



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

ISABELLE RODRIGUES DE MENDONÇA CÂMARA

**INFLUÊNCIA DA MICROAERAÇÃO INTERMITENTE NA DEGRADAÇÃO  
ANAERÓBIA DA ANILINA**

Recife

2021

ISABELLE RODRIGUES DE MENDONÇA CÂMARA

**INFLUÊNCIA DA MICROAERAÇÃO INTERMITENTE NA DEGRADAÇÃO  
ANAERÓBIA DA ANILINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil. Área de concentração: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Sália Gavazza dos Santos Pessoa.

**Coorientador:** Prof. Dr. Fabrício Motteran.

Recife

2021

Catálogo na fonte  
Sandra Maria Neri Santiago, CRB-4 / 1267

C172i Câmara, Isabelle Rodrigues de Mendonça.  
Influência da microaeração intermitente na degradação anaeróbia da anilina / Isabelle Rodrigues de Mendonça Câmara. – Recife, 2021.  
110 f.: figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Sávia Gavazza dos Santos Pessôa.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2021.  
Inclui referências e anexos.

1. Engenharia Civil. 2. Aminas aromáticas. 3. Biodegradação. 4. Lodo UASB. 5. Ecotoxicidade. I. Pessôa, Sávia Gavazza dos Santos (Orientadora). II. Título.

UFPE

624 CDD (22. ed.)

BCTG / 2021 – 148

ISABELLE RODRIGUES DE MENDONÇA CÂMARA

**INFLUÊNCIA DA MICROAERAÇÃO INTERMITENTE NA DEGRADAÇÃO  
ANAERÓBIA DA ANILINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil. Área de concentração: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

Aprovado em: 22/01/2021.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sália Gavazza dos Santos Pessôa (orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dra. Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic (examinadora externa)  
Universidade de São Paulo

---

Profa. Dra. Giovana Tommaso (examinadora externa)  
Universidade de São Paulo

---

Dr. José Roberto Santo de Carvalho (examinador externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico essa dissertação a meus pais (Isa e Reginaldo) e minha irmã, que sempre me deram forças para seguir em frente e me incentivaram a fazer o meu melhor.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que esteve comigo em todos os momentos, mostrando-se presente nos mínimos detalhes e em todas as pessoas que me ajudaram no caminho. Agradeço a meus pais (Isa e Reginaldo Câmara) por todo suporte e amor que sempre é mais do que eu mereço. A minha irmã, Raissa, por me sugerir as melhores soluções para o crescimento das minhas filhas; batatas fritas realmente seriam a melhor opção, uma pena que não me deixaram jogar no reator. Fica para a próxima. Ao meu namorado, Lucas Maciel, que mesmo de longe está sempre comigo em todas as loucuras e decisões. A minha tia Heronita Rodrigues, por sempre me acolher nos dias mais difíceis, por todos os reikis, meditações e contato com a natureza da sua casa.

A minha orientadora, prof<sup>a</sup>. Sávvia Gavazza, pela confiança em mim depositada para realizar esse trabalho, pelo conhecimento passado nesses dois anos, por ser exemplo de simplicidade e caráter e ainda ter um grande coração. Ao meu coorientador, prof. Fabrício Motteran, por todo auxílio, paciência, dedicação, incentivos e cafezinhos. Perdi as contas de quantos surtos esses dois presenciaram e não me mandaram embora [é meme, professora!]. Obrigada por acreditarem em mim antes que eu mesma acreditasse.

A todos os amigos do laboratório, por tantos momentos compartilhados e ideias lançadas, festas descontraídas e almoços no LSA e LABIOTA que tornaram esses dias tão mais leves e risonhos: “Ai, Babi! Só quem viveu sabe!”. Agradeço especialmente a técnica Danúbia Freitas, por ser a pessoa no laboratório que mais ouviu “Daaan, me ajuda!” e sempre se mostrou presente com um sorriso e uma mão amiga. A Natanna Melo: meu bem mais precioso nesse laboratório é a nossa amizade, parece que ainda estamos juntas todos os dias. A Victor Ventura, rei das figurinhas, rolês aleatórios e dos artigos finalizados, agradeço toda ajuda para que esse experimento desse certo, pelas análises de toxicidade, a paciência com os áudios de 5 minutos no whatsapp e pelos cafés e sugestões científicas.

Ao Laboratório LSA, aos professores e toda a equipe técnica que me acolheram nessa jornada e me ajudaram a evoluir profissionalmente e pessoalmente; a UFPE,

minha segunda casa desde a graduação. A professora Ana Christina Brasileiro Vidal e ao Laboratório de Genética, pela parceria na realização dos testes de toxicidade.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, FACEPE, pelo suporte no fomento desta pesquisa através da concessão da bolsa de estudos IBPG 0653-3.07/18, ao CNPq (processo 304862/2018-5), a CAPES-Proap e FACEPE (APQ-0603.3-07/14), pelo apoio financeiro, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

A anilina é uma amina aromática presente na cadeia produtiva de pesticidas, corantes, borrachas, fármacos, solventes e cosméticos, com relevância econômica e ecológica. Contaminante direto, ou bioproduto acumulado, em corpos d'água e aquíferos subterrâneos, apresenta elevada toxicidade, potencial carcinogênico e mutagênico. Além disso, exibe recalcitrância à degradação anaeróbia, necessitando rigoroso controle do seu descarte na natureza e atenção para ocorrência de desastres ambientais. A combinação da microaeração com o processo de digestão anaeróbia tem como objetivos acelerar e estabilizar o processo anaeróbio, enquanto reduz os custos associados ao processo de aeração convencional e a sua produção de lodo. A influência da microaeração intermitente na digestão anaeróbia de anilina foi testada em três condições: 30, 15 e 10 minutos de microaeração a cada duas horas (C1, C2 e C3, respectivamente) com fluxo de ar de 0,25 L/min, em sucessivos ciclos. O experimento consistiu na degradação de 0,14 mM de anilina (13,2 mg/L), com três repetições, em bateladas alimentadas sequenciais. Foram identificados intermediários das rotas de degradação aeróbia (catecol) e anaeróbia (ácido benzoico) da anilina em todas as condições testadas. Modelo cinético de primeira ordem representou adequadamente a degradação da anilina, tendo sido 4,1 e 1,1 vezes mais rápida na condição C3 em comparação com C1 e C2, respectivamente. Isso indica que houve adaptação da cultura à anilina e o fornecimento de oxigênio intermitente foi capaz de estimular a sua degradação, apesar da diminuição do tempo de oxigenação em C3. Apesar disso, C3 foi a condição que apresentou maior toxicidade ao vegetal *Allium cepa*, apresentando efeitos citogenotóxicos. Isto decorreu da menor disponibilidade de oxigênio em C3, que provocou acúmulo de intermediários tóxicos em maior quantidade nesta condição. A análise da dinâmica da comunidade microbiana indicou a ocorrência de 18 gêneros, anaeróbios estritos e aeróbios facultativos, relacionados à degradação de anilina e seus subprodutos. Em virtude da competição microbiana pelos substratos (anilina e oxigênio) ter levado à produção de intermediário citogenotóxico em C3, indica-se C2 como a melhor condição entre as testadas, capaz de estimular a degradação anaeróbia da anilina, sem acúmulo de subprodutos tóxicos e com menor fornecimento de oxigênio. A microaeração intermitente é uma estratégia promissora para biorremediação de efluentes e de *sites* contaminados com anilina.

**Palavras-chave:** aminas aromáticas; biodegradação; lodo UASB; ecotoxicidade.

## ABSTRACT

Aniline is an aromatic amine present in the production chain of pesticides, dyes, rubbers, drugs, solvents and cosmetics, with economic and ecological relevance. Direct contaminant, or accumulated bioproduct, in water bodies and underground aquifers, presents high toxicity, carcinogenic and mutagenic potential. In addition, it shows recalcitrance to anaerobic degradation, requiring strict control of its disposal in nature and attention to the occurrence of environmental disasters. The combination of microaeration with anaerobic digestion process has the objectives of accelerating the anaerobic process and stabilizing it, while reducing the costs associated with the conventional aeration process and its sludge production. The intermittent micro-aeration influence on anaerobic digestion of aniline was tested in three conditions: 30, 15 and 10 minutes of microaeration every two hours (C1, C2 and C3, respectively), with an air flow of 0,25 L/min, in successive cycles. The experiment consisted in the degradation of 0.14 mM of aniline (13.2 mg/L), with three spikes, in single batches. By-products of aniline's aerobic (catechol) and anaerobic (benzoic acid) degradation routes were identified in all conditions tested. First-order kinetic model represented aniline degradation well, being 4.1 and 1.1 times faster in condition C3 compared to C1 and C2, respectively. This indicates that the culture was adapted to aniline and the intermittent oxygen supply was able to stimulate its degradation, despite the decrease in oxygenation time in C3. However, C3 was the condition that showed greater toxicity to the vegetable *Allium cepa*, presenting cytogenotoxic effects. This was due to the lower availability of oxygen in C3, which caused the accumulation of toxic intermediates in greater amount in this condition. The analysis of the dynamics of the microbial community indicated the occurrence of 18 genera, strict anaerobes and facultative aerobes, related to the degradation of aniline and its by-products. Due to the microbial competition for substrates (aniline and oxygen) leading to the production of cytogenotoxic intermediate in C3, C2 is indicated as the best condition among those tested, capable of stimulating anaerobic degradation of aniline, without accumulation of toxic by-products and with less oxygen supply. Intermittent microaeration is a promising strategy for bioremediation of effluents and sites contaminated with aniline.

**Keywords:** aromatic amines; biodegradation; UASB sludge; ecotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Reação de formação da anilina através da nitratação do benzeno por meio de mistura lenta sulfonítrica, seguida de posterior hidrogenação do nitrobenzeno, por Zinin e Hoffman. Reação é altamente exotérmica 23
- Figura 2 - Exemplos de corantes azo que geram anilina como subproduto da degradação anaeróbia 26
- Figura 3 - Rota parcial da degradação aeróbia da anilina até o intermediário catecol, estudada em cepa de *Pseudomonas* com genes recombinantes de *Acinetobacter* sp. YAA, por Takeo et al. (2013) 32
- Figura 4 - Rotas aeróbias de degradação do catecol, por meta-clivagem e orto-clivagem (AGHAPOUR; MOUSSAVI; YAGHMAEIAN, 2013) 33
- Figura 5 - Rota anaeróbia de degradação da anilina ao intermediário benzoato, identificada no microrganismo *Desulfobacterium anilini*, no estudo de Schnell e Shinck (1991) 34
- Figura 6 - Fluxograma das etapas realizadas no trabalho, por ordem de realização da esquerda para a direita 38
- Figura 7 - Esquema de distribuição do tempo do ciclo em cada condição de tratamento 41
- Figura 8 - Esquema do reator de acrílico, com agitação magnética, microaeração fornecida por bomba de ar e controlada por meio de rotâmetro e temporizador.  $V_t$  = volume total;  $V_u$  = volume útil 42
- Figura 9 - Degradação de anilina em C1 (A), C2 (B) e C3 (C), 30, 15 e 10 minutos de microaeração a cada 2 horas, respectivamente. Cada seta no gráfico representa uma injeção de anilina no reator. Atentar para as diferentes escalas temporais nos eixos 49

das abcissas

- Figura 10 - Residual da ANOVA na modelagem dos parâmetros cinéticos de C1 para a 1ª (A), 2ª (B) e 3ª (C) injeções. Atentar para as diferentes escalas temporais nos eixos das abcissas 54
- Figura 11 - Residual da ANOVA na modelagem dos parâmetros cinéticos de C2 para a 1ª (A), 2ª (B) e 3ª (C) injeções. Atentar para as diferentes escalas temporais nos eixos das abcissas 54
- Figura 12 - Residual da ANOVA na modelagem dos parâmetros cinéticos de C3 para a 1ª (A), 2ª (B) e 3ª (C) injeções. Atentar para as diferentes escalas temporais nos eixos das abcissas 54
- Figura 13 - Potencial de oxirredução, ORP (—) e degradação de anilina (---) em C1 (A), C2 (B) e C3 (C), 30, 15 e 10 minutos de microaeração a cada 2 horas, respectivamente. Cada seta no gráfico representa uma realimentação da anilina. Atentar para as diferentes escalas temporais nos eixos das abcissas 57
- Figura 14 - Detecção de ácido benzoico, intermediário da rota anaeróbia de degradação da anilina, em C1 (A), C2 (B) e C3 (C), 30, 15 e 10 minutos de microaeração a cada 2 horas, respectivamente. Cada seta no gráfico representa uma realimentação da anilina. Atentar para as diferentes escalas temporais nos eixos das abcissas 60
- Figura 15 - Detecção de catecol, intermediário da rota aeróbia de degradação da anilina, em C1 (A), C2 (B) e C3 (C), 30, 15 e 10 minutos de microaeração a cada 2 horas, respectivamente. Cada seta no gráfico representa uma realimentação da anilina. Atentar para as diferentes escalas temporais nos eixos das abcissas 61
- Figura 16 - Perfil do ciclo de duas horas representativo de C2 (15 minutos de microaeração a cada duas horas). À esquerda, degradação 63

da anilina ( ■ ) no período de 120 minutos. À direita, detecção de metabólitos intermediários (ácido benzoico ( ● ) e catecol ( ▲ )) no mesmo período e comportamento do OD ( -■- ) e ORP ( -■- )

Figura 17 - Perfil do ciclo de duas horas representativo de C3 (10 minutos de microaeração a cada duas horas). À esquerda, degradação da anilina ( ■ ) no período de 120 minutos. À direita, detecção de metabólitos intermediários (ácido benzoico ( ● ) e catecol ( ▲ )) no mesmo período e comportamento do OD ( -■- ) e ORP ( -■- )

Figura 18 - Índice germinativo (A), crescimento radicular (B), índice mitótico (C) e índice de genotoxicidade (D) de afluentes (a) e efluentes (e) de C1, C2 e C3, em comparação com o controle negativo (CN), em sistema-teste *Allium cepa*. Todos os índices em porcentagem representam o percentual de observações no espaço amostral de 70 sementes germinadas, após período de 72h

Figura 19 - Representação circular dos gêneros microbianos com maior abundância relativa presentes no Inóculo e em C1, C2 e C3 (30, 15 e 10 minutos de microaeração a cada 2 horas, respectivamente)

Figura 20 - Abundância relativa, a nível de filo, para amostras do inóculo e do final de C1, C2 e C3

Figura 21 - Gêneros microbianos presentes em C1 (A), C2 (B) e C3 (C) que apresentaram abundância relativa maior que 1%

Figura 22 - Possíveis rotas metabólicas identificadas para os microrganismos presentes em C1 e C2, baseadas na literatura. Os compostos destacados com linha tracejada foram monitorados neste estudo

Figura 23 - Possíveis rotas metabólicas identificadas para os 88 microrganismos presentes em C3, baseadas na literatura. Os compostos destacados com linha tracejada foram monitorados neste estudo

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Tabela resumo das condições de tratamento aplicadas para promover degradação de anilina	40
Tabela 2 -	Concentração de macronutrientes na solução final do efluente sintético	43
Tabela 3 -	Concentração de micronutrientes na solução final do efluente sintético	43
Tabela 4 -	Amostras analisadas para ecotoxicologia do experimento; a: afluente; e: efluente; AT: Antes do tratamento; DT: Após o tratamento	47
Tabela 5 -	Parâmetros cinéticos de C1, C2 e C3, ajustados com o software Origin <sup>MT</sup>	51
Tabela 6 -	Índices de diversidade para o Inóculo e em C1, C2 e C3, em âmbito de gênero	70
Tabela 7 -	Gêneros microbianos presentes em C1, C2 e C3 que apresentam crescimento utilizando anilina ou seus subprodutos como fontes de carbono, segundo a literatura	76
Tabela 8 -	Gêneros microbianos presentes em C1, C2 e C3, que apresentam crescimento utilizando compostos aromático como fontes de carbono, segundo a literature	78
Tabela 9 -	Gêneros microbianos que permaneceram com AR > 1% em C1, C2 e C3 e suas ARs em cada condição	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIT	Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção
APLCP	Arranjo Produtivo Local de Confecções de Pernambuco
AR	abundância relativa
AT	pré-tratamento
ATP	adenosina trifosfato
A/M	Relação alimento/microrganismos
BOS	bactérias oxidadoras de sulfeto/enxofre
BRS	bactérias redutoras de sulfato
C1	Condição 1 (30 minutos de microaeração a cada 2 horas)
C1a	amostra para estudo de toxicidade antes do início da primeira injeção da Condição C1
C1e	amostra para estudo de toxicidade após a degradação completa da terceira injeção da Condição C1
C2	Condição 2 (15 minutos de microaeração a cada 2 horas)
C2a	amostra para estudo de toxicidade antes do início da primeira injeção da Condição C2
C2e	amostra para estudo de toxicidade após a degradação completa da terceira injeção da Condição C2
C3	Condição 3 (10 minutos de microaeração a cada 2 horas)
C3a	amostra para estudo de toxicidade antes do início da primeira injeção da Condição C3
C3e	amostra para estudo de toxicidade após a degradação completa da terceira injeção da Condição C3
CEE	Comunidade Econômica Europeia
Chao-1	indicador de riqueza
CIP	Índice de Performance de Competitividade Industrial
CN	controle negativo
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
D	índice de dominância de Simpson

DA	digestão anaeróbia
DAD	detector de arranjo de diodo
DB22	<i>Direct Black 22</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
DT	pós-tratamento
EPA	Environmental Protection Agency
$\gamma$ -GA	$\gamma$ -glutamil anilide
H	índice de Shannon
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
J	índice de equitabilidade
k	coeficiente cinético de decaimento
LQ	limite de quantificação
MDI	Metileno Difenil Diisocianato
OD	oxigênio dissolvido
ORP	potencial de oxirredução
P10	Perfil da condição C3
P15	Perfil da condição C2
PAH	hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
PBS	solução tampão de fosfato
pH	potencial hidrogeniônico
PIA	Pesquisa Industrial Anual
PIB	Produto Interno Bruto
POP	poluentes orgânicos persistentes
R <sup>2</sup>	qualidade do ajuste
S	número de gêneros
SSV	sólidos suspensos voláteis
T	temperatura
t	tempo
t <sub>1</sub>	tempo necessário para atingir máxima remoção
t <sub>1/2</sub>	tempo de meia-vida

$t_{total}$	tempo total de degradação
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VMP	valores máximos permitidos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
1.1	OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS	21
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>23</b>
2.1	ANILINA	23
2.2	ÁGUAS RESIDUÁRIAS CONTENDO ANILINA E SITES CONTAMINADOS	24
2.3	TOXICIDADE DA ANILINA E SEUS SUBPRODUTOS	28
2.4	BIODEGRADAÇÃO DE ANILINA	29
<b>2.4.1</b>	<b>Rota metabólica aeróbia da biodegradação da anilina</b>	<b>31</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Rota metabólica anaeróbia da biodegradação da anilina</b>	<b>33</b>
2.5	APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DA MICROAERAÇÃO INTERMITENTE	35
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>38</b>
3.1	INÓCULO	38
3.2	COMPOSTOS ORGÂNICOS MONITORADOS	39
3.3	CONDIÇÕES E APARATO EXPERIMENTAL	40
3.4	MEIO MINERAL	42
3.5	PERFIS TEMPORAIS REALIZADOS PARA C2 E C3	43
3.6	MÉTODOS ANALÍTICOS	44
<b>3.6.1</b>	<b>Parâmetros físico-químicos</b>	<b>44</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Análises de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)</b>	<b>44</b>
3.7	PARÂMETROS CINÉTICOS	45
3.8	BIOLOGIA MOLECULAR (EXTRAÇÃO DE DNA E ANÁLISE DE DIVERSIDADE MICROBIANA)	46

<b>3.8.1</b>	<b>Coleta e preservação de amostras, extração do DNA e quantificação da concentração</b>	<b>46</b>
<b>3.8.2</b>	<b>Sequenciamento do material genético e bioinformática</b>	<b>46</b>
3.9	TESTES DE ECOTOXICIDADE	47
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>49</b>
4.1	CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DA ANILINA	49
4.2	MONITORAMENTO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS (PH, ORP E OD)	55
4.3	ANÁLISE DOS SUBPRODUTOS	59
4.4	ANÁLISE DOS PERFIS	62
4.5	ECOTOXICIDADE	66
4.6	ANÁLISE DA MICROBIOTA DO INÓCULO E FINAL DAS CONDIÇÕES C1, C2 E C3	70
<b>4.6.1</b>	<b>Diversidade microbiana</b>	<b>70</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Análise da dinâmica da comunidade microbiana</b>	<b>73</b>
4.6.2.1	Gêneros microbianos chave em C1 e C2	79
4.6.2.2	Gêneros microbianos chave em C3	85
4.6.2.3	Avaliação da dinâmica da comunidade de C1 a C3	88
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES E SUGESTÕES</b>	<b>91</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>94</b>
	<b>ANEXO A - METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO DO DNA PELO FABRICANTE DO KIT POWERSOIL™</b>	<b>108</b>
	<b>ANEXO B - METODOLOGIA UTILIZADA PARA SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS DE DNA</b>	<b>109</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A indústria de transformação tem papel muito importante para a economia mundial pois reúne os setores industriais nos quais a matéria-prima é transformada em produto final, participando efetivamente na fabricação de bens de consumo. Mundialmente, o Brasil é o 40º país de 152 países ranqueados de acordo com o índice de desempenho de competitividade industrial (CIP) e o primeiro quando se consideram apenas os países da América Latina (UNIDO, 2020), fazendo com que o gerenciamento dos resíduos gerados por esse ramo industrial no Brasil seja igualmente de grande relevância.

De acordo com a Pesquisa Industrial Anual (PIA) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2020), a indústria da transformação, só no estado de Pernambuco, conta com 4.851 unidades locais, sendo 8,1% dessas unidades correspondentes à soma das indústrias de fabricação de coque, produtos derivados de petróleo, biocombustíveis, produtos químicos, farmoquímicos e farmacêuticos, produtos de borracha e de material plástico. Também das 4.851 unidades, 26% são correspondentes somente à fabricação de produtos têxteis e confecção de artigos de vestuário e acessórios.

O setor da indústria em Pernambuco é responsável por 20,9% do Produto Interno Bruto (PIB) estadual e as indústrias de derivados de petróleo e biocombustíveis representam 7,5% do PIB industrial do estado, ficando atrás somente dos setores de construção civil, alimentos e serviços públicos (CNI, 2020). A importância dos setores da indústria da transformação não se resume somente ao seu valor econômico, mas também à geração e ao gerenciamento dos seus resíduos.

A anilina é um composto aromático artificial perigoso que é extensivamente utilizado como matéria-prima em diversos setores industriais como a fabricação de polímeros, plásticos, compostos químicos orgânicos sintéticos, borrachas, corantes, pesticidas e produtos farmacêuticos (ARORA, 2015; SANG et al., 2019). Em grande parte dos setores da indústria da transformação a anilina é encontrada nos resíduos das cadeias de produção, sendo despejada no meio ambiente por meio da má administração de efluentes industriais ou por desastres de derramamento de resíduos.

Outro destaque presente no estado de Pernambuco é referente às indústrias têxteis e de confecção de vestuários, destacando-se a presença do Arranjo Produtivo Local de Confecções de Pernambuco (APLCP), no Agreste do estado, que abrange três municípios centrais da região, Caruaru, Toritama e Santa Cruz do Capibaribe. O APLCP é um importante polo industrial e também é responsável pelo lançamento de efluentes têxteis nos corpos d'água.

Os corantes do tipo azo representam a maior parte dos corantes sintéticos utilizados por esse setor e são substâncias tóxicas. No processo de degradação anaeróbia através da clivagem reductiva da ligação azo, os corantes são biotransformados em aminas aromáticas (ARORA, 2015; O'NEILL et al., 2000), subprodutos que podem ser ainda mais tóxicos do que os corantes e apresentam potencial carcinogênico.

Brüschweiler e Merlot (2017) identificaram 40 tipos diferentes de aminas aromáticas como mutagênicas e estas são potencialmente originadas na degradação anaeróbia de aproximadamente 180 corantes azo utilizados pelas indústrias têxteis. A anilina é a amina aromática mais simples que pode ser encontrada, sendo formada pelo anel benzênico sem a presença de radicais, excetuando-se apenas a presença do grupo amino.

A anilina é classificada pela Comunidade Econômica Europeia (CEE) como um produto perigoso para a saúde e para o meio ambiente e é controlada por legislação (European Parliament, Council of the European Union, 2008), devido a seu crescente descarte no meio ambiente. Quando na natureza, pode ser incorporada ao solo, por meio de transformações químicas com ácidos húmicos e fúlvicos e ser facilmente incorporada à matéria orgânica coloidal, apresentando recalcitrância a degradação anaeróbia (BALAPURE et al., 2016; QI; CHEN; LIU, 2015).

É um composto que não é ambientalmente amigável devido às suas características de toxicidade à vida aquática, causando danos ao material genético através da inibição dos processos de fotossíntese e de respiração celular. A sua bioacumulação pode prejudicar a saúde de animais e seres humanos, pois a anilina pode ser transformada em metabólitos ainda mais tóxicos que afetam o baço e o sistema nervoso, levando a disfunções celulares, apoptose e necrose, mutagênese,

tumorigênese e respostas carcinogênicas em mamíferos (MAKHDOUMI et al., 2018). A disposição de resíduos industriais, sem o devido tratamento, apresenta perigo para os ecossistemas aquáticos e também à saúde pública, se mostrando necessário o estudo dos mecanismos de degradação deste composto e seus similares.

O uso da digestão anaeróbia (DA) para biomineralização da anilina é possível, como demonstrado pela primeira vez por Schnell et al. (1989), e novamente mais tarde por Kahng et al. (2000), mas pouco estudado. Isso decorre do fato de ser bem mais lento do que a já bem estabelecida degradação aeróbia. A introdução da microaeração nos processos de DA deve ser capaz de favorecer o processo de degradação por meio da diversificação das comunidades bacterianas facultativas, beneficiando o processo de abertura do anel aromático e promovendo a estabilidade geral do processo.

Em condições microaeróbias, as bactérias facultativas conseguem trocar mais facilmente da rota metabólica de fermentação anaeróbia para a respiração aeróbia, que apresenta melhor cinética e é termodinamicamente mais vantajosa (NGUYEN; KHANAL, 2018). A combinação da microaeração com os processos de DA possibilita a aceleração do processo anaeróbio e sua estabilização, enquanto reduz os custos associados ao processo de aeração convencional e a sua produção de lodo.

Levando em consideração os efeitos causados por este composto e a dificuldade encontrada na sua remoção do meio ambiente pelas suas características de recalcitrância, a biodegradação da anilina em ambiente anaeróbio intermitentemente microaerado pode ser um método de remediação por bioestimulação. Um melhor entendimento deste método pode auxiliar na elucidação dos mecanismos da degradação de aminas aromáticas.

A baixa demanda de oxigênio no sistema poderá resultar em concentrações de  $O_2$  que podem ser suficientes para a mineralização deste composto recalcitrante, dando suporte à existência de culturas que toleram ambos ambientes, anaeróbio e aeróbio. Neste estudo avaliou-se a cinética de biodegradação da anilina e a formação de subprodutos intermediários, bem como a remoção de ecotoxicidade, em ambiente anaeróbio associado a diferentes condições de microaeração intermitente, caracterizando também a microbiota desenvolvida nas condições aplicadas.

## 1.1 OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a degradação da anilina em ambiente anaeróbio com microaeração. Para tanto foram estabelecidos como objetivos específicos:

- a) estimar parâmetros cinéticos de degradação da anilina para cada período de microaeração intermitente utilizado;
- b) avaliar a influência da microaeração intermitente na dinâmica de produção e consumo de catecol e ácido benzoico, como subprodutos intermediários, aeróbio e anaeróbio, respectivamente, da biodegradação de anilina;
- c) analisar grau de toxicidade em cada condição estudada;
- d) analisar e acompanhar o desenvolvimento da comunidade microbiana e o seu papel na biodegradação da anilina.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

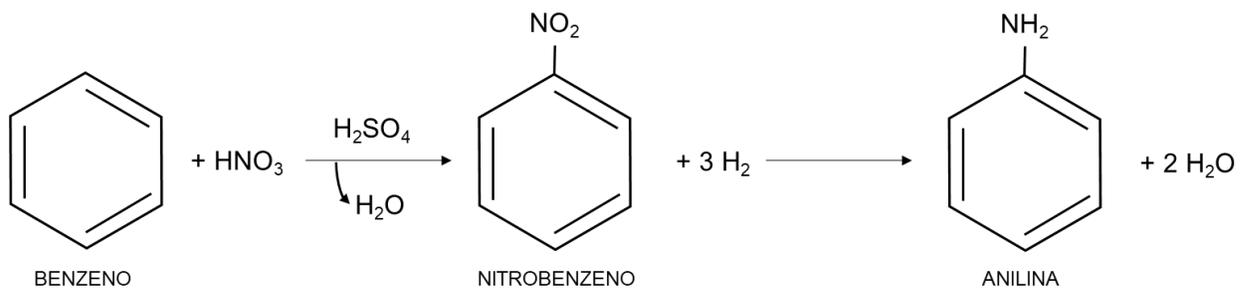
### 2.1 ANILINA

A anilina foi descoberta através da destilação do corante índigo (ou anil) como um importante intermediário de corantes em 1826, por Unverdoben (JOHNSTON, 2008). No entanto, foi somente após a descoberta do benzeno e da reação de nitratação seguida de hidrogenação deste composto, resultando em anilina (Figura 1), por Zinin e Hoffman em 1845, que essa começou a ser fabricada em larga escala (GRIFFITHS, 1990).

Sua utilização como matéria-prima para diversos corantes têxteis iniciou-se um ano após a descoberta do corante sintético malva por William Perkin, em 1856 (JOHNSTON, 2008), surgindo o termo popular “anilina” para os corantes, tendo sido utilizada para fabricá-los desde então. Apesar de seu descobrimento ter se dado por meio da indústria dos corantes, hoje é também largamente utilizada na produção de poliuretano (KÄFFERLEIN et al., 2014) e inseticidas (TAO et al., 2017).

Figura 1 - Reação de formação da anilina através da nitratação do benzeno por meio de mistura lenta sulfonítrica, seguida de posterior hidrogenação do nitrobenzeno, por Zinin e Hoffman.

Reação é altamente exotérmica



Fonte: a autora (2021).

Formada por um agrupamento amino ligado ao anel benzênico, com fórmula molecular  $\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$ , a anilina é muito utilizada na fabricação de uma grande variedade de produtos como espuma de poliuretano, corantes sintéticos, anti oxidantes,

farmacêuticos, estabilizantes para a indústria da borracha, vernizes, derivados de petróleo e explosivos (ARORA, 2015; CHATURVEDI e KATOCH, 2020). Sendo assim, também encontrada em efluentes dessas cadeias de produção (CHEN; SUN; CHUNG, 2009; JIANG et al., 2016). O principal produto químico que tem a anilina como matéria-prima atualmente é o Metileno Difenil Diisocianato (MDI), utilizado na fabricação do poliuretano, polímero utilizado em espumas rígidas e flexíveis, com aplicação na construção civil como isolante térmico, indústria de móveis, fabricação de pneus, colchões e automóveis (GAMA; FERREIRA; BARROS-TIMMONS, 2018). A anilina, também chamada fenilamina ou aminobenzeno, é um composto aromático bastante tóxico, apresentando toxicidade em microcrustáceos (ABE et al., 2001), genotoxicidade e inibição do crescimento em vegetal superior (TAO et al., 2017), toxicidade no baço e neurotoxicidade em ratos (MAKHDOUMI et al., 2018) e ação co-mutagênica e tumorigênica em humanos quando combinada com  $\beta$ -carbolicinas (TOTSUKA e WAKABAYASHI, 2020).

## 2.2 ÁGUAS RESIDUÁRIAS CONTENDO ANILINA E SITES CONTAMINADOS

Nos últimos anos têm-se dado cada vez mais importância ao estudo e gerenciamento da qualidade das águas, impulsionados pelo aumento dos problemas ambientais relacionados à poluição dos corpos d'água (VIKRANT et al., 2018). A introdução de anilina no meio ambiente por meio do lançamento de águas residuárias contaminadas é bastante preocupante.

