



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL**

**JOSÉ ROBERTO SANTO DE CARVALHO**

**DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE ANILINA UTILIZANDO DIFERENTES CULTURAS  
MICROBIANAS**

Recife

2020

**JOSÉ ROBERTO SANTO DE CARVALHO**

**DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE ANILINA UTILIZANDO DIFERENTES CULTURAS  
MICROBIANAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Civil.

Área de concentração: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

Orientadora: Profa. Dra. Sávvia Gavazza dos Santos Pessôa.

Recife

2020

---

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Margareth Malta, CRB-4 / 1198

C331d Carvalho, José Roberto Santo de.  
degradação anaeróbia de anilina utilizando diferentes culturas  
microbianas / José Roberto Santo de Carvalho. - 2020.  
86 folhas, il., gráfs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Sávia Gavazza dos Santos Pessôa.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2020.  
Inclui Referências.

1. Engenharia Civil. 2. Anilina. 3. Degradação anaeróbia. 4.  
Culturas microbianas nativas. 5. Efluente têxtil. I. Pessôa, Sávia Gavazza  
dos Santos (Orientadora). II. Título

UFPE

624 CDD (22. ed.)

BCTG/2020-273

**JOSÉ ROBERTO SANTO DE CARVALHO**

**DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE ANILINA UTILIZANDO DIFERENTES CULTURAS  
MICROBIANAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Civil

Aprovada em: 10/11/2020.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Sávia Gavazza dos Santos Pessôa (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. José Luis Sanz Martin (Examinador Externo)  
Universidad Autónoma de Madrid

---

Prof. Dr. Hugo Moreira Soares (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Profa. Dra. Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic (Examinadora Externa)  
Universidade de São Paulo

---

Prof. Dr. André Bezerra dos Santos (Examinador Externo)  
Universidade Federal do Ceará

Dedico este trabalho aos meus pais  
que sempre me incentivaram a  
estudar e a ser uma pessoa melhor.

## AGRADECIMENTOS

Sou grato ao Senhor Deus, que me permite como cientista, descobrir e aprender coisas maravilhosas sobre a natureza e o universo incrível criado por suas mãos. Toda honra e glória sejam dados a Ele. Agradeço aos meus pais José Roberto e Luciene Carvalho que sempre me direcionaram aos estudos, e me ensinaram princípios morais que nem sempre a academia consegue ensinar, amo vocês. Sou grato por todo carinho recebido de minha esposa querida Sandrelle, que há treze anos tem sido minha companheira em todos os momentos, obrigado por toda paciência e amor, te amo. Deixo aqui também meu enorme agradecimento à professora Sávia Gavazza, que é minha tutora na ciência há quase uma década, e me mostrou com seu exemplo de vida como é ser um cientista gigante e ao mesmo tempo humilde, extremamente comprometido com o trabalho e ao mesmo tempo compassivo com a personalidade de seus alunos, mais uma vez muito obrigado por todas as oportunidades. Gostaria de agradecer aos pesquisadores que botaram a mão na massa junto comigo nesta pesquisa, citando primeiramente minha querida colega Rhayssa Brito que iniciou a pesquisa junto comigo, dona de uma inteligência e força admirável, muito obrigado Rhay!. Agradeço imensamente a técnica de laboratório Danúbia Freitas, que é uma das pessoas mais paciente, prestativa e educada que já conheci, sem ela o HPLC ia me matar do coração...muito obrigado Dan! Agradeço também ao aluno de iniciação científica Gabriel Victor por toda ajuda no laboratório, e também por todos os questionamentos, que me fizeram pensar e aprender mais para respondê-los. Também agradeço por toda infraestrutura fornecida nos laboratórios LSA e LABIOTA, que são personificados nas pessoas de prof. Mário Kato e prof<sup>a</sup>. Lourdinha Florêncio que dedicaram suas vidas para construir este legado. Finalizo registrando meu agradecimento por todo suporte no fomento dessa pesquisa através da concessão da bolsa nº 142122/2016-5 pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## RESUMO

A contenção e o tratamento da poluição causada pela introdução de compostos aromáticos na natureza, provenientes de fármacos, pesticidas, insumos para fabricação de borrachas e corantes, tem sido um dos grandes desafios do saneamento ambiental neste século. A maioria dos produtos citados apresentam anilina em sua composição, e que se apresenta como subproduto no processo de degradação desses produtos, acarretando danos quando atinge ambientes anaeróbios. Para contribuir com o esclarecimento desse tema, foi avaliado nesta tese o desempenho de três culturas microbianas com diferentes origens (CET – reator com efluente têxtil sintético; CSR – sedimentos de rio contaminado por efluente têxtil; CEP reator com efluente petroquímico real) na degradação anaeróbia de anilina. Os testes de biodegradação foram montados em uma câmara anaeróbia, onde microcosmos continham anilina como única fonte de carbono. Quatro testes de biodegradação de anilina foram realizados, onde foi possível verificar a influência dos íons nitrato e sulfato atuando como acceptor de elétrons (Experimento 1), a influência da glicose como co-substrato (Experimento 2), o papel da metanogênese na rota de degradação (Experimento 3) e, por fim, um teste de biodegradação comparando as diferenças taxonômicas apresentadas pelas três culturas (Experimento 4). Os resultados indicaram que os compostos de enxofre, como o sulfato e sulfeto, foram de fundamental importância no processo de degradação da anilina pelas culturas CET e CSR que conseguiram degradar sucessivas alimentações de 3 mg/L de anilina em condição anaeróbia. A aplicação da técnica de diluição a extinção nos microcosmos contendo a CET fez com que após a segunda transferência o intervalo de tempo necessário para degradar uma injeção de anilina fosse reduzido de  $88 \pm 11$  dias, para  $37 \pm 4$  dias, destacando os gêneros *Sulfuricurvum*, *Mesotoga*, *Desulfococcus* e *Thauera* como núcleo microbiano que prevaleceu após as diluições. A cultura CEP apresentou composição taxonômica com características sintróficas associadas a gêneros fermentativos e metanogênicos, que também apresentaram habilidade em degradar anilina, entretanto, utilizando metabolismo não relacionado ao sulfato, diferentemente de CET e CSR.

Palavras-chave: Anilina. Degradação anaeróbia. Culturas microbianas nativas. Efluente têxtil.

## ABSTRACT

The containment and treatment of pollution caused by the introduction of compounds such as pharmaceuticals, pesticides, inputs for the manufacture of rubbers, and dyes, has been one of the great challenges of environmental sanitation in this century. Aniline is a component of all of the mentioned products, which is a toxic compound. As a basic material in the production chain aniline is a degradation by-product of many contaminants. The accidental release of compounds such as aniline in nature, is aggravated when the contamination plumes reach natural environments with low levels of O<sub>2</sub>, or in the absence of oxygen (anaerobiosis). In such condition few information is available, mainly in when aniline is the target compound. In order to contribute to clarifying this theme, we evaluated the performance of three microbial cultures, collected from different sources (TEC - reactor treating textile wastewater; RSC – sediment from a river contaminated by textile wastewater; PEC - reactor treating petrochemical wastewater), in degrading aniline anaerobically. The biodegradation tests were set up in microcosms, kept in an anaerobic chamber, containing aniline as the sole carbon source. Four aniline biodegradation tests were carried out, allowing to verify the influence of nitrate and sulfate ions acting as electron acceptors (Experiment 1); the influence of glucose as a co-substrate (Experiment 2), the role of methanogenesis in the degradation pathway of aniline (Experiment 3); and finally, a biodegradation test comparing the the taxonomic differences among the three microbial cultures (Experiment 4). The results showed that sulfur compounds, such as sulfate and sulfide, were of fundamental importance in the process of degradation of aniline by TEC and RSC cultures that managed to degrade 3 mg/L of aniline in successive spikes. The application of the dilution to extinction technique in the microcosms containing the TEC diminished from 88 ± 11 days to 37 ± 4 days the time interval required to degrade an aniline injection, after the second transfer of 50% (v:v). The genera *Sulfuricurvum*, *Mesotoga*, *Desulfococcus*, and *Thauera* were identified as the core microbiome in TEC. On the other hand, PEC culture presented a taxonomic composition with syntrophic characteristics associating fermentative and methanogenic genera, which also showed ability to degrade aniline, however, using a metabolism not related to sulfate, differently from TEC and RSC.

Keywords: Aniline. Anaerobic degradation. Indigenous microbial cultures. Textile wastewater.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração do processo de hidrogenação do nitrobenzeno e formação da anilina..	17
Figura 2 - Estrutura molecular de corantes azo utilizados na indústria têxtil. (A) Acid Red 1- CAS 3734-67-6. (B) Reactive Red 2 – CAS 12226-03-8.....	19
Figura 3 - Rota metabólica de formação e degradação do tioéster benzoil-CoA.....	23
Figura 4 - Rota metabólica de degradação anaeróbia da anilina, proposta para a espécie <i>Desulfobacterium anilini</i> . ....	26
Figura 5 - Fluxograma das atividades realizadas neste trabalho em formato de linha do tempo ordenado sequencialmente da esquerda para a direita. ....	29
Figura 6 - Fotos do local de coleta da cultura CSR. (A) coloração azulada nas pedras ribeirinhas, causada pela presença de corantes na água do rio. (B) local de coleta dos sedimentos.....	30
Figura 7 - Localização do ponto de coleta da CSR. ....	31
Figura 8 - Ilustração da composição dos microcosmos.....	32
Figura 9 - Esquema ilustrativo dos subprodutos formados com a quebra das ligações azo presentes na molécula do corante DB22.....	36
Figura 10 - Foto do aparato experimental utilizado no experimento 1. ....	37
Figura 11 - Foto do novo aparato utilizado no Experimento 2.....	38
Figura 12 - Purga com gás nitrogênio/CO <sub>2</sub> das duplicatas contendo diferentes concentrações de 2-BESA.....	40
Figura 13 - Estrutura molecular do ácido 2-bromoetanosulfônico.....	40
Figura 14 - Ilustração da série de diluições à extinção realizadas com transferências de 50%.....	41
Figura 15 - Valor médio da concentração de anilina medida nas triplicatas An-CET, S-CET e N-CET ao longo do tempo operacional. ....	45
Figura 16 - Comparação do perfil da concentração de anilina e do consumo de nitrato durante o tempo operacional.....	46
Figura 17 - Comparação do perfil da concentração de anilina e do consumo de sulfato durante o tempo operacional. ....	47
Figura 18 - Comportamento cinético dos microcosmos An-CET (A), S-CET (B) e N-CET (C), ajustados para cinética de primeira ordem. ....	49

Figura 19. Composição taxonômica a nível de filo nas amostras CET, An-CET, S-CET e N-CET: (A) Heatmap mostrando a abundância relativa e distância filogenética (UPGMA) entre as amostras e (B) Abundância relativa mostrada em gráfico de barras.....	51
Figura 20. Variação da AR dos gêneros com abundância AR > 1%, encontrados nos microcosmos: (A) Comparação entre as amostras An-CET e CET; (B) entre as amostras N-CET e CET; (C) entre S-CET e CET. Fonte: O Autor (2020). .....	53
Figura 21. Concentração de anilina monitorada nos microcosmos com indicação do ponto de injeção da glicose.....	57
Figura 22. Valor médio da concentração de anilina e glicose medida como carboidratos totais, nos microcosmos G-CET. ....	58
Figura 23. Cromatogramas contendo a proporção de N <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> e CH <sub>4</sub> no headspace dos microcosmos contendo (A) 0 mM de BESA e (B) 5 mM de BESA. Fonte: O Autor (2020)..	60
Figura 24. Perfil da concentração de anilina e formação de ácido benzóico (▲;▲) detectados nos microcosmos An-CET e BESA-CET.....	61
Figura 25. Ilustração da sequência de transferências e seus respectivos perfis de remoção de anilina. O perfil foi construído com a média das duplicatas (A) T1-CET, (B) T2-CET e (C) T3-CET.....	64
Figura 26. Clivagem do anel aromático do benzoil-CoA por via de beta oxidação. Em vermelho estão destacados os genes presentes no genoma da espécie <i>D. multivorans</i> .....	65
Figura 27. Inferência dos possíveis metabolismos estabelecidos em T2-CET com base no potencial genético dos gêneros microbianos identificados.....	67
Figura 28. Concentração de anilina durante o monitoramento dos microcosmos: (A) triplicata com acultura CSR nas condições anaeróbia (An-CSR) e estéril (E-CSR) e (B) triplicata com cultura CEP nas condições anaeróbia (An-CEP) e estéril (E-CEP). As setas azuis indicam os pontos de realimentação. ....	68
Figura 29. Abundância relativa dos gêneros identificados com AR > 1% nas amostras CSR e An-CSR. O agrupamento outros corresponde aos gêneros com AR inferior a 1% em ambas as amostras.....	72
Figura 30. Abundância relativa dos gêneros identificados com AR > 1% nas amostras CEP e An-CEP. O agrupamento outros corresponde aos gêneros com AR inferior a 1% em ambas as amostras. ....	73
Figura 31 - Dendrograma elaborado através do índice de Jaccard, mostrando a similaridade entre as amostras sequenciadas das culturas CET, CSR e CEP. ....	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da caracterização da água do rio no ponto de coleta da CSR. ....	31
Tabela 2 - Concentração dos nutrientes utilizados para compor o meio basal.....	32
Tabela 3 - Concentrações utilizadas no experimento 1. ....	35
Tabela 4 - Condições monitoradas no Experimento 2.....	39
Tabela 5 - Concentrações utilizadas para montar a triplicata com inibidor. ....	40
Tabela 6 - Condições iniciais dos microcosmos no experimento 4.....	43
Tabela 7 - Constantes de velocidade e $R^2$ obtidos nos ajustes cinéticos de primeira ordem. .	49
Tabela 8 - Índices de diversidade, dominância e riqueza calculados para as amostras sequenciadas. ....	51
Tabela 9 - Gêneros microbianos que apresentaram AR maior que 1%, em pelo menos uma das amostras.....	54
Tabela 10 - Composição do biogás no headspace em termos de metano, nitrogênio e gás carbônico, coletado após o consumo da terceira alimentação de anilina nos microcosmos.....	55
Tabela 11 - Concentração dos AGV medidos nas condições BESA-CET e An-CET .....	61
Tabela 12 - Taxonomia das OTUs que apresentaram AR > 1% presentes na microbiota de T2-CET.....	63
Tabela 13 - Índices de diversidade calculados para as culturas CSR e CEP nas condições originais e após o teste de biodegradação de anilina representadas por An-CSR e An-CEP.....	70
Tabela 14 - Reações envolvidas nos metabolismos sintróficos do gênero Syntrophus.....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-BESA	ácido 2-bromoetanosulfônico
AGV	ácidos graxos voláteis.
AR	abundância relativa.
An-CET	Anaeróbio padrão com cultura microbiana adaptada a efluente têxtil.
An-CEP	Anaeróbio padrão com cultura microbiana adaptada a efluente petroquímico.
An-CSR	Anaeróbio padrão com cultura microbiana de sedimento de rio.
BTEX	benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno.
CEP	cultura adaptada a efluente petroquímico.
CET	cultura adaptada a efluente têxtil.
COI	composto orgânico de interesse.
CSR	cultura coletada em sedimentos de rio.
DB22	corante direct black 22.
DBO	demanda química de oxigênio.
DNA	ácido desoxirribonucleico.
DQO	demanda bioquímica de oxigênio.
HPLC	cromatógrafo líquido de alta pressão.
MDI	metileno difenil isocianato.
NGS	sequenciadores de nova geração (do inglês: <i>new generation sequencing</i> ).
OD	oxigênio dissolvido.
OTU	unidade taxonômica operacional (do inglês: <i>operationa taxonomic units</i> ).
pH	potencial hidrogeniônico.
rRNA	ácido ribonucleico ribossômico.
SSV	sólidos suspensos voláteis.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>16</b>
1.1.1	<i>Objetivo geral.....</i>	<i>16</i>
1.1.2	<i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>16</i>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Importância da anilina no cenário global e local.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Mecanismos de biodegradação anaeróbia de compostos aromáticos monocíclicos.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3</b>	<b>Degradação anaeróbia da anilina.....</b>	<b>25</b>
<b>2.4</b>	<b>Utilização de culturas nativas desenvolvidas em locais contaminados.....</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Culturas microbianas utilizadas como inóculo .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>Montagem dos microcosmos.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3</b>	<b>Procedimentos analíticos: monitoramento do COI e quantificação de biogás, AGVs, íons e carboidratos totais .....</b>	<b>33</b>
3.3.1	<i>Anilina.....</i>	<i>33</i>
3.3.2	<i>Catecol e ácido benzóico.....</i>	<i>33</i>
3.3.3	<i>Composição do biogás produzido e quantificação dos AGV.....</i>	<i>33</i>
3.3.4	<i>Quantificação de íons.....</i>	<i>34</i>
3.3.5	<i>Carboidratos totais.....</i>	<i>34</i>
<b>3.4</b>	<b>Experimentos com a cultura de efluente têxtil (CET).....</b>	<b>34</b>
3.4.1	<i>Experimento 1: Influência dos íons nitrato e sulfato no processo de biodegradação da anilina.....</i>	<i>34</i>
3.4.2	<i>Experimento 2: Avaliação da glicose como co-substrato e adição de um controle com inóculo autoclavado.....</i>	<i>37</i>
3.4.3	<i>Experimento 3: Ensaio de inibição da metanogênese e detecção de AGVs.....</i>	<i>39</i>
3.4.4	<i>Seleção de microrganismos através de diluição a extinção.....</i>	<i>41</i>
<b>3.5</b>	<b>Experimento com as CSR e CEP.....</b>	<b>42</b>
3.5.1	<i>Experimento 4: Ensaio de biodegradação anaeróbia de anilina, utilizando culturas microbianas de diferentes origens.....</i>	<i>42</i>

<b>3.6</b>	<b>Extração e sequenciamento do DNA</b> .....	<b>43</b>
<b>3.7</b>	<b>Análises estatísticas e de bioinformática</b> .....	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
<b>4.1</b>	<b>Experimento 1: Comportamento cinético e influência dos íons NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b> ....	<b>45</b>
4.1.1	<i>Influência dos íons nitrato e sulfato na remoção da anilina</i> .....	45
4.1.2	<i>Aspectos cinéticos da degradação da anilina</i> .....	48
4.1.3	<i>Análise da comunidade microbiana dos microcosmos An-CET, S-CET e N-CET</i> .....	50
<b>4.2</b>	<b>Experimento 2: Influência da glicose como co-substrato e verificação do efeito de adsorção na biomassa</b> .....	<b>56</b>
<b>4.3</b>	<b>Experimento 3: Ensaio de inibição da metanogênese e detecção de AGVs</b> .....	<b>59</b>
<b>4.4</b>	<b>Seleção de microrganismos utilizando diluição a extinção</b> .....	<b>62</b>
<b>4.5</b>	<b>Teste de biodegradação utilizando as culturas CSR e CEP</b> .....	<b>67</b>
4.5.1	<i>Análise taxonômica das culturas CSR e CEP</i> .....	70
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>77</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Historicamente os desafios do saneamento ambiental estavam na maior parte do tempo focados no desenvolvimento de tecnologias para tratar as águas residuárias domésticas e industriais, como também em gerenciar os resíduos sólidos produzidos. A medida que o avanço tecnológico permitiu o desenvolvimento de novos produtos e processos, o setor industrial ganhou peso nos problemas ambientais, trazendo desafios cada vez mais difíceis de serem resolvidos.

No mundo inteiro, boa parte das águas subterrâneas estão contaminadas por compostos aromáticos, na maioria hidrocarbonetos, oriundos de atividades industriais, relacionadas ou não a cadeia produtiva do petróleo. O estudo de Baldasano (2020) relatou que, após monitorar a concentração de 25 diferentes compostos aromáticos em 355 amostras de águas subterrâneas coletadas em todo território da China, os BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) foram encontrados na maioria das amostras, entretanto em concentrações baixas (0,25 – 3,17 µg/L). Já o segundo grupo de poluentes mais relevantes foram os compostos halogenados como o clorobenzeno, que foram detectados com concentrações mais altas (0,1 – 64,3 µg/L). O grupo de poluentes halogenados são em sua maioria provenientes de contaminações pelo uso de agrotóxicos nas atividades agrícolas e durante a linha de produção nas indústrias de pesticidas e agrotóxicos, que utilizam compostos aromáticos monocíclicos como insumos da cadeia produtiva.

Os compostos 4-cloroanilina, 2-cloroanilina, 3,4-dicloroanilina, 4-bromoanilina e 4-metoxianilina são compostos primários gerados na degradação de alguns grupos de herbicidas (carbanilatos, fenil-ureas e acil-anilidas) que acumulam em solos e se espalham nos solos e águas subterrâneas após derramamentos acidentais durante seu estoque e transporte (HADANH; NGUYEN THI, 2019; SCHUKAT et al., 1983; VANGNAI; PETCHKROH, 2007). O mesmo problema acontece com os compostos nitroaromáticos como os nitrobenzenos, largamente utilizados nas indústrias de munição e explosivos (SPAIN, 1995). A indústria têxtil também é conhecida por seus danos ambientais, sendo os corantes azo, os compostos aromáticos que representam esse ramo industrial. Todos esses compostos que foram citados possuem uma característica em comum; todos podem ser convertidos a anilina em alguma etapa do processo de biodegradação no meio ambiente.

Muitos experimentos e estudos epidemiológicos concluíram que a anilina causa danos ao sistema endócrino e reprodutor humanos. Os seus efeitos tóxicos foram testados em mamíferos (HOLM et al., 2015) crustáceos (TRUBETSKOVA; LAMPERT, 2002) e peixes

(BOSCOLO PEREIRA et al., 2016), e todos confirmam o risco ambiental que a anilina pode causar quando acumulada na natureza.

Apesar de suas características tóxicas, alguns microrganismos conseguem sobreviver em ambientes contaminados com anilina, inclusive alguns deles conseguem utilizá-la como fonte de carbono e energia. Infelizmente o número de microrganismos, descobertos e relatados na literatura, aptos a realizar essa tarefa ainda é muito restrito, principalmente quando o ambiente estudado é anaeróbico ou com baixa disponibilidade de oxigênio, que são características comuns nas contaminações de camadas profundas de subsolo e nas águas subterrâneas.

São três os artigos publicados que reportam a degradação anaeróbia da anilina (SCHNELL; SCHINK, 1991; SUN et al., 2015; KAHNG; KUKOR; OH, 2000), entretanto, apenas um elucidou a rota metabólica de degradação completa. Desta forma, a identificação de microrganismos com tal habilidade e a investigação dos seus mecanismos de degradação tem sido um desafio atual, que pode auxiliar na descontaminação de áreas degradadas por compostos aromáticos derivados da anilina. Esta tarefa tem encontrado suporte nos avanços das técnicas moleculares, como por exemplo o sequenciamento da região 16S do rDNA, difundido nas últimas duas décadas, que permite a identificação taxonômica de culturas microbianas de forma rápida e com baixo custo. As novas técnicas moleculares permitem que os pesquisadores explorem culturas microbianas de diferentes locais, caracterizando sua composição e consequentemente, esclarecendo como os processos bioquímicos acontecem nos ambientes naturais, em reatores biológicos ou em ensaios de laboratório.

É neste contexto que esta tese foi proposta, tendo como principal objetivo, testar a hipótese exploratória de que, culturas microbianas provenientes de locais com diferentes tipos de contaminantes aromáticos e diferentes condições nutricionais apresentam metabolismos que podem ser aplicados na degradação anaeróbia da anilina, podendo ser utilizadas como inóculo de reatores ou em processos de bioaugmentação. Para isso, o uso de três diferentes culturas microbianas foi avaliado em testes de biodegradação anaeróbia utilizando anilina como única fonte de carbono e energia disponível. Através do monitoramento dos testes de biodegradação foram obtidas respostas sobre o desempenho que cada cultura apresentou na biodegradação da anilina, como também os possíveis mecanismos e os principais gêneros microbianos que se desenvolveram em cada cultura testada.

## 1.1 Objetivos

Para responder a hipótese explanada previamente na introdução, foram estabelecidos os seguintes objetivos.

### 1.1.1 *Objetivo geral*

Ampliar o conhecimento sobre a degradação anaeróbia metabólica/co-metabólica da anilina em condições metanogênica, sulfetogênica e de redução de nitrato.

### 1.1.2 *Objetivos Específicos*

- a) Investigar a influência dos íons nitrato e sulfato como aceptores de elétrons na degradação de anilina;
- b) Avaliar os efeitos do uso da glicose como co-substrato no processo de biodegradação anaeróbia de anilina;
- c) Investigar o acúmulo de ácidos graxos voláteis após inibição da metanogênese durante a degradação da anilina;
- d) Aplicar a técnica de diluição à extinção em microcosmos, como ferramenta para identificar os microrganismos chaves no processo;
- e) Identificar a composição taxonômica das três culturas utilizadas, através do sequenciamento da região do 16S do DNA ribossomal (16S rDNA);
- f) Comparar o desempenho apresentado pelas três culturas microbianas na biodegradação/biotransformação da anilina.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

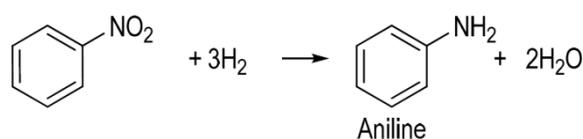
Este capítulo aborda o embasamento teórico e científico dos temas que permeiam o entendimento da degradação biológica da anilina por microrganismos, especificamente, culturas microbianas que se desenvolvem em ambientes anaeróbios. Além disso as rotas metabólicas e o conhecimento sobre alguns mecanismos enzimáticos e químicos que transformam a anilina em outros subprodutos estão relatadas neste referencial teórico.

### 2.1 Importância da anilina no cenário global e local

A produção comercial da anilina é realizada através da hidrogenação catalítica do nitrobenzeno (Figura 1). Anteriormente existia outra rota de produção comercial, através do mecanismo de aminação do fenol. Entretanto, esse método entrou em desuso, em função de dificuldades em controlar o processo (TOMKINS et al., 2019; ZENG et al., 2017).

