

II-488 - IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA E AVALIAÇÃO DA MUDANÇA DA BIOTA DE FILTROS DE POLIMENTO UTILIZADOS EM ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO PARA REMOÇÃO DE MICROCONTAMINANTES

Daniel Benjamin de Oliveira Dutra⁽¹⁾

Bacharel em Ciências Biológicas (UFMG), mestrando em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Lucas Vassalle de Castro⁽²⁾

Engenheiro ambiental. Doutorando em Engenharia Sanitária, Ambiental e Recursos Hídricos pela UFMG. Mestre em Engenharia Sanitária, Ambiental e Recursos Hídricos pela UFMG. Especialista em engenharia sanitária pela Universidade FUMEC, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Emanuela Silva Costa⁽³⁾

Bacharel em Ciências Biológicas pela UFMG.

Russel Davenport⁽⁴⁾

Professor na Universidade de Newcastle, Reino Unido. Doutor em Engenharia Ambiental e Mestre em Biotecnologia Industrial pela Universidade de Newcastle e Bacharel em Microbiologia pela Universidade de Leeds, Reino Unido.

Cesar Rossas Mota Filho⁽⁵⁾

Professor Adjunto do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG. Doutor em Engenharia Civil e Ambiental pela *North Carolina State University*, EUA. Mestre em Engenharia Civil e Ambiental pela *University of Nevada*, EUA.

Endereço⁽¹⁾: Rua Contria 1278, apto 402 – Grajaú – Belo Horizonte – MG – CEP: 30431-245 – Brasil – Tel (31) 99815-6200. E-mail: ddutra.bio@gmail.com

RESUMO

O presente estudo identificou os microrganismos presentes no biofilme formado em diferentes filtros de polimento construídos e instalados ao final de uma estação de tratamento de esgoto doméstico para remoção de microcontaminantes, cuja tecnologia utilizada é de lodos ativados convencional. As unidades que compuseram o sistema de polimento proposto foram quatro colunas de areia misturada a proporção de 90%:10% em volume com materiais adsorventes, sendo: coluna 1 - composta apenas por areia, coluna 2 – composta por areia e vermiculita, coluna 3 – composta por areia e carvão vegetal não ativado e coluna 4 – composta por areia e carvão vegetal ativado. Essas unidades foram operadas com taxa de aplicação hidráulica de 50 m³/m².dia. visando a remoção de Estrona, Estradiol e Etinilestradiol do efluente doméstico já tratado. Amostras das colunas foram retiradas sazonalmente da parte mais superficial da mesma, do meio e fundo para análises de citometria de fluxo e sequenciamento genético (Ion Torrent). Foi possível observar uma maior formação do biofilme nas amostras do topo das colunas e uma diferenciação entre a biota deste com as demais partes da coluna a nível de filo e gênero, corroborando com os resultados da remoção dos microcontaminantes. Porém, estatisticamente as diferenças não foram significativas entre os meios, tal como os índices de diversidade. A dominância de alguns grupos em cada estrato da coluna pode ser responsável pela diferença na altura do filtro, assim como a possível migração de espécies e condições do meio diferentes. Ademais, foi possível identificar grupos que podem estar relacionados com a degradação de microcontaminantes, fato este em investigação atualmente por outra pesquisa.

PALAVRAS-CHAVE: Biodegradação, Citometria de fluxo, Efluente Doméstico, Microcontaminantes, Sequenciamento Genético

INTRODUÇÃO

Com o aumento da utilização de fármacos, agentes de limpeza, pesticidas e alguns produtos de higiene pessoal, os microcontaminantes passaram a compor um preocupante grupo de contaminantes recalcitrantes presentes na natureza (FERNANDEZ *et al.*, 2007). Assim, essas substâncias passaram a ser um ponto de preocupação para as autoridades responsáveis por garantir a segurança sanitária da população e também se tornaram objeto de inúmeras pesquisas nos últimos anos. Esses compostos possuem inúmeras vias de entrada no ambiente, sendo uma das principais os lançamentos dos efluentes sanitários, mesmo que tratados em nível

secundário, uma vez que as estações de tratamento de esgoto não são projetadas para a remoção desse tipo de substância (KOLPIN *et al.*, 2002; NAKADA *et al.*, 2006; SNYDER *et al.*, 2003; TAN *et al.*, 2007).

Uma das maiores preocupações relacionadas aos microcontaminantes é a sua toxicidade, podendo produzir efeitos adversos em organismos expostos a concentrações extremamente baixas (LUO *et al.*, 2014). A ocorrência de microcontaminantes no ambiente aquático tem sido frequentemente associada ao aumento de incidência de câncer, desregulação endócrina e a resistência de microrganismos aos antibióticos (PRUDEN *et al.*, 2006; WHO, 2002).

As principais vias de degradação dos microcontaminantes são a fotodegradação, degradação biológica e sorção (adsorção ou absorção) (CIRJA *et al.*, 2008). Grande parte das vias citadas ocorre em estações de tratamento de esgoto (ETEs) para remoção de macro poluentes, assim, por muitas vezes, as ETEs acabam removendo parcialmente os microcontaminantes, mesmo quando os mesmos não são o foco do tratamento (LUO *et al.*, 2014). Entretanto, devido aos efeitos negativos supracitados, provocados pelos microcontaminantes, é necessário buscar um tratamento mais eficiente e de baixo custo, para viabilizar uma unidade com o intuito promover a remoção e/ou degradação desses poluentes com mais eficiência. Sendo assim, uma unidade de polimento que conjugue os efeitos favoráveis da utilização dos leitos bioativos e também de materiais adsorventes, se torna uma opção viável para o tratamento desse tipo de contaminante nos efluentes domésticos.

Para tanto, foi proposta uma unidade de polimento composta por filtro de areia misturada a pequenas quantidades de materiais adsorventes, como vermiculita, carvão vegetal e carvão ativado. Neste caso, a função da areia foi permitir o crescimento aderido de um biofilme rico em microrganismos, e a função dos materiais adsorventes foi promover a sorção dos microcontaminantes e aumentar a sua biodisponibilidade aos microrganismos que são capazes de degradá-los (PAREDES *et al.*, 2016).

Entretanto, para conseguir avaliar quais os mecanismos de remoção atuam no processo de tratamento da unidade proposta e quais variáveis o afetam, é necessário compreender a dinâmica de formação dos biofilmes no material filtrante proposto, assunto esse escasso na literatura. É importante ressaltar que a biologia molecular possui diversas ferramentas que auxiliam na identificação e interpretação dos organismos presentes no biofilme formado em filtros. Uma das metodologias utilizadas é a citometria de fluxo, que permite a separação, contagem e classificação de micropartículas (SHAPIRO, 2005), tal como as células do biofilme formado.

Além disso, utiliza-se também o sequenciamento genético, tornando possível a identificação exata de quais organismos estão presentes no meio filtrante. Dentre as metodologias utilizadas para o sequenciamento genético, para esta pesquisa utilizou-se o sequenciamento de nova geração, *Ion Torrent*, que permite a identificação das espécies presentes em uma amostra através de seu DNA ou RNA juntamente com uma prévia base de dados (LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION, 2011). Este método também permite a quantificação do material genético presente na amostra que é referente às espécies identificadas.