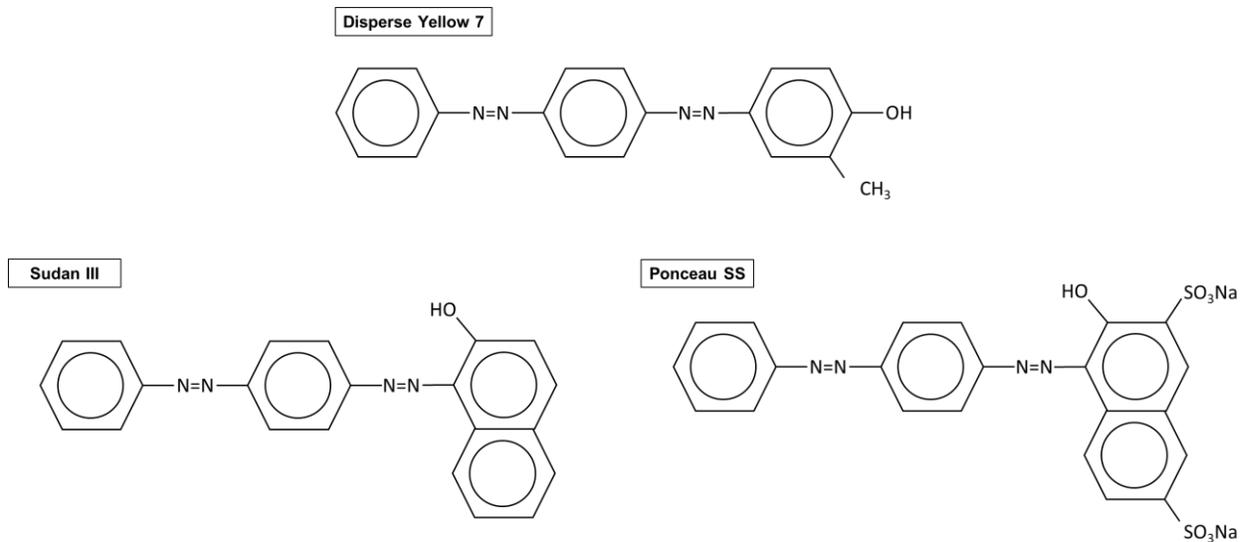
Efluentes industriais, escoamento superficial contaminado com químicos agrícolas e esgotos domésticos contendo concentrações de anilina e outras aminas aromáticas ou poluentes xenobióticos, se dispostos sem o devido tratamento, podem ocasionar danos ambientais severos, contaminando os corpos d'água superficiais e subterrâneos e apresentando elevada toxicidade em ambientes aquáticos (DOM et al., 2010), impactando negativamente o ecossistema, modificando a qualidade da água e inibindo a fotossíntese aquática (BAÊTA et al., 2015; MATA, PINHEIRO e LOURENÇO, 2015; STARLING et al., 2017).

Em Pernambuco, a anilina está ligada a forte presença da indústria têxtil no Agreste do estado, por meio do Arranjo Produtivo Local de Confeções de Pernambuco (APLCP) que engloba as cidades de Caruaru, Toritama e Santa Cruz do Capibaribe, com grande importância social e econômica. Segundo a ABIT (2020), o Brasil tem a maior Cadeia Têxtil completa do Ocidente (desde a produção das fibras às indústrias de beneficiamento dos tecidos, confeções, varejo e desfiles de moda), sendo o quarto maior produtor e consumidor de denim do mundo, produzindo também uma grande quantidade de resíduos líquidos providos de alta concentração de cor, matéria orgânica e produtos químicos recalcitrantes.

Os compostos químicos têxteis exibem propriedades tóxicas e até mutagênicas ou carcinogênicas. Os corantes do tipo azo, que representam de 60%–80% dos corantes usados na indústria têxtil, quando degradados anaerobiamente por meio da clivagem redutiva da ligação azo, geram aminas aromáticas, compostos ainda mais tóxicos, incluindo a anilina ( KÖCHLING et al., 2017, CARVALHO et al., 2020).

Pielesz et al. (2002) estudaram a redução de diferentes corantes azo e verificaram que os corantes *Disperse Yellow 7*, *Sudan III* e *Ponceau SS* (Figura 2) geravam anilina e p-fenilenodiamina como subprodutos. Segundos os autores, as proporções destas aminas aromáticas foram 256, 110 e 160 g de aminas aromáticas por quilo de corante utilizado, respectivamente para os corantes testados. Gang e colaboradores (2019) estudaram a presença de anilina em efluente de reator UASB (*Up-flow Anaerobic Sludge Blanket*) e observaram concentrações que variaram entre 3,34 mg.L<sup>-1</sup> e 22,5 mg.L<sup>-1</sup> após tratamento de efluente têxtil real contendo corantes azo bifenilaminados.

Figura 2 - Exemplos de corantes azo que geram anilina como subproduto da degradação anaeróbia



Fonte: a autora (2021).

Além da disposição indevida dos efluentes nos corpos hídricos, a anilina também chega ao meio ambiente através dos desastres ambientais. Casos conhecidos de grandes derramamentos de anilina ocorreram ainda nesta década: em 2012, na China, a indústria de produtos químicos fertilizantes Tianji Coal Chemical Industry derramou 39 toneladas de anilina no rio Zhuozhang (CHINADAILY, 2013a) e em 2013 a Hebei Jianxin Chemicals, produtora de intermediários de corantes, contaminou água de abastecimento da província de Hebei, tendo sido detectadas concentrações da ordem 7 mg.L<sup>-1</sup> de anilina (CHINADAILY, 2013b). No ano de 2005, houve uma explosão em uma fábrica de anilina, na qual foram derramadas mais de 100 toneladas de nitrobenzeno e outros compostos no rio Songhua, também na China (LI et al., 2008), atingindo concentrações de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de nitrobenzeno a 400 km de distância do foco da contaminação.

Concentrações de diferentes compostos químicos xenobióticos também podem ser encontrados nas redondezas de indústrias fabricantes de produtos químicos, como no caso do estudo de Sun et al. (2015) que observaram monoclorobenzeno, diclorobenzeno, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), corantes e anilina, essa em concentrações variando de 6 µg.L<sup>-1</sup> a 61 mg.L<sup>-1</sup>, detectados no solo e nas

águas subterrâneas no entorno das instalações da fábrica, nos Estados Unidos. Devido a transformações químicas, a anilina ainda pode ser incorporada a substâncias húmicas presentes no solo e nas águas naturais por meio de ligações covalentes, formando outros compostos como anilino-hidroquinona, anilino-quinona, anilidas e nitrogênio heterocíclico (THORN et al., 1996).

Além da anilina, outros compostos aromáticos provenientes dos processos de exploração, transporte e armazenamento de derivados do petróleo são focos de contaminação do solo e de aquíferos (BESSER; HAMED, 2019; LIANG et al., 2009), caracterizando sério risco para a saúde humana. Estudos de casos demonstram persistência de problemas respiratórios em pescadores voluntários que participaram das operações de limpeza do material contaminante, após 5 anos de contaminação, por derramamento de óleo na costa da Espanha, em 2002 (ZOCK et al., 2012). Alteração do perfil sanguíneo, enzimas hepáticas e sintomas somáticos em voluntários das operações de limpeza do derramamento de óleo na costa do estado da Louisiana, nos Estados Unidos em 2010, foram observados em decorrência da exposição a compostos como benzeno e para-fenóis (D'ANDREA e REDDY, 2013). O estudo de processos de biorremediação da anilina pode elucidar mecanismos e rotas de degradação não só para a anilina, como também para outros compostos aromáticos e xenobióticos, cujo processo de degradação resulta na acumulação de anilina.

Na Resolução 430 do Conselho Nacional do Meio Ambiente, CONAMA (2011), fica estabelecido que não é permitido o lançamento de efluentes nos corpos hídricos que contenham Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs), porém não há maiores especificações sobre a abrangência do termo na Resolução; são estabelecidos alguns valores máximos permitidos (VMPs) nos efluentes a serem lançados para poluentes orgânicos específicos como Benzeno ( $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ), Etilbenzeno ( $0,84 \text{ mg.L}^{-1}$ ), Fenóis Totais ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), Tolueno ( $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e Xileno ( $1,6 \text{ mg.L}^{-1}$ ), no entanto a anilina não é um dos compostos orgânicos listados. O mesmo ocorre na Resolução 357, também do CONAMA (2005), sobre o enquadramento dos corpos hídricos. A carência de legislação brasileira que estabeleça limites mais específicos quanto à disposição de compostos xenobióticos no meio ambiente torna difícil o controle dos órgãos ambientais sobre o lançamento desses poluentes. Destaca-se que são necessárias metodologias

específicas e custosas para sua detecção, pois eles não são visíveis a olho nu, por serem incolores. Isso dificulta o controle do lançamento de substâncias como as aminas aromáticas e frequentemente leva a negligência do tratamento de efluentes industriais para remoção desses compostos tóxicos por determinadas empresas.

### 2.3 TOXICIDADE DA ANILINA E SEUS SUBPRODUTOS

A anilina é um composto que apresenta característica de resistência a degradação, sendo considerada um poluente perigoso e prioritário em avaliações de risco ambiental, por causar sérios danos ambientais em função de sua elevada toxicidade. No estudo de Dom et al. (2010) com anilina, 4-cloroanilina, 3,5-dicloroanilina e 2,3,4-tricloroanilina, verificou-se que a anilina foi o composto que apresentou maior toxicidade (i.e. muito tóxico) ao microcrustáceo *Daphnia magna*, dentre os 4 compostos testados. *D. magna* apresenta um papel importante no ecossistema aquático por ser predadora de bactérias, algas e protozoários e estar na base da cadeia trófica de alguns peixes, sendo considerada uma espécie padrão em testagem de toxicidade aquática por organizações como a *Environmental Protection Agency* (EPA) dos EUA.

A natureza hostil da anilina também foi observada em estudo com vegetal superior (Tao e colaboradores, 2017). Os autores verificaram efeitos genotóxicos nas células de raízes de trigo submetidas a crescimento em meio com anilina e inibição do crescimento em mudas de trigo.

Estudos em ratos demonstram que a exposição crônica a anilina em altas dosagens por inalação, administração oral ou percutânea podem apresentar toxicidade ao sistema nervoso e levar a destruição de células do baço, podendo evoluir para a formação de tumores e sarcomas (MAKHDOUMI et al., 2018). A exposição à anilina ocasionou o acúmulo de íons de ferro no baço de ratos, que resultaram na geração de radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (KHAN et al., 2003), ocasionando disfunção celular e resposta autoimune. Esses eventos têm potencial envolvimento no desenvolvimento de muitas doenças em seres humanos, como esclerose múltipla, diabetes, câncer, inflamações, doenças neurodegenerativas e doença arterial coronária (MAKHDOUMI et al., 2018).

Tanto a exposição a concentrações de anilina nos corpos hídricos quanto a exposição ocupacional por trabalhadores em contato direto com a anilina são preocupantes, por seus danos ao corpo humano. A anilina pode ser absorvida por ingestão, inalação ou pela pele e pode levar a formação de metahemoglobina, ocasionando a diminuição da capacidade de transporte de oxigênio no sangue e causando danos ao sistema cardiovascular e nervoso, podendo levar a anemia hemolítica e hemólise (MAKHDOUMI et al., 2018).

Um estudo controlado de exposição humana à anilina no ar com concentrações de 2 ppm ( $7,5 \text{ mg.m}^{-3}$ ), simulando ambiente ocupacional com jornada de trabalho de 8 horas, foi realizado por Käfferlein e colaboradores (2014). Os autores verificaram que a exposição à anilina levou ao aumento dos níveis de metahemoglobina no sangue de todos os voluntários expostos e que esses níveis também foram dependentes do tempo de exposição.

A Norma Brasileira Regulamentadora de atividades e operações insalubres considera a exposição à anilina dispersa no ar como grau máximo de insalubridade, com valor máximo aceitável de 4 ppm ( $15 \text{ mg.m}^{-3}$ ), para jornada de trabalho de até 48h semanais (ABNT, 2019), enquanto na legislação alemã o valor máximo é de 2 ppm ( $7,7 \text{ mg.m}^{-3}$ ) (BMAS, 2020) e na americana 5 ppm ( $19 \text{ mg.m}^{-3}$ ) (USDOL, 2020). A exposição a elevadas concentrações ou em regime crônico pode ocasionar diversos sintomas como fraqueza, cianose, dor de cabeça, confusão mental, vômito, tontura, perda de coordenação motora e pode levar ao coma (MAKHDOUMI et al., 2018).

## 2.4 BIODEGRADAÇÃO DE ANILINA

O uso de microrganismos para degradação de compostos orgânicos complexos está cada vez mais em evidência, devido às vantagens apresentadas em relação aos tratamentos físico-químicos. A degradação de compostos aromáticos e xenobióticos com o uso de microrganismos tem como uma das vantagens em relação aos processos físico-químicos a biotransformação de compostos tóxicos e recalcitrantes em subprodutos atóxicos quando mineralizados, como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ , água e sais inorgânicos.

Os processos de tratamento físico-químicos são em geral bastante eficientes quanto à remoção dos compostos complexos (GANG et al., 2019; MOREIRA et al., 2017), porém a grande geração de lodo químico vai ao encontro de problemas ambientais relacionados à disposição dos resíduos e aos impactos negativos desses compostos tóxicos no ambiente (POURAN et al., 2015).

As tecnologias de tratamento biológico dos poluentes orgânicos incluem processos de biorremediação que podem ser realizadas *in-situ* (DUARTE et al., 2017), quando o composto é tratado no local da poluição, ou *ex-situ* (ZHU et al., 2020) por meio da extração do meio contaminado e tratamento em reatores.

Os processos de degradação aeróbia ou anaeróbia de poluentes podem ocorrer naturalmente no local da poluição ou com auxílio de tecnologias de engenharia facilitem a degradação dos compostos, mediante fornecimento de estímulos aos microrganismos. A variação de parâmetros abióticos como pH, oxigênio dissolvido, temperatura (bioestimulação) ou a introdução no ambiente de microrganismos que acelerem o processo de degradação (bioaugmentação) são métodos de biorremediação (FARHADIAN et al., 2008).

Nos processos *ex-situ*, existe maior facilidade em controlarem-se os fatores abióticos, otimizando-os, porém são necessárias a remoção do meio contaminado e a sua devolução ao meio ambiente após o tratamento, seja por reinserção do efluente tratado no *site* ou por lançamento nos corpos hídricos (FARHADIAN et al., 2008).

O uso de biotecnologias também apresenta a vantagem de serem ecologicamente amigáveis, por utilizarem rotas naturais para degradação dos compostos a fim de manter a qualidade da água, apresentando-se como processos simples, com potencial para economia de custos com produtos químicos, boa eficiência de degradação e que não produzem resíduos secundários (FARHADIAN et al., 2008). A anilina pode ser degradada biologicamente por processos aeróbios (HUANG et al., 2018; QI et al., 2015; WANG et al., 2011; XIAO et al., 2009) e também anaeróbios (ALEXANDRA DE et al., 1994; PEREIRA et al., 2011; SHEN et al., 2012; SUN et al., 2015), utilizando culturas mistas (CUI et al., 2017; MENEZES et al., 2019; PERES et al., 1998; QIAO et al., 2020) ou microrganismos isolados (DINO et al., 2019; HONGSAWAT e VANGNAI, 2011; XIE e MÜLLER, 2019; ZHANG et al., 2008).

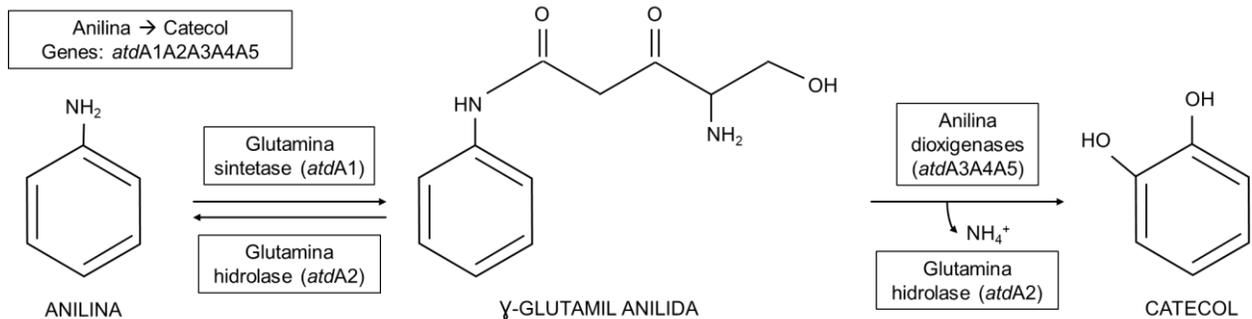
#### 2.4.1 Rota metabólica aeróbia da biodegradação da anilina

A rota metabólica mais estudada da degradação da anilina é a rota aeróbia. Por ser energeticamente mais favorável, é bastante utilizada para remoção de monoaromáticos e é capaz de remover até 99% dos poluentes da água (FARHADIAN et al., 2008). A rota aeróbia melhor estabelecida na literatura é a do catecol, com algumas bactérias aeróbias isoladas e caracterizadas que carregam genes envolvidos com a mineralização aeróbia da anilina, mediante formação de catecol e sua degradação a intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico.

A degradação da anilina pela rota do catecol pode ocorrer por meta ou orto-clivagem. Por meta-clivagem é reportada em *Pseudomonas putida* UCC22 (FUKUMORI; SAINT, 1997), *Acinetobacter* sp. YAA (FUJII; TAKEO; MAEDA, 1997), *Delftia tsuruhatensis* AD9 (LIANG et al., 2005) e *Delftia* sp. AN3 (ZHANG et al., 2008), enquanto a orto-clivagem envolve bactérias como *Frateuria* sp. ANA-18 (MURAKAMI et al., 2003) e *Delftia* sp. XYJ6 (XIAO et al., 2009).

A rota de degradação aeróbia da anilina pelo intermediário catecol acontece em múltiplas etapas, a primeira etapa sido elucidada no estudo de Takeo e colaboradores (2013), que recombinaram os genes *atdA1* a *atdA5* da bactéria *Acinetobacter* sp. YAA em cepa de *Pseudomonas*. A oxidação da anilina até o seu metabólito principal, o catecol, ocorre com liberação do grupo amino e se dá através da ação de um conjunto de três enzimas, passando por um intermediário, o  $\gamma$ -glutamil anilida ( $\gamma$ -GA) (Figura 3). Primeiro a enzima glutamina sintetase combina a anilina ao L-glutamato, produzindo  $\gamma$ -GA, em presença de ATP e  $MgCl_2$ ; o  $\gamma$ -GA é então atacado por enzimas oxigenase, rompendo o anel aromático. Este produto oxidado é então hidrolisado em L-glutamato e um ciclohexadieno instável (1-amino-ciclohexa-3,5-dieno-1,2-diol), o qual espontaneamente forma catecol, com liberação de íons amônio e com provável participação da enzima do tipo glutamina hidrolase. Quando há acúmulo de  $\gamma$ -GA, a glutamina hidrolase promove a reação reversa deste composto em anilina, pois seu acúmulo pode inibir a atividade das enzimas oxigenase (TAKEO et al., 2013), mostrando-se citotóxico quando acumulado.

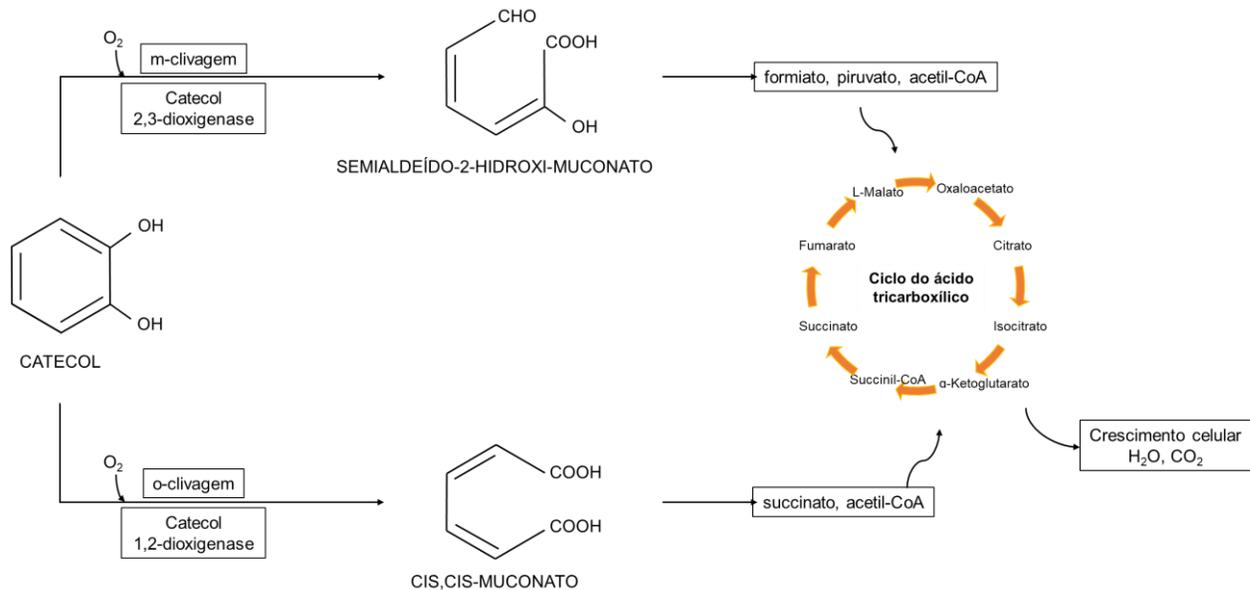
Figura 3 - Rota parcial da degradação aeróbia da anilina até o intermediário catecol, estudada em cepa de *Pseudomonas* com genes recombinantes de *Acinetobacter* sp. YAA, por Takeo *et al.* (2013)



Fonte: a autora (2021).

O intermediário catecol também é degradado aerobiamente, por orto ou meta clivagem (Figura 4). Na orto clivagem, o catecol é atacado pela enzima 1,2-dioxigenase, que promove a introdução do oxigênio no anel, rompendo-o e formando o semialdeído-2-hidroxi-muconato, que é degradado a formiato, piruvato e acetil-CoA. Já na meta clivagem, o catecol é atacado pela enzima 2,3-dioxigenase, formando o *cis,cis*-muconato e posteriormente indo a acetil-CoA e a succinato (AGHAPOUR; MOUSSAVI; YAGHMAEIAN, 2013). Os ácidos orgânicos entram no processo de respiração, contribuindo para o crescimento celular, formando  $\text{CO}_2$  e água.

Figura 4 - Rotas aeróbias de degradação do catecol, por meta-clivagem e orto-clivagem (AGHAPOUR; MOUSSAVI; YAGHMAEIAN, 2013)



Fonte: a autora (2021).

#### 2.4.2 Rota metabólica anaeróbia da biodegradação da anilina

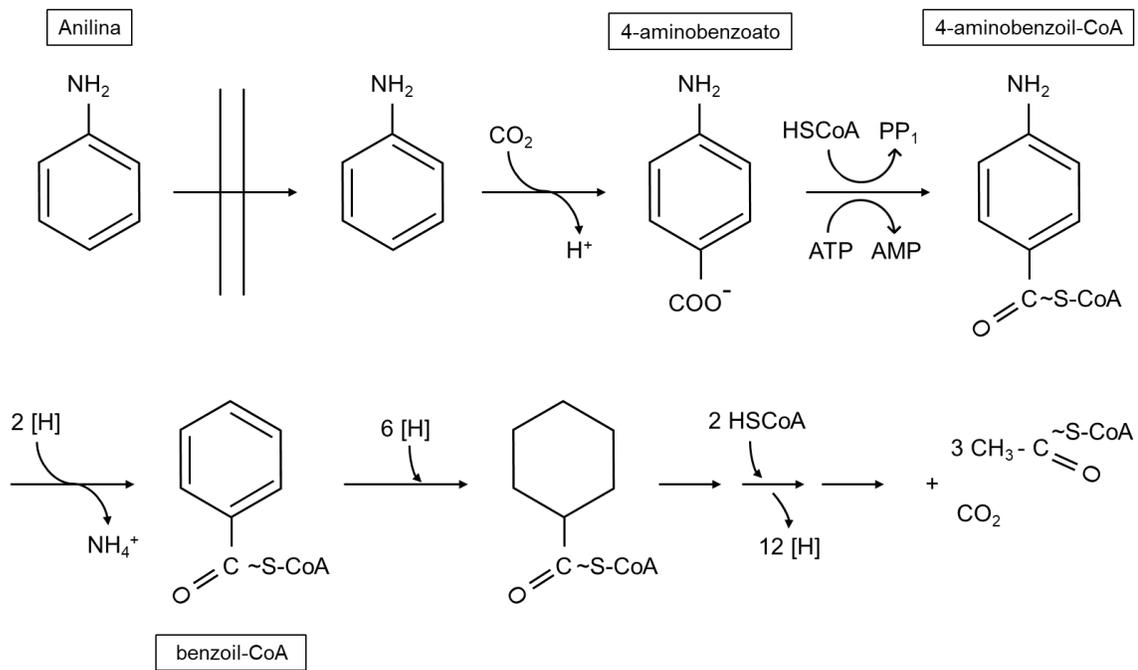
A degradação da anilina em condições anaeróbias foi observada em estudos como os de Alexandra De, O'connor e Kosson (1994), Pereira et al. (2011), Shen et al. (2012), Hu et al. (2014), Sun et al. (2015) e Li et al. (2020a), com a utilização de culturas mistas. No entanto, somente Schnell e Schink (1991) e Kahng, Kukor e Oh (2000) estudaram a degradação anaeróbia da anilina com bactérias isoladas e dão informações mais detalhadas sobre sua utilização como fonte de carbono e energia.

No estudo de Kahng, Kukor e Oh (2000) a bactéria *Delftia acidovorans* HY99 degradou 1 mM de anilina ( $93,13 \text{ mg.L}^{-1}$ ) em 7 dias, em condições anóxicas utilizando nitrato como acceptor de elétrons. Verificou-se que houve a formação de um intermediário da rota anaeróbia (ácido 4-amino-benzoico). Sun et al. (2015) utilizaram anilina marcada com carbono  $C^{13}$  para identificação de microrganismos degradadores em condições metanogênicas e identificaram as bactérias da espécie *Ignavibacterium album* como degradadoras de anilina. O estudo de Schnell, Bak e Pfennig (1989) foi o primeiro a relatar a degradação da anilina em condições anaeróbias com a bactéria

isolada *Desulfobacterium anilini*. Sulfato foi utilizado como aceptor de elétrons e a rota de degradação anaeróbica da anilina mediante estudos das reações passo a passo foi sugerida por Schnell e Schink (1991).

A rota sugerida por Schnell e Schink (1991) (Figura 5) se inicia com a carboxilação da anilina como passo inicial, por meio da ação de enzima descarboxilase, fazendo a rota reversa da carboxilação e formando o 4-aminobenzoato. A utilização de enzimas descarboxilase para realização de carboxilação de aromáticos, conhecida como a carboxilação de Kolbe-Schmitt enzimática, também foi verificada por Kirimura e colaboradores (2010), ao produzir ácido salicílico do fenol em condições normais de temperatura e pressão. O 4-aminobenzoato formado na carboxilação é ativado a 4-aminobenzoil-CoA e posteriormente reduzido a benzoil-CoA, com liberação do grupo amino na forma de íons amônio. O benzoil-CoA vai para a rota comum do benzoato e finaliza na formação de acetatos, entrando no ciclo do ácido tricarbóxico e contribuindo para o crescimento celular e produção de energia.

Figura 5 - Rota anaeróbica de degradação da anilina ao intermediário benzoato, identificada no microrganismo *Desulfobacterium anilini*, no estudo de Schnell e Shinck (1991)



Fonte: Adaptado de Schnell e Schink (1991).

## 2.5 APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DA MICROAERAÇÃO INTERMITENTE

Ainda não se tem muita informação sobre a degradação anaeróbia da anilina, apesar desta ser observada e rotas terem sido sugeridas pela literatura. Isso provavelmente se deve a baixa velocidade do crescimento de microrganismos na DA em relação ao processo aeróbio, dificultando a detecção de microrganismos capazes de degradar anilina anaerobiamente e tornando o estudo da degradação aeróbia deste composto mais atraente. A inserção da microaeração intermitente na DA traz à luz a possibilidade de aceleração do processo anaeróbio de degradação da anilina enquanto reduz os custos associados ao processo de aeração convencional e a sua produção de lodo. A microaeração promove o aumento da diversidade microbiana e assim beneficia as interações sintróficas entre diferentes grupos microbianos, promovendo o melhoramento da digestão anaeróbia (NGUYEN e KHANAL, 2018).

A combinação de processos de tratamentos biológicos anaeróbios e aeróbios é uma alternativa promissora, pois pode ser realizada em um único reator, visto que a co-existência de microrganismos anaeróbios e aeróbios em culturas mistas é possível. Muitas bactérias anaeróbias estritas têm capacidade para sobreviver em ambientes periodicamente oxigenados quando co-existindo com microrganismos aeróbios; estes criam micronichos anaeróbios por meio do consumo do oxigênio (FIELD et al., 1995; NGUYEN e KHANAL, 2018).

O uso de microaeração intermitente é uma tecnologia que tem potencial para ser utilizada no tratamento de diferentes efluentes industriais. No tratamento de efluentes têxteis, pode ser utilizada como pós-tratamento de efluente tratado em reator anaeróbio, com o objetivo de promover a remoção de aminas aromáticas e de toxicidade.

A clivagem redutiva de corantes do tipo azo resulta na formação de aminas aromáticas as quais, assim como a anilina, apresentam resistência à degradação anaeróbia, por atuarem como doadores de elétrons e apresentarem maior toxicidade do que o corante. O uso da microaeração como pós-tratamento anaeróbio de efluentes têxteis foi utilizado por Balapure et al. (2016), removendo aminas aromáticas e

promovendo diminuição da toxicidade, além da remoção de DQO e cor residuais do tratamento anterior.

Ainda na temática de tratamento de efluentes têxteis, a microaeração tem potencial para aplicação em uma única unidade de tratamento, tanto promovendo redução dos corantes têxteis e remoção de DQO, quanto removendo aminas aromáticas e toxicidade. Menezes e colaboradores (2019) compararam o tratamento com microaeração contínua e intermitente, demonstrando que o processo intermitente, além do tratamento de corantes e seus subprodutos com mesma eficiência ou até maior que a microaeração contínua, potencializava a diminuição de custos com aeração.

Nos processos de biorremediação, tanto em solos e subsolos contaminados com poluição recorrente devido ao uso de pesticidas, por vazamento de derivados de petróleo ou mau gerenciamento de resíduos industriais, quanto em casos de desastres ambientais, a microaeração pode ser utilizada (SIQUEIRA et al., 2018). A introdução de oxigênio como método de bioestimulação é usada para biorremediação de solos contaminados com PAHs, que também apresentam recalcitrância à degradação, assim como os monocíclicos (KUPPUSAMY et al., 2017).

Chagas-Spinelli et al. (2012) utilizaram aeração para remoção de hidrocarbonetos, em solo contaminado com óleo diesel e Duarte et al. (2017) identificaram genes envolvidos na produção de enzimas do tipo oxigenase presentes na rota de degradação central de aromáticos monocíclicos em um solo contaminado por aromáticos policíclicos e submetido a 12 anos de biorremediação.

Sun et al. (2015) identificaram microrganismos anaeróbios com potencial de degradação de anilina em um *site* contaminado com altas concentrações de anilina e também outros compostos químicos como PHAs, monoclorobenzeno e diclorobenzeno. Análises de OD nos *sites* acusaram teor de OD em faixas de até 1, 2 e 5 mg.L<sup>-1</sup>, em diferentes locais analisados, demonstrando que baixas doses de oxigênio podem ser suficientes para a degradação de anilina.