A reação de hidrogenação é extremamente exotérmica, liberando aproximadamente 544 kJ por mol produzido (QU et al., 2017). O hidrogênio é utilizado em excesso tanto na fase líquida quanto na fase de vapor, e quanto mais puro for o hidrogênio mais eficiente é o processo.

Figura 1 - Ilustração do processo de hidrogenação do nitrobenzeno e formação da anilina



Fonte: Autor (2020).

Após produzida, a anilina torna-se composto base para produção de diversos outros compostos em diferentes segmentos produtivos. A partir da anilina são gerados alguns derivados como 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA), 4,4'-metilenodianilina (4-4'MDA), e o 1-naftilamina (1-NPA). A anilina e os citados derivados são insumos principais ou intermediários para a produção de pesticidas, produtos farmacêuticos, borrachas, corantes, solventes e cosméticos, dentre outros segmentos. Todos esses compostos podem ser considerados como poluentes emergentes, e estão presentes nos efluentes industriais, nas contaminações ambientais e, indiretamente podem chegar às águas de abastecimento.

Como exemplo de contaminação, o 1-NPA, componente de tinturas para cabelo, tinturas para tatuagens de henna, e alguns cosméticos (AKYÜZ; ATA, 2008), pode atingir águas superficiais e subterrâneas. Já o 4-4'MDA pode ser liberado a partir do isocianato residual presente em adesivos de poliuretano (PEZO et al., 2012). Quanto à anilina em sua forma natural, esta pode ser utilizada na fabricação de medicamentos como anti-piréticos, analgésicos, vitamínicos e anti-alérgicos, com potencial para ser lançado no esgoto doméstico após uso. Já o 3,4-DCA pode ser liberado como subproduto de alguns herbicidas como o Diuron, Linuron e o Propanil (MARLATT; MARTYNIUK, 2017).

O uso da anilina como material de insumo para indústrias dos mais diversos setores é relevante na economia global. A anilina, como citado, é utilizada em larga escala para produção de pesticidas, cosméticos, borrachas, corantes e outros produtos. Entretanto, cerca de 80% de seu uso está na produção de metileno difenil diisocianato (MDI) (VAN DEN BERG et al., 2012). O MDI, por sua vez, após reagir com poliálcool, forma o poliuretano, polímero que é utilizado no mundo todo desde a construção civil até a fabricação de móveis e utensílios domésticos. Todos esses processos industriais geram resíduos e subprodutos contendo tanto a anilina em sua forma natural como na forma de seus derivados.

Na maioria das vezes a anilina e seus derivados não são completamente degradados nas estações de tratamento de esgotos convencionais, devido a sua complexa estrutura molecular. O problema é agravado pelo potencial tóxico, carcinogênico e mutagênico que a anilina possui (HUDA BHUIYAN et al., 2019; MOHAMMED et al., 2020; YAN et al., 2019), que em contato com o solo e os mananciais superficiais e subterrâneos, através de derramamentos, pode gerar sérios problemas ambientais e de saúde pública.

Para exemplificar o tamanho do problema, um grande derramamento acidental ocorreu em dezembro de 2012 na China. A indústria *Tianji Coal Chemical Industry* introduziu mais de 39 toneladas de anilina no rio *Zhuo Zhang*, causando uma crise hídrica para milhares de pessoas (SILI et al., 2019). No ano seguinte a indústria *Hebei Jianxin Chemicals*, foi responsável por um vazamento de anilina, que atingiu as águas de abastecimento da província de Hebei também na China (CHINADAILY, 2013). Esse vazamento foi a causa da morte de centenas de animais.

Em uma abordagem local, a anilina está totalmente ligada ao segmento têxtil, onde pode ser encontrada na cadeia produtiva como material de insumo para fabricação de corantes, ou pode ser encontrada como subproduto da degradação de corantes. No cenário brasileiro, esse segmento industrial merece atenção devido a sua grande importância econômica e social. O Brasil está inserido no grupo dos dez maiores produtores do segmento têxtil no mundo

(WANG et al., 2016). No estado de Pernambuco existe um arranjo produtivo local composto pelas cidades de Caruaru, Toritama e Santa Cruz do Capibaribe, que juntas possuem 14.517 unidades produtivas, desde lavanderias de jeans à fábricas de tecido bruto (SEBRAE, 2013).

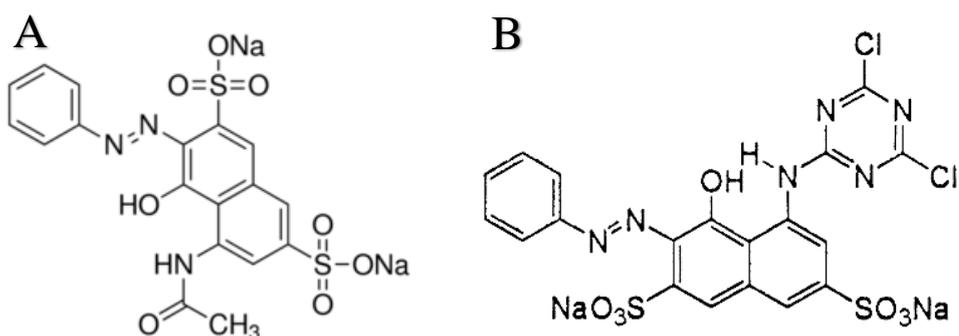
Cada quilograma de jeans produzido em uma lavanderia industrial pode gerar aproximadamente 100 L de resíduos apenas nos processos de tingimento e lavagem. As lavanderias de pequeno e médio porte envolvidas no tingimento de produtos têxteis produzem, com frequência, mais de 3,7 milhões de litros de águas residuais por dia (AMARAL *et al.*, 2014). A composição dos efluentes têxteis geralmente apresentam produtos químicos (permanganato de potássio, tiosulfato de sódio entre outros) e corantes usados no processo industrial. Além disso é comum encontrar na composição desses efluentes altos teores de salinidade (FERRAZ *et al.*, 2011; AMARAL *et al.*, 2014).

Os corantes do tipo azo são a maior classe de corantes produzidos comercialmente e a maior fonte dos problemas no tratamento dos efluentes têxteis. Esses compostos são usados para tingir e imprimir fibras naturais e sintéticas, couro, papel e para outros fins de coloração (HUNGER *et al.*, 1985).

Alguns tipos de corantes (Figura 2), sob condições anaeróbias, podem liberar anilina após a quebra de suas ligações azo. Esse processo pode ocorrer nos corpos hídricos poluídos, ao receber descargas de efluentes têxteis não tratados (ou tratados parcialmente), ou através de vazamentos industriais.

A presença da anilina e das demais aminas aromáticas produzidas a partir dos corantes, são de difícil detecção pelos órgãos ambientais, uma vez que não possuem cor, e os métodos de detecção requerem metodologias específicas para cada composto. Além da dificuldade de detecção, as normas de vigilância dos órgãos ambientais no Brasil ainda não foram totalmente adequadas para o monitoramento e regulação da emissão de poluentes emergentes, fato que agrava a solução desse problema ambiental.

Figura 2 - Estrutura molecular de corantes azo utilizados na indústria têxtil. (A) Acid Red 1- CAS 3734-67-6. (B) Reactive Red 2 – CAS 12226-03-8



Fonte: Sigma Aldrich®.

O processo usual para tratamento dos efluentes têxteis no Brasil ainda é em sua maior parte realizado por processos físico-químicos, compostos pelas etapas de coagulação floculação e disposição em leitos de secagem. Ao final do processo são geradas grandes quantidades de lodo químico (KHANDEGAR; SAROHA, 2013), um passivo ambiental que necessita de uma destinação final adequada para não causar problemas ambientais (BURNARD; COE; BRODNIK, 2015). Esse método de tratamento além de gerar um subproduto não inerte ainda exige um custo relativo à utilização de coagulantes químicos para o tratamento, tornando o processo muitas vezes negligenciado pelos pequenos produtores e indústrias de pequeno porte.

O incentivo aos métodos de tratamento biológico tem ao longo dos anos consolidado seus fundamentos, sendo a opção ambientalmente/economicamente mais favorável. Os corantes azo são geralmente persistentes em condições aeróbias, entretanto, sob condições anaeróbias, eles sofrem fissão redutora, produzindo aminas aromáticas (ZIMMERMANN; KULLA; LEISINGER, 1982). Por outro lado, as aminas aromáticas, são geralmente degradadas por culturas aeróbias, em reatores alimentados com oxigênio de forma intermitente ou contínua. O uso de processos aeróbios é geralmente desvantajoso do ponto de vista econômico, quando comparado com os processos anaeróbios, justamente pela necessidade de fornecer oxigênio através de sopradores e compressores e pela maior geração de lodo biológico.

O desenvolvimento de culturas anaeróbias adaptadas à degradação dessas aminas aromáticas pode permitir que o processo de degradação dos corantes ocorra em uma única etapa, eliminando a necessidade de aeração utilizada na oxidação das aminas. As culturas adaptadas em laboratório podem ser utilizadas em técnicas de bioaugmentação, em inóculos de reatores biológicos, melhorando a sua eficiência de remoção para os compostos nos quais as culturas foram desenvolvidas, e conseqüentemente permitir a concepção de processos de tratamento mais compactos e rápidos.

Dentro desse contexto a remoção de anilina dos efluentes industriais ainda precisa ser explorada. Alguns mecanismos de remoção de anilina têm sido abordados na literatura geralmente através de processos físico-químicos como adsorção (KEYHANIAN; FARMANZADEH, 2019) e oxidação avançada (GANG et al., 2019; JIAO et al., 2019). Essas técnicas de remoção têm apresentado bons resultados na remoção de anilina, entretanto, sua aplicação é voltada para o tratamento de efluentes líquidos e mananciais contaminados.

Quando a contaminação está no solo e em águas subterrâneas são poucos os estudos que comprovam a eficiência dessas técnicas. Adicionalmente, os custos associados aos processos de oxidação são bastante elevados em comparação aos processos biológicos, o que pode dificultar sua aplicação em larga escala.

A anilina, por ser produto primário para formulação química de uma série de compostos, é também subproduto de degradação que acumula no meio ambiente. Essa acumulação é clara em ambientes originalmente aeróbios que se tornam anaeróbios quando o oxigênio é consumido em virtude de contaminação ambiental, como águas subterrâneas ou sedimentos de rios. A degradação de poluentes primários, em geral, leva ao acúmulo de anilina como subproduto de degradação anaeróbia ou aeróbia. No caso da degradação anaeróbia de cloroanilinas, clorobenzenos e dicloronitrobenzenos, que contaminam águas subterrâneas no Brasil, acúmulo de anilina no subsolo é geralmente reportado, em concentrações que variam de 2 mg/L a 15 mg/L (HA DANH; NGUYEN THI, 2019; KRAUS, 2018). O desenvolvimento de culturas com habilidade de degradar anilina anaerobiamente pode viabilizar a aplicação da tecnologia de bioaugmentação para águas subterrâneas, solos e sedimentos contaminados com anilina e derivados. A literatura traz apenas três artigos publicados que provam adequadamente a ocorrência de degradação anaeróbia da anilina (KAHNG; KUKOR; OH, 2000; SCHNELL; SCHINK, 1991; SUN et al., 2015).

## **2.2 Mecanismos de biodegradação anaeróbia de compostos aromáticos monocíclicos**

Os compostos aromáticos monocíclicos são abundantes na natureza e estruturalmente diversos. Geralmente são encontrados em três formas diferentes de aminoácidos, fenilalanina, tirosina e triptofan (FUCHS; BOLL; HEIDER, 2011). Adicionalmente, a maior parte dos compostos aromáticos naturais são provenientes das plantas, especificamente da lignina que é constituída por unidades de fenil-propano. Um outro grupo de aromáticos monocíclicos, os BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), são comumente encontrados na natureza como poluentes ambientais, uma vez que são derivados do refinamento do petróleo. Além desses compostos naturais existem muitos outros sintetizados por processos químicos controlados industrialmente, como no caso da anilina, do ácido sulfanílico e dos clorobenzenos, que trazem radicais dificilmente encontrados na natureza como por exemplo o grupo sulfônico, presente no ácido sulfanílico, que podem aumentar a recalcitrância desses compostos.

Apesar de estarem presentes na natureza nas suas mais diversas formas, os únicos organismos que conseguem utilizar esses compostos como fonte de carbono e energia, limitam-se apenas às bactérias, arqueas e alguns fungos aeróbios (HEIDER; FUCHS, 1997). O maior desafio que os microrganismos encontram na utilização de compostos aromáticos está na forte estabilidade química do anel aromático. Quando o ambiente dispõe de oxigênio molecular as bactérias aeróbias conseguem utilizá-lo como uma ferramenta eficaz para atacar a estrutura aromática. Esse ataque ocorre, através do uso de enzimas monoxigenases ou dioxigenases, que acoplam o O<sub>2</sub> na forma de radicais hidroxila levando à formação de um composto intermediário central geralmente o catecol (HUANG et al., 2018; KAHNG; KUKOR; OH, 2000; KONOPKA; KNIGHT; TURCO, 1989; PARALES; ONTL; GIBSON, 1997).

Quando o oxigênio molecular não está disponível no meio, as bactérias anaeróbias necessitam utilizar uma outra abordagem para conseguir sobrepor a estabilidade química do anel aromático. No trabalho de Boll e Fuchs (1995) os autores demonstram que a estratégia utilizada na degradação anaeróbia está na ativação da molécula pelo tioéster coenzima-A (CoASH), que diminui a ressonância do anel aromático, facilitando sua posterior redução mediada por reações enzimáticas (Figura 3).



acontece através da abertura do anel aromático por sucessivas reduções de *Birch*, nas quais ocorrem a alternância no recebimento de um elétron e de um próton  $H^+$ , que são incorporados no anel aromático, desestabilizando sua ressonância, permitindo sua posterior abertura (BOLL, 2005). Já a segunda rota de degradação do benzoil-CoA descrita, só acontece na presença de ATP, onde o processo depende da hidrólise de 2 moléculas de ATP, catalizadas por enzimas reductases. Essas enzimas transferem elétrons, geralmente de uma ferredoxina reduzida, para o anel aromático do benzoil-CoA, ocasionando a desestabilização de sua ressonância e posterior conversão a um composto alifático (BOLL et al., 2000; FUCHS, BOLL e HEIDER, 2011). Este segundo tipo de rota dependente de ATP, predomina entre os gêneros microbianos reportados na literatura, como por exemplo, as espécies *Thauera aromática* (LEUTWEIN; HEIDER, 1999), *Rhodopseudomonas* (DISPENSA et al., 1992), e *Azoarcus evansii* (LÓPEZ BARRAGÁN et al., 2004).

O saldo energético obtido com a degradação anaeróbia completa de uma molécula de benzoil-CoA corresponde à formação de 3 mols de acetil-CoA, que após serem utilizados no ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs) resultam em um mol de CoASH, três mols de NADH, um mol de FADH e um ATP, liberando dois mols de  $CO_2$  no meio (BIOLOGIE; BIOLOGIE; MARBURG, 1988). Esta é a recompensa que os microrganismos anaeróbios receberiam com a degradação de 1 mol de anilina por exemplo.

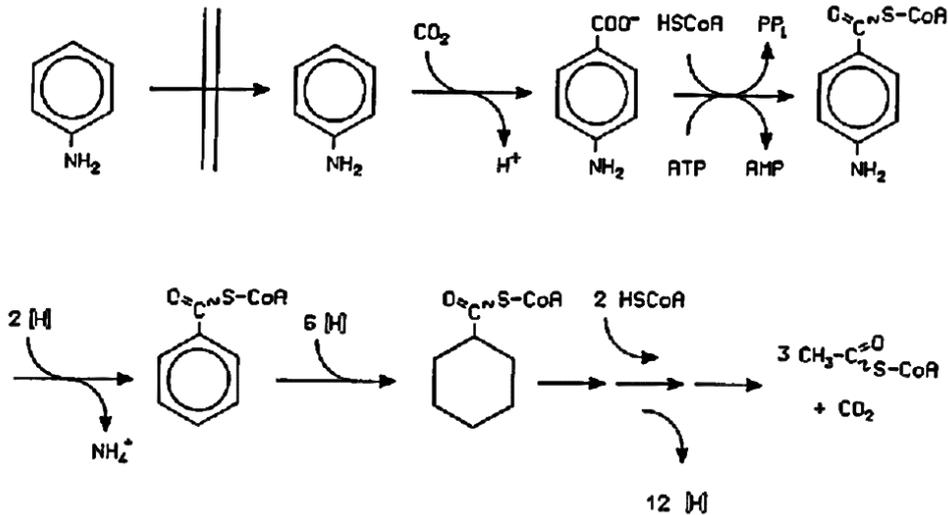
### 2.3 Degradação anaeróbia da anilina

Por muito tempo, a anilina foi considerada biodegradável apenas em processos biológicos aeróbios por meio da ação de enzimas oxigenases que conseguem atacar sua estrutura aromática, levando o composto a etapas posteriores em que ocorre mineralização a CO<sub>2</sub> e água (FUCHS; BOLL; HEIDER, 2011; HAYAISHI, 2008). Existem escassos relatos na literatura sobre a degradação anaeróbia da anilina, muito provavelmente pela dificuldade de encontrar microrganismos capazes de resistir à toxicidade inerente de sua estrutura molecular ou pela lenta taxa de crescimento. Além disso, os microrganismos precisam dispor de genes adequados para produzir as enzimas necessárias no processo de biodegradação, característica que é encontrada com mais facilidade nos microrganismos aeróbios (ANLI DINO et al., 2019; CUI et al., 2017; HUANG et al., 2018; KONOPKA; KNIGHT; TURCO, 1989; PEREIRA et al., 2011; SHELUDCHENKO et al., 2005).

O primeiro trabalho que relatou com clareza a degradação anaeróbia da anilina descreveu o gênero *Desulfobacterium anilini*, como capaz de degradar 0,46 mM (42 mg/L) de anilina em períodos de 5 a 15 dias (SCHNELL; BAK; PFENNIG, 1981) sob condições sulfetogênicas. Os autores enriqueceram cultura microbiana coletada em sedimento marinho, tendo a espécie enriquecida sido capaz de degradar a anilina completamente a CO<sub>2</sub> e NH<sub>3</sub>, em reação estequiometricamente associada à redução de sulfato para sulfeto.

A rota de degradação observada na espécie *D. anilini* é descrita em três etapas até chegar ao composto intermediário central, o benzoil-CoA (Figura 4). À medida que a anilina era consumida havia o aumento do composto 4-aminobenzoato, caracterizando o processo de carboxilação como a primeira etapa da rota. A segunda etapa foi atribuída à ativação da anilina por uma molécula de CoASH, resultando na formação do composto 4-aminobenzoil-CoA. Importante ressaltar que essa segunda etapa só acontecia na presença de ATP, do contrário havia acúmulo de 4-aminobenzoato. A terceira etapa consistiu na remoção do grupo amino liberado na forma de NH<sub>3</sub>. Por fim, o intermediário central benzoil-CoA seguia pelas rotas de degradação já estabelecidas na literatura (KAMAGATA et al., 1992; LÓPEZ BARRAGÁN et al., 2004; UPADHYAY; KUMAR; MEHROTRA, 2008).

Figura 4 - Rota metabólica de degradação anaeróbica da anilina, proposta para a espécie *Desulfobacterium anilini*.



Fonte: Schnell e Schink (1991).

O segundo trabalho em que a anilina foi degradada por via anaeróbica em condições metanogênicas (SUN et al., 2015) evidenciou que o  $^{14}\text{C}$ , isótopo marcado na anilina, foi recuperado na estrutura carbônica do metano formado dentro dos microcosmos, indicando que a anilina poderia ser degradada por via de formação de metano. O terceiro e último trabalho relevante associou a degradação da anilina (1 mM em 7 dias) à redução de nitrato (0,1 mM) (KAHNG; KUKOR; OH, 2000). Contudo, os autores não detalham as condições de incubação, como por exemplo, o uso de câmara anaeróbica para garantir o ambiente de incubação livre de oxigênio, o que pode ter influenciado no resultado. Com exceção do primeiro trabalho os artigos citados neste tópico não contêm informações disponíveis sobre as rotas de degradação e os genes envolvidos no processo de biodegradação anaeróbica da anilina, o que apenas demonstra a escassez de conhecimento sobre esse tema na literatura.

## 2.4 Utilização de culturas nativas desenvolvidas em locais contaminados

Enquanto a demanda por petróleo aumenta mundialmente, os hidrocarbonetos derivados de petróleo tornam-se o maior grupo dos contaminantes tanto no aspecto quantidade, quanto no aspecto prevalência no meio ambiente. Esse cenário reflete os casos frequentes de

contaminações acidentais que ocorrem nos mais diversos sites industriais ao redor do mundo, sendo de fato uma tragédia presente nos noticiários todos os anos.

Apesar de trágico, esse cenário desperta o interesse da ciência em avaliar como a microbiota presente naquele ambiente hostil se adaptou à presença de um poluente que não fazia parte de seu habitat. Foi a partir deste interesse que técnicas como a bioestimulação e a bioaumentação, que hoje são ferramentas eficazes na bioremediação de solos e águas subterrâneas contaminadas, conseguem contribuir na recuperação de ambientes contaminados poluentes de difícil degradação (PANIGRAHI; VELRAJ; SUBBA RAO, 2019; TYAGI; DA FONSECA; DE CARVALHO, 2011).

Os microrganismos, especificamente, as bactérias, arqueas e fungos presentes nos solos apresentam por natureza um vasto potencial catabólico, que tem sido explorado por muitos pesquisadores, que direcionam esse potencial para a biodegradação de compostos tóxicos e recalcitrantes (DE CARVALHO et al., 2005; VAN DER GEIZE; DIJKHUIZEN, 2004). Além desse potencial catabólico, muitas bactérias desenvolvem estratégias de adaptação ao novo ambiente, modificando a estrutura de sua membrana celular (seu aparato metabólico), se adequando ao novo meio nutricional e mantendo suas funções biológicas ativas (ISKEN; DE BONT, 1998).

O uso dessas culturas desenvolvidas em ambientes contaminados tem ampliado e acelerado os processos de recuperação de áreas contaminadas. Na área de tratamento de contaminantes derivados de petróleo temos vários exemplos que refletem a eficiência das técnicas de bioaumentação. No trabalho de Musa et al. (2015) os autores utilizaram uma cultura que se desenvolveu na água residuária de uma refinaria de petróleo na Nigéria. A cultura foi caracterizada pelos gêneros microbianos *Bacillus*, *Micrococcus* e *Staphylococcus*, que demonstraram acelerar o processo de tratamento dos resíduos gerados na refinaria, implicando na diminuição dos custos com o tratamento dos efluentes. Em outro trabalho a bioaumentação utilizando algumas espécies do gênero *Pseudomonas* acelerou o processo de biodegradação do clorobenzeno, ressaltando que as espécies utilizadas tiveram seu metabolismo descoberto e foram isoladas a partir de sedimentos contaminados com o composto de interesse, neste caso o clorobenzeno (WENDEROTH et al., 2003).

O uso de culturas nativas ou espécies isoladas não se limitam à aplicação de técnicas de bioremediação de áreas contaminadas. A bioaumentação também pode ser aplicada no uso de culturas como inóculo de reatores biológicos, para tratamento de efluentes recalcitrantes. Um exemplo de aplicação dessa abordagem é relatado no trabalho de Li et al. (2020b) que utilizaram uma cepa do gênero *Delftia sp.* para aumentar a eficiência de remoção

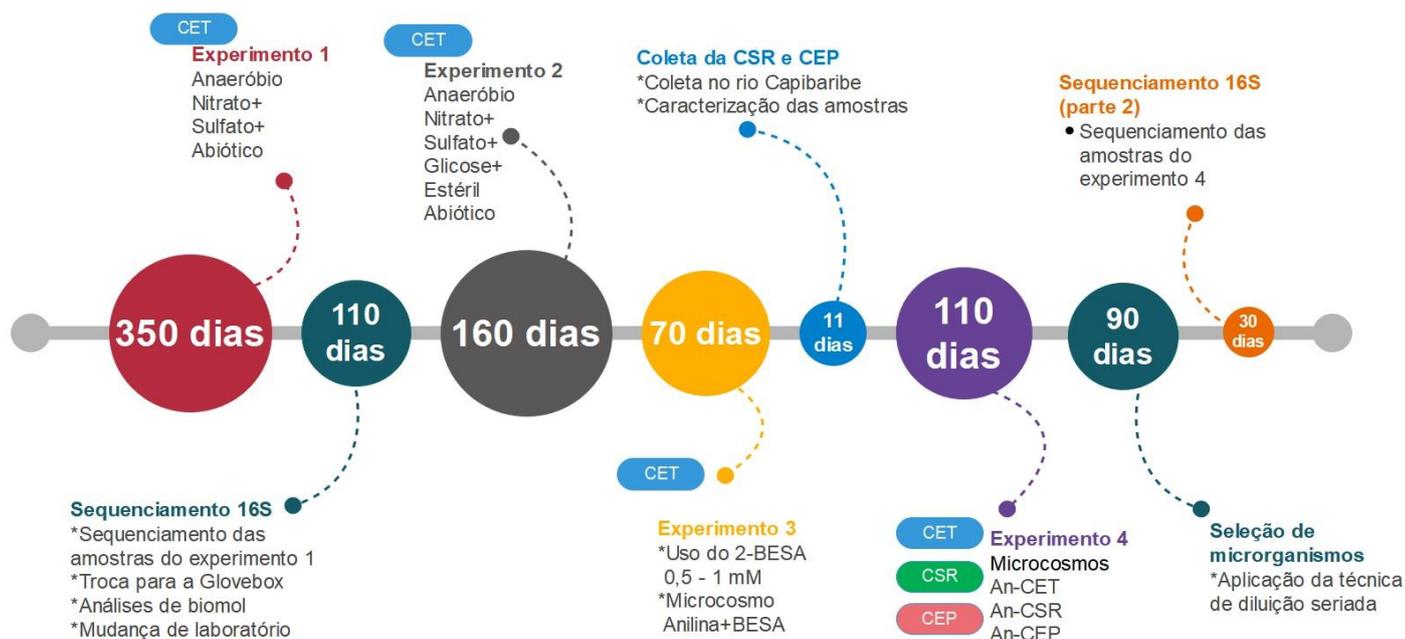
de anilina em um reator aeróbio sequencial em batelada. Os autores concluíram que a aplicação da cepa diminuiu em 15 dias o tempo de adaptação do reator, além de conseguir remover completamente 600 mg/L de anilina.