OBJETIVOS

O principal objetivo desse trabalho foi estudar a abundância e a dinâmica dos microrganismos existentes no biofilme formado em filtros utilizados para o polimento de efluente doméstico tratado em nível secundário, visando elucidar os mecanismos de remoção biológica de microcontaminantes nos sistemas de tratamento terciário.

METODOLOGIA

Filtros - A pesquisa foi desenvolvida em uma ETE projetada para tratar em final de plano, uma vazão de 4,5m³/s. A tecnologia utilizada por esta estação de tratamento é a de lodos ativados convencional.

Utilizou-se do efluente tratado por esta ETE como afluente de leitos filtrantes confeccionados em colunas de acrílico projetadas para remoção de microcontaminantes. Sendo assim, montou-se um aparato experimental, no final da referida estação de tratamento, desviando uma pequena parte da vazão do efluente tratado para alimentar as colunas. O desenho esquemático do aparato experimental está apresentado na Figura 1. O sistema

foi composto por uma bomba de esgoto, um pré-filtro de plástico, um reservatório de PVC de 1.000 litros, uma bomba peristáltica com saídas múltiplas e quatro colunas de acrílico, como pode ser visto nas Figuras 2, 3 e 4.

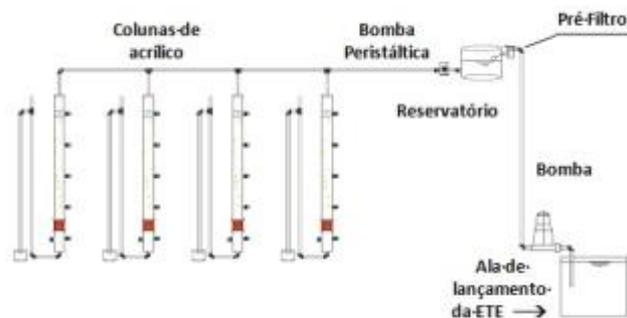


Figura 1 Desenho esquemático do aparato experimental



Figura 2 (A) Bomba de esgoto

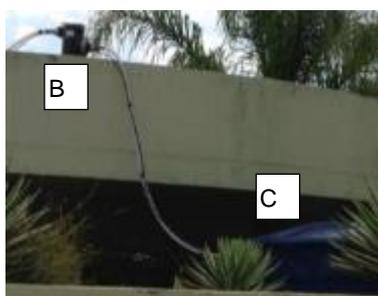


Figura 3 (B) Pré-Filtro e (C) Reservatório



Figura 4 (C) Reservatório, (D) bomba peristáltica e (E) colunas de acrílico

Cada uma das colunas foi preenchida com um meio filtrante diferente de mesma altura (40cm). Além disto, todos os meios filtrantes foram colocados sobre um meio suporte formado por camadas de brita nº1 e nº2, com 20 cm de altura, cada. A primeira coluna foi preenchida apenas com areia. Na segunda o preenchimento foi feito com uma mistura de areia com vermiculita na proporção de 90% : 10% em volume ocupado do material. A mesma proporção foi utilizada para a terceira e quarta colunas, que tiveram como enchimento areia + carvão vegetal e areia + carvão ativado granular. A proporção e metodologia foram adaptadas da literatura (ALVES, 2008), que apresenta a mistura de materiais à areia como uma forma de ganho na capacidade de remoção de alguns contaminantes.

Para a presente pesquisa, o sistema funcionou durante aproximadamente 3 meses com taxa de filtração de 50 m³/m².dia, o que corresponde a uma vazão de 0,24 L/min. Esta taxa de filtração foi escolhida para simulação de filtros de média taxa. É importante observar que, para o crescimento e estabilização do biofilme dentro das colunas, o sistema foi operado durante 15 dias ininterruptamente, antes de começar as amostragens de cada fase.

Para o bom funcionamento do aparato experimental foram estabelecidos procedimentos operacionais repetidos duas vezes por semana, a fim de melhorar a eficiência de tratamento e aumentar a vida útil do meio filtrante. Sendo assim, estabeleceu-se que em todo período experimental fosse dada descarga no fundo da caixa de 1.000 litros e feita a limpeza do pré-filtro instalado. Dessa forma foi possível minimizar o aporte de sólidos responsáveis por colmatar o meio filtrante.

Coletas das amostras - Para cada coluna foram coletadas amostras na superfície do filtro, no meio (a 10 cm da superfície) e na base (a 40 cm da superfície). Todas as amostras abrangeram um horizonte inteiro da coluna, desde a parte mais externa até a mais interna e foram colocadas em tubos falcon de 15 ml. Em cada

coleta, o material foi separado para as preparações para a citometria de fluxo e sequenciamento genético. Os filtros ficaram em operação por 15 dias antes do início do experimento, momento este da primeira coleta. As outras amostragens ocorreram após 15 e 30 dias em relação à primeira amostragem.

Citometria de fluxo - Conforme metodologia de coleta, amostras do biofilme das colunas foram extraídas e tratadas para posterior análise de citometria de fluxo na Universidade de Newcastle, na Inglaterra, no departamento de Engenharia Civil e Geociências.

Foi feita a fixação das células, adicionando a cada tubo falcon, aproximadamente 2 ml de solução 1% glutaraldeído em água deionizada e armazenadas por no máximo 3 dias em câmara fria, a aproximadamente 5 °C. Após o período de fixação, as amostras foram lavadas 3 vezes com solução tampão fosfato-salino (PBS) 1x. Em cada lavagem, foi adicionado aproximadamente 2 ml da solução e centrifugado a 4.000 rpm por 20 min. Após cada centrifugação, foi retirado com cuidado o sobrenadante. Após tais etapas, foi adicionado às amostras uma solução PBS 1X e etanol 50% em proporção 1:1 para conservação até a preparação para análise por citometria de fluxo utilizando SYBR Green.

A extração do biofilme foi feita por adição de um total de 150 ml de solução TWEEN 5% à cada amostra, em um ciclo com três etapas de sonicação por ultrassom. Para isso, foi adicionado 50 ml de TWEEN 5% a todo o meio filtrante coletado a cada ciclo e a solução foi submetida a ondas de ultrassom com uma amplitude de 43% e 2400J. O procedimento foi repetido mais duas vezes até atingir o volume total a ser adicionado. Após o procedimento as células que estavam aderidas ao meio passaram a estar presentes no meio aquoso.

Para análise de citometria de fluxo foi utilizado o equipamento FACScan™, juntamente com o *software* CellQuest. A janela de detecção foi definida para partículas de dimensões relativas a bactérias e, portanto, somente os eventos identificados dentro desta janela foram considerados. As amostras foram diluídas quando necessárias a 10, 50, 100, 200 ou 500 vezes e foram consideradas para os cálculos de concentração. Após a análise de citometria de fluxo, todas as amostras foram filtradas a vácuo para pesagem após retirada de toda água por secagem em mufla.