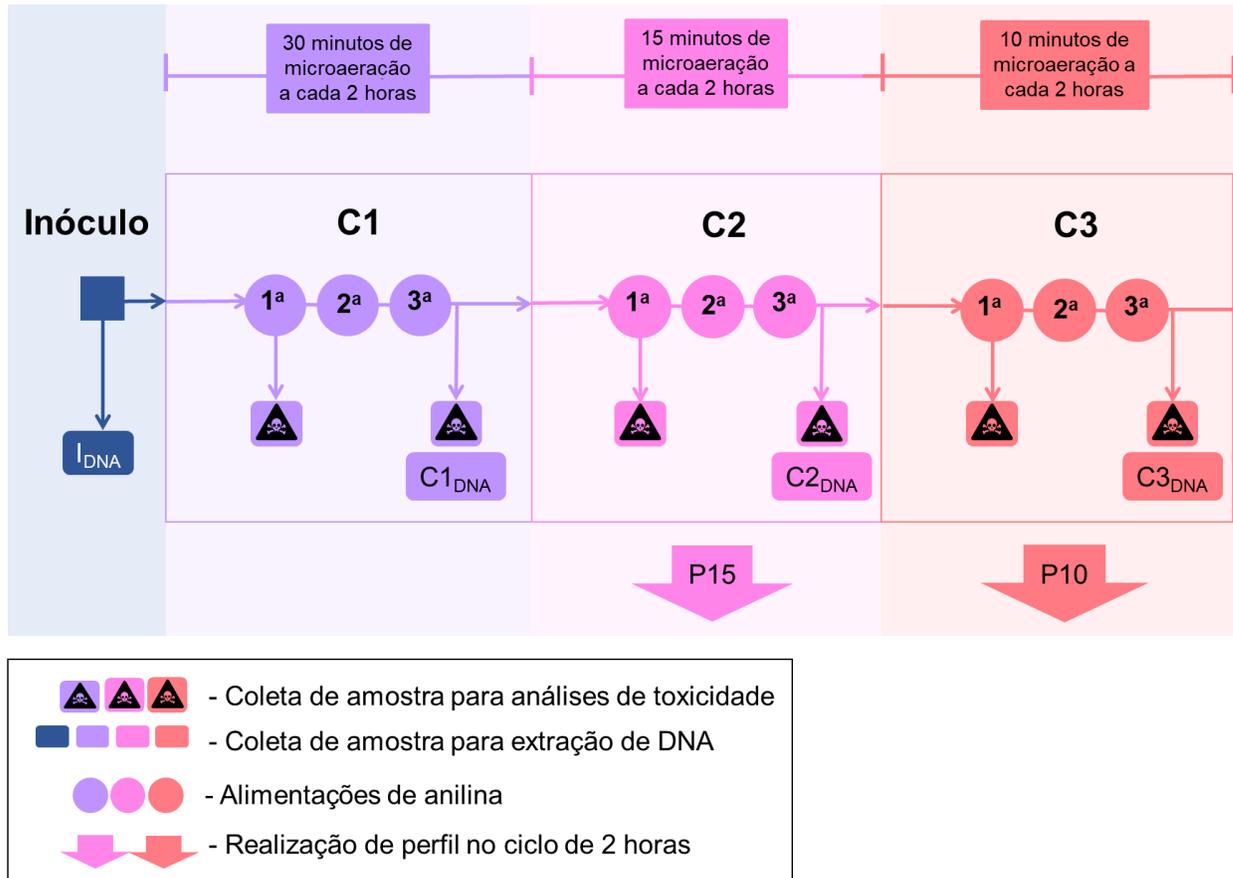
Ainda são escassos os estudos na literatura que reportam o uso de microaeração ou de aeração intermitente para biodegradação de compostos aromáticos como objetos de estudo principal (YANG et al., 2015; SIQUEIRA et al., 2018). A biodegradação de

compostos aromáticos por meio da digestão anaeróbia combinada com microaeração é uma área com bastante campo a ser explorado e bastante promissora.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado de acordo com as etapas discriminadas no fluxograma da Figura 6, sendo C1, C2 e C3 correspondentes às três condições de tratamento testadas e P15 e P10 os perfis realizados em C2 e C3, respectivamente, durante um ciclo microaerado-anaeróbio de duas horas. Mais detalhes de cada etapa serão explicados nas próximas Seções.

Figura 6 - Fluxograma das etapas realizadas no trabalho, por ordem de realização da esquerda para a direita



Fonte: a autora (2021).

#### 3.1 INÓCULO

O inóculo utilizado foi uma mistura de dois lodos provenientes de reatores do tipo UASB, um em escala piloto, que tratava efluente têxtil sintético no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA) na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em Recife, PE; e outro que tratava resíduos petroquímicos de indústria localizada na cidade de Ipojuca, PE, no Porto de Suape. A proporção usada foi de 2:1 (v:v), têxtil/petroquímico, sendo a concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) do lodo têxtil de 30,53 gSSV.L<sup>-1</sup>, a do lodo petroquímico de 2,03 gSSV.L<sup>-1</sup>, resultando em uma concentração final de inóculo de 20,63 gSSV.L<sup>-1</sup>.

Ambos os lodos, petroquímico e têxtil, foram elutriados previamente à mistura, com auxílio de centrífuga, para remoção de possíveis impurezas provenientes dos tratamentos UASB, como resíduos de corantes e fontes de carbono de fácil degradação a fim de minimizar efeitos de respiração endogênica ao início do tratamento. Utilizaram-se tubos de centrífuga de 50 mL, a 3500 rpm por 7 minutos, com solução tampão de fosfato (PBS 1x). O processo de centrifugação, descarte do conteúdo líquido e preenchimento com PBS foi realizado com 3 repetições.

### 3.2 COMPOSTOS ORGÂNICOS MONITORADOS

O composto alvo utilizado no experimento foi a anilina (CAS# 62-53-3). Sua fórmula molecular é C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NH<sub>2</sub>, peso molecular 93,13 g.mol<sup>-1</sup>, e pico de máxima absorção da luz em 230 nm; o padrão foi adquirido da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA), com 99% de pureza. A solução estoque foi preparada com água ultra purificada, em uma concentração de 5280 mg.L<sup>-1</sup> e mantida refrigerada a 4 ± 1 °C.

A concentração de anilina aplicada neste estudo foi de 0,14 mM (aproximadamente 13,2 mg.L<sup>-1</sup>) e foi calculada por meio da relação A/M de 1,535, que correspondeu a metade da A/M utilizada no trabalho de Carvalho (2020), a qual foi de 3,5.10<sup>-3</sup>, atentando para a elevada carga de toxicidade que seria aplicada na biomassa.

Foi monitorado o composto intermediário da rota aeróbia, o catecol (CAS# 120-80-9), com fórmula molecular C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-1,2-(OH)<sub>2</sub>, peso molecular 110,11 g.mol<sup>-1</sup> e pico de máxima absorção da luz em 280 nm; também foi monitorado o intermediário anaeróbio, ácido benzoico (CAS# 65-85-0), com fórmula molecular C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>COOH, peso molecular

122,12 g.mol<sup>-1</sup> e pico de máxima absorção da luz em 254 nm. Ambos os padrões também foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA), com 99% de pureza.

Foi monitorado também o composto ácido sulfanílico (CAS# 121-57-3), com fórmula molecular 4-(H<sub>2</sub>N)C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>3</sub>H, peso molecular de 173,19 mol.L<sup>-1</sup> e pico de absorção máxima da luz no comprimento de onda de 248 nm; com 99% de pureza, o padrão também foi adquirido da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA), sendo adicionado na concentração de 0,14 mM (aproximadamente 24,6 mg.L<sup>-1</sup>).

### 3.3 CONDIÇÕES E APARATO EXPERIMENTAL

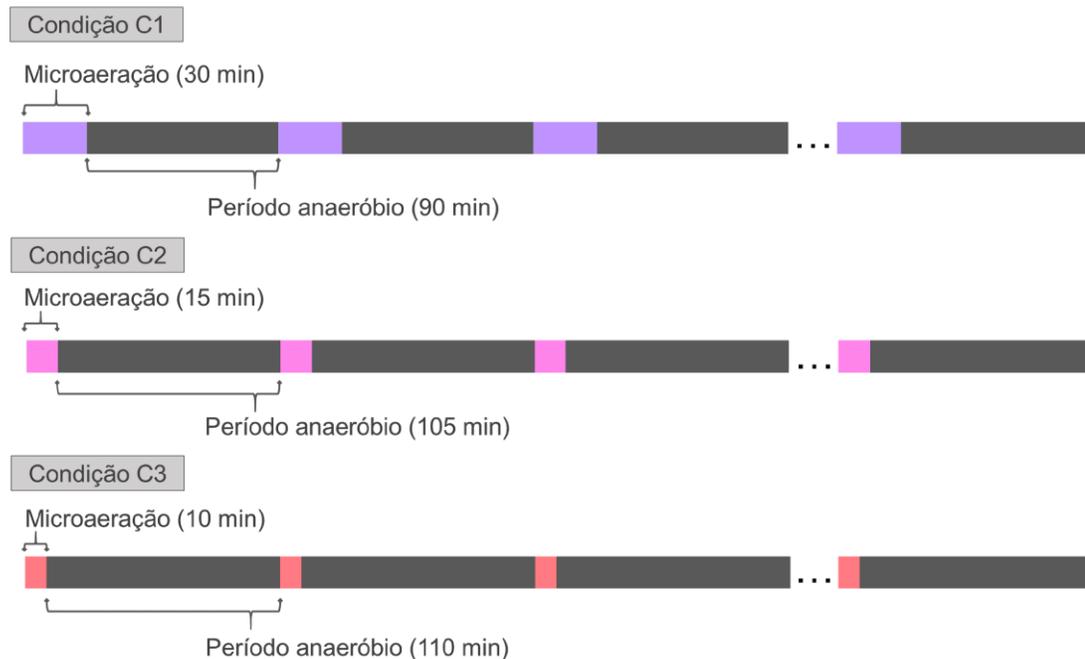
O experimento de biodegradação foi conduzido em três diferentes condições de tratamento (Tabela 1), testadas em estratégia de bateladas alimentadas sequenciais. As condições eram diferenciadas pelo tempo de aplicação da microaeração. Estas consistiam em ciclos de operação anaeróbios de duas horas, nos quais havia introdução de microaeração no início do ciclo, com durações de 30, 15 e 10 minutos para as condições C1, C2 e C3, respectivamente. Esses três tempos foram testados com o intuito de melhorar a eficiência energética do processo de tratamento. Os ciclos de microaeração eram continuamente repetidos até a degradação completa do composto adicionado (Figura 7).

Tabela 1 - Tabela resumo das condições de tratamento aplicadas para promover degradação de anilina

Condição	Injeções	Divisão do ciclo de 2 horas	
		Período microaerado (min)	Período anaeróbio (min)
C1	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	30	90
C2	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	15	105
C3	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	10	110

Fonte: a autora (2021).

Figura 7 - Esquema de distribuição do tempo do ciclo em cada condição de tratamento



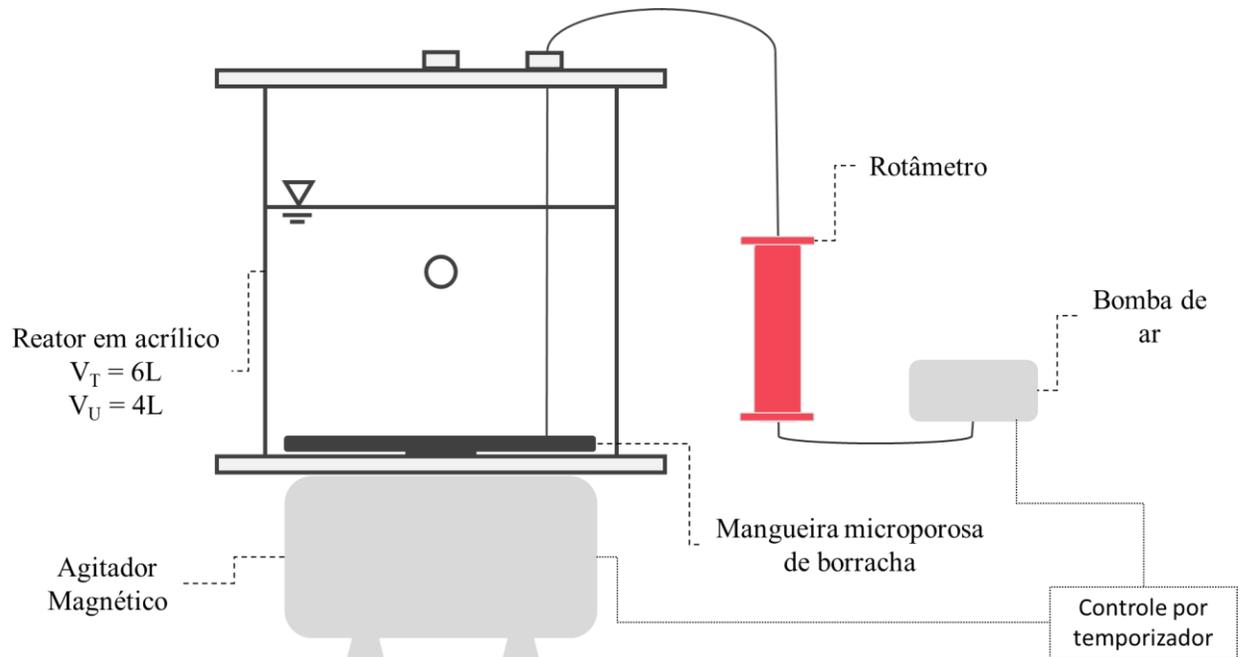
Fonte: a autora (2021).

Um reator em escala de bancada confeccionado em acrílico (Figura 8), com 20 cm de diâmetro interno e 19 cm de altura, com um volume total de 6L e volume reacional de 4L, foi utilizado em todas as etapas do experimento.

A microaeração era promovida por bomba de ar (Jad Air-Pump S-2000, Brasil), conectada a uma mangueira micro porosa de borracha (Resun Air Curtain, China) posicionada no fundo do reator. O fluxo era controlado por um rotômetro (Tecnofluid RV-140-K-7-P, Brasil) a  $0,25 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ . A intermitência da aeração era controlada por temporizador (Clip CLB-40, Brasil). O agitador magnético (Ceramag Midi, EUA) foi utilizado para promover o melhor contato entre as partículas de biomassa e o oxigênio artificialmente fornecido. A concentração da biomassa no licor misto foi de  $7,5 \text{ gSSV}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Quando a anilina era consumida completamente, era realizada a complementação da fase líquida até o volume útil e reposição da concentração de anilina. Nas trocas de condições de tratamento havia um período de sedimentação de 2 horas, seguido de esvaziamento da fase líquida com realimentação. Todo o experimento foi conduzido em temperatura ambiente a  $27,4 \pm 0,7 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Figura 8 - Esquema do reator de acrílico, com agitação magnética, microaeração fornecida por bomba de ar e controlada por meio de rotâmetro e temporizador.  $V_t$  = volume total;  $V_u$  = volume útil



Fonte: a autora (2021).

### 3.4 MEIO MINERAL

O meio mineral foi composto de macro e micro nutrientes, como pode ser visto nas Tabela 2 e Tabela 3. Soluções estoque, concentradas 10x para macro nutrientes e 1x para micro nutrientes, foram preparadas com água deionizada. Utilizou-se  $1 \text{ mL.L}^{-1}$  da solução de micronutrientes no efluente sintético final e a solução de macro nutrientes era diluída a 1x ao ser adicionada ao reator.

Tabela 2 - Concentração de macronutrientes na solução final do efluente sintético

<b>Macro nutrientes</b>	<b>Concentração (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
NH <sub>4</sub> Cl	280
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	252
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	100
CaCl <sub>2</sub>	70

NaHCO<sub>3</sub> foi utilizado somente na condição 3, na concentração de 400 mg.L<sup>-1</sup> (Carvalho et al., 2020).

Fonte: adaptado de Carvalho et al. (2020).

Tabela 3 - Concentração de micronutrientes na solução final do efluente sintético

<b>Micro nutrientes</b>	<b>Concentração (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
FeCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	2000
ZnCl <sub>2</sub>	50
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	500
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	142
NaSeO <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	164
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	38
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2000
AlCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	90
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> .Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	50
EDTA	1000
HCl	1 mL.L <sup>-1</sup>

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid

Fonte: adaptado de Carvalho et al. (2020).

### 3.5 PERFIS TEMPORAIS REALIZADOS PARA C2 E C3

Análises detalhadas dos ciclos de duas horas foram realizadas para as condições que apresentaram os melhores resultados de degradação da anilina (C2 e C3). Esta parte do experimento tinha o objetivo de compreender melhor a dinâmica do ciclo: o consumo do oxigênio e o processo de formação e consumo dos intermediários catecol e ácido benzoico, durante as fases anaeróbia e microaeróbia.

Os perfis P15, 15 minutos de microaeração e 105 minutos pós-microaeração e P10, 10 minutos de microaeração e 110 minutos pós-microaeração foram realizados durante C2 e C3, respectivamente.

O comportamento do ciclo foi avaliado por meio da coleta de amostras a cada dois minutos durante o período microaerado e a cada dez minutos no período não-microaerado, até o final de um ciclo de 2h. C2 teve um total de 19 amostras coletadas enquanto em C3, 17 amostras. O perfil do ciclo em C2 foi feito em uma nova alimentação, após a 3ª injeção, enquanto em C3 foi realizado durante a 2ª injeção.

### 3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.6.1 Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos foram monitorados junto com as amostras retiradas, utilizando um equipamento multi-parâmetros (Hach™ HQ40d multi), com método potenciométrico, de acordo com o *Standard Methods* (APHA, 2005): pH, temperatura, OD e potencial redox (ORP).

#### 3.6.2 Análises de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

Concentrações de anilina, catecol e ácido benzoico foram medidas utilizando Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC). O HPLC era equipado com um detector de arranjo de diodo (DAD) da Shimadzu™ (LC-20AT, Japão) e uma coluna Zorbax™ Eclipse XDB-C18 (5 µm, 4,6 x 250 nm) da Agilent™ (Santa Clara, EUA), em gradiente isocrático. A temperatura do forno foi de 30 °C. Amostras de 1 mL eram coletadas e filtradas em membranas Chromafil de nylon, 0,22 µm, da Macherey-Nagel™.

Para a quantificação da anilina, a fase móvel era composta de 30% de metanol (grau HPLC) e 70% solução tampão de fosfato (5 mM, pH = 7,0), com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. O volume de injeção foi de 20 µL e tempo total de corrida era de 12 minutos. A anilina foi identificada no comprimento de onda de 230 nm, em um tempo de retenção de 10,03 minutos.

Para a quantificação do catecol e ácido benzoico, a fase móvel era composta de 30% de acetonitrila (grau HPLC) e 70% de solução de ácido fosfórico 0,003%, com fluxo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 50 µL e tempo total de corrida de 13,5 minutos. O catecol foi identificado no comprimento de onda de 280 nm e o ácido benzoico 254 nm, com tempos de retenção de 6,92 min e 12,04 min, respectivamente.

### 3.7 PARÂMETROS CINÉTICOS

Os parâmetros cinéticos foram analisados utilizando o software Origin™ (OriginLab, Northampton, Massachusetts, EUA); os dados de degradação da anilina foram ajustados no modelo matemático de decaimento de primeira ordem. A velocidade da reação ( $r$ ) é descrita por Levenspiel (2000) como na Equação 1, na qual  $C$  é a concentração do reagente,  $t$  é o tempo,  $m$  é a ordem da reação e  $k$  é a constante que indica o consumo ou formação do reagente.

$$r = \frac{\partial C}{\partial t} = k \times C^m \quad (1)$$

Quando  $m = 1$ , a reação é dita de primeira ordem e a velocidade é proporcional à concentração do reagente; a forma integrada da Equação 1 para  $m = 1$  é mostrada na Equação 2.

$$C = C_0 \times e^{k \times (t - t_0)} \quad (2)$$

O coeficiente da reação,  $k$ , é determinado pela inclinação da reta  $-\ln(C/C_0)$  pelo tempo, na qual  $C_0$  é a concentração inicial do reagente e sua dimensão é  $\{k\} = [1/t]$ .

Os parâmetros cinéticos da reação foram calculados usando a função de decaimento mostrada na Equação 3

$$y = y_0 + A_1 \times e^{\frac{-x}{t_1}} \quad (3)$$

Como a função é uma curva de modelagem,  $y$  representa o valor esperado para aquele ponto e  $y_0$  é o resíduo do modelo, diferença entre o valor observado e  $y$ ; assim,  $(y - y_0)$  é o ponto observado no espaço amostral, neste caso, o valor da concentração de anilina; o coeficiente da reação na Equação 2,  $k$ , é dado aqui por  $1/t_1$ , sendo  $t_1$  o tempo no qual a taxa de decaimento atinge o seu valor máximo. O sinal negativo significa que o reagente está sendo consumido.

### 3.8 BIOLOGIA MOLECULAR (EXTRAÇÃO DE DNA E ANÁLISE DE DIVERSIDADE MICROBIANA)

#### 3.8.1 Coleta e preservação de amostras, extração do DNA e quantificação da concentração

Quatro amostras foram coletadas para extração do DNA. A primeira amostra foi retirada do inóculo misto (têxtil e petroquímico) ( $I_{DNA}$ ) antes do início dos tratamentos e as outras 3, ao final de cada condição de tratamento, C1 ( $C1_{DNA}$ ), C2 ( $C2_{DNA}$ ) e C3 ( $C3_{DNA}$ ), após a última injeção.

O kit de extração de DNA utilizado foi o PowerSoil™ isolation kit (Mo Bio Laboratories Inc. Carlsbad, CA, EUA) e as instruções do fabricante para extração encontram-se no Anexo A.

A amostragem do DNA da biomassa foi realizada de acordo com as instruções do fabricante do kit de extração de DNA utilizado. Alíquotas de 50 mL de lodo do reator foram coletadas do inóculo e do final das condições de tratamento, em tubos cônicos e centrifugada a 3000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e substituído por água ultra pura; este procedimento foi repedido por três vezes, sendo a última repetição realizada com solução tampão de fosfato (PBS 1x), a fim de manter a amostra tamponada para congelamento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Todo o sobrenadante foi descartado antes do congelamento e o *pellet* foi utilizado para extração do DNA microbiano.

Após a extração do DNA foi realizada a leitura de concentração em espectrofotômetro de DNA Nanodrop 2000™ e todas as amostras lidas continham concentração adequada (acima de  $12\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) de DNA para sequenciamento utilizando técnica de sequenciamento de nova geração (NGS).

#### 3.8.2 Sequenciamento do material genético e bioinformática

O sequenciamento do material genético das quatro amostras foi realizado através do serviço da empresa *Neoprosecta Microbiome Technologies* (Florianópolis, Brasil), com o uso do equipamento *MiSeq Sequencing System* (Illumina Inc., USA). Foram

sequenciadas as regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. Informações mais detalhadas sobre a metodologia utilizada para análises de bioinformática encontram-se no Anexo B.

Os índices de alfa diversidade foram calculados por meio do software Past®. As sequências identificadas por Illumina MiSeq® serão submetidas ao *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e o código de acesso será divulgado em futuras publicações deste estudo.

### 3.9 TESTES DE ECOTOXICIDADE

Análises de ecotoxicologia foram realizadas pelo aluno de mestrado Victor Ventura de Souza, do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco. O trabalho foi conduzido em parceria com a Profa. Ana Christina Brasileiro Vidal, orientadora do aluno. Maiores detalhes do trabalho realizado podem ser obtidos na dissertação de mestrado do referido aluno, em Souza (2021).

Um gênero da família *Alliaceae*, sistema-teste *Allium cepa* foi utilizado para testar o potencial ecotoxicológico do efluente contaminado com anilina antes e depois dos testes de biodegradação em ambiente anaeróbio-microaeróbio.

Para cada condição de tratamento, amostras de 20 mL foram retiradas do licor misto, antes do início da primeira injeção das condições de tratamento (amostras C1a, C2a, C3a), com a anilina em sua condição inicial e após a degradação completa da terceira injeção das condições de tratamento (amostras C1e, C2e, C3e). Na Tabela 4 pode ser visto um resumo das análises.

Tabela 4 - Amostras analisadas para ecotoxicologia do experimento; a: afluente; e: efluente; AT: Antes do tratamento; DT: Após o tratamento

<b>Amostra</b>	<b>C1a</b>		<b>C1e</b>		<b>C2a</b>		<b>C2e</b>		<b>C3a</b>		<b>C3e</b>	
<b>Injeção</b>	1 <sup>a</sup>	de	3 <sup>a</sup>	de	1 <sup>a</sup>	de	3 <sup>a</sup>	de	1 <sup>a</sup>	de	3 <sup>a</sup>	de
	C1		C1		C2		C2		C3		C3	
<b>Coleta</b>	AT		DT		AT		DT		AT		DT	
<b>Volume total da amostra (mL)</b>	20		20		20		20		20		20	
<b>Replicatas</b>	4		4		4		4		4		4	
<b>Volume das replicatas (mL)</b>	5		5		5		5		5		5	

Fonte: a autora (2021).

Quatro placas de petri foram preparadas para cada amostra de 20 mL e cada uma era composta por: 5 mL da amostra, 2 filtros qualitativos e 70 sementes de *A. cepa* para germinação. As placas de petri foram cobertas em plástico filme para evitar evaporação do seu conteúdo. Água mineral foi utilizada como controle negativo.

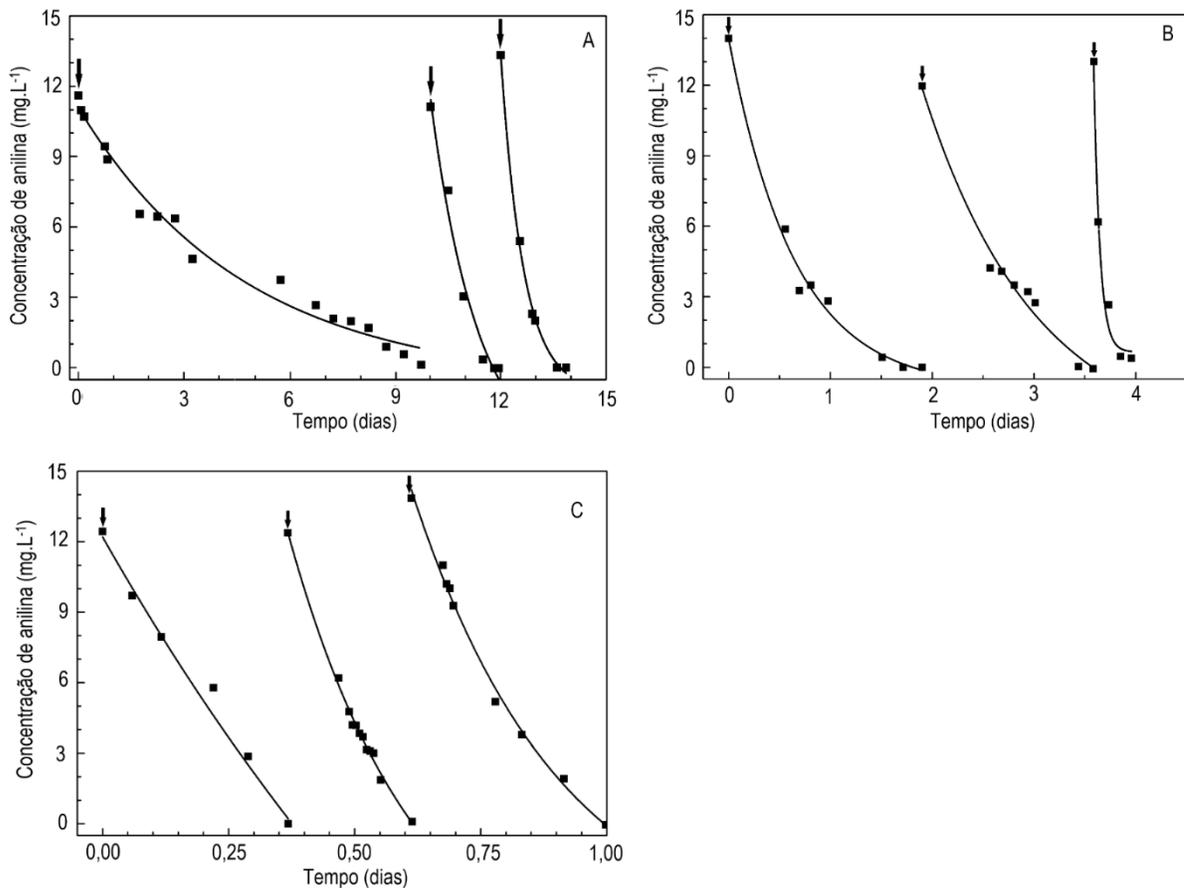
A toxicidade foi testada utilizando como parâmetros o índice de germinação (após 72h) e o comprimento da raiz (média de 15 raízes por placa). A citotoxicidade foi analisada a partir do índice mitótico.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DA ANILINA

O experimento foi iniciado com a adição da concentração inicial de anilina,  $13,2 \text{ mg.L}^{-1}$ , por um período de 48h sem introdução de pulsos de microaeração, para preenchimento dos sítios de adsorção. Foram adsorvidos  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  da concentração inicial de anilina e então completou-se a concentração para  $13,2 \text{ mg.L}^{-1}$  novamente, para início das bateladas. Na Figura 9 é possível verificar as curvas de decaimento para as 3 alimentações de anilina feitas em C1, C2 e C3.

Figura 9 - Curvas de decaimento da anilina em C1 (A), C2 (B) e C3 (C), 30, 15 e 10 minutos de microaeração a cada 2 horas, respectivamente. Cada seta no gráfico representa uma injeção de anilina no reator. Atentar para as diferentes escalas temporais nos eixos das abcissas



Fonte: a autora (2021).

A anilina foi completamente transformada nas três condições analisadas, independente do período de microaeração, porém com menor tempo requerido para desaparecimento completo da anilina, na 3<sup>as</sup> injeções, em C2 (10 horas) e C3 (9,4 horas) do que em C1 (38,4 horas). Balapure et al. (2016) reportaram remoção de aminas aromáticas utilizando microaeração contínua em 12 horas, enquanto Menezes et al. (2019) removeram aminas aromáticas com aeração intermitente de 30 minutos a cada 2 horas em bateladas sequenciais com ciclos de 24 horas.

A cinética do decaimento da concentração de anilina em função do tempo, em todas as condições, foi ajustada utilizando o modelo matemático do software Origin<sup>MT</sup> (OriginLab, Massachusetts, USA). Assim, cada modelagem utilizada neste estudo apresenta uma média e desvio padrão dos parâmetros cinéticos gerados, os quais são tempo necessário para atingir máxima remoção de anilina ( $t_1$ ), tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) e coeficiente cinético de decaimento ( $k$ ). A Tabela 5 apresenta os parâmetros cinéticos para as três condições de tratamento estudadas, a qualidade do ajuste ( $R^2$ ) e o tempo total de degradação para cada injeção de anilina.

Tabela 5 - Parâmetros cinéticos de C1, C2 e C3, ajustados com o software Origin<sup>MT</sup>

Condição	Injeção	$t_{total}$ (dias)	$R^2$	$k$ (dia <sup>-1</sup> )	$t_1$ (dias)	$t_{1/2}$ (dias)
<b>C1</b>	1 <sup>a</sup>	9,75	0,98	0,20 ± 0,03	4,85 ± 0,80	3,36 ± 0,56
	2 <sup>a</sup>	1,82	0,96	0,73 ± 0,30	1,36 ± 0,56	0,94 ± 0,39
	3 <sup>a</sup>	1,60	0,99	1,55 ± 0,11	0,64 ± 0,04	0,45 ± 0,03
<b>C2</b>	1 <sup>a</sup>	1,72	0,98	1,51 ± 0,21	0,66 ± 0,09	0,46 ± 0,06
	2 <sup>a</sup>	1,54	0,98	0,90 ± 0,20	1,07 ± 0,23	0,74 ± 0,16
	3 <sup>a</sup>	0,42	0,97	14,56 ± 3,38	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,01
<b>C3</b>	1 <sup>a</sup>	0,37	0,99	3,41 ± 0,58	0,29 ± 0,05	0,20 ± 0,03
	2 <sup>a</sup>	0,25	0,99	3,90 ± 0,50	0,26 ± 0,03	0,18 ± 0,02
	3 <sup>a</sup>	0,39	0,99	3,40 ± 0,58	0,29 ± 0,05	0,20 ± 0,03

$t_{total}$  – Tempo total de degradação;  $R^2$  - Coeficiente de determinação;  $t_1$  – Tempo necessário para atingir máxima remoção de anilina;  $k$  – Coeficiente cinético;  $t_{1/2}$  – Tempo de meia-vida da anilina em um reator anaeróbio-intermitentemente microaerado.

Fonte: a autora (2021).

Todas as injeções, para as três condições, tiveram ajustes acima de 96% ao modelo cinético de decaimento de primeira ordem, segundo à qualidade do ajuste ( $R^2$ ). A adaptação microbiana levou o coeficiente cinético,  $k$ , a aumentar da 1<sup>a</sup> para a 3<sup>a</sup> injeções, 7,8 vezes em C1 e 9,6 vezes em C2, apontando para uma relevante adaptação da comunidade microbiana às condições impostas. No entanto, quando o tempo de microaeração diminuiu para 10 minutos a cada 2 horas, em C3, o tempo de operação não alterou sensivelmente o  $k$ , embora o tempo total de degradação (0,39 dia) tenha sido mais rápido do que em C1 (1,60 dias) e comparável com C2 (0,42 dia).