Estes exemplos demonstram diferentes perspectivas para o uso de culturas microbianas na biodegradação de compostos recalcitrantes, indicando que a ferramenta para resolver boa parte dos problemas ambientais pode ser encontrada na própria natureza.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos realizados nesta pesquisa foram sumarizados na forma de um fluxograma temporal (Figura 5), com a finalidade de auxiliar no entendimento e na ordenação na qual esta pesquisa foi montada.

Figura 5 - Fluxograma das atividades realizadas neste trabalho em formato de linha do tempo ordenado sequencialmente da esquerda para a direita.



Fonte: O Autor (2020).

#### 3.1 Culturas microbianas utilizadas como inóculo

Neste trabalho foram utilizadas três diferentes culturas microbianas mistas. Essas culturas foram coletadas de ambientes contaminados por compostos aromáticos, em sua maioria corantes e seus subprodutos, como também, hidrocarbonetos derivados de petróleo. Essas culturas serviram como inóculo para os testes de biodegradação anaeróbia de anilina descritos nos tópicos 3.3 e 3.4.

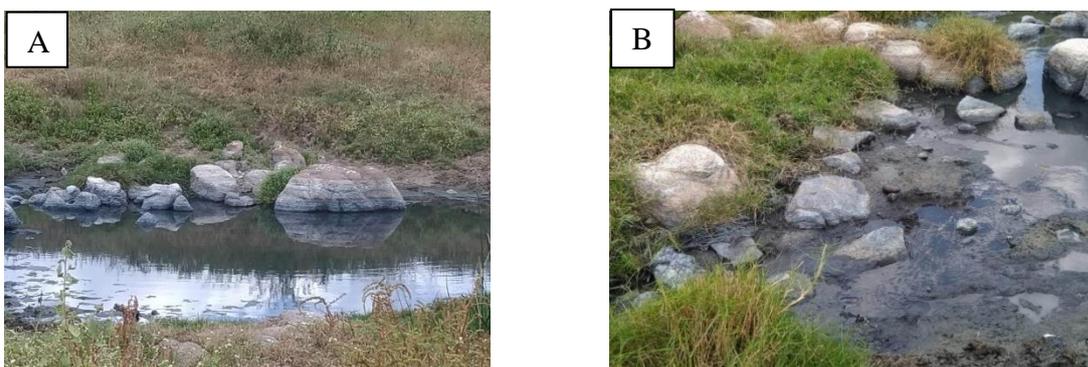
A primeira delas é uma cultura anaeróbia adaptada ao tratamento de efluentes têxteis (CET). A CET foi coletada em um reator do tipo *upflow anaerobic sludge blanket* (UASB) utilizado para tratar efluente têxtil real (em planta piloto por 4 anos) e sintético (escala de bancada por 3 anos) contendo corantes do tipo azo geralmente em concentrações de  $\cong 65$  mg/L. Além dos corantes e das aminas aromáticas, o ambiente onde a CET se desenvolveu apresentava concentração de sulfato entre 250-600 mg/L, salinidade  $\cong 1,9$  g de NaCl /L (0,19%) e DQO  $\cong 1$  g de O<sub>2</sub>/L (AMARAL et al., 2014a; CARVALHO et al., 2020). A CET é

o inóculo principal para este trabalho, pois está sendo monitorada em nosso laboratório há aproximadamente oito anos, onde foi utilizada em vários experimentos nos quais foi mantida em ambiente contendo corante *DB22* e as aminas aromáticas derivadas de sua descoloração redutiva. Deste modo, essa é a cultura que temos mais informações a respeito de sua estrutura taxonômica e suas condições nutricionais.

A segunda cultura utilizada (CEP) foi coletada também de um reator UASB, dessa vez utilizado em uma estação de tratamento de efluentes petroquímicos. A CEP veio de ambiente onde os principais poluentes eram subprodutos da manufatura do petróleo, os BTEX (benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos). Todos esses compostos são aromáticos monocíclicos, semelhantes a anilina, justificando o uso dessa cultura nos experimentos de biodegradação. Além dos BTEX o ambiente de adaptação da CEP continha DQO  $\cong$  1200 mg O<sub>2</sub>/L, nitrogênio amoniacal  $\cong$  80 mg/L e sulfato  $\cong$  160 mg/L, esses valores foram medidos no efluente no dia de coleta do inóculo.

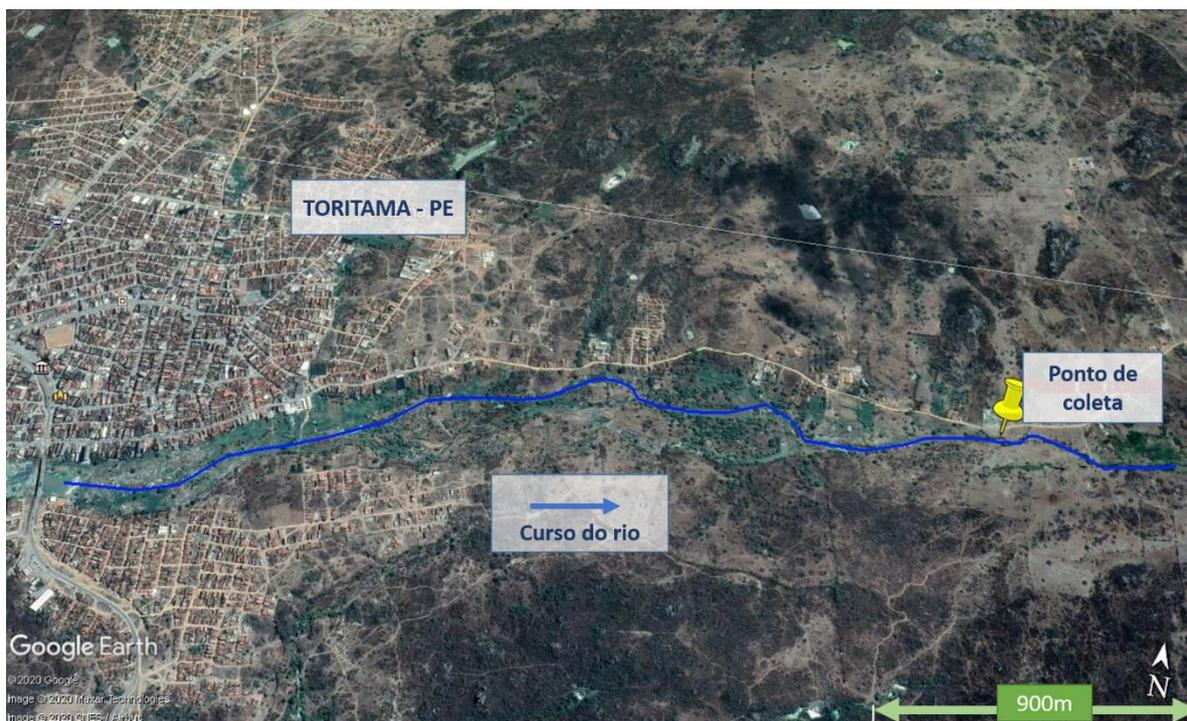
A terceira e última cultura microbiana utilizada (CSR) foi proveniente de sedimentos coletados do Rio Capibaribe em trecho situado na cidade de Toritama – PE (-8.005463N, -36.030765E – Figura 6). A cidade de Toritama possui mais de 1200 empreendimentos no setor têxtil, onde predomina a confecção e lavagem de peças de jeans (SEBRAE, 2019). Essa atividade é responsável por boa parte dos lançamentos de efluentes no rio Capibaribe. Por se tratar de um ambiente natural onde a microbiota nativa é exposta a diversos tipos de poluentes (corantes, químicos, sais, sulfato, etc.), é esperado que se desenvolvam microrganismos nativos com habilidades e genes específicos para utilizar esses compostos como fonte de energia, justificando o uso desse inóculo. O sedimento foi coletado a 15 cm do nível da água do rio, em local sem correnteza, distanciado a 20 m de um ponto de descarga de efluentes de uma lavanderia têxtil.

Figura 6 - Fotos do local de coleta da cultura CSR. (A) coloração azulada nas pedras ribeirinhas, causada pela presença de corantes na água do rio. (B) local de coleta dos sedimentos.



Fonte: O Autor (2020).

Figura 7 - Localização do ponto de coleta da CSR.



Fonte: Autor (2020).

A qualidade da água do rio Capibaribe no ponto de coleta do sedimento foi analisada em amostras duplicatas, para os parâmetros indicados na Tabela 1. Destaca-se a concentração de anilina medida nas amostras, com valor médio de 0,81 mg/L indicando a presença do composto alvo no curso de água em questão.

Tabela 1 - Resultados da caracterização da água do rio no ponto de coleta da CSR.

Parametro	Resultado*	Método
pH	7,74	SM 4500-H
DQO (mg O <sub>2</sub> /L)	386	SM 5220
Anilina (mg/L)	0,81	HPLC
Potencial redox (mV)	5,4	SM 2580
Salinidade	2,84	SM 2520
OD (mg O <sub>2</sub> /L)	0,42	SM 4500-O

Fonte: O Autor (2020).

\*Valor médio da duplicata coletada. SM = *Standard Methods* (APHA, 2005).

### 3.2 Montagem dos microcosmos

Os microcosmos utilizados em todas as etapas desse projeto foram montados em frascos de penicilina com volume total de 120 mL, onde 90 mL correspondeu ao volume útil e 30 mL ao *headspace* (Figura 7). Foram inseridos em cada frasco uma solução de nutrientes em volume necessário para obter as concentrações descritas na Tabela 2 no licor misto, suprimindo assim as necessidades nutricionais requeridas para o desenvolvimento de microrganismos.

As culturas foram inoculadas com volume suficiente para obter uma concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) correspondente a 0,8 mg/L, também no licor misto. Foi utilizada anilina com pureza 99,5% (Sigma Aldrich® - CAS Number 62-53-3) para alimentar os reatores nas concentrações estabelecidas em cada experimento.

Após a alimentação dos microcosmos os mesmos eram purgados com uma mistura de gases N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> na proporção de 80/20%, durante cinco minutos, a fim de remover o oxigênio remanescente no *headspace*. Após a purga os microcosmos foram armazenados em uma câmara anaeróbia (Plaslabs® – 818GB). A câmara anaeróbia foi preenchida com a mesma mistura de gases utilizada para purga dos microcosmos, a fim de manter o ambiente sem a presença de oxigênio.

Figura 8 - Ilustração da composição dos microcosmos. Tabela 2 - Concentração dos nutrientes utilizados para compor o meio basal.



Fonte: Autor (2020).

Compostos	Concentração (mg/L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	140
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	286
NH <sub>4</sub> Cl	357
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	32
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	16
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,4
ZnCl	0,13
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,13
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,99
MnCL <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,33
CuCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,13
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,99
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,03
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> .18H <sub>2</sub> O	0,13
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,3
Resazurina	0,66
NaHCO <sub>3</sub>	1333,25

Fonte: adaptado de EDWARDS; GRBIC-GALIC (1994).

### 3.3 Procedimentos analíticos: monitoramento do COI e quantificação de biogás, AGVs, íons e carboidratos totais

Essa pesquisa se restringiu em avaliar apenas um composto orgânicos de interesse (COI) a anilina. Adicionalmente foram monitorados o catecol e o benzoato (na forma de ácido benzóico) como compostos intermediários do processo de biodegradação.

#### 3.3.1 Anilina

Para quantificação da anilina foi utilizado um cromatógrafo líquido do tipo HPLC SHIMADZU<sup>®</sup> LC-20AT, equipado com uma coluna de fase reversa do modelo LiChospher<sup>®</sup> 100 RP-18 (5 $\mu$ m). A fase móvel foi composta por acetonitrila 40% e água Milli Q 60% sob condições isocráticas. O fluxo da fase móvel foi ajustado para 1 mL.min<sup>-1</sup>. Utilizou-se 50  $\mu$ L como volume de injeção. O pico de detecção da anilina foi medido no comprimento de onda de 230 nm, com tempo de retenção de 6,1 minutos. A amostragem dos microcosmos foi realizada utilizando seringas de 1 mL de volume, acopladas a agulhas de inox (BD Spinal 20g X 3 1/2”),

#### 3.3.2 Catecol e ácido benzóico

Para a detecção dos compostos catecol e ácido benzóico foi utilizado o mesmo cromatógrafo líquido descrito na metodologia da anilina (tópico 3.5.1), entretanto com as seguintes modificações: 1. A fase móvel foi composta por água Milli Q acidificada com 0.003% de ácido fosfórico (70%) e acetonitrila (30%) sob condições isocráticas; e 2. O fluxo da fase móvel foi de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>, com volume de injeção de amostra correspondente a 50 $\mu$ L. O pico de detecção do catecol no comprimento de onda de 280 nm ocorreu com tempo de retenção de 6,59 minutos. Já para o ácido benzoico, com detecção em 254 nm, o tempo de retenção foi de 11,85 min. Os compostos químicos utilizados como padrão foram o *Catechol* com pureza  $\geq$  98%, peso molecular de 110,11g (CAS: 120-80-9), e Ácido Benzóico (Sigma Aldrich – BRA) com pureza  $\geq$  99,5%, peso molecular de 122,12 g (CAS: 65-85-0).

#### 3.3.3 Composição do biogás produzido e quantificação dos AGV

As análises do biogás produzido foram feitas utilizando cromatógrafo gasoso com detector de condutividade térmica GC-TCD (SHIMADZU<sup>®</sup>, GC2014). A coluna utilizada é a Carboxen 1010Plot (Supelco<sup>®</sup> 30m x 0,53mm), utilizando argônio como gás de arraste 5,66

mL/min. A temperatura do injetor foi de 220°C e a do detector 230°C. Foi utilizado método de injeção *Split* 5:1, com volume de amostra de 200 µL, com forno em temperatura de 100°C. Os gases detectados foram descritos em porcentagem de N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. Foram utilizadas para coleta das amostras nos microcosmos, seringas do tipo *GASTIGHT*<sup>®</sup> com trava de segurança para evitar o contato com o ar atmosférico durante o trajeto da glove box até o cromatógrafo.

As análises de quantificação dos AGV foram realizada em cromatógrafo gasoso (GC – 7890A- Agilent Technology<sup>®</sup>), equipado com coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, USA). O fluxo da fase móvel (ácido sulfúrico 5 mM) foi ajustado para 0,6 mL/min e o volume de injeção configurado para 20 µL de amostra. A temperatura do forno foi estabilizada em 60 °C. Os ácidos graxos voláteis de até 6 carbonos, foram detectados em comprimento de onda de 210 nm. Todas as amostras foram filtradas em filtros de celulose regenerada de 0,45µm antes da injeção.

#### 3.3.4 *Quantificação de íons*

A análise dos íons NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> foi feita por cromatografia iônica líquida, de acordo com *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005), método SM 4110B. O cromatógrafo utilizado foi o ICS-2100 - Dionex<sup>®</sup>.

As amostras eram retiradas com agulha descartável, do tipo BD Spinal 20g X 3 1/2” acoplada a uma seringa com volume de 1 mL. Antes da análise, as amostras eram filtradas em filtro rosqueável com membrana de 0,45 µm e diluídas com água deionizada (1:5).

#### 3.3.5 *Carboidratos totais*

O método utilizado para a quantificação de glicose, foi o método colorimétrico que utiliza o reagente antrona para quantificar os carboidratos totais presentes na amostra (YEEM; WILLIS, 1954). O volume amostral retirado dos microcosmos foi de 0,5 mL, posteriormente diluídos (1:10) em água mili-q, resultando em um volume final de 5 mL.

### 3.4 **Experimentos com a cultura de efluente têxtil (CET)**

O primeiro teste de biodegradação utilizando a CET foi conduzido com a finalidade de avaliar desempenho da cultura em degradar anilina anaerobiamente, como também verificar os efeitos do uso de nitrato e sulfato como aceptores finais de elétrons. Para isso, foram montados microcosmos em triplicata, operando nas condições descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Concentrações utilizadas no experimento 1.

Composição	AN-CET	S-CET	N-CET	A-CET
	Anaeróbio (Padrão)	+Sulfato	+Nitrato	Abiótico
Anilina (mg/L)	2,79	2,79	2,79	2,79
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> adicionado (mg/L)	0	180	0	0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> endogênico (mg/L)	41	38	62	0
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	0	0	50	0
Inóculo (mg SSV/L)	1,6	1,6	1,6	1,6

Fonte: O Autor (2020).

\* O valor depois da barra representa o valor médio de sulfato endogênico (medido no lodo) da cultura CET e o valor antes da barra representa o que foi adicionado para o experimento.

### 3.4.1 Experimento 1: Influência dos íons nitrato e sulfato no processo de biodegradação da anilina

A concentração inicial de anilina (2,79±0.2 mg/L) foi obtida através da relação de que 1 mol do corante DB22 potencialmente forma 1 mol de anilina após a quebra das ligações azo (Figura 9). Admitindo-se que a concentração média de corante nos efluentes é de 65±20 mg/L, segundo trabalhos realizados na região do agreste pernambucano (AMARAL et al., 2014; CARVALHO et al., 2020; MENEZES et al., 2019). Essa concentração de anilina também é compatível com as faixas de concentrações medidas em sites contaminados por atividades industriais, como por exemplo em *sites* localizado em Camaçari-BA, com anilina e cloroanilinas na faixa de 2 mg/L a 15 mg/L nos solos e águas subterrâneas (HA DANH; NGUYEN THI, 2019; KRAUS, 2018).

A concentração de sulfato adicionado como aceptor de elétrons (180 mg/L) também partiu do valor médio encontrado nos efluentes de lavanderias têxteis da região, reportados nos trabalhos citados.

Quanto à concentração do íon nitrato utilizado como aceptor final de elétrons (50 mg/L), esta foi obtida através da relação estequiométrica com a quantidade de anilina fornecida, e pode ser expressa pelas equações 1 e 2, onde na Equação 1 o benzoato representa a anilina. O valor teórico necessário para degradar 2,79 mg/L de anilina seria 16,74 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, contudo, optamos por utilizar 50 mg/L para assegurar que haveria nitrato suficiente para atender essa rota metabólica, considerando influência de processos endógenos.

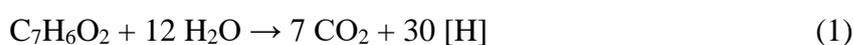
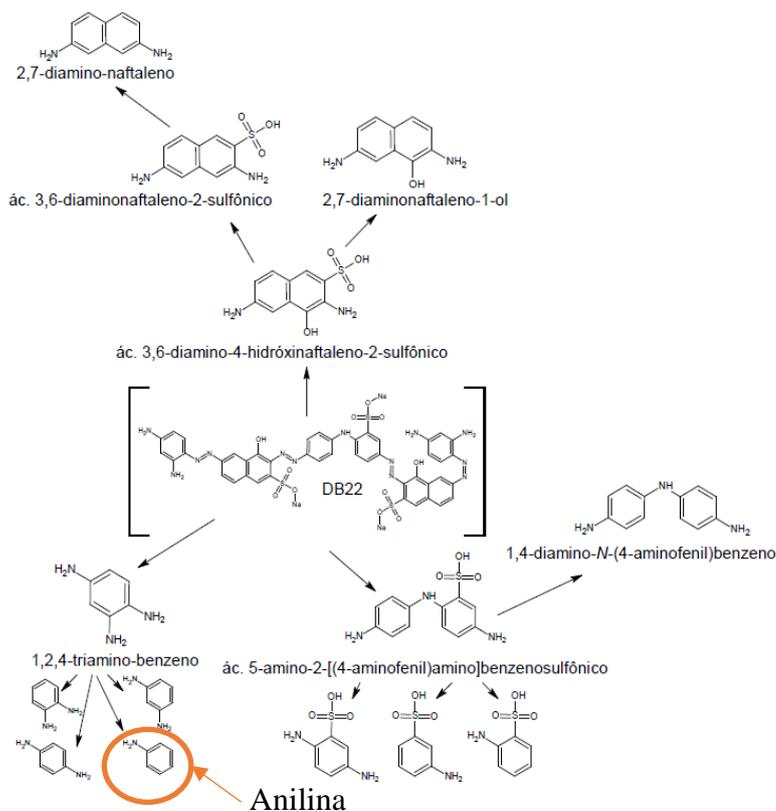


Figura 9 - Esquema ilustrativo dos subprodutos formados com a quebra das ligações azo presentes na molécula do corante DB22.



Fonte: Silva (2016).

As triplicatas de cada condição foram mantidas em Glovebag (

Figura 10), alimentada por uma bomba a vácuo com potência de 200 W (VIX® – 5CSM), usada para manter o interior da Glovebag com uma mistura N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> na proporção de 80/20%. As amostras foram coletadas duas vezes por semana no início do experimento (até o dia 100). Após esse período a amostragem passou a ser semanal. O experimento teve duração de 349 dias, período em que foi possível monitorar três alimentações de anilina, todas elas sem troca de volume. As concentrações de nitrato e sulfato foram realimentadas sempre que ocorria sua depleção dentro dos microcosmos. Todos os procedimentos de realimentação foram realizados dentro da Glovebag.

Figura 10 - Foto do aparato experimental utilizado no experimento 1



Fonte: O Autor (2020).

Os parâmetros monitorados nesse experimento foram: concentração de anilina e dos íons sulfato nitrato e nitrito. A composição do biogás no headspace também foi analisada, entretanto, apenas após última alimentação de anilina. Ao final do teste de biodegradação foram coletadas amostras de 0,5 g da biomassa de cada condição testada, para realizar a extração de DNA e sequenciamento, afim de avaliar as alterações taxômicas que aconteceram em cada condição.

#### 3.4.2 *Experimento 2: Avaliação da glicose como co-substrato e adição de um controle com inóculo autoclavado*

Um segundo experimento com a CET foi realizado, com o objetivo de validar os resultados obtidos no Experimento 1. Neste novo experimento todo o aparato experimental foi modificado para melhor controlar as condições ambientais durante os testes de biodegradação. A glovebag descartável foi substituída por uma câmara anaeróbia (Glovebox – 518GB, Plaslabs® - Figura 11), a sala onde o experimento foi realizado passou a ter a temperatura controlada por um aquecedor térmico a óleo (A-06, Mondial®) mantendo a temperatura do ambiente em  $35 \pm 2$  °C.

Figura 11 - Foto do novo aparato utilizado no Experimento 2.



Fonte: O Autor (2020).

Além de validar os resultados do primeiro experimento, foi possível avaliar a influência do uso de um co-substrato no processo de biodegradação da anilina. Neste caso utilizamos a glicose como co-substrato, com o objetivo de estimular o desenvolvimento de microrganismos fermentativos, aumentando o fluxo de elétrons no meio (entropia). Para esta análise adicionamos uma triplicata de microcosmos alimentados com 500 mg/L de glicose (99,5% - *Sigma Aldrich*<sup>®</sup>, CAS 50-99-7). A mesma concentração de glicose era realimentada sempre que detectada sua depleção total nos microcosmos.

Além da condição contendo glicose como co-substrato, também foi adicionado ao monitoramento um controle contendo a cultura CET autoclavada, a fim de analisar qualquer contribuição proveniente da adsorção ou de reações químicas advindas de compostos presentes no inóculo. Para montar este controle, a cultura CET foi autoclavada por 40 minutos a 120 °C em três dias consecutivos. Após o procedimento de esterilização térmica a CET foi inoculada nos microcosmos na mesma quantidade utilizada nas demais condições (SSV = 0,8 mg/L no licor misto). A configuração das condições monitoradas no Experimento 2 estão sumarizadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições monitoradas no Experimento 2.

Composição	AN-CET	S-CET	N-CET	A-CET	E-CET	G-CET
	Anaeróbio (Padrão)	Sulfato+	Nitrato+	Abiótico	Estéril	Glicose+
Anilina (mg/L)	2,79	2,79	2,79	2,79	2,79	2,79
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> adicionado (mg/L)	0	180	0	0	0	0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> endogênico (mg/L)	41	34	27	0	18	33
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	0	0	50	0	0	0
Inóculo (mg SSV/L)	0,8	0,8	0,8	0	0,8	0,8
Glicose (mg/L)	0	0	0	0	0	500

Fonte: O Autor (2020).

\*Concentração média endogênica do inóculo.

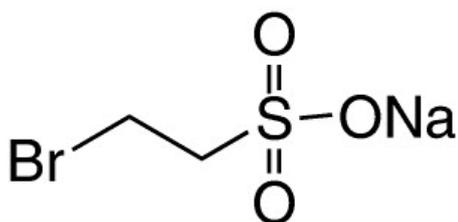
Neste experimento foram avaliados semanalmente os teores de: anilina, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e S-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, carboidratos totais, catecol e ácido benzoico, além da composição do biogás no headspace. Os métodos utilizados foram descritos no tópico 3.5.4.

### 3.4.3 Experimento 3: Ensaio de inibição da metanogênese e detecção de AGVs

Um último experimento foi realizado com a CET, onde foi possível induzir a inibição da metanogênese utilizando o ácido 2-bromoetanosulfônico (2-BESA - Figura 13), afim de verificar se haveria acúmulo de acetato (via acetogênica) ou se o metano produzido em sua maioria viria da pela utilização de H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (via hidrogenotrófica). Além da investigação da via metanogênica, monitoramos se a inibição causaria algum impacto na remoção de anilina.