Sequenciamento genético (Ion Torrent) - Tal como as análises de citometria de fluxo, a extração do material genético, preparação do mesmo e sequenciamento (*Ion Torrent*) foram realizadas na Universidade de Newcastle, na Inglaterra, no Departamento de Engenharia Civil e Geociências. Sendo assim, essas amostras foram coletadas das colunas de polimento e armazenadas em freezer a -80°C até o momento de preparação para a análise.

Para extração do DNA / RNA foi utilizado o kit MP FAST DNA SPIN, de acordo com o protocolo de especificação do mesmo, para 0,4g de amostra e para melhor homogeneização da amostra com a matriz de lise, o equipamento FastPrep foi utilizado. A região de interesse foi a de 16S, uma vez que, ela faz parte de uma subunidade dos ribossomos procariotos e possui uma baixa taxa de mutação, sendo assim, bastante utilizada para estudos de filogenia e classificação de espécies (WOO *et al.*, 2008).

O sobrenadante final da extração foi armazenado e utilizado para amplificação do material genético extraído pela metodologia de polimerase de alta afinidade pela reação de PCR em termociclador, utilizando valores específicos para cada etapa, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 Valores para PCR no termociclador

	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	2 min	1
Desnaturação	95°C	30 seg	30
Anelamento	56°C	30 seg	
Extensão	72°C	45 seg	
Extensão final	72°C	7 min	1

As reações foram feitas em um volume de 25 µl, dos quais 0,5 µl dNTP, 2,5 µl buffer, 0,25 µl enzima, 20,25 µl de água deionizada, autoclavada e filtrada, 0,5 µl *primer* F, 0,5 *primer* R e 0,5 µl do material genético. Vale ressaltar que o *primer* F também continha o marcador molecular já previamente definido e que foi identificado durante o sequenciamento para a separação de todas amostras. Estes marcadores foram para fragmentos de 481 pb (V4f – V5r).

A eficiência da PCR foi confirmada por gel de agarose (2%) a 100V por 1 hora. As reações com resultado negativo foram refeitas e quando necessário, o material genético foi extraído novamente. A partir disso, os produtos da PCR foram purificados utilizando *AMPure XP Beads* com o objetivo de remover regiões de amplificação que não são de interesse e impurezas.

Os produtos de PCR já purificados foram quantificados no fluorômetro Qubit 2.0 para garantir a quantidade mínima necessária para o *Ion Torrent*. Portanto, para amostras com concentrações inferiores a 0,50 ng/ml os passos anteriores foram repetidos até atingir estas concentrações. Os casos em que mesmo após repetições não foi possível obter tal valor, foram descartadas para o sequenciamento genético.

Para o sequenciamento genético (*Ion Torrent*) foi feito um *pool* com todas amostras, de maneira a garantir uma concentração final de 500 pM em um volume de aproximadamente 40 µl, conforme orientação do equipamento. Posteriormente, as amostras sequenciadas foram tratadas e comparadas com o banco de dados para identificação da filogenia.

Nomeclatura - Para simplificar o entendimento das amostras, foi elaborado uma nomenclatura baseada no período de coleta, altura na coluna do filtro e o meio filtrante:

Nomeclatura = Meio, Altura da coluna, Período de coleta

Os meios variaram entre areia (A), areia + vermiculita (AV), areia + carvão ativado (ACA) e areia + carvão vegetal (ACV). As alturas podem ser no topo (T), meio da coluna (M) e base (B). Já o período de coleta foi início (I), metade do tempo de experimento (M) e final (F). Por exemplo, uma amostra coletada no topo do filtro de areia com vermiculita do final do experimento foi nomeada de acordo com o critério estabelecido como AVTF.

Análise estatística - Todos cálculos estatísticos, de diversidade e dominância foram feitos de acordo com os pré-requisitos dos mesmos (HAMMER, 2012) e pelo software *Past* versão 3.13 (HAMMER; HARPE; RYAN, 2001). Para investigação de diferenças significativas foi feito o teste de *Kruskal Wallis*, considerando como significativo os valores de $p < 0,05$, e para estes casos foi feito o teste *U de Mann-Whitney* para identificar entre quais amostras ocorre essa diferença.

APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS

Citometria de fluxo - Os resultados da citometria de fluxo estão apresentados na Figura 5 na unidade de bactérias por grama do meio filtrante. Para todos os filtros foi possível observar a variação do número de bactérias em cada altura da coluna do meio filtrante. No topo ocorreu um maior número de células em todas as unidades, porém para os meios com vermiculita e somente areia, ocorreu uma diminuição após a metade do experimento. Já no meio e fundo de cada filtro, ocorreram valores baixos quando comparados ao topo, sendo que somente na última amostragem foram detectados valores expressivos. Vale destacar que nessa fase, o meio composto por areia e vermiculita obteve valores mais elevados se comparados com os demais.

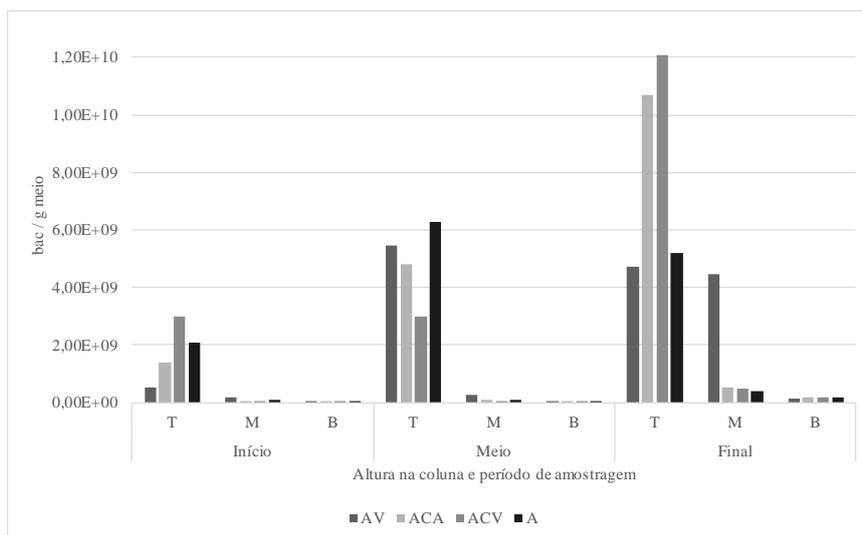


Figura 5 Resultados da análise de citometria de fluxo para cada altura na coluna dos filtros para as três amostragens

A alteração na quantidade de organismos ao longo do tempo e entre as diferentes alturas nos filtros é explicado pela migração, colonização (GUCHI, 2015; HARRIS et al., 1978) e competição. Os organismos começam colonizando a parte superior do filtro e, à medida que ocorre competição entre eles, as espécies mais bem adaptadas são encontradas em maior abundância. Além disso, ocorre migração de várias espécies em busca de novos nichos e menor competição por recurso. As condições em cada altura também são importantes na seleção das espécies, porém com o presente estudo não foi possível fazer tais avaliações. Já a composição do biofilme foi melhor avaliada a partir dos resultados obtidos pelo sequenciamento genético.