Outra evidência da adaptação microbiana é revelada pelo tempo necessário para atingir máxima remoção de anilina ( $t_1$ ) e o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) (Tabela 5), entre as condições. Na 3<sup>a</sup> injeção de anilina,  $t_1$  e  $t_{1/2}$  em C2 (0,07 e 0,05) foram 9,1 vezes menores do que em C1 (0,64 e 0,45). Embora estes parâmetros tenham sido 2,2 e 2,3

vezes menores em C3 (0,29 e 0,20) do que C1, foram 4 vezes maiores, quando comparados a C2. Estes resultados corroboram com a hipótese de que os microrganismos foram capazes de degradar anilina, apesar de suas características recalcitrantes, com cada vez menos oxigênio devido ao seu poder de adaptação, porém os parâmetros cinéticos e o tempo total de degradação indicam a presença de fatores limitantes no ambiente de dez minutos de microaeração (C3).

Quando comparados os parâmetros cinéticos e o tempo total de degradação conjuntamente, C3 apresentou melhor performance de remoção de anilina do que C1, na 3ª injeção. Os tempos de remoção máxima e meia-vida foram 4 vezes maiores em C3 quando comparados com C2, demonstrando que com menor fornecimento de oxigênio, os microrganismos necessitaram de mais tempo para degradar metade da anilina, salientando as características de recalcitrância do composto à degradação em condições anaeróbias. A equivalência do tempo total de degradação entre C2 e C3 demonstra a capacidade da biomassa em remover anilina igualmente nas duas condições, apesar da restrição de exposição ao oxigênio em C3. Esses resultados são promissores quando pensa-se na aplicação prática da remoção de anilina, pois uma menor demanda por OD com manutenção da qualidade da remoção do poluente implica em menores custos com fornecimento de aeração ao tratamento.

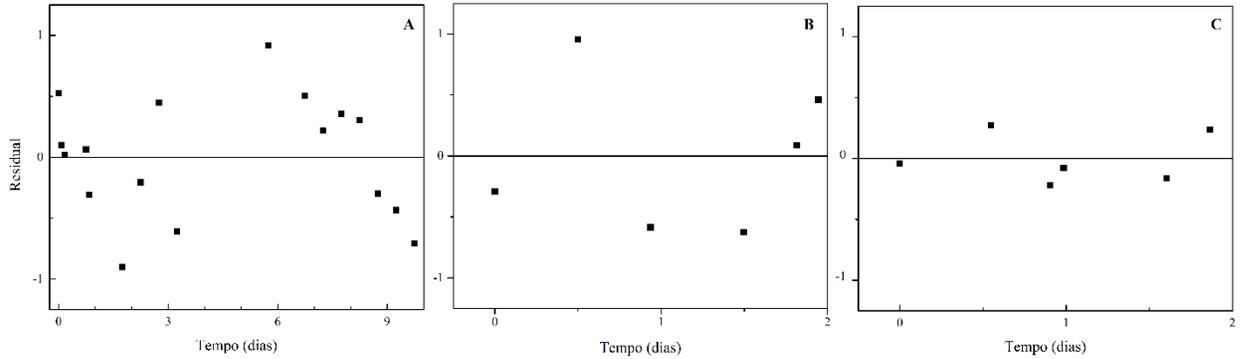
Toräng et al. (2002) verificaram biodegradação aeróbia da anilina ajustada a um modelo de primeira ordem e demonstraram que esse resultado é comparável com velocidades de depleção de anilina em corpos d'água. O modelo foi aplicado para dados de rio contaminado com efluente industrial tratado em estação de tratamento, o qual apresentou concentração residual de anilina da ordem de 160  $\mu\text{g/L}$ , com coeficiente cinético de decaimento de  $1,8 \text{ dia}^{-1}$ . Já Zhu e colaboradores, em 2012, estudaram a degradação de anilina e de cloroanilinas utilizando grânulos aeróbios, com concentração de OD acima de  $2 \text{ mg.L}^{-1}$ , e verificaram que a cinética seguia a equação de Haldane, na qual a taxa de degradação específica do composto está diretamente relacionada à concentração do mesmo e, a partir de uma concentração inibitória, a curva apresenta declínio do consumo. Os últimos autores reportam que a anilina apresentou concentrações inibitórias de crescimento bacteriano acima de  $500 \text{ mg.L}^{-1}$  e taxa máxima de degradação específica de  $111,6 \text{ mg.gSSV}^{-1}.\text{L}^{-1}$ . No presente trabalho, a

degradação de anilina ocorreu de forma similar ao estudo de Toräng et al. (2002), adequando-se a um modelo cinético de primeira ordem e a concentração utilizada está dentro da faixa que promove o crescimento bacteriano, de acordo com Zhu et al. (2012).

Kahng e colaboradores (2000) foram capazes de remover 1 mM (93,13 mg.L<sup>-1</sup>) de anilina com microrganismo isolado pertencente à espécie *Delftia acidovorans*, em condições aeróbias em 30 horas e em condições anaeróbias em 7 dias, com detecção de intermediários das rotas (catecol e benzoato, respectivamente). Qi e colaboradores (2015) também observaram a remoção completa da anilina com microaeração contínua em 1,5 dias, para a concentração inicial de anilina de 0,32 mM (30 mg.L<sup>-1</sup>). Schnell & Schink foram os primeiros a sugerir rota de degradação anaeróbia da anilina, em 1991; em seu trabalho, e observaram degradação de anilina com concentração inicial de 1 mM (93,13 mg.L<sup>-1</sup>) em menos de 30 horas, por meio de crescimento em suspensão celular de cultura isolada (*Desulfobacterium anilini*), sob condições anóxicas tendo sulfato como aceptor de elétrons. Eles realizaram estudos comprovando a carboxilação da anilina como passo inicial, seguido da formação do 4-aminobenzoato e a sua posterior desaminação reductiva ao intermediário principal benzoato, com mineralização desse metabólito seguindo sua rota comum. Neste trabalho tem-se remoção de 0,14 mM (13,2 mg.L<sup>-1</sup>) em 10 horas de tratamento (C2), com o uso de cultura mista em ambiente combinado de microaeração e DA. A detecção de intermediários anaeróbio (ácido benzoico) e aeróbio (catecol) neste trabalho, que será discutido em Seções posteriores, possivelmente ocorreu devido a degradação da anilina por meio das rotas sugeridas nos trabalhos anteriores e com tempo total de degradação situado entre esses, demonstrando congruência com a literatura.

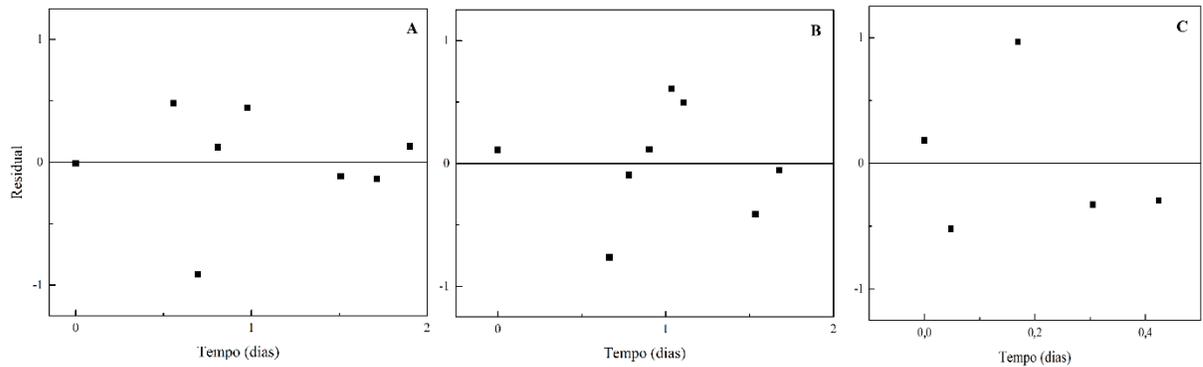
Os resíduos da modelagem provenientes do ajuste matemático de decaimento podem ser vistos nas Figura 10 (C1), Figura 11 (C2) e Figura 12 (C3), para as 1<sup>a</sup> (A), 2<sup>a</sup> (B) e 3<sup>a</sup> (C) injeções das condições, respectivamente. Os gráficos mostram que não houve tendência na modelagem, pois os resíduos foram dispersos próximos ao eixo zero, com variância constante, caracterizando homoscedasticidade e concentrados entre 1 e -1, sem apresentar dados atípicos (desvios no ajuste ou *outliers*) e sem padrões visíveis de correlação entre X e Y (distribuição dos resíduos não-linear).

Figura 10 - Residual da ANOVA na modelagem dos parâmetros cinéticos de C1 para a 1ª (A), 2ª (B) e 3ª (C) injeções. Atentar para as diferentes escalas temporais nos eixos das abcissas



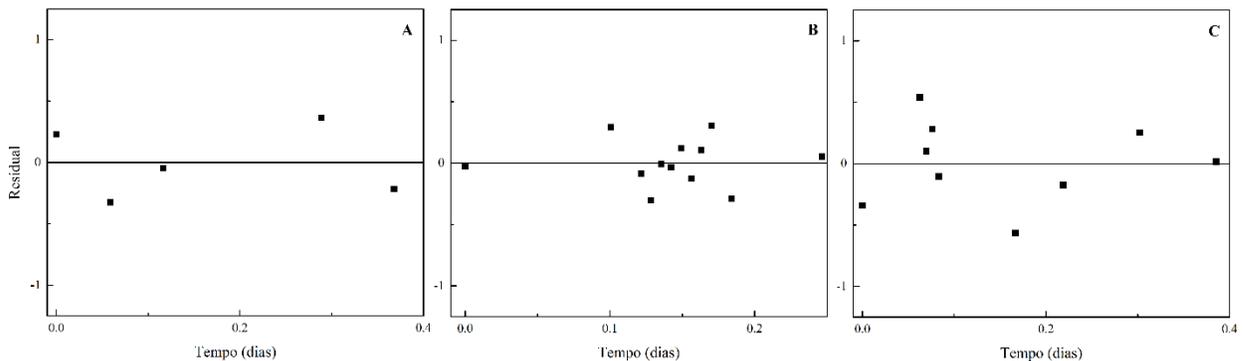
Fonte: a autora (2021).

Figura 11 - Residual da ANOVA na modelagem dos parâmetros cinéticos de C2 para a 1ª (A), 2ª (B) e 3ª (C) injeções. Atentar para as diferentes escalas temporais nos eixos das abcissas



Fonte: a autora (2021).

Figura 12 - Residual da ANOVA na modelagem dos parâmetros cinéticos de C3 para a 1ª (A), 2ª (B) e 3ª (C) injeções. Atentar para as diferentes escalas temporais nos eixos das abcissas



Fonte: a autora (2021).

#### 4.2 MONITORAMENTO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS (PH, ORP E OD)

Em C1 (30 minutos de microaeração a cada 2 horas) o pH no reator variou de 7,1 a 7,6, enquanto em C2 (15 minutos de microaeração a cada 2 horas) foi de 7,3 a 7,5. Dado o início de C3 (10 minutos de microaeração a cada 2 horas), foi verificado o declínio do pH para valores abaixo de 6,5, tornando necessário o tamponamento do processo por meio de solução de bicarbonato de sódio para manter o meio neutro, evitando a acidificação do reator.

O crescimento da comunidade fermentativa em C2 (a comunidade microbiana será discutida mais adiante) e a diminuição da disponibilidade do oxigênio em C3 devem ter levado ao acúmulo de ácidos orgânicos e acarretado à diminuição do pH do meio. O controle artificial da faixa do pH por meio do uso do tampão de bicarbonato é usualmente realizado em reatores anaeróbios, devido a existência de níveis tróficos com diferentes velocidades de produção e consumo dos ácidos orgânicos, tendendo ao acúmulo destes no ambiente. Dessa forma, o pH foi artificialmente mantido entre 7,4 e 7,9 em C3. Em todas as condições, o pH favoreceu a atividade microbiana para a degradação da anilina, comumente reportado entre 6 e 8, tanto aeróbia quanto anaerobiamente (HUANG et al., 2018; KAHNG; KUKOR; OH, 2000; WANG et al., 2011).

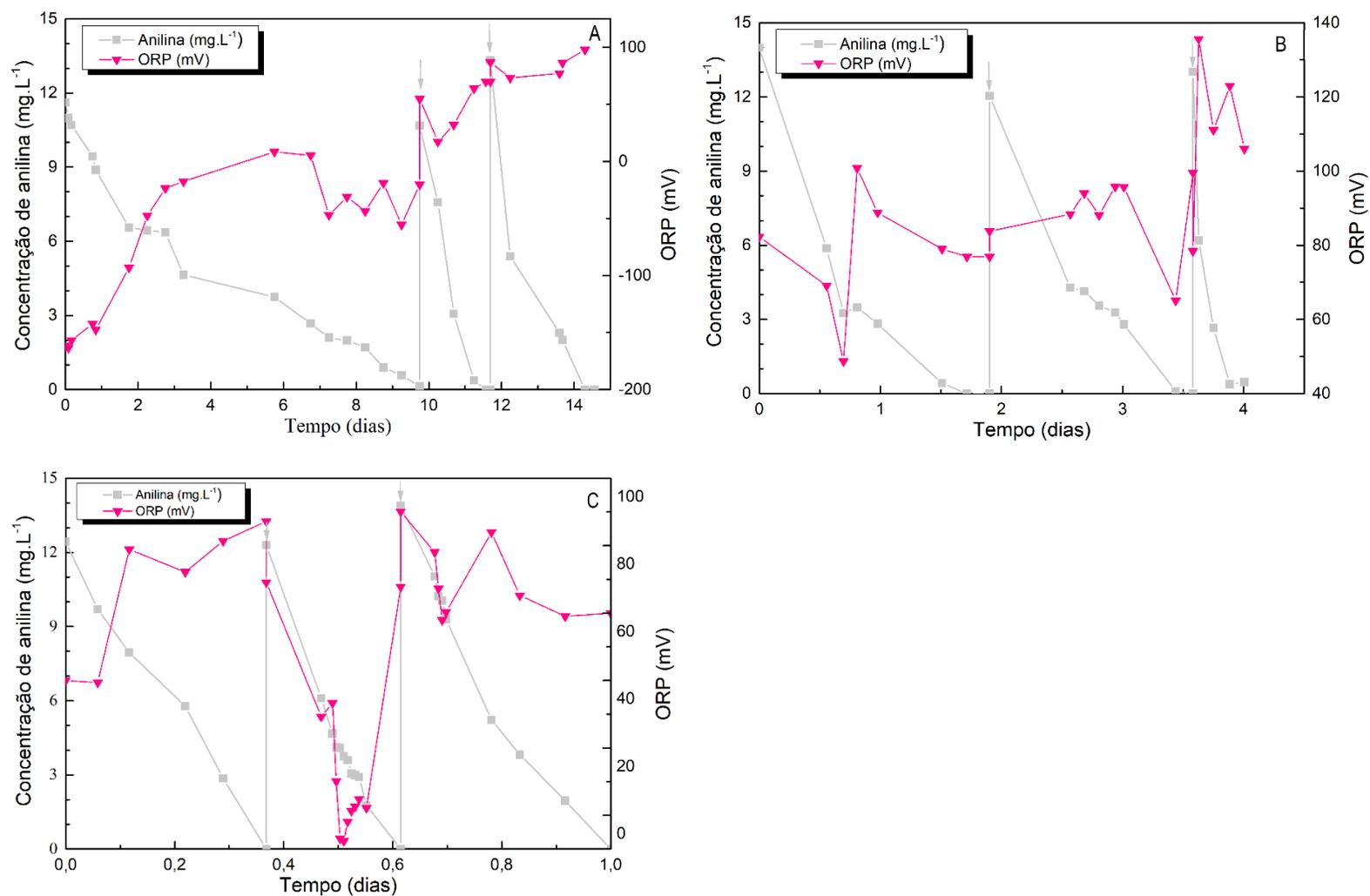
O potencial de oxirredução (ORP) é um parâmetro importante no acompanhamento do reator, pois ele revela as condições de oxidação ou redução do meio. O ambiente no reator se manteve favorável a reações anóxicas (-100 mV a 100 mV), como pode ser observado na Figura 13.

No início de C1, o ORP esteve abaixo de -150 mV (Figura 13.A), o que é esperado, devido às condições anaeróbias do inóculo utilizado e a provável existência de matéria orgânica residual de fácil degradação proveniente do lodo petroquímico, configurando ambiente redutivo. Ao longo desta condição, o ORP variou positivamente e se manteve entre 50 mV e 100 mV; em C2 (Figura 13.B), o ORP se manteve entre 40 mV e 100 mV, durante as 1ª e 2ª injeções e variou acima de 100 mV durante a 3ª

injeção. Entretanto, em C3 (Figura 13.C), houve uma mudança da faixa do ORP, registrando valor mínimo de -7,6 mV e máximo de 90,1 mV, refletindo a diminuição da disponibilidade do oxigênio em sua forma livre ( $O_2$ ). Esses valores em C3 foram obtidos na realização do perfil de duas horas P10 e provavelmente retratam o período em que a biomassa se encontrava no pico de sua fase de crescimento exponencial, com os microrganismos aeróbios consumindo o oxigênio rapidamente e havendo então predominância da degradação anaeróbia da anilina, tornando os valores de ORP negativos, como será discutido mais adiante nas seções de análise dos perfis e dos microrganismos chave em C3.

A exposição cíclica ao oxigênio aliada a ausência de matéria orgânica de fácil degradação foram fatores decisivos que contribuíram para a manutenção de condições anóxicas no ambiente fornecido.

Figura 13 - Potencial de oxirredução, ORP (—▼—) e decaimento da anilina (—■—) em C1 (A), C2 (B) e C3 (C), 30, 15 e 10 minutos de microaeração a cada 2 horas, respectivamente. Cada seta no gráfico representa uma realimentação da anilina. Atentar para as diferentes escalas temporais nos eixos das abcissas



Fonte: a autora (2021).

Neste estudo, o fluxo de ar fornecido durante a microaeração foi de 0,25 L de ar por minuto, nas três condições, C1, C2 e C3. A dosagem de O<sub>2</sub> fornecida se encontra dentro da que caracteriza um sistema microaerado e na faixa recomendada para tratamento de substratos recalcitrantes, 0,2 L a 5 L de O<sub>2</sub> por litro de reator por dia, segundo Nguyen & Khanal (2018). Durante C1, o OD variou entre 0,11 e 0,50 mg.L<sup>-1</sup> e em C2, 0,11 e 0,71 mg.L<sup>-1</sup>, tendo sido medido durante a microaeração e durante o período anaeróbio; já em C3, no acompanhamento do perfil P10, verificou-se que o OD oscilou desde abaixo do limite de detecção até 1,61 mg.L<sup>-1</sup>, no decorrer de um ciclo completo de alternância entre os ambientes. O perfil P15 foi realizado entre a 3<sup>a</sup> injeção de C2 e a 1<sup>a</sup> de C3 e também demonstrou que o OD teve limite máximo de 1,69 mg.L<sup>-1</sup>. Maior discussão sobre o comportamento OD será vista na Seção 4.4, junto com a análise dos perfis. A microaeração trouxe ao reator condições de OD semelhantes às encontradas em sites de biorremediação contaminados com anilina, benzeno clorados e hidrocarbonetos (SUN et al., 2015), demonstrando potencial da estratégia adotada para criação de condições que estimulem a degradação de aromáticos.

Hosseini Koupaie e colaboradores (2013) estudaram a degradação de corante azo em reator em bateladas sequenciais de 24h de ciclo, com combinação de 14h de fase anaeróbia seguida de 8h de fase aeróbia em biorreator de leito fixo, com oxigênio dissolvido (OD) da fase aeróbia mantido acima de 3 mg.L<sup>-1</sup> e verificaram que o ORP ao final da fase aeróbia se apresentou acima de 250 mV, indicando condições explicitamente aeróbias com ambiente oxidativo ao final da aeração.

Mata et al. (2015) estudaram a degradação de corante azo com aeração intermitente e notaram o aumento do valor do ORP, de aproximadamente 100 a 250 mV, após iniciada a aeração e diminuição após interrupção do fornecimento de ar, a qual só era observada após o consumo dos equivalentes redutores produzidos no período anaeróbio. Também observaram o aumento gradual do acréscimo de ORP a cada ciclo de aeração fornecida. A mesma tendência pôde ser observada em Menezes e colaboradores (2019), quando foi utilizada microaeração intermitente no tratamento de efluente têxtil, do qual resultam aminas aromáticas da DA dos corantes azo. No presente estudo, C1 também apresentou aumento gradual do valor do ORP ao longo do processo, porém em C2 e C3 esse aumento gradual não foi observado,

demonstrando a maior presença do oxigênio em sua forma livre em C1, com maior período de microaeração e menor em C2 e C3, com menores tempos de microaeração.

#### 4.3 ANÁLISE DOS SUBPRODUTOS

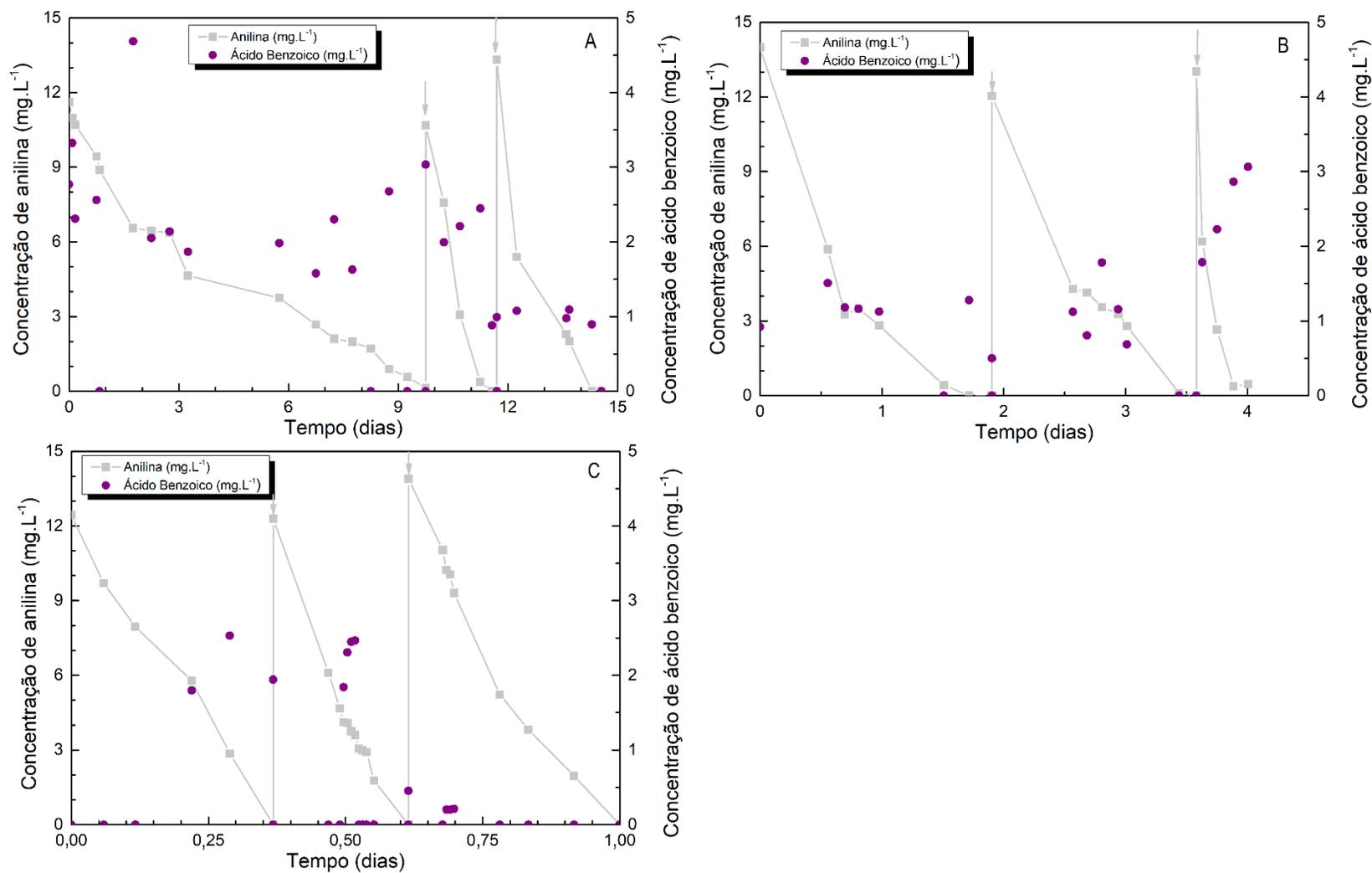
Os intermediários analisados neste estudo foram o catecol e ácido benzoico, que são bem estabelecidos na literatura como intermediários das rotas aeróbia e anaeróbia da biodegradação de anilina (ARORA, 2015), respectivamente. A detecção destes intermediários pode ser vista nas Figura 14 e Figura 15.

O intermediário da rota anaeróbia, o ácido benzoico, foi detectado em todas as condições de degradação de anilina, já o catecol, intermediário da degradação aeróbia, foi detectado apenas em C1 e C2. O limite de quantificação (LQ) inferior da curva no método de detecção do ácido benzoico foi de  $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$  e do catecol,  $0,075 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Observa-se, na visualização das Figura 14 e Figura 15 que, diferentemente da anilina, a concentração do catecol e ácido benzoico não demonstram correlação de variação com o tempo. Isso aconteceu porque tanto o ácido benzoico quanto o catecol, por serem compostos intermediários, estão sempre sendo formados e também consumidos, como verificado em estudos com acompanhamento de intermediários como Kahng et al. (2000), Elshahed et al. (2001) e Cui et al. (2017).

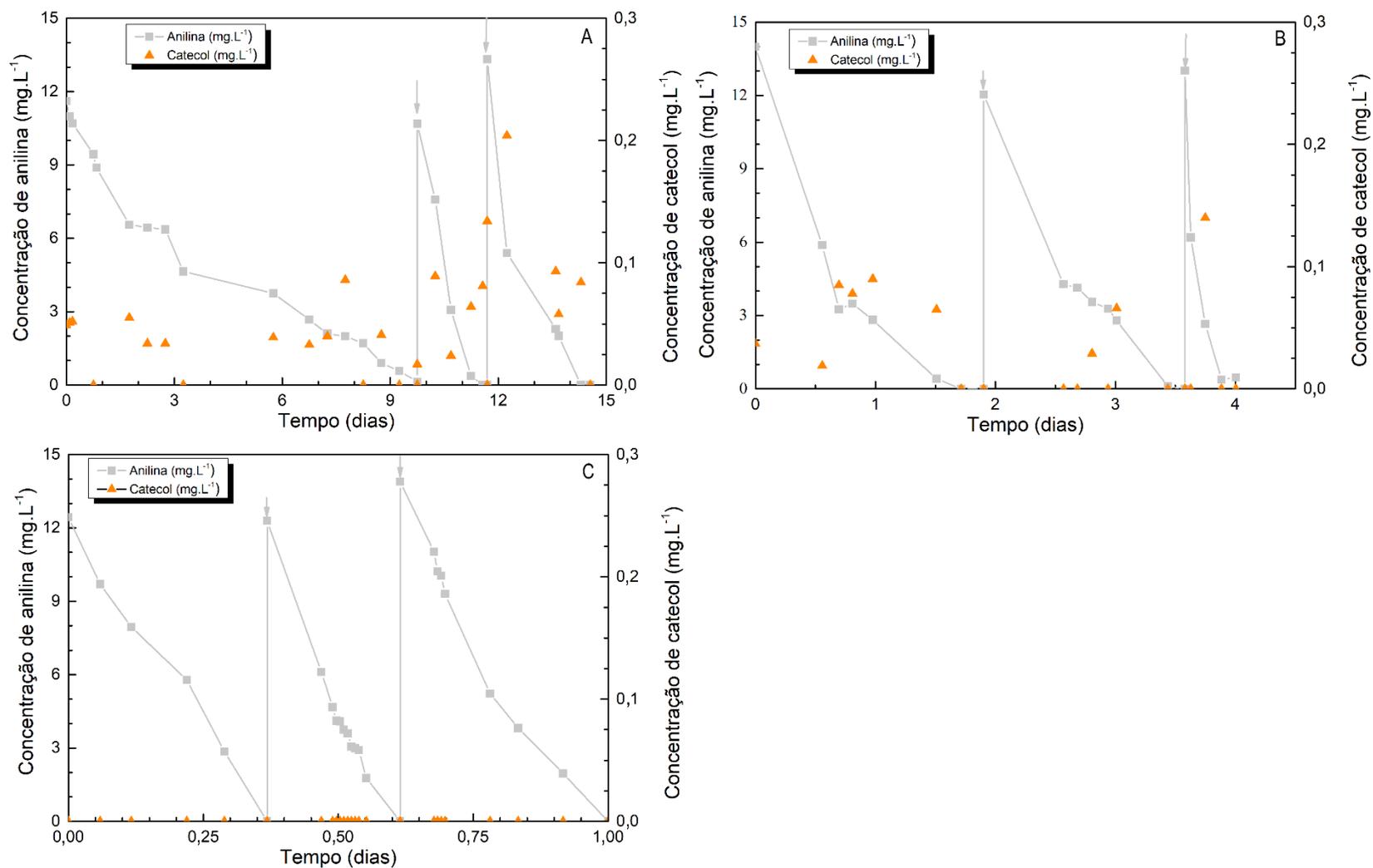
As maiores concentrações detectadas para o ácido benzoico foram de  $4,7 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $3,1 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$  em C1, C2 e C3, respectivamente. Nos gráficos A, B e C da Figura 14 verificou-se que a média das leituras acompanha essa tendência de diminuição dos valores ao longo das condições, com  $2,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $1,3 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $0,7 \text{ mg.L}^{-1}$  em C1, C2 e C3 respectivamente. A mesma análise quando feita para o catecol nos gráficos da Figura 15, mostra que em C1 e C2 as maiores concentrações detectadas foram  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente, porém houve diminuição da média de  $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$  para  $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$  de C1 para C2, com maior número de amostras em C2, no qual o composto não foi detectado, do que em C1. Em C3, não houve nenhuma detecção deste intermediário.

Figura 14 - Detecção de ácido benzoico, intermediário da rota anaeróbia de degradação da anilina, em C1 (A), C2 (B) e C3 (C), 30, 15 e 10 minutos de microaeração a cada 2 horas, respectivamente. Cada seta no gráfico representa uma realimentação da anilina.  
Atentar para as diferentes escalas temporais nos eixos das abcissas



Fonte: a autora (2021).

Figura 15 - Detecção de catecol, intermediário da rota aeróbia de degradação da anilina, em C1 (A), C2 (B) e C3 (C), 30, 15 e 10 minutos de microaeração a cada 2 horas, respectivamente. Cada seta no gráfico representa uma realimentação da anilina. Atentar para as diferentes escalas temporais nos eixos das abcissas



Fonte: a autora (2021).

Essa diminuição dos valores dos intermediários indica de que os compostos estavam sendo consumidos mais rapidamente a cada condição, pois o aumento da velocidade da degradação de anilina, verificada pelos parâmetros cinéticos, acarretaria no acúmulo dos intermediários em concentrações maiores ou iguais durante às condições, como verificado, corroborando com a hipótese de adaptação da comunidade microbiana à degradação da anilina e também dos intermediários com cada vez menores tempo de microaeração.

Alexandra et al. (1994), Kahng et al. (2000) e Schnell & Schink (1991) também detectaram a presença do benzoato como intermediário da degradação anaeróbia da anilina, utilizando como acceptor final de elétrons o nitrato e o sulfato, respectivamente. A anilina primeiramente é carboxilada a ácido 4-aminobenzoico e então ocorre a desaminação redutiva, a qual ocorre com a liberação de íons amônio para o meio, resultando no ácido benzoico, o qual entra na rota do benzoato, produzindo 3 acetil-CoA.

A literatura mostra que o catecol é um intermediário comumente encontrado na rota do catabolismo aeróbio de anilina (CUI et al., 2017; HUANG et al., 2018; TAKEO et al., 2013), o qual é formado por meio da ação de enzimas do tipo dioxigenase, sendo posteriormente mineralizado, também por enzimas do tipo oxigenase, em ácidos que entram no ciclo tricarboxílico.

Os resultados encontrados neste estudo corroboram com pesquisas anteriores e são indícios de que tanto o ácido benzoico quanto o catecol foram formados a partir das degradações anaeróbia e aeróbia da anilina, respectivamente. A formação dos intermediários será discutida com mais detalhes na Seção 4.4.

