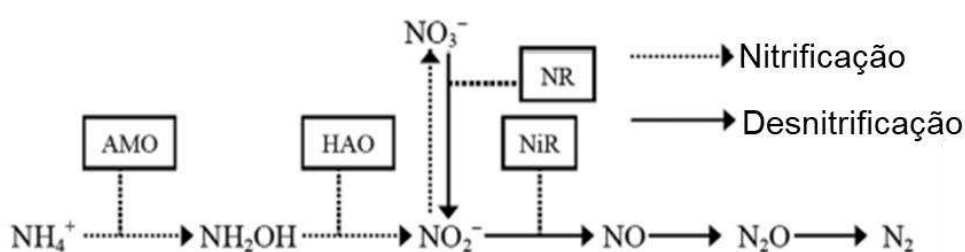
\*Isolados identificados neste estudo

PCR = reação em cadeia da polimerase e AE = atividade enzimática

Enzimas: Amo - amônia monooxigenase; Hao - hidroxilamina óxido redutase; Nap - Nitrato redutase periplasmática; NirS - nitrito redutase; Nor - óxido nítrico redutase e Nos - óxido nitroso redutase. (+) – detecção do gene ou de atividade enzimática, (-) não detecção do gene ou da atividade enzimática. Os espaços em branco significam que as enzimas não foram avaliadas.



**Figura 2.** Possível rota de NH/DA para o isolado *Bacillus methylotrophicus* L7. As linhas inteiras mostram os intermediários formados durante o processo de nitrificação, e as tracejadas durante a desnitrificação. FONTE: ZHANG et al. (2012)



**Figura 3.** Possível rota de NH/DA para o isolado *Acinetobacter* sp. Y16. Amo: amônia monooxigenase – oxidação de amônia em hidroxilamina; Hao: hidroxilamina óxido redutase – oxidação da hidroxilamina em nitrito; Nr: nitrato redutase – redução de nitrato a nitrito; Nir: nitrito redutase – redução de nitrito a óxido nítrico. FONTE: HUANG et al.(2016)

Como mostrado anteriormente, os estudos que objetivaram investigar a rota metabólica dos microrganismos com metabolismo NH/DA são baseados em enzimas já conhecidas dos processos de nitrificação autotrófica e desnitrificação anaeróbia. A maioria dos microrganismos descritos como sendo NH/DA são também desnitrificantes anaeróbios facultativos. Dessa forma, a presença do gene que codifica uma enzima da via não indica que ela irá atuar no processo de NH/DA. Dada a importância desses microrganismos para o processo biológico de remoção de amônia em sistemas de tratamento de efluentes, estudos mais aprofundados devem ser realizados para detectar e identificar quais as enzimas estão diretamente envolvidas na NH/DA.

## 2.6. Fatores físico-químicos que afetam a NH/DA

Assim como outros processos biológicos, a NH/DA também é influenciada por fatores físico-químicos, tais como a fonte de carbono, razão carbono/nitrogênio (C/N), temperatura, pH e salinidade (Zhang et al., 2012; Huang et al., 2013; Ren et al., 2014)

Diferentes fontes de carbono resultam em diferentes taxas de produção de energia para diferentes microrganismos. De acordo com a literatura, na NH/DA as fontes preferenciais são succinato, acetato e citrato, que estão envolvidos diretamente no ciclo do ácido tri-carboxílico, não excluindo a possibilidade de diferentes microrganismos terem diferentes preferências (Chen e Ni, 2012).

Como a maioria dos microrganismos descritos como NH/DA são também desnitrificantes heterotróficos, a relação C/N é muito importante. 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. Uma relação baixa indica baixa concentração de carbono, e conseqüentemente pouco crescimento microbiano, enquanto que uma concentração muito alta pode inibir o crescimento (Ji et al., 2014).

Quanto à temperatura, os microrganismos NH/DA apresentam uma faixa ótima variando de 25 a 37 °C, valores observados para outras bactérias mesofílicas. Embora alguns isolados possam suportar e crescer bem em baixas (abaixo de 10 °C) ou altas temperaturas (acima de 40 °C), elas podem ser prejudiciais para o processo (Robertson et al., 1989; Joo et al., 2005).

Em relação ao pH, o considerado ótimo para a NH/DA é em torno de 7,0 – 7,5 para culturas puras. A nitrificação acidifica o meio, porém a desnitrificação alcaliniza, deixando o pH próximo do neutro (Thomas et al., 1994).

A salinidade é influencia diretamente os processos biológicos microbianos, bem como a NH/DA, reduzindo o crescimento dos microrganismos e a taxa de oxidação de amônia (Dalmacija et al., 1996). O

motivo para a diminuição do crescimento de bactérias não-halofílicas com o aumento da salinidade, é que parte do substrato consumido é gasto na síntese de “solutos compatíveis” usados no balanceamento da pressão osmótica da célula, o que implica em um alto custo energético para os microrganismos (Measures, 1975). 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 % (Duan et al., 2015; Lei et al., 2015; Huang et al., 2017).

Dada a importância do processo de NH/DA para aplicação em sistemas de tratamento biológico de efluentes e a ausência de informação sobre a biologia do processo, observamos que muito ainda deve ser explorado e elucidado. O processo de NH/DA é uma vantajosa alternativa em relação ao processo convencional, pelo fato de um único microrganismo ser capaz de realizar todas as etapas de remoção de amônia numa mesma condição, em aerobiose, refletindo em uma maior facilidade operacional, e consequentemente na redução dos custos, além das outras vantagens já apresentadas anteriormente. Assim, um conhecimento mais aprofundado sobre os microrganismos envolvidos na NH/DA, bem como das vias metabólicas envolvidas neste processo se tornam de fundamental importância para a otimização do processo de remoção de amônia nas estações de tratamento de efluentes.

### 3. Referências bibliográficas

1. Alzahrani S., Mohammad A.W. Challenges and trends in membrane technology implementation for produced water treatment: A review, *Journal of Water Process Engineering*. 4 107-133, 2014.
2. Amini, S.; Mowla, D.; Golkar, M.; Esmailzadeh, F. Mathematical modelling of a hydrocyclone for the down-hole oil-water separation (DOWS). *Chemical Engineering Research and Design*. 90, 2186-2195, 2012.
3. Andrade, V.T. Avaliação da toxicidade de água produzida tratada por processo evaporativo com a finalidade de reúso em solo. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ. 2009.
4. BP. *British Petroleum Statistical Review of World Energy*. 2017.
5. Chen, Q. and Ni J. Ammonium removal by *Agrobacterium* sp. LAD9 capable of heterotrophic nitrification - aerobic denitrification. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 113, 619-623, 2012.
6. Chen, M., Wang, W., Feng, Y., Zhu, X., Zhou, H., Tan, Z., Li, X. Impact resistance of different factors on ammonium removal by heterotrophic nitrification - aerobic denitrification bacterium *Aeromonas* sp. HN-02. *Bioresour. Technol.* 167, 456–461, 2014.
7. Dalmacija, B., Karlovic, E., Tamas, Z., Miskovic, D. Purification of high salinity wastewater by activated sludge process, *Water Research*. 2, 295-298, 1996.

8. Duan, J., Fang, H., Su, B., Chen, J., & Lin, J. Characterization of a halophilic heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacterium and its application on treatment of saline wastewater. *Bioresource technology*, 179, 421-428, 2015.
9. Ferreira, S. Eduardo. Cinética química e fundamentos dos processos de Nitrificação e denitrificação biológica, 2000.
10. Freire, R.S., Pelegrini, R., Kubota, L.T., Durán, N., Peralta-Zamora, P. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. *Química Nova*, v. 23, n. 4, p. 504-511, 2000.
11. Gabardo, I.T. Caracterização química e toxicológica da água produzida descartada em plataformas de óleo e gás na costa brasileira e seu comportamento dispersivo no mar. Tese de Doutorado, UFRN, Natal, RN, Brasil. 2007.
12. Guo, Y., Zhou, X., Li, Y., Li, K., Wang, C., Liu, J., Yan, D., Liu, Y., Yang, D., Xing, J. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Halomonas campisalis*. *Biotechnology Letters*. 35, 2045-2049, 2013.
13. Huang, X., Li, W., Zhang, D., & Qin, W. Ammonium removal by a novel oligotrophic *Acinetobacter* sp. Y16 capable of heterotrophic nitrification–aerobic denitrification at low temperature. *Bioresource technology*. 146, 44-50, 2013.
14. Huang, F., Pan, L., Lv, N., Tang, X. Characterization of novel *Bacillus* strain N31 from mariculture water capable of halophilic heterotrophic

- nitrification–aerobic denitrification. *Journal of bioscience and bioengineering*, 124(5), 564-571, 2017.
15. Igunnu E.T., Chen G.Z. Produced water treatment technologies, *International Journal of Low-Carbon Technologies*. 9, 157-177, 2012.
  16. Ji, B., H. Wang, and K. Yang. Tolerance of an aerobic denitrifier (*Pseudomonas stutzeri*) to high O<sub>2</sub> concentrations. *Biotechnology Letters*. 36, 719-722, 2014.
  17. Jin, R., Liu, T., Liu, G., Zhou, J., Huang, J., & Wang, A. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the marine origin bacterium *Pseudomonas* sp. ADN-42. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175(4), 2000-2011, 2015.
  18. Joo, H.S., Hirai, M., Shoda, M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification–aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 100, 184–191, 2005.
  19. Kathiravan, V., Krishnani, K. K. *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, 2014.
  20. Kits, K.D., Sedlacek, C.J., Lebedeva, E.V., Han, P., Bulaev, A., Pjevac, P., Daims, H., 2017. Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle. *Nature*, 549, 269.
  21. Kraft, B., M. Strous, and H.E. Tegetmeyer. Microbial nitrate respiration-genes, enzymes and environmental distribution. *Journal of Biotechnology*. 155: 104-117, 2011.

22. Lei, Y., Wang, Y., Liu, H., Xi, C., Song, L. A novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium, *Zobellella taiwanensis* DN-7, can remove high-strength ammonium. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100, 4219-4229, 2015.
23. Li, C., Yang, J., Wang, X., Wang, E., Li, B., He, R., & Yuan, H. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification–aerobic denitrification of a phosphate accumulating bacterium *Pseudomonas stutzeri* YG-24. *Bioresource technology*, 182, 18-25, 2015.
24. Lima, R.M.G.; Wildhagen, G R.S.; Cunha, J.W.S.D. Remoção do íon amônio de águas produzidas na exploração de petróleo em áreas *offshore* por adsorção em clinoptilolita. *Química Nova*. 31, 1237-1242, 2008.
25. Limpiyakorn, T., Fürhacker, M., Haberl, R., Chodanon, T., Srithep, P., Sonthiphand, P. AmoA-encoding Archaea in wastewater treatment plants: a review. Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Thailand, 2013.
26. Liu, Y., Hu, T., Song, Y., Chen, H., Lv, Y. Heterotrophic nitrogen removal by *Acinetobacter* sp. Y1 isolated from coke plant wastewater. *Journal of bioscience and bioengineering*, 120(5), 549-554, 2015.
27. Liu, Y., Hu, T., Zhao, J., Lv, Y., Ren, R. Simultaneous removal of carbon and nitrogen by mycelial pellets of a heterotrophic nitrifying fungus-*Penicillium* sp. L1. *Journal of bioscience and bioengineering*, 123(2), 223-229, 2017.
28. Liu, Z., Liu, G., Cai, H., Shi, P., Chang, W., Zhang, S., Ma, J. *Paecilomyces variotii*: a fungus capable of removing ammonia nitrogen

- and inhibiting ammonia emission from manure. PloS one, 11(6), e0158089, 2016.
29. Madigan, T.M., Martinko, J.M., Parker, J. Brock Biology of Microorganisms, Prentice Hall, 16<sup>a</sup> edição, New York, 2016.
  30. Marazioti, C., Kornaros, M., Lyberatos, G. Kinetic modeling of a mixed culture of *Pseudomonas denitrificans* and *Bacillus subtilis* under aerobic and anoxic operating conditions. Water Research. 37, 1239–1251, 2003.
  31. Measures, J.C. Role of amino acids in osmoregulation of nonhalophilic bacteria, Nature. 257, 398-400, 1975.
  32. Metcalf & Eddy. Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, Reuse. 4<sup>a</sup> edição, New York, 2003.
  33. Motta, M.D., Pons, M.N., Roche, N.I.C.O.L.A.S., Vivier, H.E.R.V.É., Amaral, A.L., Ferreira, E.C., Mota, M.A.N.U.E.L. Estudo do funcionamento de estações de tratamento de esgotos por análise de imagem: validações e estudo de caso. Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 8, n. 3, p. 170-181, 2003.
  34. Oguz, M.T., K.G. Robinson, A.C. Layton, and G.S. Sayler. Concurrent nitrite oxidation and aerobic denitrification in activated sludge exposed to volatile fatty acids. Biotechnology and Bioengineering. 97, 1562-1572, 2007.
  35. Padhi, S. K., Tripathy, S., Sen, R., Mahapatra, A. S., Mohanty, S., & Maiti, N. K. Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of

- wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 78, 67-73, 2013.
36. Padhi, S. K., Tripathy, S., Mohanty, S., Maiti, N. K. Aerobic and heterotrophic nitrogen removal by *Enterobacter cloacae* CF-S27 with efficient utilization of hydroxylamine. *Bioresource technology*, 232, 285-296, 2017.
  37. Patin, S. Environmental impact of the offshore oil and gas industry. New York: Ecomonitor Publishing, 1999.
  38. Paul, E. A. Soil microbiology, ecology and biochemistry. Academic press, 2014.
  39. Pereira, L. P. F., & Mercante, C. T. J. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma revisão. *Boletim do Instituto de Pesca*, 31(1), 81-88, 2005.
  40. Reinbold, K.A.; Pescitelli, S.M. Effects of exposure to ammonia on sensitive life stages of aquatic organisms. Champaign, Illinois: Illinois Natural History Survey, 1982.
  41. Ren, Y. X., Yang, L., Liang, X. The characteristics of a novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium, *Acinetobacter junii* YB. *Bioresource technology*, 171, 1-9, 2014.
  42. Rittmann, B.E. & Langeland, W.E. Simultaneous denitrification with nitrification in single channel oxidation ditches. *Journal Water Pollution Control, Federation Washington*. 45, 249 – 260, 1985.
  43. Robertson, L.A., Kuenen, J.G. *Thiosphaera pantotropha* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulfur bacterium. *Journal of General Microbiology*. 129, 2847–2855, 1983.

44. Stephenson, M.T. Components of produced water: a compilation of industry studies. *Journal of Petroleum Technology*. 548-603, 1992.
45. Third, K.A., Gibbs, B., Newland, M., Cord-Ruwisch, R. Long-term aeration management for improved N-removal via SND in a sequencing batch reactor. *Water Research*. 39, 3523–3530, 2005.
46. Thomas, K.L., D. Lloyd, and L. Boddy. Effects of oxygen, pH and nitrate concentration on denitrification by *Pseudomonas* species. *Fems Microbiology Letters*. 118, 181-186, 1994.
47. Uemoto, H., Saiki, H. Nitrogen removal by tubular gel containing *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans*, *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 4224-4228, 2000.
48. Van Haandel, A. C., Marais, G. v. R. O Comportamento do Sistema de Lodo Ativado: Teoria e Aplicações para Projetos e Operações. Campina Grande: epgraf. 472, 1999.
49. Vanparys B., Bodelier P., De Vos P. Validation of the correct start codon of norX/nxrX and universality of the norAXB/nxrAXB gene cluster in *Nitrobacter* species. *Current Microbiology* .53, 255-257, 2006.
50. Vazoller, R.F.; Gomes, L.P.; Villas-Boas, D.M.; Baldochl, V.M.Z.; Badra, R.J.; Povinelli, J. Biodegradability potential of two experimental landfills in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32, 87-92, 2001.
51. Verstrae, W., Alexande, M. Heterotrophic nitrification by *Arthrobacter* sp. *Journal of Bacteriology*. 110, 955–959, 1972.
52. Xu, Y., He, T., Li, Z., Ye, Q., Chen, Y., Xie, E., Zhang, X. Nitrogen removal characteristics of *Pseudomonas putida* Y-9 capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low

- temperature. BioMed Research International, 2017.
53. Wan, C., Yang, X., Lee, D.J., Du, M., Wan, F., Chen, C. Aerobic denitrification by novel isolated strain using  $\text{NO}_2^-$ -N as nitrogen source. Bioresource Technology. 102, 7244–7248, 2011.
  54. Yang, X.P., Wang, S.M., Zhang, D.W., Zhou, L.X. Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1. Bioresource Technology. 102, 854–862, 2011.
  55. Yang, L., Ren, Y. X., Liang, X., Zhao, S. Q., Wang, J. P., & Xia, Z. H. Nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifier *Acinetobacter junii* YB and its potential application for the treatment of high-strength nitrogenous wastewater. Bioresource technology, 193, 227-233, 2015.
  56. Yao, S., Ni, J., Ma, T., Li, C. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. HA2. Bioresource Technology. 139, 80–86, 2013.
  57. Zhang, J., Wu, P., Hao, B., Yu, Z. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. Bioresource Technology. 102, 9866–9869, 2011.
  58. Zhang, Q. L., Liu, Y., Ai, G.M., Miao, L.L., Zheng, H.Y., Liu, Z.P. The characteristics of a novel heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotrophicus* strain L7. Bioresource Technology. 108, 35–44, 2012.
  59. Zhang, S., Sha, C., Jiang, W., Li, W., Zhang, D., Li, J., Piao, Y. 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, 2015.

60. Zhao, B., An, Q., He, Y. L., & Guo, J. S. N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> production during heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis* strain NR. Bioresource technology, 116, 379-385, 2012.

## CAPÍTULO 2

\*artigo escrito dentro das normas da revista *Bioresource Technology*, com modificações.