O experimento foi dividido em duas etapas. Na primeira foram montadas três duplicatas de microcosmos (Figura 12) contendo a CET (0,8 mg SSV /L), meio basal, e concentrações variadas de 2-BESA, 0,5 mM, 3 mM e 5 mM, respectivamente a cada duplicata. Essa etapa serviu para verificar qual a concentração necessária de 2-BESA para inibir a metanogênese. Foi utilizado glicose (500 mg/L) como doador de elétrons para essa verificação. Glicose foi escolhida em virtude de ter sido utilizada como co-substrato no experimento 2.

Figura 13 - Estrutura molecular do ácido 2-bromoetanosulfônico.



Fonte: O Autor (2020).

Figura 12 - Purga com gás nitrogênio/CO<sub>2</sub> das duplicatas contendo diferentes concentrações de 2-BESA.



Fonte: O Autor (2020).

Após montadas, todas as duplicatas foram armazenadas dentro da *glovebox*, e foram monitoradas através de coletas (1,5 mL de amostra líquida e 1 mL de gás) realizadas a cada dois dias. Os parâmetros analisados foram: carboidratos totais e a quantificação de biogás no headspace em termos de N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>. Essa etapa do experimento durou até o consumo completo da glicose fornecida (14 dias).

Conhecida a concentração adequada para inibir a formação de metano, foi iniciada a segunda etapa do experimento, que consistiu em avaliar como o processo de biodegradação da anilina poderia ser afetado com a inibição da metanogênese. Para isso foi montada uma triplicata de microcosmos conforme a composição descrita na Tabela 5.

Tabela 5 - Concentrações utilizadas para montar a triplicata com inibidor.

Composição	BESA-CET
	Anaeróbio+inibidor
Anilina (mg/L)	2,79
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> endogênico(mg/L)	41*
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	0
CET (mg SSV/L)	0,8
Glicose (mg/L)	0
2-BESA (mM)	5

Fonte: O Autor (2020).

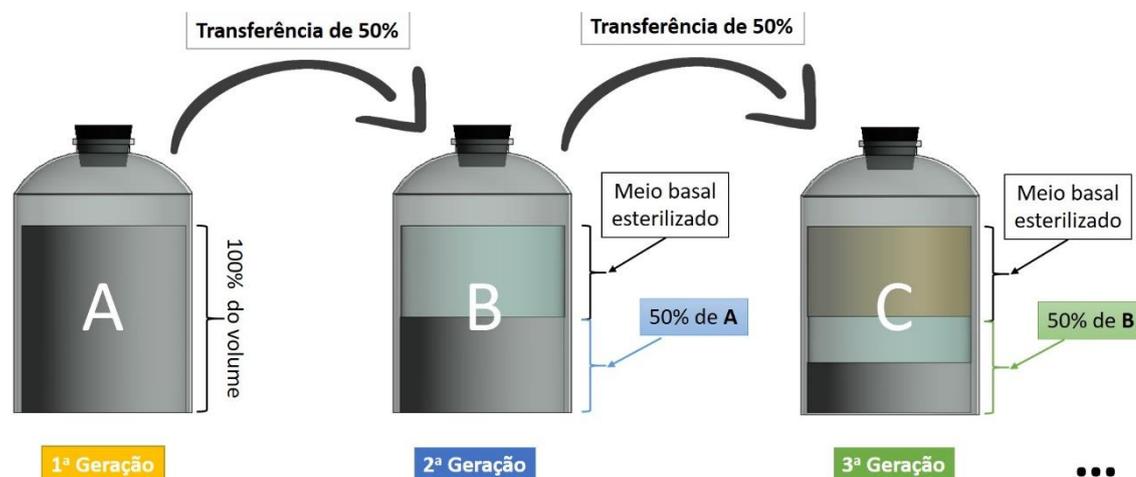
\*Concentração média endogênica do inóculo

Os parâmetros de monitoramento para essa condição foram a concentração de anilina, ácido benzoico, catecol, ácidos orgânicos voláteis e a composição do biogás no *headspace*.

### 3.4.4 Seleção de microrganismos através de diluição a extinção

Na tentativa de isolar os gêneros microbianos ligados ao processo de biodegradação da anilina, optamos por aplicar o método de seleção microbiana através de diluições seriadas (sucessivas transferências), onde as culturas de interesse são repassadas para novas gerações de microcosmos repetidamente. As diluições foram realizadas com transferências de 50% (45 mL) do volume útil do microcosmo selecionado para um novo microcosmo (2ª geração – Figura 14), contendo 45 mL de meio basal esterilizado e anilina, reajustando a concentração para 3 mg/L de anilina no volume final de 90 mL. O novo microcosmo foi monitorado até que a anilina fosse completamente removida em duas realimentações consecutivas, indicando que uma nova transferência poderia ser realizada, montando uma terceira geração de microcosmos. A série de diluições era interrompida quando a remoção de anilina não fosse mais detectada nos microcosmos, atingindo extinção.

Figura 14 - Ilustração da série de diluições à extinção realizadas com transferências de 50%.



Fonte: O Autor (2020).

Uma vez finalizadas as transferências, uma amostra da biomassa presente na última geração de microcosmos, era coletada para posterior extração de DNA e sequenciamento, seguindo os protocolos descritos no tópico 3.6. O DNA das amostras era extraído em até 48 horas após a realização da transferência seguinte, e armazenado em freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o envio para sequenciamento. As informações taxonômicas, obtidas após a seleção microbiana por extinção, são comparadas com as informações taxonômicas do microcosmo inicial (1ª geração), permitindo, com o cruzamento dos dados, identificar quais gêneros microbianos

permaneceram no sistema e quais não se desenvolveram. Desta forma, é possível restringir o número de gêneros envolvidos no processo de biodegradação da anilina.

### **3.5 Experimento com as CSR e CEP**

Os resultados promissores reportados na literatura quanto ao uso de microrganismos de áreas contaminadas para degradar compostos de interesse, motivou a coleta e utilização das culturas provenientes de sedimento de rio (CSR) e de efluente da indústria petroquímica (CEP) em ensaios de biodegradação de anilina. Esse novo experimento foi realizado também em microcosmos, monitorados em triplicata, montados nas condições previamente descritas no tópico 3.2. O objetivo foi primeiramente investigar se todas as culturas eram aptas a degradar anilina em ambiente anaeróbio, e posteriormente avaliar comparativamente o desempenho cinético na degradação da anilina por cada cultura.

#### *3.5.1 Experimento 4: Ensaio de biodegradação anaeróbia de anilina, utilizando culturas microbianas de diferentes origens.*

Para essa investigação monitoramos a concentração de anilina, catecol e ácido benzóico por um período de 210 dias. Em um segundo momento foram avaliadas as diferenças e semelhanças taxonômicas entre as culturas CET, CSR e CEP através da extração de DNA e sequenciamento das regiões V3/V4 do 16S rRNA. As amostras de DNA foram coletadas antes de inocular os microcosmos (condição natural das culturas) e ao final do ensaio de biodegradação, quando os microrganismos estavam adaptados ao uso da anilina como única fonte de carbono. Todo o processo das análises de biologia molecular está descrito nos tópicos Extração e sequenciamento do DNA<sup>3.6</sup> e <sup>3.7</sup>. As condições de operação desse experimento estão sumarizadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Condições iniciais dos microcosmos no experimento 4.

Composição	AN-CET	AN-CSR	AN-CEP
	Efluente. têxtil	Sedimento de rio	Efluente petroquímico
	Anaeróbio (Padrão)		
Anilina (mg/L)	2,79	2,79	2,79
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> endogênico (mg/L)	41*	37*	84*
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	0	11*	0
Inóculo (mg SSV/L)	0,8	0,8	0,8
pH inicial	7.7	7.6	7.3

Fonte: O Autor (2020).

\*Concentração média endogênica do inóculo

### 3.6 Extração e sequenciamento do DNA

As extrações de DNA foram realizadas com a utilização do kit de extração *Kit PowerSoil*<sup>®</sup> (Mo Bio Laboratories Inc. Carlsbad, CA), segundo o protocolo do fabricante. O volume de amostra de biomassa coletado dos microcosmos variou de 0,25 à 0,5 g, de acordo com o que foi possível recuperar dos microcosmos. Após extração, o DNA purificado passava por verificação de sua concentração em espectrofotômetro (NanoDrop 2000 - Thermofischer<sup>®</sup>), nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm, que indicam a pureza do DNA. Todas as amostras de DNA utilizadas nessa pesquisa apresentaram concentração acima 12 ng/μL, consideradas adequadas para serem sequenciadas em plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS).

A plataforma escolhida foi a Illumina Miseq, utilizando o método de análise metabarcoding, que permitiu acessar as informações genéticas da região 16S do DNA extraído. As condições de sequenciamento foram estabelecidas para 50 mil reads, com 300 pares de base cada. O par de primer utilizado foi o 341F-806R, que apresenta uma vasta cobertura taxonômica para bactérias e arqueias (TAKAHASHI et al., 2014). O serviço de sequenciamento foi prestado pela empresa *Neoprosecta Microbiome Technologies* (Florianópolis – SC, Brasil), seguindo protocolo descrito por (CHRISTOFF et al., 2017). Todas as sequências serão depositadas em um banco de dados públicos e terá o código de acesso divulgado nas futuras publicações deste trabalho.

### 3.7 Análises estatísticas e de bioinformática

Para as análises de estatística descritivas simples (médias, desvio padrão, mediana, etc...) e elaboração de tabelas e gráficos foi utilizado o software Excel (v.2016, Microsoft<sup>®</sup> -

EUA) sem nenhum plugin adicional. Já para as análises cinéticas foi utilizado o software Origin Pro (v9.5, OriginLab Corporation® - EUA). Os coeficientes cinéticos foram obtidos por ajuste exponencial de ordem 1, com número de iterações necessárias para o melhor ajuste da curva ( $R^2$  próximo de 1).

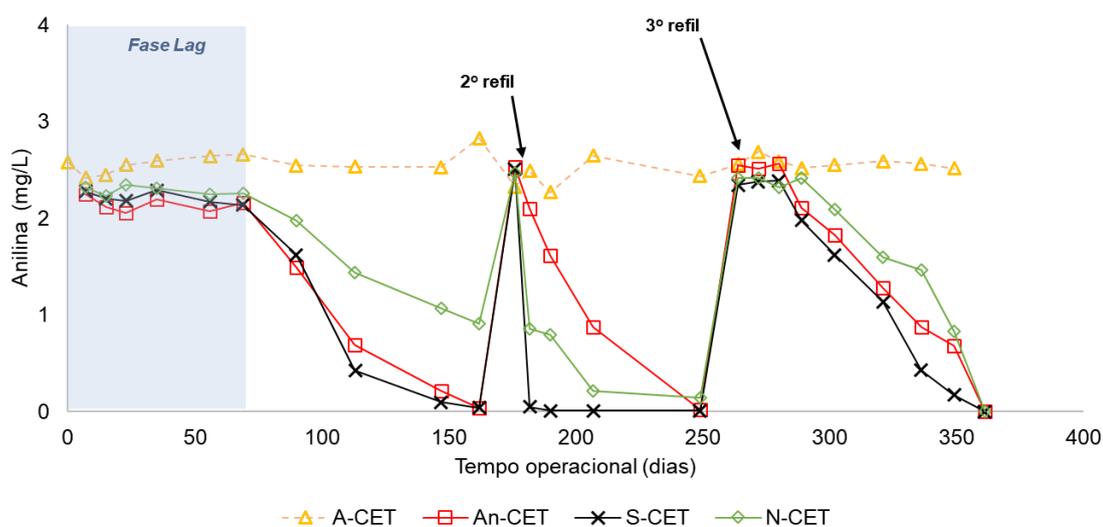
Quanto a análise de bioinformática dos dados brutos recebidos após o sequenciamento, o mesmo foi feito utilizando o servidor de análises genômicas MG-RAST ([www.mg-rast.org](http://www.mg-rast.org)), que disponibiliza interface gráfica com as ferramentas necessárias para realizar a filtragem inicial dos dados (remoção de singletons e quimeras, alinhamento e comparação com banco de dados). O banco de dados utilizado para identificação taxonômica foi o *Ribosomal Database Project* (RDP) (WANG et al., 2007), bastante conhecido por disponibilizar uma base de dados acurada na identificação de sequências 16S rRNA. A elaboração dos gráficos e cálculos de diversidade microbiana foram feitos com auxílio dos softwares Excel (v.2016, Microsoft® - EUA) e STAMP® Bioinformatic software (PARKS; BEIKO, 2010).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Experimento 1: Comportamento cinético e influência dos íons $\text{NO}_3^-$ e $\text{SO}_4^{2-}$

A remoção de anilina foi observada nos microcosmos An-CET, N-CET e S-CET, após uma fase lag de aproximadamente 70 dias (Figura 15). O teste de biodegradação durou 361 dias, tempo necessário para investigar a cinética de remoção de três realimentações de anilina (2,8 mg/L). O controle abiótico não apresentou remoção de anilina durante toda fase operacional, eliminando as hipóteses de remoção da anilina por reação química com compostos do meio basal, contaminação por oxigênio e de adsorção ao material do frasco dos microcosmos.

Figura 15 - Valor médio da concentração de anilina medida nas triplicatas An-CET, S-CET e N-CET ao longo do tempo operacional.



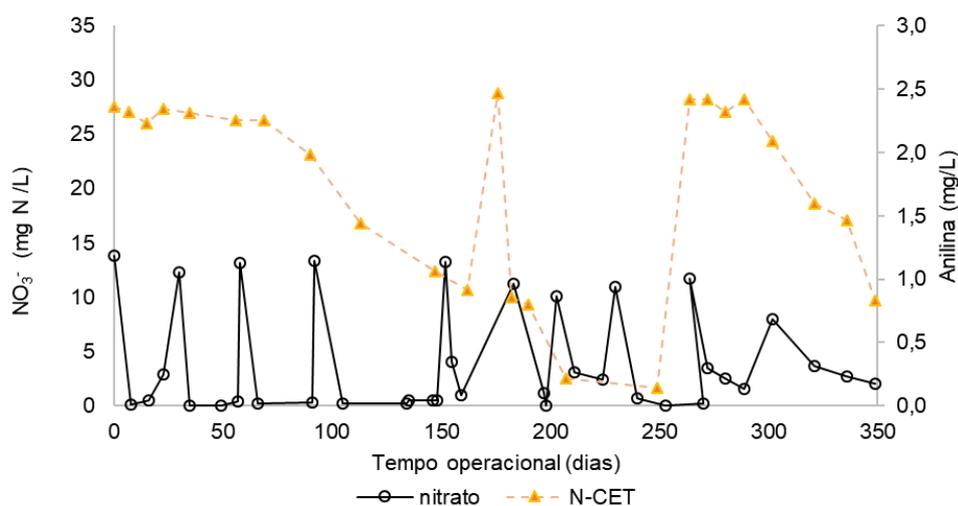
Fonte: O Autor (2020).

#### 4.1.1 Influência dos íons nitrato e sulfato na remoção da anilina

A triplicata de microcosmos N-CET que foi alimentada inicialmente com 50 mg/L de nitrato de potássio (equivalente a 17,5 mg de N/L) foi a condição que apresentou cinética de degradação mais lenta. O nitrato adicionado com objetivo de atuar comoceptor final de elétrons era consumido em períodos de aproximadamente 7 dias (Figura 16). Sempre que totalmente consumido a concentração inicial era repostaa fim de manter o sistema sempre com a disponibilidade desse íon.

É notável que o perfil de remoção de anilina não apresenta correlação com o consumo de nitrato medido na condição N-CET. A maioria dos trabalhos (KAHNG; KUKOR; OH, 2000; O'NEILL et al., 2000; SUN et al., 2015) onde o nitrato foi utilizado como acceptor final de elétrons, reportam correlação da remoção de anilina com o uso de nitrato, resultando em maiores taxas de degradação em comparação com condições sem aceptores finais de elétrons. Essa afirmação é facilmente sustentada pelo seu alto potencial oxidante (+433 mV), que comparado com outros aceptores comuns na natureza, por exemplo o próprio sulfato (-200 mV) torna-se preferível para boa parte dos microrganismos. Entretanto, neste trabalho o nitrato não demonstrou efeito positivo na remoção de anilina. O rápido consumo do nitrato nas sucessivas realimentações sugere que este íon foi utilizado em outras rotas metabólicas paralelas à biodegradação da anilina, onde fontes endógenas devem ter atuado como doadores de elétrons para a desnitrificação.

Figura 16 - Comparação do perfil da concentração de anilina e do consumo de nitrato durante o tempo operacional.



Fonte: O Autor (2020).

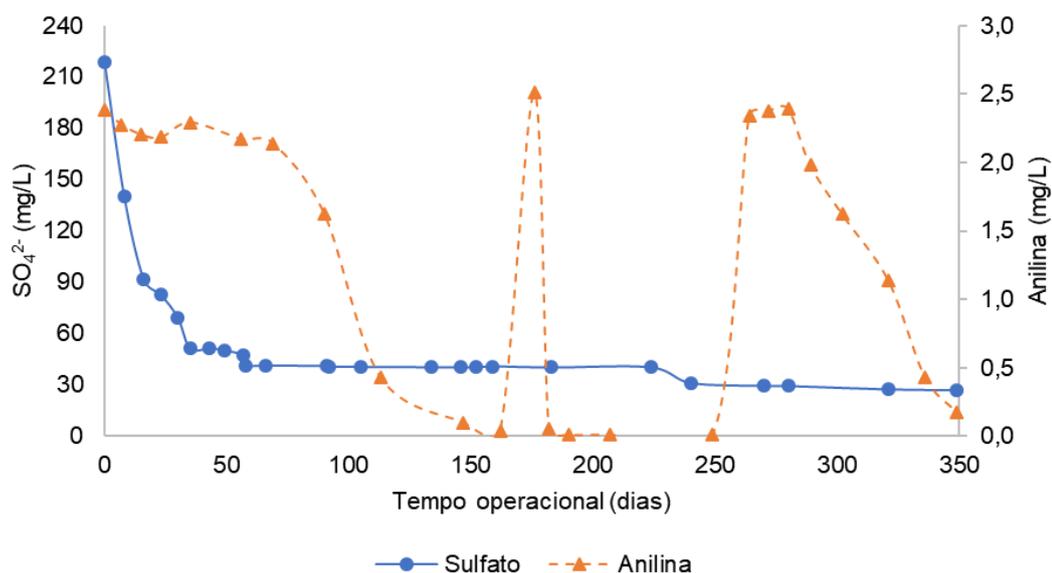
Avaliando desta vez a influência do íon sulfato utilizado no microcosmo S-CET (180 mg de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L), observa-se que a cinética de remoção de anilina foi mais rápida nesta condição em comparação com as demais (Tabela 7), especialmente durante as duas primeiras alimentações. Este comportamento poderia indicar que a intenção de utilizar o sulfato como acceptor final de elétrons no processo de degradação teria funcionado.

Contudo, algumas observações merecem destaque: 1. O consumo do sulfato iniciou antes mesmo da fase lag observada no perfil de anilina ter sido encerrada (dia 69 – Figura 17); 2. O teor de sulfato se estabilizou em torno de 40 mg/L, sem que tenha havido degradação deste quando a anilina foi degradada e 3. Na última alimentação as constantes de velocidade apresentaram valores similares para as três condições testadas. Destaca-se que no início do teste de biodegradação a concentração de sulfato medida foi igual a 218,4 mg/L, quando 180 mg/L foram adicionados externamente. Ou seja, como o meio basal foi preparado sem nenhum composto a base de sulfato, 38,4 mg/L de sulfato devem ter sido provenientes do inóculo, que apresentava características sulfetogênicas, oriundo de reator anaeróbio alimentado com 250 mg/L de sulfato.

Fonte: O Autor (2020).

Quando a anilina começou a ser removida na triplicata S-CET, 81% do sulfato inicial já havia sido consumido a uma velocidade de  $k = 0,075 \text{ d}^{-1}$ , e coincidentemente após a fase lag no perfil da anilina, o consumo de sulfato passou a ser muito lento. Esse comportamento

Figura 17 - Comparação do perfil da concentração de anilina e do consumo de sulfato durante o tempo operacional.



levanta a hipótese de que havia a presença endogênica de alguma fonte de elétrons (matéria orgânica residual), energeticamente mais favorável que a anilina, suportando a redução de 180 mg/L de sulfato. Antes de ser utilizada neste trabalho a CET era alimentada com amido de milho a uma concentração correspondente a DQO de 1g de  $\text{O}_2/\text{L}$ , que poderia ter um residual presente mesmo após a lavagem do inóculo no início do experimento. Uma vez cessado o fator endogênico de um possível substrato residual, a anilina passou a ser a única fonte de

carbono disponível no meio (em torno do dia 56) prosseguindo para uma fase de adaptação da microbiota e início da remoção da anilina no dia 69.

De acordo com os estudos de Heider e Fuchs (1997), seria necessário 3,75 mols de sulfato para cada mol de anilina consumido seguindo as equações 3 e 4, o que neste experimento significa que, as três alimentações de anilina ( $\approx 9$  mg/L) conjuntamente demandariam  $\approx 34,8$  mg/L de sulfato, sendo 11,6 mg/L para cada alimentação de anilina. A concentração de sulfato medida durante todo experimento sempre esteve em quantidade suficiente para atender essa relação estequiométrica, teoricamente suportando a quantidade de elétrons provenientes da biodegradação da anilina.



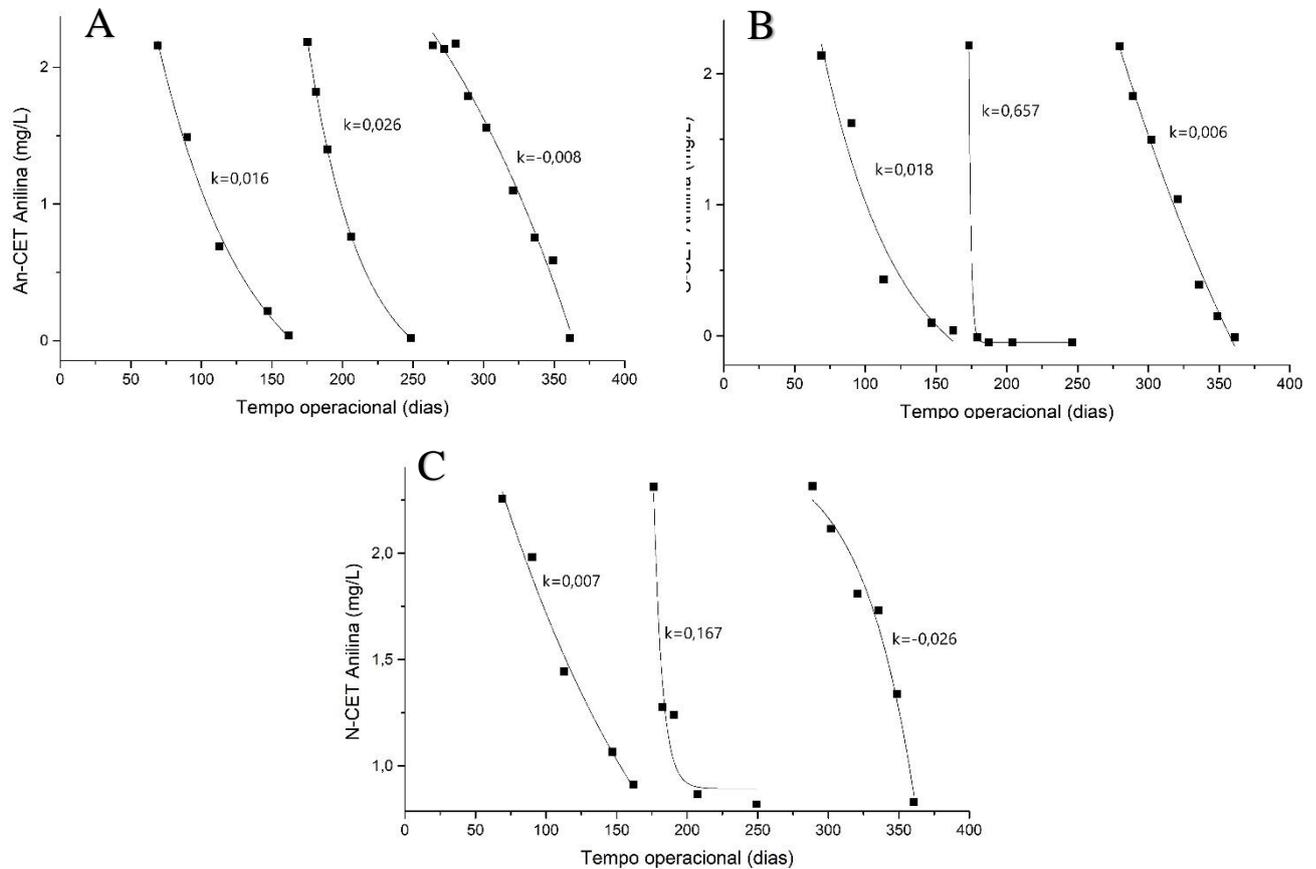
Nos demais microcosmos An-CET e N-CET, apesar de não terem recebido alimentação de sulfato, o monitoramento dos íons presentes em sua composição indicou que, no início do experimento, ambos continham concentração de sulfato de 41 e 62 mg/L respectivamente, proveniente do inóculo. Vale ressaltar que essa cultura foi coletada de um ambiente sulfetogênico (AMARAL et al., 2014b). Com relação ao íon nitrato, o mesmo não apresentou nenhum nível de endogenia nas condições testadas.

#### 4.1.2 Aspectos cinéticos da degradação da anilina

Na primeira alimentação os microcosmos An-CET e S-CET apresentaram constantes de velocidade semelhantes,  $k=0,016 \text{ d}^{-1}$  e  $0,018 \text{ d}^{-1}$  respectivamente, enquanto N-CET apresentou um comportamento mais lento  $k=0,007 \text{ d}^{-1}$

Na segunda alimentação as cinéticas de remoção de anilina foram mais rápidas (Figura 18) o que sugere adaptação da microbiota ao ambiente anaeróbio, que continha anilina como única fonte de carbono. Destaca-se a cinética de remoção apresentada pelo microcosmo S-CET, no qual a anilina foi totalmente removida em um período de 7 dias, enquanto nos microcosmos An-CET e N-CET, 60 e 24 dias foram necessários, respectivamente, para se atingir 90% de remoção da anilina na segunda realimentação.

