



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

GABRIEL VICTOR DE LIMA

**AVALIAÇÃO TAXONÔMICA DE DIFERENTES CULTURAS MICROBIANAS,
ADAPTADAS À DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DA ANILINA**

Recife
2023

GABRIEL VICTOR DE LIMA

**AVALIAÇÃO TAXONÔMICA DE DIFERENTES CULTURAS MICROBIANAS,
ADAPTADAS À DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DA ANILINA**

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

Área de concentração: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

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

Recife

2023

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

L732a	Lima, Gabriel Victor de. Avaliação taxonômica de diferentes culturas microbianas, adaptadas à degradação anaeróbia da anilina / Gabriel Victor de Lima. – 2023. 49 f.: il., fig., tab. e siglas. Orientadora: Profa. Dra. Sávia Gavazza dos Santos Pessôa. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2023. Inclui referências. 1. Engenharia Civil. 2. Anilina. 3. Biodegradação. 4. Taxonomia. 5. Methanosaeta. 6. Aminicenantes. 7. <i>Geobacter</i>. I. Pessôa, Sávia Gavazza dos Santos (Orientadora). II. Título. UFPE 624 CDD (22. ed.) BCTG/2023-165
-------	--

GABREL VICTOR DE LIMA

**AVALIAÇÃO TAXONÔMICA DE DIFERENTES CULTURAS MICROBIANAS,
ADAPTADAS À 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 parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil.

Área de concentração: Tecnologia ambiental e Recursos Hídricos.

Aprovada em: 31/07/2023.

BANCA EXAMINADORA

participação por vídeo conferência

Prof. Dr. Wanderli Rogério Moreira Leite (Presidente da Banca)
Universidade Federal de Pernambuco

participação por vídeo conferência

Prof. Dr. José Roberto Santo de Carvalho (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

participação por vídeo conferência

Profa. Dra. Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic (Examinador Externo)
Universidade de São Paulo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer as instituições que contribuíram para o desenvolvimento deste estudo. a FACEPE, a Universidade Federal de Pernambuco, ao laboratório de saneamento ambiental, ao LITIPEG, e a todas as outras instituições parceiras. Sou imensamente grato também à minha orientadora Sávia Gavazza, por ser uma inspiração para mim (desde 2016), como profissional e pessoa. Agradeço ao meu primeiro tutor científico José Roberto, que foi o precursor desta linha de pesquisa, e me ajudou a desenvolver boa parte da minha base de conhecimento científico. Gratidão à toda a ajuda, que eu recebi de Danubia Freitas, Fernanda Magalhães, Clelia, e Isabelle Câmara que em meio a todos os imprevistos ocorridos durante o desenvolvimento deste estudo, sempre fizeram de tudo para me ajuda a resolver. Outra imensa ajuda que eu recebi foi da Amanda Kosuiesko, que me acompanhou como aluna de iniciação científica, e sempre deu seu melhor me ajudar no desenvolvimento deste estudo, principalmente na reta final. Gratidão ao professor Fabricio Motteran, que dedicou horas e horas, me ajudando a entender não só as ferramentas moleculares usadas neste estudo, mas também me ofereceu ferramentas e conhecimentos para as pesquisas que virão em seguida. Agradeço a todos os outros professores que ao longo da jornada do mestrado, contribuíram para o meu desenvolvimento, e sempre me motivaram a buscar mais, como a professora Bruna Fernandes, e o professor Wanderli Leite. Também agradeço a todos os colegas de laboratório que sempre se disponibilizaram a me ajudar, Sofia Pimentel, Felipe Figueira, Fabricio, Maria Luiza, Manuella, Sofia Teixeira, Luiz, Alessandro, e muitos outros nomes que não caberiam no espaço desta página, mas que sempre me deram motivação e palavras de apoio. Por fim, mas não menos importante, agradeço a Eliane Cristina da Silva (minha mãe), por ser minha amiga, patrocinadora, fã número 1, psicóloga, coach, e o amor da minha vida.

RESUMO

A anilina é uma molécula composta por um anel benzênico ligado a um grupamento amina. Embora a anilina seja um importante insumo para a produção de fármacos, corantes, pigmentos, e outros produtos de interesse econômico, sua toxicidade e atividade carcinogênica para animais e plantas a torna um potencial contaminante ambiental. A anilina tanto é molécula precursora quanto por ser liberada como produto da degradação aeróbia ou anaeróbia de diversos compostos químicos. O descarte de resíduos contendo essa substância pode representar um risco ao meio ambiente e à saúde pública. Embora a degradação anaeróbia da anilina tenha sido reportada, e alguns possíveis passos da rota de degradação tenham sido elucidados, ainda existem lacunas que requerem investigação, sobretudo na utilização de culturas mistas metanogênicas. O presente estudo avaliou a composição taxonômica de três culturas mistas distintas, adaptadas a degradação anaeróbia da anilina, utilizando sequenciamento 16S do rRNA. A cinética de degradação de anilina, e a formação de subprodutos foi analisada através de cromatografia líquida de alta eficiência. A velocidade de consumo de anilina, em todas as culturas, cresceu ao longo das sucessivas alimentações, chegando 0,99 $\mu\text{M}/\text{dia}$ de anilina. Foram registradas diferentes concentrações de formação dos subprodutos ácido benzoico e ácido 4-aminobenzoico. Foi possível observar que, apesar das diferentes origens das culturas utilizadas, o core microbiano dos microcosmos com inóculo de sedimento de rio, de reator têxtil, e de lodo petroquímico foi selecionado de maneira semelhante. Os grupos comuns a estes microcosmos incluem *Methanosaeta*, *Aminicenantes*, e *Geobacter*.

Palavras-chave: anilina; biodegradação; taxonomia; methanosaeta; aminicenantes; *geobacter*.

ABSTRACT

Aniline is a molecule composed of a benzoic group linked to an amino group. Although aniline is an important raw material to produce pharmaceuticals, dyes, pigments, and other economically valuable products, its toxicity and carcinogenic activity to animals and plants make it a potential environmental contaminant. Aniline can act both as a precursor molecule and as a byproduct released during the aerobic or anaerobic degradation of various chemical compounds. The disposal of waste containing this substance can pose a risk to the environment and public health. While anaerobic degradation of aniline is possible, and some possible steps in the degradation pathway have been elucidated, there are still gaps that require investigation, especially regarding the use of mixed cultures. This study evaluated the taxonomic composition of three distinct mixed cultures adapted to anaerobic degradation of aniline using 16S rRNA sequencing. The degradation kinetics of aniline and the formation of byproducts were analyzed using high-performance liquid chromatography. The degradation kinetics of aniline increased with successive feedings, reaching 0.99 $\mu\text{M/day}$ of aniline. Different concentrations of the byproducts benzoic acid and 4-aminobenzoic acid were recorded. It was possible to observe that despite the different origins of the microbiotas, the microbial core of the microcosms with sediment from a river, a textile reactor, and a petrochemical source were selected in a similar manner. The common groups that stood out the most were Methanosaeta, Aminicenantes, and Geobacter.

Keywords: aniline; biodegradation; taxonomy; methanosaeta; aminicenantes; *geobacter*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	OBJETIVOS	9
1.1.1	Objetivo Geral	9
1.1.2	Objetivos Específicos	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	ANILINA: CARACTERÍSTICAS, PRODUÇÃO E PRESENÇA EM PROCESSOS INDUSTRIAIS.	11
2.1.1	Produção e aplicação.....	11
2.1.2	Resíduos e contaminação	12
2.1.3	Efeitos da anilina em seres vivos	12
2.2	PROCESSOS CONVENCIONAIS DE DESCONTAMINAÇÃO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS.....	13
2.2.1	Processos físico-químicos de remoção de anilina e derivados.....	13
2.2.2	Processos biológicos de remoção de anilina	15
2.3	TAXONOMIA DE BACTÉRIAS ANAEROBIAS.....	17
2.3.1	Ferramentas de identificação taxonômicas em procariotos	17
2.3.2	Domínio Bacteria: visão geral	19
2.3.3	Domínio Archaea: grupos metanogênicos.....	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	DESCRIÇÃO DAS CULTURAS MICROBIANAS UTILIZADAS	21
3.2	COMPOSIÇÃO DOS BIORREATORES (MICROCOSMOS).....	24
3.3	COLETA E EXTRAÇÃO DO DNA	27
3.4	AMOSTRAGEM E DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	29
4	ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS DADOS.....	30
4.1	MONITORAMENTO DE BIODEGRADAÇÃO DE ANILINA	30
4.2	TAXONOMIA MICROBIANA	32
4.3	CINÉTICAS DE DEGRADAÇÃO	38
5	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

Com a retomada do crescimento dos setores de construção civil, têxtil e automotivos após a pandemia de COVID-19 em 2021, a demanda por produtos relacionados a esses segmentos também aumentou. Em 2022, o mercado de corantes e pigmentos foi avaliado em 38,2 bilhões de dólares americanos, enquanto o setor de construção alcançou a marca de 12,74 trilhões e o automotivo foi projetado para chegar a 2,95 trilhões de dólares americanos (GVR, 2023; STATISTA 2023; EMR, 2023).

A crescente demanda por produtos industriais tem impulsionado o mercado de componentes utilizados em sua produção, muitos dos quais contêm anéis benzênicos. Exemplos incluem o metilelo difenil diisociato (MDI), amplamente utilizado em espumas de poliuretano, revestimentos, adesivos, elastômeros e aglutinantes. A produção deste isocianato aromático é obtida a partir da condensação da anilina utilizando formaldeído que reage formando metilenodianilina, que em seguida reage com fosgênio, formando o MDI. O MDI também possui características tóxicas, e sua presença já foi reportada em urina de trabalhadores envolvidos no meio de produção deste composto (ROBERT et al., 2007).

A anilina é uma molécula composta por um anel benzênico ligado a um grupamento amina. Embora a anilina seja um importante insumo para a produção de fármacos, corantes, pigmentos, e outros produtos de interesse econômico, sua toxicidade e atividade carcinogênica para animais e plantas a torna um potencial contaminante ambiental (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2016; TAO et al., 2022). A anilina tanto é molécula precursora quanto por ser liberada como produto da degradação aeróbia ou anaeróbia de diversos compostos químicos. O descarte de resíduos contendo essa substância pode representar um risco ao meio ambiente e à saúde pública.

Um estudo realizado por URBANIAK et al. (2022) nos Estados Unidos avaliou a presença de sete aminas aromáticas em amostras de sedimentos de água doce e águas estuarinas coletadas em seis estados. Entre as aminas avaliadas, a anilina foi a mais detectada nas amostras analisadas, apresentando uma maior concentração de 730 ng de anilina por grama de amostra seca. O estudo indica que a contaminação por anilina pode estar mais presente em grande escala no meio ambiente do que se imagina.

No tratamento de resíduos provenientes de processos industriais, é muito comum a aplicação de processos físico-químicos para a atenuação da composição potencialmente nociva do efluente. No entanto, além de possuir um elevado custo de operação, manutenção e de consumo reagentes, muitas vezes o que é feito é uma transferência de fase dos contaminantes, gerando passivos ambientais a serem tratados e/ou destinados.

Uma alternativa para o tratamento de resíduos contendo anilina é a utilização de processos biológicos de remoção que podem ser, ou não, associadas aos processos físico-químicos. Os processos aeróbios para degradação da anilina são mais aplicados e mais bem estabelecidos. No entanto, é importante destacar que condições anaeróbias se estabelecem tanto em microambientes de sistemas aeróbios, quanto em leitos de corpos hídricos contaminados ou em subsolo contaminado por compostos aromáticos. Algumas etapas, do processo de degradação anaeróbia da anilina, já foram relatadas através do uso de culturas puras de bactérias em condições redutoras de sulfato (SCHNELL; SCHINK, 1991). No entanto, a aplicação de culturas puras em escala industrial e em ambientes naturais tem um elevado nível de complexidade. Desta forma, é importante que o entendimento acerca do processo de degradação da anilina por consórcios microbianos mistos.

Atualmente pouco se sabe sobre como um consorcio misto de microrganismos pode interagir para a degradação anaeróbia da anilina. Entender como diferentes táxons podem se beneficiar da rota de degradação da anilina é crucial para aplicação de técnicas de biodegradação de aminas aromáticas. Dessa forma, o presente estudo visou contribuir para o entendimento do processo de degradação anaeróbia da anilina por culturas mistas, investigando a taxonomia microbiana de três culturas distintas utilizadas em estudos de degradação anaeróbia da anilina.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Contribuir para o entendimento do processo de degradação anaeróbia da anilina por meio da identificação taxonômica de culturas anaeróbias degradadoras de anilina.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar do comportamento cinético de três culturas anaeróbias em termos de remoção de anilina e de formação de compostos intermediários de degradação;
- Identificar a taxonomia e quantificar a abundância relativa dos grupos microbianos presentes nas três culturas anaeróbias.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ANILINA: CARACTERÍSTICAS, PRODUÇÃO E PRESENÇA EM PROCESSOS INDUSTRIAIS.

2.1.1 Produção e aplicação

A produção industrial de anilina é realizada por meio da hidrogenação catalítica do nitrobenzeno (Figura 1). A confecção também pode ser realizada através de outra rota, por meio do mecanismo de aminação do fenol, mas essa abordagem entrou em desuso devido às dificuldades em controlar o processo (FOREZI, 2011).

Figura 1 - Aaminação do nitrobenzeno



Fonte: O Autor (2023).

Após a produção, a anilina se torna um composto base para a produção de vários outros compostos aplicados em diferentes segmentos industriais. Alguns exemplos são 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA), 4,4'-metilenodianilina (4-4'MDA) e 1-naftilamina (1-NPA). A anilina e seus derivados são usados como principais insumos ou intermediários para a produção de pesticidas, produtos farmacêuticos, borrachas, corantes, espumas utilizadas pelos setores automotivos e de construção, entre outros setores. No entanto, esses compostos podem ser considerados poluentes ambientais e são encontrados em efluentes industriais, áreas degradadas e, tem o potencial de atingir águas superficiais, subterrâneas e solo.

Apesar da anilina ser utilizada em indústrias dos mais diversos setores, cerca de 80% de seu uso está na produção de metileno difenil diisocianato (MDI). O MDI,

por sua vez, é utilizado para produzir espuma rígida, espuma flexível, revestimentos, elastômeros, adesivos e selantes eletrônicos e eletrodomésticos, calçados e outras indústrias de usuário final.

2.1.2 Resíduos e contaminação

Todos os processos industriais geram resíduos, dessa forma os resíduos provenientes dos setores industriais citados anteriormente, podem conter anilina e seus derivados. Além disso, os produtos derivados de anilina, comumente não são completamente degradados nas estações de tratamento de esgotos convencionais ou em contaminações ambientais, devido à sua complexa estrutura molecular, podendo resultar em efluentes tratados contendo anilina ou em acúmulo de anilina no meio ambiente.