Ion Torrent - Algumas amostras não foram passíveis de serem sequenciadas, uma vez que mesmo após todo o processo de preparação das amostras, incluindo extração do material genético, PCR e purificação ainda permaneceram com concentração inferiores à exigida para o método de sequenciamento (0,50 ng/ml). Tal técnica exige a preparação de um *pool* de amostras com marcadores moleculares específicos e, a fim de se manter a qualidade dos resultados do *Ion Torrent*, foi decidido a exclusão das amostras em questão, sendo elas as da base e meio do filtro referentes a primeira e segunda coletas de todas as colunas. Tal fato corrobora com o resultado obtido pela citometria de fluxo, que também indicou quantidades baixas de bactéria por grama de meio para estes pontos.

No tratamento das sequências obtidas pelo sequenciamento por *Ion Torrent* em consulta ao banco de dados, foi possível identificar as espécies a partir de filo e em alguns casos, até gênero e espécie. Porém, devido ao elevado número de informação e ao objetivo de descrição, o presente trabalho focou nos filos e gêneros mais abundantes. Para o primeiro caso, os filos selecionados foram os com abundância relativa superior a 0,1%, enquanto ao nível de gênero, superior a 2%. Porém, para os cálculos estatísticos, de diversidade e dominância foram consideradas todas as espécies presentes sem nenhuma seleção (aproximadamente 3700 espécies). Além disso, algumas espécies de interesse também foram investigadas. Ao todo foram encontrados 51 filos e aproximadamente 1870 gêneros. Os resultados para os filos podem ser observados nas Figuras Figura 6, Figura 7, Figura 8 e Figura 9.

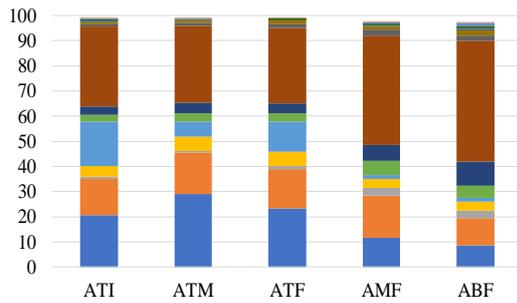


Figura 6 Abundância relativa dos filamentos em filtro de areia por amostragem e altura na coluna

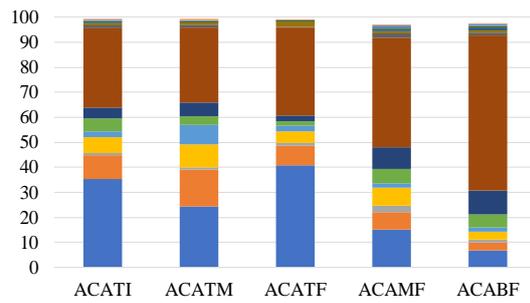


Figura 7 Abundância relativa dos filamentos em filtro de areia com carvão ativado por amostragem e altura na coluna

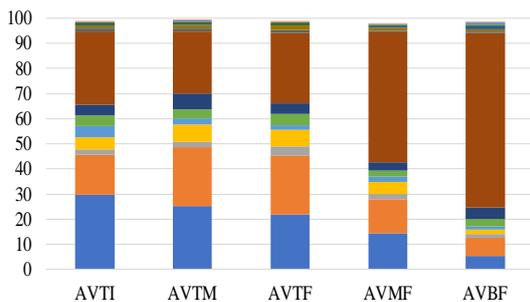


Figura 8 Abundância relativa dos filamentos em filtro de areia com vermiculita por amostragem e altura na coluna

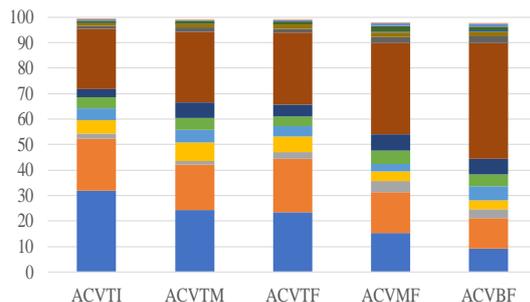
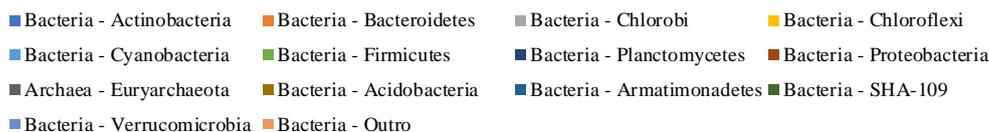


Figura 9 Abundância relativa dos filamentos em filtro de areia com carvão vegetal por amostragem e altura na coluna



Como é possível observar pelos gráficos, em todos os meios filtrantes, por mais que se tenha filtrados os filamentos com abundância relativa acima de 0,1 %, os 12 mais dominantes, juntamente com um não identificado abrangem quase a totalidade de todo o material genético encontrado nas amostras. Destacam-se, porém, os filamentos Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Proteobacteria e Chloroflexi. A alta abundância relativa dos dois primeiros filamentos corrobora o resultado de Wagner e Loy (2002) que obtiveram tais filamentos com maior ocorrência, a partir de sequenciamento genético a partir da região de 16S, em estações de tratamento de esgoto doméstico.

Entre todos os filamentos de bactéria, as Actinobacterias são o maior grupo taxonômico, distribuídas entre os ambientes aquático e terrestre. Também são encontradas como simbiontes em plantas, algumas patogênicas de animais e plantas, comensais gastrointestinais ou saprofíticas, principalmente os estreptomicetos. Em geral a temperatura ótima de crescimento é entre 25 e 30°C mas alguns indivíduos termofílicos crescem em temperaturas de 50 a 60°C (EDWARDS, 1993; KHAN; WILLIAMS, 1975; LUDWIG *et al.*, 2012). São procariontes com parede celular e em sua maioria quimioheterotróficas com diversas fontes nutricionais. Através de enzimas extracelulares podem degradar proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e polímeros de vegetais além de expressarem sua importância na ciclagem de carbono. A maioria das espécies é dependente de oxigênio (BARKA *et al.*, 2016; EDWARDS, 1993; ZIMMERMANN, 1990). Algumas actinobacterias se apresentam como potenciais organismos acumuladores de polifosfato (OAP) através da captação aeróbia de P após liberação em condição anaeróbia (SEVIOUR; MINO; ONUKI, 2003).

Este filamento foi um dos com maior abundância relativa nas camadas do topo dos filtros, o que pode ser explicado por várias espécies serem dependentes de oxigênio, porém não foi possível confirmar a condição aeróbia neste

estrato. Uma outra explicação para a elevada ocorrência é que a ETE em questão se utiliza de tratamento do esgoto por meio de lodos ativados com chicanas no início do reator. Esta conformação pode criar condições anóxicas ou anaeróbias antes da parte aerada do mesmo, o que favoreceria o metabolismo de bactérias acumuladoras de fósforo.