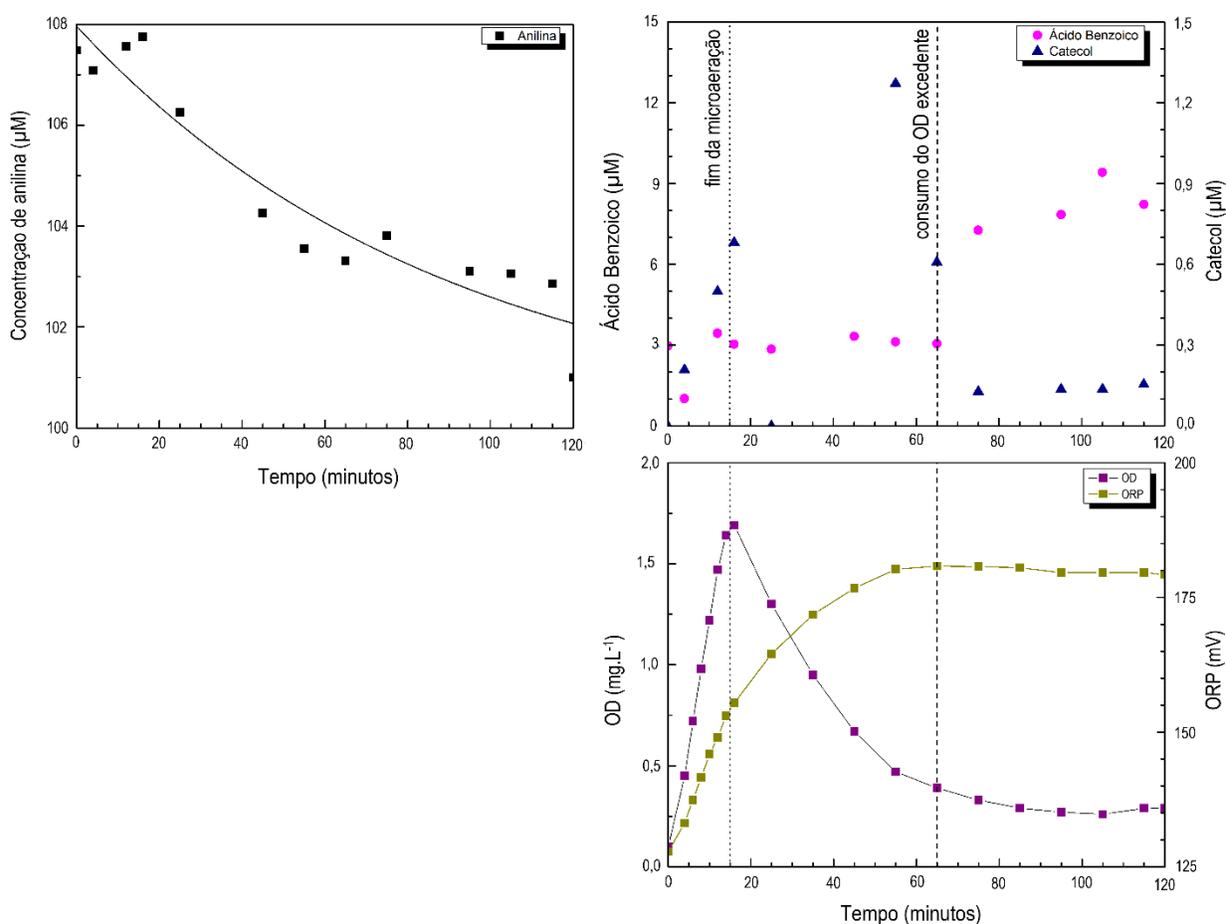
#### 4.4 ANÁLISE DOS PERFIS

A análise de perfil foi detalhada no espaço de tempo de um único ciclo de duas horas, dentre os sucessivos ciclos da batelada completa. Os perfis P15, 15 minutos de microaeração e 105 minutos pós-microaeração e P10, 10 minutos de microaeração e os 110 minutos pós microaeração foram realizados durante C2 e C3, respectivamente.

Todas as concentrações dos compostos nas figuras desta seção estão em unidades de  $\mu\text{M}$ , para facilitação de cálculos estequiométricos.

O perfil P15 (Figura 16) mostra uma diminuição da concentração de anilina ao longo do ciclo de duas horas, com decaimento único durante as duas fases do ciclo, microaerada e anaeróbia, com variação total de  $6,76 \mu\text{M}$  ( $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

Figura 16 - Perfil do ciclo de duas horas representativo de C2 (15 minutos de microaeração a cada duas horas). À esquerda, degradação da anilina (■) no período de 120 minutos. À direita, detecção de metabólitos intermediários (ácido benzoico (●) e catecol (▲)) no mesmo período e comportamento do OD (■) e ORP (■)



Fonte: a autora (2021).

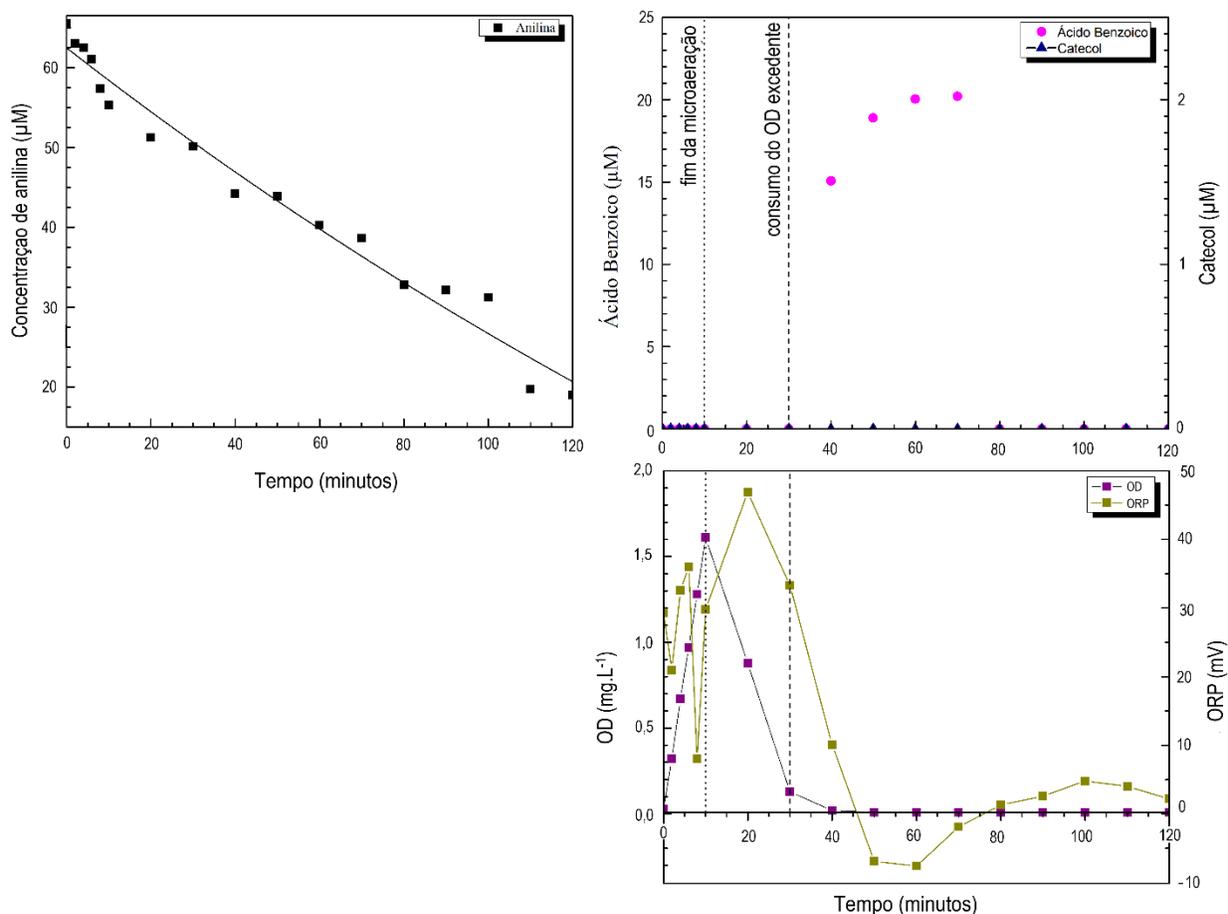
Na Figura 16, é possível notar que houve acúmulo de OD durante a fase de microaeração, alcançando valor máximo aos 15 minutos do ciclo,  $1,69 \text{ mg.L}^{-1}$ , representando 21% de saturação do OD para a temperatura medida, utilizando a lei de

Henry. Após a microaeração, o oxigênio foi rapidamente consumido, até valor abaixo de 10% da saturação e permanecendo estável após 30 minutos. Com o aumento do OD ao máximo, em 15 minutos, verificou-se também o aumento do potencial redox, em aproximadamente 50 mV. Observa-se que, mesmo com o consumo do oxigênio após a microaeração, não há uma diminuição do ORP correspondente, o que pode ser atribuído à presença do oxigênio residual presente, que influencia no ORP positivamente. Quando não há mais consumo do oxigênio, a anilina também deixa de ser degradada, indicando que pode haver dependência da ação do oxigênio no processo inicial de degradação da anilina, apesar da posterior formação de intermediário anaeróbico.

Os intermediários aeróbio e anaeróbico acompanharam o gradiente do OD: durante a aeração, até o fim do consumo do oxigênio, verificou-se o aumento da concentração do catecol e presença do ácido benzoico em baixas concentrações, enquanto após o consumo do oxigênio, houve aumento da concentração de ácido benzoico e a concentração do catecol caiu para abaixo do limite de quantificação do método utilizado ( $0,075 \text{ mg.L}^{-1}$  para o catecol).

No perfil P10 (Figura 17), realizado em C3, também houve diminuição da concentração de anilina, sem distinção no decaimento nas fases com e sem microaeração durante o ciclo, porém o consumo da anilina foi mais rápido que na condição anterior, havendo remoção de  $46,5 \mu\text{M}$  ( $4,3 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

Figura 17 - Perfil do ciclo de duas horas representativo de C3 (10 minutos de microaeração a cada duas horas). À esquerda, degradação da anilina (■) no período de 120 minutos. À direita, detecção de metabólitos intermediários (ácido benzoico (●) e catecol (▲)) no mesmo período e comportamento do OD (■) e ORP (—■—)



Fonte: a autora (2021).

A variação do OD nesta condição segue a mesma tendência da condição anterior, com aumento durante o fornecimento da microaeração, atingindo pico de  $1,61 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (21% de saturação do OD), porém com decaimento mais rápido quando comparado com P15 após o fim do fornecimento de oxigênio, em somente 10 minutos, chegando abaixo de 12% da saturação do OD e sendo completamente consumido, sem valor residual. Neste caso em que o oxigênio é consumido completamente, o gráfico do ORP acompanha o OD, alcançando valores negativos e oscilando em torno de zero.

Nota-se que o intermediário da rota anaeróbia apenas foi detectado após o oxigênio ser consumido e, neste caso, especificamente quando o potencial redox se

encontrava próximo de zero e em maior concentração quando o ORP estava negativo, evidenciando condições anaeróbias para a degradação da anilina. Ademais, neste perfil, diferentemente de P15, a anilina não deixa de ser degradada após o consumo do oxigênio, não indicando a dependência do mesmo no processo inicial de degradação da anilina como em P15.

Já o intermediário aeróbio não foi detectado em nenhum ponto coletado durante o ciclo ou durante nenhuma das três alimentações do composto em C3 (Figura 15.C), 10 minutos de microaeração a cada 2 horas, o que sugere que a conversão aeróbia da anilina não ocorreu nesta condição.

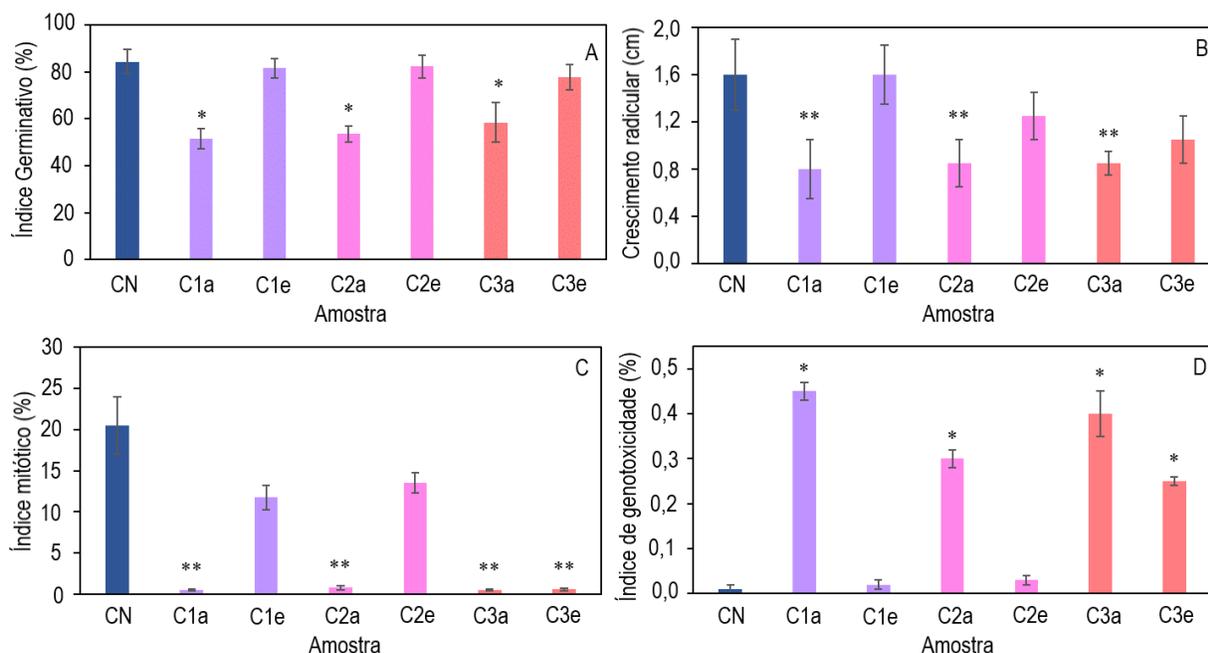
Segundo Takeo e colaboradores (2013), o primeiro passo para a degradação aeróbia da anilina pela rota do catecol é a formação do  $\gamma$ -GA (Figura 3), seguida da oxigenação do anel aromático, ocasionando como produto final o catecol; baixas concentrações de anilina são convertidas a  $\gamma$ -GA, mesmo que a rota não seja finalizada em ocasião da ausência de condições que favoreçam a ativação dos genes da degradação aeróbia de anilina.

O rápido consumo do oxigênio no perfil P10 (realizado na condição C3) aliado à não formação do intermediário da rota aeróbia da anilina sugere que o  $O_2$  fornecido foi utilizado para realização de outras atividades metabólicas e será discutido mais adiante.

#### 4.5 ECOTOXICIDADE

O potencial tóxico medido pelo índice germinativo, demonstra a capacidade da substância estudada de inibir a germinação das sementes (Figura 18.A). Os afluentes de C1, C2 e C3 tem potencial tóxico por terem inibido a germinação, de forma significativa ( $p > 0,05$ ), em relação ao controle negativo (CN), água mineral; já os efluentes das condições experimentais, após degradação da anilina, não apresentam mais toxicidade quanto a esse parâmetro. Esse resultado demonstra que, nas três condições de microaeração, os metabólitos resultantes da degradação da anilina presentes no meio não interferiram significativamente na germinação das sementes de *Allium cepa* (nome popular, cebola).

Figura 18 - Índice germinativo (A), crescimento radicular (B), índice mitótico (C) e índice de genotoxicidade (D) de afluentes (a) e efluentes (e) de C1, C2 e C3, em comparação com o controle negativo (CN), em sistema-teste *Allium cepa*. Todos os índices em porcentagem representam o percentual de observações no espaço amostral de 70 sementes germinadas, após período de 72h



Diferente significativamente em relação ao CN pelo teste de Kruskal-Wallis com teste *a posteriori* de Tukey (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

Fonte: a autora (2021).

O efeito fitotóxico do meio, que influencia o potencial de inibição do crescimento de um órgão da planta, foi analisado pelo crescimento radicular (raiz da planta). As amostras analisadas do afluente de C1, C2 e C3 inibiram o crescimento radicular (Figura 18.B), com diferença significativa quando comparadas com o CN, a nível de confiança  $p > 0,01$ , evidenciando o potencial fitotóxico já conhecido da anilina (DOM et al., 2010; MAKHDOUMI et al., 2018). As amostras pós tratamento com microaeração intermitente não inibiram o crescimento da raiz, demonstrando a eficácia dos tratamentos quanto à fitotoxicidade. Embora tenha se observado uma redução no crescimento radicular de 22% e 34% comparando-se os efluentes de C2 e C3 ao efluente de C1, respectivamente, não houve diferença significativa ( $p < 0,01$ ).

O potencial citotóxico do efluente contendo anilina pode ser medido pelo índice mitótico, avaliando o percentual de células de *A. cepa* do espaço amostral estudado

que conseguem realizar o processo de divisão celular naquele meio. Neste estudo, todos os afluentes foram citotóxicos, inibindo o ciclo celular, diferindo significativamente do CN (Figura 18.C). Já os efluentes das condições de tratamento não apresentaram diferença significativa quando comparados com o CN, com exceção do tratamento C3, com dez minutos de microaeração a cada duas horas, que apresentou resultado semelhante aos afluentes das demais condições.

Embora a remoção da anilina tenha ocorrido por completo e apresentado parâmetros cinéticos de decaimento promissores, as células de *A. cepa* submetidas a crescimento em meio retirado do final de C3 permaneceram em intérfase, indicando que algum intermediário produzido na degradação da anilina induziu à citotoxicidade. A não detecção do catecol durante C3, em oposição à recorrente detecção deste intermediário durante C1 e C2, corrobora com a hipótese de que esse metabólito não chegou a ser formado durante o processo de degradação da anilina.

Takeo e colaboradores (2013) estudaram a oxidação bacteriana da anilina e verificaram que o metabólito  $\gamma$ -GA, foi produzido pela enzima do tipo glutamina sintetase, expressa pelo gene *atdA1*, a partir de anilina na presença de L-glutamato (intracelular), ATP e  $MgCl_2$ . Este metabólito pode ser reconvertido a anilina pela enzima glutamina hidrolase, expressa por *atdA2*, pois quando em excesso, o  $\gamma$ -GA apresenta efeitos citotóxicos, impedindo o funcionamento de enzimas dioxigenase responsáveis pela conversão do mesmo em catecol. É provável que o intermediário que acumulou na rota de anilina a catecol seja o  $\gamma$ -GA, pois em concentrações baixas, como a utilizada neste estudo, o intermediário ainda é produzido com consumo de anilina, mesmo sem finalização da rota a catecol (TAKEO et al., 2013).

Finalmente, o índice de genotoxicidade avalia os eventos que estão ocorrendo no material genético, seja durante o ciclo celular ou no núcleo da célula que permaneceu em intérfase. Todos os afluentes analisados apresentaram diferença estatística significativa quando comparados ao CN. Isto significa que os afluentes contendo anilina induziram genotoxicidade às células das sementes germinadas de *A. cepa*, seja por broto nuclear ou c-metáfase, que acarretam alterações no material genético, podendo levar a morte celular. Assim como no índice de citotoxicidade, os efluentes dos tratamentos C1 e C2 não induziram a genotoxicidade, porém o de C3, sim,

demonstrando que o efluente tratado de C3 é genotóxico e citotóxico, causando danos ao material genético enquanto o dos tratamentos de C1 e C2, não apresentam efeitos ecotoxicológicos.

Muitos estudos com tratamento anaeróbio de efluentes têxteis verificaram a formação de aminas aromáticas após a degradação de corantes, reportando aumento da toxicidade no meio e posterior diminuição desta toxicidade após remoção ou degradação desses subprodutos, por meio de processos biológicos como fornecimento de microaeração (BALAPURE et al., 2016; BALAPURE; BHATT; MADAMWAR, 2015; LADE et al., 2015; MENEZES et al., 2019), aeração (AMARAL et al., 2014; FERRAZ et al., 2011; GOTTLIEB et al., 2003; TOMEI; SORIA PASCUAL; MOSCA ANGELUCCI, 2016); processos físico-químicos como ozonização (PUNZI et al., 2015a), foto-Fenton (PUNZI et al., 2015b), foto-Fenton solar (STARLING et al., 2017) e processos que combinam a ação de microrganismos com métodos físico-químicos, como a eletrólise em biorreator anaeróbio (GAVAZZA; GUZMAN; ANGENENT, 2015). Um estudo com degradação de anilina verificou a remoção de toxicidade com uso de biodegradação aeróbia com cultura mista, através do teste *Ames* (CUI et al., 2017).

Além do potencial cancerígeno em animais, danos genéticos nas células de animais foram identificados, pela exposição a anilina (JONES; FOX, 2003). Tao et al. (2017) verificaram efeitos genotóxicos nas células de raízes de trigo expostas a anilina e também efeitos tóxicos em mudas de trigo cultivadas também em ambiente exposto a anilina.

Os resultados de toxicidade da anilina a *A. cepa* apresentados nesse estudo reforçam outros trabalhos da literatura que apresentam este composto com potencial ecotóxico e genocitotóxico, ressaltando o perigo à saúde coletiva apresentado pelo lançamento da anilina e seus subprodutos nos corpos hídricos sem o devido tratamento.

A introdução de microaeração na DA da anilina em C1 e C2 mostrou-se eficiente para degradação deste composto e dos seus subprodutos com remoção da toxicidade, sugerindo esta tecnologia como alternativa promissora para aplicação no tratamento de efluentes recalcitrantes, visando diminuição de custos com aeração. No entanto o mesmo não pode ser dito para as condições de microaeração aplicadas em C3, na

qual, apesar da anilina ter sido degradada, foram gerados subprodutos tóxicos que ainda apresentam característica hostil ao meio ambiente e à saúde humana.

#### 4.6 ANÁLISE DA MICROBIOTA DO INÓCULO E FINAL DAS CONDIÇÕES C1, C2 E C3

##### 4.6.1 Diversidade microbiana

A análise filogenética das amostras do inóculo e da biomassa final de C1, C2 e C3 (30, 15 e 10 minutos de microaeração a cada 2 horas, respectivamente) resultou na visualização da distribuição das espécies presentes no reator (Figura 19), além de permitir a compreensão da dinâmica das comunidades microbianas de acordo com a variação do oxigênio dissolvido em cada etapa operacional e também com a aclimatação à anilina adicionada como fonte única de carbono.

Os índices de diversidade podem ser visualizados na Tabela 6 e indicam a complexidade da comunidade, levando em conta não somente a riqueza das populações presentes na amostra como também a sua proporção nos reatores biológicos (abundância relativa).

Tabela 6 - Índices de diversidade para o Inóculo e em C1, C2 e C3, em âmbito de gênero

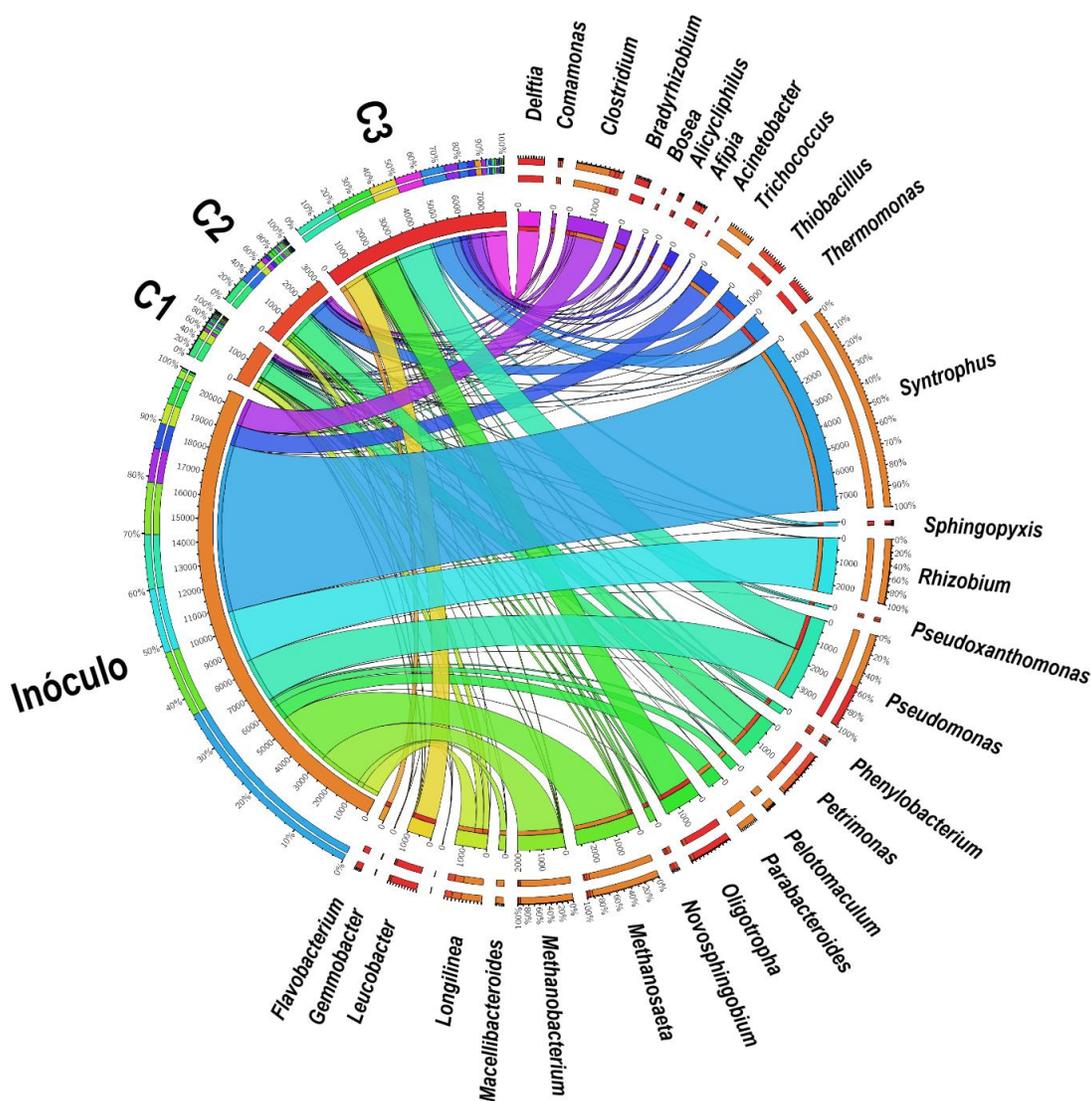
<b>Índices</b>	<b>Inóculo</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>
<b>Número de gêneros (S)</b>	85	64	63	61
<b>Dominância (D)</b>	0,1771	0,1623	0,1463	0,1072
<b>Shannon (H)</b>	2,189	2,593	2,560	2,638
<b>Equitabilidade (J)</b>	0,4927	0,6236	0,6179	0,6417
<b>Chao-1</b>	113,1	73,1	93,3	72,0

Fonte: a autora (2021)

O índice de dominância de Simpson (D) demonstra que não houve predominância de um grupo de microrganismos nas amostras analisadas, pois os valores estão próximos de zero. Comparando o índice D do inóculo (0,18) com D de C1 (0,16), C2 (0,15) e C3 (0,11), pode-se verificar que ocorreu uma diminuição dos valores deste índice, corroborando com o aumento da biodiversidade na microbiota ao longo das condições reacionais, representada pelo índice de Shannon (H), o qual apresentou valor mais baixo para o inóculo (H = 2,189) e mais alto para C3 (H = 2,638). Nota-se o

aumento de 20% da diversidade, entre essas duas amostras, reafirmando que as condições ambientais aplicadas no reator influenciaram diretamente no desenvolvimento e seleção microbiana no reator. O aumento da biodiversidade é corroborado pelo gráfico representado na Figura 19, no qual nota-se que os microrganismos presentes no inóculo apresentam-se em faixas largas (maior AR), enquanto os microrganismos presentes em C1, C2 e C3 representam faixas mais estreitas (menor AR), dando espaço para outros gêneros se fazerem presentes.

Figura 19 - Representação circular dos gêneros microbianos com maior abundância relativa presentes no Inóculo e em C1, C2 e C3 (30, 15 e 10 minutos de microaeração a cada 2 horas, respectivamente)



Fonte: a autora (2021).

É notório que a riqueza microbiana das amostras, refletida pelo número de gêneros (S) e pelo índice Chao-1, no inóculo anaeróbio é maior do que em C1, C2 e C3. Isso se deve à exposição da biomassa microbiana à anilina e seus metabólitos em todas as condições. A diferença entre a riqueza contida no inóculo quanto comparada com as demais condições pode estar associada à diminuição da abundância relativa de microrganismos anaeróbios mais sensíveis quando expostos ao oxigênio ciclicamente, o que é evidenciado pelo quase desaparecimento do gênero estritamente anaeróbio *Syntrophus* e das arqueias metanogênicas (Figura 19). Menezes et al. (2019) também observaram inibição da metanogênese quando a microbiota anaeróbia era exposta ao oxigênio. Os organismos pertencentes ao gênero *Syntrophus* são capazes de realizar fermentação do benzoato e derivados como ciclohexano carboxilato e ciclo hex-1-ano carboxilato (ELSHAHED et al., 2001) e outros aromáticos como o benzeno, e a sua abundância relativa (AR) no inóculo era de 35,6%, porém em C1 caiu para 0,15%. Também houve diminuição da AR das arqueias metanogênicas *Methanosaeta* e *Methanobacterium* de 8,9% para 1,9% e 11,6% para 5,2%, respectivamente (Figura 19), também anaeróbias estritas. No entanto, quando se diminui a exposição ao oxigênio para 15 minutos a cada duas horas, notou-se um aumento desses indicadores de riqueza, evidenciando a adaptação às condições operacionais. Quando em C3 diminui-se o O<sub>2</sub> fornecido, houve diminuição da riqueza, contrariando a tendência da condição anterior, porém indicando a presença de fatores limitantes no ambiente de dez minutos de microaeração (C3) e produtos tóxicos que podem inibir o desenvolvimento de grupos microbianos mais sensíveis, corroborando com os dados de cinética vistos anteriormente.

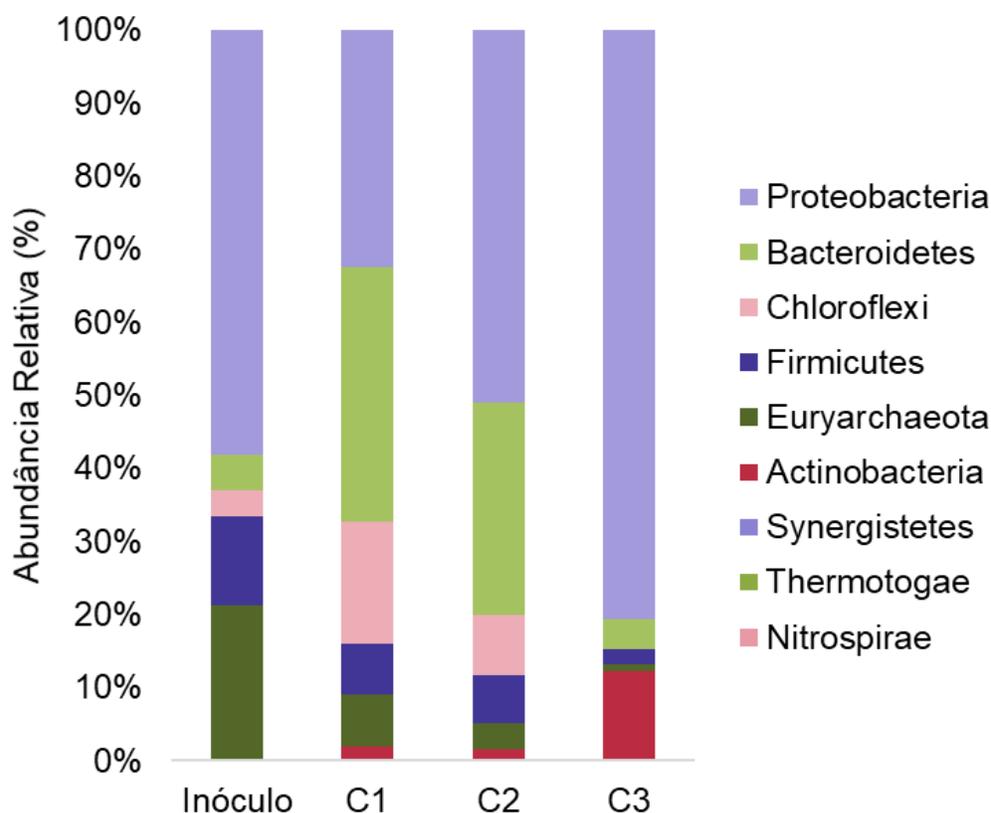
O índice de equitabilidade (J) evidencia a uniformidade da distribuição entre os gêneros microbianos ao longo das condições operacionais do reator, conforme pode ser verificado na Figura 19. O inóculo apresentou menor índice de equitabilidade ( $J = 0,49$ ) quando comparado com C1 ( $J = 0,62$ ), C2 ( $J = 0,62$ ) e C3 ( $J = 0,64$ ), que tiveram índices semelhantes. Esses valores de J corroboram com o índice de Shannon (H) e demonstram que, além de haver aumento da diversidade, também houve uma distribuição mais uniforme dos gêneros ao longo das condições de operação, tendo C3

o maior índice de equitabilidade. Essa distribuição mais equitativa é também notada pelo aumento do número de gêneros com abundância relativa (AR) maior que 10% em C3 (*Deftia*, *Leucobacter*, *Oligotropha*, *Pseudomonas* e *Thermomonas*) enquanto em C1 e C2 só havia dois gêneros em cada condição com AR maior que 10% (em C1 *Longilinea* e *Petrimonas* e em C2, *Petrimonas* e *Thiobacillus*). Também vale ressaltar que *Petrimonas* e *Longilinea* juntos em C1, assim como *Petrimonas* e *Thiobacillus* juntos, em C2, representaram 51% e 50% da microbiota, respectivamente, enquanto *Deftia*, *Leucobacter*, *Oligotropha*, *Pseudomonas* e *Thermomonas* representaram 68%, em C3. Os gêneros citados aparecem como as faixas com maiores larguras na Figura 19 nas respectivas condições.