### **Caracterização de isolados bacterianos nitrificantes heterotróficos/desnitrificantes aeróbicos e investigação dos possíveis genes envolvidos no processo.**

Lívia Carneiro Fidélis Silva<sup>a</sup>, Helena Santiago Lima<sup>b</sup>, Adilson Sartoratto<sup>c</sup>, Maira Souza<sup>d</sup>, Rodrigo Suhett de Souza<sup>e</sup>, Sérgio Oliveira de Paula<sup>f</sup>, Valéria Maia de Oliveira<sup>g</sup>, Cynthia Canêdo da Silva<sup>h\*</sup>

<sup>a</sup>M. Sc., Estudante, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. (livia.silva@ufv.br)

<sup>b</sup>Pós-graduação, Estudante, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. (hsantiagolima@gmail.com)

<sup>c</sup>M. Sc., Pesquisador, Divisão de química orgânica e farmacêutica, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil. (adilson@cpqba.unicamp.br)

<sup>d</sup>M. Sc., Pesquisadora, Petrobras – Centro de pesquisa e desenvolvimento (CENPES), Petrobras, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. (mpsousa@petrobras.com.br)

<sup>e</sup>Pesquisador, Petrobras – Centro de pesquisa e desenvolvimento (CENPES), Petrobras, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. (rsuhett@petrobras.com.br)

<sup>f</sup>Ph. D., Professor, Departamento de biologia geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. (depaula@ufv.br)

<sup>g</sup>Ph. D., Professora, Divisão de recursos microbianos, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil. (vmaia@cpqba.unicamp.br)

<sup>h</sup>Ph. D., Professora, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. (ccanedo@ufv.br)

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

**Resumo:** Durante o processo de extração do petróleo, é gerado elevado volume de efluente contaminado com compostos tóxicos incluindo a amônia. O descarte desse efluente pode ser prejudicial para o ambiente e, por isso, antes de ser descartado, ele deve ser tratado. A remoção biológica da amônia pode acontecer por diferentes processos que envolvem grupos distintos de microrganismos. Um desses processos é a nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia (NH/DA), que embora seja pouco estudado, apresenta diversas vantagens em relação aos processos de remoção convencionais (Nitrificação autotrófica e Denitrificação anaeróbia) para aplicação em estação de tratamento de efluentes. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o de isolar e caracterizar microrganismos NH/DA provenientes de amostra de lodo ativado, bem como investigar os genes envolvidos no processo. Foram identificados seis isolados bacterianos com capacidade de transformar 100 % de amônia em N<sub>2</sub> sob condições aeróbias em até 72 horas. A identificação taxonômica dos isolados mostrou que dos seis, três foram classificados como *Pseudomonas balearica*, e os outros como *Rhodococcus ruber*, *Pseudomonas stutzeri*, e *Gordonia amicalis*. Esses isolados foram investigados em relação aos fatores que poderiam influenciar o processo de NH/DA, e eles exibiram alta eficiência de remoção de amônia em diferentes fontes de carbono, relação Carbono/Nitrogênio, concentração salina, pH e temperatura. O balanço de nitrogênio mostrou que, para todos eles, aproximadamente 55 % de toda a amônia removida foi perdida na forma de N<sub>2</sub>, e 45 % assimilada na biomassa microbiana. Não foram detectados, por PCR e genômica comparativa, os genes que codificam as enzimas descritas nos processos de remoção de amônia

convencionais, sugerindo o envolvimento de outras enzimas no processo de NH/DA. Assim, concluímos que os isolados identificados neste trabalho possuem alto potencial para aplicação em estações de tratamento de efluentes visando a otimização do processo de remoção biológica de amônia.

**Palavras-chave:** remoção de amônia, nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia, tratamento de efluentes.

## 1. Introdução

Os efluentes gerados durante a exploração do petróleo apresentam altas concentrações de nitrogênio, principalmente na forma de amônia, que quando lançados no corpo receptor podem ser tóxicos à vida aquática, causar eutrofização e depleção de oxigênio no meio (Ahn 2006; Munirasu et al., 2016). Segundo a literatura, as concentrações de amônia nestes efluentes podem variar de 22 a 800 mgL<sup>-1</sup>, e de acordo com a resolução do CONAMA, somente concentrações abaixo de 20 mgL<sup>-1</sup> são permitidas para lançamento nos corpos hídricos (Gabardo 2007, Lima 2008, Andrade 2009). Por isso, antes de ser descartado, o efluente deve ser submetido à processos para remoção de nitrogênio, que incluem os físicos, químicos e biológicos. Este último é o mais utilizado devido à facilidade de implementação, baixo custo e boa eficiência de remoção do poluente (Da Motta et al., 2003).

O processo mais convencional de remoção biológica de amônia aplicado em estações de tratamento de efluentes (ETE) consiste de duas

etapas sequenciais: nitrificação e desnitrificação. A nitrificação é a oxidação da amônia a nitrito, seguida da oxidação do nitrito a nitrato, por bactérias e arqueias autotróficas em condições de aerobiose. O nitrato formado serve de substrato para a desnitrificação, que é reduzido a nitrogênio gasoso por bactérias heterotróficas em condições de anaerobiose (Madigan et al., 1997; Vanparys 2006; Limpiyakorn 2013). Entretanto, um processo que vem ganhando destaque para remoção biológica de amônia em ETE é a nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia (NH/DA), no qual um único microrganismo heterotrófico realiza simultaneamente a nitrificação e a desnitrificação em condições de aerobiose (Robertson e Kuenen, 1983).

Nos últimos anos, diversas espécies foram descritas como nitrificante heterotrófico/desnitrificante aeróbio, a exemplo de: *Paracoccus denitrificans* (Robertson e Kuenen, 1983), *Alcaligenes faecalis* (Joo et al., 2005), *Pseudomonas stutzeri* (Zhang et al., 2011), *Bacillus methylotrophicus* (Zhang et al., 2012), *Rhodococcus* sp. (Chen et al., 2012), *Halomonas campisalis* (Guo et al., 2013), *Zobellella taiwanenses* (Lei et al., 2016). Apesar de ser pouco estudado e não ter sido completamente elucidado, o processo NH/DA quando comparado com o processo convencional de remoção biológica de amônia (nitrificação e desnitrificação), apresenta algumas vantagens, como: maior taxa de crescimento dos microrganismos, que são heterotróficos, resultando em maior taxa de remoção de amônia; possibilidade do processo de remoção ocorrer em único reator e em um único estágio; remoção simultânea de amônia e matéria orgânica e não há necessidade de adição de alcalinizantes, já que a desnitrificação alcaliniza o meio (Marazioti et al., 2003; Lei et al., 2016).

Embora apresente diversas vantagens, pouco se conhece sobre as vias metabólicas envolvidas no processo de NH/DA e os trabalhos que buscaram entender essa rota foram baseados no estudo das enzimas envolvidas nos processos de remoção convencional ou dos intermediários formados durante esse processo (hidroxilamina, nitrito, nitrato, óxido nítrico, óxido nitroso e  $N_{2(g)}$ ) (Padhi et al., 2013; Duan et al., 2015; Lei et al., 2015; Padhi et al., 2017).

Assim como outros processos biológicos, a NH/DA também é afetada por fatores físico-químicos como fonte de carbono, relação C/N, pH, temperatura e salinidade. De acordo com a literatura, diferentes microrganismos NH/DA comportam-se de diferentes maneiras frente a esses fatores (Chen e Ni, 2012; Ji et al., 2014). Sabendo das vantagens desse processo, da falta de conhecimento de suas vias e do seu potencial para aplicação em ETE, esse trabalho teve como objetivos identificar isolados bacterianos provenientes de lodo ativado de ETE de petróleo capazes de realizar o processo de NH/DA, avaliar a influência de fatores físico-químicos como fonte de carbono, relação C/N, temperatura, pH e salinidade no processo de remoção, bem como investigar as possíveis vias metabólicas envolvidas nesse processo, visando a aplicação na remoção biológica de amônia em ETE.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Isolamento bacteriano**

Para isolamento dos microrganismos, foi utilizada uma amostra de lodo nitrificante proveniente do sistema de tratamento de lodos ativados do Terminal Marítimo Almirante Barroso/TEBAR (São Sebastião/SP). A amostra de lodo foi enriquecida em quatro diferentes meios de cultivo visando o isolamento de microrganismos nitrificantes: 1- meio de enriquecimento para bactérias que oxidam amônia, 2- meio de enriquecimento para bactérias que oxidam nitrito, 3- meio de enriquecimento de nitrobactéria heterotrófica e 4- meio de enriquecimento de nitrobactéria mixotrófica. A constituição dos meios de cultivo utilizados está descrita na Tabela 1. O enriquecimento foi realizado inoculando 1 mL de lodo em 10 mL de cada um dos meios de cultivo em tubos Falcon de 50 mL. As culturas foram incubadas a 30 °C, a 150 rpm por 90 dias. Com 60 e 90 dias foi realizada diluição seriada ( $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ ), seguida do plaqueamento de uma alíquota de 100 µL de cada diluição em placas de Petri contendo ágar-nutriente para isolamento das bactérias. Foi realizada uma triagem de todos os isolados avaliando seu potencial de remoção de amônia em meio para nitrificantes heterotróficos HNM (*Heterotrophic Nitrification Medium*) (Zhang et al., 2012). Seis isolados com as maiores taxas de remoção de amônia foram selecionados para estudos posteriores e nomeados como 1.27 e 1.35 (isolados do meio 1) e 2.22, 2.23, 2.26 e 2v (isolados do meio 2).

**Tabela 1.** Constituição dos meios de cultivo utilizados para enriquecimento de bactérias nitrificantes.

Meios de cultivo	Composição (gL <sup>-1</sup> )
Meio 1: Bactérias que oxidam amônia	2.92 g NH <sub>4</sub> Cl, 0.054 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.074 g KCl, 0,1 g MgSO <sub>4</sub> , 6,16 g NaCl, 5 g CaCO <sub>3</sub> , 1 mL de solução de cresol e 1 mL de solução traço: 0,2 mM MnSO <sub>4</sub> , 0,8 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 0,15 mM ZnSO <sub>4</sub> , 0,03 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> .O <sub>24</sub> , 2,5 mM FeSO <sub>4</sub> , 0,1 mM CuSO <sub>4</sub> em 0,01 N de HCl
Meio 2: Bactérias que oxidam nitrito	1 g NaNO <sub>2</sub> , 0,5 g NaCl, 0,15 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,05 g MgSO <sub>4</sub> , 0,03 g CaCO <sub>3</sub> , 0,001 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> .O <sub>24</sub> , 0,00028 g FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.
Meio 3: Nitrobactéria Heterotrófica	1,5 g Extrato de levedura, 1,5 g Peptona, 0,55 g N-Piruvato 1 mL Solução traço <sup>a</sup> , 100 mL Solução estoque <sup>b</sup> . Ajustar pH para 8.6 com NaOH ou KOH
Meio 4: Nitrobactéria Mixotrófica	0,15 g Extrato de levedura, 0,15 g Peptona, 0,055 g N-Piruvato, 1 mL Solução traço <sup>a</sup> , 100 mL Solução estoque <sup>b</sup> , 2 g NaNO <sub>2</sub> . Ajustar pH para 7.4 com NaOH ou KOH

<sup>a</sup>Solução traço (mgL<sup>-1</sup>): 33,8 g MnSO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O, 49,4 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 43,1 mg ZnSO<sub>4</sub>. 7 H<sub>2</sub>O, 37,1 mg (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>.O<sub>24</sub>, 25 mg FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 25 mg CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O

<sup>b</sup>Solução estoque (g<sup>-1</sup>): 0,07 g CaCO<sub>3</sub>, 5 g NaCl, 0,5 g MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O, 1,5 g KH<sub>2</sub>PO

## 2.2. Identificação taxonômica dos isolados

O DNA dos 6 isolados bacterianos foi extraído como descrito por Pospiech & Neumann (1995). Após extração, o DNA foi submetido à reação em cadeia da polimerase utilizando os primers 10f e 1100r (Lane et al., 1985), homólogos à regiões conservadas do gene RNAr 16S do Domínio Bacteria. Os fragmentos de DNAr 16S amplificados foram purificados e sequenciados. As sequências de DNAr 16S obtidas foram comparadas com

as sequências depositadas no banco de dados *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando o BLASTn.

Foram então selecionadas sequências de organismos referência bem como sequências de bactérias nitrificantes heterotróficas/desnitrificantes aeróbias relacionadas aos microrganismos identificados neste trabalho e já descritos na literatura para realização das análises filogenéticas. As sequências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTALW (Thompson et al., 1997) e analisadas com o *software* MEGA 7.0.18 (Tamura et al., 2007). A construção de uma árvore filogenética para revelar a identificação taxonômica foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (Saitou e Nei, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1000 replicatas.

### **2.3. Avaliação da remoção de amônia**

A taxa de remoção de amônia foi avaliada a cada 24 horas ao longo de 7 dias através de teste colorimétrico em meio HNM (Zhang et al., 2012) como descrito por Chaney e Marbach (1962) com modificações. As análises foram realizadas em microplacas de 96 poços, contendo em cada poço: uma alíquota de 5 µl de cultura de cada isolado crescido em meio HMN, 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). Como controle positivo, foi adicionado 5 µl de lodo ativado nitrificante/desnitrificante cultivado em HNM, e como negativo, foi adicionado 5 µl de meio sem inóculo. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### **2.4. Avaliação da nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia**

Para validação da ocorrência da NH/DA, foi monitorada a produção dos gases NO, N<sub>2</sub>O e N<sub>2</sub> por cromatografia gasosa (GC). Um e meio mililitro de cada isolado foram inoculados em 15 mL de meio HNM contidos em frascos de 30 mL. Os frascos foram hermeticamente fechados e a atmosfera no interior do tubo foi saturada com oxigênio (99,5 % de pureza). Os tubos foram incubados a 30° C com agitação de 150 rpm. O controle negativo foi feito utilizando o meio HNM sem inóculo, e o positivo utilizando o lodo ativado nitrificante/desnitrificante inoculado em meio HNM. As amostras de gás foram coletadas ao final de 10 dias, usando seringa coletora de gás de 1 ml. Um volume de 100 microlitros de gás foi aplicado em um cromatógrafo gasoso acoplado com espectômetro de massa (Cromatógrafo a gás Agilent, modelo HP-6890 acoplado a detector seletivo de massas Agilent, modelo HP-5975) equipado com uma coluna HP-Plot 5A molecular sieve column (30 m x 0.32 mm x 25 µm) (Sigma Aldrich). O procedimento foi realizado de acordo com Yao e colaboradores (2013). As análises foram realizadas em triplicata.

#### **2.5. Caracterização dos isolados quanto aos fatores físico-químicos**

Os isolados selecionados foram caracterizados em relação a diferentes fatores físico-químicos: fonte de carbono, relação C/N, pH, temperatura e salinidade. Todos os fatores foram avaliados como variáveis independentes. Para tal, colônias dos isolados foram ativadas em 5 mL de meio LB, e depois um inóculo de 100 µL foi transferido para tubos plásticos

contendo 10 mL de meio HNM padrão, e depois transferido para outros tubos plásticos contendo meio HNM com diferentes condições estudadas. A cultura foi incubada a 30 °C sob agitação de 150 rpm durante 72 horas. A cada 24 horas, foram feitas a leitura da densidade óptica dos isolados no comprimento de onda de 600 nm e a análise de remoção de amônia. Para todos os fatores físico-químicos estudados, foi utilizado o meio HNM padrão com alteração apenas da variável, com exceção da fonte de carbono, onde foi utilizado a fonte que verificamos melhor crescimentos dos isolados. As condições avaliadas foram: **fonte de carbono** (piruvato de sódio, sacarose, acetato de sódio, citrato de sódio, succinato de sódio e glicose), **relação C/N** (4, 6, 8, 10 e 12); **pH** (3, 5, 7 e 9); **temperatura** (20, 25, 40, 35 e 40 °C); e **salinidade** (0, 3, 6, 9, 12 e 15 % de NaCl). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Durante o experimento de avaliação da influência do pH na remoção de amônia, o pH das culturas inoculadas em meio HNM foi monitorado e a quantificação de amônia do controle negativo foi realizada (meio HNM sem inóculo) para garantir que não estava havendo perda de amônia por volatilização.

## 2.6. Balanço de Nitrogênio

O balanço de nitrogênio foi realizado em *Erlenmeyer* de 1 litro, contendo 250 mL de meio HNM. As colônias dos 6 isolados foram ativadas em 150 mL de meio LB, e uma alíquota foi transferida para 250 mL de meio HNM (de maneira que a densidade óptica fosse igual a 0,1), incubados a 30 °C sob agitação de 150 rpm durante 72 horas. A cada 24 horas, foram realizadas medições de densidade óptica, amônia, hidroxilamina, nitrito e

nitrato. Ao final das 72 horas, o nitrogênio da biomassa foi calculado. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

O crescimento celular foi monitorado medindo a densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Scientific). A análise de amônia foi feita por colorimetria, segundo Chaney e Marbach (1962). A hidroxilamina foi determinada de acordo com Frear e Burrell (1995). Nitrito foi quantificado pelo método fotométrico do N-(1-naftaleno)-diaminoetano, e o nitrato pelo método do ácido clorídrico, descrito segundo o Standard Methods - APHA (2012). Para calcular a quantidade de nitrogênio da biomassa, ao final das 72 horas, 250 mL de cultura foram centrifugados a 6.000 g por 10 minutos, e o precipitado foi seco em estufa a 55 °C até peso constante. Depois, o nitrogênio total foi medido pela metodologia de *Kjeldahl* (AOAC, 1995). A quantidade de nitrogênio gasoso foi determinada pela diferença em relação aos valores encontrados para hidroxilamina, nitrito, nitrato e nitrogênio total, considerando 100 % de remoção de amônia.

## **2.7. Detecção de genes envolvidos na nitrificação autotrófica e desnitrificação anaeróbia**

Amostras do DNA genômico dos seis isolados foram submetidas à amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase) dos genes que codificam enzimas conhecidamente relacionadas ao processo de nitrificação e desnitrificação. Os genes analisados foram: *amo* = amônia monooxigenase (Rotthauwe et al., 1997), *hao* = Hidroxilamina óxido redutase (Yang et al. 2015), *nap* = Nitrato redutase periplasmática (Zhu et al. 2012); *nirS* = Nitrito

redutase (citocromo cd1 nitrito redutase) e *nirK*= Nitrito redutase (Wan et al. 2011); *norB*= Óxido nítrico redutase (Wan et al. 2011); *nosZ*= Óxido nitroso redutase (Wan et al. 2011).