Já o filo Bacteroidetes foi encontrado no topo de todos os filtros e teve uma abundância relativa com valores relevantes nos demais estratos. Este grupo está presente nos mais diversos meios aquáticos, composto por organismos quimiorganotróficos e várias espécies são capazes de degradar polímeros como celulose, quitina e pectina (STEVENS et al., 2005). Ademais, são capazes de degradar carboidratos e se adaptam bem a condições aeróbias (MA et al., 2013; MENG; HE, 2015), o que pode explicar a maior abundância nos topos dos filtros, tal como o que foi obtido por Choi, Kim e Ahn (2017), que observaram uma redução desse filo com a redução dos níveis de oxigênio em lodo adensado.

As cianobactérias são amplamente dispersas, o filo existe a mais de 2,5 bilhões de anos e compreende inúmeros possíveis nichos em todo o planeta (MOREIRA; VASCONCELOS; ANTUNES, 2013). Composto por mais de 1000 espécies distribuídas em cerca de 150 gêneros o subgrupo é considerado um dos maiores entre os procariotos gram-negativos (STANIER et al., 1979). O filo é caracterizado por bactérias fotossintetizantes que apresentam clorofila a (WOESE, 1987). Singh e Olsen (2011) indicam que possuem alta taxa de crescimento. Adicionalmente, devido a uma incrível capacidade de bioacumulação e bioissorção podem ser aplicadas na fitoremediação para remoção de dióxido de carbono do ar e nutrientes e xenobióticos do esgoto (OLGUÍN; SÁNCHEZ-GALVÁN, 2012). Outro estudo de remediação de águas residuais foi feito por Chinnasamy et al. (2010) onde o consórcio das espécies de cianobactérias *Anabaena* e *Limnothrix* e algumas algas verdes demonstraram uma redução de cerca de 99% de N-nitrato, 100% de N-amônia e 75% de F-fosfato. PAHs, PHBs, fenóis e pesticidas são outros poluentes orgânicos que podem ser reduzidos pelo consórcio de cianobactérias e microalgas. (SUBASHCHANDRABOSE et al., 2013). A importância de cianobactérias filamentosas foi descrita também com papel na degradação de matéria orgânica e inorgânica de resíduos sólidos e líquidos de agroindústrias (ANDRADE; COSTA, 2007; MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011; PHANG et al., 2000).

Vale ainda destacar que como já descrito anteriormente, as cianobactérias desenvolveram exclusivamente a capacidade de gerenciar o uso da nitrogenase, essencialmente anaeróbia, e a produção de oxigênio como subproduto da fotossíntese. Sendo o único organismo diazotrófico capaz de realizar fotossíntese oxigenada, assumindo papel destaque como fixadoras de nitrogênio no meio aquático (BERMAN-FRANK; LUNDGREN; FALKOWSKI, 2003). Devido a versatilidade em seu metabolismo foi possível encontrar espécies desse filo ao longo de todas as colunas e em todos os meios.

Proteobacteria foi muito encontrado nas amostras da metade e fundo das colunas. Tal filo compreende a maioria das bactérias gram negativas (GUPTA, 2000) e antigamente eram conhecidas como purpuras (WOESE, 1987), porém, a atividade fotossintética propiciadora da coloração púrpura se restringe a apenas alguns organismos do filo (GUPTA, 2000). De maneira geral, possuem características fenotípicas e fisiológicas complexas incluindo bactérias de metabolismo fototrófico, heterotrófico ou quimioheterotrófico. Ademais, as proteobactérias exercem papel fundamental nesse caso sendo o filo que compreende quase a totalidade das bactérias nitrato-oxidantes (NOB) (SOROKIN et al., 2012). As proteobactérias compõem grande maioria na comunidade bacteriana de amostras de esgoto chegando a compor até 81% das amostras de sequenciamento genético de fases aeróbias e anaeróbias do tratamento (WANG, ZHIPING et al., 2015; ZHANG; SHAO; YE, 2012). Essa característica tem sido demonstrada consensualmente em vários estudos com lodos ativados ou reatores de biofilme. (MA et al., 2013; MCLELLAN et al., 2010; MIURA et al., 2007), o que justificaria a elevada abundância relativa desses microrganismos em todas as amostras de todos os filtros, porém não é possível explicar a dominância no meio e fundo dos filtros.

CHOI, KIM e AHN (2017) identificaram que as proteobactérias foram mais abundantes na camada externa da torta do lodo (27%), do que na região interna (21%). Isto indica que os microrganismos presentes no meio podem influenciar a colonização das diversas regiões. No presente estudo foi possível observar que somente a partir de um tempo (na última amostragem) foi possível sequenciar e identificar nas camadas do meio e fundo das colunas, indicando assim a possibilidade de uma migração das espécies e de diferentes condições em cada estrato dos filtros.

Organismos do filo Chloroflexi foram encontrados com abundância relativa considerável em todos os filtros, mesmo não sendo o mais dominante, foram mais presentes no topo e metade da coluna. Este filo já foi conhecido como o das bactérias “verdes não-sulfurosas” e abrange organismos com metabolismo fotoautotróficos (Chloroflexales), heterotróficos (Herpetosiphonales) e quimioheterotróficos termofílicos (Thermomicrobia) (BVI, 2001; HUGENHOLTZ; GOEBEL; PACE, 1998). Posteriormente foram adicionados os Dehalococcoidetes (redutores anaeróbios deshalogênicos de hidrocarbonetos clorados) e Anaerolineae e Caldilineae identificadas em sistemas de tratamento de águas residuais e ambientes aeróbios ou anóxicos (YABE *et al.*, 2010; YAMADA *et al.*, 2006; YAMADA; SEKIGUCHI, 2009). Existem algumas espécies capazes de oxidar sulfetos com fixação de dióxido de carbono (fotoheterotrófico) (MADIGAN; BROCK, 1977), outras de metabolismo autotrófico que usam o hidrogênio como aceptor final de elétrons (HOLO; SIREVÅG, 1986).

Concordando com estudos prévios (SNAIDR *et al.*, 1997; XIA, SIQING *et al.*, 2010), o pirosequenciamento feito por Zhang, Shao, & Ye, 2012 demonstrou que o filo Chloroflexi compunha apenas 3,4% das bactérias encontradas em 14 estações de tratamento por lodos ativados. Além disso, os Chloroflexi se apresentam de forma essencial para o processo com reatores de membrana submersa (MBR) e são o terceiro filo de maior dominância em lodos granulares desidratados (Miura *et al.*, 2007).

Quando consideradas todas espécies pelo meio, sem distinção da altura na coluna, não houve diferença significativa entre todos eles (H Chi² 0,4617 e p=0,5105). O mesmo ocorreu na comparação dos topos entre os meios filtrantes (H Chi² 1,619 e p=0,5365) e entre os topos do mesmo meio filtrante ao longo das amostragens: areia (H Chi² 0,09994 e p=0,7319), areia com vermiculita (H Chi² 0,4621 e p=0,2483), areia com carvão ativado (H Chi² 1,689 e p=0,2235) e areia com carvão vegetal (H Chi² 1,209 e p=0,3514).

Ademais, quando comparadas às amostras da base (H Chi² 1,316 e p=0,1016) e do meio (H Chi² 1,47 e p=0,05293) da coluna entre os meios, também não houve diferença significativa. Porém nota-se que para as do meio, o valor de p foi muito próximo ao valor limite.