#### 4.6.2 Análise da dinâmica da comunidade microbiana

Os filos microbianos mais abundantes encontrados nas três condições foram Proteobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Firmicutes, Euryarcheota e Actinobacteria (Figura 20), os quais são comumente reportados com AR maior que 1% em sistemas anaeróbios (KÖCHLING et al., 2017; CARVALHO et al., 2020). O filo Proteobacteria se destaca por apresentar maior AR tanto no inóculo (58,13%) quanto em C2 (50,99%) e C3 (80,74%), só não sendo o mais abundante em C1 (32,49%), na qual o filo Bacteroidetes teve maior evidência, com 34,88% de AR. O filo Actinobacteria também se destacou em C3 (12,21%), cuja AR em C2 foi de 1,49%. Estes filos também foram reportados por Li et al. (2020) como os mais abundantes em reator em bateladas sequenciais aeróbio submetido a elevadas concentrações de anilina, chegando a 600 mg.L<sup>-1</sup> (6,44 mM), apontando os filos Proteobacteria, Bacteroidetes e Actinobacteria como participantes primordiais na degradação da anilina e na remoção de nitrogênio.

Figura 20 - Abundância relativa, a nível de filo, para amostras do inóculo e do final de C1, C2 e C3



Fonte: a autora (2021).

De acordo com a literatura (Tabela 7), 18 gêneros presentes na comunidade microbiana nas três condições estudadas estão diretamente relacionados com a degradação de anilina e seus subprodutos intermediários e 9 desses gêneros apresentaram abundância relativa maior que 1% em ao menos uma das condições (Figura 21), sendo eles *Comamonas*, *Clostridium*, *Delftia*, *Flavobacterium*, *Novosphingobium*, *Phenylobacterium*, *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas* e *Thermomonas*. Os gêneros *Clostridium* e *Flavobacterium* foram reportados por Carvalho et al. (2020) como abundantes em reator microaerado tratando efluente têxtil com DB22, potencial formador de anilina no processo de degradação anaeróbia enquanto *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Novosphingobium* e

*Phenylobacterium* foram reportados no estudo de Köchling et al. (2017), em reator UASB também tratando efluente têxtil com DB22.

Os que não apresentaram AR maior ou igual a 1% em nenhuma das condições foram *Acinetobacter*, *Altererythrobacter*, *Desulfomicrobium*, *Geobacter*, *Nitrosomonas*, *Pelotomaculum*, *Rhizobium*, *Sphingobium* e *Syntrophus*; mesmo que esses gêneros não tenham apresentado, individualmente, AR maior que 1% nas condições operacionais, esta comunidade representou 3,73%, 2,83% e 1,28% da biomassa em C1, C2 e C3, respectivamente e contribuiu para a degradação aeróbia e anaeróbia da anilina e seus intermediários. Os 18 gêneros, todos aeróbios facultativos ou anaeróbios fermentativos, representaram 26,12% dos microrganismos presentes em C1, 20,66% em C2 e 49,92% em C3, enquanto no inóculo somente os gêneros *Syntrophus* e *Rhizobium* caracterizavam 47% da microbiota. A presença de diferentes gêneros realizando a mesma função indica que a comunidade é mais robusta e o reator mais estável, suportando maiores cargas orgânicas e compostos tóxicos. Um sistema que apresenta mais rotas metabólicas disponíveis para a degradação de um composto é mais funcionalmente estável por não depender de processos metabólicos independentes acontecendo em série e sim, paralelamente (BRIONES; RASKIN, 2003).

Também estiveram presentes 8 gêneros com AR maior que 1% em pelo menos uma das condições (Figura 21) e que degradam outros compostos xenobióticos, como metanol e metanossulfonato (*Afiptia*), fenol (*Alicyclophilus*), nitroanilinas (*Bradyrhizobium*), sulfonamidas (*Leucobacter*, *Oligotropha*), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (*Longilinea*), trifetil fosfato (*Petrimonas*) e ácido fenilacético (*Sphingopyxis*); outros 8 gêneros que também degradam aromáticos e estiveram presentes com AR menor que 1% (*Aquamicrobium*, *Bosea*, *Brevundimonas*, *Hydrogenophaga*, *Mesorhizobium*, *Methyloversatilis*, *Sphingosinicella*, *Trichococcus*), representam juntos 2,44%, 1,65% e 2,56% da biomassa em C1, C2 e C3. Segundo a literatura, os 16 gêneros citados degradam compostos tóxicos, xenobióticos e aromáticos (Tabela 8) e esses microrganismos podem ter participado da degradação direta da anilina e subprodutos neste estudo.

Tabela 7 - Gêneros microbianos presentes em C1, C2 e C3 que apresentam crescimento utilizando anilina ou seus subprodutos

Gênero	Inóculo	Amostras			Composto degradado	Conservação de energia	Aceptor de e <sup>-</sup>				Referência
		C1	C2	C3			O	N	S	Fe	
<i>Acinetobacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,74%	Anilina	Aeróbia	+	-	-	-	(Hongswat & Vangnai, 2011)
<i>Altererythrobacter</i>	0,00%	0,50%	0,37%	0,08%	Ácido benzoico	Aeróbia Facultativa	+	+	-	-	(Maeda <i>et al.</i> , 2018)
<i>Clostridium</i>	5,80%	5,62%	5,70%	1,95%	Ácido benzoico	Anaeróbia Fermentativa	-	-	-	-	(He & Wiegel, 1995)
<i>Comamonas</i>	0,00%	3,33%	2,74%	0,09%	Anilina	Aeróbia Facultativa	+	+	+	-	(Boon <i>et al.</i> , 2000)
<i>Delftia</i>	0,00%	0,00%	0,00%	1,25%	Anilina	Aeróbia Facultativa	+	+	-	-	(Xiao <i>et al.</i> , 2009)
<i>Desulfomicrobium</i>	0,04%	0,45%	0,24%	0,00%	Anilina	Anaeróbia Facultativa	-	-	+	-	(Li <i>et al.</i> , 2020)
<i>Flavobacterium</i>	0,00%	0,00%	0,00%	2,82%	Anilina	Aeróbia Facultativa	+	+	-	-	(Suzuki <i>et al.</i> , 1996)
<i>Geobacter</i>	0,02%	0,35%	0,15%	0,20%	Anilina	Aeróbia Facultativa	+	-	-	+	(Danh & Thi, 2019)
<i>Nitrosomonas</i>	0,00%	0,60%	0,76%	0,01%	Anilina	Aeróbia	+	-	-	-	(Keener & Arp, 1994)
<i>Novosphingobium</i>	0,00%	2,94%	4,02%	0,99%	Anilina	Aeróbia Facultativa	+	+	-	-	(Liu <i>et al.</i> , 2005)
<i>Pseudomonas</i>	9,31%	0,65%	0,30%	18,27%	Anilina	Aeróbia Facultativa	+	+	-	-	(Fukumori & Saint, 1997)
<i>Rhizobium</i>	11,07%	0,45%	0,21%	0,00%	Anilina	Aeróbia Facultativa	+	+	-	-	(Zhang <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pelotomaculum</i>	1,55%	0,60%	0,37%	0,01%	Benzoato	Anaeróbia Facultativa	-	-	+	-	(Dong <i>et al.</i> , 2017)
<i>Phenylobacterium</i>	0,05%	4,78%	3,08%	1,11%	Ácido benzoico	Aeróbia Facultativa	+	+	-	-	(Chu <i>et al.</i> , 2015)
<i>Pseudoxanthomonas</i>	0,01%	3,28%	2,29%	0,00%	Ácido benzoico	Aeróbia Facultativa	+	+	-	-	(Thierry <i>et al.</i> , 2004)
<i>Sphingobium</i>	0,00%	0,65%	0,70%	0,20%	Benzoato	Aeróbia Facultativa	+	+	-	-	(Liang & Lloyd-Jones, 2010)
<i>Syntrophus</i>	35,60%	0,15%	0,03%	0,02%	Benzoato	Anaeróbia Fermentativa	-	-	-	-	(Elshahed <i>et al.</i> , 2001)
<i>Thermomonas</i>	0,00%	2,44%	0,88%	10,24%	Ácido benzoico	Aeróbia Facultativa	+	+	-	-	(Kim <i>et al.</i> , 2006)
<b>Total</b>	<b>63,47%</b>	<b>26,77%</b>	<b>21,85%</b>	<b>48,01%</b>	-	-	-	-	-	-	-

como fontes de carbono, segundo a literatura

Fonte: a autora (2021).

Figura 21 - Gêneros microbianos presentes em C1 (A), C2 (B) e C3 (C) que apresentaram abundância relativa maior que 1%

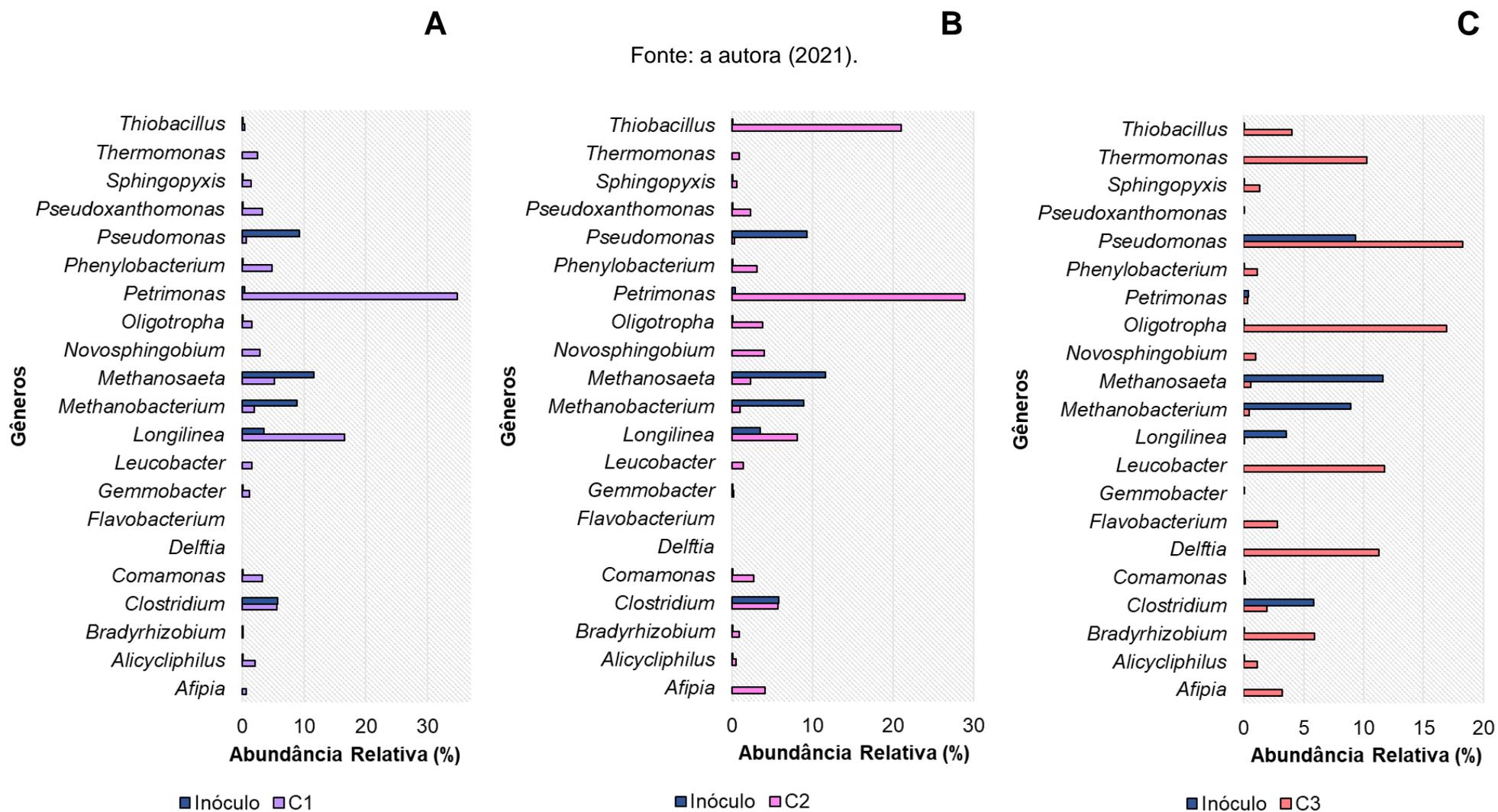


Tabela 8 - Gêneros microbianos presentes em C1, C2 e C3, que apresentam crescimento utilizando compostos aromático como fontes de carbono, segundo a literatura

Gênero	Inóculo	Amostras			Composto degradado	Conservação de energia	Aceptor de e <sup>-</sup>				Referência
		C1	C2	C3			O	N	S	Fe	
<i>Afipia</i>	0,00%	0,70%	4,18%	3,20%	Metano sulfonato	Aeróbia	+	-	-	-	(Moosvi <i>et al.</i> , 2005)
<i>Alicyclophilus</i>	0,00%	2,09%	0,49%	1,13%	Fenol	Aeróbia Facultativa	+	+	-	-	(Liu <i>et al.</i> , 2017)
<i>Aquamicrobium</i>	0,03%	0,10%	0,03%	0,14%	Sulfonamidas	Aeróbia	+	-	-	-	(Yang <i>et al.</i> , 2018)
<i>Bosea</i>	0,02%	0,60%	0,49%	0,93%	Hidrocarbonetos aromáticos	Aeróbia	+	-	-	-	(Sharma & Philip, 2015)
<i>Bradyrhizobium</i>	0,02%	0,10%	0,94%	5,86%	Nitroanilinas	Aeróbia	+	-	-	-	(Qu & Spain, 2010)
<i>Brevundimonas</i>	0,26%	0,05%	0,09%	0,13%	Sulfonamidas	Aeróbia	+	-	-	-	(Yang <i>et al.</i> , 2018)
<i>Hydrogenophaga</i>	0,00%	0,35%	0,03%	0,00%	4-aminobenzenosulfonato	Aeróbia	+	-	-	-	(Gan <i>et al.</i> , 2011)
<i>Leucobacter</i>	0,00%	1,59%	1,43%	11,77%	Sulfonamidas	Aeróbia Facultativa	+	+	-	-	(Reis <i>et al.</i> , 2018)
<i>Longilinea</i>	3,52%	16,57%	8,11%	0,04%	Hidrocarbonetos aromáticos	Anaeróbia Fermentativa	-	-	-	-	(Yan <i>et al.</i> , 2015)
<i>Mesorhizobium</i>	0,01%	0,35%	0,37%	0,24%	Derivados de anilina	Aeróbia	+	-	-	-	(Rodrigues-Lima <i>et al.</i> , 2006)
<i>Methyloversatilis</i>	0,00%	0,20%	0,21%	0,76%	Benzeno e naftaleno	Aeróbia	+	-	-	-	(Rochman <i>et al.</i> , 2017)
<i>Oligotropha</i>	0,00%	1,64%	3,81%	16,90%	Sulfonamida	Aeróbia	+	-	-	-	(Yang <i>et al.</i> , 2018)
<i>Petrimonas</i>	0,38%	34,78%	28,95%	0,33%	Tri-fenil fosfato	Anaeróbia Facultativa	-	+	+	-	(Hou <i>et al.</i> , 2019)
<i>Sphingopyxis</i>	0,02%	1,39%	0,67%	1,34%	Ácido fenil acético	Aeróbia	+	+	-	-	(Huang <i>et al.</i> , 2019)
<i>Sphingosinicella</i>	0,02%	0,40%	0,21%	0,37%	Sulfonamidas	Aeróbia	+	-	-	-	(Yang <i>et al.</i> , 2018)
<i>Trichococcus</i>	4,40%	0,40%	0,21%	0,00%	Fenantreno	Aeróbia Facultativa	+	-	-	+	(Zhang <i>et al.</i> , 2021)
<b>Total</b>	<b>8,69%</b>	<b>61,29%</b>	<b>50,23%</b>	<b>43,14%</b>	-	-					-

Fonte: a autora (2021).

### 2.1.1.1 Gêneros microbianos chave em C1 e C2

A dinâmica da comunidade microbiana anaeróbia presente no inóculo, como os representantes dos gêneros *Syntrophus* (35,60%), *Methanosaeta* (11,58%), *Methanobacterium* (8,91%) e *Clostridium* (5,80%) foi alterada com a introdução da microaeração e da anilina, como única fonte de carbono. A abundância relativa relacionada aos gêneros dos microrganismos aeróbios facultativos aumentou em C1, quando comparada com o inóculo, como *Leucobacter* (inóculo - 0%; C1-1,59%) e *Phenylobacterium* (inóculo - 0%; C1 - 4,78%) e aeróbios estritos como *Oligotropha* (inóculo - 0%; C1-1,64%). Já foi reportado que estes gêneros são encontrados em reatores biológicos que são capazes de degradar compostos xenobióticos e anilina em elevadas concentrações (Chu et al., 2015; Li et al., 2020; Yang et al., 2018). Os gêneros *Clostridium*, *Leucobacter*, *Oligotropha* e *Phenylobacterium* apresentaram AR maior do que 1% em todas as condições de estudadas (Tabela 9), embora os três últimos gêneros não tenham sido detectados no inóculo. A detecção de gêneros na microbiota que não estavam presentes no inóculo, porém estavam ao longo das condições de operação, indica que o ambiente de efluente com anilina induziu o seu crescimento.

Tabela 9 - Gêneros microbianos que permaneceram com AR > 1% em C1, C2 e C3 e suas ARs em cada condição

Gênero	Inóculo	C1	C2	C3
<i>Clostridium</i>	5,80%	5,62%	5,70%	1,95%
<i>Leucobacter</i>	0,00%	1,59%	1,43%	11,77%
<i>Oligotropha</i>	0,00%	1,64%	3,81%	16,90%
<i>Phenylobacterium</i>	0,05%	4,78%	3,08%	1,11%

Fonte: a autora (2021).

Destaca-se também a presença dos gêneros *Comamonas* (C1 - 3,33% e C2 - 2,74%) e *Pseudoxanthomonas* (C1 - 3,28% e C2 - 2,29%), em C1 e C2 e que não estavam presentes no inóculo. Esses dois gêneros, que possuem representantes aeróbios facultativos, também foram evidenciados como os principais gêneros responsáveis na remoção de indol, piridina e quinolona, poluentes orgânicos

aromáticos contendo nitrogênio e em presença de fenol em estudo de Zhang e colaboradores (2021), trabalhando com lodos ativados. Estes autores citam que os gêneros apresentam riqueza de genes funcionais relacionados à degradação e metabolismo de compostos xenobióticos, principalmente benzoato e aminobenzoato, em presença de tais poluentes. O gênero *Comamonas* foi isolado em meios específicos e identificado como bactéria capaz de degradar 3-cloroanilina, anilina e seus derivados, como fontes únicas de carbono, nitrogênio e energia (Boon et al., 2000) e o gênero *Pseudoxanthomonas* também foi isolado e identificado como degradador de ácido benzoico (THIERRY et al., 2004). O ambiente intermitentemente microaerado favoreceu diversos gêneros capazes de realizar degradação anaeróbia e aeróbia da anilina, sendo reforçada esta hipótese pela presença dos respectivos intermediários das rotas de degradação, ácido benzoico e catecol.

A respiração aeróbia, por seu maior saldo energético, promove mais rápido consumo da matéria orgânica e crescimento da população microbiana quando comparado com a respiração anaeróbia. A adaptação da comunidade anaeróbia à microaeração fornecida, com o desenvolvimento de gêneros aeróbios aos gêneros anaeróbios que degradam xenobióticos explicam o aumento do coeficiente cinético de degradação de anilina de 7,8 vezes da 1ª para a 3ª injeção em C1, além da diminuição do tempo total de degradação de 9,8 dias para 1,6 dias, com a mudança gradual da dinâmica populacional, o que mostra que a introdução da microaeração foi benéfica à comunidade, favorecendo o consumo da matéria orgânica disponível, nesse caso, a anilina.

A presença dos gêneros *Leucobacter*, *Oligotropha* e *Phenylobacterium*, apresentando AR maior do que 1% em todas as condições, indica que o reator anaeróbio com microaeração intermitente com anilina como fonte de carbono apresentou-se como ambiente adequado para o desenvolvimento e manutenção do seu metabolismo, com fatores ambientais favoráveis à sua sobrevivência e reprodução. Apesar da introdução de oxigênio no reator, o surgimento de microrganismos aeróbios estritos e facultativos além favorecer a velocidade da degradação da anilina, ainda possibilitou a permanência de gêneros como *Petrimonas*, *Longilinea*, *Clostridium* e as arqueias metanogênicas, anaeróbios estritos,

no ambiente, estabelecendo um tipo de proteção contra o ataque do O<sub>2</sub> (NGUYEN; KHANAL, 2018). Este tipo de relação sintrófica entre diferentes grupos microbianos é comumente estabelecida em processos de DA nos quais há introdução de pequenas quantidades de oxigênio, promovendo robustez e estabilidade ao processo. A coexistência e as relações sinérgicas entre microrganismos anaeróbios e aeróbios facultativos em ambientes microaerados é um mecanismo existente para promover a tolerância ao oxigênio aos microrganismos que não produzem enzimas antioxidativas. Foi reportado no estudo de Botheju e colaboradores (2010) que, em reatores configurados como etapa única, as bactérias aeróbias facultativas consomem o oxigênio rapidamente, protegendo as anaeróbias estritas.

Os gêneros *Petrimonas* (C1 - 34,78%, C2 - 28,95% e C3 - 0,33%) e *Longilinea* (C1 - 16,57%, C2 - 8,11% e C3 - 0,04%) presentes nas três condições, indicam que o ambiente se mostrou bastante favorável ao seu desenvolvimento, especialmente em C1 e C2. *Petrimonas*, gênero quimiorganotrofo, estritamente anaeróbio e fermenta carboidratos e alguns ácidos orgânicos, produzindo principalmente acetato e butirato e esteve presente em reator anaeróbio tratando anilina, com altas concentrações de sulfato, se mostrando atuante, com AR maior que 1% (Li et al., 2020). Já a *Longilinea*, da família das *Anaerolineaceae*, também é anaeróbia fermentativa, consumindo carboidratos e ácidos orgânicos e produzindo acetato, lactato e hidrogênio e foi um gênero dominante no estudo da degradação de hidrocarbonetos poliaromáticos de alto peso molecular por Yan e colaboradores (2015). Seu crescimento pode ser estimulado quando desenvolvido junto com metanogênicas hidrogenotróficas como co-cultura, como evidenciado no estudo de Yamada et al. (2007), pois H<sub>2</sub> é um dos seus subprodutos e em grande quantidade, inibe seu crescimento. Uma ligação entre *Anaerolineaceae* e a degradação metanogênica da anilina foi comprovada através da utilização de sondagem de isótopos estáveis em DNA no trabalho de Sun e colaboradores (2015) e é possível que esse tipo de relação tenha se estabelecido nesta pesquisa.

O gênero *Clostridium* esteve presente em todas as condições (C1 - 5,62%, C2 - 5,70% e C3 - 1,95%) e abriga microrganismos anaeróbios fermentativos, que produzem acetato, butirato, caproato e algumas espécies podem produzir H<sub>2</sub>,

participando da degradação anaeróbia de poluentes xenobióticos e compostos orgânicos tóxicos (ESTEVE-NÚÑEZ; CABALLERO; RAMOS, 2001; KLEINSTEUBER et al., 2008).

O gênero *Clostridium* foi isolado e identificado como degradador do intermediário anaeróbio da anilina, o ácido benzoico (He & Wiegel, 1995). Yohda et al. (2017) demonstraram que *Petrimonas* também realiza consórcio com o gênero *Clostridium*, participando na degradação do hidrocarboneto tricloroetileno. No estudo atual, o gênero *Clostridium* se manteve com AR maior que 1% em todas as condições, sustentando também a hipótese de cooperação entre esses gêneros. A detecção do ácido benzoico, intermediário da rota anaeróbio da anilina, em todas as condições e nos perfis P15 e P10, indica que houve degradação anaeróbia da anilina e do ácido benzoico, sendo o gênero *Clostridium* considerado putativo degradador do ácido benzoico neste reator.

A capacidade de resistência a ambientes tóxicos e a de adaptação a degradação de compostos xenobióticos do gênero *Clostridium* é identificada no estudo de Köchling e colaboradores (2017), que reportaram sua dominação, com AR de 94%, em reator UASB tratando efluente têxtil. O gênero também se mostrou abundante em reator microaerado tratando efluente têxtil com corante azo DB22, potencial formador de anilina mediante clivagem redutiva, no estudo de Carvalho et al. (2020), confirmando sua aptidão para tratamento de compostos aromáticos e a habilidade do gênero de sobrevivência a ambiente com baixas doses de aeração, apesar de ser anaeróbio fermentativo.

Os microrganismos fermentadores encontrados (*Petrimonas*, *Clostridium* e *Longilinea*) podem estar diretamente relacionados com o grupo de arqueias metanogênicas, representado neste trabalho pelas hidrogenotróficas *Methanobacterium* (C1 - 1,94%, C2 - 1,01% e C3 - 0,45%) e as acetotróficas *Methanosaeta* (C1 - 5,17%, C2 - 2,35% e C3 - 0,56%) presentes no reator, indicando relações sintrófica entre os grupos microbianos e apontando para a conclusão da última etapa da DA para a mineralização completa da anilina e seus subprodutos. A presença de gêneros acidogênicos em alta abundância relativa indica que houve continuidade do processo da DA no reator, após a hidrólise de substratos orgânicos

complexos (anilina e subprodutos) em substratos solúveis, levando às etapas seguintes de acidogênese e acetogênese, com posterior utilização do substrato gerado (acetato,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ ) pelas arqueias metanogênicas na produção de metano. O estudo de Carvalho (2020) ressalta a importância de relações sintróficas entre microrganismos fermentativos e metanogênicos, como potencial comunidade degradadora de anilina em condições anóxicas, em presença de microrganismos, como as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas, capazes de controlar as concentrações de hidrogênio existentes no ambiente.

O uso de microaeração intermitente induziu o consumo aeróbio da anilina, possivelmente contribuindo para que não houvesse grande acúmulo de ácidos orgânicos voláteis no reator em C1, como sugerido por Nguyen & Khanal (2018). O consumo desse oxigênio fornecido por bactérias aeróbias facultativas em C2, assim como em C1, possibilitou a permanência de microrganismos anaeróbios estritos no ambiente, diminuindo a exposição destes ao  $\text{O}_2$  e também possibilitou o aumento do coeficiente cinético de degradação de anilina de 9,6 vezes da 1ª para a 3ª injeção de C2, reduzindo o tempo total de degradação da anilina da 3ª injeção de C1 (1,6 dias) para a 3ª de C2 (0,42 dias) em quase 4 vezes.

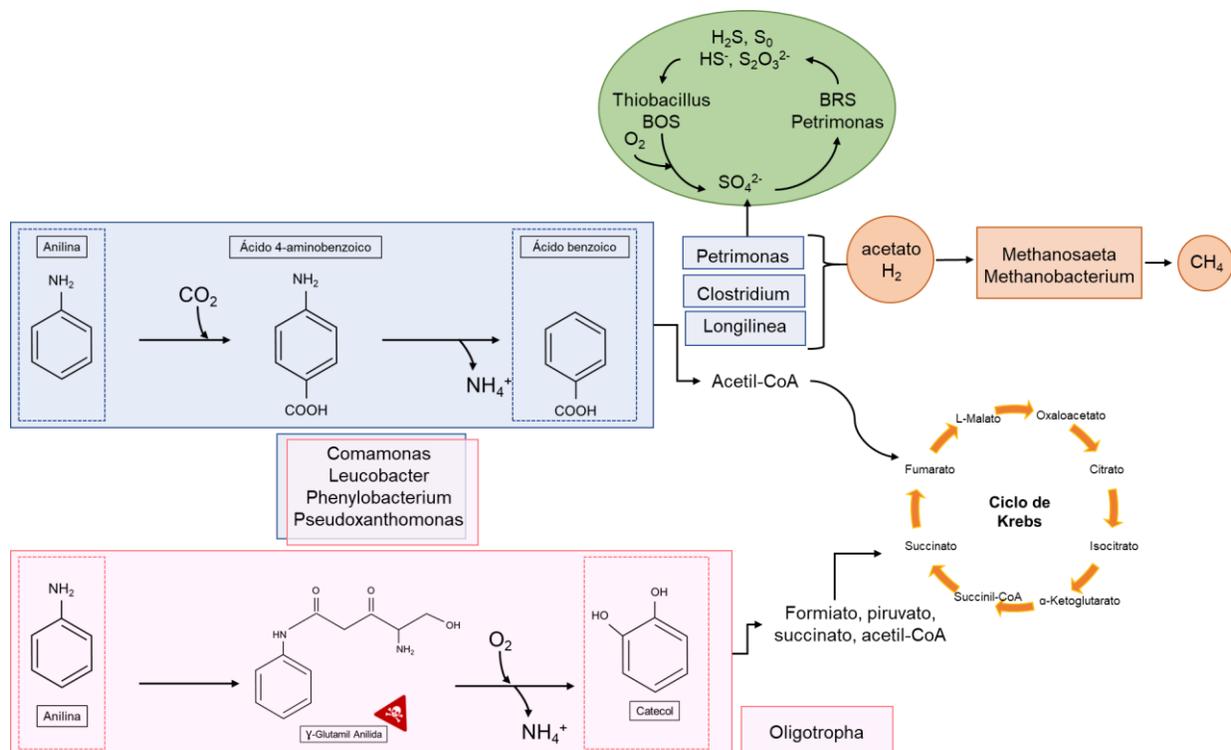
Não se pode deixar notar a presença do gênero *Thiobacillus* (C1 - 0,40%, C2 - 21,03% e C3 - 3,99%), que em C2 se estabeleceu bem, com 21% de AR e é um microrganismo quimiolitotrofo, que pode utilizar  $\text{CO}_2$  produzido na DA como fonte de C e oxida  $\text{H}_2\text{S}$  ou tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) a sulfato, aerobiamente (HUTT et al., 2017) ou anaerobiamente, com nitrato como aceptor de elétrons (KELLY; WOOD, 2000). As bactérias oxidadoras de sulfeto/enxofre (BOS) oxidam biologicamente o sulfeto ( $\text{HS}^-$ ) a enxofre elementar ( $\text{S}^0$ ), tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) e sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) e muitas BOS pertencem aos gêneros *Thiobacillus* e *Acinetobacter* (C3 - 0,74%), presentes neste estudo. Uma das vantagens do uso da microaeração na DA é justamente o estímulo do desenvolvimento de microrganismos que participem do ciclo do enxofre, contribuindo com a transformação do corrosivo e tóxico sulfeto de hidrogênio no ambiente para outros estados de oxidação do enxofre menos agressivos. O gênero *Petrimonas* tem seu crescimento estimulado em presença de enxofre elementar ou sulfato, reduzindo-os a sulfeto ( $\text{H}_2\text{S}$ ) (GRABOWSKI et al., 2005); como população

mais abundante em C2 (28,95%), provavelmente foi pivô da redução do sulfato, juntamente com outras bactérias redutoras de sulfato (BRS) presentes com menor AR, como *Desulfomicrobium*, *Desulfuromonas* e *Desulfovibrio*, que juntos tiveram AR de 0,70% em C1 e 0,39% em C2.