## 2.8. Genômica Comparativa

Para verificar se as enzimas envolvidas nos processos de nitrificação autotrófica e desnitrificação anaeróbia estão presentes no genoma das espécies bacterianas observadas neste estudo, foi feita uma genômica comparativa utilizando genomas já depositados no banco de dados do GenBank. Para tal, foi feito o *download* de todos os genomas completos disponíveis no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) aos quais os isolados deste estudo foram afiliados. O genoma dos isolados obtidos neste estudo ainda não foram sequenciados. Adicionalmente, também foi realizado o *download* pelo KEGG (*KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) das sequências de aminoácidos de todas as enzimas conhecidamente envolvidas no processo de remoção de amônia. Os genomas dos isolados juntamente com as sequências das proteínas foram alinhados pelo BLASTn, e obedecendo a um critério de 20 % de identidade e 25 % de cobertura, foram selecionados possíveis candidatos de proteínas nos genomas analisados que poderiam estar exercendo a mesma função das enzimas conhecidamente envolvidas na nitrificação autotrófica e desnitrificação anaeróbia. Essas sequências foram analisadas no PFAM (<http://pfam.xfam.org/>) (Finn et al., 2016), para determinação da sua função.

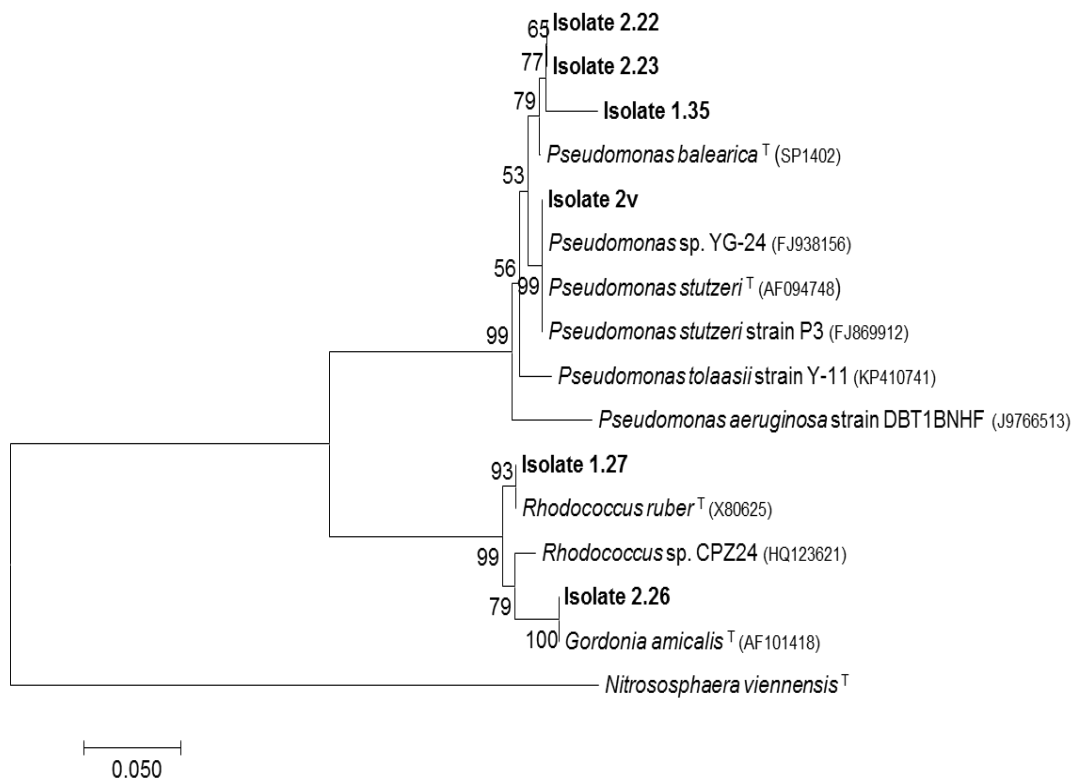
## **2.9. Análises estatísticas**

De acordo com o teste estatístico Shapiro-Wilk (Shapiro e Wilk, 1965), todos os conjuntos de dados seguiram distribuição normal, e portanto, todos os grupos foram comparados por análise de variância (ANOVA). Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software GraphPadPrism®* (versão 6.0). Valores com  $P \leq 0,05$  foram considerados para indicar diferença estatística a 95 % de confiança.

## **3. Resultados e Discussão**

### **3.1. Identificação taxonômica dos isolados bacterianos**

A identificação taxonômica dos seis isolados selecionados, 1.27, 1.35, 2.22, 2.23, 2.26 e 2v, mostrou que os mesmos foram afiliados a quatro espécies bacterianas, sendo que o isolado 1.27 apresentou 100 % de identidade com *Rhodococcus ruber* (número de acesso CP024890.1), os isolados 1.35, 2.22 e 2.23 foram afiliados a *Pseudomonas balearica* (número de acesso KX495190.2), com identidades de 95, 99 e 100 %, respectivamente, o isolado 2.26 apresentou 100 % de identidade com *Gordonia amicalis* (número de acesso KU904410.1), e o isolado 2v apresentou 100 % de identidade com *Pseudomonas stutzeri* (número de acesso KY616652.1). Para validação da classificação taxonômica dos isolados, uma árvore filogenética foi construída com as sequências parciais do gene RNAr 16S (Figura 1). As sequências do DNAr 16S dos isolados identificados neste trabalho foram depositadas no *GenBank* com número de acesso: 1.27 (MH021606), 2.22 (MH021607), 2.23 (MH021608), 2.26 (MH021609) e 2v (MH021610).



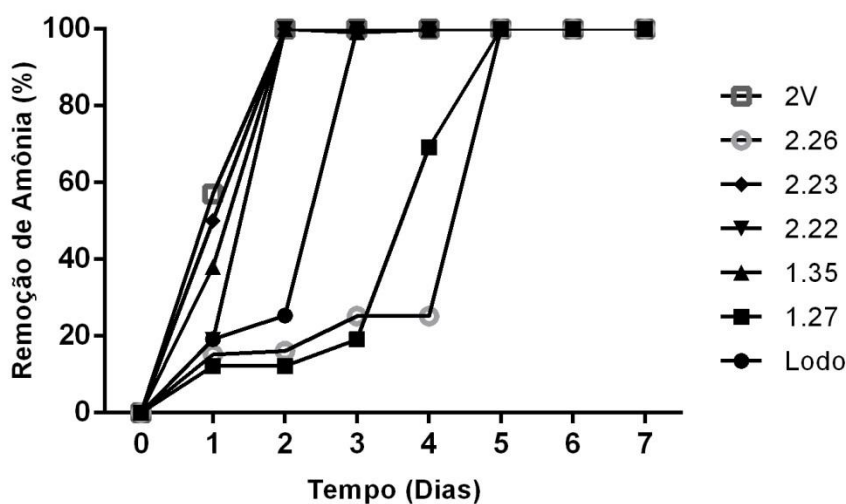
**Figura 01.** Árvore filogenética baseada na sequência parcial do 16S rDNA dos 6 isolados bacterianos, sequências tipo (T) de bactérias relacionadas e as demais sequências são microrganismos NH/DA relacionados aos isolados. A árvore foi construída pelo método *Neighbor-Joining* com valor de *Bootstrap* representado nos ramos referente a 1000 replicações. O número de acesso das sequências no *GenBank* é apresentadas entre parênteses.

A árvore filogenética mostrou que os isolados se agruparam com as sequências dos organismos referencias (T) relacionados e com as dos microrganismos NH/DA, comprovando que os isolados 1.35, 2.22, 2.23 e 2v sejam mesmo afiliados ao gênero *Pseudomonas*, 1.27 ao gênero *Rhodococcus* e 2.26 ao gênero *Gordonia*. De acordo com a literatura, este é o primeiro trabalho que descreve *Pseudomonas balearica* e *Gordonia amicalis* como nitrificantes heterotróficas/desnitrificantes aeróbias.

Para verificar se os isolados 1.35, 2.22 e 2.23, afiliados a *P. balearica*, se tratavam de linhagens diferentes, foi realizado um RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) utilizando os primers descritos por Gutierrez et al. (2011) (Figura S1). Os três isolados apresentaram um perfil único de bandas, indicando três diferentes linhagens de *P. balearica*.

### 3.2. Avaliação da remoção de amônia

Após 3 dias de incubação, os isolados *P. balearica* 1.35, 2.22, 2.23 e *P. stutzeri* 2v já haviam removido 100 % de amônia em meio HMN, a uma velocidade superior à do controle positivo (lodo nitrificante). Os outros isolados, embora tenham levado mais tempo, dentro de 5 dias já haviam removido toda a amônia (Figura 2).



**Figura 2.** Porcentagem de remoção de amônia dos isolados bacterianos ao longo do tempo. As culturas foram incubadas em meio HNM durante sete dias, e a quantificação da amônia foi avaliada a cada 24 horas.

Resultados encontrados na literatura mostram que isolados NH/DA são capazes de remover amônia em um período de 1 a 5 dias com alta eficiência, porém, quanto menor for o tempo de remoção, mais vantajoso se torna o processo (Zheng et al., 2012; Yao et al., 2013; Xu et al., 2017). Entre os seis isolados avaliados neste estudo, *P. stutzeri* 2v foi o mais eficiente.

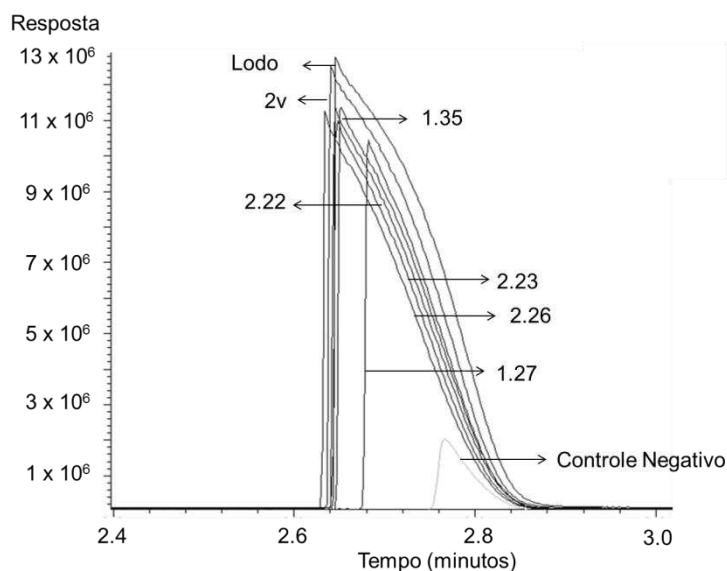
### **3.3. Validação do processo de NH/DA**

A ocorrência do processo de nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia nos seis isolados foi avaliada em tubos hermeticamente fechados com *headspace* saturado de oxigênio. Tal condição garantiu que todo gás produzido era proveniente do processo biológico.

Os resultados da produção dos gases mostraram que os seis isolados foram capazes de realizar nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia (Figura 3).

Nenhum pico referente aos gases óxido nítrico e nitroso foi observado, somente o nitrogênio gasoso foi produzido. Apesar de ter sido uma avaliação qualitativa, todos os seis isolados apresentaram picos maiores do que o controle negativo (meio sem inóculo), mostrando a alta produção do nitrogênio gasoso. Dentre todos os isolados, *R. ruber* 1.27 e *G. amicalis* 2.26 foram os que apresentaram picos de menor tamanho, enquanto que *P. stutzeri* 2v foi o que apresentou o maior pico. Em relação à ocorrência da NH/DA nos reatores biológicos, quanto mais nitrogênio gasoso for liberado para atmosfera e menos nitrogênio for incorporado na biomassa microbiana melhor, uma vez que aumento da biomassa representa maior produção de lodo biológico. Este quando em excesso no biorreator deve ser

descartado, um processo custoso para as estações de tratamento de efluentes (Jordão e Pessoa, 2005). Neste sentido, o isolado *P. stutzeri* 2v mostrou-se o mais promissor para estudos e aplicações posteriores.



**Figura 3.** Análise qualitativa da produção de nitrogênio gasoso durante o processo de NH/DA. Uma amostra de lodo nitrificante em meio HNM foi utilizada como controle positivo, e o meio HNM sem inóculo como controle negativo. Eixo X = tempo, em minutos, de detecção do gás, e eixo Y = intensidade do sinal, quanto maior o pico, maior a quantidade de nitrogênio gasoso produzido.

### 3.4. Efeito dos fatores físico-químicos na remoção de amônia via NH/DA

#### 3.4.1. Fonte de carbono

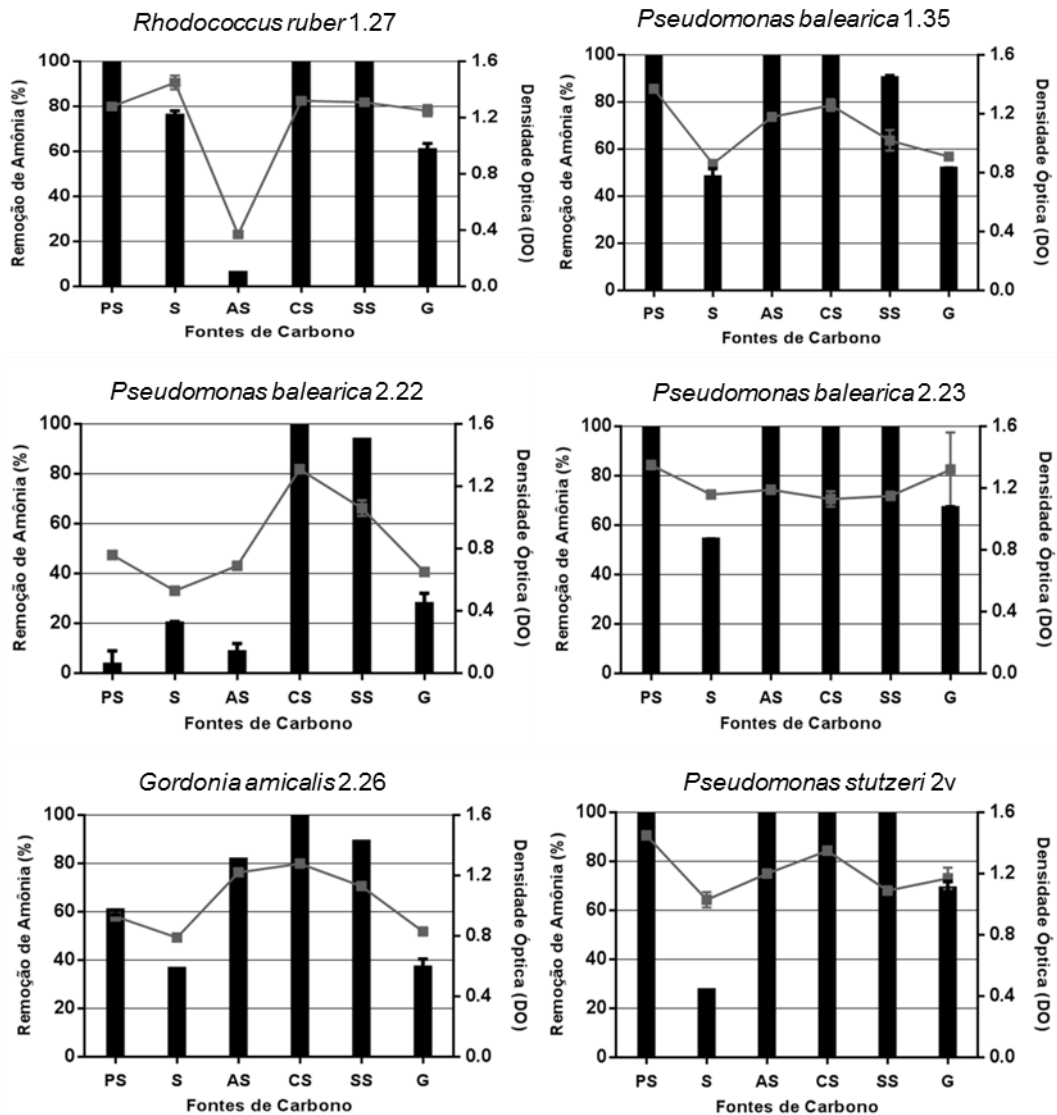
Os isolados responderam de formas diferentes às fontes de carbono testadas (Figura 4). O uso de diferentes substratos afetou significativamente o crescimento e a remoção de amônia dos microrganismos. Os isolados *P. balearica* 1.35 e 2.23 e *P. stutzeri* 2v removeram 100 % de amônia quando a fonte de carbono foi piruvato de sódio, acetato de sódio, citrato de sódio e

succinato de sódio. O perfil do isolado *R. ruber* 1.27 foi similar aos anteriores, porém com acetato de sódio quase não houve remoção.

A utilização do acetato de sódio como fonte de carbono é através da via do glioxilato, e como a taxa de remoção do isolado *R. ruber* 1.27 foi muito baixa com esse substrato, acreditamos ele não tenha os genes que codificam as enzimas necessárias para essa via.

O isolado *P. balearica* 2.22 removeu 100 % de amônia com citrato e succinato de sódio, e o isolado *G. amicalis* 2.26 só obteve eficiência máxima de remoção com citrato de sódio. Como o citrato de sódio foi uma boa fonte de carbono para todos os isolados, essa fonte foi selecionada para ser utilizada nos experimentos posteriores.

A glicose e a sacarose foram os substratos que refletiram em menor remoção de amônia para todos os isolados, resultados também encontrados em outros trabalhos (Ren et al., 2014; Liu et al., 2015). De acordo com a literatura, para a NH/DA, as fontes preferenciais de carbono são succinato, acetato e citrato, que estão envolvidos diretamente no ciclo do ácido tricarbóxico (Chen e Ni, 2012). Embora fontes preferenciais de carbono reflitam em alta taxa de crescimento microbiano, os resultados evidenciaram que maior crescimento microbiano não indica necessariamente melhor remoção de amônia. Como observado para o isolado *P. stutzeri* 2v (Figura 4), a taxa de crescimento com sacarose, com aproximadamente 20 % de remoção de amônia, foi estatisticamente igual a taxa de crescimento com succinato de sódio, com 100 % de remoção, permitindo-nos inferir que durante o processo de NH/DA possivelmente não há aumento excessivo da biomassa microbiana.