Uma vez que as amostras da base e meio das colunas para todos os meios não foram passíveis de sequenciamento durante a primeira e segunda amostragem, os resultados obtidos nestas alturas ao final do experimento indicam a migração e colonização das espécies (GUCCI, 2015) e um ambiente diferente entre as estratificações ao longo da coluna (HARRIS *et al.*, 1978). Portanto, cada filtro foi analisado separadamente, utilizando apenas os dados da última coleta de todas as alturas.

A coluna preenchida com areia e vermiculita foi a única que não apresentou diferença significativa entre as alturas na coluna (H Chi² 0,6194 e p=0,1788), enquanto para os outros meios ocorreu o contrário: areia (H Chi² 2,748 e p=0,000905), areia com carvão ativado (H Chi² 6,412 e p=0,005587) e areia com carvão vegetal (H Chi² 8,496 e p=0,001444). O teste *U de Mann-Whitney* mostrou que na areia o topo apresentou aspecto diferente da base (0,0003205) e da metade da coluna (0,003874). O mesmo aconteceu para areia com carvão ativado (base - 0,002546, metade - 0,009961). Enquanto para areia com carvão vegetal, o topo se diferenciou apenas da base (0,0005145), porém a metade também se mostrou diferente da base (0,01198).

Os índices de diversidade e dominância auxiliam na compreensão e confirmação da não ocorrência de uma variação sazonal em uma mesma altura e da existência de uma diferença na estratificação ao longo da coluna. Tais resultados encontram-se nas Figuras Figura 10, Figura 11, Figura 12 e Figura 13.

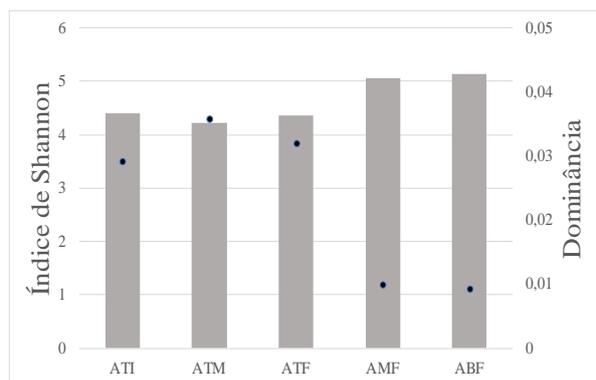


Figura 10 Índice de diversidade e dominância de espécies em filtro de areia

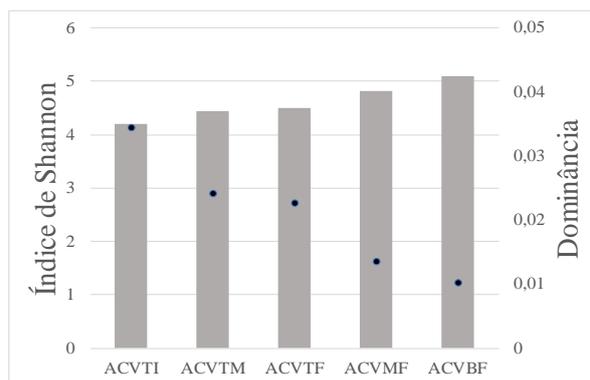


Figura 11 Índice de diversidade e dominância de espécies em filtro de areia com carvão vegetal

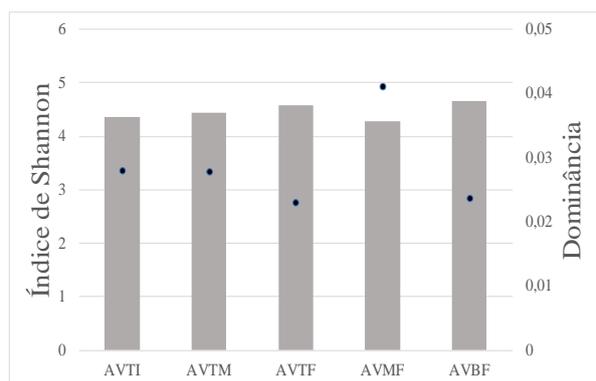


Figura 12 Índice de diversidade e dominância de espécies em filtro de areia com vermiculita

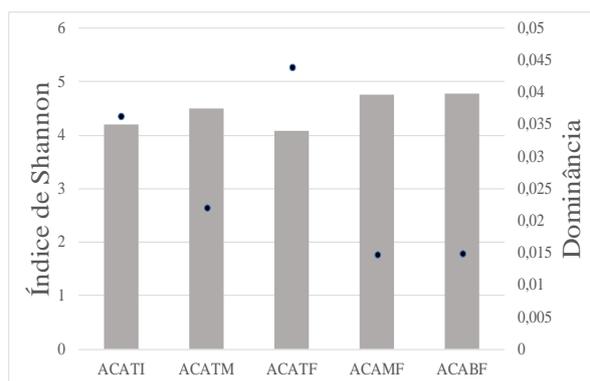


Figura 13 Índice de diversidade e dominância de espécies em filtro de areia com carvão ativado

■ Índice de diversidade de Shannon ● Dominância

A diversidade observada foi semelhante em todos os filtros, o que não ocorreu com a dominância das espécies. Em todos os meios, com exceção de areia com vermiculita, observou uma menor dominância nas amostras do final para a base e metade da coluna. Esta dominância de espécies pode explicar a diferença significativa entre as partes da coluna e conseqüentemente indicar a estratificação do biofilme formado.

Devido ao grande número de gêneros encontrados, estes foram filtrados a aqueles com abundância relativa maior que 2% e comparados entre os meios filtrantes afim de identificar possibilidade de seleção das espécies (Figura 14). É possível observar uma alta abundância relativa em todos os meios da Actinobacteria da família Intrasporangiaceae de gênero *Janibacter*. Tal gênero já foi encontrado em estações de tratamento de esgoto (MARTIN *et al.*, 1997) e a pesquisa de Kong, Nielsen, & Nielsen (2005) demonstrou a atividade OAP em sistemas de remoção biológica de fosforo em grande escala e a identificação dos organismos apresentou uma alta relação próxima com gêneros da família Intrasporangiaceae. (NGUYEN *et al.*, 2011).

O mesmo ocorreu para Bacteroidetes da família Saprospiraceae, exceto para areia com carvão ativado. A filogenia dessa família foi baseada na região 16S e isoladas desde ambientes marinhos e de água doce, mas também de estações de tratamento de lodos ativados. Alguns membros estão associados a degradação de orgânicos complexos no meio ambiente. Eles se encontram em grande número nas águas residuais onde desempenham um papel importante (ALBERS; SIEBERS, 2014)(MUNOZ; ROSSELLÓ-MÓRA; AMANN, 2016). São colonizadores de bactérias filamentosas nos lodos ativados, onde apresentam capacidade de realizar e hidrólises de proteína e utilizar aminoácidos como fontes de carbono, não estando envolvidos na desnitrificação. (XIA, YUN *et al.*, 2008). Em todos também foi expressiva a abundância relativa de outra Actinobacteria da família Norcadiaaceae de gênero *Gordonia*.