Em condições anaeróbias, corantes do tipo azo, nitrobenzeno, cloroanilinas entre outros produtos, podem ser convertidos a anilina. A anilina já foi reportada como presente em efluentes provenientes de diversos segmentos industriais, como o têxtil e o petroquímico (BOTALOVA et al., 2009; JAZIRI; BEN; FERNANDEZ-SERRANO, 2021; KISHOR et al., 2021). Também há o relato de concentrações de anilina em solo e sedimentos de água doce e salgada (URBANIÁK et al., 2022). Esses relatos se devem tanto ao descarte direto de efluente contendo anilina, quando pela degradação de derivados de anilina descartados no ambiente.

Outra fonte de lançamento de anilina no meio ambiente são os acidentes nos processos de armazenamento e transporte de produtos químicos. Em 2005, na província de Jilin na China, ocorreu uma explosão em uma planta petroquímica. A explosão resultou no derramamento de 100 toneladas de uma mistura de benzeno, anilina e nitrobenzeno. A pluma de contaminação fluiu pelo rio Songhua comprometendo o abastecimento de água e mais de 10.000 residentes foram evacuados (WU, 2006)s.

2.1.3 Efeitos da anilina em seres vivos

No âmbito físico-químico, à temperatura ambiente, o composto puro de anilina se apresenta em fase líquida com coloração âmbar, com baixa pressão de vapor, sendo levemente solúvel em água e altamente miscível com solventes orgânicos.

Segundo a Agency for Toxic Substances and Disease Registry ((INFORMATION, [s.d.]), a anilina pode ser absorvida pelo corpo humano através da inalação, ingestão e absorção em contato com a pele.

O vapor inalado da anilina pode ser absorvido pelos pulmões, levando a toxicidade sistêmica. No entanto, o característico cheiro de peixe apresentado pelo vapor de anilina pode ser notado em 1 ppm, que fica abaixo do limite de segurança ocupacional estabelecido de 5 ppm. Entretanto, crianças possuem uma maior sensibilidade em função da maior relação da área de superfície do pulmão/peso corporal.

A anilina também pode ser absorvida pela pele, no entanto, os efeitos podem ser retardados por várias horas. A maior taxa de absorção da anilina pelo corpo humano se dá pela ingestão, que apresenta uma rápida absorção podendo gerar efeitos graves de toxicidade, geralmente acompanhados por náusea e vômito. Não existe um limite de segurança para a ingestão oral de anilina. Entretanto, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) calculou um fator de risco de $1,6 \times 10^{-7}$ ($\mu\text{g/L}$) para líquidos, e de tendência ao câncer de $5,7 \times 10^{-3}$ (mg/kg/dia)⁻¹ c. No entanto, a EPA alerta que os valores são apenas uma referência.

O estudo apresentado por TAO et al. (2022) avaliou o efeito de diferentes concentrações de anilina no crescimento e danos ao DNA de duas variedades de arroz. A anilina inibiu significativamente a taxa de germinação, a atividade da amilase e lipase, o crescimento das raízes e reduziu o conteúdo de DNA em ambas as variedades. Já o estudo de CHEN et al. (2014) demonstrou que a anilina pode provocar uma resposta de estresse em células microbianas, sugerindo que a anilina tem a capacidade de exercer efeitos negativos para as membranas celulares de microrganismos.

2.2 PROCESSOS CONVENCIONAIS DE DESCONTAMINAÇÃO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS.

2.2.1 Processos físico-químicos de remoção de anilina e derivados

Devido à sua utilização como insumo industrial, a presença de anilina em efluentes está frequentemente associada a outros compostos ou formada no processo de tratamento de seus derivados. Em particular, os efluentes têxteis, ricos em corantes

do tipo azo, apresentam um desafio ambiental significativo. A estabilidade promovida pelas ligações azo, fazem com que a remoção desses corantes seja geralmente realizada por meio de processos físico-químicos.

Um estudo recente avaliou o efeito do processo de Fenton no tratamento do corante azul de metileno (VIEIRA et al., 2021). O processo de Fenton ocorre através da reação de íons Fe^{+2} e peróxido de hidrogênio, e possui um alto potencial de oxidação. Embora a eficiência de remoção do corante tenha chegado a 94%, foi observado que o efluente tratado exibiu maior toxicidade em relação ao efluente bruto. Essa maior toxicidade foi atribuída à formação de anilina durante o processo de remoção do corante.

O uso de persulfato para o tratamento de corantes azo também é amplamente utilizado. Neste processo, radicais de sulfato e hidroxilas promovem a degradação do corante. No entanto, subprodutos mais tóxicos que o próprio corante foram gerados (TÖLGYESI; SHARMA, 2020). O estudo de SAMY et al. (2022) demonstrou que a fotocatalise de sulfadiazina, um antibiótico amplamente utilizado, pode aumentar a toxicidade do efluente tratado através da formação de subprodutos mais tóxicos, incluindo a anilina.

Como já foi discutido anteriormente a anilina pode estar presente em diferentes tipos de efluentes, e ambientes contaminados. Existem diferentes abordagens para a remoção da anilina, que podem ser divididas em dois grupos: remoção físico-química e remoção biológica. Na remoção físico-química é comum a aplicação de processos de adsorção e de oxidação química.

A remoção por adsorção consiste na utilização de materiais com a propriedade de atrair e imobilizar a anilina, como resinas pós-reticuladas (AI; ZHANG; CHEN, 2011). A desvantagem de aplicar esse tipo de metodologia é que pode ser necessária uma grande quantidade material adsorvente, o que encarece o processo. Além disso, trata-se apenas de uma transferência de fase do contaminante, onde o material adsorvido precisará ser destinado para algum tratamento, podendo ser regenerado ou não, gerando resíduos e impactos ambientais secundários.

A utilização da oxidação química para remoção da anilina, consiste na aplicação de reagentes químicos com capacidade de produção de radicais que reagem com a anilina, podendo transformá-la em subprodutos menos tóxicos. YU et al. (2020) utilizou persulfato para a degradação de corantes azo, e constatou que apesar de ocorrer a redução dos corante, as aminas aromáticas formadas

necessitaram de um tratamento microbiano sulfetogênico para completa mineralização das aminas. Além do custo associado a esse método, e a não especificidade das reações dos radicais com a anilina, pode produzir subprodutos igualmente tóxicos, ou intermediários reativos, e parâmetros como pH e temperatura podem interferir no processo de remoção.

Portanto, o uso de métodos biológicos para o tratamento de efluentes industriais, e para recuperação de áreas contaminadas com anilina representa não só uma alternativa, mas também pode exercer um papel complementar aos métodos físico-químicos de tratamento convencionais.

2.2.2 Processos biológicos de remoção de anilina

Apesar da toxicidade exercida pela molécula de anilina, métodos biológicos de degradação deste composto têm o potencial de serem aplicados de forma eficiente, como uma alternativa mais segura para o meio ambiente e de menor custo. Na biodegradação e biorremediação, agentes biológicos como bactérias são utilizados para metabolizar e degradar compostos orgânicos contaminantes, como a anilina.

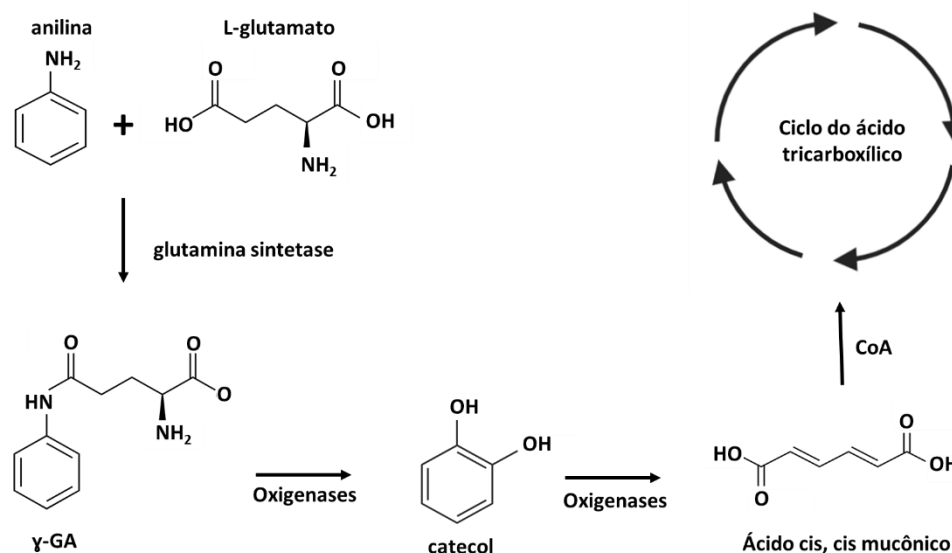
Do ponto de vista metabólico, a anilina pode ser degradada por via aeróbia ou anaeróbia. Na via aeróbia, bactérias aeróbias utilizam o oxigênio disponível no meio para oxidar a anilina, transformando-a em produtos menos tóxicos e mais estáveis. No entanto, durante o processo de degradação da anilina a etapa de clivagem do anel aromático é a mais difícil, em função da forte estabilidade.

Para clivar o anel aromático, presente na anilina as bactérias aeróbias fazem uso de múltiplas etapas enzimáticas, como foi observado nos gêneros *Pseudomonas* putida UCC22, *Acinetobacter* sp. YAA, *Delftia tsuruhatensis* AD9 e *Delftia* sp. AN3 (FUJII; TAKEO; MAEDA, 1997; FUKUMORI; SAINT, 1997; KAHNG; KUKOR; OH, 2000; LIANG et al., 2005; YU et al., 2020), tendo como principal intermediário da degradação o catecol.

TAKEO et al. (2013), ao avaliar os genes de *Acinebacter* sp., indicaram que a oxidação de anilina à catecol ocorre através da ação de duas enzimas, a glutamina sintetase e oxigenases. A glutamina sintetase combina a anilina com o L-glutamato, produzindo o γ -GA. Em seguida, o γ -GA sofre a ação das oxigenases, que provem uma oxidação da molécula aromática através da formação de radicais hidroxila,

resultando no intermediário central da degradação aeróbia catecol e posteriormente à clivagem do anel aromático.

Figura 2 - Degradação aeróbia da anilina



Fonte: O Autor (2023), adaptado de FUJII; TAKEO; MAEDA (1997); FUKUMORI; SAINT (1997); KAHNG; KUKOR; OH (2000); LIANG et al. (2005); YU et al. (2020).

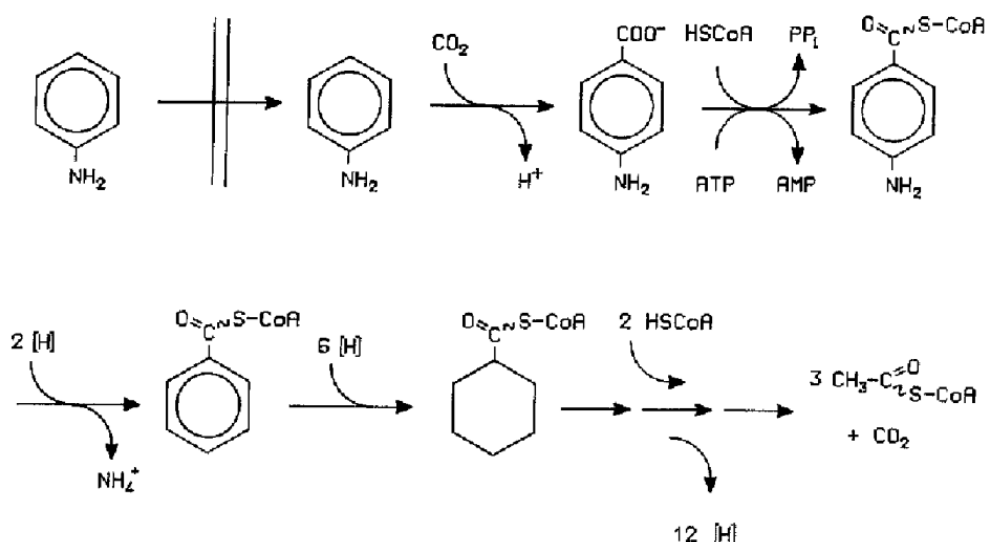
O entendimento da degradação aeróbia da anilina é robusto o suficiente para permitir o desenvolvimento de metodologias de degradação de anilina em sistemas anaeróbios. No entanto, quando não há oxigênio disponível no meio, como em sistemas anaeróbios de tratamento de corantes azo ou de outros compostos aromáticos, ou em situações de contaminação de camadas mais profundas de solo, subsolo, leitos de rio e águas subterrâneas, é necessária a avaliação da aplicação da degradação anaeróbia.

O tratamento anaeróbio oferece algumas vantagens, como menor consumo de energia quando comparado com o tratamento aeróbio, menor produção de lodo e aplicação em áreas contaminadas que não possuem oxigênio disponível. A degradação anaeróbia da anilina foi reportada pela primeira vez no estudo de (SCHNELL, SYLVIA FRIEDHELM, BAK NORBERT, 1989) por uma cepa pura do gênero *Desulfobacterium anilini*, com um metabolismo voltado para a redução do sulfato.

No estudo de SCHNELL; SCHINK (1991), foram sugeridas algumas etapas da rota de degradação anaeróbia da anilina. A primeira etapa sugerida foi a carboxilação da anilina, que reage com o CO_2 para formar o ácido 4-aminobenzoico. Em seguida

ocorre a ativação do ácido 4-aminobenzoico para formar 4-aminobenzoil-CoA. Na etapa seguinte ocorre uma desaminação redutiva, formando o benzoil-CoA, que entra na via do ácido benzoico. Nessa via de degradação, o resultado é a formação de três moléculas de acetil-CoA, que possui grande valor energético.

Figura 3 - Degradação anaeróbica da anilina



Fonte: SCHNELL; SCHINK (1991).

Já no estudo de (KAHNG; KUKOR; OH, 2000) que avaliou a degradação da anilina por uma cepa anaeróbica facultativa (cepa HY99), a anilina foi catabolizada em condições desnitrificantes. No entanto, também foi reportada a formação do intermediário ácido 4-aminobenzoico, reforçando a etapa de carboxilação sugerida anteriormente no estudo de SCHNELL; SCHINK (1991).

Embora a degradação anaeróbica da anilina seja possível, e alguns possíveis passos da rota de degradação tenham sido elucidados, ainda existem lacunas que requerem investigação. Embora as cepas citadas tenham sido identificadas como capazes de realizar a degradação da anilina, não se sabe se existem outros microrganismos ou consórcios microbianos que possam estar envolvidos nesse processo.