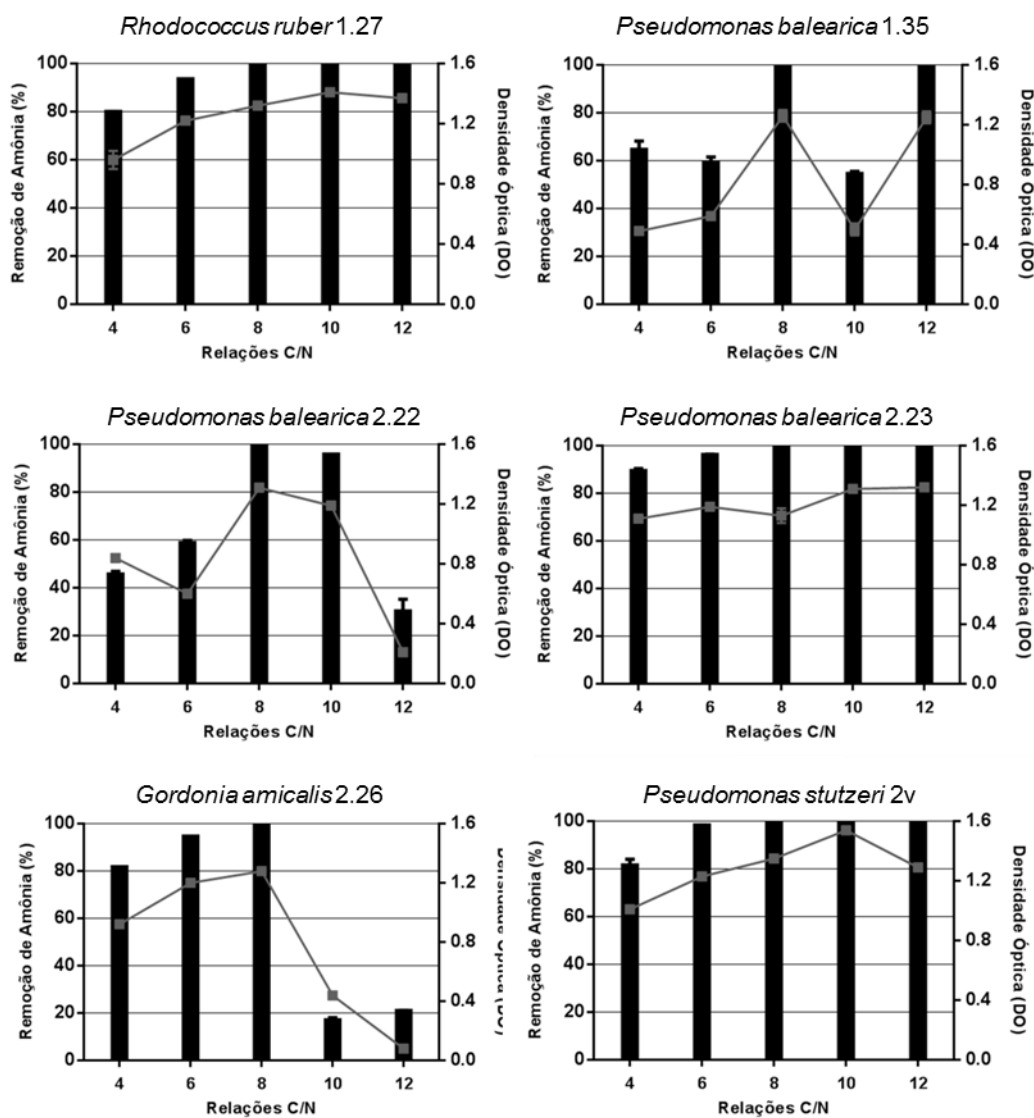


**Figura 04.** Efeito da fonte de carbono sobre o crescimento (—■) e remoção de amônia (■) dos isolados bacterianos após 72 horas de incubação em meio HNM. As fontes de carbono utilizadas foram: Piruvato de sódio (PS), Sacarose (S), Acetato de sódio (AS), Citrato de sódio (CS), Succinato de sódio (SS) e Glicose (G).

### 3.4.2. Relação Carbono/Nitrogênio

Os microrganismos nitrificantes heterotróficos/desnitrificantes aeróbios necessitam de um substrato orgânico como fonte de carbono e energia. A relação carbono/nitrogênio dos NH/DA em relação aos nitrificantes autotróficos deve ser consideravelmente maior.

Os resultados da influência da relação C/N na taxa de crescimento e remoção de amônia dos isolados mostraram que a melhor relação para todos os isolados foi 8 (Figura 5).



**Figura 05.** Efeito da relação C/N sobre o crescimento (—■—) e remoção de amônia (■) dos isolados bacterianos após 72 horas de incubação em meio HNM.

Os isolados *R. ruber* 1.27, *P. balearica* 2.23 e *P. stutzeri* 2v apresentaram taxa máxima de remoção de amônia nas relações C/N 8, 10 e 12. Os isolados *P. balearica* 2.22 e *G. amicalis* 2.26 removeram 100 % de

amônia quando a relação C/N foi igual a 8. Diversos trabalhos que avaliaram a relação C/N no processo NH/DA também observaram que a melhor relação para maioria dos isolados foi 8 (Joo et al., 2005; Chen et al., 2012; Duan et al., 2015).

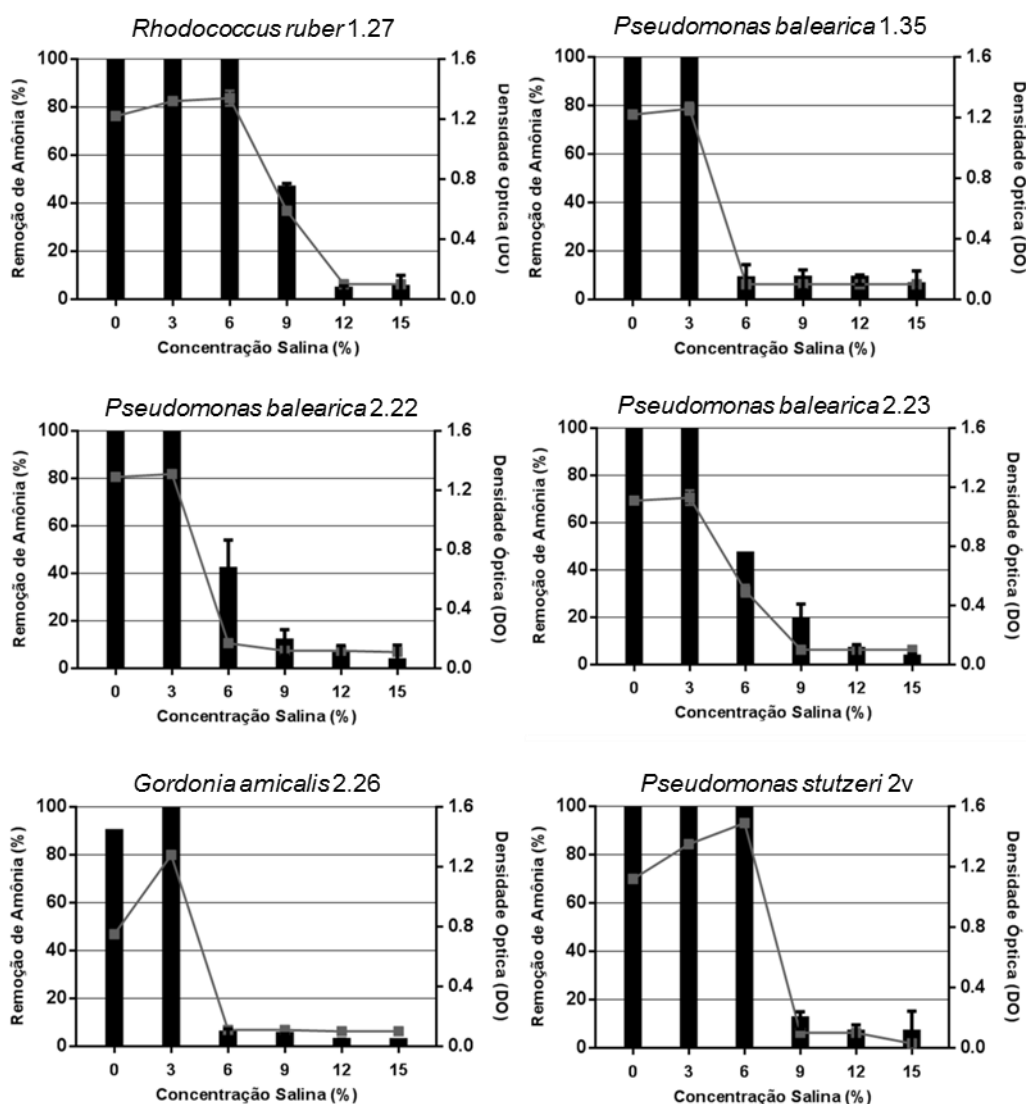
Entretanto, o perfil de resposta dos isolados *R. ruber* 1.27, *G. amicalis* 2.26 e *P. stutzeri* 2v foi semelhante nas relações C/N mais baixas, 4 e 6, condição que também apresentaram alta eficiência de remoção de amônia (Figura 5). Para uma possível aplicação desses microrganismos nas estações de tratamento de efluentes, uma maior eficiência de remoção com uma menor relação C/N seria o ideal, uma vez que fontes de carbono externas não precisariam ser adicionadas.

### **3.4.3. Efeito da salinidade**

A salinidade influencia diretamente os processos biológicos microbianos, reduzindo o crescimento dos microrganismos e a taxa de oxidação de amônia (Dalmacija, et al., 1996). De acordo com a literatura, concentrações salinas acima de 4 % de NaCl fazem com que a eficiência de remoção de amônia caia drasticamente (Shoda, et al., 2014; Lei, et al., 2015). Entretanto, microrganismos halofílicos possuem mecanismos de adaptação ao ambiente salino, e até onde se conhece, os NH/DA não são halofílicos, assim concentrações mais elevadas de sal podem afetar negativamente a taxa de crescimento e remoção de amônia (Measures, 1975; Roberts, 2005).

Nossos resultados mostraram que todos os isolados foram capazes de remover 100 % de amônia com 3 % de NaCl, porém os isolados *R. ruber*

1.27 e *P. stutzeri* 2v mantiveram a taxa de remoção de amônia elevada até 6 % de NaCl (Figura 6).



**Figura 06.** Efeito da salinidade sobre o crescimento (—■—) e remoção de amônia (■) dos isolados bacterianos após 72 horas de incubação em meio HNM.

Tais resultados foram considerados promissores, uma vez que dependendo do local de exploração do petróleo, a concentração salina da água de produção pode ser alta. Apesar da maior parte dos efluentes provenientes da exploração do petróleo chegarem nas estações de

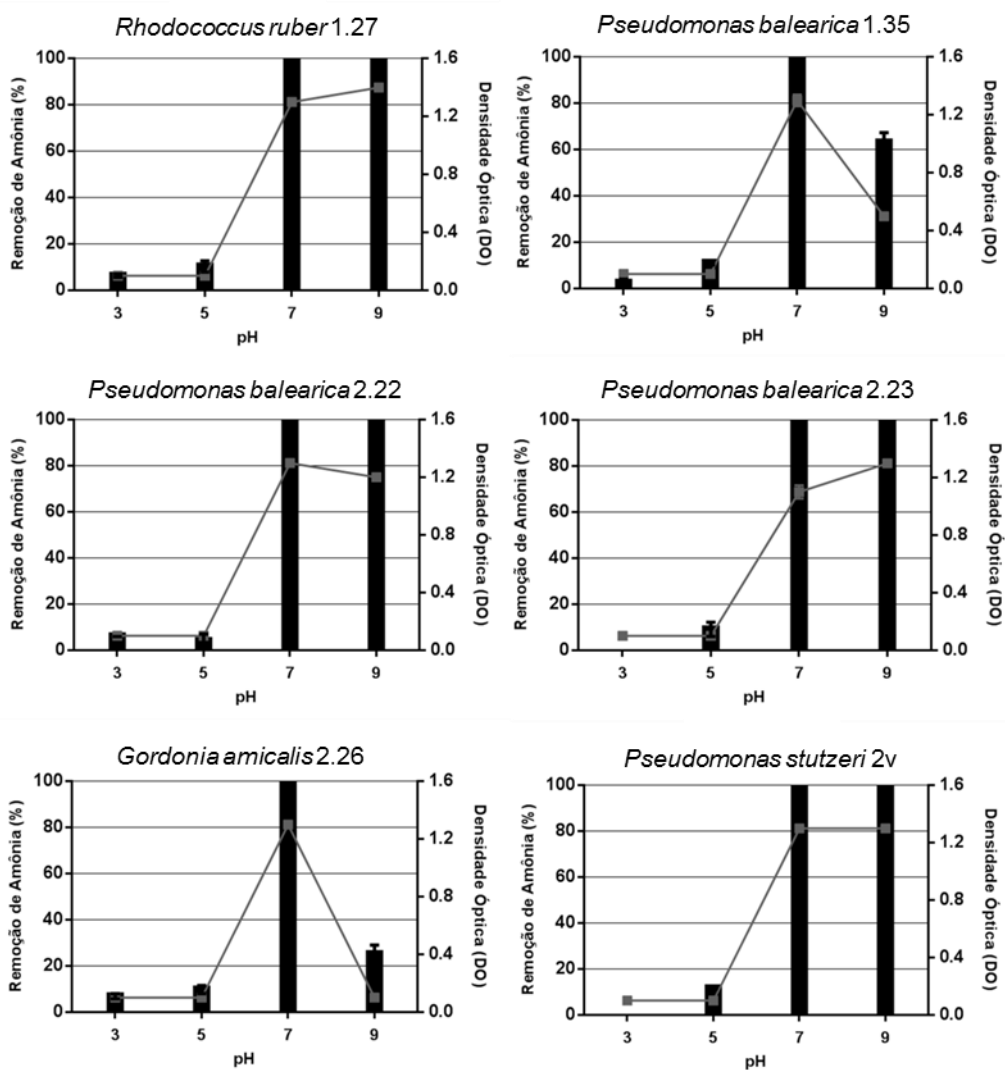
tratamento com a salinidade próxima à encontrada na água do mar, 3,5 %, após a exploração da camada do pré-sal esta realidade vem sendo alterada (Petrobrás, 2012).

Assim, conhecendo melhor o lodo biológico utilizado e conseqüentemente, sabendo da existência de isolados mais resistentes às flutuações das condições ambientais torna-se mais fácil a operação do sistema de tratamento biológico, não só para remoção de amônia, mas também para outros contaminantes.

#### **3.4.4. Efeito do pH**

Assim como outros microrganismos, os NH/DA também são fisiologicamente afetados pela variação de pH. Os valores considerados ótimos para que a NH/DA ocorra são em torno de 7,0 – 7,5.

Os resultados mostraram que nenhum isolado foi capaz de crescer e remover amônia em valores de pH menores que 7, entretanto, todos alcançaram 100 % de remoção no pH 7 (Figura 7), evidenciando que os isolados NH/DA avaliados neste trabalho crescem e removem maiores taxas de amônia em pH neutro. Porém, os isolados *R. ruber* 1.27, *P. balearica* 2.22 e 2.23 e *P. stutzeri* 2v mantiveram a eficiência de remoção até o pH 9, valor já considerado alcalino. Valores de pH baixo, onde o meio se torna mais ácido, favorecem a formação e a prevalência do íon amônio, como discutido no capítulo 1. Para que a nitrificação aconteça, a amônia, que é o substrato da enzima amônia monooxigenase, deve estar presente, e isso ocorre em situações de pH mais elevado, com meio mais alcalino.

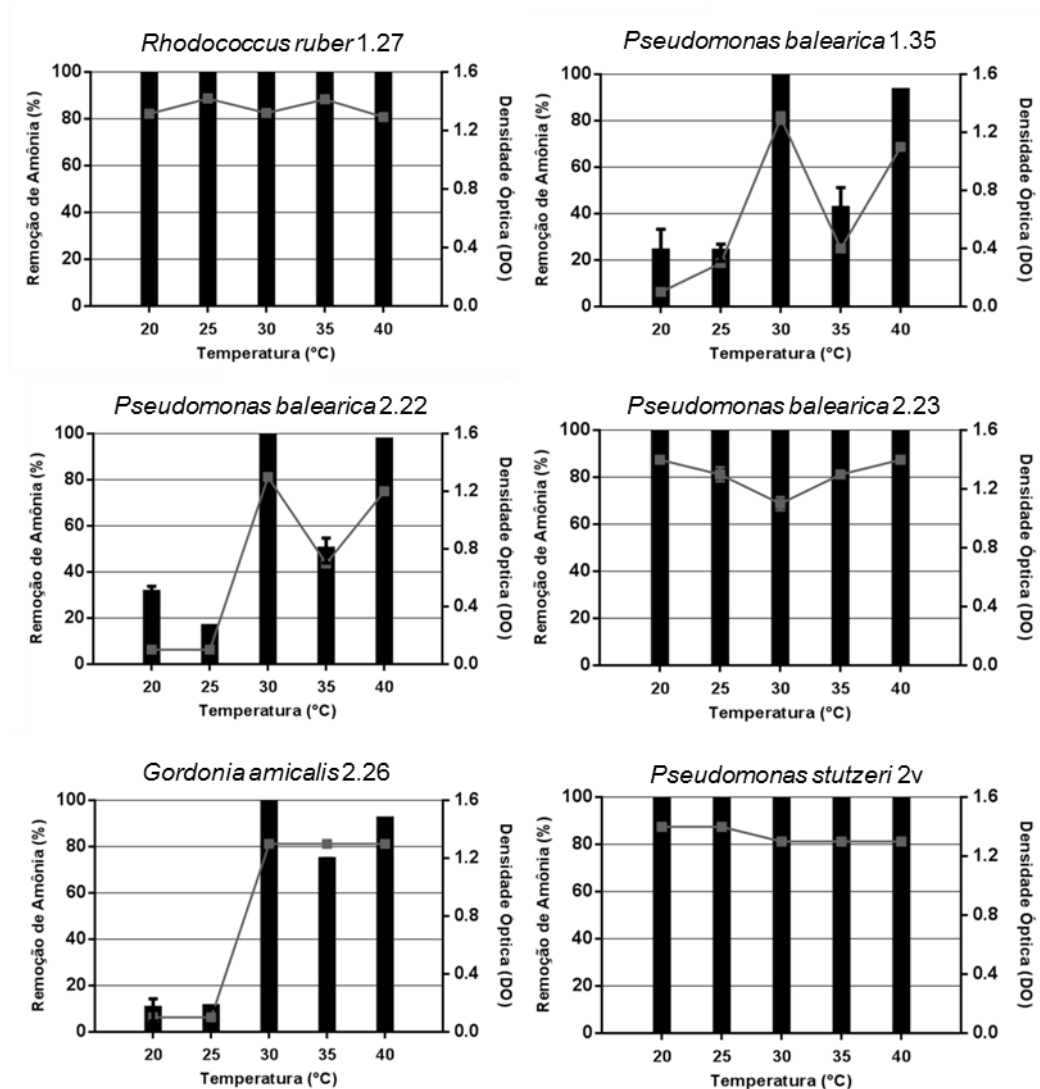


**Figura 07.** Efeito do pH sobre o crescimento (—■—) e remoção de amônia (■) dos isolados bacterianos após 72 horas de incubação em meio HNM.