Vale ressaltar a elevada abundância relativa no meio de areia, que não foi observado nos demais, de duas Cianobactérias, da família *Planktothrix* e outra do gênero *Chlorella*, mais especificamente *C. vulgaris* e de uma Proteobactéria da família Xanthomonadaceae do gênero *Thermomonas*.

O gênero *Planktothrix* pertence à família Phormidiaceae na ordem Oscillatoria, comumente encontradas em águas eutrofizadas, grande maioria autotrófica com alguns heterotróficos facultativos. Pode ocorrer fixação de nitrogênio em ambiente anóxico ou com ausência de luz (Silva-Benavides & Torzillo, 2012). Algumas espécies podem produzir hepatotoxinas, conhecidas como microcistinas (MOREIRA; VASCONCELOS; ANTUNES, 2013). A utilização da associação de *Planktothrix sp* com *Chlorella sp* foi a solução encontrada por Silva-Benavides & Torzillo, (2012) para alcançar uma taxa de remoção de nitrogênio de até 80% com retenção de 85% do CO₂ como biomassa.

O gênero *Chlorella* se mostrou polifilético e faltam variações morfológicas significantes (HUSS; SOGIN, 1990). Vale ressaltar que, de acordo com o banco de dados utilizados, esta espécie foi enquadrada como cianobactéria, porém, de acordo com Guiry e Guiry (2017) ela se encaixa como Eucarioto do Reino Plantae, esta classificação pode ser devido a genes parecidos, íntrons. O seu uso inicialmente para tratamento de efluentes a nível terciário foi ampliado para substituição de lodos ativados com boa viabilidade econômica (CAI; PARK; LI, 2013; GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2016). A remoção no nitrogênio acontece tanto pela assimilação de nitrato e amônia quanto pelo escape deste último, dado à elevação do pH. Já a remoção de fósforo acontece pela bioassimilação adsorção e precipitação, essa última, devido à elevação nos níveis de OD e pH. (ASLAN; KAPDAN, 2006; WANG, MENG *et al.*, 2014). Espécies de *Chlorella* são amplamente utilizadas para tais estudos de remoção de nutrientes (GONZFILEZ, 1997; LEE; LEE, 2001; MCGRIFF; Y, 1972). *Chlorella sp.* demonstraram altas eficiências de remoção de nitrogênio, fósforo e carbono (WANG, LIANG *et al.*, 2010).

A espécie *Chlorella vulgaris* alcançou uma remoção de DBO de 98% e entre 50-90% aproximadamente de N e P com menos de cinco dias de retenção em efluentes de suinocultura (FALLOWFIELD; GARRETT, 1985). O consorcio de *C. vulgaris* com outras espécies também já foi estudado e apresentou potencial redução no tempo para atingir os padrões de lançamento no corpo d'água receptor (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2016; MCGRIFF; Y, 1972).

As espécies do gênero *Thermomonas* são aeróbias, porém podem usar N como aceptor final de elétrons na ausência de O₂ (BUSSE; KA, 2017) (MERGAERT; CNOCKAERT; SWINGS, 2003). Nos estudos de Mergaert et al. 2003 espécies de *Thermomonas* realizaram desnitrificação e temperaturas entre 28C e 35C e não cresceram em substratos orgânicos como glicose, maltose e N-acetilglicosamina. Elas também demonstraram ter importante papel em reatores combinados de micro-eletrólise e desnitrificação autotrófica (CEAD) compondo mas de 20% da microbiota dos sistemas (XING *et al.*, 2016). Organismos da família Xanthomonadaceae, principalmente do gênero *Thermomonas* apresentam características genéticas especiais que lhes concedem um potencial inerente de decomposição de cianetos, o que justifica sua dominância na comunidade microbiana encontrada em análises taxonômicas das fases aeróbias e anaeróbias no esgoto de indústrias de coque (WANG, ZHIPING *et al.*, 2015).

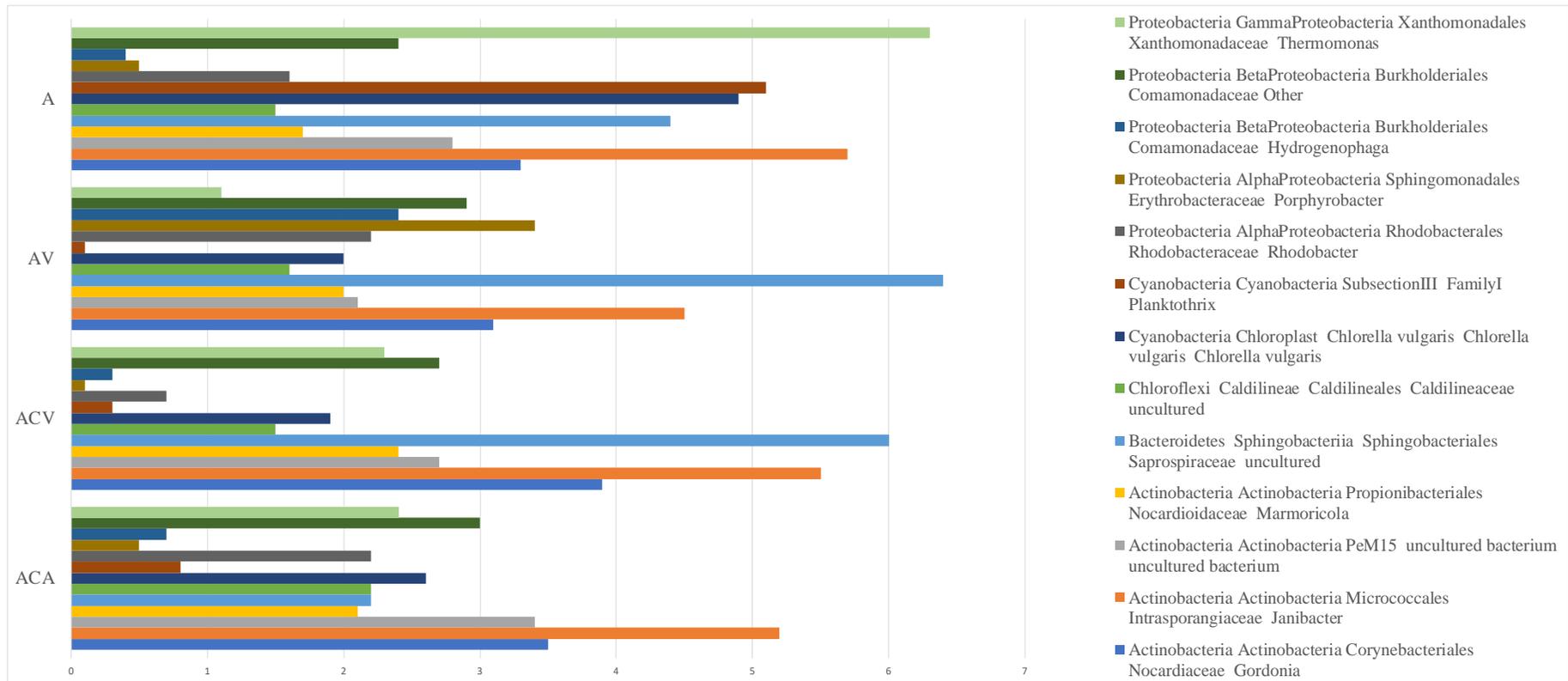


Figura 14 Principais gêneros encontrados em cada meio filtrante

Remoção dos microcontaminantes e a relação com a biota encontrada - Os compostos alvos da pesquisa de remoção de microcontaminantes foram: Estrona (E1); 17 β -estradiol (E2); 17 α -etinilestradiol (EE2). Os resultados mostraram uma elevada eficiência na remoção desses estrogênios nas colunas de polimento propostas, independentemente do meio filtrante testado. As Figuras 15,16, 17, 18,19 e 20 mostram as concentrações médias de entrada desses microcontaminantes nas colunas de polimento e a capacidade de remoção no tratamento proposto.