2.3 TAXONOMIA DE BACTÉRIAS ANAEROBIAS

2.3.1 Ferramentas de identificação taxonômicas em procariotos

Originalmente, a classificação dos seres vivos era realizada com base em características morfológicas. O primeiro sistema moderno de classificação de procariotos foi proposto na primeira edição de Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, em 1923 (ROSSELLÓ-MÓRA; WHITMAN, 2019). O principal desafio desse tipo de metodologia de classificação em procariotos era o grande número de bactérias não cultiváveis ou de morfologia semelhantes.

O advento da metodologia de identificação de procariotos, pela área conservada do 16S rRNA foi fundamental para evidenciar uma grande diversidade de procariotos que não era acessada através da metodologia de cultura (RAPPÉ; GIOVANNONI, 2003). Contudo, a porcentagem de taxa com prefixos "candidatos" (que se refere a uma classificação provisória) representa mais de 10% dos procariotos no nível de filo registrados no Genome taxonomy Database (HUGENHOLTZ et al., 2021).

Apesar das lacunas presentes na taxonomia procariótica, através da utilização da metodologia de sequenciamento 16S rRNA, é possível classificar e identificar os diferentes táxons presentes em culturas mistas (LIANG et al., 2005). Ao contrário das metodologias tradicionais de identificação microbiológicas, o sequenciamento 16S rRNA permite a identificação taxonômica independente de cepas com fenótipos aberrantes, de pouca descrição ou de microrganismos raros, além de estimar a abundância dos taxa nas amostras (ZEMB et al., 2020).

A partir da identificação e quantificação, dos grupos de microrganismos que compõe um ambiente (microbiota), é possível correlacionar suas vias metabólicas descritas e inferir a relação entre a microbiota e a degradação de um contaminante alvo (YE et al., 2019). Além disso, a análise das interações biológicas dentro de uma microbiota, permite a otimização dos processos de tratamento de resíduos. Com base nas informações taxonômicas, é possível desenvolver metodologias de cultivo seletivo ou enriquecimento da cultura, facilitando a aplicação da biodegradação em maior escala (SINGH et al., 2013).

Dentro da taxonomia procarionte, existe uma grande diversidade de grupos taxonômicos, que desempenham papéis específicos na degradação de contaminantes. Durante a aplicação de metodologias de biodegradação de compostos aromáticos, é comum observar a relação entre dois domínios microbiológicos, Bactérias e Archeas.

2.3.2 Domínio Bacteria: visão geral

De acordo com o GPC (Censo Global de Procariontes), que relaciona dados composto em grande escala de sequências de amplicon 16S de bactérias e arqueas, compreendendo dados publicamente disponíveis de aproximadamente 34.000 amostras em 492 estudos em todo o mundo, em 2019 já tinham sido registradas 690,474 unidades taxonômica operacionais (inglês, OTU) para Bacteria..

Em função da grande diversidade metabólica, presente nas OTU presentes, e com a finalidade de aplicação biotecnológicas desses microrganismos, também é possível relacioná-los às suas funções metabólicas. Do ponto de vista do metabolismo anaeróbio, as bactérias podem apresentar diferentes estratégias de obtenção de energia. A digestão anaeróbia possui uma sequência metabólica de quatro processos sucessivos de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (HUGENHOLTZ et al., 2021).

As bactérias são mais relacionadas aos três primeiros processos, sendo realizados por uma parceria entre diferentes microrganismos. No processo de hidrólise, compostos orgânicos de grande peso molecular são clivados por enzimas extracelulares, formando moléculas menores, como monômeros e aminoácidos. Os produtos da hidrólise, podem ser absorvidos e metabolizados pelas bactérias acidogênicas, sendo utilizados na produção de ácidos graxos de cadeia curta e acetato. As bactérias acetogênicas, utilizam os ácidos graxos, produzidos na acidogênese, convertendo em acetato e dióxido de carbono.

Paralelamente a essa rota, em ambientes ricos em sulfato, as bactérias redutoras de sulfato (BRS) tem a capacidade de utilizar o sulfato através da rota dissimilativa de redução, também possuindo a capacidade de degradar contaminantes como hidrocarbonetos, óleos e outros contaminantes ambientais (ZHANG et al., 2022). A *Desulbacterium anilini*, descrita no estudo de Schnell (1991) é pertencente a esse grupo de microrganismos, sendo um dos poucos taxa documentados com capacidade de degradar anaerobiamente a anilina, ressalta a importância deste grupo de microrganismos para a degradação da anilina.

2.3.3 Domínio Archaea: grupos metanogênicos

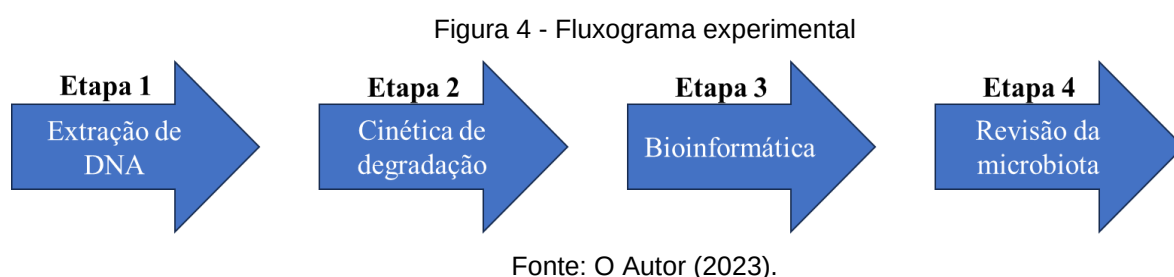
As arqueas metanogênicas, compõem um grupo com 5 ordens de microrganismos, pertencentes ao domínio Archaea, com metabolismo predominantemente anaeróbio relacionado a produção de metano. Esse grupo de microrganismos, é frequentemente relatado formando parceria com bactérias em função tem a capacidade de produzir metano a partir dos subprodutos do metabolismo bacteriano. As Archeas podem realizar a metanogênese a partir de em duas principais rotas metabólicas, dividindo esse grupo microbiano em Archeas acetoclástica, hidrogenotróficas (SOWERS, 2009).

As Archeas hidrogenotróficas, são capazes de oxidar o hidrogênio e reduzir o dióxido de carbono em metano. A metanogênese hidrogenotrófica possui maior eficiência energética, nesse processo o hidrogênio atua como doador de elétrons, para a redução do dióxido de carbono. Tendo em vista que o hidrogênio é um dos produtos da digestão anaeróbia, e seu acúmulo no sistema pode ser prejudicial para a comunidade microbianas, dessa forma as archeas hidrogenotróficas assumem um papel importante de controlar os níveis de hidrogênio no meio (RAY et al., 2023).

Em ambientes com baixa concentração de hidrogênio e alta concentração de acetato, as arqueas as acetoclásticas são mais dominantes, realizando a metanogênese a partir da degradação do acetato. Dessa forma, é comum observar uma relação sintrófica entre bactérias acetogênicas e archeas acetoclásticas (LIANG et al., 2015).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo experimental, utilizado para elaboração do presente estudo, foi sumarizado na Figura 4. O fluxograma compreende as etapas de extração de material genético para o sequenciamento taxonômico, avaliação da cinética de degradação da anilina e identificação de subprodutos da degradação, análise de bioinformática dos dados provenientes do sequenciamento e a revisão da literatura da microbiota identificada.



3.1 DESCRIÇÃO DAS CULTURAS MICROBIANAS UTILIZADAS

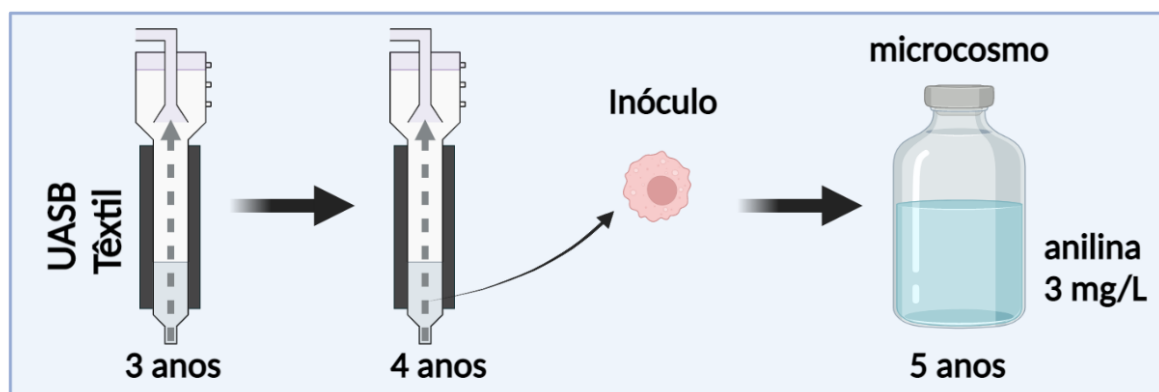
No presente estudo, foram utilizadas três culturas anaeróbias com origens distintas. As culturas microbianas, utilizadas nesta dissertação, foram previamente utilizadas nos experimentos de biodegradação anaeróbia de anilina que resultaram na Tese de Doutorado de José Roberto Santo de Carvalho (CARVALHO, 2020). Desta forma, as culturas já apresentavam habilidade de consumir sucessivas injeções do contaminante. Neste estudo foi feita a manutenção das culturas, aumento da concentração de anilina, testes cinéticos e análise da comunidade microbiana.

A primeira cultura (CT), das três utilizadas, é originária de um sistema de tratamento de efluente têxtil e possui o maior tempo de acompanhamento e documentação laboratorial dentre as três culturas. A CT, foi retirada da manta microbiana anaeróbia, de um reator do tipo UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket), utilizado no tratamento de efluente têxtil real, por um período de quatro anos, e sintético, por um período de 3 anos. Em seguida, a CT foi aplicada em experimentos de degradação anaeróbia da anilina durante aproximadamente 5 anos (Carvalho, 2020), antes de ser utilizada no presente estudo (Figura 5).

Dentre as principais características dos efluentes têxteis em que a CT era utilizada para o tratamento destacam-se: a presença de corantes do tipo azo,

concentrações elevadas de sulfato (entre 250 e 600 mg/L), e de salinidade ($\approx 1,9$ g de NaCl/L).

Figura 5 - Resumo gráfico de CT

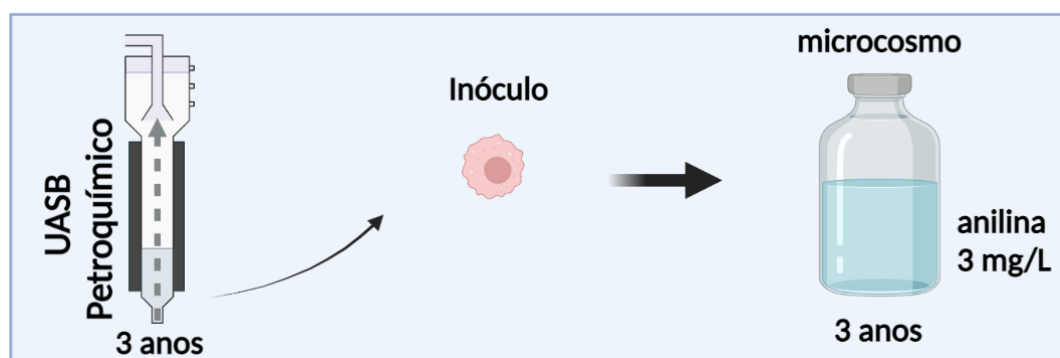


Fonte: O Autor (2023).

A segunda cultura utilizada (CP) é originária de um sistema de tratamento de efluente petroquímico. De forma semelhante a CT, a CP foi retirada da manta de lodo de um reator do tipo UASB, utilizado para o tratamento de efluente petroquímico real. Dentre as principais características do efluente tratado pela CP destacam-se: presença de sulfato (≈ 180 mg/L), de nitrogênio amoniacal (≈ 80 mg/L) e de DQO (≈ 1200 mg de O_2 /L).

Além dos parâmetros descritos acima, a CT era exposta a subprodutos comuns no tratamento de efluentes petroquímicos como o benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos (grupo BTEX). De forma similar a anilina, os BTEX possuem na sua composição apenas um anel aromático, e essa foi a razão da utilização desta cultura nos experimentos de degradação de anilina. Dessa forma, a CT foi utilizada em experimentos envolvendo a degradação anaeróbia da anilina, em escala de bancada, durante um período de 3 anos antes de ser utilizada no presente trabalho conforme a Figura 6.

Figura 6 - Resumo gráfico de CP



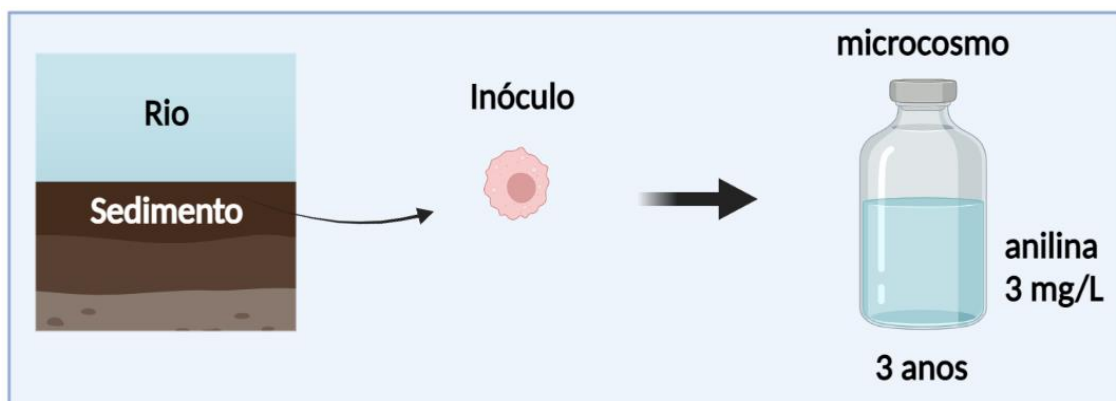
Fonte: O Autor (2023).

Por fim, a terceira cultura utilizada (CR), é originária do sedimento de um rio contaminado por efluentes têxteis. Trata-se de um trecho do Rio Capibaribe, que passa na cidade de Toritama, no estado de Pernambuco. Segundo dados do IBGE 2020, apenas 14,9% da população da cidade possui vínculo formal de trabalho, sendo o restante dos trabalhadores pertencentes a atividades informais. Em contrapartida, a cidade possui mais de 1200 empreendimentos no setor têxtil, predominando a confecção e lavagem de jeans, sendo essa última responsável por grande parte dos lançamentos de efluente no Rio Capibaribe.