### 3.4.5. Efeito da temperatura

Como é possível observar, os isolados *R. ruber* 1.27, *P. balearica* 2.23 e *P. stutzeri* 2v responderam de forma similar à variação de temperatura, os três mantiveram 100 % de remoção de amônia em todas as temperaturas analisadas. Já os isolados *P. balearica* 1.35 e 2.22 e *G. amicalis* 2.26 alcançaram máxima eficiência de remoção apenas em 30 °C,

embora tenham removido aproximadamente 90 % de amônia em 40 °C. Nas temperaturas abaixo de 30 °C a remoção foi mínima (menor que 20 %) (Figura 8).



**Figura 08.** Efeito da temperatura sobre o crescimento (—■—) e remoção de amônia (■) dos isolados bacterianos após 72 horas de incubação.

De acordo com a literatura, a temperatura ótima para os microrganismos NH/DA varia de acordo com a fisiologia de cada um, porém, quanto maior o intervalo de temperatura em que a remoção de amônia seja

máxima, melhor para a operação das estações de tratamento de efluentes (Guo et al., 2013; Huang et al., 2013; Liu et al., 2015; Lei, et al., 2016).

Os resultados obtidos na caracterização do NH/DA frente aos fatores físico-químicos mostraram que o perfil de resposta de cada isolado frente aos fatores foi diferente, inclusive para os três isolados identificados como *P. balearica* 1.35, 2.22 e 2.23, evidenciando mais uma vez que são linhagens diferentes. Esse comportamento variável é interessante para uma estação de tratamento de efluentes, visto que o lodo se torna mais resiliente caso haja alguma mudança nas condições físico-químicas do efluente a ser tratado ou dos próprios biorreatores. Assim o processo biológico de remoção de amônia e de outros poluentes não ficará totalmente comprometido.

### **3.5. Balanço de Nitrogênio**

O balanço de nitrogênio mostrou que de toda amônia removida (100% de remoção em 72 horas), aproximadamente 45 % foi transformada em biomassa e 55 % em nitrogênio gasoso (Tabela 2). A diferença de produção de biomassa entre os isolados não foi estatisticamente significativa. Pela cromatografia gasosa não foi possível detectar a produção dos gases óxido nítrico e nitroso para nenhum dos isolados estudados (Tabela 2). Portanto, sabendo que não houve produção desses intermediários, foram monitoradas a produção de hidroxilamina, nitrito e nitrato por métodos colorimétricos, e não foi possível detectar nenhum deles. Como essas metodologias são muito sensíveis, a não detecção desses compostos pode ter ocorrido por eles serem rapidamente utilizados e transformados em nitrogênio gasoso, mostrando a habilidade desses isolados para remoção de nitrogênio.

**Tabela 02.** Balanço de nitrogênio dos isolados NH/DA avaliados neste estudo.

Isolado	Quantidade de Amônia no meio (mg)	Hidroxilamina (mg)	Nitrito (mg)	Nitrato (mg)	Nitrogênio Intracelular (%)	Nitrogênio gasoso (%)
<i>R. ruber</i> 1.27	45	ND	ND	ND	41,5	58,5
<i>P. balearica</i> 1.35	45	ND	ND	ND	46,9	53,1
<i>P. balearica</i> 2.22	45	ND	ND	ND	45,6	54,4
<i>P. balearica</i> 2.23	45	ND	ND	ND	47,0	53,0
<i>G. amicalis</i> 2.26	45	ND	ND	ND	47,6	52,4
<i>P. stutzeri</i> 2v	45	ND	ND	ND	47,0	53,0

\*ND = não detectado

Trabalhos na literatura mostram que os microrganismos NH/DA utilizam aproximadamente 40 % da amônia removida para incorporação na biomassa, podendo variar de acordo com o microrganismo, e que os intermediários hidroxilamina, nitrito e nitrato, quando são detectados, estão presentes em quantidades traço (Chen et al., 2012; Ren et al., 2014; Jin et al., 2015).

Como discutido anteriormente neste trabalho, é importante que a remoção da amônia não esteja acoplada com o aumento da biomassa microbiana, uma vez que o excesso de biomassa pode se tornar um fator negativo para as estações de tratamento de efluentes.

### **3.6. Detecção dos genes envolvidos na remoção de amônia convencional**

Como ainda não foi encontrado um marcador específico para o processo de NH/DA, os estudos sobre esse processo descritos na literatura

são realizados através da detecção dos genes que codificam as enzimas envolvidas na nitrificação autotrófica e desnitrificação anaeróbia (Chen e Ni, 2012; Yang et al., 2015; Huang et al., 2017). Dessa forma, os genes que codificam as enzimas AmoA, HaoF, Nap, NirS, NorB e NosZ foram utilizados neste trabalho.

Não foi possível detectar nenhum gene que codifica as enzimas envolvidas no processo de nitrificação autotrófica no genoma dos seis isolados deste estudo. Já os genes envolvidos na desnitrificação anaeróbia foram identificados nos isolados *P. balearica* 1.35, 2.22 e 2.23 e *P. stutzeri* 2v (Tabela 03, Figura S2). Esses isolados já foram descritos na literatura como desnitrificantes anaeróbios, então o fato deles possuírem os genes que codificam essas enzimas, não significa que elas estão sendo utilizadas no processo de NH/DA, até porque a desnitrificação convencional ocorre em anaerobiose o processo de NH/DA em aerobiose.

Nos isolados 1.27 e 2.26, identificados como *Rhodococcus ruber* e *Gordonia amicalis*, respectivamente, não foram detectados nenhum dos genes envolvidos no processo de remoção de amônia convencional. Essas duas espécies são gram-positivas, e de acordo com literatura, a maioria dos microrganismos capazes de NH/DA são gram-negativos (Zhang et al., 2011).

Os resultados deste estudo mostram que, embora alguns isolados tenham os genes que codificam algumas enzimas chaves do processo de desnitrificação, possivelmente não são essas enzimas que estão envolvidas no processo de NH/DA, e estudos moleculares mais aprofundados devem ser feitos para tentar elucidar a via metabólica envolvida nesse processo de remoção.

**Tabela 03.** Detecção dos genes envolvidos no processo de remoção de amônia convencional nos isolados identificados neste trabalho. Enzimas destacadas em vermelho - envolvidas no processo de nitrificação autotrófica; Enzimas destacadas em verde - envolvidas no processo de desnitrificação anaeróbia.

Isolados	Enzimas envolvidas na nitrificação autotrófica/desnitrificação anaeróbia					
	AmoA	HaoF	Nap	NirS	NorB	NosZ
<i>R. ruber</i> 1.27	-	-	-	-	-	-
<i>P. balearica</i> 1.35	-	-	+	+	+	+
<i>P. balearica</i> 2.22	-	-	+	+	+	+
<i>P. balearica</i> 2.23	-	-	+	+	+	+
<i>G. amicalis</i> 2.26	-	-	-	-	-	-
<i>P. stutzeri</i> 2v	-	-	+	+	+	+

Sinal de positivo (+): presença do gene no genoma do isolado e sinal de negativo (-): ausência do gene. AmoA - amônia monooxigenase; HaoF - hidroxilamina óxido redutase; Nap - Nitrato redutase periplasmática; NirS - nitrito redutase; NorB - óxido nítrico redutase e NosZ - óxido nítrico redutase.

### 3.7. Genômica comparativa

A genômica comparativa foi realizada para investigar em detalhes as enzimas envolvidas na remoção de amônia que estão presentes nos genomas dos microrganismos relacionados aos deste trabalho, bem como minimizar as limitações da técnica de PCR, como a padronização da técnica, especificidade dos *primers*, amplificação inespecífica, que podem fazer com que cheguemos a resultados falso-negativos.

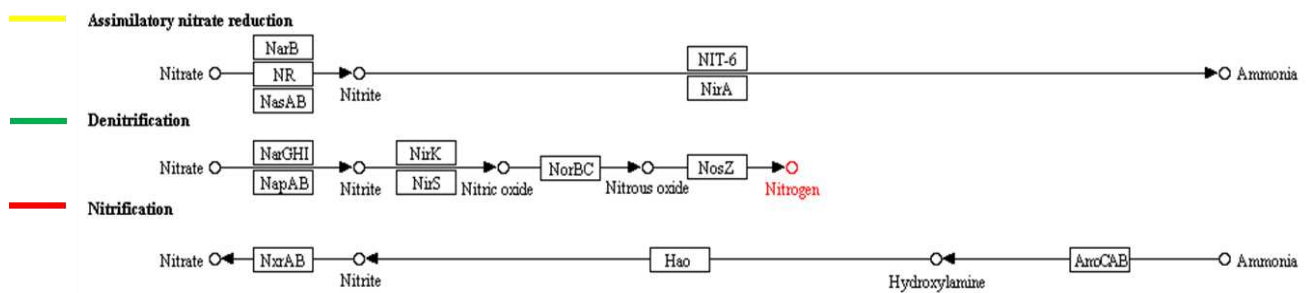
Os resultados encontrados na análise comparativa do genoma mostraram que nenhum dos isolados avaliados possuíam os genes que codificam as enzimas envolvidas no processo de nitrificação autotrófica, indicando que outras enzimas estão participando dessa etapa na NH/DA (Tabela 4).

**Tabela 4.** Análise comparativa das sequências de enzimas envolvidas em diferentes vias do ciclo do nitrogênio presentes nos genomas de isolados capazes de NH/DA disponíveis no banco de dados do GenBank.

Enzimas	Isolados NH/DA (genoma disponível no GenBank)			
	<i>G. amicalis</i>	<i>P. balearica</i>	<i>P. stutzeri</i>	<i>R. ruber</i>
AmoABC	-	-	-	-
Hao	-	-	-	-
NarG/NxrA	-	+	+	+
NarH/NxrB	-	+	+	+
NarI	-	+	+	-
NapA	-	+	+	-
NirS	-	+	+	-
NirK	-	-	-	-
NorBC	-	+	+	-
NosZ	-	+	+	-
NasA	+	+	+	+
NR	+	+	+	+
NarB	+	+	+	+
NirA	+	+	+	+

Sinal de positivo (+): presença do gene que codifica a enzima e sinal de negativo (-): ausência do gene que codifica a enzima no genoma.

Para melhor entendimento, as vias metabólicas das quais as enzimas analisadas na genômica comparativa participam estão sumarizadas a seguir (Figura 9).



**Figura 9.** Vias metabólicas envolvidas nos processos de nitrificação, desnitrificação e assimilação do nitrato e as enzimas envolvidas em cada processo. Amo - amônia monooxigenase; Hao - hidroxilamina óxido redutase; Nar/Nxr - nitrato redutase / nitrito oxidoreductase; Nap - Nitrato redutase periplasmática; Nir - nitrito redutase; NorB - óxido nítrico redutase; NosZ - óxido nítrico redutase; Nas - nitrato redutase assimilatória; NR - nitrato redutase (NADPH); Nar - nitrato redutase ferredoxina; Nir - nitrito redutase ferredoxina e NIT-6 - nitrito redutase (NADPH). FONTE: KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, com modificações.

Os genes que codificam as enzimas envolvidas na redução assimilatória do nitrato estão presentes em todos os genomas, uma vez que essa é a via na qual os microrganismos utilizam o nitrato diretamente para incorporação intracelular. Os genomas referentes aos isolados *P. balearica* 1.35, 2.22 e 2.23 e *P. stutzeri* 2v, afiliados ao gênero *Pseudomonas*, possuem os genes que codificam as enzimas envolvidas na desnitrificação anaeróbia, exceto o gene *nirK*. De acordo com Shapleigh e Payne (1985) ambas as enzimas, NirK e NirS desempenham a mesma função, porém, o mesmo microrganismo é incapaz de ter as duas.

Como discutido em sessões anteriores, a presença dos genes que codificam as enzimas envolvidas no processo de desnitrificação não garante que são essas enzimas que participam do processo de NH<sub>4</sub>/DA, uma vez que

esses microrganismos já são descritos como desnitrificantes anaeróbios e precisam dessas enzimas para realizar esse processo. Por isso, acreditamos que o processo de NH/DA seja realizado por uma ou mais vias metabólicas diferentes das atualmente descritas.

Na tentativa de resolver esta questão, o isolado *P. stutzeri* 2v foi selecionado entre os seis para aprofundarmos no estudo das enzimas envolvidas no processo de NH/DA através do estudo de seu transcriptoma em condição de indução da via. A seleção foi feita com base nos resultados obtidos neste trabalho, uma vez que este isolado apresentou melhor resposta nos testes de remoção de amônia, produção de nitrogênio gasoso e influência dos fatores físico-químicos.

#### **4. Conclusões**

Os seis isolados identificados neste trabalho são capazes de remover amônia em meio MHN e de transformar amônia em nitrogênio gasoso em condições de aerbiose, caracterizando o processo de NH/DA. O estudo da influência dos fatores físico-químicos sobre o processo de remoção mostrou que os seis isolados respondem de forma diferente aos diferentes fatores. As condições em que cada isolado manteve 100% de remoção de amônia foram: *R. ruber* 1.27- fonte de carbono: piruvato, citrato e succinato de sódio, relação C/N: 8, 10 e 12, salinidade: 0, 3 e 6 %, pH: 7 e 9, temperatura: 20, 25, 30, 35 e 40 °C; *P. balearica* 1.35 - fonte de carbono: piruvato, acetato e citrato de sódio, relação C/N: 8 e 12, salinidade: 0, e 3 %, pH: 7, temperatura: 30 °C; *P. balearica* 2.22 - fonte de carbono: citrato de sódio, relação C/N: 8, salinidade: 0, e 3 %, pH: 7 e 9, temperatura: 30 °C; *P.*

*balearica* 2.23 - fonte de carbono: piruvato, acetato, citrato e succinato de sódio, relação C/N: 8,10 e 12, salinidade: 0, e 3 %, pH: 7 e 9, temperatura: 20, 25, 30, 35 e 40 °C; *G. amicalis* 2.26 - fonte de carbono: citrato de sódio, relação C/N: 8, salinidade: 3 %, pH: 7, temperatura: 30 °C; *P. stutzeri* 2v - fonte de carbono: piruvato, acetato, citrato e succinato de sódio, relação C/N: 8,10 e 12, salinidade: 0, e 3 e 6 %, pH: 7 e 9, temperatura: 20, 25, 30, 35 e 40 °C. O balanço de nitrogênio mostrou que de toda a amônia removida, aproximadamente 55% é perdida na forma de gás e o resto é transformado em biomassa microbiana. Os isolados *P. balearica* 1.35, 2.22, 2.23 e *P. stutzeri* 2v que também são desnitrificantes anaeróbios possuem todos os genes que codificam as enzimas desta via, porém, a presença do gene não garante que ele seja expresso em condição de indução da via de NH/DA, e os isolados *R. ruber* 1.27 e *G. amicalis* 2.26 não possuem nenhum dos genes relacionados ao processo de remoção de amônia convencional. Esse trabalho mostrou que todos os isolados estudados possuem alto potencial para aplicação em estação de tratamento de efluentes para remoção de amônia e que estudos moleculares mais aprofundados devem ser realizados para um melhor conhecimento das vias do processo de NH/DA nos microrganismos avaliados.

### **Agradecimentos**

Os autores são gratos à PETROBRAS e FAPEMIG pelo apoio financeiro e à CNPq e CAPES pela concessão de bolsas de estudo.

## Financiamento

Esse trabalho foi apoiado pela CAPES, FAPEMIG e PETROBRAS (número de concessão 8603-4600391375).

## Referências Bibliográficas

1. Ahn, Y.H., 2006. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process. Biochemistry*. 41, 1709-1721.
2. Andrade, V.T. Avaliação da toxicidade de água produzida tratada por processo evaporativo com a finalidade de reúso em solo. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ. 2009.
3. APHA, 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th ed. American Public Health Association, Washington, DC.
4. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. *Official methods of analysis*. 16 ed. Arlington: AOAC, 1995, v. 1.
5. Chaney, A.L., Marbach, E.P., 1961. Modified Reagents for Determination of Urea and Ammonium, *Clin. Chem.* 8, 130-132.
6. Chen, Q. and Ni J., 2012. Ammonium removal by *Agrobacterium* sp. LAD9 capable of heterotrophic nitrification - aerobic denitrification. *J. Biosci. Bioeng.* 113, 619-623.
7. Da Motta, M., Pons, M.N., Roche, N., Vivier, H., Amaral, A.L., Ferreira, E.C., Mota, M., 2003. Estudo do funcionamento de estações de

tratamento de esgotos por análise de imagem: validações e estudo de caso.