Conforme observado por Amaral e colaboradores, em 2014, trabalhando com a remoção de corantes têxteis em reatores biológicos, é possível que neste estudo houvesse resquícios de sulfato e enxofre elementar no lodo, devido ao inóculo provir de reator que tratava efluente têxtil com alto teor de sulfato, além do sulfato adicionado ao meio basal ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Isto deve ter proporcionado o desenvolvimento das BRS e das BOS no reator, reforçando a ideia de relações sintróficas entre os microrganismos, muito necessária em reatores anaeróbios (BRIONES; RASKIN, 2003). O fornecimento do oxigênio em baixas concentrações ao lodo anaeróbio possibilitou o estabelecimento dessa relação de troca entre diversos grupos microbianos, sustentando a hipótese da adaptação microbiana ao ambiente no qual foram inseridos e favorecendo a remoção de matéria orgânica e da anilina.

O fato dos gêneros *Petrimonas*, *Longilinea*, *Clostridium*, *Thiobacillus*, *Methanosaeta* e *Methanobacterium* juntos corresponderem a 59% e 65% dos microrganismos presentes em C1 e C2, respectivamente, pode indicar a forte participação destes microrganismos no processo de DA existente no reator e também evidencia a cooperação existente entre diferentes grupos microbianos para que haja a efetiva remoção da anilina e seus subprodutos. A microaeração intermitente foi capaz de fornecer ambiente favorável ao enriquecimento dos microrganismos, como pode ser visto pelo aumento do estimador de riqueza, Chao-1, sem causar danos ao trabalho cooperativo harmonioso existente na comunidade, apesar da diminuição da oxigenação fornecida entre C1 e C2. Na Figura 22 pode ser visualizado um resumo gráfico das possíveis rotas metabólicas discutidas neste tópico.

Figura 22 - Possíveis rotas metabólicas identificadas para os microrganismos presentes em C1 e C2, baseadas na literatura. Os compostos destacados com linha tracejada foram monitorados neste estudo



Fonte: a autora (2021).

#### 4.6.2.2 Gêneros microbianos chave em C3

Em C3 observa-se que houve uma mudança fundamental na comunidade microbiana de C2 para C3, com diminuição da AR das anaeróbias fermentativas e aumento das aeróbias facultativas. O aumento acentuado da AR de gêneros em C3 como *Pseudomonas* (0,30% em C2 para 18,26%, C3), *Delftia* (0% em C2 para 11,19%, C3), *Leucobacter* (1,43% em C2, para 11,75%, C3) e *Thermomonas* (0,88% em C2 para 10,20%, C3), que juntos representaram 51,53% da comunidade microbiana e são capazes de realizar desnitrificação, é apoiado pelo ambiente anóxico criado pelo consumo completo do OD no início dos ciclos no reator, como evidenciado no perfil P10. Tais gêneros podem ter utilizado a anilina e seus subprodutos como fontes de carbono e de nitrogênio, além do macronutriente  $\text{NH}_4\text{Cl}$

(280 mg.L<sup>-1</sup>) como principal fonte de N, provavelmente realizando respiração aeróbia em presença de oxigênio e respiração anaeróbia quando o OD era consumido completamente. A presença destes gêneros desnitrificantes e sua elevada AR em C3 evidencia a provável presença de nitrito e nitrato no licor misto e também a respiração anaeróbia da anilina, por vias de desnitrificação, levando a sua biomineralização. Também corrobora com esta hipótese a detecção do intermediário anaeróbio, ácido benzoico, caracterizando acúmulo e consumo, alternadamente, durante C3, juntamente com a sua detecção no perfil P10, durante o período em que o potencial redox (ORP) ficou negativo, confirmando a utilização desta rota na degradação da anilina.

O gênero *Pseudomonas* é considerado um dos mais tolerantes a anilina, degradando concentrações até 32 mM (2.980 mg.L<sup>-1</sup>) e existem trabalhos na literatura que utilizam este gênero como modelo no estudo de enzimas relacionadas à degradação aeróbia de anilina e do catecol (MURAKAMI et al., 1998, 2003; TAKEO et al., 2013). Este gênero também é encontrado em sistemas microaerados de degradação de corantes azo (LADE et al., 2015), em tratamento de efluentes petroquímicos contendo pentilamina e anilina (WANG; BARRINGTON; KIM, 2007) e em consórcio para mineralização de aminas aromáticas sulfonadas (BARSING et al., 2011).

O gênero *Delftia*, que igualmente apresentou elevada AR em C3 (11,25%), também apresentou alta tolerância a anilina, 53,8 mM (5.010 mg.L<sup>-1</sup>), conforme demonstrado em estudo de Liu et al. (2002) com a cepa identificada como *Delftia* sp. AN3, sendo encontrado em tratamentos de efluente com anilina. Este gênero também foi evidenciado em estudo da degradação de anilina com microrganismos isolados ou em consórcio, conforme abordado por Li et al. (2020), Liang et al. (2005), Sheludchenko et al. (2005), XIAO et al. (2009), Yan et al. (2011) e ZHANG et al. (2008). Van der Waals e colaboradores, em 2017, reportaram membros da família *Comamonadaceae*, a qual *Delftia* pertence, como abundantes em reator anaeróbio degradando benzeno por meio da carboxilação como passo inicial e este gênero é capaz de realizar tanto respiração aeróbia quanto anaeróbia da anilina, como verificado por Kahng et al. (2000). Este processo deve ter ocorrido com a anilina no

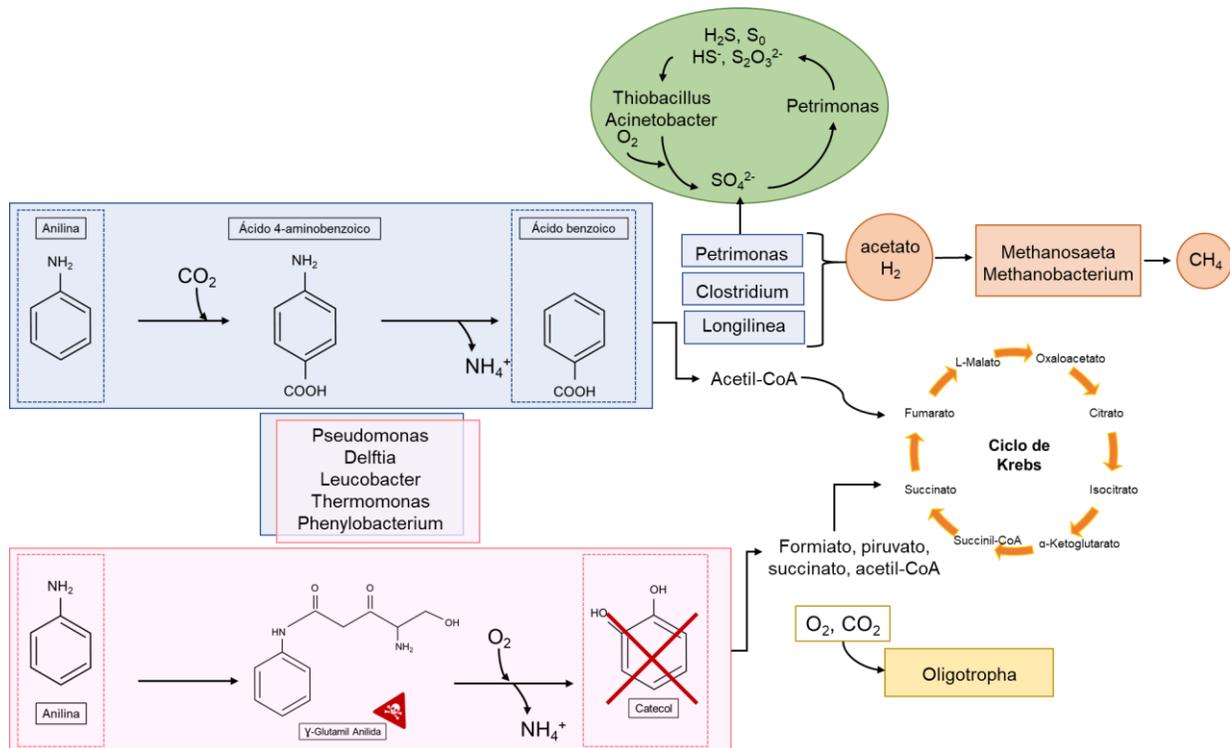
reator em estudo, visto que o ácido benzoico foi o intermediário anaeróbio detectado durante todo o experimento, provavelmente sendo formado através da carboxilação da anilina (SCHNELL; SCHINK, 1991).

Também presentes com elevada abundância relativa em C3, os gêneros *Leucobacter*, *Oligotropha*, tendo os dois primeiros AR superiores a 1% em todas as condições. O gênero *Leucobacter* foi identificado em consórcio na mineralização de sulfonamida, um xenobiótico que tem a anilina como um dos metabólitos resultantes de biodegradação aeróbia e também apresentou alta AR em reator aeróbio-anóxico tratando anilina em altas concentrações (400 mg.L<sup>-1</sup>), assim como o gênero *Thermomonas* (Li et al., 2020). *Thermomonas* igualmente aparece em reator degradando corantes azo (TAN et al., 2013) e pertence à família *Comamonadaceae*, assim como *Delftia*, e apresentou AR em C3 de 10,24%. Já os representantes do gênero *Oligotropha* (16,90%), são estritamente aeróbios e podem crescer heterotroficamente ou autotroficamente, utilizando ácidos orgânicos como substrato (PAUL et al., 2008); este gênero foi identificado em reator tratando efluente com corante azo *Acid Orange 7* em sistema bioeletroquímico com módulos empilhados (KONG et al., 2018) e também em estudo da degradação de sulfonamidas em lodo de manguezal (Yang et al., 2018).

A presença do gênero *Phenylobacterium* também foi evidenciada com relativa importância na degradação da anilina em reatores microaerados. Esse gênero possui metabolismo aeróbio facultativo e é capaz de utilizar 4-hidroxibenzoato (ácido benzoico) e 3-hidroxibutirato como fonte de carbono, sendo encontrado em tratamento de efluente da produção de herbicidas do tipo cloroacetanilidas (CHU et al., 2015), surfactantes (MOTTERAN et al., 2017) e efluente têxtil (KÖCHLING et al., 2017). Tal gênero apresentou AR superior a 1% em todas as condições e demonstra tolerância a toxicidade, por ter permanecido em C3, diferente de outros gêneros degradadores de aromáticos como *Comamonas*, também da família *Comamonadaceae*, e *Pseudoxanthomonas*, que foram encontrados em C1 e C2, porém não aparecem em C3. Neste o gênero *Phenylobacterium* pode ter assumido papéis importantes na degradação da anilina e seus subprodutos, uma vez que pode assumir rotas aeróbia e anaeróbia para degradação de compostos orgânicos. Na

Figura 23 pode ser visualizado um resumo gráfico das possíveis rotas metabólicas discutidas neste tópico.

Figura 23 - Possíveis rotas metabólicas identificadas para os microrganismos presentes em C3, baseadas na literatura. Os compostos destacados com linha tracejada foram monitorados neste estudo.



Fonte: a autora (2021).

#### 4.6.2.3 Avaliação da dinâmica da comunidade de C1 a C3

Observa-se que entre os gêneros existentes em C1, C2 e C3 degradadores de anilina (Tabela 7) havia gêneros que utilizavam o oxigênio estritamente ou que fossem anaeróbios estritos, porém a gama de microrganismos aeróbios facultativos, utilizando como aceptor alternativo de elétrons o oxigênio em sua forma combinada ( $\text{SO}_4^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ), foi maior.

Fica claro que houve uma interação cooperativa entre os gêneros em C1 e C2, enquanto em C3 houve um ambiente competitivo. Nos ambientes C1 e C2 havia disponibilidade de oxigênio suficiente para estimular troca harmônica entre aeróbios

presentes, que não eram maioria da comunidade, e os fermentativos, ambos convivendo em ambiente onde predominava o co-metabolismo. Já em C3 havia uma prevalência de microrganismos aeróbios facultativos, provavelmente realizando o processo de desnitrificação quando em ambiente anóxico, reforçado pela detecção do ácido benzoico como intermediário, e respiração aeróbia durante o pouco tempo em que o oxigênio era fornecido, 10 minutos a cada duas horas. Estes foram favorecidos pelo ambiente anóxico, por meio da diminuição do tempo de fornecimento do oxigênio ao reator e conseqüentemente também da faixa de ORP. O crescimento da biodiversidade desses gêneros, que utilizam o mesmo substrato e mesmos aceptores de elétrons, e a sua equitabilidade (4 gêneros com AR maior que 10%, totalizando 51,53% da comunidade) corroboram com a hipótese de competitividade existente no reator.

O aumento da comunidade ora aeróbia, ora desnitrificante, levou a um estágio no qual havia depleção completa do OD nos ciclos durante a microaeração, como pode ser visualizado no perfil P10, promovendo competição tanto pelo oxigênio escasso quanto pela anilina e seus subprodutos, única fonte de carbono orgânico fornecida. Uma das hipóteses aqui apresentadas é que a competição pela anilina como fonte de carbono pode ter induzido os representantes do gênero *Oligotropha* a utilizar autotroficamente o CO<sub>2</sub> como fonte de carbono alternativa, que é produzido aeróbia e anaerobiamente, abrindo vantagem na competição pelo oxigênio por dispensar a fonte de carbono disputada por tamanha biodiversidade, a anilina, e promovendo o gênero ao segundo lugar em abundância relativa em C3, com 16,90%.

A disputa pelo oxigênio pode ter levado a não oxidação do intermediário aeróbio  $\gamma$ -GA a catecol pelos microrganismos heterótrofos que realizavam degradação da anilina, iniciando a rota de degradação, porém sem finalizá-la e impossibilitando a remoção da toxicidade em C3. Por esse motivo, o intermediário aeróbio catecol não foi detectado em C3 nem no perfil P10, sendo a degradação de anilina provavelmente feita majoritariamente por rota anaeróbia. Takeo e colaboradores, em 2013, verificaram que a ausência da enzima produzida pelo gene *atdA2*, glutamina hidrolase, leva ao acúmulo do  $\gamma$ -GA, acarretando efeitos citotóxicos, apresentados neste trabalho somente no efluente de C3. É válido ressaltar que em Takeo *et al.*

(2013) se verifica breve degradação de anilina, mesmo em ausência do gene *atdA2* e acúmulo de  $\gamma$ -GA, em baixa concentração, como a utilizada neste estudo.

Os gêneros *Pseudomonas* e *Deftia*, sendo tolerantes a altas concentrações de anilina — 32 mM (2.980 mg.L<sup>-1</sup>) e 54 mM (5.010 mg.L<sup>-1</sup>), respectivamente — usufruíram de melhores condições de desenvolvimento no ambiente tóxico de C3 do que outros gêneros. Também o gênero *Oligotropha* possui alta tolerância a substâncias tóxicas, devido a sua capacidade autotrófica de utilizar monóxido de carbono (CO) como fonte de carbono e elétrons. Tais gêneros tem claras vantagens de sobrevivência em ambientes tóxicos sobre microrganismos mais sensíveis.

A competição existente pelo oxigênio escasso e a breve depleção do OD, levaram a um ambiente anóxico, onde foi favorecida a respiração anaeróbia da anilina, com menor saldo energético e consumo mais demorado da matéria orgânica, causando o aumento do tempo de meia-vida em 4 vezes de C2 (1,2 h) para C3 (4,8 h) e manutenção do coeficiente cinético da 1ª (3,41 d<sup>-1</sup>) para a 3ª injeção (3,40 d<sup>-1</sup>). Através do aumento da biodiversidade e equitabilidade, a competição pela fonte de carbono orgânico na comunidade em C3 ocasionou na não alteração do tempo total de degradação da anilina nesta condição (9,4 h), comparavelmente à C2 (10,1 h), pois havia maior diversidade de microrganismos que utilizavam o mesmo substrato, apesar da maior parte da respiração ser anaeróbia em C3.

## 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

A microaeração intermitente em reator anaeróbio mostrou-se um eficiente método para a degradação da anilina, melhorando o processo de digestão anaeróbia em todas as três condições testadas (trinta, quinze e dez minutos de microaeração a cada duas horas em C1, C2 e C3, respectivamente). O decaimento da anilina foi bem representado por reação de primeira ordem. Como resultado da adaptação da microbiota, houve aumento do coeficiente cinético (k), da 1ª para 3ª injeção, de 7,8 vezes em C1 e 9,6 vezes em C2. Em C3, a diminuição da aeração para 10 minutos a cada duas horas não alterou significativamente o coeficiente cinético e o tempo total de degradação foi comparável com o de C2, nas terceiras injeções.

Os parâmetros físico-químicos analisados, T, pH, ORP e OD, mostram que a operação do reator se deu dentro da faixa mesofílica, com pH variando em torno da neutralidade, manteve-se o ambiente anóxico durante as 3 condições (-150 mV a 100 mV) e o OD permaneceu em baixas concentrações, entre 0,1 e 1,75 mg.L<sup>-1</sup>.

Metabólitos intermediários principais, das rotas aeróbia (catecol) e anaeróbia (ácido benzoico) foram detectados em todas as condições, sendo acumulados e consumidos alternadamente. Em C3 o catecol não foi detectado, apontando para a sua não formação e acúmulo de intermediário anterior a ele na rota de degradação. Os perfis dos ciclos de C2 (P15) e C3 (P10) evidenciam a degradação da anilina durante todo o ciclo e através das duas rotas metabólicas, com formação e consumo dos respectivos intermediários nas fases de microaeração e anaeróbia.

Os afluentes dos tratamentos de C1, C2 e C3 apresentaram potencial fitotóxico e citotóxico na germinação de *Allium cepa*, evidenciando o potencial tóxico da anilina, já conhecido, enquanto os efluentes não apresentaram, com exceção do efluente de C3 que apresentou potencial citotóxico, também evidenciando a presença de metabólito tóxico em C3.

Houve adaptação da biomassa ao longo do tempo de degradação deste composto recalcitrante, com aumento da biodiversidade e equitabilidade dos gêneros, de C1 a C3. Através da introdução do oxigênio no reator e utilização da anilina como fonte única de carbono desenvolveram-se em C1 gêneros aeróbios facultativos, como

*Comamonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Leucobacter* e *Phenylobacterium* e aeróbios estritos como *Oligotropha*, degradadores de xenobióticos, capazes de realizar respiração aeróbia ou anaeróbia.

Em C1, C2 e C3 o arranjo da comunidade microbiana aponta para forte relação sintrófica entre os gêneros anaeróbios presentes. A presença dos gêneros *Petrimonas*, *Longilinea*, *Clostridium*, *Methanobacterium* e *Methanosaeta* aponta para efeitos sinérgicos entre os gêneros e a continuidade das diferentes etapas tróficas da DA da anilina e seus intermediários, apesar da introdução de microaeração, a qual auxiliou na degradação da anilina, melhorando o processo de degradação anaeróbia. A presença do gênero aeróbio facultativo *Thiobacillus* durante todas as condições, com destaque para C2 (onde foi o segundo gênero com mais elevada AR) e de outros gêneros de BOS e das BRS no reator também aponta para efeitos de sinergia entre esses microrganismos presentes e para a realização do ciclo do enxofre relacionada à degradação da anilina. O desenvolvimento de bactérias aeróbias e aeróbias facultativas levou ao consumo rápido do oxigênio introduzido na microaeração, criando um mecanismo de proteção da microbiota anaeróbia e possibilitando o desenvolvimento da DA da anilina e seus subprodutos.

A depleção completa do OD e o ambiente anóxico em C3 levaram ao aumento da comunidade aeróbia facultativa degradadora de anilina, com aumento da AR de gêneros como *Pseudomonas*, *Delftia*, *Leucobacter* e *Thermomonas*. O aumento da biodiversidade e equitabilidade em C3 culminou na competição pelo baixo oxigênio fornecido e pelo substrato, promovendo a manutenção do tempo total de degradação da anilina em C3 em valores próximos aos atingidos em C2, mesmo com menor fornecimento de oxigênio.

A competição pelo substrato provavelmente levou o gênero *Oligotropha* (C3 - 16,90%) a realizar autotrofia, deixando-o livre para consumir o oxigênio disponível sem competir pelo substrato orgânico. A competição pelo oxigênio provavelmente levou à degradação aeróbia da anilina com acúmulo do intermediário citotóxico  $\gamma$ -GA, tornando o meio tóxico em C3 e promovendo a sobrevivência dos gêneros aeróbios facultativos com alta tolerância a toxicidade, como *Delftia*, *Pseudomonas*.

No geral, o uso de microaeração intermitente na digestão anaeróbia de anilina promoveu sua eficiente degradação, mediante estímulo da cooperação ou da competição entre as espécies anaeróbias e aeróbias facultativas. A cooperação entre as espécies foi favorável tanto à degradação aeróbia quanto anaeróbia da anilina, proporcionando sua mineralização completa e remoção da toxicidade, porém a diminuição da disponibilidade de alimento e oxigênio desfavoreceram à degradação aeróbia de anilina, não sendo capaz de remover a toxicidade.

Com vistas à aplicação tecnológica, a condição de 15 minutos de microaeração a cada duas horas foi a que, com menor tempo de microaeração fornecida, mostrou-se eficiente e capaz de remover a toxicidade, sendo uma alternativa de tratamento promissora para aplicação em soluções de biorremediação e tratamento de efluentes com estímulo aeróbio, porém com menos custos associados ao convencional fornecimento de aeração contínua.

O estudo da comunidade microbiana é primordial para o entendimento dos efeitos causados pela variação dos parâmetros físico-químicos na remoção e degradação da anilina e outros compostos xenobióticos, sendo uma ferramenta importante para a validação da viabilidade de tratamentos biológicos de efluentes industriais e biorremediação.

Algumas sugestões de trabalhos de continuidade são:

- Investigar microrganismos envolvidos nos ciclos do enxofre e do nitrogênio e suas relações com mecanismos de degradação aeróbia e anaeróbia da anilina em reator intermitentemente microaerado, realizando enriquecimento da biomassa e posterior análise enzimática e de funcionalidade dos genes, através do estudo das reações e da aplicação da metagenômica;
- Examinar o potencial da microaeração intermitente na degradação da anilina em maiores concentrações, avaliando também a capacidade da comunidade adaptada de utilizar a anilina como fonte única de nitrogênio;
- Estimar parâmetros cinéticos de degradação de anilina em reator intermitentemente microaerado em escala piloto utilizando a técnica de bioaugmentação com biomassa enriquecida anaerobiamente.

## REFERÊNCIAS

ABE, T.; SAITO, H.; NIIKURA, Y.; SHIGEOKA, T.; NAKANO, Y. Embryonic development assay with *Daphnia magna*: Application to toxicity of aniline derivatives. **Chemosphere**, v. 45, n. 4–5, p. 487–495, 2001.

ABIT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL (2020). Perfil do Setor. Disponível em: <<https://www.abit.org.br/cont/perfil-do-setor>>. Acesso em: 29 de dezembro de 2020.

ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas, **Norma Brasileira NBR 15: Atividades e operações insalubres**. NR15, 2019.

AGHAPOUR, A. A.; MOUSSAVI, G.; YAGHMAEIAN, K. Biological degradation of catechol in wastewater using the sequencing continuous-inflow reactor (SCR). **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 11, n. 1, 2013.

ALEXANDRA DE, M.; O'CONNOR, O. A.; KOSSON, D. S. Metabolism of aniline under different anaerobic electron-accepting and nutritional conditions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 233–239, 1994.

AMARAL, F. M.; KATO, M. T.; FLORÊNCIO, L.; GAVAZZA, S. Color, organic matter and sulfate removal from textile effluents by anaerobic and aerobic processes. **Bioresource Technology**, v. 163, p. 364–369, 2014.

APHA, AWWA, WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20. ed. Washington: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation, 2005.

ARORA, P. K. Bacterial degradation of monocyclic aromatic amine. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. JUL, p. 1–14, 2015.

BAÊTA, B. E L.; LIMA, D. R S.; SILVA, S. Q.; AQUINO, S. F. Evaluation of soluble microbial products and aromatic amines accumulation during a combined anaerobic/aerobic treatment of a model azo dye. **Chemical Engineering Journal**, v. 259, p. 936–944, 2015.

BALAPURE, K.; JAIN, K.; BHATT, N.; MADAMWAR, D. Exploring bioremediation strategies to enhance the mineralization of textile industrial wastewater through sequential anaerobic-microaerophilic process. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 106, p. 97–105, 2016.

BALAPURE, K.; BHATT, N.; MADAMWAR, D. Mineralization of reactive azo dyes present in simulated textile waste water using down flow microaerophilic fixed film bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 1–7, 2015.

- BARSING, P; TIWARI, A; JOSHI, T; GARG, S. Application of a novel bacterial consortium for mineralization of sulphonated aromatic amines. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 765–771, 2011.
- BARTON, L. L.; NORTHUP, D. E. **Microbial Ecology**. New Jersey: Wiley-Blackwell. 2011.
- BESSER, H.; HAMED, Y. Causes and risk evaluation of oil and brine contamination in the Lower Cretaceous Continental Intercalaire aquifer in the Kebili region of southern Tunisia using chemical fingerprinting techniques. **Environmental Pollution**, v. 253, p. 412–423, 2019.
- BMAS, MINISTÉRIO FEDERAL DO TRABALHO E ASSUNTOS SOCIAIS (2006). TRGs 900 Limites de Exposição Ocupacional. BARbBl. Edição 1/2006 p. 1-69. [Em alemão] <[https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRGS/pdf/TRGS-900.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=18](https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRGS/pdf/TRGS-900.pdf?__blob=publicationFile&v=18)>. Acesso em: 6 de dezembro de 2020.
- BOON, N; GORIS, J; VOS, P D; VERSTRAETE, W; TOP, E. M. Bioaugmentation of Activated Sludge by an Indigenous 3-Chloroaniline-Degrading *Comamonas testosteroni* Strain, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 2906–2913, 2000.
- BOTHEJU, D.; LIE, B.; BAKKE, R. Oxygen effects in anaerobic digestion - II. **Modeling, Identification and Control**, v. 31, n. 2, p. 55–65, 2010.
- CONAMA, Resolução nº 357, de 15 de junho de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.** Publicada no Diário Oficial da União em 18/03/2005; Brasília, DF.
- CONAMA, Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. **Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA.** Publicada no Diário Oficial da União em 16/05/2011; Brasília, DF.
- BRIONES, A.; RASKIN, L. Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 270–276, 2003.
- BRÜSCHWEILER, B. J.; MERLOT, C. Azo dyes in clothing textiles can be cleaved into a series of mutagenic aromatic amines which are not regulated yet. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 88, p. 214–226, 2017.
- CARVALHO, José Roberto Santo de. **Ecologia microbiana de reatores UASB submetidos a diferentes condições de operação para tratar efluente têxtil.** 2016.

77f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

CARVALHO, J.R.S; AMARAL, F.M.; L. FLORENCIO; M.T. KATO; T.P. DELFORNO; S. GAVAZZA. Microaerated UASB reactor treating textile wastewater: The core microbiome and removal of azo dye Direct Black 22. **Chemosphere**, v. 242, p. 125157, 2020a.

CARVALHO, José Roberto Santo de. **Degradação anaeróbia de anilina utilizando diferentes culturas microbianas**. 2020. 82f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020b.

CHAGAS-SPINELLI, A. C. O.; KATO, M.T.; LIMA, E. S. D.; GAVAZZA, S; Bioremediation of a tropical clay soil contaminated with diesel oil. **Journal of Environmental Management**, v. 113, p. 510–516, 2012.

CHATURVEDI, N. K.; KATOCH, S. S. Remedial technologies for aniline and aniline derivatives elimination from wastewater. **Journal of Health and Pollution**, v. 10., n. 25, p. 1-11, 2020.

CHEN, S.; SUN, D.; CHUNG, J. S. Simultaneous methanogenesis and denitrification of aniline wastewater by using anaerobic-aerobic biofilm system with recirculation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, n. 1–3, p. 575–580, 2009.

CHINADAILY. Chemical leak into river puts focus on plant. 11 de janeiro de 2013. Disponível em: <[http://usa.chinadaily.com.cn/epaper/2013-01/11/content\\_16105865.htm](http://usa.chinadaily.com.cn/epaper/2013-01/11/content_16105865.htm)> Acesso em: 17 de julho de 2020. 2020a.

CHINADAILY. High levels of aniline found in Hebei water supply. 08 de abril de 2013. Disponível em: <[http://www.chinadaily.com.cn/china/////2013-04/08/content\\_16384273.htm](http://www.chinadaily.com.cn/china/////2013-04/08/content_16384273.htm)> Acesso em: 17 de julho de 2020. 2020b.

CHU, C; YUAN, C; LIU, X; YAO, L; ZHU, J; HE, J; KWON, S W; HUANG, X. *Phenylobacterium kunshanense* sp. Nov., isolated from the sludge of a pesticide manufacturing factory. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 325–330, 2015.

CUI, D; SHEN, D; WU, C; LI, C; LENG, D; ZHAO, M; Biodegradation of aniline by a novel bacterial mixed culture AC. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 125, p. 86–96, 2017.

D'ANDREA, M. A.; REDDY, G. K. Health consequences among subjects involved in gulf oil spill clean-up activities. **American Journal of Medicine**, v. 126, n. 11, p. 966–974, 2013.

DA SILVA, Carlos Pereira. **Tratamento anaeróbio de efluente têxtil: Toxicidade a organismos metanogênicos e interferência dos íons sulfato e sulfeto no processo de descoloração**. 2016. 146 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

- DINO, A. ANLI; BRINDHA, R.; JAYAMUTHUNAGAI, J.; BHARATHIRAJA, B. 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.
- DOM, N; KNAPEN, D; BENOOT, D; NOBELS, I; BLUST, R. Aquatic multi-species acute toxicity of (chlorinated) anilines: Experimental versus predicted data. **Chemosphere**, v. 81, n. 2, p. 177–186, 2010.
- DONG, X.; DRÖGE, J; TOERNE, C. V; MAROZAVA, S; MCHARDY, A. C.; MECKENSTOCK, R. U. Reconstructing metabolic pathways of a member of the genus *Pelotomaculum* suggesting its potential to oxidize benzene to carbon dioxide with direct reduction of sulfate. **FEMS Microbiology eEcology**, v. 93, n. 3, p. 1–9, 2017.
- DUARTE, M.; NIELSEN, A; CAMARINHA-SILVA, A; VILCHEZ-VARGAS, R.; BRULS, T; WOS-OXLEY, M. L.;JAUREGUI, R.; PIEPER, D. H. Functional soil metagenomics: elucidation of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation potential following 12 years of in situ bioremediation. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 8, p. 2992–3011, 2017.
- ELSHAHED, M. S; BHUPATHIRAJU, V. K.; WOFFORD, N. Q.; NANNY, M. A.; MCINERNEY, M. J. Metabolism of Benzoate, Cyclohex-1-ene Carboxylate, and Cyclohexane Carboxylate by Syntrophus aciditrophicus Strain SB in Syntrophic Association with H<sub>2</sub>-Using Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1728–1738, 2001.
- ESTEVE-NÚÑEZ, A.; CABALLERO, A.; RAMOS, J. L. Biological Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 65, n. 3, p. 335–352, 2001.
- FARHADIAN, M.; DUCHEZ, D.; VACHELARD, C.; LARROCHE, C. Monoaromatics removal from polluted water through bioreactors-A review. **Water Research**, v. 42, n. 6–7, p. 1325–1341, 2008.
- FERRAZ, E. R. A.; GRANDO, M. D.; OLIVEIRA, D. P. Textile effluent treatment in a UASB reactor followed by submerged aerated biofiltration. **Water Science and Technology**, v. 64, n. 8, p. 1581–1589, 2011.
- FUJII, T.; TAKEO, M.; MAEDA, Y. Plasmid-encoded genes specifying aniline oxidation from *Acinetobacter* sp. strain YAA. **Microbiology**, v. 143, n. 1, p. 93–99, 1997.
- FUKUMORI, F.; SAINT, C. P. Nucleotide sequences and regulational analysis of genes involved in conversion of aniline to catechol in *Pseudomonas putida* UCC22 (pTDN1). **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 2, p. 399–408, 1997.
- GAMA, N. V.; FERREIRA, A.; BARROS-TIMMONS, A. Polyurethane foams: Past, present, and future. **Materials**, v. 11, n. 10, p. 1-35, 2018.

GAN, H. M.; IBRAHIM, Z.; SHAHIR, S.; YAHYA, A. Identification of genes involved in the 4-aminobenzenesulfonate degradation pathway of *Hydrogenophaga* sp. PBC via transposon mutagenesis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 318, n. 2, p. 108–114, 2011.

GANG, X.; WANG, Q.; QIAN, Y.; GAO, P.; SU, Y.; LIU, Z.; CHEN, H.; LI, X.; CHEN, J. 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. February, p. 840–848, 2019.