Figura 18 - Comportamento cinético dos microcosmos An-CET (A), S-CET (B) e N-CET (C), ajustados para cinética de primeira ordem.



Fonte. Autor (2020).

Tabela 7 - Constantes de velocidade e  $R^2$  obtidos nos ajustes cinéticos de primeira ordem.

Realimentações		An-CET	N-CET	S-CET
1 <sup>a</sup>	<b>k (dia<sup>-1</sup>)</b>	0,016	0,007	0,018
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,988	0,978	0,911
2 <sup>a</sup>	<b>k (dia<sup>-1</sup>)</b>	0,027	0,167	0,657
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,999	0,905	0,999
3 <sup>a</sup>	<b>k (dia<sup>-1</sup>)</b>	-0,008	-0,026	0,006
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,979	0,968	0,985

Fonte: O Autor (2020).

Já na última alimentação de anilina (3<sup>o</sup> realimentação - Figura 18) o comportamento cinético foi diferente das demais alimentações. As curvas ajustadas apresentaram concavidade para baixo nos microcosmos N-CET e S-CET, resultando nas constantes de velocidade  $k = -$

0,008 d<sup>-1</sup> e -0,026 d<sup>-1</sup> respectivamente. Segundo Schmidt, Simkins e Alexander (1985) a concavidade da curva de biodegradação de qualquer substrato pode ser associada ao crescimento celular dos gêneros envolvidos no processo. O comportamento de concavidade voltada para baixo (como na 3ª realimentação) geralmente se relaciona a um aumento da microbiota especializada (biomassa) em degradar o substrato. O caso contrário (concavidade para cima) pode indicar que o processo está ocorrendo sem que haja crescimento celular de microbiota especializada, ou até mesmo que o processo seja co-metabólico, em que o composto alvo pode atuar como co-substrato, mediador redox ou acceptor final de elétrons. Aliada à mudança de concavidade no comportamento cinético após a terceira alimentação, houve o surgimento de uma nova fase lag (16 dias) antes que qualquer remoção de anilina fosse detectada. Essas observações podem ser reflexo de alguma mudança ambiental nos microcosmos, seja pela depleção de algum agente endogênico que estava presente no inóculo, ou simplesmente pela adaptação da microbiota resultando em um rearranjo das rotas metabólicas envolvidas na degradação da anilina.

Por se tratar de um ensaio de biodegradação de um composto aromático em ambiente estritamente anaeróbio, é esperado que o número de microrganismos com potencial enzimático capaz de realizar essa tarefa, seja muito restrito. Conseqüentemente, o crescimento celular lento justifica o tempo requerido para degradação completa das injeções subsequentes, que variou entre 67 e 88 dias, com exceção da segunda realimentação no microcosmo S-CET (7 dias).

#### *4.1.3 Análise da comunidade microbiana dos microcosmos An-CET, S-CET e N-CET*

A estrutura da comunidade microbiana presente nos microcosmos An-CET, S-CET e N-CET foi acessada através do sequenciamento do 16S rRNA, que permitiu visualizar a taxonomia dos gêneros mais abundantes em cada condição ambiental testada. Ao todo foram sequenciadas quatro amostras, das quais, três amostras correspondem à condição final dos microcosmos após a remoção da terceira realimentação de anilina. A última amostra é referente a cultura CET utilizada para inocular os microcosmos, que representa o ponto inicial da dinâmica microbiana nesse experimento. Ao todo foram obtidas 45699 seqüências filtradas, variando de 7948 a 16290 por amostra. O índice de riqueza Chao1 indicou que a exposição à anilina nos microcosmos resultou em uma menor riqueza na microbiota dos microcosmos, se comparado com o inóculo CET. O mesmo acontece para o parâmetro diversidade medido pelo índice de Shannon (Tabela 8).

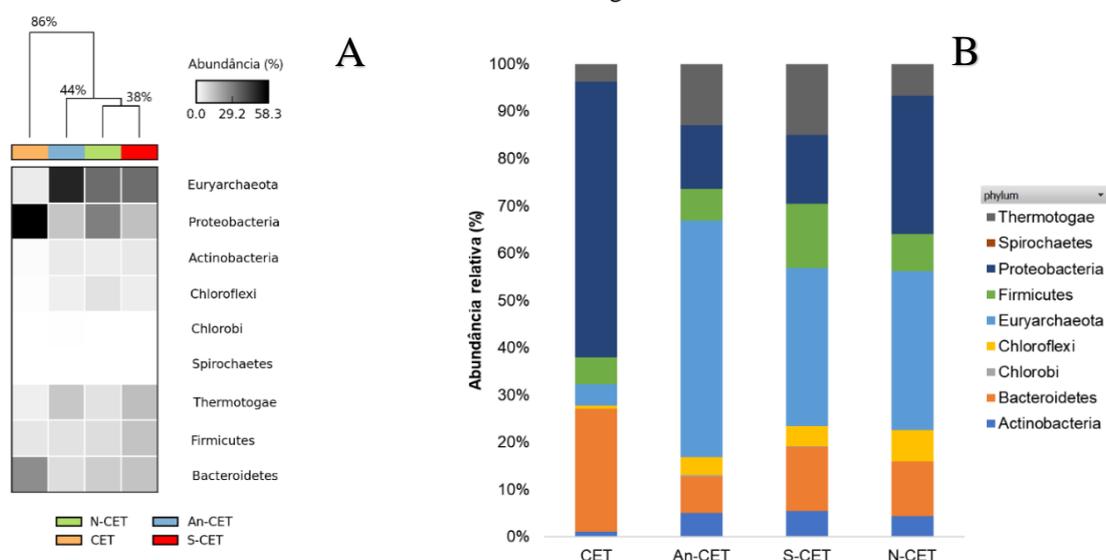
Tabela 8 - Índices de diversidade, dominância e riqueza calculados para as amostras sequenciadas.

Parâmetro	Biomassa			
	CET	An-CET	S-CET	N-CET
<b>Número de sequências</b>	16290	11205	7948	10256
<b>Índice de dominância D</b>	0,1846	0,2543	0,152	0,1885
<b>Índice de Simpson 1-D</b>	0,8154	0,7457	0,848	0,8115
<b>Coeficiente de ShannonH</b>	2,403	2,048	2,386	2,115
<b>Índice de Berger-Parker</b>	0,384	0,472	0,3099	0,3242
<b>Índice Chao1</b>	52	36	40	33

Fonte: O Autor (2020).

Em aspectos gerais houve predominância dos filos *Proteobacteria*, *Euryarchaeota*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* em todas as amostras (Figura 19 A e B), com destaque para o filo *Euryarchaeota*, o mais abundante nos microcosmos, e para o filo *Proteobacteria*, que foi o mais abundante no inóculo (CET).

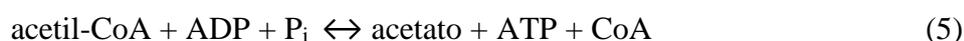
Figura 19 - Composição taxonômica a nível de filo nas amostras CET, An-CET, S-CET e N-CET: (A) Heatmap mostrando a abundância relativa e distância filogenética (UPGMA) entre as amostras e (B) Abundância relativa mostrada em gráfico de barras.



Fonte: O Autor (2020).

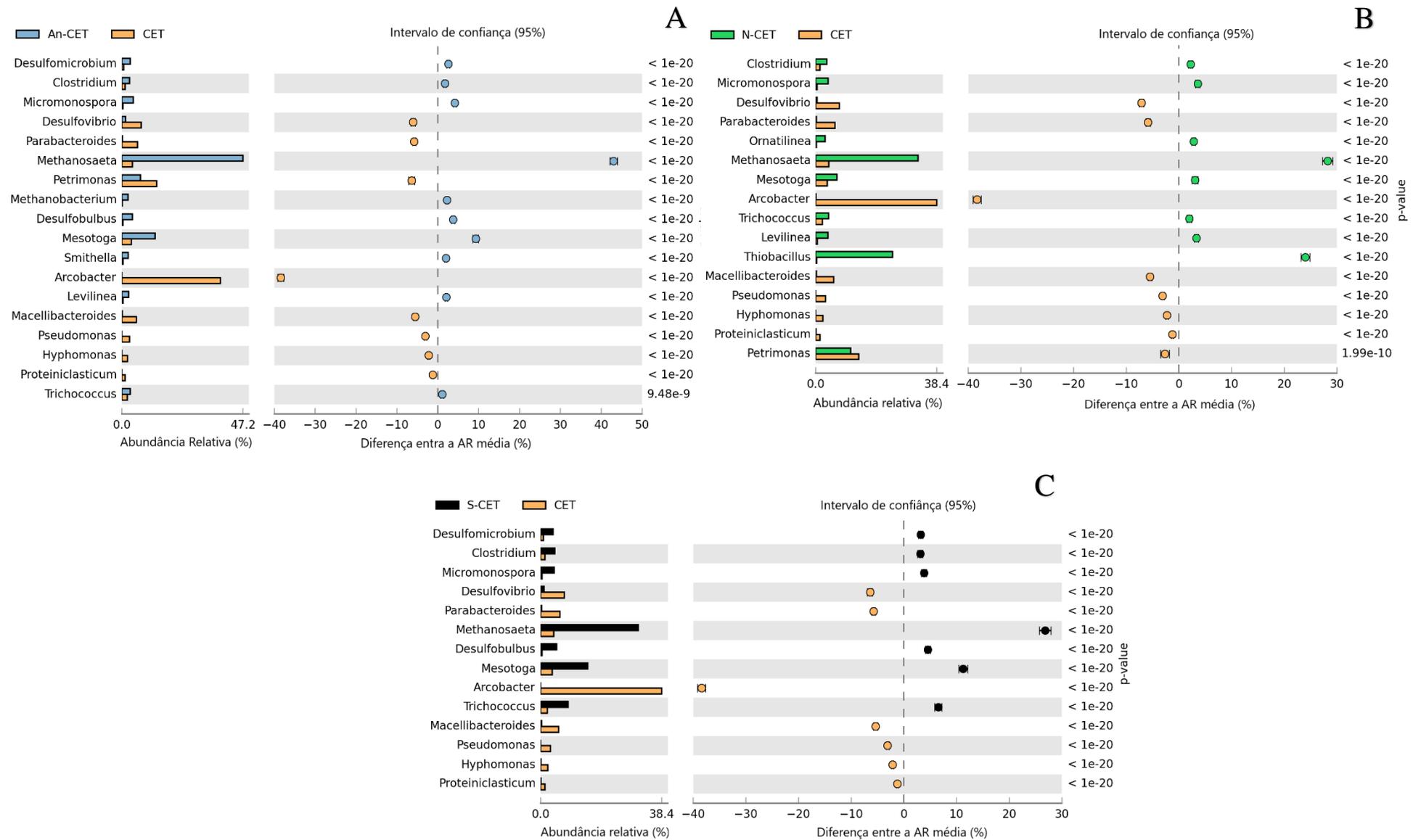
Analisando a nível de gênero, observamos que a estrutura taxonômica formada nas três condições testadas foi bem semelhante. O principal núcleo microbiano foi formado por bactérias redutoras de sulfato, representadas pelos gêneros *Desulfobulbus* (AR = 1,5-4,9%) e *Desulfomicrobium* (AR = 0,7-4,0%), bactérias fermentativas, representadas pelos gêneros *Trichococcus* (AR = 3,2-8,6%) e *Levilinea* (Ar = 2,0-3,8%), e por último o grupo das arqueias metanogênicas que foi fortemente representado pelos gêneros *Methanosaeta* (AR = 30-47%) e *Methanobacterium* (AR = 1,0-2,4%).

Analisando as Figuras 20 A, B e C, observamos que o gênero *Methanosaeta* apresentou o maior crescimento em porcentagem se comparado aos demais gêneros microbianos alcançando uma AR = 47% no microcosmo An-CET. Esse gênero bastante conhecido utiliza acetato como principal fonte de obtenção de energia reduzindo-o a CH<sub>4</sub>. A única fonte de carbono injetada na montagem dos microcosmos foi a anilina, o que levanta a hipótese de que a endogenia do lodo deve ter tido participação importante na manutenção desse gênero na microbiota. No entanto, a detecção de *Methanosaeta* pode também indicar que a rota metabólica de degradação da anilina tenha levado à formação de acetato, seja pela formação de AGVs após a quebra do anel benzênico ou pela conversão do acetil-CoA a acetato. O acetil-CoA é o produto final de muitas rotas de obtenção de energia para células microbianas, entretanto, também pode ser convertido a acetato dependendo do equilíbrio químico da reação, conforme a Equação 5. Isso só seria possível na presença de gêneros microbianos com capacidade de produzir a enzima acetyl-CoA sintetase (ACD), geralmente presente em algumas arqueias halofílicas, que não foram detectadas na cultura CET. (BRÄSEN; SCHÖNHEIT, 2004).



Um outro gênero que merece destaque pela elevada AR apresentada durante seu desenvolvimento nos microcosmos foi o gênero *Thiobacillus*, que foi identificado apenas na triplicata N-CET, com AR = 24% (Figura 20B). A maioria das espécies desse gênero quimioautotrófico cresce através da oxidação de tiosulfato e enxofre elementar associado à redução de nitrato como acceptor de elétrons. O desenvolvimento desse gênero na triplicata N-CET explica o motivo pelo qual o nitrato adicionado (discussão do tópico 4.1.2) foi desviado da rota da anilina, não tendo sido utilizado como acceptor de elétrons para degradação da anilina. Outra informação que sustenta essa hipótese está no trabalho de Amaral et al. (2014b), que operou reator anaeróbico tratando efluente têxtil com elevador teor de sulfato, origem da cultura CET utilizada nesse experimento, e verificou alta produção de material precipitado em seu reator, caracterizado pelos autores como enxofre elementar (98%) produzido por essa cultura. Boa parte desse precipitado poderia estar ainda presente na biomassa, sendo a fonte de elétrons para o gênero *Thiobacillus*.

Figura 20 - Variação da AR dos gêneros com abundância AR > 1%, encontrados nos microcosmos: (A) Comparação entre as amostras An-CET e CET; (B) entre as amostras N-CET e CET; (C) entre S-CET e CET.



Fonte: O Autor (2020).

Os gêneros microbianos *Mesotoga*, *Ornatilinea*, *Petrimonas* e *Levilinea* apresentaram um crescimento significativo dentro dos microcosmos contendo anilina, conforme pode ser visto na tabela 9. Alguns trabalhos na literatura apontam esses gêneros como participantes diretos ou indiretos na degradação de compostos aromáticos, e geralmente são encontrados em ambientes contaminados por esses poluentes. Os pesquisadores Van der Waals et al. (2017) evidenciaram em seu trabalho a presença de espécies da família *Anaerolineaceae* como os que mais se desenvolveram dentro de um reator anaeróbico com ambiente desnitrificante utilizado para degradar benzeno por via de carboxilação e formação de benzoato. Estão classificados dentro da família *Anaerolineaceae*, os gêneros *Ornatilinea* e *Levilinea*, que apresentaram crescimento nos microcosmos contendo anilina. Na pesquisa de Sun et al. (2015) espécies da família *Anaerolineaceae* encontradas em sedimentos contaminados apresentaram incorporação do carbono  $^{13}\text{C}$  (isotopo) marcado na anilina em seu DNA, indicando a participação dessas espécies na degradação anaeróbia de anilina.

Tabela 9 - Gêneros microbianos que apresentaram AR maior que 1%, em pelo menos uma das amostras.

Gêneros	CET	An-CET	S-CET	N-CET
Arcobacter	38.4%	0.0%	0.0%	0.0%
Clostridium	1.4%	3.1%	4.5%	3.6%
Desulfobulbus	0.4%	4.1%	5.0%	1.5%
Desulfococcus	1.1%	0.4%	0.4%	0.1%
Desulfomicrobium	0.8%	3.4%	4.0%	0.7%
Desulfovibrio	7.5%	1.5%	1.1%	0.4%
Hyphomonas	2.3%	0.1%	0.1%	0.0%
Levilinea	0.5%	2.6%	2.0%	3.8%
Macellibacteroides	5.7%	0.1%	0.3%	0.2%
Mesotoga	3.7%	13.0%	14.9%	6.7%
Methanobacterium	0.2%	2.4%	2.0%	1.0%
Methanosaeta	4.1%	47.2%	31.0%	32.4%
Micromonospora	0.4%	4.5%	4.2%	4.0%
Ornatilinea	0.2%	1.2%	2.2%	2.9%
Parabacteroides	6.1%	0.3%	0.4%	0.2%
Petrimonas	13.7%	7.3%	12.8%	11.0%
Proteiniclasticum	1.3%	0.1%	0.1%	0.1%
Pseudomonas	3.1%	0.1%	0.0%	0.0%
Smithella	0.5%	2.5%	1.0%	0.6%
Thiobacillus	0.3%	0.0%	0.0%	24.4%
Trichococcus	2.1%	3.3%	8.7%	4.1%

Fonte: O Autor (2020).

Quanto ao gênero *Mesotoga*, especificamente as espécies *M. infera* e *M. prima* que se desenvolveram nos microcosmos apresentando AR entre 4,9-11,2% e 1,8-4,6% respectivamente, foram isoladas pela primeira vez em sedimentos utilizados em microcosmos

contendo o composto aromático clorado 2,3,5,6-tetrachlorobiphenyl (ZHAXYBAYEVA et al., 2012). Segundo as informações armazenadas no banco genético *GenBank* (GenBank, 2020), acessadas através da plataforma Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), o gênero *Mesotoga* apresenta alguns genes codificados para atuar na degradação anaeróbia do benzoato através da clivagem do anel por beta oxidação (KANEHISA; GOTO, 2000). Essa informação sugere que esse gênero possa estar relacionado com a rota metabólica de degradação da anilina, uma vez que o benzoato é o metabólito intermediário central na degradação anaeróbia de compostos aromáticos monocíclicos, como a anilina (rota descrita no tópico 2.2).

A taxonomia identificada através das análises genômicas do 16S rRNA foi condizente com o comportamento físico-químico e cinético apresentados no tópico anterior. A presença de gêneros metanogênicos e gêneros desnitrificantes, refletiram também na análise da composição do gás presente no headspace dos microcosmos testados. A proporção dos gases identificados no headspace dos microcosmos An-CET, N-CET e S-CET apresentaram quantidade significativas de metano, fato esperado devido a presença do gênero *Methanosaeta*. Já a presença do gênero *Thiobacillus* com AR > 20% em N-CET proporcionou um aumento na quantidade de N<sub>2</sub> no headspace dessa condição, fato não observado nas demais condições como pode ser visto na Tabela 10. O aumento da quantidade de N<sub>2</sub> foi promovido pela redução do nitrato injetado como acceptor de elétrons na condição N-CET.

Tabela 10 - Composição do biogás no headspace em termos de metano, nitrogênio e gás carbônico, coletado após o consumo da terceira alimentação de anilina nos microcosmos.

Microcosmo	Gases		
	CH <sub>4</sub>	N <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
<b>An-CET</b>	6%	86%	8%
<b>S-CET</b>	5%	87%	8%
<b>N-CET</b>	2%	93%	5%
<b>Abiótico</b>	0%	88%	12%

Fonte: O Autor (2020).

Uma última observação pode ser feita quanto diminuição na abundância relativa do gênero *Arcobacter* que esteve presente no inóculo com AR = 38%, entretanto nos microcosmos não se desenvolveu ao ponto de não ser detectado entre os gêneros com AR>1%. Este gênero caracterizado por espécies anaeróbias aerotolerantes, geralmente se desenvolve utilizando açúcares (manitol, manose e outros) e ácidos carboxílicos (critato ou

malonato), tendo como possíveis aceptores de elétrons, nitrato ou oxigênio (ROALKVAM et al., 2015). No trabalho de Pérez-Cataluña et al. (2018), as condições de crescimento desse gênero são fortemente ligadas aos ambientes halofílicos, ressaltando que várias espécies necessitam de salinidade no meio para se desenvolverem. Este provavelmente foi o motivo da diminuição em sua AR nos microcosmos, um vez que saiu de um ambiente com salinidade elevada (2,9 mg/L - CARVALHO et al., 2020), para um meio nutritivo não halofílico.

#### **4.2 Experimento 2: Influência da glicose como co-substrato e verificação do efeito de adsorção na biomassa**

Após as análises moleculares realizadas no primeiro experimento, foi necessário realizar a mudança de todo aparato experimental para um novo laboratório. Em função disto, as culturas foram mantidas em geladeira por 60 dias. Além disso, no novo laboratório os experimentos passaram a ser executados dentro de uma câmara anaeróbia de acrílico do tipo Glove Box.

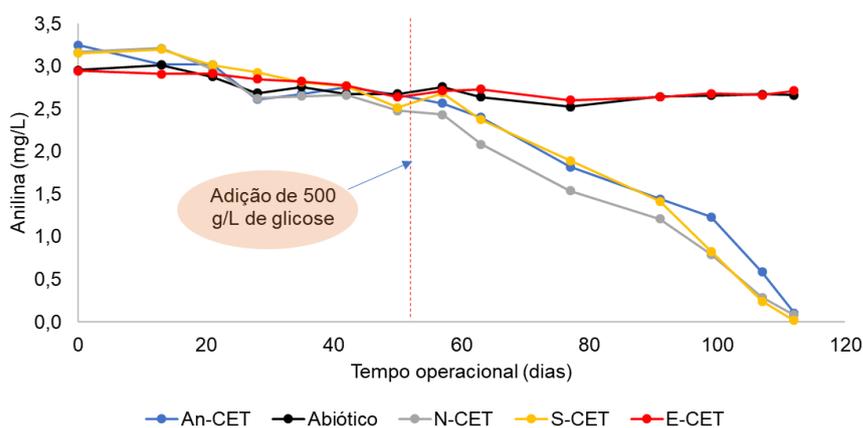
Foi decidido repetir mais uma alimentação de anilina nos microcosmos que foram utilizados no Experimento 1. Adicionalmente, foi acrescentada mais uma condição operacional na qual a cultura CET foi autoclavada e colocada em meio basal contendo anilina em concentrações análogas às encontradas nas demais condições.

Vale ressaltar que antes de iniciar este segundo experimento, o inóculo foi lavado por duas vezes com solução tampão fosfato-salino (1x PBS) contendo NaCl (137 mM – 8 g/L) Fosfato (10 mM - 0,93 g/L), KCl (2,7 mM - 0,2 g/L), e um pH de 7,4, com intenção de minimizar os efeitos endogênicos que estiveram bem presentes no experimento 1. Em nenhum momento da lavagem a cultura teve contato com a atmosfera, sendo sempre mantida em tubos selados com atmosfera N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.

O início deste novo teste de biodegradação foi marcado por um período de 50 dias onde não houve nenhum consumo de anilina. Este comportamento de inatividade levou à hipótese de que faltava algo, como algum co-substrato que possivelmente estava presente no inóculo antes da lavagem, para que o processo de degradação da anilina ocorresse. Por esta razão, decidiu-se injetar 500 mg/L de glicose nas condições An-CET, N-CET, S-CET e E-CET a fim de estimular a produção de ATP por outras rotas metabólicas, como também aumentar a disponibilidade de elétrons no meio. Desta forma analisou-se a dependência de um co-substrato para que a anilina fosse degradada. Na Figura 21 observa-se que três dias após a injeção de glicose nos microcosmos atividade na degradação de anilina foi observada nas

condições N-CET, An-CET e S-CET, com respectivas constantes de velocidade (k) iguais a -0,012, -0,025 e -0,024 ( $\text{dia}^{-1}$ ). A depleção da anilina aconteceu 55 dias após o início da remoção nas três condições bióticas

Figura 21 - Concentração de anilina monitorada nos microcosmos com indicação do ponto de injeção de glicose.



Fonte: O Autor (2020).

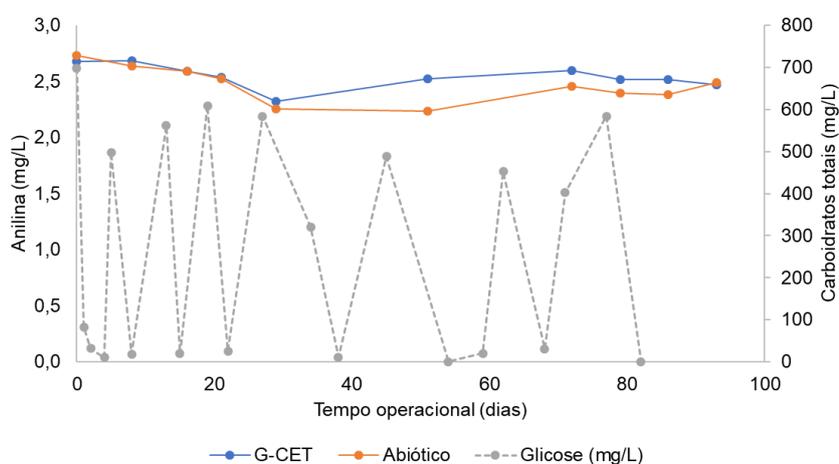
Não foi detectada nenhuma remoção de anilina na condição estéril E-CET, que apresentou um perfil cinético similar ao microcosmo abiótico. Nesse experimento foi possível verificar se houve a formação de catecol e ácido benzóico nos microcosmos onde ocorreu remoção de anilina. Durante os 110 dias de operação, em nenhum momento foi detectada a presença do intermediário catecol, conforme esperado. O catecol é geralmente formado a partir da ação das enzimas monoxigenases e dioxigenases que utilizam o oxigênio molecular disponível para atacar a estrutura aromática adicionando grupos hidroxila. Desta forma ocorre a diminuição da energia de ressonância do anel aromático permitindo a sua posterior clivagem (FUCHS; BOLL; HEIDER, 2011). Como os microcosmos foram mantidos em anaerobiose estrita, não houve disponibilidade de oxigênio molecular livre, impedindo a principal via de formação do catecol. Por outro lado, houve formação de ácido benzóico nas três condições bióticas An-CET (0,2 - 1,1 mg/L), N-CET (0,1 - 0,8 mg/L) e S-CET (0,1 - 0,93 mg/L).