Em função da informalidade do setor, os efluentes oriundos dos processos de produção são descartados sem o devido tratamento. Dessa forma, possuem em sua composição grandes concentrações de corantes, compostos químicos, sais e sulfato. Graças aos processos adaptativos, e a grande diversidade metabólica que as bactérias possuem, o sedimento do rio foi escolhido pelo potencial de conter microrganismos adaptados à degradação de anilina, uma vez que a anaerobiose é comum a sedimentos de rios contaminados pelo lançamento de efluentes domésticos e industriais.

Portanto, o sedimento extraído do trecho poluído do Rio Capibaribe, foi utilizado em testes anaeróbios de degradação da anilina (Figura 7). A comunidade microbiana proveniente do rio apresentou a habilidade de consumir anilina, sendo adaptada ao longo de três anos, tendo a anilina como única fonte de carbono, antes da utilização neste trabalho.

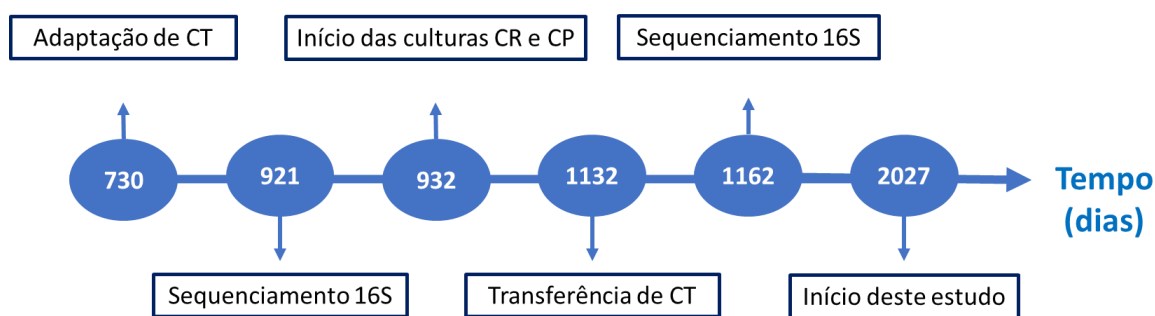
Figura 7 - Resumo gráfico de CR



Fonte: O Autor (2023).

O resumo temporal de todas as culturas pode ser observado na Figura 8.

Figura 8 - Resumo temporal das culturas degradados de anilina

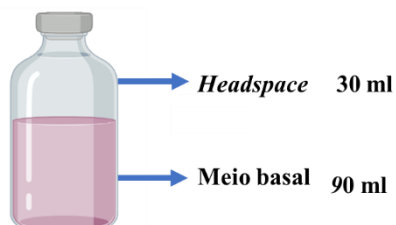


Fonte: O Autor (2023).

3.2 COMPOSIÇÃO DOS BIORREATORES (MICROCOSMOS)

Os reatores biológicos (microcosmos), utilizados nos experimentos de biodegradação de anilina, e na manutenção das culturas microbianas são compostos por frascos de vidro de penicilina (120 mL), tampados com tampa de butila e lacrados com lacre metálico (Figura 9). Os microcosmos foram preenchidos com 90 mL de meio mineral (adaptado de EDWARDS; GRBIC-GALIC, 1994) e 30 mL de headspace (N_2/CO_2)

Figura 9 - Microscosmo e composição do meio adaptado de EDWARDS; GRBIC-GALIC (1994)



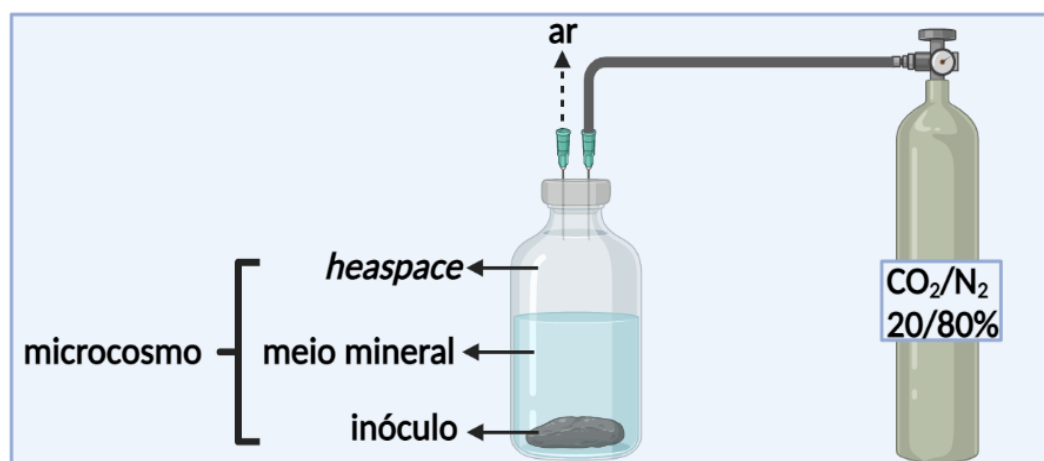
Compostos	Concentração (mg/L)
KH_2PO_4	140
K_2HPO_4	286
NH_4Cl	357
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	32
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	16
H_3BO_3	0,4
ZnCl	0,13
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,13
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,99
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,33
$\text{CuCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,13
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,99
Na_2SeO_3	0,03
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$	0,13
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,3
Resazurina	0,66
NaHCO_3	1333,25

Fonte: O Autor (2023).

Em função das diferentes origens dos inóculos utilizados, a determinação da quantidade de biomassa empregados nos microcosmos foi definida a partir do parâmetro de sólidos suspensos voláteis (SSV). Foi utilizado um volume de inóculo necessário para atingir uma concentração final de 0,8 mg/L de SSV dentro dos microcosmos.

Após a inoculação, os microcosmos foram lacrados e foi realizada a purga no *headspace* (Figura 10). A purga consiste na renovação da composição interna de gases, realizada por meio da inserção de duas agulhas hipodérmicas (25x0,7 mm) através da tampa de butila dos microcosmos. Em uma das agulhas foi injetada uma mistura gasosa de N_2/CO_2 (na proporção 80/20%). A pressão positiva faz com que o ar interno (contendo O_2) seja substituído pela mistura injetada. Esse processo foi realizado por 5 minutos, em cada microcosmo, a fim de promover um ambiente anaeróbio.

Figura 10 - Purga do microcosmo

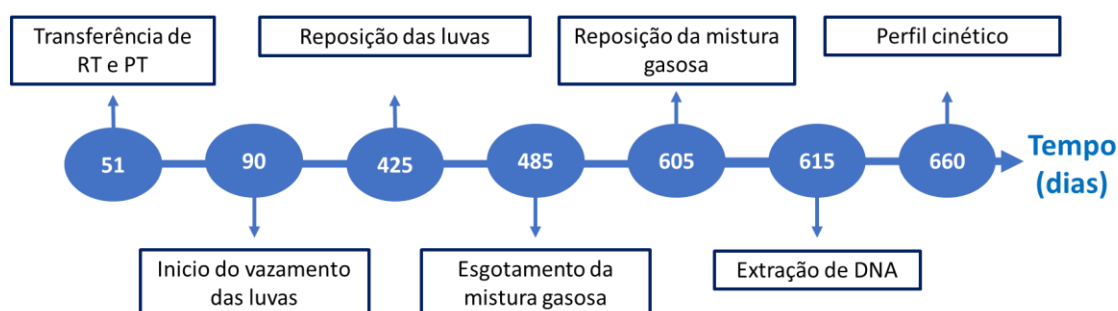


Fonte: O Autor (2023).

Após a purga, os microcosmos foram transferidos para uma câmara anaeróbia, do tipo *Glovebox* (Plaslabs® – 818GB), preenchida com a mesma mistura de gases utilizada no headspace. A *Glovebox*, foi alocada em uma sala climatizada à $\approx 34\text{ }^{\circ}\text{C}$, a fim de evitar interferência de oscilação de temperatura e com luminosidade controlada, para não evitar a fotodegradação da anilina.

No presente trabalho as três culturas foram monitoradas por um período de 660 dias. O monitoramento se deu em termos de concentração de anilina e detecção de subprodutos. Cabe destacar que o monitoramento foi comprometido tanto pelo período de pandemia, quanto pela necessidade de substituição da luva da *GloveBox*. Dessa forma o perfil cinético foi construído com dados referentes a 45 dias, após a extração da biomassa para o sequenciamento, conforme a Figura 11.

Figura 11 - Resumo temporal do presente estudo

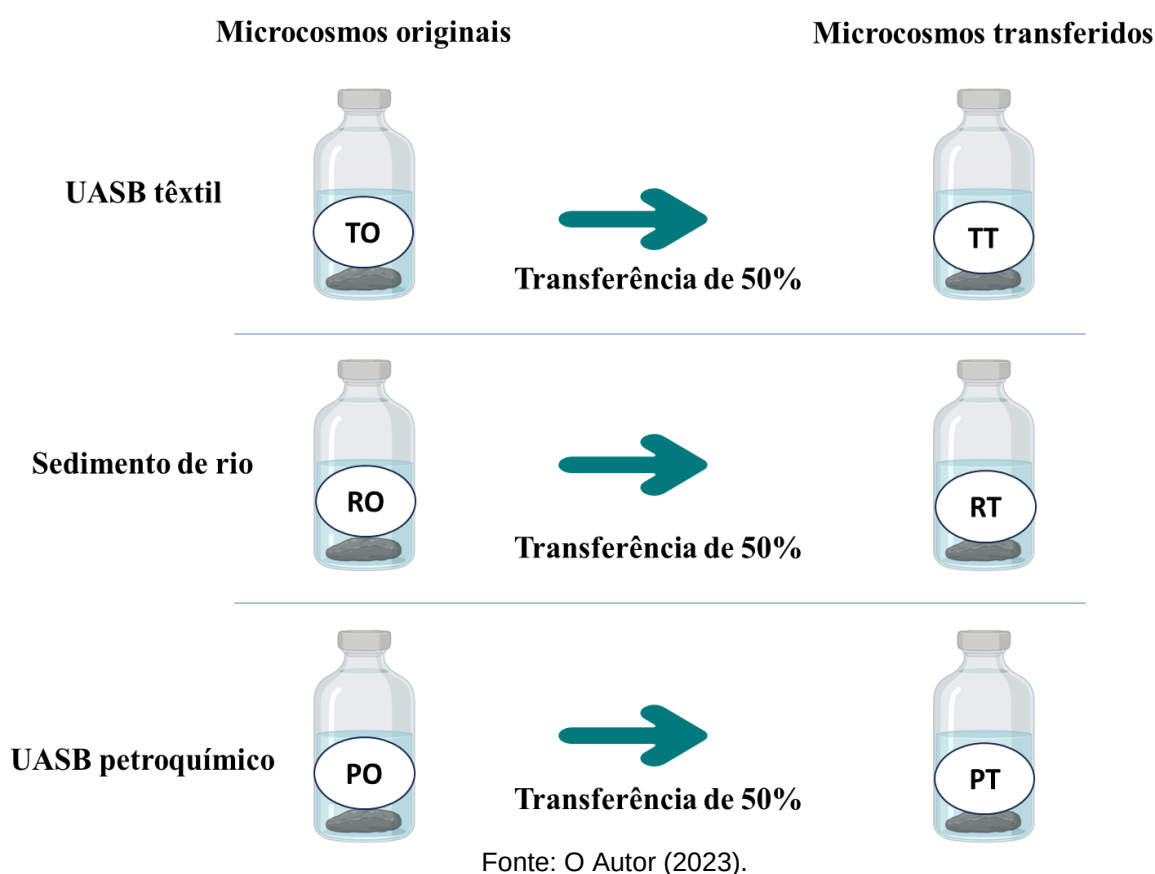


Fonte: O Autor (2023).

3.3 COLETA E EXTRAÇÃO DO DNA

Foram selecionados dois microcosmos de cada cultura microbiana (de rio, têxtil e petroquímica), totalizando um conjunto de 6 microcosmos. O primeiro microcosmo de cada cultura foi o microcosmo mais antigo, e o segundo, a transferência que era mais recente no laboratório no momento da utilização. Os microcosmos mais antigos representam as culturas originais de sedimento de rio (RO), UASB têxtil (TO) e UASB petroquímico (PO). As transferências representavam as culturas microbianas mais adaptadas às condições experimentais desejadas, para a cultura de rio (RT), UASB têxtil (TT) e UASB petroquímico (PT).

Figura 12 - Esquema representativo da origem das culturas utilizadas no presente estudo



Foram retiradas alíquotas de 30 mL do liquor misto de cada microcosmo, e transferidas para tubos de 50 mL. Os tubos foram centrifugados a 5000 rpm, por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet de biomassa foi utilizado para a extração de DNA. Foi utilizado um kit de extração de DNA PowerSoil™ isolation kit (Mo Bio

Laboratories Inc. Carlsbad, CA, EUA) segundo as instruções do fabricante. Após a extração, foi realizada a leitura de concentração de DNA, utilizando um espectrofotômetro Nanodrop 2000™. A concentração de DNA em todas as mostras foi superior a 17 ng.µL⁻¹, suficiente para realização de sequenciamento utilizando técnica de sequenciamento de nova geração (NGS).

Figura 13 - (a) coleta da biomassa, (b) Tubo centrifugado, contendo pellet de biomassa e sobrenadante, (c) kit de extração de DNA, (d) Eppendorf, contendo DNA extraído



Fonte: O Autor (2023).

O sequenciamento do material genético proveniente dos seis microcosmos foi realizado por um laboratório externo. A empresa escolhida foi GO Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (Rio de Janeiro, Brasil), que utiliza o método Metabarcoding em plataforma Illumina (Sistemas HiSeq) com leituras pareadas de 2x250bp, e rendimento de até 100 mil leituras por cada “amostra”, para sequenciar as regiões V3/V4 do gene 16S rRNA.

3.4 AMOSTRAGEM E DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

A cromatografia líquida de alta eficiência foi aplicada para o monitoramento das concentrações de anilina, e de seus subprodutos, o ácido 4-aminobenzoico, ácido benzoico e catecol. O monitoramento das concentrações de catecol serviu como um controle adicional de anaerobiose, tendo em vista que este é um intermediário aeróbio da degradação da anilina. Foram realizadas duas curvas de calibração para cada composto, uma curva baixa (entre 53 e 1073 μM) e uma curva alta (entre 1073 e 21473 μM), a fim de garantir uma maior precisão no monitoramento das concentrações destes compostos.