GAVAZZA, S.; GUZMAN, J. J. L.; ANGENENT, L. T. Electrolysis within anaerobic bioreactors stimulates breakdown of toxic products from azo dye treatment. **Biodegradation**, v. 26, n. 2, p. 151–160, 2015.

GOTTLIEB, A.; SHAW, C.; SMITH, A.; WHEATLEY, A.; FORSYTHE, S. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. **Journal of Biotechnology**, v. 101, n. 1, p. 49–56, 2003.

GRABOWSKI, A.; TINDALL, B. J.; BARDIN, V.; BLANCHET, D.; JEANTHON, C. *Petrimonas sulfuriphila* gen. nov., sp. nov., a mesophilic fermentative bacterium isolated from a biodegraded oil reservoir. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 1113–1121, 2005.

GRIFFITHS, J. **The Evolution of Present-Day Dye Technology. In: The Chemistry and Application of Dyes.** New York, Plenum Press, 1990.

HA DANH, D.; NGUYEN THI, O. Anaerobic Degradation of Chloroanilines by *Geobacter* sp. KT5. **Current Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 248–257, 2019.

HONGSAWAT, P.; VANGNAI, A. S. Biodegradation pathways of Chloroanilines by *Acinetobacter baylyi* strain GFJ2. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n. 2–3, p. 1300–1307, 2011.

HOSSEINI KOUPAIE, E.; ALAVI MOGHADDAM, M. R.; HASHEMI, S. H. Evaluation of integrated anaerobic/aerobic fixed-bed sequencing batch biofilm reactor for decolorization and biodegradation of azo dye Acid Red 18: Comparison of using two types of packing media. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 415–421, 2013.

HOU, R.; LUO, X.; LIU, C.; ZHOU, L.; WEN, J.; YUAN, Y. Enhanced degradation of triphenyl phosphate (TPHP) in bioelectrochemical systems: Kinetics, pathway and degradation mechanisms. **Environmental Pollution**, v. 254, p. 113040, 2019.

HU, S.; WU, Y.; WANG, L.; YAO, H.; LI, T. Simultaneous removal of nitrate and aniline from groundwater by cooperating heterotrophic denitrification with anaerobic ammonium oxidation. **Desalination and Water Treatment**, v. 52, n. 40–42, p. 7937–7950, 2014.

HUANG, F.; LI, X.; GUO, J.; FENG, H.; YANG, F. Aromatic hydrocarbon compound degradation of phenylacetic acid by indigenous bacterial *Sphingopyxis* isolated from

Lake Taihu. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 82, n. 22, p. 1164–1171, 2019.

HUANG, J.; LING, J.; KUANG, C.; CHEN, J.; XU, Y.; LI, Y. 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.

HUTT, L. P.; HUNTEMANN, M.; CLUM, A.; PILLAY, M.; PALANIAPPAN, K.; VARGHESE, N.; MIKHAILOVA, N.; STAMATIS, D.; REDDY, T.; DAUM, C.; SHAPIRO, N.; IVANOVA, N.; KYRPIDES, N.; WOYKE, T.; BODEN, R. Permanent draft genome of *Thiobacillus thioparus* DSM 505T, an obligately chemolithoautotrophic member of the Betaproteobacteria. **Standards in Genomic Sciences**, v. 12, n. 1, p. 1–8, 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa Industrial Anual (PIA) – Empresa de 2018. Tabela 2.7k - Dados gerais das unidades locais industriais de empresas industriais com 5 ou mais pessoas ocupadas, por Unidades da Federação, segundo as divisões de atividades - Região Nordeste – 2018. Recife, 17 de julho de 2020.

JIANG, Y.; WANG, H.; SHANG, Y.; YANG, K. Simultaneous removal of aniline, nitrogen and phosphorus in aniline-containing wastewater treatment by using sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 422–429, 2016.

JOHNSTON, W. T. The discovery of aniline and the origin of the term “aniline dye”. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 83, n. 2, p. 83–87, 2008.

JONES, E.; FOX, V. Lack of clastogenic activity of aniline hydrochloride in the mouse bone marrow. **Mutagenesis**, v. 18, n. 3, p. 283–286, 2003.

KÄFFERLEIN, H. U.; BRODING, H. C.; BÜNGER, J.; JETTKANT, B.; KOSLITZ, S.; LEHNERT, M.; MAREK, E. M.; BLASZKEWICZ, M.; MONSÉ, C.; WEISS, T.; BRÜNING, T. Human exposure to airborne aniline and formation of methemoglobin: A contribution to occupational exposure limits. **Archives of Toxicology**, v. 88, n. 7, p. 1419–1426, 2014.

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.

KEENER, W. K.; ARP, D. J. Transformations of aromatic compounds by *Nitrosomonas europaea*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 1914–1920, 1994.

KELLY, D. P.; WOOD, A. P. Confirmation of *Thiobacillus denitrificans* as a species of the genus *Thiobacillus*, in the  $\beta$ -subclass of the Proteobacteria, with strain NCIMB 9548 as the type strain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 547–550, 2000.

KHAN, M. F.; WU, X.; KAPHALIA, B. S.; BOOR, P. J.; ANSARI, G. A. S. Nitrotyrosine formation in splenic toxicity of aniline. **Toxicology**, v. 194, n. 1–2, p. 95–102, 2003.

KIM, M. K.; IM, W. T.; IN, J. G.; KIM, S. H.; YANG, D. C. *Thermomonas koreensis* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from a ginseng field. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 1615–1619, 2006.

KIRIMURA, K.; GUNJI, H.; WAKAYAMA, R.; HATTORI, T.; ISHII, Y. Enzymatic Kolbe-Schmitt reaction to form salicylic acid from phenol: Enzymatic characterization and gene identification of a novel enzyme, *Trichosporon moniliiforme* salicylic acid decarboxylase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 394, n. 2, p. 279–284, 2010.

KLEINSTEUBER, S.; SCHLEINITZ, K. M.; BREITFELD, J.; HARMS, H.; RICHNOW, H. H.; VOGT, C. Molecular characterization of bacterial communities mineralizing benzene under sulfate-reducing conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, n. 1, p. 143–157, 2008.

KÖCHLING, T.; FERRAZ JR, A. D. N.; FLORENCIO, L.; KATO, M. T.; GAVAZZA, S. 454-Pyrosequencing analysis of highly adapted azo dye-degrading microbial communities in a two-stage anaerobic–aerobic bioreactor treating textile effluent. **Environmental Technology**, v. 38, n. 6, p. 687–693, 2017.

KONG, F. REN, H. Y.; PAVLOSTATHIS, S. G.; WANG, A.; NAN, J.; REN, N. Enhanced azo dye decolorization and microbial community analysis in a stacked bioelectrochemical system. **Chemical Engineering Journal**, v. 354, n. June, p. 351–362, 2018.

KUPPUSAMY, S.; THAVAMANI, P.; VENKATESWARLU, K.; LEE, Y. B.; NAIDU, R.; MEGHARAJ, M. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. **Chemosphere**, v. 168, p. 944–968, 2017.

LADE, H.; KADAM, A.; PAUL, D.; GOVINDWAR, S. Biodegradation and detoxification of textile azo dyes by bacterial consortium under sequential microaerophilic/aerobic processes. **EXCLI Journal**, v. 14, p. 158–174, 2015.

LI, D.; YANG, M.; LI, Z.; QI, R.; HE, J.; LIU, H. Change of bacterial communities in sediments along Songhua River in Northeastern China after a nitrobenzene pollution event. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 65, n. 3, p. 494–503, 2008.

LI, J.; LIANG, Y.; MIAO, Y.; WANG, D.; JIA, S.; LIU, C. H. 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.; ZHANG, Q.; LI, M.; SANG, W.; WANG, Y.; WU, L.; YANG, Y. 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, Q.; TAKEO, M.; CHEN, M.; ZHANG, W.; XU, Y.; LIN, M. Chromosome-encoded gene cluster for the metabolic pathway that converts aniline to TCA-cycle intermediates in *Delftia tsuruhatensis* AD9. **Microbiology**, v. 151, n. 10, p. 3435–3446, 2005.

LIANG, Q.; LLOYD-JONES, G. *Sphingobium scionense* sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from contaminated sawmill soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 413–416, 2010.

LIANG, Y.; LI, G.; VAN NOSTRAN, J. D.; HE, Z.; WU, L.; DENG, Y.; ZHANG, X.; ZHOU, J. Microarray-based analysis of microbial functional diversity along an oil contamination gradient in oil field. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 70, n. 2, p. 324–333, 2009.

LIU, Q.; SINGH, V. P.; FU, Z.; WANG, J.; HU, L. An anoxic-aerobic system for simultaneous biodegradation of phenol and ammonia in a sequencing batch reactor. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 12, p. 11789–11799, 2017.

LIU, Z.; YANG, H.; HUANG, Z.; ZHOU, P.; LIU, S. J. Degradation of aniline by newly isolated, extremely aniline-tolerant *Delftia* sp. AN3. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 5, p. 679–682, 2002.

LIU, Z. P.; WANG, B. J.; LIU, Y. H. LIU, S. J. *Novosphingobium taihuense* sp. nov., a novel aromatic-compound-degrading bacterium isolated from Taihu Lake, China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 1229–1232, 2005.

MAEDA, A.H.; NISHI, S.; ISHII, S.; SHIMANE, Y.; KOBAYASHI, H.; ICHIKAWA, J.; KUROSAWA, K.; ARAI, W.; TAKAMI, H.; OHTAA, Y. Complete Genome Sequence of *Altererythrobacter* sp. Strain B11, an Aromatic Monomer-Degrading Bacterium, Isolated from Deep-Sea Sediment under the Seabed off Kashima, Japan. **Genome Announcements**, v. 6, n. 12, p. 11–12, 2018.

MAKHDOUMI, P.; HOSSINI, H.; ASHRAF, G. M.; LIMOEI, M. Molecular Mechanism of Aniline Induced Spleen Toxicity and Neuron Toxicity in Experimental Rat Exposure: A Review. **Current Neuropharmacology**, v. 17, n. 3, p. 201–213, 2018.

MATA, A. M. T.; PINHEIRO, H. M.; LOURENÇO, N. D. Effect of sequencing batch cycle strategy on the treatment of a simulated textile wastewater with aerobic granular sludge. **Biochemical Engineering Journal**, v. 104, p. 106–114, 2015.

MENEZES, O.; BRITO, R.; HALLWASS, F.; FLORÊNCIO, L.; KATO, M. T.; GAVAZZA, S. 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.

MOOSVI, S. A.; PACHECO, C. C.; MCDONALD, I. R.; DE MARCO, P.; PEARCE, D. A.; KELLY, D. P.; WOOD, A. P. Isolation and properties of methanesulfonate-degrading *Afiplia felis* from Antarctica and comparison with other strains of *A. felis*. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 22–33, 2005.

MOREIRA, F. C.; BOAVENTURA, R.A.R.; BRILLAS, E.; VILAR, V.J.P. Electrochemical advanced oxidation processes: A review on their application to synthetic and real wastewaters. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 202, p. 217–261, 2017.

MOTTERAN, F.; BRAGA, J.K.; SILVA, E.L.; VARESCHE, M.B.A. Influence of Sucrose on the Diversity of Bacteria Involved in Nonionic Surfactant Degradation in Fluidized Bed Reactor. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 228, n. 1, 2017.

MURAKAMI, S.; NAKANISHI, Y.; KODAMA, N.; TAKENAKA, S.; SHINKE, R.; AOKI, K. Purification, characterization, and gene analysis of catechol 2,3-dioxygenase from the aniline-assimilating bacterium *Pseudomonas* species AW-2. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 4, p. 747–752, 1998.

MURAKAMI, S.; HAYASHI, T.; MAEDA, T.; TAKENAKA, S.; AOKI, K. Cloning and functional analysis of aniline dioxygenase gene cluster, from *Frateuria* species ANA-18, that metabolizes aniline via an ortho-cleavage pathway of catechol. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, n. 11, p. 2351–2358, 2003.

NGUYEN, D.; KHANAL, S. K. A little breath of fresh air into an anaerobic system: How microaeration facilitates anaerobic digestion process. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 7, p. 1971–1983, 2018.

O'NEILL, F. J.; BROMLEY-CHALLENGER, K.C.A.; GREENWOOD, R. J. KNAPP, J. S. Bacterial growth on aniline: Implications for the biotreatment of industrial wastewater. **Water Research**, v. 34, n. 18, p. 4397–4409, 2000.

PAUL, D.; BRIDGES, S.; BURGESS, S.C.; DANDASS, Y.; LAWRENCE, M.L. Genome sequence of the chemolithoautotrophic bacterium *Oligotropha carboxidovorans* OM5T. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 15, p. 5531–5532, 2008.

PEREIRA, R.; PEREIRA, L.; VAN DER ZEE, F.P.; ALVES, M.M. Fate of aniline and sulfanilic acid in UASB bioreactors under denitrifying conditions. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 191–200, 2011.

PERES, C. M.; NAVEAU, H.; AGATHOS, S. N. Biodegradation of nitrobenzene by its simultaneous reduction into aniline and mineralization of the aniline formed. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, n. 3, p. 343–349, 1998.

PIELESZ, A.; BARANOWSKA, I.; RYBAK, A.; WŁOCHOWICZ, A. Detection and determination of aromatic amines as products of reductive splitting from selected azo dyes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, n. 1, p. 42–47, 2002.

Perfil da Indústria do Estado de Pernambuco, Portal da Indústria. Confederação Nacional da Indústria (CNI). 2020. Disponível em: <<http://perfildaindustria.portaldaindustria.com.br/estado/pe#this>>. Acesso em 17 de julho de 2020.

PORTAL DE DADOS ESTATÍSTICOS UNIDO, Perfil do País. United Nations Industrial Development Organization (UNIDO). 2020. Disponível em <<https://stat.unido.org/>>. Acesso em 17 de julho de 2020.

POURAN, S.R.; AZIZ, A. R. A.; DAUD, W. M. A. W. Review on the main advances in photo-Fenton oxidation system for recalcitrant wastewaters. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p. 53–69, 2015.

PUNZI, M.; NILSSON, F.; ANBALAGAN, A.; SVENSSON, B.M.; JÖNSSON, K.; MATTIASSON, B.; JONSTRUP, M. Combined anaerobic-ozonation process for treatment of textile wastewater: Removal of acute toxicity and mutagenicity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 292, p. 52–60, 2015a.

PUNZI, M.; ANBALAGAN, A.; BÖRNER, R.A.; SVENSSON, B.M.; JONSTRUP, M.; MATTIASSON, B. Degradation of a textile azo dye using biological treatment followed by photo-Fenton oxidation: Evaluation of toxicity and microbial community structure. **Chemical Engineering Journal**, v. 270, p. 290–299, 2015b.

QI, P.; CHEN, H.; LIU, Y. Treatment of aniline-contaminated wastewater by sequencing biofilm batch reactor system under Micro-Aerobic condition. **Journal of Shanghai Jiaotong University (Science)**, v. 20, n. 5, p. 634–640, 29 out. 2015.

QIAO, Z.; SUN, R.; WU, Y.; HU, S.; LIU, X.; CHAN, J. Microbial Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Dominates Simultaneous Removal of Aniline and Ammonium in Aquatic Ecosystems. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 231, n. 3, 2020.

QU, Y.; SPAIN, J. C. Biodegradation of 5-Nitroanthranilic acid by *Bradyrhizobium sp.* strain JS329. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1417–1422, 2010.

REIS, A.C.; ČVANČAROVÁ, M.; LIU, Y.; LENZ, M.; HETTICH, T.; KOLVENBACH, B.A.; CORVINI, P.F.X.; NUNES, O.C. Biodegradation of sulfamethoxazole by a bacterial consortium of *Achromobacter denitrificans* PR1 and *Leucobacter sp.* GP. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 23, p. 10299–10314, 2018.

ROCHMAN, F.F.; SHEREMET, A.; TAMAS, I.; SAIDI-MEHRABAD, A.; KIM, J.J.; DONG, X.; SENSEN, C.W.; GIEG, L.M.; DUNFIELD, P. F. Benzene and naphthalene degrading bacterial communities in an oil sands tailings pond. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. SEP, p. 1–12, 2017.

RODRIGUES-LIMA, F.; DAIROU, J.; DIAZ, C.L.; RUBIO, M.C.; SIM, E.; SPAINK, H.P.; DUPRET, J.M. Cloning, functional expression and characterization of Mesorhizobium loti arylamine N-acetyltransferases: Rhizobial symbiosis supplies leguminous plants with the xenobiotic N-acetylation pathway. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 505–512, 2006.

SANG, W.; CUI, J.; FENG, Y.; MEI, L.; ZHANG, Q.; LI, D.; ZHANG, W. Degradation of aniline in aqueous solution by dielectric barrier discharge plasma: Mechanism and degradation pathways. **Chemosphere**, v. 223, p. 416–424, 2019.

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, 1989.

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.

SHARMA, N. K.; PHILIP, L. Treatment of Phenolics, Aromatic Hydrocarbons, and Cyanide-Bearing Wastewater in Individual and Combined Anaerobic, Aerobic, and Anoxic Bioreactors. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 1, p. 300–322, 2015.

SHELUDCHENKO, M. S.; KOLOMYTSEVA, M. P.; TRAVKIN, V. M.; AKIMOV, V. N.; GOLOVLEVA, L. A. Degradation of aniline by *Delftia tsuruhatensis* 14S in batch and continuous processes. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 530–534, 2005.

SHEN, J.; ZHANG, C.; SUN, X.; LI, J.; WANG, L. Enhanced biodegradation of aniline under anoxic condition. **Advanced Materials Research**, v. 356–360, p. 25–30, 2012.

SOUZA, Victor Ventura de. **Análise toxicogenética de anilina em diferentes condições de biodegradação**. 2021. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2021.

STARLING, M.C.V.M.; DOS SANTOS, P.H.R.; DE SOUZA, F.A.R.; OLIVEIRA, S.C.; LEÃO, M.M.D.; AMORIM, C.C. Application of solar photo-Fenton toward toxicity removal and textile wastewater reuse. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 14, p. 12515–12528, 2017.

SUN, W.; LI, Y.; MCGUINNESS, L.R.; LUO, S.; HUANG, W.; KERKHOF, L.J.; MACK, E. E.; HÄGGBLUM, M.M.; FENNELL, D.E. Identification of Anaerobic Aniline-Degrading Bacteria at a Contaminated Industrial Site. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 18, p. 11079–11088, 2015.

SUZUKI, K.-I.; SASAKI, J.; URAMOT, M.; NAKASE, T. ; KOMAGATA, K. *Agromyces mediolanus* sp. nov., nom. rev., comb. nov., a Species for “*Corynebacterium mediolanum*” Mamoli 1939 and for Some Aniline-Assimilating Bacteria Which Contain

2,4-Diaminobutyric Acid in the Cell Wall Peptidoglycan. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 1, p. 88–93, 1996.

TAKEO, M.; OHARA, A.; SAKAE, S.; OKAMOTO, Y.; KITAMURA, C.; KATO, D.I.; NEGORO, S. Function of a glutamine synthetase-like protein in bacterial aniline oxidation via  $\gamma$  glutamylanilide. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 19, p. 4406–4414, 2013.

TAN, L.; NING, S.; XIA, H.; SUN, J. Aerobic decolorization and mineralization of azo dyes by a microbial community in the absence of an external carbon source. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 85, p. 210–216, 2013.

TAO, N.; LIU, G.; BAI, L.; TANG, L.; GUO, C. Genotoxicity and growth inhibition effects of aniline on wheat. **Chemosphere**, v. 169, p. 467–473, 2017.

THIERRY, S.; MACARIE, H.; IIZUKA, T.; GEIßDÖRFER, W.A.; ASSIH, E.A.; SPANEVELLO, M.; VERHE, F.; THOMAS, P.; FUDOU, R.; MONROY, O.; LABAT, M.; OUATTARA, A.S. *Pseudoxanthomonas mexicana* sp. nov. and *Pseudoxanthomonas japonensis* sp. nov., isolated from diverse environments, and emended descriptions of the genus *Pseudoxanthomonas* Finkmann et al. 2000 and of its type species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2245–2255, 2004.

THORN, K.A.; PETTIGREW, P.J.; GOLDENBERG, W.S.; WEBER, E.J. Covalent binding of aniline to humic substances. 2.  $^{15}\text{N}$  NMR studies of nucleophilic addition reactions. **Environmental Science and Technology**, v. 30, n. 9, p. 2764–2775, 1996.

TOMEI, M. C.; PASCUAL, J.S.; ANGELUCCI, D.M. Analysing performance of real textile wastewater bio-decolourization under different reaction environments. **Journal of Cleaner Production**, v. 129, p. 468–477, 2016.

TORÄNG, L.; REUSCHENBACH, P.; MÜLLER, B.; NYHOLM, N. Laboratory shake flask batch tests can predict field biodegradation of aniline in the Rhine. **Chemosphere**, v. 49, n. 10, p. 1257–1265, 2002.

TOTSUKA, Y.; WAKABAYASHI, K. Biological significance of aminophenyl- $\beta$ -carboline derivatives formed from co-mutagenic action of  $\beta$ -carbolines and aniline and o-toluidine and its effect on tumorigenesis in humans: A review. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 850–851, n. January, p. 503148, 2020.

USDOL, DEPARTAMENTO DE TRABALHO DOS ESTADOS UNIDOS (2017). Código De Regulamentos Federais, CFR GBR 291910.1000, Limites Para Contaminantes Do Ar. Aniline. Disponível em: < <https://www.osha.gov/laws-regs/regulations/standardnumber/1910/1910.1000TABLEZ1> > Acesso em: 6 de dezembro de 2020.

VAN DER WAALS, M.J.; ATASHGAHI, S; DA ROCHA, U.N.; VAN DER ZAAN, B.M.; 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.

VIKRANT, K.; GIRI, B.S.; RAZA, N.; ROY, K.; KIM, K.H.; RAI, B.N.; SINGH, R.S. Recent advancements in bioremediation of dye: Current status and challenges. **Bioresource Technology**, v. 253, n. January, p. 355–367, 2018.

WANG, D.; ZHENG, G.; WANG, S.; ZHANG, D.; ZHOU, L. Biodegradation of aniline by *Candida tropicalis* AN1 isolated from aerobic granular sludge. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 12, p. 2063–2068, dez. 2011.

WANG, L.; BARRINGTON, S.; KIM, J. W. Biodegradation of pentyl amine and aniline from petrochemical wastewater. **Journal of Environmental Management**, v.83, p. 191-197, 2007.

XIAO, C.; NING, J.; YAN, H.; SUN, X.; HU, J. Biodegradation of Aniline by a Newly Isolated *Delftia* sp. XYJ6. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 17, n. 3, p. 500–505, 2009.

XIE, X.; MÜLLER, N. Enhanced aniline degradation by *Desulfatiglans anilini* in a synthetic microbial community with the phototrophic purple sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 42, n. 5, 2019.

YAMADA, T.; IMACHI, H.; OHASHI, A.; HARADA, H.; HANADA, S.; KAMAGATA, Y.; SEKIGUCHI, Y. *Bellilinea caldifistulae* gen. nov., sp. nov and *Longilinea arvoryzae* gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum Chloroflexi isolated from methanogenic propionate-degrading consortia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 2299–2306, 2007.

YAN, H.; YANG, X.; CHEN, J.; YIN, C.; XIAO, C.; CHEN, H. Synergistic removal of aniline by carbon nanotubes and the enzymes of *Delftia* sp. XYJ6. **Journal of Environmental Sciences**, v.23, n. 7, p. 1165–1170, 2011.

YAN, Z.; JIANG, H.; CAI, H.; ZHOU, Y.; KRUMHOLZ, L.R. Complex interactions between the macrophyte *Acorus Calamus* and microbial fuel cells during pyrene and benzo[a]pyrene degradation in sediments. **Scientific Reports**, v. 5, n. December 2014, p. 1–11, 2015.

YANG, C. W.; TSAI, L. L.; CHANG, B. V. Fungi extracellular enzyme-containing microcapsules enhance degradation of sulfonamide antibiotics in mangrove sediments. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 10, p. 10069–10079, 2018.

YEAGER, C.M.; NORTHUP, D.E.; GROW, C.C.; BARNES, S.M.; KUSKE, C.R. Changes in nitrogen-fixing and ammonia-oxidizing bacterial communities in soil of a mixed conifer forest after wildfire. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2713–2722, 2005.

YOHDA, M.; IKEGAMI, K.; AITA, Y.; KITAJIMA, M.; TAKECHI, A.; IWAMOTO, M.; FUKUDA, T.; TAMURA, N.; SHIBASAKI, J.; KOIKE, S.; KOMATSU, D.; MIYAGI, S.; NISHIMURA, M.; UCHINO, Y.; SHIROMA, A.; SHIMOJI, M.; TAMOTSU, H.; ASHIMINE, N.; SHINZATO, M.; OHKI, S.; NAKANO, K.; TERUYA, K.; SATOU, K.; HIRANO, T.; YAGI, O. Isolation and genomic characterization of a Dehalococcoides strain suggests genomic rearrangement during culture. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

ZHANG, G.X. ; REN, S.Z.. XU, M.Y. ; ZENG, G.Q. ; LUO, H.D. ; CHEN, J.L. ; TAN, Z. Y. ; SUN, G.P. *Rhizobium borbori* sp. nov., aniline-degrading bacteria isolated from activated sludge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 816–822, 2011.

ZHANG, T. et al. A novel and complete gene cluster involved in the degradation of aniline by Delftia sp. AN3. *Journal of Environmental Sciences*, v. 20, n. 6, p. 717–724, 2008.

ZHANG, W.; Zhang, Q.; Li, M.; Wang, H.; Li, Y.; Peng, H.; Feng, J. Microbial community and function evaluation in the start-up period of bioaugmented SBR fed with aniline wastewater. **Bioresource Technology**, 2021a.

ZHANG, X.; SONG, Z.; TANG, Q.; WU, M.; ZHOU, H.; LIU, L.; QU, Y. Performance and microbial community analysis of bioaugmented activated sludge for nitrogen-containing organic pollutants removal. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 101, p. 373–381, 2021b.

ZHANG, Z.; GUO, H.; SUN, J.; GONG, X.; WANG, C.; WANG, H. Exploration of the biotransformation processes in the biodegradation of phenanthrene by a facultative anaerobe, strain PheF2, with Fe(III) or O<sub>2</sub> as an electron acceptor. **Science of the Total Environment**, v. 750, p. 142245, 2021c.

ZHU, L.; LV, M.; DAI, X.; XU, X.; QI, H.; YU, Y. Reaction kinetics of the degradation of chloroanilines and aniline by aerobic granule. **Biochemical Engineering Journal**, v. 68, p. 215-220, 2012.

ZHU, Y.; WANG, W.; NI, J.; HU, B. Cultivation of granules containing anaerobic decolorization and aerobic degradation cultures for the complete mineralization of azo dyes in wastewater. **Chemosphere**, v. 246, p. 125753, 2020.

ZOCK, J.P.; RODRÍGUEZ-TRIGO, G.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, E.; ESPINOSA, A.; POZO-RODRÍGUEZ, F.; GÓMEZ, F.; FUSTER, C.; CASTAÑO-VINYALS, G.; ANTÓ, J.M.; BARBERÀ, J.A. Persistent respiratory symptoms in clean-up workers 5 years after the Prestige oil spill. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 69, n. 7, p. 508–513, 2012.

## **ANEXO A - METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO DO DNA PELO FABRICANTE DO KIT POWERSOIL™**

O DNA foi extraído usando o kit de isolamento PowerSoil™ (Mo Bio Laboratories Inc. Carlsbad, CA, EUA), seguindo as etapas descritas abaixo:

- 1: Transferir 0,25 g da amostra de lodo para os tubos PowerBead fornecidos e usar o vórtice para misturar suavemente;
- 2: Adicionar 60 µL de solução C1 e vertê-lo várias vezes;
- 3: Usar o MO BIO Vortex e o adaptador para fixar os tubos horizontalmente, no vórtice na velocidade máxima por 5 minutos;
- 4: Certificar-se de que os tubos PowerBead girem livremente, sem atrito, em seguida centrifugar os tubos a 10.000 g, por 30 segundos, em temperatura ambiente;
- 5: Transferir o sobrenadante para um tubo limpo de 2 mL;
- 6: Adicionar 250 µL de solução C2 e agitar no vórtice por 5 segundos. Incubar por 5 minutos, a 4 ° C e, em seguida, centrifugar o tubo a 10.000 g, por 1 minuto, em temperatura ambiente;
- 7: Evitando o pellet, transferir até 600 µL do sobrenadante para um tubo limpo de 2 mL;
- 8: Adicionar a 200 µL de solução C3 e misturar brevemente no vórtice. Incubar por 5 minutos, a 4 ° C e, a seguir, centrifugar os tubos a 10.000 g, por 1 minuto, em temperatura ambiente;
- 9: Evitando o pellet, transferir até 750 µL do sobrenadante para um tubo limpo de 2 mL;
- 10: Adicionar 1220 µL de solução C4 ao sobrenadante e agitar no vórtice por 5 segundos;
- 11: Transferir cerca de 675 µL do sobrenadante para um filtro giratório e centrifugar a 10.000 g, por 1 minuto, em temperatura ambiente. Descartar o líquido do tubo e repetir o procedimento com o restante do sobrenadante mais duas vezes;
- 12: Adicionar 500 µL de solução C5 e centrifugar, a 10.000 g, por 30 segundos, em temperatura ambiente;
- 13: Transferir cuidadosamente o filtro em um tubo limpo de 2 mL e descartar o líquido;
- 14: Adicionar 100 µL de solução C6 no centro da membrana branca e centrifugar a 10000 g, por 30 segundos, em temperatura ambiente;
- 15: Descartar o filtro giratório. O DNA no tubo está pronto para qualquer aplicação e recomenda-se que seja conservado congelado (-20 ° C a -80 ° C).

## ANEXO B - METODOLOGIA UTILIZADA PARA SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS DE DNA

A identificação de bactérias foi realizada utilizando-se o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. O preparo das bibliotecas seguiu um protocolo proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). Foi realizada a amplificação com primers para região V3-V4 do gene rRNA 16S, 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG, doi: 10.1371/journal.pone.0007401) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT, doi: 10.1038/ismej.2012.8). As bibliotecas foram sequenciadas utilizando-se o equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) e o kit V2, com 300 ciclos e sequenciamento *single-end*. As sequências foram analisadas por meio do *pipeline* Sentinel.

No pipeline Sentinel os arquivos fastq são avaliados quanto a qualidade Phred (QP) usando o programa FastQC v.0.11.8 (ANDREWS, 2010). A seguir, os arquivos fastq são submetidos à trimagem de primers e sequências com baixa qualidade (QP<20). O software proprietário utilizado para tal finalidade foi construído em Python v.3.6, sendo este inspirado nas funcionalidades do projeto BioPython (COCK et al. 2009).

Clusters com abundância menor do que 2, são removidos das análises, pois tais estruturas normalmente são relacionadas a sequências quimeras (SMYTH et al., 2010). As identificações taxonômicas são realizadas com blastn v.2.6.0+ (ALTSCHUL et al., 1990), usando como referência um banco de dados proprietário ou público. Quanto a definição de uma espécie, dentre os 20 hits retornados para cada cluster, uma instrução em Python avalia se um dos três quesitos seriam atendidos pelos hits: 1) maior bit-score; 2) menor e-value; e 3) taxonomias com maior representação.

Os hits que atenderam um dos itens anteriores, foram escolhidos como espécie representante, essas análises foram realizadas na plataforma computacional da Amazon, onde a estrutura de bioinformática da Neopropecta está hospedada. As análises de DMD Bactéria e Fungo, podem ser feitas contra bancos de dados de referência para os genes 16S rRNA e ITS proprietários ou públicos.

Por padrão, nosso pipeline de bioinformática irá realizar as análises contra nossos bancos de dados proprietários. Nossos bancos de sequências para os genes 16S rRNA e ITS, contam com sequências de genes completos (em sua maioria), os quais contém sequências recuperadas de genomas, não ambíguas e filtradas para sequências quimeras.

No entanto, se requerido pelo cliente, além das análises feitas a partir de nossos bancos de sequências podemos usar um banco de dados públicos, mas não garantimos acurácia do resultado. Os bancos de dados públicos que temos a disposição são o Silva (QUAST et al., 2013) e Greengenes (DeSANTIS et al., 2006).

## REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL et al. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ANDREWS, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- COCK, P. J. A et al. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1422–1423, 2009.
- DeSANTIS, T. Z. et al. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 7, p. 5069-5072, 2006.
- QUAST C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucl. Acids Res.**, v. 41, n. D1, D590-D596, 2013.