Por se tratar de um metabólito intermediário na rota de degradação da anilina, o ácido benzóico é consumido rapidamente, não acumulando nos microcosmos, o que torna difícil verificar um comportamento cinético para esse composto. Entretanto, a confirmação de que o ácido benzóico foi formado a partir da degradação da anilina indica que a rota metabólica de

carboxilação e desaminação da molécula de anilina deve ter sido utilizada pelos microrganismos.

Os resultados do experimento 2, entretanto, levantou dúvida quanto a real influência da glicose adicionada no processo de degradação da anilina. Para responder esta questão uma nova triplicata de microcosmos foi montada e mantida com sucessivas alimentações de glicose (500 mg/L), repostas sempre que detectado seu consumo total (Figura 22).

Figura 22 - Valor médio da concentração de anilina e glicose medida como carboidratos totais, nos microcosmos G-CET.



Fonte: O Autor (2020).

Manter a disponibilidade de glicose no meio em concentrações próximas a 500 mg/L fez com que a remoção de anilina não acontecesse, anulando por completo a hipótese de que a glicose estaria atuando como co-substrato vital para o processo de biodegradação. Na pesquisa de Kahng, Kukor e Oh, (2000), a glicose (0,2 %) apresentou efeitos inibitórios na degradação de anilina (1 mM) ao ser testada como co-substrato, utilizando a cepa HY99 (*Delftia acidovorans* – similaridade de 96%). Através da medição de densidade óptica (OD 600 nm) os autores verificaram a ausência de crescimento celular dessas espécies quando na presença de glicose. Já, Schukat et al. (1983) não encontraram efeitos inibitórios na degradação de anilina (5 mM), ao utilizar glicose (500 mg/L) como co-substrato para a cultura identificada como *Rhodococcus sp.*, entretanto condições aeróbias foram mantidas pelos autores.

Os gêneros *Mesotoga* e *Petrimonas*, apontados como gêneros putativos no processo de biodegradação da anilina na CET (tópico 4.1.3), apesar de apresentarem ferramentas genéticas para utilização de compostos aromáticos como fonte de energia, seu mecanismo primário de crescimento é a fermentação de carboidratos, como a glicose. De fato, é plausível que a

disponibilidade de um substrato mais favorável tenha sido o motivo da não utilização da anilina nos microcosmos da Figura 22.

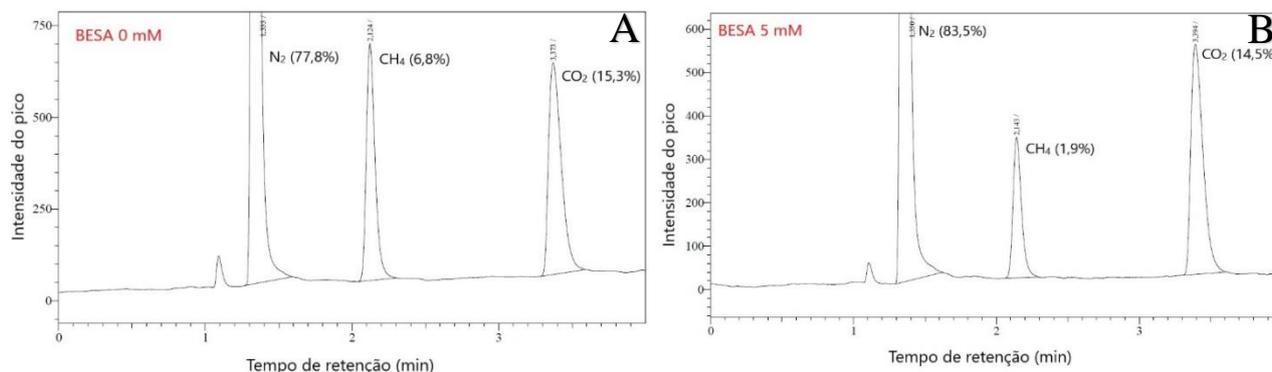
Desta forma, concluímos que a glicose não foi utilizada como co-substrato no experimento 2, mas estimulou o processo de degradação da anilina no experimento 2 (Figura 21), possivelmente aumentando a entropia, provendo elétrons, cofatores e coenzimas necessárias para iniciar a autosuficiência da rota de degradação da anilina.

O saldo deixado após a glicólise corresponde a duas moléculas de NADH, ATP, H<sup>+</sup> e H<sub>2</sub>O, para cada mol de glicose convertido a piruvato. O NADH e o ATP são importantes para diversas ações enzimáticas. No trabalho de Schnell e Schink (1991), foi provado que existe dependência de ATP e Mg<sup>+</sup> para que ocorra ação da enzima aminobenzoil-CoA-sintetase, responsável pela ativação do ácido 4-aminobenzóico formado após a carboxilação da anilina. A falta desses componentes interrompe a rota de degradação de anilina pela espécie *Desulfobacterium anilini*. Já os pesquisadores Lee, Bae e McCarty (2007) verificaram que era necessário ter um doador de elétron (acetato) para iniciar o processo de descloração reductiva do tetra-cloroeteno, que leva a formação do eteno como produto final. Os autores reportam que esse mecanismo se torna autossuficiente uma vez iniciado, não necessitando da suplementação de acetato, o que deve ter ocorrido no experimento 2.

### 4.3 Experimento 3: Ensaio de inibição da metanogênese e detecção de AGVs

Os resultados do pré-ensaio, responsável por identificar a concentração de BESA necessária para inibir a metanogênese, apontou que a concentração de 5 mM de BESA (1,05 g/L) foi suficiente para inibir 72% da produção teórica de metano formado a partir da degradação de 500 mg/L de glicose (Figura 23). Essa concentração de BESA, portanto, foi utilizada para inibir a metanogênese a partir da anilina, durante o período operacional na condição BESA-CET, sem necessidade de realimentação. O metano teórico produzido por 500 mg/L de glicose corresponde em massa a 12 mg de CH<sub>4</sub> (0,0183 dm<sup>3</sup> em condições padrão), enquanto 3 mg/L de anilina tem potencial teórico para formar 8,7.10<sup>-6</sup> mols de acetyl-CoA, que convertidos a acetato produziram apenas 0,139 mg de CH<sub>4</sub>.

Figura 23 - Cromatogramas contendo a proporção de N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> no headspace dos microcosmos contendo (A) 0 mM de BESA e (B) 5 mM de BESA. **Fonte:** Autor.

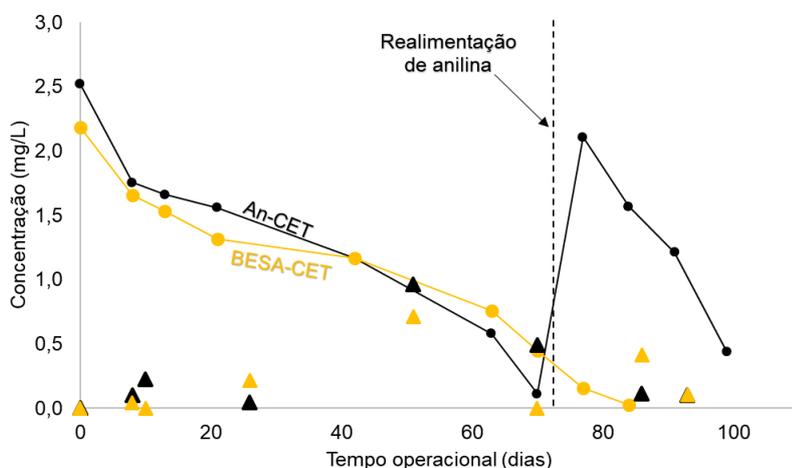


Fonte: O Autor (2020).)

A inibição da metanogênese pelo BESA não afetou a cinética de remoção da anilina, que na condição BESA-CET apresentou constante de velocidade igual a  $k = -0.024 \text{ d}^{-1}$ , ligeiramente inferior à constante de velocidade da condição An-CET ( $k = -0.029 \text{ d}^{-1}$ ), utilizada como comparação (Figura 24). Era esperado que a remoção da anilina não fosse afetada pela inibição da metanogênese pois a atuação do inibidor BESA está restrita à última etapa da rota de formação do metano onde a enzima metil-coenzima-M é capturada, impedindo assim a formação do metano. Contudo, todas as outras etapas precedentes na rota de degradação da anilina não são afetadas.

Quanto a análise dos ácidos graxos voláteis (AGV), sua medição foi realizada no final do experimento, quando a anilina já havia sido completamente consumida, no dia 70 em An-CET e no dia 84 em BESA-CET. A formação de acetato foi detectada em ambas as condições, contudo, em BESA-CET a concentração de acetato (1,69 mg/L) detectada foi cinco vezes maior que em An-CET (0,33 mg/L). Nenhum outro AGV foi detectado com exceção do propionato (0,12 mg/L -Tabela 11), detectado em BESA-CET. A metodologia para medição de AGV permite a detecção de ácidos graxos voláteis de até seis carbonos em sua estrutura.

Figura 24 - Perfil da concentração de anilina e formação de ácido benzóico (▲; ▲) detectados nos microcosmos An-CET e BESA-CET.



Fonte: O Autor (2020).

Tabela 11. Concentração dos AGV medidos nas condições BESA-CET e An-CET

AGV	(mg/L)	
	BESA-CET	An-CET
Etanóico	1,69	0,33
Propanóico	0,12	nd
Butanóico	nd	nd
Pentanóico	nd	nd
Hexanóico	nd	nd

Fonte: O Autor (2020).

A quantidade de acetato de 1,69 mg/L, detectada em BESA-CET, foi inferior à quantidade teórica estimada 5,72 mg/L, caso toda anilina injetada ( $\cong 3\text{mg/L}$ ) fosse convertida a acetato no final de sua rota metabólica. Entretanto, o fato de o acetato ter sido formado em condições anaeróbias estritas em que a anilina era a única fonte de carbono disponível, revela que é possível que os gêneros metanogênicos acetoclásticos se sustentem neste ambiente participando do processo de mineralização da anilina.

Os autores Sun *et al.* (2015), verificaram em ensaio anaeróbio com microcosmos estabelecidos para realizar metanogênese, que a anilina alimentada como única fonte de carbono foi removida após uma fase lag de 100 dias. Todavia, a produção de metano medida foi maior que o valor teórico esperado, sugerindo que havia uma parcela do metano produzido por endogenia, advinda do sedimento usado como inóculo. Já no trabalho de Liang *et al.* (2013) os autores conseguiram realizar a total mineralização do clorobenzeno para  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  ao combinar duas culturas especializadas no processo. De fato, existem indícios na literatura que suportam a hipótese de que consórcios metanogênicos podem realmente associar-se com rotas de degradação de compostos aromáticos.

Neste trabalho a presença dos gêneros *Methanosaeta* e *Methanobacterium* evidenciam que existe um consórcio metanogênico que consegue sobreviver em um ambiente onde apenas anilina está disponível como substrato. A quantidade de acetato detectada nos microcosmos BESA-CET e An-CET, pode indicar que uma parcela da anilina removida poderia ser

destinada à formação de acetato. Contudo, essa hipótese necessita de uma melhor investigação para ser provada.

#### **4.4 Seleção de microrganismos utilizando diluição a extinção**

Após a realização de todos os testes de biodegradação, os microcosmos da condição An-CET foram selecionados para aplicação da técnica de diluição a extinção. A técnica foi aplicada com transferências de 50% do volume útil total, que eram repassados para uma nova geração de microcosmos, contendo meio basal e anilina. Até o momento que esta tese foi concluída foi possível monitorar apenas três transferências seriadas, que terão seus resultados discutidos neste tópico. Vale ressaltar que não foram realizadas análises cinéticas nos microcosmos das transferências, pois nas últimas realimentações a quantidade de pontos amostrais não foram suficientes. Essa limitação ocorreu devido ao período de pandemia que limitou o acesso aos laboratórios da universidade onde essa pesquisa foi realizada.

A duplicata de microcosmos oriundos da primeira transferência foi chamada de T1-CET, e apresentaram bom desempenho na remoção de anilina em três realimentações consecutivas conforme mostrado na Figura 25A. O intervalo de tempo necessário para remover cada injeção de 3 mg/L de anilina foi em média  $43 \pm 4$  dias. A pequena variação entre os intervalos de tempo utilizados demonstrou certa estabilidade da cultura transferida na remoção de anilina.

A terceira geração de microcosmos, concebidos após a segunda transferência seriada (Figura 25B), continuou apresentando bom desempenho na remoção de anilina. Os intervalos de remoção apresentados em T2-CET foram ligeiramente mais curtos que os intervalos medidos em T1-CET, com média de 35 dias para cada realimentação de anilina. Uma observação a ser feita é a fase lag de 15 dias que ocorreu antes que qualquer remoção de anilina fosse detectada.

A terceira transferência não foi bem-sucedida quanto a remoção de anilina, os microcosmos T3-CET não apresentaram nenhuma atividade de remoção mesmo após uma espera de 120 dias. Este comportamento indica que durante a terceira transferência a rota de remoção da anilina, que estava bem estabelecida até então, foi interrompida pela retirada de parte da biomassa, ocasionando a exclusão de um ou mais gêneros importantes no processo. Essa afirmação baseia-se no fato de que as condições nutricionais impostas em cada transferência foram iguais, o que exclui a possibilidade de inibição da rota por falta de algum nutriente ou

substrato. Por ser a última geração de microcosmo capaz de remover anilina, o microcosmo T2-CET teve o DNA extraído de sua biomassa e sequenciado com o objetivo de verificar quais gêneros microbianos permaneceram após aplicação das duas diluições seriadas.

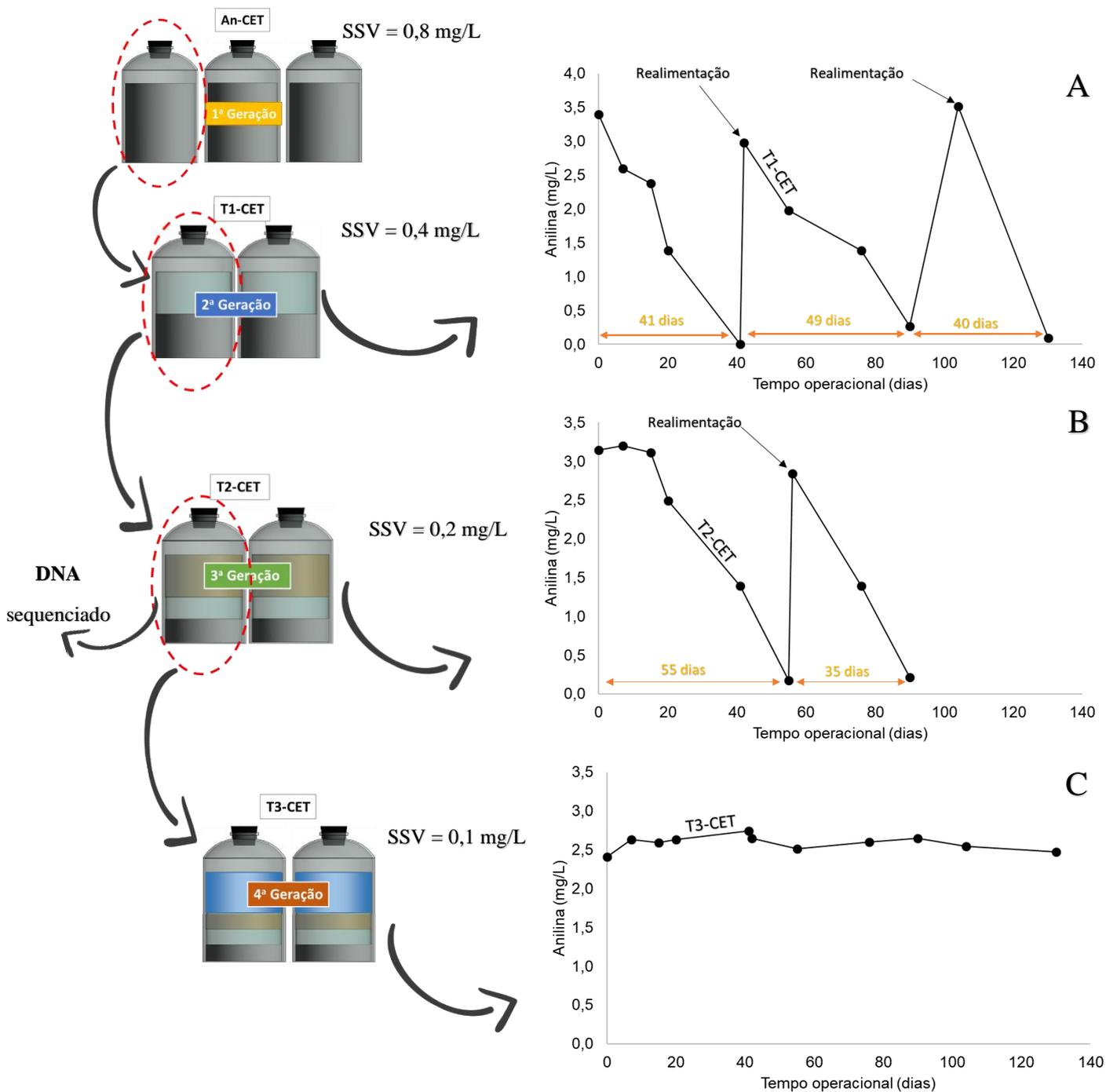
O número de gêneros microbianos foi reduzido drasticamente se comparado com os gêneros que estavam presente em An-CET (1ª geração). O núcleo microbiano foi composto por apenas sete gêneros os quais representam 94,34% de AR dentro da comunidade microbiana formada em T2-CET (Tabela 12).

Tabela 12 - Taxonômia das OTUs que apresentaram AR > 1% presentes na microbiota de T2-CET

<b>Espécies identificadas</b> (similaridade > 95%)	<b>T2-CET</b>	
	<b>Sequências</b>	<b>AR</b>
<i>Sulfuricurvum kujiense</i>	6653	72,97%
<i>Mesotoga prima</i>	1314	14,41%
<i>Desulfococcus multivorans</i>	177	1,94%
<i>Methanosaeta concilii</i>	173	1,90%
<i>Phenylobacterium haematophilum</i>	124	1,36%
<i>Clostridium ruminantium</i>	81	0,89%
<i>Thauera chlorobenzoica</i>	80	0,88%
	<b>AR total</b>	<b>94,34%</b>

Fonte: O Autor (2020).

Figura 25. Ilustração da sequência de transferências e seus respectivos perfis de remoção de anilina. O perfil foi construído com a média das duplicatas (A) T1-CET, (B) T2-CET e (C) T3-CET.



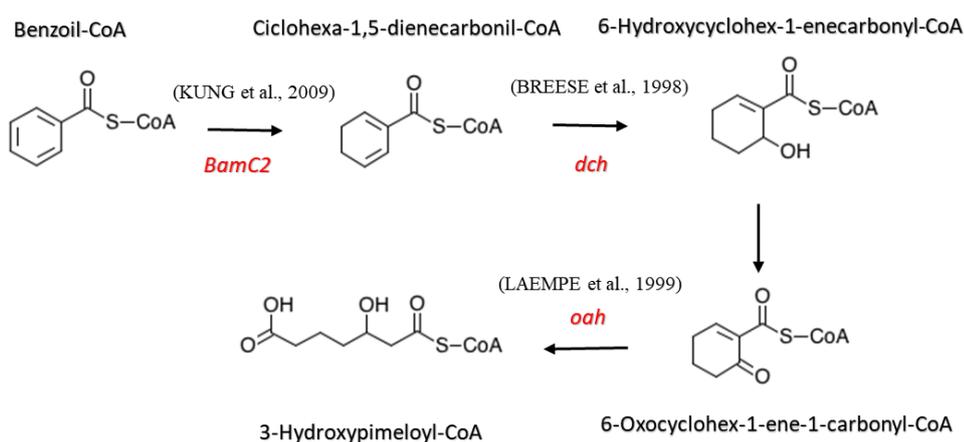
Fonte: O Autor (2020).

Neste grupo selecionado de gêneros microbianos, destaca-se a dominância do gênero *Sulfuricurvum* (AR = 72,9%), que está totalmente associado a mecanismos de oxidação de enxofre elementar, sulfeto e tiosulfato, liberando-os na forma de sulfato. Chama atenção o fato de que este gênero não esteve entre os gêneros mais significantes na microbiota de An-CET (discutido no tópico 4.1.3), contudo encontrou condições muito favoráveis após as

transferências. O segundo gênero mais abundante foi o gênero *Mesotoga* (AR = 14,4%), que neste trabalho é apontado como um dos generos putativos de atuar na degradação da anilina. As espécies desse gênero também estão associadas a oxiredução de compostos de enxofre, geralmente produzindo grandes quantidades de H<sub>2</sub>S a partir da oxidação de compostos de enxofre parcialmente reduzidos, como o tiosulfato (NESBØ et al., 2012; ZHAXYBAYEVA et al., 2012). Fechando o grupo relacionado aos compostos de enxofre está o gênero *Desulfococcus* que por sua vez obtém energia utilizando sulfato como acceptor final de elétrons, entretanto, é reportado em alguns trabalhos como gênero atuante na degradação de hidrocarbonetos aromáticos (RABUS et al., 2016; SHIN et al., 2019).

A degradação anaeróbia do composto benzoil-CoA, formado a partir da ativação do benzoato por uma coenzima-A, pode acontecer através da clivagem do anel aromático por via de beta oxidação (Figura 26). Essa via necessita geralmente da ação de quatro enzimas específicas. A espécie *Desulfococcus multivorans* (AR = 1,94%) possui três dos quatro genes utilizados neste processo, catalogados no banco de dados genômicos KEGG (KANEHISA; GOTO, 2000). Esses genes são identificados nos bancos genéticos como *BamC2* ou *BamB2* (codificam enzimas reductases), *dch* (codifica enzima hidratase), *oah* (codifica enzima hidrolase).

Figura 26. Clivagem do anel aromático do benzoil-CoA por via de beta oxidação. Em vermelho estão destacados os genes presentes no genoma da espécie *D. multivorans*.



Fonte: O Autor (2020).

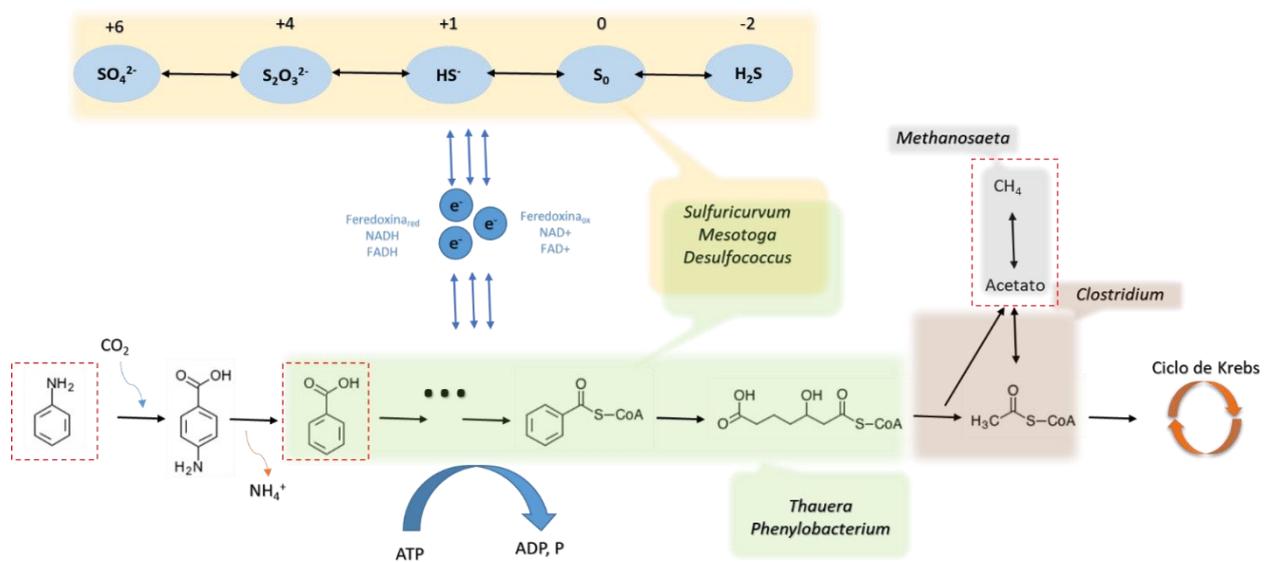
\* Baseado nos trabalhos de KUNG *et al.*, (2009), BREESSE *et al.*, (1998); LAEMPE; JAHN; FUCHS (1999).

No trabalho publicado recentemente por Li et al. (2020), foram utilizadas ferramentas metagenômicas para estudar a comunidade microbiana presente em reator do tipo *Expanded Granular Sludge Bed* (EGSB), utilizado para remover anilina em condição sulfetogênica (450 – 3600 mg/L de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). O que chama atenção é que a composição do núcleo microbiano

encontrado pelos autores se assemelha bastante com a microbiota identificada no inóculo de CET. O gênero *Thauera*, que esteve presente no inóculo deste trabalho (AR = ) e na cultura reportada por Li et al. (2020) possui seu genoma totalmente sequenciado (cod. ASM192230v1, GenBank). Segundo as informações da enciclopédia genômica KEGG, este gênero, que apresentou AR = 0,88% em T2-CET, possui genes necessários para realizar a biodegradação de tolueno, benzoato e fenol anaerobiamente (KANEHISA; GOTO, 2000). No artigo de Boll (2005), a capacidade do Gênero *Thauera* em degradar o benzoato é evidente através da produção da enzima benzoil-CoA reductase, que em reação dependente de ATP, recebe elétrons transportados pela ferredoxina, resultando na desaromatização do anel benzênico.