8. Dalmacija, B., Karlovic, E., Tamas, Z., Miskovic, D., 1996. Purification of high salinity wastewater by activated sludge process, *Water Research*. 2, 295-298.
9. 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. *Bioresour. Technol.* 179, 421-428.
10. Finn, R.D., P. Coghill, R.Y. Eberhardt, S.R. Eddy, J. Mistry, A.L. Mitchell, S.C. Potter, M. Punta, M. Qureshi, A. Sangrador-Vegas, G.A. Salazar, J. Tate, A. Bateman, 2016. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research Database Issue* 44:D279-D285.
11. Frear, D.S., Burrell, R.C., 1955. Spectrophotometric method for determining hydroxylamine reductase activity in higher plants. *Anal. Chem.* 27, 1664–1665.
12. Gabardo, I.T. Caracterização química e toxicológica da água produzida descartada em plataformas de óleo e gás na costa brasileira e seu comportamento dispersivo no mar. Tese de Doutorado, UFRN, Natal, RN, Brasil. 2007.
13. 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. Letters*. 35, 2045-2049.

14. Gutierrez, D., Martin-Platero, A. M., Rodriguez, A., Martinez-Bueno, M., Garcia, P. & Martinez, B., 2011. Typing of bacteriophages by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR to assess genetic diversity. *FEMS microbiology letters* 322, 90-97.
15. 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. *Bioresour. Technol.* 146, 44-50.
16. Huang, F., Pan, L., Lv, N., Tang, X. Characterization of novel *Bacillus* strain N31 from mariculture water capable of halophilic heterotrophic nitrification–aerobic denitrification. *Journal of bioscience and bioengineering*, 124(5), 564-571, 2017.
17. Ji, B., H. Wang, and K. Yang., 2014. Tolerance of an aerobic denitrifier (*Pseudomonas stutzeri*) to high O<sub>2</sub> concentrations. *Biotechnol. Letters.* 36, 719-722.
18. Ji, B., Yang, K., Wang, H., Zhou, J., & Zhang, H., 2015. Aerobic denitrification by *Pseudomonas stutzeri* C3 incapable of heterotrophic nitrification. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 38(2), 407-409.
19. Jin, R., Liu, T., Liu, G., Zhou, J., Huang, J., & Wang, A., 2015. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the marine origin bacterium *Pseudomonas* sp. ADN-42. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175(4), 2000-2011.
20. Joo, H.S., Hirai, M., Shoda, M., 2005. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification–aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis*. *J. Biosci. Bioeng.* 100, 184–191.

21. Jordão, E.P, Pessoa, C.A. Tratamento de Esgotos Domésticos. 4<sup>a</sup> ed. ABES-RJ, 682p. 2005.
22. Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *In*: Goodfellow, M. & Stackebrandt, E. (eds.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. p. 115-147.
23. 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. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 4219-4229.
24. Limpiyakorn, T., Fürhacker, 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.
25. Liu, Y., Hu, T., Song, Y., Chen, H., & Lv, Y., 2015. Heterotrophic nitrogen removal by *Acinetobacter* sp. Y1 isolated from coke plant wastewater. *J. biosci. Bioeng.* 120(5), 549-554.
26. Madigan, T.M., Martinko, J.M., Parker, J., 1997. Brock Biology of Microorganisms, Prentice Hall, 8<sup>a</sup> edição, New York.
27. 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.
28. Measures, J.C., 1975. Role of amino acids in osmoregulation of nonhalophilic bacteria, *Nature.* 257, 398-400.

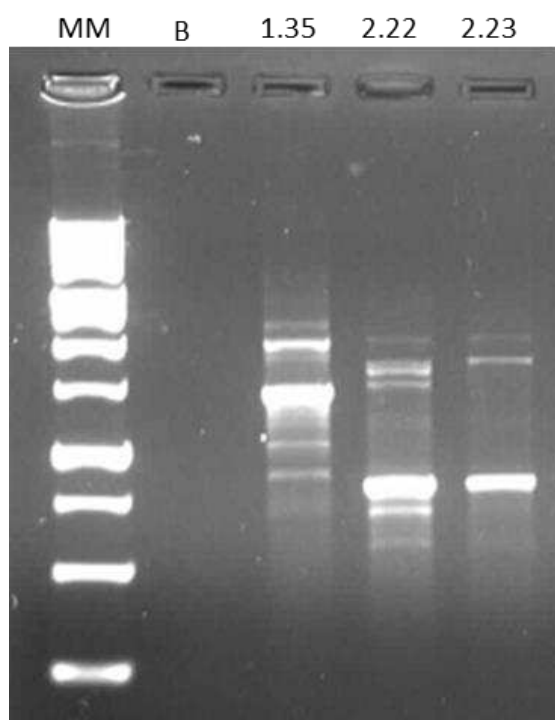
29. Munirasu, S., Haija, M.A., Banat, F., 2016. Use of membrane technology for oil field and refinery produced water treatment - A review. *Process. Saf. Environ.* 100, 183-202.
30. Padhi, S. K., Tripathy, S., Sen, R., Mahapatra, A. S., Mohanty, S., & Maiti, N. K. Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 78, 67-73, 2013.
31. Padhi, S. K., Tripathy, S., Mohanty, S., Maiti, N. K. Aerobic and heterotrophic nitrogen removal by *Enterobacter cloacae* CF-S27 with efficient utilization of hydroxylamine. *Bioresource technology*, 232, 285-296, 2017.
32. PETROBRAS, 2012. Disponível em: <http://www.petrobras.com.br/pt/>. Acesso em 20 de julho de 2015.
33. Pospiech, A. & Neumann, B., 1995. Versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends Genet.* 11:217-218.
34. Ren, Y. X., Yang, L., & Liang, X., 2014. The characteristics of a novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium, *Acinetobacter junii* YB. *Bioresour. Technol.* 171, 1-9.
35. Roberts, M.F., 2005. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems.* 1-5.
36. 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.

37. Rotthauwe, 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(12), 4704-4712.
38. Saitou, N. and Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
39. Shapleigh, J.P., Payne, W.J., 1985. Differentiation of *c*, *d1* cytochrome and copper nitrite reductase production in denitrifiers. *FEMS Microbiol. Lett.* 26, 275–279.
40. Shapiro, S. S.; Wilk, M. B., 1965. "An analysis of variance test for normality (complete samples)". *Biometrika.* 52 (3–4): 591–611. doi:10.1093/biomet/52.3-4.591. JSTOR 2333709. MR 0205384. p. 593
41. Shoda, M., & Ishikawa, Y., 2014. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification of high-strength ammonium in anaerobically digested sludge by *Alcaligenes faecalis* strain No. 4. *J. bioosci. Bioeng.* 117(6), 737-741.
42. Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. and Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary genetics analysis. (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
43. Thompson, J. D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F. and Higgins, D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24: 4876-4882.

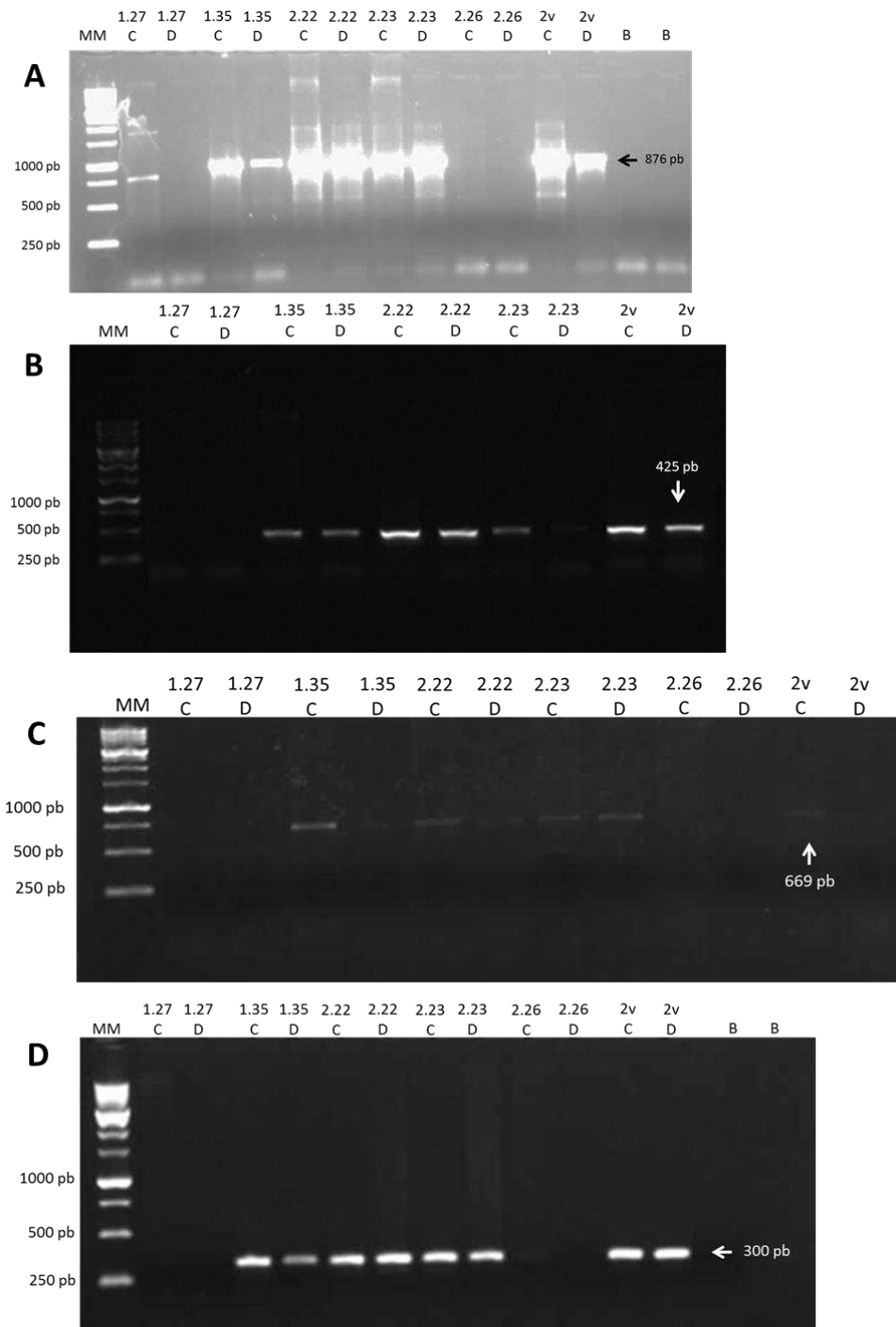
44. Vanparys B., Bodelier P., De Vos P., 2006. Validation of the correct start codon of norX/nxrX and universality of the norAXB/nxrAXB gene cluster in *Nitrobacter* species. *Curr. Microbiol.* 53, 255-257.
45. Xu, Y., He, T., Li, Z., Ye, Q., Chen, Y., Xie, E., Zhang, X., 2017. Nitrogen removal characteristics of *Pseudomonas putida* Y-9 capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature. *BioMed Res. Int.*
46. Zhang, J., Wu, P., Hao, B., Yu, Z., 2011. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. *Bioresour. Technol.* 102, 9866–9869.
47. 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.
48. Zheng, H. Y., Liu, Y., Gao, X. Y., Ai, G. M., Miao, L. L., & Liu, Z. P., 2012. Characterization of a marine origin aerobic nitrifying–denitrifying bacterium. *J. biosci. Bioeng.* 114(1), 33-37.
49. Wan, C., Yang, X., Lee, D.J., Du, M., Wan, F., Chen, C., 2011. Aerobic denitrification by novel isolated strain using  $\text{NO}_2^-$ -N as nitrogen source. *Bioresour. Technol.* 102, 7244–7248.
50. Yang, L., Ren, Y. X., Liang, X., Zhao, S. Q., Wang, J. P., & Xia, Z. H., 2015. Nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifier *Acinetobacter junii* YB and its potential application for the treatment of high-strength nitrogenous wastewater. *Bioresour. Technol.* 193, 227-233.

51. 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.

## Material Suplementar



**Figura S1.** Perfil de bandas dos isolados *P. balearica* 1.35, 2.22 e 2.23 por RAPD. O marcador molecular utilizado foi de 1 Kb, e as amostras foram aplicadas na seguinte ordem: marcador molecular (MM), branco (B), isolado 1.35, isolado 2.22 e isolado 2.23.



**Figura S2.** Resultados das ampliações dos genes que codificam enzimas relacionadas ao processo de remoção de amônia convencional. A) gene que codifica a enzima nitrato redutase periplasmática - Nap, B) gene que codifica a enzima nitrito redutase - NirS, C) gene que codifica a enzima óxido nítrico redutase - NorB, e D) gene que codifica a enzima óxido nitroso redutase - NosZ. As ampliações foram feitas com o DNA extraído C = concentrado e D = diluído 10 vezes. MM= marcador molecular de 1 Kb.

## CAPÍTULO 3

### **Elucidación dos genes envolvidos na via de nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia do isolado *Pseudomonas stutzeri* 2v por transcriptômica**

Lívia Carneiro Fidélis Silva<sup>a</sup>, Helena Santiago Lima<sup>b</sup>, Tiago Antonio de Oliveira Mendes<sup>c</sup>, Adilson Sartoratto<sup>d</sup>, Maira Souza<sup>e</sup>, Rodrigo Suhett de Souza<sup>f</sup>, Sérgio Oliveira de Paula<sup>g</sup>, Valéria Maia de Oliveira<sup>h</sup>, Cynthia Canêdo da Silva<sup>i</sup>

<sup>a</sup>M. Sc., Estudante, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. (livia.silva@ufv.br)

<sup>b</sup>Pós-graduação, Estudante, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. (hsantiagolima@gmail.com)

<sup>c</sup>Ph. D., Professor, Departamento bioquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. (tiagomgmendes@yahoo.com.br)

<sup>d</sup>M. Sc., Pesquisador, Divisão de química orgânica e farmacêutica, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil. (adilson@cpqba.unicamp.br)

<sup>e</sup>M. Sc., Pesquisadora, Petrobras – Centro de pesquisa e desenvolvimento (CENPES), Petrobras, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. (mpsousa@petrobras.com.br)

<sup>f</sup>Pesquisador, Petrobras – Centro de pesquisa e desenvolvimento (CENPES), Petrobras, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. (rsuhett@petrobras.com.br)

<sup>g</sup>Ph. D., Professor, Departamento de biologia geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. (depaula@ufv.br)

<sup>h</sup>Ph. D., Professora, Divisão de recursos microbianos, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil. (vmaia@cpqba.unicamp.br)

<sup>i</sup>Ph. D., Professora, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. (ccanedo@ufv.br)

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

**Resumo:**

A nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia (NH/DA) corresponde ao processo de remoção de amônia em que um único microrganismo é capaz de transformá-la em  $N_{2(g)}$  em condições aeróbias. Entretanto, ainda é um processo pouco elucidado, com limitado conhecimento sobre sua via metabólica. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar os genes envolvidos na via de NH/DA no isolado *P. stutzeri* 2v através do estudo de seu transcriptoma. A padronização das condições do transcriptoma mostrou que a indução da via de NH/DA ocorreu em 4 horas após adição do inóculo ao meio de cultivo, e que a remoção de amônia foi dose dependente. Após a análise do transcriptoma em condições de baixa ( $0,16 \text{ gL}^{-1}$ ) e alta ( $1,32 \text{ gL}^{-1}$ ) concentração de amônia, os resultados mostraram que 29 genes foram super expressos, refletindo em uma mudança na maquinaria de biossíntese e tradução celular do isolado *P. stutzeri* 2v, indicando que outros genes foram expressos durante o processo de NH/DA, incluindo aqueles que codificam proteínas envolvidas em processos de óxido-redução. Os genes que codificam as enzimas envolvidas na nitrificação autotrófica e desnitrificação anaeróbia não tiveram sua expressão alterada, mostrando que os genes responsáveis pelo processo de NH/DA são diferentes daqueles envolvidos nos processos convencionais.

**Palavras-chave:** remoção de amônia; nitrificação; tratamento biológico; expressão diferencial de genes.

## 1. Introdução

A remoção biológica de nitrogênio pode acontecer através de diferentes processos que envolvem grupos microbianos e vias metabólicas distintas. Um desses processos é a nitrificação autotrófica seguida da desnitrificação anaeróbia, em que a amônia é removida e transformada em  $N_{2(g)}$  pela ação conjunta de microrganismos autotróficos e heterotróficos, e duas condições atmosféricas são necessárias: aerobiose para a nitrificação e anaerobiose para a desnitrificação (Madigan et al., 1997; Uemoto e Saiki, 2000; Vazoller, 2001; Limpiyakorn, 2013).

Outro exemplo é a nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia (NH/DA), processo realizado por um único microrganismo capaz de transformar a amônia em nitrogênio gasoso em uma única condição atmosférica, aerobiose (Robertson e Kuenen, 1983; Jin et al., 2011; Xu et al., 2017). Este processo, descrito pela primeira vez em 1983, vem ganhando maior destaque nos últimos 10 anos, uma vez que a maioria dos isolados descritos na literatura como capazes de realizar a NH/DA terem sido isolados de estações de tratamento de efluentes (ETE) (Zhang et al., 2011; Chen et al., 2012; Chen et al., 2014).

No contexto do tratamento biológico de efluentes, os microrganismos que realizam o processo de NH/DA oferecem algumas vantagens em relação aos convencionais, pois conseguem remover amônia em uma única condição de operação do reator, removem também a matéria orgânica e apresentam maior taxa de crescimento e resiliência que os autotróficos (Guo et al., 2013; Li et al., 2015; Lei et al., 2016; Silva et al., 2018).

Entretanto, ao contrário do processo convencional de remoção de amônia, que tem as enzimas envolvidas nas vias metabólicas bem elucidadas, a NH/DA ainda é limitada, pois pouco se conhece sobre seu metabolismo e sobre os microrganismos capazes de realizá-lo.