As amostragens dos microcosmos foram realizadas no interior da Glovebox, para não comprometer a anaerobiose com a entrada de ar atmosférico. O volume de amostra retirado de cada microcosmo foi de 0,5 mL (semanalmente), extraído com o auxílio de uma seringa de 1 mL, acoplada a uma agulha hipodérmica (25 mmx0,7 mm) introduzida através da tampa de butila. Em seguida, as amostras foram filtradas para frascos (vials) de 2 mL, e por fim, as amostras eram retiradas da *Glovebox* para serem analisadas no HPLC.

Para a determinação da concentração de anilina foi utilizada uma coluna de fase reversa (LiChospher® 100 RP-18 (5 μm)), acoplada a um HPLC SHIMADZU LC-20AT. Foi utilizada anilina com pureza 99,5% (Sigma Aldrich® - CAS Number 62-53-3) para realização da curva de calibração. A fase móvel consistiu em 60% metanol e 40% água Milli Q, com fluxo de 1 mL.min⁻¹ e o volume de injeção de amostra foi de 20 μL . O pico de detecção foi medido no comprimento de onda de 30 nm, apresentando um tempo de retenção de 4,622 minutos.

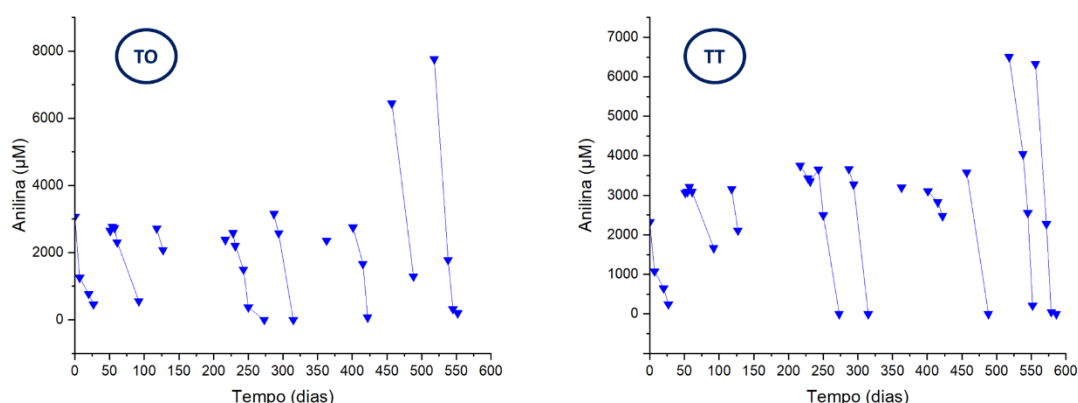
O mesmo cromatógrafo foi utilizado para a detecção dos subprodutos (ácido 4-aminobenzoico, ácido benzoico e catecol). Entretanto, tendo como fase móvel água acidificada com 0,003% de ácido fosfórico (70%) e acetonitrila (30%). O fluxo da fase móvel foi de 0,8 mL.min⁻¹ e o volume de injeção da amostra permaneceu em 20 μL . O pico de detecção de ácido 4-aminobenzoico foi medido no comprimento de onda de 287 nm, apresentando tempo de retenção de 4,06 min. O ácido benzoico foi detectado no comprimento de onda de 228 nm, com tempo de retenção de 7,898 minutos. E o catecol foi medido em 230 nm, com tempo de retenção de 4,622 minutos.

4 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS DADOS

4.1 MONITORAMENTO DE BIODEGRADAÇÃO DE ANILINA

Apesar das dificuldades operacionais para a garantia da anaerobiose, como o rompimento da luva da GloveBox, e o esgotamento da mistura gasosa, as culturas continuaram sendo alimentadas com anilina, e o monitoramento foi realizado em intervalos maiores para diminuir o risco de contaminação por oxigênio. Essas alimentações foram realizadas com o intuito de manter as culturas ativas. No entanto, a determinação precisa da velocidade de degradação de anilina, só pode ser determinada a partir do dia 615, com a retomada das condições experimentais ideais (tópico 4.3 “cinética de degradação”).

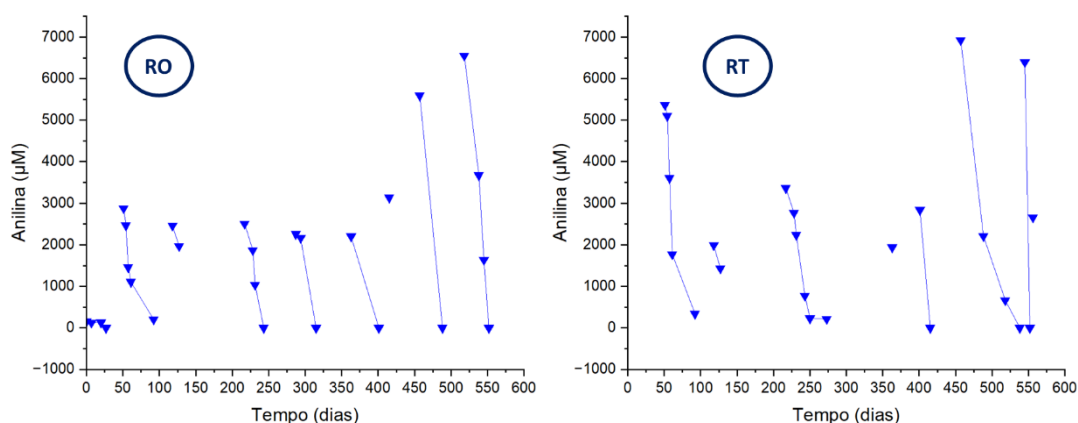
Figura 14 - Monitoramento das concentrações de anilina, nas culturas TO e TT



Fonte: O Autor (2023).

Inicialmente, TO e TT (Figura 14) foram alimentadas com uma concentração de aproximadamente 3220 µM de anilina, que era a concentração em que todas as culturas estavam adaptadas nos experimentos realizados por CARVALHO (2020). Posteriormente a concentração foi aumentada para 6441 µM, dia 457 (em TO) e 518 (em TT). Apesar de receberem o dobro da concentração, ambas as culturas foram capazes de consumir a anilina. Em TO, foi possível observar o consumo de sete alimentações de anilina na concentração de 3220 µM, e duas alimentações na concentração de 6441 µM. Enquanto em TT foi possível observar o consumo de oito alimentações de anilina na concentração de 3220 µM, e duas alimentações na concentração de 6441 µM.

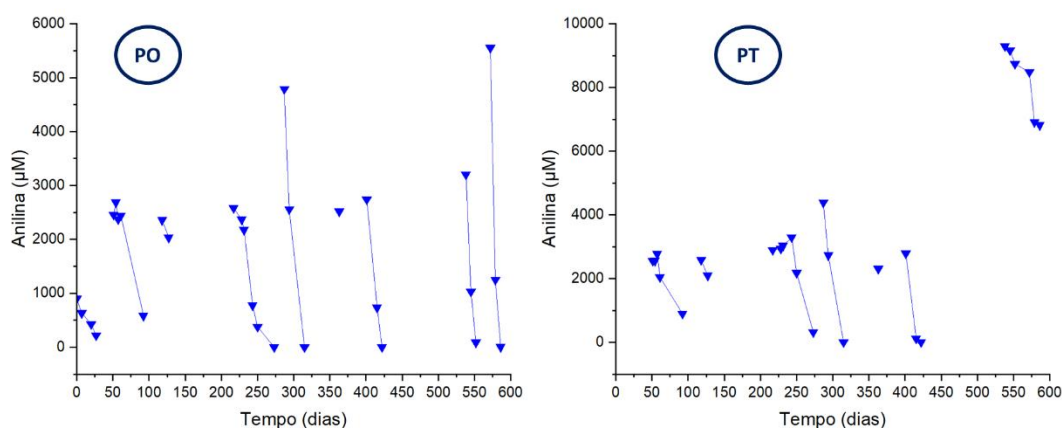
Figura 15 - Monitoramento das concentrações de anilina, nas culturas RO e RT



Fonte: O Autor (2023).

RO e RT (Figura 15) também foram alimentadas com concentração de aproximadamente 3220 µM de anilina, que posteriormente foi aumentada para 6441 µM, dia 457. Em RO, foi possível observar o consumo de seis alimentações de anilina na concentração de 3220 µM, e duas alimentações na concentração de 6441 µM. Enquanto em RT foi possível observar o consumo de quatro alimentações de anilina na concentração de 3220 µM, e três alimentações na concentração de 6441 µM.

Figura 16 - Monitoramento das concentrações de anilina, nas culturas PO e PT



Fonte: Autor (2023).

PO e PT também foram submetidas à duplicação da concentração inicial de anilina (Figura 16). Em PO, foi possível observar o consumo de seis alimentações de anilina na concentração de 3220 µM, uma alimentação 4475 µM (por erro operacional,

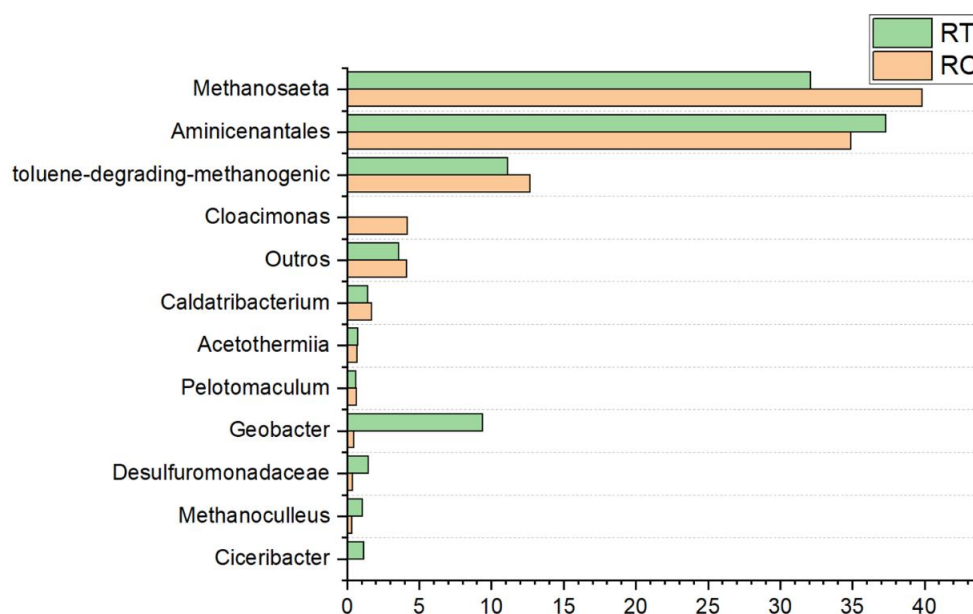
no dia 287) e alimentação na concentração de 6441 μM . Enquanto em PT foi possível observar o consumo de seis alimentações de anilina na concentração de 3220 μM , e um consumo lento da alimentação de anilina na concentração de 6441 μM , que pode ter ocorrido em função do espaço de tempo entre o consumo da alimentação anterior (no dia 422), até a nova alimentação (no dia 538).

Dessa forma, todas as culturas monitoras neste estudo, se mantiveram ativas para a degradação da anilina. Também pode ser observada, a capacidade de degradar o dobro da concentração de anilina, na qual elas foram adaptadas (3220 μM de anilina) nos experimentos realizados anteriormente por CARVALHO (2020).

4.2 TAXONOMIA MICROBIANA

Foram selecionados os gêneros mais abundantes de archeas e bactérias presentes em cada um dos microcosmos. Os gêneros com abundância relativa $>0,5\%$ foram comparados entre os microcosmos originais e transferidos de cada consorcio (rio, têxtil e petroquímico).

Figura 17 - Abundância relativa da microbiota presente em RO e RT



Fonte: O Autor (2023).

O core microbiano em RO (Figura 17) era composto pelos grupos Methanosaeta, Aminicenantales, toluene-degrading-mehtanogenic, *Cloacimonas*, *Caldatribacterium*, *Acetothermiia* e *Pelotomaculum*. A maior AR dentre as o domínio

Archea, foi do gênero *Methanosaeta*, representando 32,1% da microbiota total de RO, enquanto a maior AR dentre Bacteria, pertenceu a um grupo de microrganismos, não identificado no nível de gênero, mas pertencente à família Aminicenantales.

Methanosaeta engloba um grupo de arqueas metanogênicas com um metabolismo caracteristicamente acetoclástico. Em função do metabolismo acetoclástico ser energeticamente menos favorável ($\Delta G^{\circ} = -30,9 \text{ kJ.mol}^{-1}$), quando comparado ao hidrogenotrófico ($\Delta G^{\circ} = -104,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$), as arqueas *Methanosaeta* possuem um crescimento lento, com duplicação celular ocorrendo de 4 a 9 dias (LIU; YAN; YUE, 2011). Apesar do metabolismo metanogênico ser menos competitivo do que as SRB, a metanogênese pode ocorrer através de amins metiladas, e em ambientes com baixa disponibilidade de fontes mais oxidadas de enxofre, as arqueas metanogênicas podem atuar na mineralização central do acetato (FENCHEL; KING; BLACKBURN, 2012; SOWERS, 2009).

Os organismos que compõem o grupo Aminicenantales possuem em seu metabolismo primário, o potencial de utilizar o sulfato como aceptor de elétrons, tendo acetato, hidrogênio ou lactato como doadores de elétrons (KADNIKOV et al., 2019). No entanto, quando há uma baixa disponibilidade de sulfato no meio, essas bactérias podem atuar na fermentação acetogênica, propiciando uma relação nutricional com arqueas metanogênicas como *Methanosaeta* (DALCIN MARTINS et al., 2021). A família Aminicenantales também está relacionada com a degradação de compostos heterocíclicos nitrogenados (FAN et al., 2022).

Outro grupo bacteriano com AR elevada (12,6%) foi identificada como toluene-degrading-methanogenic. Trata-se de um grupo microbiano taxonomicamente não definido em nível de gênero, pertencente a família Anaerolinaceae. O metabolismo primário deste grupo é relacionado a acetogênese e degradação de hidrocarbonetos (LIANG et al., 2015). Também há registro da produção enzimática de transaminases, que catalisam a transferência de grupos aminos e cetoácidos (WANG et al., 2021).

O gênero *Cloacimonas*, com AR de 4,1%, possui metabolismo fermentativo acetogênico, utilizando como substrato aminoácidos. Em ambientes em que há a produção de hidrogênio e dióxido de carbono, este gênero está frequentemente associado a microrganismos consumidores de H^+ , dependendo diretamente dessa relação para o controle da pressão de hidrogênio do meio (ALALAWY et al., 2021; QI et al., 2021).