De alguma forma o consórcio microbiano formado em T2-CET, predominantemente relacionado a rota de oxirredução do sulfato, conseguiu se manter sem o fornecimento externo de nenhum composto de enxofre. Por se tratar de um experimento realizado em microcosmos operados sem troca de volume entre as realimentações e sem troca gasosa com o meio externo, é possível que os compostos de enxofre intrínsecos à cultura CET tenham apenas transitado entre as suas formas oxidadas e reduzidas sem perda para o meio externo na forma de H<sub>2</sub>S. Essa manutenção do ciclo do enxofre pode ser a chave para a transferência de elétrons que impulsionou a degradação da anilina neste trabalho (Figura 27). Avaliando essa hipótese, é provável que, após a terceira transferência com duas diluições prévias de 50%, a quantidade dos compostos de enxofre tenha diminuído no meio, a ponto de limitar a degradação da anilina, o que teria ocasionado o comportamento mostrado na Figura 25C. A concentração de sulfato e sulfeto não foi medida durante o monitoramento das transferências, não possibilitando a conclusão dessa hipótese. De qualquer forma, é possível afirmar que a degradação anaeróbia da anilina monitorada neste trabalho foi dependente de um consórcio microbiano, em que compostos do ciclo do enxofre desempenharam importante papel na cadeia transportadora de elétrons (Figura 27).

Figura 27 - Inferência dos possíveis metabolismos estabelecidos em T2-CET com base no potencial genético dos gêneros microbianos identificados.



Fonte: O Autor (2020).

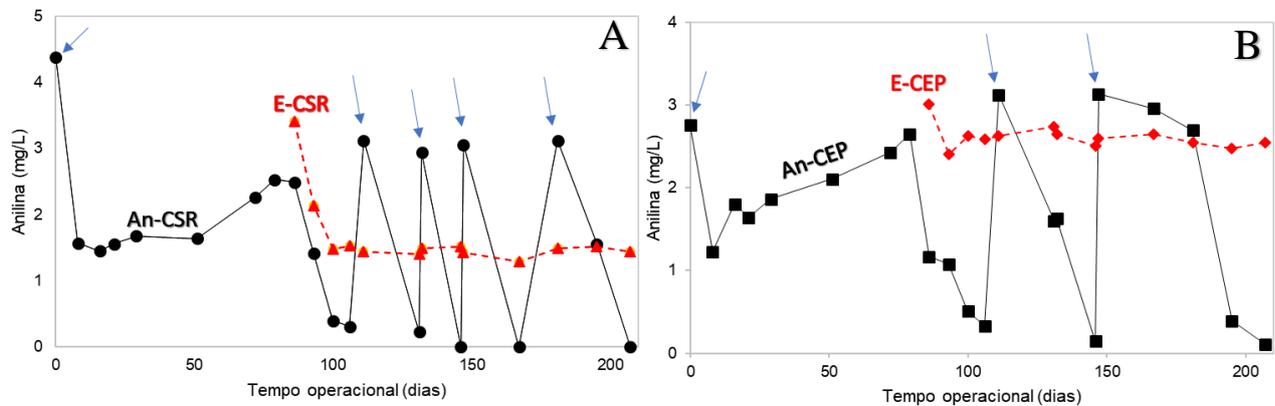
\*A linha tracejada vermelha indica os compostos detectados durante o monitoramento.

#### 4.5 Teste de biodegradação utilizando as culturas CSR e CEP

Após a realização de todos os ensaios de biodegradação com a cultura adaptada a partir de efluente têxtil (CET), iniciamos um último experimento, desta vez investigando se as culturas provenientes de sistema de tratamento de efluente petroquímico (CEP) e de sedimento de rio (CSR) também possuíam habilidade em degradar anilina, identificando as principais diferenças taxonômicas entre os três inóculos.

Os resultados obtidos no teste de biodegradação de anilina indicaram que ambas as culturas CSR e CEP apresentaram atividade na remoção de anilina, entretanto com diferentes perfis e diferentes intervalos de tempo para cada alimentação. As culturas foram monitoradas durante um período de 210 dias, suficiente para acompanhar o perfil de remoção de cinco realimentações de anilina na triplicata contendo a CSR e três realimentações na triplicata contendo a cultura CEP (Figura 28).

Figura 28 - Concentração de anilina durante o monitoramento dos microcosmos: (A) Média das triplicatas com a cultura CSR nas condições anaeróbia (An-CSR) e estéril (E-CSR) e (B) triplicata com cultura CEP nas condições anaeróbia (An-CEP) e estéril (E-CEP). As setas azuis indicam os pontos de realimentação



Fonte: O Autor (2020).

Vale destacar que a concentração inicial de anilina medida no microcosmo CSR foi de 4,38 mg/L, enquanto 3 mg/L foram adicionados. A diferença de 1,38 mg/L, corresponde ao teor de anilina proveniente do sedimento coletado no rio Capibaribe. Nos microcosmos An-CSR um rápido consumo de anilina foi detectado durante os primeiros 16 dias de monitoramento, com diminuição da concentração inicial de 4,38 mg/L para 1,57 mg/L (64% de remoção). Entretanto, tal remoção foi sucedida por um periodo onde a concentração de anilina aumentou gradualmente até atingir o valor de 2,52 mg/L (dia 79), indicando que o comportamento apresentado até então deve ter sido causado por mecanismo não biológico, como adsorção. Para melhor entender este comportamento, no dia 86 iniciamos o monitoramento de um controle esterilizado por autoclavagem da cultura CSR, com intuito de avaliar a porcentagem de remoção de anilina advinda de mecanismos de adsorção, sem influência biótica no meio.

Como esperado, a concentração inicial de anilina no controle estéril E-CSR diminuiu em cerca de 56%, tendo cessado a partir do dia 106 em diante, mantendo a concentração de anilina em  $1,48 \pm 0,07$  mg/L. Esse comportamento aponta o mecanismo de adsorção como a causa dessa remoção. Diferentemente do que foi visto em todos os experimentos com a CET, apenas nos microcosmos contendo o sedimento de rio contaminado (An-CSR) se observou considerável parcela de remoção de anilina por adsorção. Vale lembrar que ao tratar-se de sedimentos provenientes de um ecossistema natural aberto, especificamente coletado às margens de um rio contaminado, é muito provável que exista matéria orgânica na forma substâncias húmicas e fúlvicas, comumente presentes em sedimentos de rios. Essas substâncias podem facilmente formar ligações covalentes com alguns compostos orgânicos,

inclusive a anilina, capturando parte desse composto no meio. No trabalho de Weber, Spidle e Thorn (1996) foi evidenciado que cerca de 50% da anilina alimentada (5  $\mu$ M) em frascos reacionais de 125 mL foi removida pela ação de compostos húmicos e fúlvicos, extraídos da água do rio Swannee (EUA). O mecanismo de remoção da anilina, proposto no trabalho desses autores, foi atribuída à formação de ligações covalentes entre a anilina e os grupos quinonas presentes nos ácidos húmicos e fúlvicos, reduzindo desta a forma a concentração de anilina no sistema.

A primeira alimentação de anilina em An-CSR foi removida totalmente no dia 106 do monitoramento. A partir deste dia correram mais quatro realimentações de anilina respectivamente nos dias 111, 132, 147 e 181. Cada realimentação foi removida em um intervalo médio de  $25 \pm 9$  dias (Figura 28A). O desempenho da CSR em remover anilina foi superior ao desempenho apresentado pela CET em todos os testes de biodegradação, que apresentou intervalos de degradação variando entre 40 e 60 dias.

Observando a Figura 28B identificamos que o comportamento da condição An-CEP foi semelhante ao ocorrido em An-CSR, e também foi confirmado com o monitoramento de um controle estéril E-CEP. Os resultados obtidos no monitoramento de E-CEP indica que apenas 12,6% da concentração de anilina inicial foi removida por absorção, valor inferior ao observado no controle estéril para CSR (64%). Vale lembrar que a cultura CEP oriunda de reator UASB tratando efluente petroquímico, assim como a cultura têxtil CET, provavelmente não apresenta quantidades significativas das substâncias húmicas e fúlvicas, que são encontradas facilmente em sedimentos de rios. Isso explica o baixo percentual de remoção por adsorção por essas culturas, diferentemente do ocorrido nos microcosmos contendo a CSR. Um futuro experimento quantificando a fonte de matéria orgânica dissolvida na forma de ácidos húmicos e fúlvicos poderia melhor elucidar esse processo de adsorção, de forma a complementar essa discussão.

Quanto aos intervalos de remoção entre as realimentações de anilina, a condição An-CEP apresentou comportamento semelhante ao observado nos microcosmos da An-CET. O tempo necessário para remoção da segunda e terceira alimentações de anilina em An-CEP foi 40 e 61 dias, respectivamente.

Em ambas as condições foi detectada a formação de ácido benzóico em concentrações entre 0,01 e 1,91 mg/L para An-CEP e entre 0,01 e 0,62 mg/L para An-CSR. O intermediário catecol, não foi detectado em nenhuma das amostras coletadas.

#### 4.5.1 Análise taxonômica das culturas CSR e CEP

A ecologia microbiana dos microcosmos contendo as culturas CSR e CEP foi explorada através do sequenciamento do 16S rDNA presente em quatro amostras. As duas primeiras amostras foram extraídas das culturas em condições que representam suas origens, antes de serem utilizadas nos ensaios de biodegradação de anilina. As outras duas amostras foram extraídas da biomassa desenvolvida nos microcosmos no final do ensaio de biodegradação, dia 210 do monitoramento.

Os índices de diversidade calculados para a cultura CSR (Tabela 13), indicam que a microbiota formada nos microcosmos após o teste de biodegradação (An-CSR) apresentou menores índices, se comparado ao índice de diversidade calculado em suas condições originais (CSR). O número de OTUs diminuiu de 108 para 89 na CSR, evidenciando que o ambiente criado dentro dos microcosmos proporcionou uma seleção de microrganismos, resultante das condições nutricionais limitadas nos microcosmos (apenas anilina como substrato), diferentemente do que ocorre na natureza onde as condições nutricionais são mais amplas. Aliado a diminuição dos índices de diversidade, está o aumento do índice Dominância (D) que mudou de 0,115 para 0,475 após a cultura ser utilizada nos microcosmos.

Tabela 13 - Índices de diversidade calculados para as culturas CSR e CEP nas condições originais e após o teste de biodegradação de anilina representadas por An-CSR e An-CEP.

<b>Parâmetros</b>	<b>CSR</b>	<b>An-CSR</b>	<b>CEP</b>	<b>An-CEP</b>
OTUs	108	89	44	33
Sequências	9054	21406	31919	24431
<b>Índices de diversidade</b>				
Dominance D	0,115	0,475	0,506	0,412
Simpson 1-D	0,884	0,525	0,493	0,587
Shannon H	2,917	1,273	1,265	1,209
Berger-Parker	0,288	0,657	0,702	0,584
Chao1	116	109,3	46,5	35

Fonte: O Autor (2020).

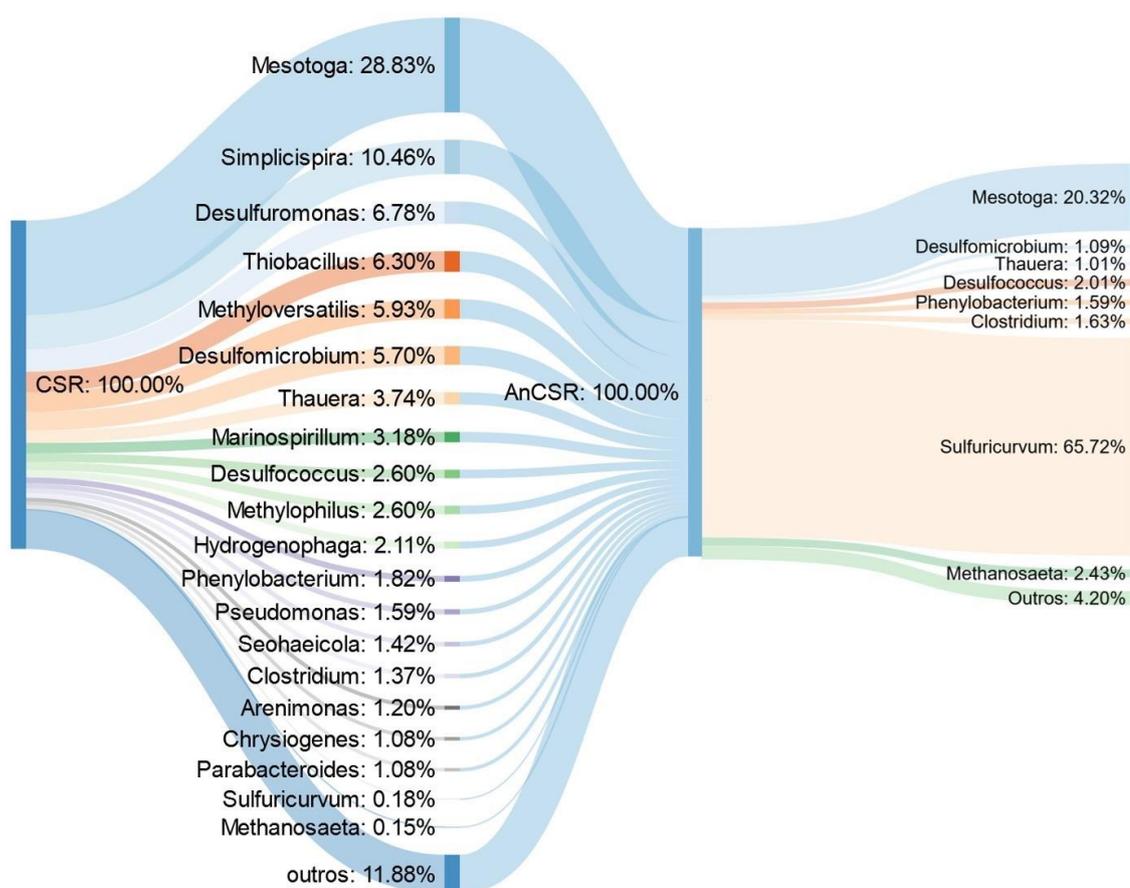
As variações nos índices de Simpson (1-D) e Shannon (H) calculados para a cultura CEP, não foram significativas. Diferentemente da cultura proveniente de sedimentos de rio (CSR), a cultura CEP foi coletada de um reator biológico, um sistema fechado onde as condições nutricionais já eram restritas. O número de OTUs identificadas em CEP (44 OTUs) foi inferior ao encontrado em CSR (108 OTUs), elucidando que a diversidade microbiana que se desenvolve em ambientes naturais (sistemas abertos) é mais ampla. Essa observação é

justificada pela diversidade nutricional encontrada nos ambientes naturais que permite que gêneros microbianos de diferentes metabolismos coexistam aumentando a diversidade da microbiota.

A taxonomia identificada na amostra CSR mostrou a presença de 18 gêneros microbianos com AR maior que 1% (Figura 29). Durante o teste de biodegradação, o ambiente criado dentro dos microcosmos composto pelo meio basal e anilina como única fonte de carbono, proporcionou condições favoráveis para que apenas 8 gêneros permanecessem com AR maior que 1%. Destacam-se os gêneros *Mesotoga* e *Sulfuricurvum* que juntos apresentaram AR = 86% na amostra proveniente do microcosmo An-CSR. O gênero *Mesotoga* foi identificado com AR entre 6% e 14% nos experimentos realizados com a cultura adaptada a efluente têxtil CET, sendo um dos gêneros que mais se adaptaram ao ambiente com anilina. As espécies desse gênero têm seu crescimento favorecido pela redução de compostos de enxofre, como tiosulfato e enxofre elementar aliados a oxidação de H<sub>2</sub> ou acetato (NESBØ et al., 2012). A maioria dos trabalhos que isolaram espécies desse gênero foram desenvolvidos com culturas que estavam sob influência de hidrocarbonetos aromáticos. A espécie *M. apprima* por exemplo, foi isolada a partir de cultura microbiana desenvolvida em microcosmo contendo 2,3,5,6-tetraclorobifenil (NESBØ et al., 2012; ZHAXYBAYEVA et al., 2012), ou por exemplo, a espécie *M. infera* que foi obtida com o enriquecimento de microcosmos contendo benzeno como única fonte de carbono (BEN HANIA et al., 2013). Apesar da maioria dos autores associar o desenvolvimento do gênero *Mesotoga* com locais contaminados por hidrocarbonetos aromáticos, os mecanismos de como esse gênero obtém energia a partir desses compostos não são explorados.

O gênero *Sulfuricurvum* apresentou um desenvolvimento superior aos demais gêneros aumentando sua AR de 0,18% em CSR para 65,72% em An-CSR. O metabolismo desse gênero foi discutido no tópico 4.4, onde foi visto que o seu principal mecanismo de crescimento está associado à oxidação de tiosulfato e sulfeto, convertendo-os a sulfato (HAN et al., 2012; KODAMA; WATANABE, 2004). A princípio nenhum relato na literatura evidencia a atuação desse gênero na degradação de compostos aromáticos, o que sugere que a função metabólica desse gênero nos microcosmos limita-se à utilização do sulfeto e do tiosulfato disponíveis, tanto na cultura CSR quanto na cultura CET. Essa função, apesar de não estar diretamente ligada a degradação da anilina, continua sendo importante, pois consegue manter o íon sulfato disponível no meio, que por sua vez pode ser utilizado como aceptor de elétrons para outros processos.

Figura 29 - Abundância relativa dos gêneros identificados com AR > 1% nas amostras CSR e An-CSR. O agrupamento outros corresponde aos gêneros com AR inferior a 1% em ambas as amostras



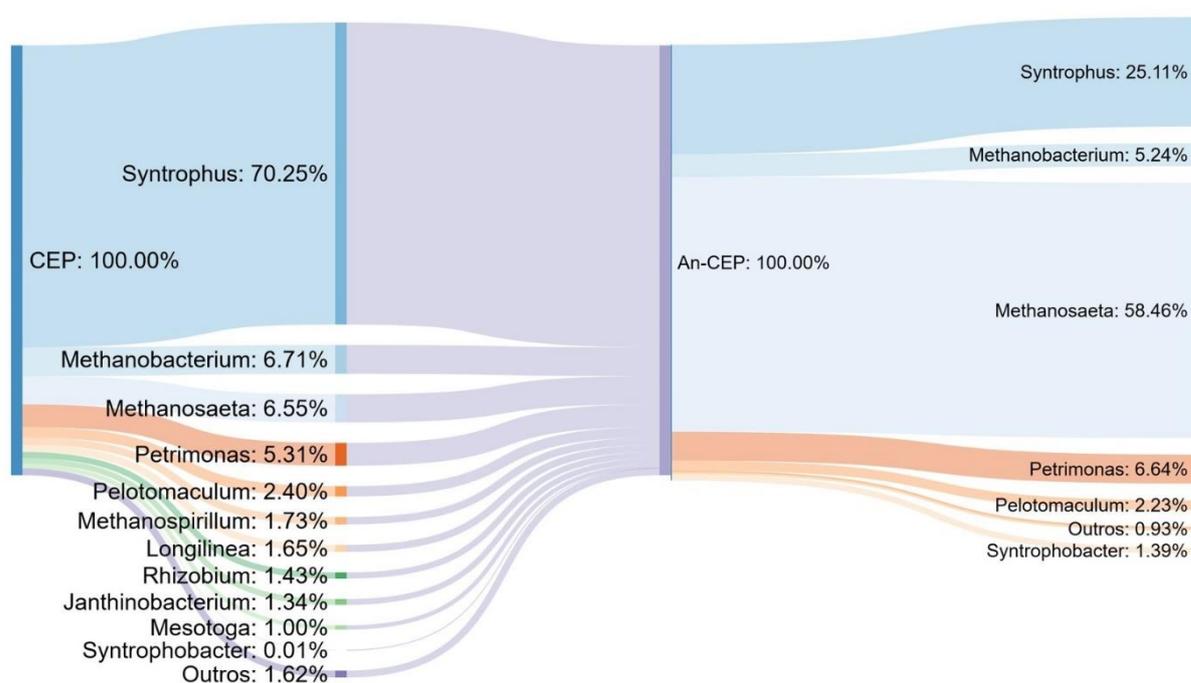
Fonte: O Autor (2020).

Analisando a taxonomia identificada em CEP observa-se que a microbiota desenvolvida é composta por 11 gêneros significativos (AR>1% - Figura 30) com metabolismos

predominantemente fermentativos e metanogênicos, diferentemente do que foi observado nas culturas CSR e CET que apresentaram uma comunidade formada ao redor do ciclo de oxidação e redução de compostos de enxofre.

Os gêneros *Syntrophus*, *Methanosaeta*, *Methanobacterium* e *Petrimonas* predominaram como núcleo microbiano, tanto na amostra CEP (inóculo origem) quanto na amostra An-CEP (microcosmo com anilina), o que justifica os semelhantes índices de diversidade dessas amostras.

Figura 30 - Abundância relativa dos gêneros identificados com AR > 1% nas amostras CEP e An-CEP. O agrupamento outros corresponde aos gêneros com AR inferior a 1% em ambas as amostras.



Fonte: O Autor (2020).

Os autores Mcinerney et al. (2007) estudaram o genoma do gênero *Syntrophus* avaliando os aspectos termodinâmicos que limitam seu crescimento na comunidade microbiana. Os autores afirmam que esse genero consegue obter energia de uma vasta gama de compostos orgânicos como alcoois, AGVs, ácidos aromáticos (benzoato), ácidos orgânicos e hidrocarbonetos. Apesar de toda essa versatilidade, todas essas reações são endergônicas e só acontecem quando o hidrogênio e/ou o formiato estão em baixos teores no meio, fazendo com que esses microrganismos vivam em consórcios sintróficos com arqueas metanogênicas e outros gêneros que utilizam H<sub>2</sub> e formiato. Na Tabela 14 estão descritas algumas reações

propostas por Mcinerney et al. (2007), que demonstram como funciona o metabolismo sintrófico desse gênero.

A taxonomia identificada em An-CEP se enquadra perfeitamente neste cenário de simbiose. O gênero *Syntrophus* (AR = 25,11%) se desenvolveu em consórcio com os gêneros *Methanobacterium* (AR = 5,24%) que utiliza hidrogênio para produzir metano e o gênero *Methanosaeta* (AR = 58,46%) que se beneficia do acetato produzido após a degradação dos substratos orgânicos disponíveis, neste caso o ácido benzóico proveniente da anilina. As concentrações de ácido benzóico em An-CEP variaram de 0,2 a 1,8 mg/L durante o monitoramento (210 dias) indicando que a rota de degradação da anilina foi por via de carboxilação e desaminação.

Tabela 14 - Reações envolvidas nos metabolismos sintróficos do gênero *Syntrophus*.

Reações	$\Delta G^0$ (kJ/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol)
Metanogênese hidrogenotrófica		
$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	-135,6	-15,8
Metabolismo sintrófico		
$Propionato^- + 3H_2O \rightarrow acetato^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$	+76,1	-16,9
$Butirato^- + 2H_2O \rightarrow 2 acetato^- + H^+ + 2H_2$	+48,6	-39,2
$Benzoato^- + 7H_2O \rightarrow 3 acetato^- + HCO_3^- + 3H^+ + 3H_2$	+70,1	-68,5

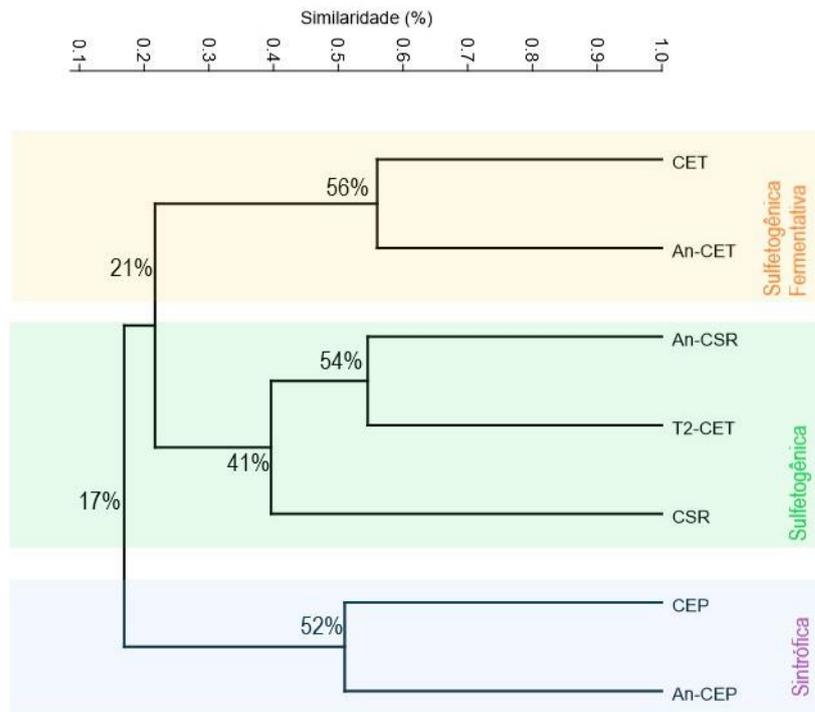
Fonte: Adaptado de Mcinerney et al. (2007).

As três culturas analisadas nesta tese apresentaram habilidade em degradar anilina por via de formação de ácido benzóico (benzoato). Em nenhum dos experimentos foi detectada a formação do intermediário central catecol. Comparando o desempenho, as culturas CET e CSR apresentaram metabolismos de degradação de anilina mais rápidos do que a cultura CEP, necessitando de menos tempo para degradar cada realimentação de anilina. A taxonomia apresentada para as três culturas foi avaliada sob a forma de dendrograma, utilizando o índice de Jaccard para verificar a similaridade das culturas estudadas (Figura 31).