Até o momento, os estudos que tentaram investigar essa via metabólica basearam-se nos processos convencionais, utilizando as enzimas envolvidas na nitrificação autotrófica e desnitrificação anaeróbia e seus intermediários (Chen e Ni, 2012; Guo et al., 2013; Huang et al., 2013; Padhi et al., 2017), porém, a maioria dos microrganismos NH/DA descritos são também desnitrificantes anaeróbios, dificultando ainda mais o entendimento deste processo.

Assim, visto a importância da NH/DA para a remoção biológica de amônia em ETE e a ausência de informação sobre seu metabolismo, neste trabalho, foi investigada a via metabólica responsável por este processo através da análise do transcriptoma da linhagem bacteriana *P. stutzeri* 2v previamente isolada por nosso grupo de pesquisa e caracterizada como nitrificante heterotrófico/desnitrificante aeróbio. Um maior conhecimento da via metabólica da NH/DA possibilitará modular melhor os microrganismos capazes de realizar este processo, que resultará na otimização das condições operacionais do reator e, conseqüentemente, numa melhor performance da remoção biológica de amônia nas estações de tratamento de efluentes.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. *Pseudomas stutzeri* 2v**

A bactéria foi previamente isolada de amostra de lodo ativado nitrificante proveniente do sistema de tratamento de efluentes do Terminal Marítimo Almirante Barroso/TEBAR (São Sebastião/SP) por nossa equipe de trabalho. O isolado foi identificado como *Pseudomas stutzeri*, denominado pelo nosso grupo *Pseudomas stutzeri* 2v (número de acesso MH021610) e caracterizado como sendo capaz de realizar o metabolismo da NH/DA.

### **2.2. Padronização das condições para o estudo do transcriptoma**

Para avaliar a diferença significativa na expressão de genes envolvidos na NH/DA, primeiro foi verificado se a expressão era induzida. Para isso, o isolado foi inoculado em tubos plásticos de 50 mL contendo 10 mL de meio para microrganismos nitrificantes heterotróficos (HNM) (Zhang et al., 2012), com diferentes concentrações de amônia ( $0,16 \text{ gL}^{-1}$ ,  $0,33 \text{ gL}^{-1}$ ,  $1,32 \text{ gL}^{-1}$  e  $3,3 \text{ gL}^{-1}$ ), a densidade óptica inicial do inóculo foi igual a 0,1, e as culturas foram incubadas a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  sob agitação de 150 rpm por 10 horas. A cada 2 horas, a densidade óptica e a remoção de amônia foram avaliadas. Fazendo uma análise de consumo de amônia por densidade óptica, foi possível determinar se a remoção de amônia tinha efeito dose dependente, indicando se a via de remoção era induzida ou não, e em qual momento ocorria essa indução. Uma vez que as condições estavam padronizadas para a indução da via de NH/DA, outro experimento foi realizado nas condições exatas para que a indução ocorresse, e fosse possível realizar o estudo do transcriptoma.

### 2.3. Indução da via NH/DA para obtenção do RNA

Tendo as condições padronizadas, duas colônias do isolado *P. stutzeri* 2v foram ativadas em 15 mL de meio LB. Uma alíquota foi transferida para Erlenmeyers contendo 50 mL de meio de cultivo HNM com 0,16 gL<sup>-1</sup> e 1,32 gL<sup>-1</sup> de amônia, em triplicata, com densidade óptica inicial 0,1. As culturas foram incubadas a 30 °C sob agitação de 150 rpm por 2 horas (tempo determinado na padronização). Após esse tempo, a remoção de amônia e densidade óptica foram medidas. Alíquotas de 1 mL de cultura foram retiradas para contagem de células viáveis e não viáveis com o corante iodeto de propídeo no citômetro de fluxo (BD FACS Verse, Biosciences). As células foram sedimentadas a 6.000 g por 10 minutos, e a extração de RNA foi feita com o reagente QIAzol®lysis (Qiagen) segundo instruções do fabricante. O RNA extraído foi quantificado, e tratado com DNase RNase free (Promega). O RNA tratado foi visualizado em gel de agarose 1 %, liofilizado, e enviado para sequenciamento RNAseq na *Molecular Research DNA* ([www.mrdnalab.com](http://www.mrdnalab.com), Shallowater, TX, USA) pela plataforma *Illumina HiSeq*.

### 2.4. Análises dos dados do RNAseq

A *pipeline* utilizada para análise dos dados gerados pelo RNAseq foi realizada de acordo com o trabalho de Conesa et al. (2016). Inicialmente, as sequências foram submetidas a uma análise de qualidade utilizando a ferramenta *FastQC*. As sequências de baixa qualidade e os adaptadores foram removidas utilizando a ferramenta *Trimmomatic* (Bolger et al., 2014).

O genoma de referência da espécie *Pseudomonas stutzeri* depositado no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (número de acesso NC\_015740.1) foi indexado através da ferramenta *Bowtie2* (Langmead e Salzberg, 2012) e as sequências de alta qualidade provenientes do transcriptoma foram alinhadas contra ele, utilizando a ferramenta *Tophat2* (Kim et al., 2013). A acumulação diferencial de transcritos entre as condições estudadas foi avaliada pelo teste da razão de verossimilhança implementado no programa *Cufflinks* (Roberts et al., 2011), obedecendo a um p-valor de 0,001. Os transcritos diferencialmente expressos nas diferentes concentrações de amônia foram submetidos à uma busca no banco de dados *Uniprot* para anotação funcional. Uma rede de interações baseada nas funções dos genes diferencialmente expressos foi feita através do programa *String*, e uma análise para avaliar os processos biológicos que foram enriquecidos foi feita com a *software GOanna* (McCarthy et al., 2006).

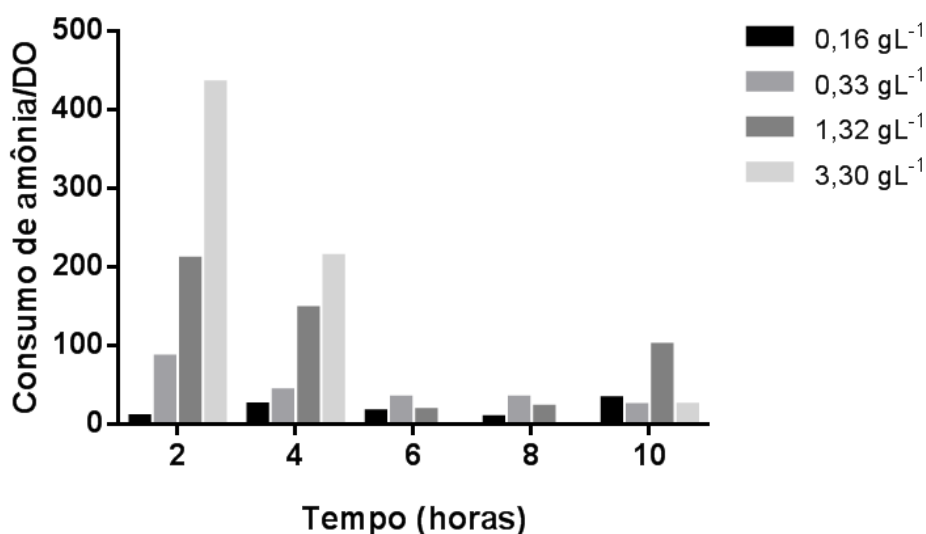
## **2.5. Análises estatísticas**

Todas as análises estatísticas foram feitas pelo *software* R-Studio, onde um teste t para comparar duas amostras foi aplicado, com base nos genes diferencialmente expressos. As replicatas foram avaliadas pela análise de componentes principais (PCA) implementado no *software* R. Valores com  $P \leq 0,001$  foram considerados para indicar diferença estatística a 99,9 % de confiança.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Padronização das condições para o estudo do transcriptoma

O perfil de consumo de amônia por densidade óptica do isolado *P. stutzeri* 2v no período de 10 horas mostrou que a medida que a concentração de amônia aumenta, o consumo por unidade de densidade óptica também aumenta, revelando que o efeito foi dose-dependente durante as 4 primeiras horas (Figura 1).



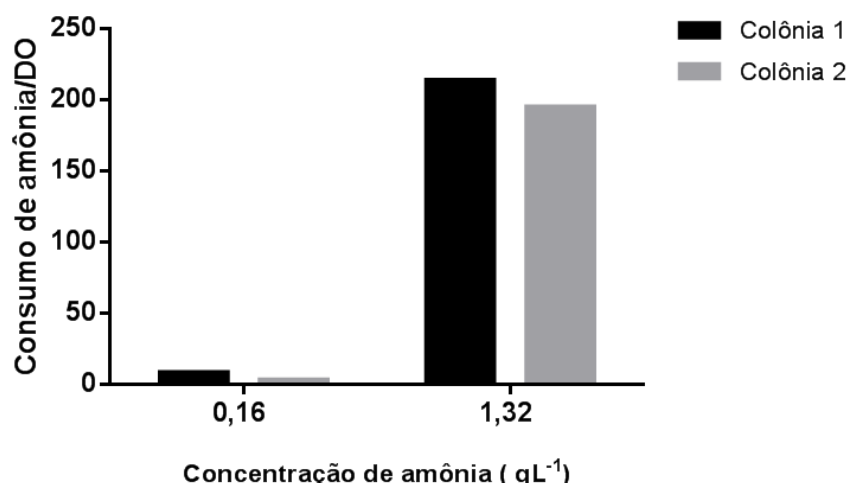
**Figura 01.** Valores normalizados do consumo de amônia por densidade óptica do isolado *P. stutzeri* 2v em diferentes concentrações de amônia. As análises foram realizadas a cada 2 horas durante o período de 10 horas.

Esse efeito dose-dependente nos mostra que a medida que aumentamos a quantidade de amônia, houve aumento da expressão dos genes envolvidos na remoção, que fez com que o consumo de amônia aumentasse. Outro fator importante, foi que essa indução ocorreu nas 4 horas iniciais do processo, mais precisamente nas 2 primeiras horas, onde maior quantidade de amônia foi removida. Como a concentração de 3,3 gL<sup>-1</sup>

de amônia é muito elevada e poderia sair da linearidade da curva padrão do teste colorimétrico, selecionamos as concentrações de  $0,16 \text{ gL}^{-1}$  e  $1,32 \text{ gL}^{-1}$  de amônia, e um tempo de 2 horas para que a indução da via de NH/DA acontecesse, e o transcriptoma do isolado pudesse ser estudado.

### 3.2. Indução da via NH/DA

Após 2 horas de incubação, o consumo de amônia por densidade óptica do isolado *P. stutzeri* 2v na menor concentração foi inferior ao seu consumo na maior concentração (Figura 2), indicando que houve indução da expressão dos genes envolvidos na via de remoção. A contagem de células por citometria indicou que 99 % das células estavam viáveis nas duas condições avaliadas (Tabela S1). Estes resultados indicaram que as condições de alta e baixa concentração de amônia foram ideais para o estudo do transcriptoma do isolado, e que a via do processo de NH/DA foi induzida dentro das condições previamente estabelecidas.



**Figura 2.** Consumo de amônia por densidade óptica do isolado *P. stutzeri* 2v em alta e baixa concentração de amônia.

A qualidade das extrações do RNA total das condições de alta e baixa concentrações de amônia foi adequada para que as amostras seguissem para o sequenciamento (Figura S1).

### 3.3. Análise dos transcriptomas

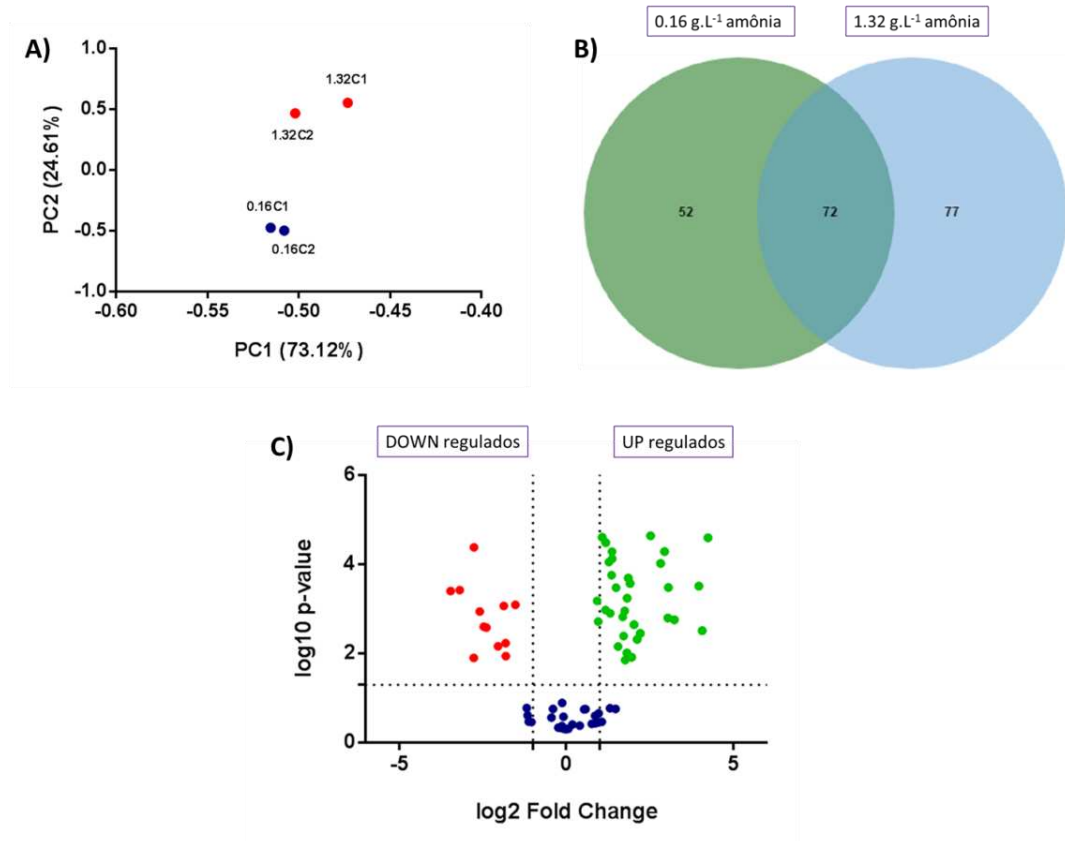
Através de Análises de Componentes Principais foi possível observar que os dados de sequenciamento do mRNA das replicatas do isolado *P. stutzeri* 2v nas condições de baixa e alta concentrações de amônia foram semelhantes (Figura 3A).

Quando comparamos os dados obtidos pelos dois transcriptomas, observamos que setenta e dois genes foram expressos nas duas condições estudadas (Figura 3B), e que alguns sofreram regulação positiva, com aumento na sua expressão, e outros sofreram regulação negativa, com diminuição da expressão.

Na condição de menor concentração de amônia, o isolado *P. stutzeri* expressou 52 genes exclusivos, enquanto na maior concentração foram 77 genes exclusivos (Figura 3B). Tais resultados mostraram que houve um aumento na expressão de genes com o aumento da concentração de amônia.

Pela análise *Volcano plot* (Figura 3C) é possível observar os genes que foram diferencialmente expressos com significância estatística entre os dois tratamentos (acima da linha tracejada), aqueles que foram positivamente regulados (*up* regulados) e negativamente regulados (*down* regulados), com valores de *Fold change* (quantidade de vezes que o gene

foi mais ou menos expresso na condição de maior concentração de amônia em relação a de menor) acima de 2. E como podemos observar, um maior número de genes teve sua expressão regulada positivamente.



**Figura 03.** Análise do transcriptoma do isolado *P. stutzeri* 2v em baixa e alta concentração de amônia. **A)** Análise de Componentes Principais das replicatas biológicas nas duas condições estudadas; **B)** Diagrama de *Venn* mostrando o número de genes que foram expressos especificamente em de cada condição e aqueles expressos nas duas; **C)** *Volcano plot* para mostrar os genes diferencialmente expressos regulados negativa e positivamente: *vermelho* – genes de expressão regulada negativa com significância estatística; *verde* – genes de expressão regulada positivamente com significância estatística; *azul* – genes de expressão inalterada.

Como nosso objetivo era investigar quais as enzimas envolvidas no processo de NH/DA, focamos as análises subsequentes nos genes

diferencialmente expressos na condição de maior concentração de amônia e naqueles que foram positivamente regulados (Tabela 1 e 2).

Onze genes foram expressos com significância estatística na condição de maior concentração de amônia (Tabela 1). Dentre esses genes, dois chamaram atenção, o que codifica a Celulase com Domínio glicosil hidrolase e o que codifica o Citocromo c oxidase (destacados na Tabela 1 em amarelo). O domínio glicosil hidrolase também está presente na enzima amônia monooxigenase, que realiza a primeira etapa da nitrificação autotrófica, oxidação de amônia a hidroxilamina. Já o gene que codifica a Citocromo c oxidase está diretamente envolvido em reações de oxirredução, e o processo de nitrificação e desnitrificação acontece através de sucessivas reações de oxirredução. Estes dois genes são fortes candidatos a compor a via da NH/DA do isolado *P. stutzeri* 2v.

**Tabela 1.** Genes que foram expressos exclusivamente na condição de maior concentração de amônia ( $1,32 \text{ gL}^{-1}$ ) pelo isolado *P. stutzeri* 2v.

Código do gene no Proteoma	Anotação Pfam	p-value
WP_003283978.1	Global regulator protein family	0,077901
WP_013982284.1	Cellulase (glycosyl hydrolase family 5)	0,00215
WP_013981187.1	PilZ domínio	0,000207
WP_013982773.1	Phospholipase_D-nuclease N-terminal	3,26E-06
WP_003298841.1	Outer membrane lipoprotein carrier protein	5,47E-07
WP_013982942.1	'Cold-shock' DNA-binding domain	1,35E-05
WP_003293422.1	'Cold-shock' DNA-binding domain	0,00215
WP_013983347.1	Bacterial regulatory proteins, tetR family	0,00215
WP_013983644.1	Iron-sulphur cluster assembly	0,000822
WP_013983984.1	Prokaryotic Cytochrome C oxidase subunit IV	0,033678
WP_003290642.1	30S ribosomal protein S21	0,000617

*Destacados em amarelo: genes relacionados com enzimas envolvidas em processos elucidados de nitrificação e desnitrificação.*

Entre os 29 genes regulados positivamente (Tabela 2), todos os que estão destacados em amarelo participam de reações de oxirredução, com exceção do gene que codifica a proteína CsbD like, que é uma proteína de resposta ao *stress*. Esse último gene foi o segundo mais expresso, como o *Fold Change* igual a 15,64. Este resultado indica que a proteína CsbD like é importante em condição de alta concentração de amônia, e esta é um fator de *stress* para a bactéria.