Outros dois gêneros acetogênicos, presentes no core microbiano foram *Caldatribacterium* e *Acertothermia*. Ambos os gêneros possuem metabolismo primário acetogênico, sendo associadas à arqueas metanogênicas acetoclásticas (COLMAN et al., 2022; DODSWORTH et al., 2013; RODRIGUEZ; HIRAS; HANSON, 2011). O ultimo gênero do core microbiano é o *Pelotomaculum*, que é sintrófico obrigatório, consumindo propionato, apenas em co-cultura com microrganismos hidrogenotróficos (IMACHI et al., 2007).

De forma semelhante ao comportamento observado em RO, RT apresentou os mesmos três grupos microbianos com as maiores AR do core microbiano (Aminicenantales, *Methanosaeta* e *tolune-degrading-methanogenic*). No entanto, o gênero *Methanosaeta* sofreu uma diminuição de 39,8% (em RO), para 32,1% em RT. Aminicenantales apresentou um crescimento de 34,8%, em RO, para 37,3% em RT. A menor diferença de AR foi de *tolune-degrading-methanogenic* que representou 11,1% do core microbiano em RT.

Uma das grandes alterações ocorridas na transferência RT, foi o crescimento da AR do gênero bacteriano *Geobacter*, que representava 0,4% em RO, passando para 9,3% em RT. Trata-se de um grupo microbiano frequentemente encontrado em zonas de aquíferos contaminados por petróleo, com a capacidade de degradar anaerobiamente o benzeno (LOVLEY et al., 2011). Também possuem a capacidade de degradar benzoato, através da utilização de enzimas benzoil-CoA redutase classe 1 (que exige 2 ATP), e classe 2 que não necessita de ATP para catalisar a reação de clivagem do anel aromático (LÖFFLER et al., 2011).

O gênero *Cloacimonas*, que apresentava AR de 4,1% em RO, foi reduzido para 0,03% em RT. Como se trata de um gênero sintrófico obrigatório, com a maior competição pelos recursos energéticos provenientes da degradação da anilina, e o crescimento de gêneros capazes de utilizar seus subprodutos diretamente como fonte de energia (como *Geobacter*), é justificável que *Cloacimonas* sofresse inibição de seu crescimento.

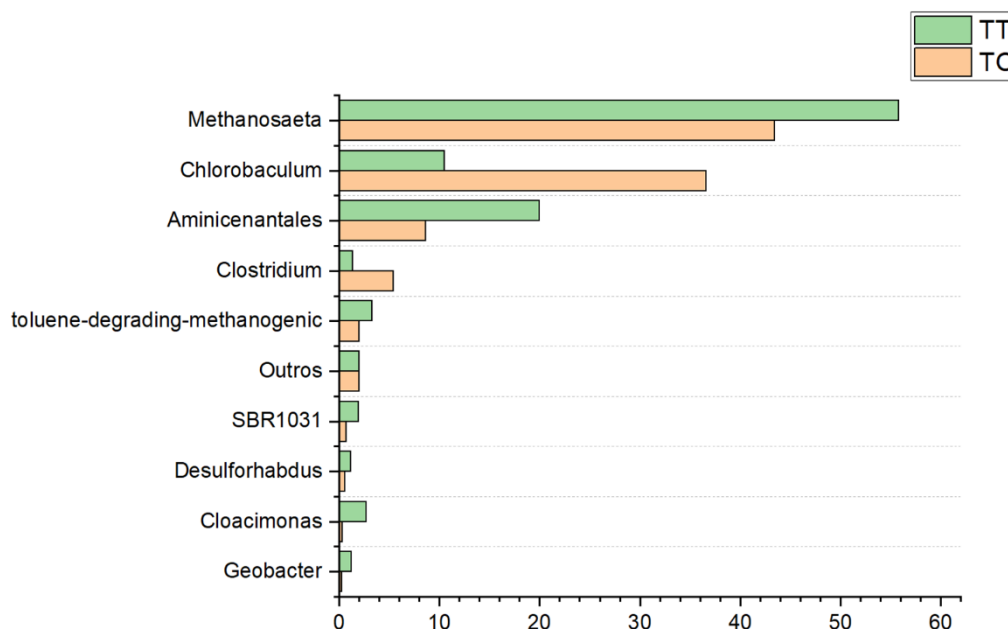
Os grupos microbianos *Methanoculleus*, Desulfuromonadaceae e *Ciceribacter* também tiveram AR maior em RT quando comparado com RO. *Methanoculleus* (AR = 1%, em RT) é um gênero pertencente ao domínio Archea, com a capacidade hidrogênotrófica, pode utilizar formiato, aminas metiladas, mas não há registros de seu crescimento através do uso de acetato (CHEN et al., 2015; TIAN; WANG; DONG,

2010). A incapacidade de utilização de acetato pode ser um dos motivos de seu baixo valor de AR, quando comparado a *Methanosaeta*.

O grupo microbiano identificado como Desulfuromonadacea, em RT, é um conjunto de microrganismos sem gênero estabelecido, agrupados dentro da família bacteriana Desulfuromonadacea. Trata-se de um grupo de microrganismos frequentemente registrados em ambientes petrolíferos, com metabolismo redutor de sulfato, tem a capacidade de utilizar trimetilamina (GREENE; PATEL; YACOB, 2009; SU et al., 2019). De forma semelhante, é possível que este gênero também possa se beneficiar de subprodutos da degradação da anilina.

O gênero *Ciceribacter* (AR = 1,1%, em RT) é documentado como sendo presente em sedimentos de rios com alto teor de ferro. Trata-se de uma bactéria anaeróbica facultativa, com capacidade de redução de nitrato e oxidação de ferro, utilizando como fonte de carbono ácido α -amino-butirico e n-acetil- β -manosamina (DENG et al., 2020).

Figura 18 - Abundância relativa da microbiota presente em TO e TT



Fonte: O Autor (2023).

Em TO, o core microbiano foi composto pelos grupos *Methanosaeta*, *Chlorobaculum*, Aminicenantales, *Clostridium*, TDM, SBR1031 e *Desulforhabdus* (Figura 18). De forma similar aos microcosmos com inóculo de rio, é possível observar

uma AR elevada para os grupos *Methanosaeta* (43%), Aminicenantales (8,6%) e TDM (2%). Sugerindo uma possível relação entre a interação destes grupos na degradação anaeróbia da anilina.

O gênero microbiano *Chlorobaculum* apresentou AR elevada em TO (36,6%). Trata-se de um grupo microbiano fototrófico obrigatório, com a capacidade de utilizar compostos reduzidos de enxofre (sulfito, sulfeto e enxofre elementar) como doadores de elétrons e ferredoxina reduzida para impulsionar a fixação de carbono, biossíntese e crescimento microbiano. Estas bactérias são adaptadas à luz baixa, por ser caracteristicamente presente em áreas mais profundas de corpos de água (HANSON et al., 2016).

O microcosmos no qual a cultura TO se encontra, é o mesmo de quando essa cultura foi iniciada em 2018. No período em questão, essa cultura recebia sulfato como acceptor de elétrons, que é convertido a formas mais reduzidas pelas SRB. Apesar de não receber novas injeções de compostos de enxofre, o enxofre residual nesse sistema é mais elevado quando comparado aos outros inóculos, dessa forma criando um ambiente mais propício para o desenvolvimento de *Chlorobaculum*.

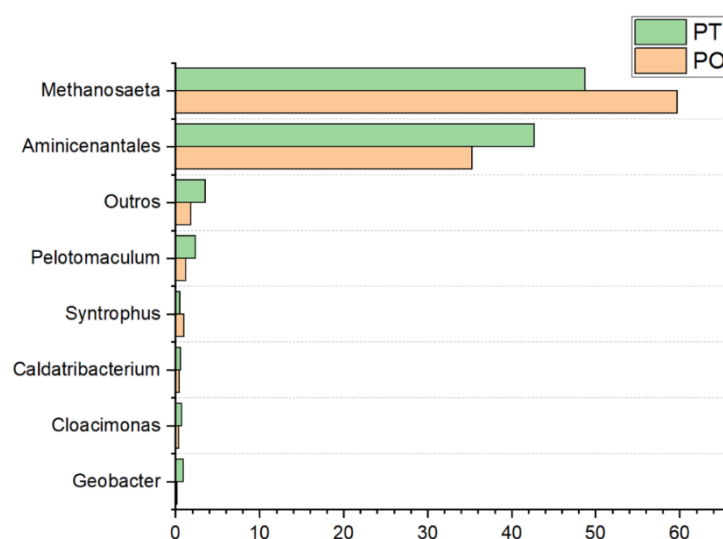
Os grupos SBR1031 e *Desulfohabdus*, que são compostos por bactérias redutoras de sulfato, podem ter se beneficiado da produção formas oxidadas de enxofre de *Chlorobaculum*. SBR1031 apresentou uma AR de 0,7% em TO, essas bactérias participam da degradação de compostos de N e S associados ao petróleo, com registro de crescimento durante a degradação de ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (ZHANG et al., 2023). Esse gênero também tem a capacidade de secretar *stick protein*, que é responsável pela estabilização de grânulos microbianos (LI et al., 2023).

Desulfohabdus (AR de 0,5), possui genes relacionados à degradação anaeróbia de tolueno (benzil succianato sintase) e genes de degradação de benzoil-coA (bamBC, dch, had e bamA) (IYENGAR, 2014). *Clostridium* (AR = 5,4) é um gênero bacteriano frequentemente associado à degradação de celulose e de corantes azo, produzindo ácido acético, fórmico, benzoato e hidrogênio. No entanto, esse gênero não teve crescimento relatado com a utilização de benzoato (CHAMKHA et al., 2001; YU; MEADE; LIU, 2019).

Em TT ocorreu uma maior AR para o gênero *Methanosaeta* (55,7%), quando comparado com TO (43,4%). Esse aumento também é observado para os grupos Aminicenantales (19,9%), TDM (3,3%) SBR1031 (1,9%), *Desulfohabdus* (1,1%)

Cloacimonas (2,7%) e *Geobacter* (1,2%). Ocorreu uma grande diminuição em *Chlorobaculum*, que em TT representou 10,5 % da microbiota. A manutenção de uma AR elevada de *Methanosaeta* é importante nestas culturas, pois a anilina era a única fonte de carbono disponível no meio. O fato da metanogênese ser dominada por *Methanosaeta* indica que a degradação de anilina provavelmente passou pela produção de acetato como composto intermediário.

Figura 19 - Abundância relativa da microbiota presente em PO e PT

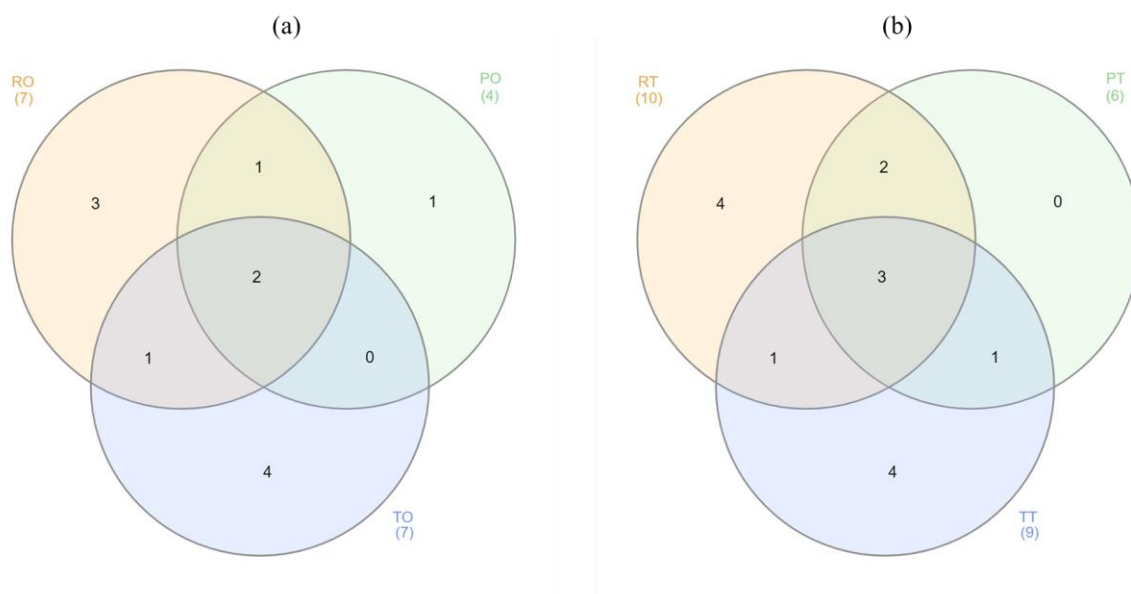


Fonte: O Autor (2023).

O core microbiano presente em PO foi o que apresentou o menor número de grupos dentre os microbiomas analisados (Figura 19). Os grupos microbianos que compuseram o core microbiano, em ordem decrescente de AR foram, *Methanosaeta* (59,6%), aminicenantales (35%), *Pelotomaculum* (1,2%) e *Syntrophus* (0,9%). Como observado nos microbiomas descritos anteriormente, a relação entre *Methanosaeta* e Aminicenantales sugere que esses dois grupos conseguem mutualmente se beneficiar da degradação anaeróbia da anilina.

PT apresentou um core microbiano com um número maior de grupos em relação a PO. Sofreram aumento na AR os grupos Aminicenantales (42%), *Pelotomaculum* (2,3%) *Geobacter* (0,9%), *Cloacimonas* (0,6%) e *Caldatribacterium* (0,5%). Ocorreram diminuição de AR em *Methanosaeta* (48,6%) e *Syntrophus* (0,4%).

Figura 20 - Diagrama de Venn do core microbiano, presente nos microcosmos



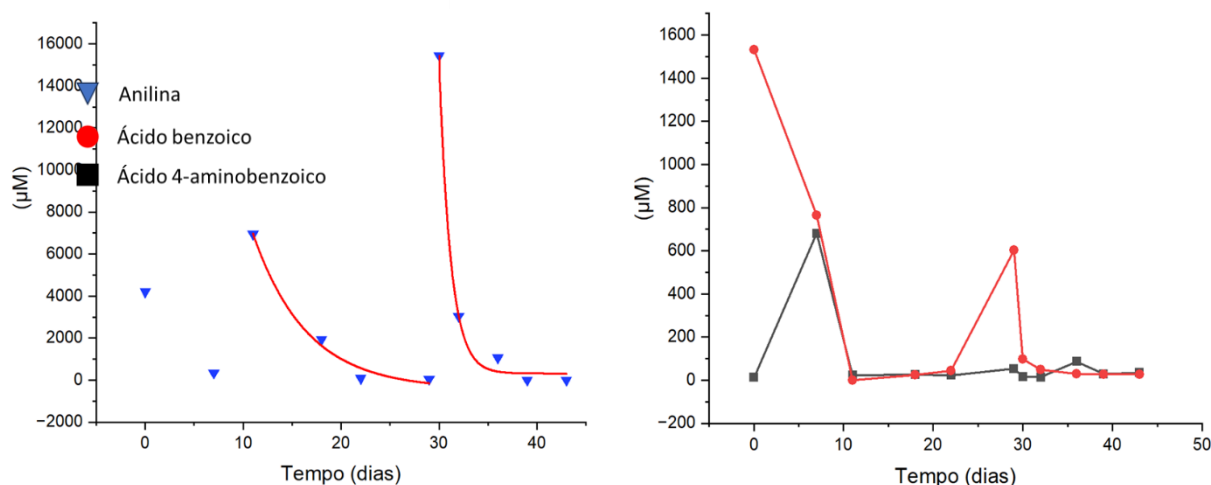
Fonte: O Autor (2023).