O agrupamento formado mostrou que a microbiota presente nas amostras CEP e An-CEP apresentam apenas 17% de similaridade com as demais amostras. A cultura CEP representa em sua maioria um consórcio sintrófico metanogênico, diferentemente da composição apresentada pelos outros agrupamentos. Um segundo agrupamento foi formado pelas amostras CET e An-CET, onde predominam gêneros sulfetogênicos. Entretanto, a

influência endogênica de substratos provenientes do amido de milho, utilizado para alimentar a cultura CET no reator em foi coletada, estimulou o crescimento de gêneros fermentativos e metanogênicos no primeiro experimento. O último agrupamento foi formado pelas amostras CSR, An-CSR e T2-CET, onde predominaram gêneros sulfetogênicos. Chama atenção a similaridade entre T2-CET e An-CSR (54%) indicando que as transferências realizadas com a cultura CET aumentaram a semelhança de sua taxonomia com a cultura CSR, uma vez que as interferências endogênicas foram minimizadas, restando apenas a anilina e os compostos oxidados e reduzidos de enxofre.

Figura 31 - Dendrograma elaborado através do índice de Jaccard, mostrando a similaridade entre as amostras sequenciadas das culturas CET, CSR e CEP



Fonte: O Autor (2020).

Este resultado comparativo traz à discussão os efeitos causados pelos lançamentos indevidos de efluentes parcialmente tratados ou não tratados, que as indústrias têxteis realizam de forma negligente nos rios. Os efeitos desses lançamentos refletem na composição da microbiota desenvolvida nos rios contaminados, a ponto de apresentarem similaridade acima de 50% com microbiotas desenvolvidas em reatores usados para tratar efluente bruto.

Estima-se que cerca de 100 L de água sejam utilizados para processar 1 kg de peças de jeans em uma lavanderia, o que segundo a *Environmental Protection Agency* (US-EPA, 1997), resulta na produção de 3,7 milhões de litros de efluentes todos os dias, no cenário mundial. Especificamente no rio Capibaribe (Local de coleta da CSR) as indústrias têxteis consomem cerca de 137.300 m<sup>3</sup> de água por mês, resultando em uma lançamento anual de aproximadamente 1 milhão de m<sup>3</sup> de efluente no curso do rio (CPRH, 2005). Em 2005 cinquenta e três indústrias têxteis foram autuadas pelo órgão ambiental do estado de Pernambuco por não disporem de tratamento adequado para os efluentes produzidos.

Em meio a este imenso desafio de tratar e preservar os mananciais contaminados, existe uma abordagem que pode ser extraída para esse problema, que consiste na exploração dos microrganismos desenvolvidos nesses ambientes contaminados. A cultura CSR dentre as três culturas testadas, foi a que apresentou o melhor desempenho na degradação de anilina, sem necessitar de longos períodos de adaptação. Os resultados obtidos com o monitoramento da CSR mostram que a microbiota presente no sedimento do rio contaminado apresentava gêneros microbianos com potencial metabólico para degradar poluentes de difícil degradação como a anilina, tornando possível a aplicação desses gêneros em técnicas de bioaugmentação para tratar áreas contaminadas por poluentes estruturalmente semelhantes.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados discutidos neste trabalho mostraram que as três culturas microbianas, provenientes de sistemas de tratamento de efluentes têxtil (CET) e petroquímico (CEP), além de sedimento de rio (CSR), apresentaram habilidade em degradar sucessivas alimentações de anilina em ambiente estritamente anaeróbio. Os resultados dos experimentos 1 e 2 com a cultura CET mostraram que a capacidade dos íons nitrato e sulfato funcionarem como aceptores finais de elétrons durante na rota de degradação da anilina, foi comprometida pela presença de outros substratos endogênicos, cuja degradação era termodinamicamente mais favorável que a anilina. Entretanto, como a cultura CET era sulfetogênica, a condição onde o sulfato foi adicionado externamente, resultou em constantes de velocidades de remoção de anilina ( $k = ,006 - 0.657 \text{ d}^{-1}$ ) ligeiramente maiores que nas condições anaeróbia ( $k = 0,006 - 0,027 \text{ d}^{-1}$ ) e com adição de nitrato ( $k = 0,007 - 0,167 \text{ d}^{-1}$ ). Mesmo após a lavagem da cultura CET, a mesma apresentava sulfato (30-50 mg/L) endogênico, o que justifica a semelhança nos comportamentos de remoção de anilina nas três condições testadas, sugerindo que a mesma rota metabólica de degradação da anilina estaria acontecendo, sem uso do nitrato e do sulfato como aceptores de elétrons para degradar a anilina.

Os resultados do sequenciamento das amostras coletadas no experimento 1, mostraram que a microbiota dos microcosmos anaeróbio (An-CET), com nitrato (N-CET) e com sulfato (S-CET) foi composta principalmente pelos gêneros *Methanosaeta* (AR = 30-47%), *Methanobacterium* (AR = 1,0-2,4%), *Desulfomicrobium* (AR = 0,7-4,0%), *Desulfobulbus* (AR = 1,5-4,9%), *Trichococcus* (AR = 3,2-8,6%) e *Levilinea* (Ar = 2,0-3,8%), os quais conferem metabolismos metanogênico, sulfetogênico e fermentativo, como predominantes.

A aplicação de uma injeção de glicose (500 mg/L) nos microcosmos do experimento 2 contendo a CET, aparentemente estimulou a degradação de anilina, após uma fase lag de 50 dias. Entretanto, manter os microcosmos sempre alimentados com a mesma concentração de glicose, fez com que a degradação de anilina fosse interrompida, provavelmente pelo fato de que a glicose é um substrato energeticamente mais favorável para os microrganismos do que a anilina.

A hipótese da formação de acetato pela rota de degradação da anilina pode ser levantada, uma vez que a presença de *Methanosaeta* foi observada nos reatores com diferentes inóculos. O acúmulo de acetato, após inibição da metanogênese, contribui para corroborar a afirmativa. Diante disso, os resultados do experimento 3 utilizando o inibidor BESA, mostraram que a inibição da metanogênese resultou em acúmulo de acetato na

condição inibida, onde apenas anilina foi alimentada como fonte de carbono. Esse resultado suporta a hipótese de que a anilina poderia ser mineralizada a metano no final de sua rota. Contudo, apenas esse resultado não é suficiente para comprovar essa hipótese.

O desempenho na remoção de anilina apresentado pela cultura CSR foi superior as demais culturas testadas. O intervalo de tempo necessário para remoção de cada injeção de anilina, nos microcosmos contendo a CSR foi duas vezes menor que nos microcosmos com a CET e com a CEP. Os gêneros identificados na amostra de DNA sequenciada ao final do teste de biodegradação com a CSR, mostrou que a composição do núcleo microbiano era formada por um grupo de bactérias relacionadas tanto a oxidação quanto a redução de compostos de enxofre, representado pelos gêneros *Sulfuricurvum*, *Mesotoga*, *Desulfococcus* e *Desulfomicroobium*. Além desse grupo fez parte do núcleo microbiano o gênero *Thauera*, bastante reportado na literatura por apresentar genes utilizados na degradação de diversos compostos aromáticos.

Compilando as informações obtidas com todos os experimentos executados nesta tese é possível afirmar que o ambiente sulfetogênico teve papel fundamental na degradação anaeróbia da anilina, que ocorre sem interferir no potencial metanogênico da cultura, podendo os dois metabolismos coexistirem ou até mesmo serem complementares. A coexistência desses metabolismos foi proposta nesta tese no formato de uma rota metabólica onde os gêneros identificados foram associados às suas potenciais funções quando submetidos a ambiente anaeróbio contendo apenas anilina como fonte de carbono e energia.

Além dessa abordagem metabólica, os resultados com CEP mostraram que culturas sintróficas, predominantemente fermentativas-metanogênicas, também possuem potencial em degradar anilina quando na presença de generos que regulam a pressão parcial de hidrogênio no meio, como no caso as arqueas hidrogenotróficas.

## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS. **Diagnóstico ambiental das lavanderias de Toritama – PE**. Recife: CPRH, 2005.
- AKYÜZ, M.; ATA, Ş. Determination of aromatic amines in hair dye and henna samples by ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 1, p. 68–80, 2008.
- AMARAL, F. M. *et al.* Color, organic matter and sulfate removal from textile effluents by anaerobic and aerobic processes. **Bioresource Technology**, v. 163, p. 364–369, 2014a.
- AMARAL, F. M. *et al.* Color, organic matter and sulfate removal from textile effluents by anaerobic and aerobic processes. **Bioresource Technology**, v. 163, p. 364–369, 2014b.
- ANLI DINO, A. *et al.* Biodegradation of aniline from textile industry waste using salt tolerant *Bacillus firmus* BA01. **Engineering in Agriculture, Environment and Food**, v. 12, n. 3, p. 360–366, 2019.
- BALDASANO, J. M. Pollution characteristics of aromatic hydrocarbons in the groundwater of China. **Science of the Total Environment**, v. 233, p. 103–, 2020.
- BEN HANIA, W. *et al.* *Mesotoga infera* sp. nov., a mesophilic member of the order Thermotogales, isolated from an underground gas storage aquifer. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3003–3008, 2013.
- BOLL, M. *et al.* Nonaromatic products from anoxic conversion of benzoyl-CoA with benzoyl-coA reductase and Cyclohexa-1,5-diene- 1-carbonyl-CoA hydratase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 29, p. 21889–21895, 2000.
- BOLL, M. Key enzymes in the anaerobic aromatic metabolism catalysing Birch-like reductions. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1707, n. 1 SPEC. ISS., p. 34–50, 2005.
- BOLL, M.; FUCHS, G. Benzoyl-Coenzyme A Reductase (Dearomatizing), a Key Enzyme of Anaerobic Aromatic Metabolism: ATP Dependence of the Reaction, Purification and Some Properties of the Enzyme from *Thauera Aromatica* Strain K172. **European Journal of Biochemistry**, v. 234, n. 3, p. 921–933, 1995.
- BOSCOLO PEREIRA, T. S. *et al.* Estrogenic activities of diuron metabolites in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Chemosphere**, v. 146, p. 497–502, 2016.
- BRÄSEN, C.; SCHÖNHEIT, P. Regulation of acetate and acetyl-CoA converting enzymes during growth on acetate and/or glucose in the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 241, n. 1, p. 21–26, 2004.
- BREESE, K. *et al.* Genes coding for the benzoyl-CoA pathway-of anaerobic aromatic metabolism in the bacterium *Thauera aromatica*. **European Journal of Biochemistry**, v. 256, n. 1, p. 148–154, 1998.

- BURNARD, M. D.; COE, I.; BRODNIK, A. **Environmental implications of recycling and recycled products**. [s.l: s.n.].
- CARVALHO, J. R. S. *et al.* Microaerated UASB reactor treating textile wastewater: The core microbiome and removal of azo dye Direct Black 22. **Chemosphere**, v. 242, 2020.
- CHRISTOFF, A. P. *et al.* Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. **Neoprosecta Microbiome Technologies**, n. May 2017, p. 1–5, 2017.
- CUI, D. *et al.* Biodegradation of aniline by a novel bacterial mixed culture AC. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 125, p. 86–96, 2017.
- CARVALHO, C. C. C. R. *et al.* Adaptation of Rhodococcus erythropolis DCL14 to growth on n-alkanes, alcohols and terpenes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 3, p. 383–388, 2005.
- DISPENSA, M. *et al.* Anaerobic growth of Rhodopseudomonas palustris on 4-hydroxybenzoate is dependent on AadR, a member of the cyclic AMP receptor protein family of transcriptional regulators. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 18, p. 5803–5813, 1992.
- EDWARDS, E. A.; GRBIC-GALIC, D. Anaerobic degradation of toluene and o-xylene by a methanogenic consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 313–322, 1994.
- FUCHS, G.; BOLL, M.; HEIDER, J. Microbial degradation of aromatic compounds- From one strategy to four. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 11, p. 803–816, 2011.
- GANG, X. *et al.* Simultaneous removal of aniline, antimony and chromium by ZVI coupled with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Implication for textile wastewater treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 368, n. October 2018, p. 840–848, 2019.
- HA DANH, D.; NGUYEN THI, O. Anaerobic Degradation of Chloroanilines by Geobacter sp. KT5. **Current Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 248–257, 2019.
- HAN, C. *et al.* Complete genome sequence of the sulfur compounds oxidizing chemolithoautotroph Sulfuricurvum kujiense type strain (YK-1 T). **Standards in Genomic Sciences**, v. 6, n. 1, p. 94–103, 2012.
- HAYAISHI, O. From oxygenase to sleep. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 28, p. 19165–19175, 2008.
- HEIDER, J.; FUCHS, G. Microbial anaerobic aromatic metabolism. **Anaerobe**, v. 3, n. 1, p. 1–22, 1997.
- HOLM, J. B. *et al.* Aniline is rapidly converted into paracetamol impairing male reproductive development. **Toxicological Sciences**, v. 148, n. 1, p. 288–298, 2015.
- HUANG, J. *et al.* Microbial biodegradation of aniline at low concentrations by Pigmentiphaga daeguensis isolated from textile dyeing sludge. **International Biodeterioration and**

**Biodegradation**, v. 129, n. 100, p. 117–122, 2018.

HUDA BHUIYAN, M. N. et al. Endocrine disruption by several aniline derivatives and related mechanisms in a human adrenal H295R cell line and adult male zebrafish.

**Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 180, n. February, p. 326–332, 2019.

ISKEN, S.; DE BONT, J. A. M. Bacteria tolerant to organic solvents. **Extremophiles**, v. 2, n. 3, p. 229–238, 1998.

JIAO, W. et al. Effects of coexisting substances on aniline degradation with ozone-based advanced oxidation process in high-gravity fields. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 138, n. November 2018, p. 36–40, 2019.

KAHNG, H. Y.; KUKOR, J. J.; OH, K. H. Characterization of strain HY99, a novel microorganism capable of aerobic and anaerobic degradation of aniline. **FEMS Microbiology Letters**, v. 190, n. 2, p. 215–221, 2000.

KAMAGATA, Y. et al. Degradation of benzoate by an anaerobic consortium and some properties of a hydrogenotrophic methanogen and sulfate-reducing bacterium in the consortium. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 73, n. 3, p. 213–218, 1992.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 2000.

KEYHANIAN, M.; FARMANZADEH, D. The role of Mn and Fe transition metal atoms mediation on the aniline adsorption by B40 fullerene: A computational investigation. **Journal of Molecular Liquids**, v. 294, p. 111638, 2019.

KHANDEGAR, V.; SAROHA, A. K. Electrocoagulation for the treatment of textile industry effluent - A review. **Journal of Environmental Management**, v. 128, p. 949–963, 2013.

KODAMA, Y.; WATANABE, K. *Sulfuricurvum kujiense* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground crude-oil storage cavity. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2297–2300, 2004.

KONOPKA, A.; KNIGHT, D.; TURCO, R. F. Characterization of a *Pseudomonas* sp. capable of aniline degradation in the presence of secondary carbon sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 385–389, 1989.

KUNG, J. W. et al. Identification and characterization of the tungsten-containing class of benzoyl-coenzyme A reductases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 42, p. 17687–17692, 2009.

LAEMPE, D.; JAHN, M.; FUCHS, G. 6-Hydroxycyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA dehydrogenase and 6-oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA hydrolase, enzymes of the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. **European Journal of Biochemistry**, v. 263, n. 2, p. 420–429, 1999.

LEE, I. S.; BAE, J. H.; MCCARTY, P. L. Comparison between acetate and hydrogen as

electron donors and implications for the reductive dehalogenation of PCE and TCE. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 94, n. 1–2, p. 76–85, 2007.

LEUTWEIN, C.; HEIDER, J. Anaerobic toluene-catabolic pathway in denitrifying *Thauera aromatica*: Activation and  $\beta$ -oxidation of the first intermediate, (R)-(+)-benzylsuccinate. **Microbiology**, v. 145, n. 11, p. 3265–3271, 1999.

LI, J. *et al.* Metagenomic insights into aniline effects on microbial community and biological sulfate reduction pathways during anaerobic treatment of high-sulfate wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 742, p. 140537, 2020a.

LI, Y. *et al.* Bioaugmentation of sequencing batch reactor for aniline treatment during start-up period: Investigation of microbial community structure of activated sludge. **Chemosphere**, v. 243, p. 125426, 2020b.

LIANG, X. *et al.* Anaerobic Conversion of Monochlorobenzene and Benzene to CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> in Bioaugmented Microcosms. **Environmental science & technology**, 2013.

LÓPEZ BARRAGÁN, M. J. *et al.* The *bzd* gene cluster, coding for anaerobic benzoate catabolism, in *Azoarcus* sp. strain CIB. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 17, p. 5762–5774, 2004.

MARLATT, V. L.; MARTYNIUK, C. J. **Biological responses to phenylurea herbicides in fish and amphibians: new directions for characterizing mechanisms of toxicity.** Amsterdã, NL: Elsevier Inc., 2017. v. 194

MCINERNEY, M. J. *et al.* **The genome of *Syntrophus aciditrophicus***: life at the thermodynamic limit of microbial growth. 2007.

MENEZES, O. *et al.* Coupling intermittent micro-aeration to anaerobic digestion improves tetra-azo dye Direct Black 22 treatment in sequencing batch reactors. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 146, p. 369–378, 2019.

MOHAMMED, M. *et al.* New insights into aniline toxicity: Aniline exposure triggers envelope stress and extracellular polymeric substance formation in *Rubrivivax benzoatilyticus* JA2. **Journal of Hazardous Materials**, v. 385, p. 121571, 2020.

MUSA, N. M.; ABDULSALAM, S.; SULEIMAN, A. D. I. Bioremediation of Petroleum Refinery Wastewater Effluent via Augmented Native Microbes. **Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences**, v. 6, n. 1, p. 1–6, 2015.

NESBØ, C. L. *et al.* *Mesotoga prima* gen. nov., sp. nov., the first described mesophilic species of the Thermotogales. **Extremophiles**, v. 16, n. 3, p. 387–393, 2012.

O'NEILL, F. J. *et al.* Bacterial growth on aniline: Implications for the biotreatment of industrial wastewater. **Water Research**, v. 34, n. 18, p. 4397–4409, 2000.

PANIGRAHI, S.; VELRAJ, P.; SUBBA RAO, T. **Functional microbial diversity in contaminated environment and application in bioremediation.** Amsterdã, NL: Elsevier Inc., 2019.

PARALES, R. E.; ONTL, T. A.; GIBSON, D. T. Cloning and sequence analysis of a catechol 2,3-dioxygenase gene from the nitrobenzene-degrading strain *Comamonas* sp JS765. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 5–6, p. 385–391, 1997.

PARKS, D. H.; BEIKO, R. G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. **Bioinformatics**, v. 26, n. 6, p. 715–721, 2010.

PEREIRA, R. *et al.* Fate of aniline and sulfanilic acid in UASB bioreactors under denitrifying conditions. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 191–200, 2011.

PÉREZ-CATALUÑA, A. *et al.* Revisiting the taxonomy of the genus *arcobacter*: Getting order from the chaos. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. SEP, 2018.

PEZO, D. *et al.* Aromatic amines from polyurethane adhesives in food packaging: The challenge of identification and pattern recognition using Quadrupole-Time of Flight-Mass Spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 756, p. 49–59, 2012.

QU, Y. *et al.* Hydrogenation of nitrobenzene to aniline catalyzed by C60-stabilized Ni. **Catalysis Communications**, v. 97, p. 83–87, 2017.

RABUS, R. *et al.* Anaerobic microbial degradation of hydrocarbons: From enzymatic reactions to the environment. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 1–3, p. 5–28, 2016.

ROALKVAM, I. *et al.* Physiological and genomic characterization of *arcobacter anaerophilus* IR-1 reveals new metabolic features in epsilonproteobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. SEP, p. 1–12, 2015.

SCHINK, B.; PHILIPP, B.; MÜLLER, J. Anaerobic degradation of phenolic compounds. **Naturwissenschaften**, v. 87, n. 1, p. 12–23, 2000.

SCHMIDT, S. K.; SIMKINS, S.; ALEXANDER, M. Models for the kinetics of biodegradation of organic compounds not supporting growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 323–331, 1985.

SCHNELL, S.; BAK, F.; PFENNIG, N. Anaerobic degradation of aniline and dihydroxybenzenes by newly isolated sulfate-reducing bacteria and description of *Desulfobacterium anilini*. **Archives of Microbiology**, v. 152, p. 556–563, 1981.

SCHNELL, S.; SCHINK, B. Anaerobic aniline degradation via reductive deamination of 4-aminobenzoyl-CoA in *Desulfobacterium anilini*. **Archives of Microbiology**, v. 155, n. 2, p. 183–190, 1991.

SCHUKAT, B. *et al.* Cometabolic degradation of 2- and 3-chloroaniline because of glucose metabolism by *Rhodococcus* sp. An 117. **Current Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 81–86, 1983.

SERVIÇO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS DO ESTADO DE PERNAMBUCO. **Estudo econômico do APL de confecções do agreste**. Recife: SEBRAE, 2013. Disponível em: [www.sebrae.com.br/Sebrae/PortalSebrae/Anexos/EstudoEconomicodoAPLdeConfecoesdoAgreste-07deMAIO2013docx](http://www.sebrae.com.br/Sebrae/PortalSebrae/Anexos/EstudoEconomicodoAPLdeConfecoesdoAgreste-07deMAIO2013docx). Acessado em 14 de julho de 2019.

- SHELUDCHENKO, M. S. *et al.* Degradation of aniline by *Delftia tsuruhatensis* 14S in batch and continuous processes. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 465–468, 2005.
- SHIN, B. *et al.* Anaerobic degradation of hexadecane and phenanthrene coupled to sulfate reduction by enriched consortia from northern Gulf of Mexico seafloor sediment. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.
- SILI, C. *et al.* Case study on emergency disposal of aniline pollution in Zhanghe River. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 267, n. 6, 2019.
- SILVA, C. P. **Tratamento anaeróbio de efluente têxtil: toxicidade a organismos metanogênicos e interferência dos íons sulfato e sulfeto no processo de descoloração**. 2016. 161 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.
- SPAIN, J. C. Biodegradation of nitroaromatic compounds. **Annual review in microbiology**, v. 49, p. 523–555, 1995.
- STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 20. ed. Washington: APHA, AWWA, WEF, 2005.
- SUN, W. *et al.* Identification of Anaerobic Aniline-Degrading Bacteria at a Contaminated Industrial Site. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 18, p. 11079–11088, 2015.
- TAKAHASHI, S. *et al.* Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.
- TOMKINS, P. *et al.* The impact of the nature of amine reactants in the palladium catalyzed conversion of phenol to N-substituted anilines. **Journal of Catalysis**, v. 371, p. 207–213, 2019.
- TRUBETSKOVA, I.; LAMPERT, W. The juvenile growth rate of *Daphnia*: A short-term alternative to measuring the per capita rate of increase in ecotoxicology? **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42, n. 2, p. 193–198, 2002.
- TYAGI, M.; DA FONSECA, M. M. R.; DE CARVALHO, C. C. C. R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation**, v. 22, n. 2, p. 231–241, 2011.
- UPADHYAY, U.; KUMAR, P.; MEHROTRA, I. Anaerobic degradation of benzoate: Batch studies. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 15, p. 6861–6865, 2008.
- VAN DEN BERG, H. *et al.* Phosgene free route to Methyl Diphenyl Diisocyanate (MDI): A technical and economical evaluation. **Chemical Engineering Journal**, v. 207–208, p. 254–257, 2012.
- VAN DER GEIZE, R.; DIJKHUIZEN, L. Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n.

3, p. 255–261, 2004.

VAN DER WAALS, M. J. ATASHGAHI S. ROCHA, U. N. VAN DER ZAAAN , B. SMIDT, H. GERRITSE, J. Benzene degradation in a denitrifying biofilm reactor: activity and microbial community composition. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 12, p. 5175–5188, 2017.

VANGNAI, A. S.; PETCHKROH, W. Biodegradation of 4-chloroaniline by bacteria enriched from soil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 268, n. 2, p. 209–216, 2007.

WANG, M. *et al.* Effects of carbon tariffs trading policy on duopoly market entry decisions and price competition: Insights from textile firms of developing countries. **International Journal of Production Economics**, v. 181, n. July 2010, p. 470–484, 2016.

WANG, Q. *et al.* Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, 2007.

WEBER, E. J.; SPIDLE, D. L.; THORN, K. A. Covalent binding of aniline to humic substances. 1. Kinetic studies. **Environmental Science and Technology**, v. 30, n. 9, p. 2755–2763, 1996.

WENDEROTH, D. F. *et al.* Bacterial community dynamics during biostimulation and bioaugmentation experiments aiming at chlorobenzene degradation in groundwater. **Microbial Ecology**, v. 46, n. 2, p. 161–176, 2003.

YAN, F. *et al.* Multiple toxicity endpoint–structure relationships for substituted phenols and anilines. **Science of the Total Environment**, v. 663, p. 560–567, 2019.

YEEM, E.; WILLIS, A. The Estimation of Carbohydrates in Plant Extracts by Anthrone. **International Journal of Pharmacy Practice**, v. 7, n. 4, p. 197, 1954.

ZENG, H. *et al.* An Adventure in Sustainable Cross-Coupling of Phenols and Derivatives via Carbon-Oxygen Bond Cleavage. **ACS Catalysis**, v. 7, n. 1, p. 510–519, 2017.

ZHAXYBAYEVA, O. *et al.* Genome sequence of the mesophilic Thermotogales bacterium *Mesotoga prima* MesG1.Ag.4.2 reveals the largest Thermotogales genome to date. **Genome Biology and Evolution**, v. 4, n. 8, p. 700–708, 2012.

ZIMMERMANN, T.; KULLA, H. G.; LEISINGER, T. Properties of Purified Orange II Azoreductase, the Enzyme Initiating Azo Dye Degradation by *Pseudomonas* KF46. **European Journal of Biochemistry**, v. 129, n. 1, p. 197–203, 1982.