**Tabela 02.** Genes diferencialmente expressos que foram regulados positivamente com o aumento da concentração de amônia.

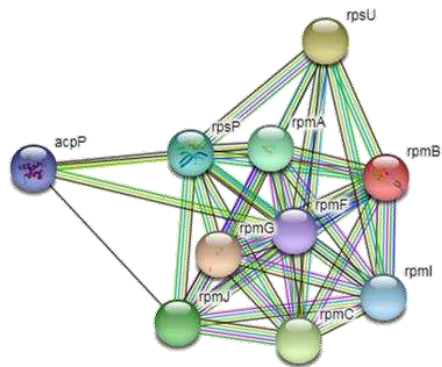
Código do gene no proteoma	Anotação do Pfam	Fold Change	p-value
WP_003294452.1	Alanine-zipper, major outer membrane lipoprotein	16,78	0,003064
WP_013982298.1	CsbD like - protein (ptna de resposta ao stress)	15,64	0,000306
WP_013983005.1	Protein of unknown function	8,30	0,000331
WP_011912999.1	Sulfurtransferase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

*Destacados em amarelo: genes potencialmente envolvidos no processo de NH<sub>4</sub>DA.*

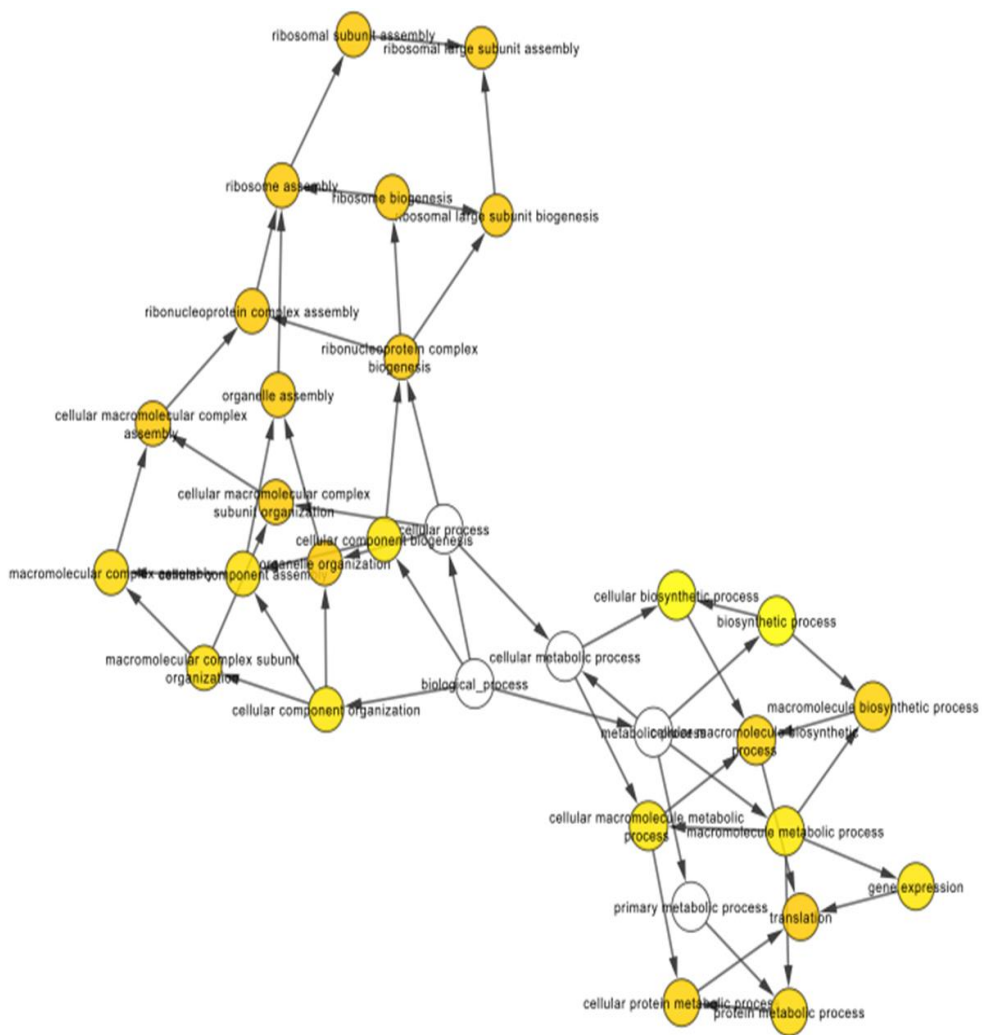
Para avaliar se os genes que foram positivamente regulados tem alguma conexão funcional entre eles, utilizamos o conjunto de sequencias *up* reguladas no *software String* (Figura 4). A rede de interações gerada mostrou que os genes que codificam as proteínas da família Rps e Rpm estão correlacionados. De acordo com o banco de dados de famílias proteicas Pfam (Finn et al., 2016), estas proteínas são ribossomais e estão envolvidas no processo de tradução proteica, indicando que a maior concentração de amônia induziu um aumento na expressão de proteínas da maquinaria de tradução celular. Após verificarmos a correlação entre os genes positivamente regulados, avaliamos quais os processos celulares foram enriquecidos com o aumento da concentração de amônia (Figura 4B). Verificamos que os processos enriquecidos neste transcriptoma estão relacionados com a montagem de organelas celulares, processo de biossíntese, metabolismo de proteínas e tradução proteica.

As análises com os genes positivamente regulados mostraram que houve uma mudança na maquinaria de tradução proteica da célula na condição de alta concentração de amônia, indicando que outros genes são expressos e traduzidos, podendo ser as enzimas envolvidas no processo de NH<sub>4</sub>DA.

**A**



**B**



**Figura 4.** Análises dos genes diferencialmente expressos regulados positivamente. **A)** Rede de interações dos genes baseado em suas funções obtida pelo programa *String*; **B)** Análise de enriquecimento de processos biológicos com o aumento da concentração de amônia pelo software *GOanna*.

#### **4. Conclusão**

A padronização das condições de realização do transcriptoma mostrou que a indução da via NH/DA no isolado *P. stutzeri* 2v aconteceu nas 4 primeiras horas após adição do inóculo em meio HNM. Mostrou também um efeito dose-dependente do consumo de amônia/densidade ótica a medida que a concentração de amônia aumentou. Não foi possível verificar, pela análise do transcriptoma, nenhum gene conhecidamente envolvido nos processos de nitrificação e desnitrificação já descritos, indicando que eles não participam da via NH/DA do isolado *P. stutzeri* 2v. Foi possível notar um aumento significativo da expressão de genes que codificam diferentes proteínas relacionadas com reações de oxirredução, que podem estar envolvidas no processo de NH/DA. Houve também um aumento significativo na expressão de genes que codificam proteínas envolvidas no processo de tradução proteica, evidenciando uma mudança na maquinaria de tradução indicando que, houve o desencadeamento da síntese de outras proteínas frente ao aumento da concentração de amônia. Portanto estudos subsequentes envolvendo mutagênese deverão ser conduzidos para verificar se estes genes que foram diferencialmente expressos e regulados positivamente estarão diretamente envolvidos com o processo de NH/DA.

#### **Agradecimentos**

Os autores são gratos à PETROBRAS pelo apoio financeiro e pela FAPEMIG, CNPq e CAPES pela concessão de bolsas de estudo.

## Financiamento

Esse trabalho foi apoiado pela CAPES, CNPq, FAPEMIG e PETROBRAS (número de concessão 8603-4600391375).

## Referências Bibliográficas

1. Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, btu170, 2014.
2. Boutet, E., Lieberherr, D., Tognolli, M., Schneider, M., Bansal, P., Bridge, A. J., Xenarios, I. UniProtKB/Swiss-Prot, the manually annotated section of the UniProt KnowledgeBase: how to use the entry view. In *Plant Bioinformatics* (pp. 23-54). Humana Press, New York, NY, 2016.
3. Chen, Q. and Ni J. Ammonium removal by *Agrobacterium* sp. LAD9 capable of heterotrophic nitrification - aerobic denitrification. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 113, 619-623, 2012.
4. Chen, M., Wang, W., Feng, Y., Zhu, X., Zhou, H., Tan, Z., Li, X. Impact resistance of different factors on ammonium removal by heterotrophic nitrification - aerobic denitrification bacterium *Aeromonas* sp. HN-02. *Bioresource Technology*. 167, 456–461, 2014.
5. Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., Szczesniak, M.A., Gaffney, D.J., Elo, L.L., Zhang, X., Mortazavi, A. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome biology*, 17, 13, 2016.
6. Finn, R.D., P. Coghill, R.Y. Eberhardt, S.R. Eddy, J. Mistry, A.L. Mitchell, S.C. Potter, M. Punta, M. Qureshi, A. Sangrador-Vegas, G.A. Salazar, J. Tate, A. Bateman. The Pfam protein families database: towards a more

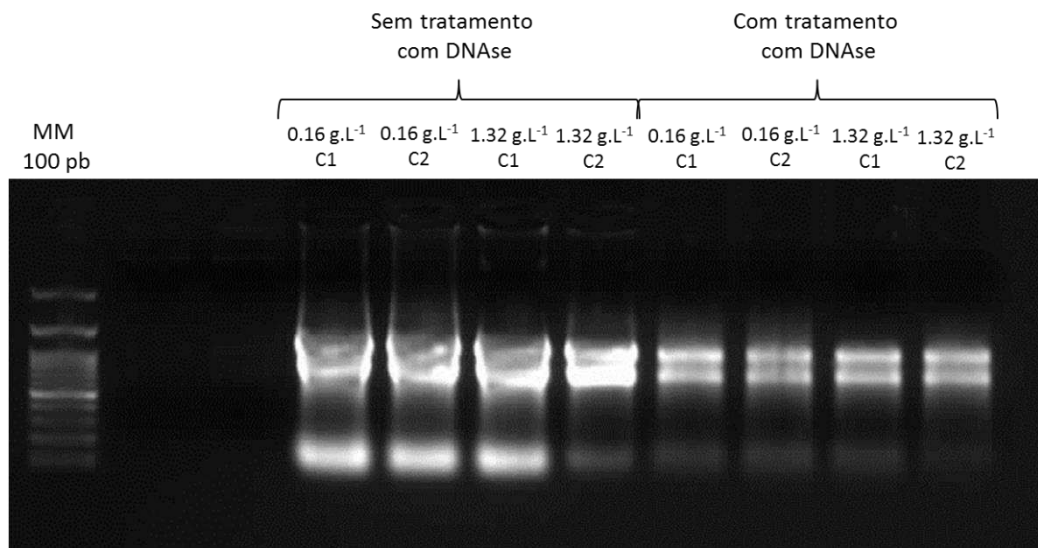
- sustainable future. Nucleic Acids Research Database Issue 44:D279-D285., 2016.
7. Guo, Y., Zhou, X., Li, Y., Li, K., Wang, C., Liu, J., Yan, D., Liu, Y., Yang, D., Xing, J. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Halomonas campisalis*. Biotechnology Letters. 35, 2045-2049, 2013.
  8. Huang, X., Li, W., Zhang, D., & Qin, W. Ammonium removal by a novel oligotrophic *Acinetobacter* sp. Y16 capable of heterotrophic nitrification–aerobic denitrification at low temperature. Bioresource technology. 146, 44-50, 2013.
  9. Jin, R., Liu, T., Liu, G., Zhou, J., Huang, J., & Wang, A., 2015. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the marine origin bacterium *Pseudomonas* sp. ADN-42. Appl. Biochem. Biotechnol. 175(4), 2000-2011.
  10. Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., & Salzberg, S. L. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. Genome biology, 14(4), R36, 2013.
  11. Langmead B, Salzberg S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nature Methods. 9:357-359, 2012.
  12. Lei, Y., Wang, Y., Liu, H., Xi, C., Song, L., 2016. A novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium, *Zobellella taiwanensis* DN-7, can remove high-strength ammonium. Appl. Microbiol. Biotechnol. 100, 4219-4229.

13. Li, C., Yang, J., Wang, X., Wang, E., Li, B., He, R., Yuan, H., 2015. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification–aerobic denitrification of a phosphate accumulating bacterium *Pseudomonas stutzeri* YG-24. *Bioresource technology*, 182, 18-25.
14. Limpiyakorn, T., Fürhacker, 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.
15. Madigan, T.M., Martinko, J.M., Parker, J., 2016. Brock Biology of Microorganisms, Prentice Hall, 14<sup>a</sup> edição, New York.
16. McCarthy, F. M., Wang, N., Magee, G. B., Nanduri, B., Lawrence, M. L., Camon, E. B., ... & Luthe, D. S. (2006). AgBase: a functional genomics resource for agriculture. *BMC genomics*, 7(1), 229.
17. 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.
18. Robertson, L.A., Cornelisse, P. De Vos, R. Hadjoetomo, and J.G. Kuenen., 1989. Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 56, 289-299.
19. Roberts, A., Pimentel, H., Trapnell, C., & Pachter, L. Identification of novel transcripts in annotated genomes using RNA-Seq. *Bioinformatics*, 27(17), 2325-2329, 2011.
20. Robertson, L.A., Kuenen, J.G. *Thiosphaera pantotropha* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulfur bacterium.

Journal of General Microbiology. 129, 2847–2855, 1983.

21. Silva, L. C. F., Lima, H. S., Sartoratto, A., de Sousa, M. P., Torres, A. P. R., de Souza, R. S., da Silva, C. C. Effect of salinity in heterotrophic nitrification/aerobic denitrification performed by acclimated microbiota from oil-produced water biological treatment system. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 130, 1-7, 2018.
22. Uemoto, H., Saiki, H. Nitrogen removal by tubular gel containing *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans*, *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 4224-4228, 2000.
23. Vazoller, R.F.; Gomes, L.P.; Villas-Boas, D.M.; Baldochi, V.M.Z.; Badra, R.J.; Povinelli, J. Biodegradability potential of two experimental landfills in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32, 87-92, 2001.
24. Xu, Y., He, T., Li, Z., Ye, Q., Chen, Y., Xie, E., Zhang, X. Nitrogen removal characteristics of *Pseudomonas putida* Y-9 capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature. *BioMed Research International*, 2017.
25. 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.

## Material Suplementar



**Figura S1.** RNA extraído para estudo do transcriptoma do isolado *P. stutzeri* 2v em diferentes concentrações de amônia, antes e após o tratamento com DNase.

**Tabela S1.** Quantificação de células viáveis nas replicatas do isolado *P. stutzeri* 2v nas diferentes concentrações de amônia para indução da via de NH/DA.

<b>Amostra</b>	<b>Número de eventos</b>	<b>% células vivas</b>	<b>% células mortas</b>
0,16 g.L <sup>-1</sup> C1 R1	1000000	99,80	0,20
0,16 g.L <sup>-1</sup> C1 R2	1000000	99,96	0,04
0,16 g.L <sup>-1</sup> C1 R3	1000000	99,94	0,06
0,16 g.L <sup>-1</sup> C2 R1	1000000	99,90	0,10
0,16 g.L <sup>-1</sup> C2 R2	1000000	99,95	0,05
0,16 g.L <sup>-1</sup> C2 R3	1000000	99,95	0,05
1,32 g.L <sup>-1</sup> C1 R1	1000000	99,84	0,16
1,32 g.L <sup>-1</sup> C1 R2	1000000	99,88	0,12
1,32 g.L <sup>-1</sup> C1 R3	1000000	99,89	0,11
1,32 g.L <sup>-1</sup> C2 R2	1000000	99,84	0,16
1,32 g.L <sup>-1</sup> C2 R2	1000000	99,92	0,08
1,32 g.L <sup>-1</sup> C2 R3	1000000	99,91	0,09

## CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho identificamos seis isolados bacterianos capazes de nitrificar heterotroficamente e desnitrificar aerobicamente. Vimos que eles removem 100 % de amônia em diferentes fontes de carbono, relação C/N, salinidade, pH e temperatura, e que cada isolado responde de uma maneira e com níveis variados de resiliência, o que é desejável para aplicação em sistemas de tratamento biológico de estações de tratamento. Além disso, observamos que 45 % de todo o nitrogênio removido é transformado em biomassa microbiana, e o restante em  $N_{2(g)}$ , sem acúmulo de intermediários gasosos óxido nítrico e nitroso no sistema.

A ausência dos genes que participam do processo de nitrificação autotrófica no genoma dos isolados indicou que outras enzimas podem estar envolvidas na NH/DA. E na tentativa de responder esta questão, um estudo do transcriptoma do isolado *P. stutzeri* 2v foi proposto. Assim foram estudadas duas concentrações de amônia, que constatamos serem as condições ideais para ativação da via de interesse. A análise do transcriptoma mostrou que as enzimas envolvidas na NH/DA não são as mesmas que realizam os processos de nitrificação autotrófica e desnitrificação anaeróbica. Observamos entre os genes diferentemente expressos na condição de maior concentração de amônia, diversos genes com expressão muito aumentada, entre eles genes envolvidos em processos de oxirredução e relacionados com a mudança da maquinaria proteica celular, indicando que novas proteínas poderão ser expressas em resposta ao aumento de amônia no meio, incluindo aquelas relacionadas com os processos de Nitrificação heterotrófica e desnitrificação aeróbia. A perspectiva do nosso trabalho será validar o envolvimento desses genes diferencialmente expressos e regulados positivamente no processo de NH/DA e assim, estabelecermos um marcador molecular para o monitoramento de populações de NH/DA em comunidades microbianas e até mesmo, elucidar a via metabólica completa responsável por este processo.