No diagrama de Venn (Figura 20) é possível observar os grupos do core microbiano, que são comuns entre os microbiomas originais (a) e transferidos (b). Os grupos em comum aos microcosmos originais que permaneceram nos core das transferências foram *Methanosaeta* e *Aminicenantes* e *Geobacter*. Dessa forma, tem-se um forte indício de que esses grupos microbianos estariam diretamente ligados a degradação anaeróbia da anilina.

4.3 CINÉTICAS DE DEGRADAÇÃO

No momento em que todas as condições operacionais permitiram o monitoramento frequente da degradação da anilina, sem comprometer a anaerobiose dos microcosmos, se iniciou o monitoramento da cinética de degradação da anilina. Os dados cromatográficos, do conjunto de seis microcosmos (TO, TT, PO, PT, RO e RT), foram plotados nos gráficos a seguir, sendo o dia 0 (dos gráficos), correspondentes ao dia 615 da Figura 11. Todas as culturas foram alimentadas com anilina neste tempo, e as concentrações dos subprodutos presentes no dia 0, correspondem ao residual proveniente de alimentações anteriores, da manutenção das culturas.

Figura 21 - Concentração de anilina ao longo de três alimentações da cultura TO: (a) cinética de degradação da anilina e (b) Subprodutos da degradação

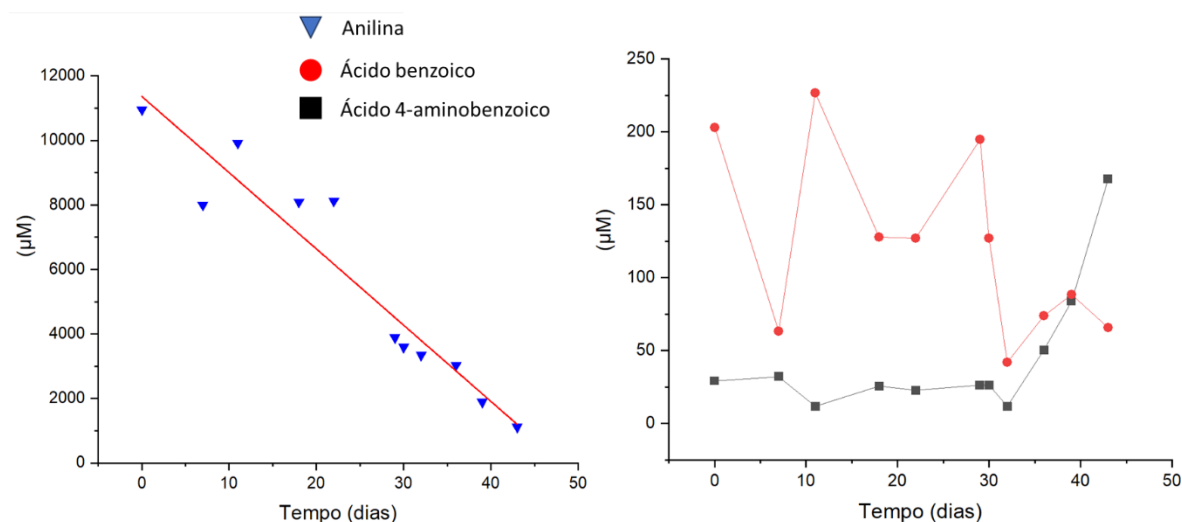


Fonte: O Autor (2023).

No microcosmo TO (Figura 21), a primeira alimentação foi rapidamente consumida, em um intervalo de tempo de duas coletas, impossibilitando a sua inserção em uma curva de degradação. Nas duas alimentações subsequentes foi possível observar um aumento da velocidade de degradação da anilina. Que passou de 0,194 $\mu\text{M}/\text{dia}$ (da segunda alimentação), para 0,904 $\mu\text{M}/\text{dia}$ (na terceira alimentação).

O monitoramento dos subprodutos durante a degradação anaeróbia da anilina, indicou a formação e o consumo dos intermediários ácido 4-aminobenzoico e ácido benzoico. Os maiores picos de ácido 4-aminobenzoico ocorreram nos dias 7 (681 μM) e 36 (86 μM). Já para o ácido benzoico, maiores picos ocorreram nos dias 0 (1532 μM) e 29 (601 μM).

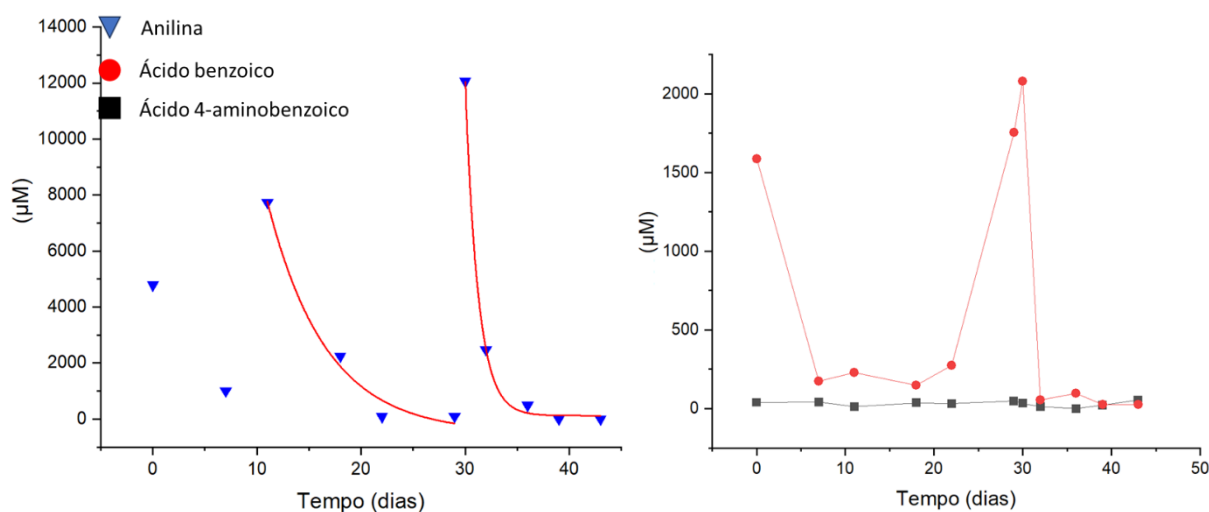
Figura 22 - Concentração de anilina da cultura TT: (a) cinética de degradação da anilina e (b) Subprodutos da degradação



Fonte: O Autor (2023).

No microcosmo TT (Figura 22), ocorreu a menor velocidade de degradação de anilina observada, entre todos os 6 microcosmos utilizados. Isso pode ter acontecido em função da coleta de biomassa realizada para o sequenciamento taxonômico. No entanto, ainda foi possível observar a formação de ácido 4-amino benzoico com pico ocorrendo no dia 43 (167 μM), e de ácido benzoico com picos nos dias 0 (203 μM) 11 (226 μM), 29 (194 μM), e 39 (88 μM)

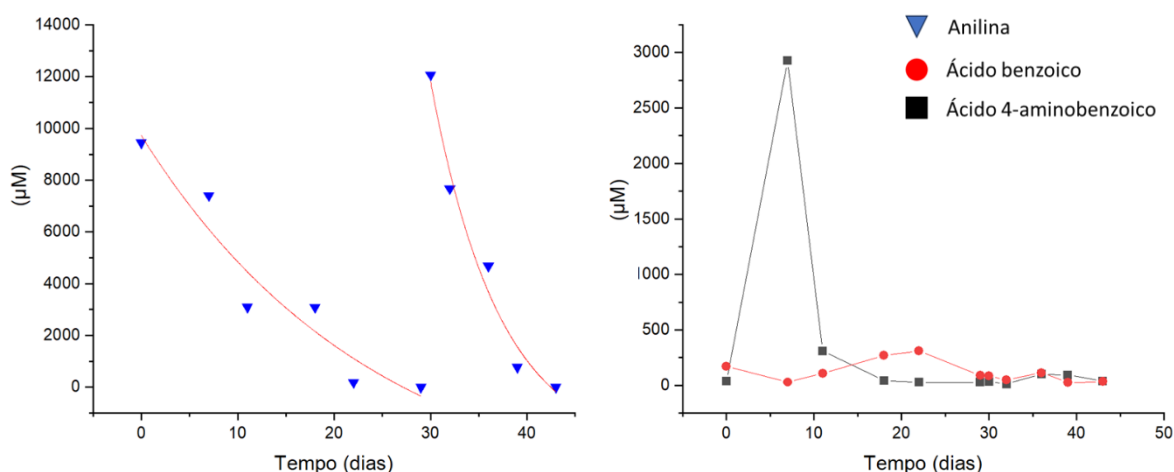
Figura 23 - Concentração de anilina ao longo de três alimentações da cultura RO: (a) cinética de degradação da anilina e (b) Subprodutos da degradação



Fonte: O Autor (2023).

Em RO (Figura 23), ocorreu um comportamento similar ao observado em TO, com um rápido consumo de anilina durante a primeira alimentação. RO também apresentou uma crescente capacidade em degradar anilina, que passou de 0,190 $\mu\text{M}/\text{dia}$ para 0,864 $\mu\text{M}/\text{dia}$ de anilina. O ácido 4-aminobenzoico não apresentou nenhum pico, sugerindo que esse subproduto não foi acumulado no microcosmo. O ácido benzoico apresentou maiores concentrações no dia 0 (1586 μM) e 30 (2079 μM), ambos sendo consumidos em sequência.

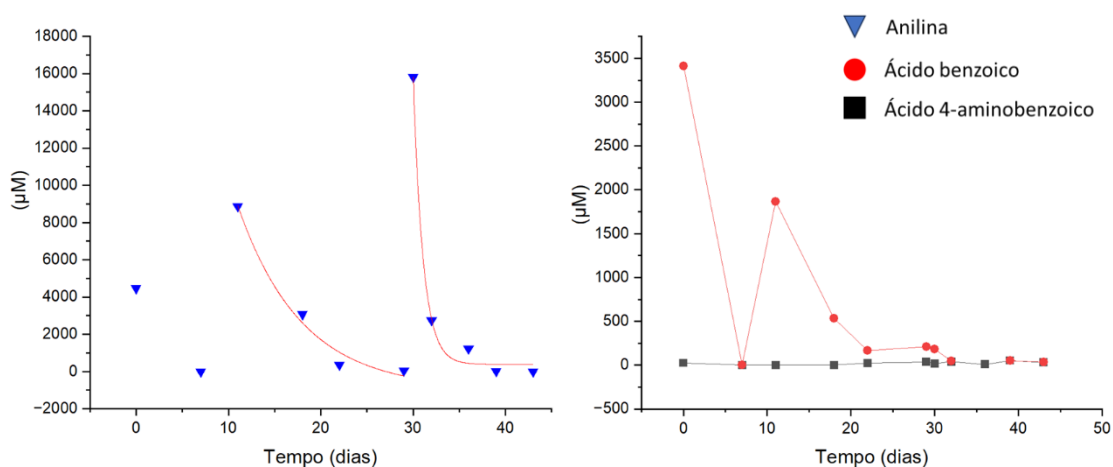
Figura 24 - Concentração de anilina ao longo de três alimentações da cultura RT: (a) cinética de degradação da anilina e (b) Subprodutos da degradação



Fonte: O Autor (2023).

Na Figura 24, a transferência (RT) apresentou uma menor velocidade de degradação, quando comparada a sua cultura original (RO). No entanto, ainda foi possível observar o consumo de duas alimentações de anilina, que tiveram sua velocidade de degradação aumentadas de 0,04 $\mu\text{M}/\text{dia}$ (na primeira alimentação) para 0,14 $\mu\text{M}/\text{dia}$ (na segunda alimentação). O pico de formação de ácido 4-amino benzoico ocorreu no dia 7 (2926 μM) e 36 (102 μM). O pico de formação de ácido benzoico ocorreu nos dias 22 (310 μM) e 36 (113 μM).

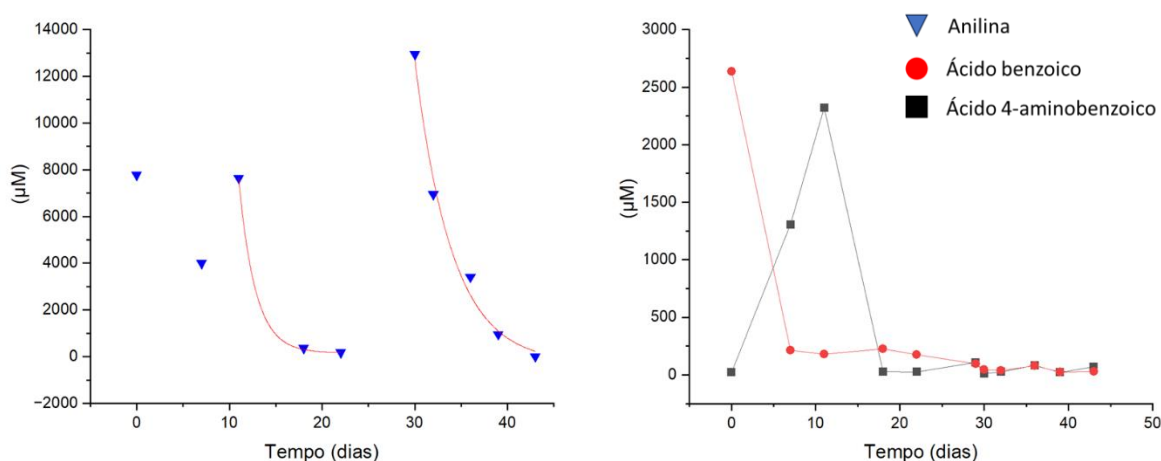
Figura 25 - Concentração de anilina ao longo de três alimentações da cultura PO: (a) cinética de degradação da anilina e (b) Subprodutos da degradação



Fonte: O Autor (2023).

Durante a primeira alimentação, PO apresentou comportamento similar às culturas originais apresentadas anteriormente, com um rápido consumo (Figura 25). A cinética de degradação destes microcosmos também teve uma crescente velocidade durante as sucessivas alimentações de anilina, passando de $0,155 \mu\text{M}/\text{dia}$ durante a segunda degradação, para $0,990 \mu\text{M}/\text{dia}$ na terceira alimentação. Não ocorreu acúmulo de ácido 4-aminobenzoico. O pico de formação de ácido benzoico ocorreu nos dias 0 ($3410 \mu\text{M}$) e 11 ($1866 \mu\text{M}$).

Figura 26 - Concentração de anilina ao longo de três alimentações da cultura PT: (a) cinética de degradação da anilina e (b) Subprodutos da degradação



Fonte: O Autor (2023).

Já em PT, foi possível observar um comportamento diferente das demais transferências (Figura 26). A velocidade de degradação decaiu da primeira alimentação com 0,24 µM/dia e passou para 0,56 µM/dia na segunda alimentação. As maiores concentrações de ácido 4-aminobenzoico ocorreram nos dias 11 (2322 µM), 29 (106 µM), 36 (83 µM). A maior concentração de ácido benzoico foi registrada no dia 0 (G) sendo consumida subsequentemente.

A presença de *Aminicenantales* e *Methanosaeta* em todos os microcosmos originais e transferidos, das culturas de sedimento de rio, lodo petroquímico e têxtil sugere uma relação direta destes grupos com a degradação anaeróbia da anilina. Vale ressaltar, também, o Aumento de AR do gênero *Geobacter* em todos os microcosmos de transferência, associado a menos concentrações de ácido benzoico nestes microcosmos, sugerindo uma atividade de consumo de ácido benzoico como já foi relatado na literatura.

5 CONCLUSÃO

A partir da identificação taxonômica de três culturas degradadoras de anilina, utilizando a metodologia de sequenciamento do 16SRNA microbiano, foi possível observar que, apesar das diferentes origens das microbiotas, o core microbiano dos microcosmos com inóculo de sedimento de rio, de reator têxtil, e petroquímico foram selecionados de maneira semelhante. Em todos os microcosmos originais (PO, RO e TO), os grupos *Methanosaeta* e Aminicenantes, apresentaram AR elevadas, sugerindo que a degradação da anilina pode ter ocorrido por sintrofia acetogênica e metanogênica acetoclástica.

Em todos os microcosmos de transferência (PT, RT e TT) ocorreu uma elevação da AR do gênero *Geobacter*. Esse gênero já foi descrito como capaz de utilizar ácido benzoico como fonte de carbono, e isso pode ser observado na menor concentração de ácido benzoico nos microcosmos transferidos quando comparados com suas culturas originais.

A coleta de biomassa, para o sequenciamento taxonômico, pode ter afetado negativamente a cinética de degradação das transferências, uma vez que essas possuem menor concentração de biomassa que suas culturas originais. Apesar disso, a cinética de degradação de anilina em todos os microcosmos aumentou ao longo do tempo, durante as sucessivas alimentações. Futuros estudos genômicos, focados na expressão gênica dos grupos *Methanosaeta*, Aminicenantes e *Geobacter*, durante a degradação da anilina, podem colaborar para o melhor entendimento da rota de degradação.

REFERÊNCIAS

- AI, L.; ZHANG, C.; CHEN, Z. Removal of methylene blue from aqueous solution by a solvothermal-synthesized graphene/magnetite composite. **Journal of Hazardous Materials**, v. 192, n. 3, p. 1515–1524, 2011.
- ALALAWY, A. I. et al. Explication of structural variations in the bacterial and archaeal community of anaerobic digestion sludges: An insight through metagenomics. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 5, p. 105910, 2021.
- AUTOMOTIVE INDUSTRY WORLDWIDE - STATISTICS & FACTS. **Statista**, 2023. Disponível em: <https://www.statista.com/topics/1487/automotive-industry/#topicOverview>. Acesso em: 15 jun. 2023.
- BOTALOVA, O. et al. Identification and chemical characterization of specific organic constituents of petrochemical effluents. **Water Research**, v. 43, n. 15, p. 3797–3812, 2009.
- CARVALHO, J. DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE ANILINA UTILIZANDO DIFERENTES CULTURAS MICROBIANAS. **UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**, v. 21, n. 1, p. 1–9, 2020.
- CHAMKHA, M. et al. Isolation of *Clostridium bifermentans* from oil mill wastewaters converting cinnamic acid to 3-phenylpropionic acid and emendation of the species. **Anaerobe**, v. 7, n. 4, p. 189–197, 2001.
- CHEN, H. et al. Short-term effect of aniline on soil microbial activity: A combined study by isothermal microcalorimetry, glucose analysis, and enzyme assay techniques. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 1, p. 674–683, 2014.
- CHEN, S. C. et al. *Methanoculleus sediminis* sp. nov., a methanogen from sediments near a submarine mud volcano. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2141–2147, 2015.
- COLMAN, D. R. et al. Deep-branching acetogens in serpentinized subsurface fluids of Oman. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 119, n. 42, p. 1–11, 2022.
- DALCIN MARTINS, P. et al. Enrichment of novel Verrucomicrobia, Bacteroidetes, and Krumholzibacteria in an oxygen-limited methane- and iron-fed bioreactor inoculated with Bothnian Sea sediments. **MicrobiologyOpen**, v. 10, n. 1, 2021.
- DENG, T. et al. *Ciceribacter ferrooxidans* sp. nov., a nitrate-reducing Fe(II)-oxidizing bacterium isolated from ferrous ion-rich sediment. **Journal of Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 350–356, 2020.
- DODSWORTH, J. A. et al. Single-cell and metagenomic analyses indicate a fermentative and saccharolytic lifestyle for members of the OP9 lineage. **Nature**

Communications, v. 4, n. May, 2013.

EDWARDS, E. A.; GRBIC-GALIC, D. Anaerobic degradation of toluene and o-xylene by a methanogenic consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 313–322, 1994.

FAN, Q. et al. Microbial community evolution, interaction, and functional genes prediction during anaerobic digestion in the presence of refractory organics. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 3, p. 107789, 2022.

FENCHEL, T.; KING, G. M.; BLACKBURN, T. H. **Bacterial Metabolism**. [s.l: s.n.].

FOREZI, L. DA SILVA M. Métodos de Preparação Industrial de Solventes e Reagentes Químicos. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 6, p. 496–503, 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.

GLOBAL CONSTRUCTION MARKET OUTLOOK. Expert Market Research, 2023. Disponível em: <<https://www.expertmarketresearch.com/about-us>>. Acesso em: 15, de junho de 2023.

GLOBAL DYES AND PIGMENTS MARKET SIZE & GROWTH REPORT, 2030. Grand View Research, 2023. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/dyes-and-pigments-market#>>. Acesso em: 16, de junho de 2023.

GREENE, A. C.; PATEL, B. K. C.; YACOB, S. *Geoalkalibacter subterraneus* sp. nov., an anaerobic Fe(III)- and Mn(IV)-reducing bacterium from a petroleum reservoir, and emended descriptions of the family Desulfuromonadaceae and the genus *Geoalkalibacter*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 781–785, 2009.

HANSON, T. E. et al. *Chlorobaculum tepidum* growth on biogenic S(0) as the sole photosynthetic electron donor. **Environmental microbiology**, v. 18, n. 9, p. 2856–2867, 2016.

HUGENHOLTZ, P. et al. Prokaryotic taxonomy and nomenclature in the age of big sequence data. **ISME Journal**, v. 15, n. 7, p. 1879–1892, 2021.

IMACHI, H. et al. *Pelotomaculum propionicum* sp. nov., an anaerobic, mesophilic, obligately syntrophic, propionate-oxidizing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 1487–1492, 2007.

INFORMATION, G. ATSDR MMG for Aniline. p. 1–20, [s.d.].

IYENGAR, M. N. S. Draft genome sequence of the mulberry. **Indian Silk**, v. 53, n. 2–4, p. 18–19, 2014.

JAZIRI, A.; BEN, H.; FERNANDEZ-SERRANO, M. Persistent organic and inorganic pollutants in the effluents from the textile dyeing industries : Ecotoxicology appraisal via a battery of biotests. v. 196, n. October 2020, 2021.

KADNIKOV, V. V. et al. Genome of the candidate phylum Aminicenantes bacterium from a deep subsurface thermal aquifer revealed its fermentative saccharolytic lifestyle. **Extremophiles**, v. 23, n. 2, p. 189–200, 2019.

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

KISHOR, R. et al. Journal of Environmental Chemical Engineering Ecotoxicological and health concerns of persistent coloring pollutants of textile industry wastewater and treatment approaches for environmental safety. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 2, p. 105012, 2021.

LI, H. et al. Long-term performance, microbial evolution and spatial microstructural characteristics of anammox granules in an upflow blanket filter (UBF) treating high-strength nitrogen wastewater. **Bioresource Technology**, v. 367, n. October 2022, p. 128206, 2023.

LIANG, B. et al. Anaerolineaceae and Methanosaeta turned to be the dominant microorganisms in alkanes-dependent methanogenic culture after long-term of incubation. **AMB Express**, v. 5, n. 1, 2015.

LIANG, Q. et al. 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.

LIU, X.; YAN, Z.; YUE, Z. B. Biogas. **Comprehensive Biotechnology, Second Edition**, v. 3, p. 99–114, 2011.

LÖFFLER, C. et al. Occurrence , genes and expression of the W / Se-containing class II benzoyl-coenzyme A reductases in anaerobic bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 13, p. 696–709, 2011.

LOVLEY, D. R. et al. **Geobacter: The Microbe Electric's Physiology , Ecology , and Practical Applications**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2011. v. 59

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Acute Exposure Guideline Levels for Selected Airborne Chemicals**. [s.l: s.n.]. v. 1

QI, Q. et al. Enhancement of methanogenic performance by gasification biochar on anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 330, n. January, p. 124993, 2021.

RAPPÉ, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The Uncultured Microbial Majority. **Annual**

Review of Microbiology, v. 57, p. 369–394, 2003.

RAY, S. et al. Biogas Upgrading by Hydrogenotrophic Methanogens: An Overview. **Waste and Biomass Valorization**, v. 14, n. 2, p. 537–552, 2023.

ROBERT, A. et al. Biological monitoring of workers exposed to 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate (MDI) in 19 French polyurethane industries. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 80, n. 5, p. 412–422, 2007.

RODRIGUEZ, J.; HIRAS, J.; HANSON, T. E. Sulfite oxidation in *Chlorobaculum tepidum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. MAY, p. 1–7, 2011.

ROSSELLÓ-MÓRA, R.; WHITMAN, W. B. Dialogue on the nomenclature and classification of prokaryotes. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 5–14, 2019.

SAMY, M.; MENSAH, K.; GAR ALALM, M. A review on photodegradation mechanism of bio-resistant pollutants: Analytical methods, transformation products, and toxicity assessment. **Journal of Water Process Engineering**, v. 49, n. August, p. 103151, 2022.

SCHNELL, SYLVIA FRIEDHELM, BAK NORBERT, P. Anaerobic degradation of aniline and dihydroxybenzenes by newly isolated sulfate-reducing bacteria and description of *Desulfobacterium anilini*. **Microbiology**, p. 121–124, 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.

SINGH, R. K. et al. From protein engineering to immobilization: Promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 1, p. 1232–1277, 2013.

SOWERS, K. R. Methanogenesis Defining Statement Historical Overview Diversity and Phylogeny Habitats Physiology and Biochemistry Molecular Genetics Conclusion Further Reading. 2009.

SU, H. et al. The mutual influence between corrosion and the surrounding soil microbial communities of buried petroleum pipelines. **RSC Advances**, v. 9, n. 33, p. 18930–18940, 2019.

TAKEO, M. et al. Function of a glutamine synthetase-like protein in bacterial aniline oxidation via γ glutamylanilide. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 19, p. 4406–4414, 2013.

TAO, N. et al. Effects of aniline on growth, oxidative and DNA damage of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. **Environmental Technology and Innovation**, v. 28, p. 102583, 2022.

TIAN, J.; WANG, Y.; DONG, X. Methanoculleus hydrogenitrophicus sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from wetland soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 9, p. 2165–2169, 2010.

TÖLGYESI, Á.; SHARMA, V. K. Quantification of aromatic amines derived from azo colorants in textile by ion-pairing liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1137, n. October 2019, p. 121957, 2020.

URBANIÁK, M. et al. Occurrence of primary aromatic amines and nicotine in sediments collected from the United States. **Science of the Total Environment**, v. 851, n. August, p. 158102, 2022.

VIEIRA, M. M. et al. When treatment increases the contaminant's ecotoxicity: A study of the Fenton process in the degradation of methylene blue. **Chemosphere**, v. 283, n. June, p. 131117, 2021.

WANG, C. et al. Identification, Characterization, and Site-Specific Mutagenesis of a Thermostable ω -Transaminase from Chloroflexi bacterium. **ACS Omega**, v. 6, n. 26, p. 17058–17070, 2021.

WU, L. Dilemmas downstream from the Songhua River spill. **Journal of medical toxicology : official journal of the American College of Medical Toxicology**, v. 2, n. 3, p. 112–113, 2006.

YE, Q. et al. ScienceDirect Molecular characterization of methanogenic microbial communities for degrading various types of polycyclic aromatic hydrocarbon. **Journal of Environmental Sciences**, v. 86, p. 97–106, 2019.

YU, H. Y.; MEADE, A.; LIU, S. J. Phylogeny of Clostridium spp. Based on Conservative Genes and Comparisons with Other Trees. **Microbiology (Russian Federation)**, v. 88, n. 4, p. 469–478, 2019.

YU, X. et al. Integration of $\bullet\text{SO}_4$ --based AOP mediated by reusable iron particles and a sulfidogenic process to degrade and detoxify Orange II. **Water Research**, v. 174, 2020.

ZEMB, O. et al. Absolute quantitation of microbes using 16S rRNA gene metabarcoding: A rapid normalization of relative abundances by quantitative PCR targeting a 16S rRNA gene spike-in standard. **MicrobiologyOpen**, v. 9, n. 3, p. 1–19, 2020.

ZHANG, X. et al. Sustained anaerobic degradation of 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid by acclimated sludge in a continuous-flow reactor. **Chemosphere**, v. 330, n. February, p. 138749, 2023.

ZHANG, Z. et al. A review of sulfate-reducing bacteria: Metabolism, influencing factors and application in wastewater treatment. **Journal of Cleaner Production**, v. 376, n. August, p. 134109, 2022.