A Figura 15 mostra as concentrações de Estrona, em ng/L, encontradas para o afluente e efluente do sistema de polimento. A Figura 16 mostra o nível de remoção desse DE para os eventos em que houve detecção no afluente do sistema.

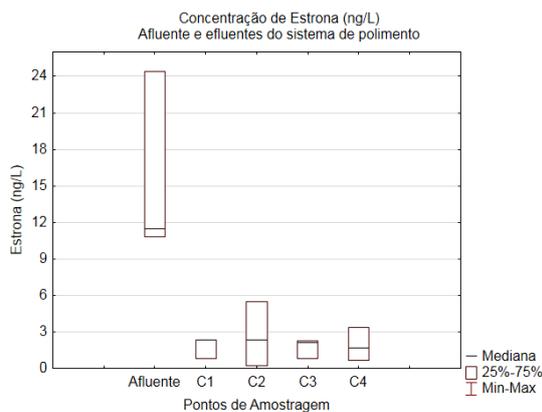


Figura 15 Concentração de E1 para o afluente e efluente do sistema de polimento

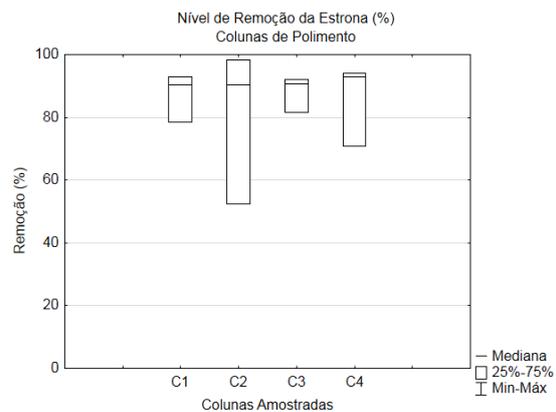


Figura 16 Nível de remoção do E1 no sistema de polimento

Para a coluna 1 (Areia) foi observada um valor mediano de remoção de Estrona equivalente a 87%, a coluna 2 (Areia+vermiculita) apresentou uma mediana de remoção de 80% enquanto as colunas 3 (Areia + Carvão vegetal não ativado) e 4 (Areia + Carvão vegetal ativado) apresentaram de 88% e 86% de eficiência de remoção (em termos medianos), respectivamente.

O alto nível de remoção da Estrona nas colunas de polimento, pode ser explicado pela biodegradação desse composto nas colunas. A estrona possui logKd igual a 2,9 indicando alta tendência do contaminante a estar adsorvido nos sólidos provenientes do tratamento. Aliado a isso, esse composto possui logKbio maior que 100, o que indica que essa substância possui grande potencial para remoção por biodegradação. Ao se adsorver nos sólidos o E1 se torna biodisponível para degradação biológica nas colunas de polimento.

De acordo com Joss *et al.* (2006) compostos com Kbio > 10 possuem remoção biológica acima de 90 %, o que se confirma ao analisarmos o comportamento da Estrona no sistema de polimento proposto. Corroborando com a hipótese de biodegradação desse DE a confirmação da presença das bactérias *Leptothrix discophora*, *P. putida*, *Rhodococcus equi*, *Rhodococcus erythropolis*, que de acordo com Sabirova *et al.*, (2008) estão relacionadas com a degradação da estrona.

Para o Estradiol, as Figuras 17 e 18 mostram as concentrações desse composto, em ng/L, encontradas para o afluente e efluente do sistema de polimento instalado ao final da ETE e o nível de remoção desse DE para os eventos em que houve detecção no afluente do sistema respectivamente.

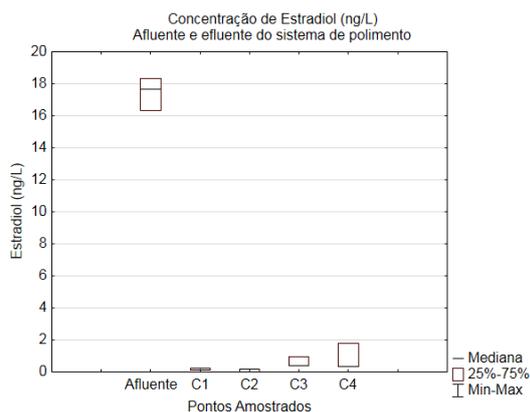


Figura 17 Concentração de E2 para o afluente e efluente do sistema de polimento

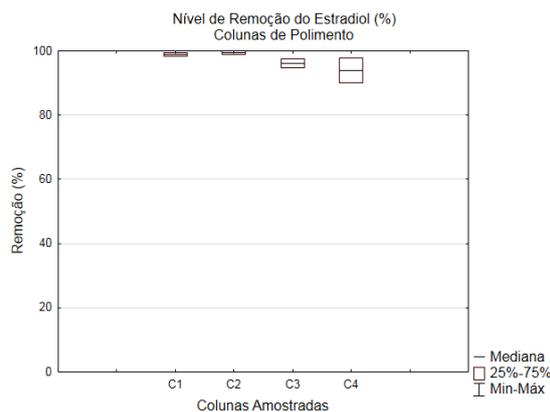


Figura 18 Nível de remoção do E2 no sistema de polimento

Neste caso, a coluna 1, apresentou um valor mediano de 99% de remoção do Estradiol presente no afluente do sistema (efluente da ETE analisada), a coluna 2 mediana de remoção de 99% enquanto as colunas 3 e 4 apresentaram medianas de remoção de 97% e 95% respectivamente. Assim como a Estrona, o Estradiol possui características de substância com elevada biodegradabilidade, o que explica o alto nível de remoção desse composto nas colunas de polimento testadas. Os materiais adsorventes fazem com que o E2 se mantenha biodisponível para ser biodegradado dentro do sistema (NAKADA *et al.*, 2006). Corroborando com a hipótese de biodegradação desse DE a confirmação da presença das bactérias *Leptothrix discophora*, *P. putida*, *Rhodococcus equi*, *Rhodococcus erythropolis*, que de acordo com Sabirova *et al.* (2008) e Forrez *et al.* (2009) estão relacionadas com a degradação do estradiol.

Para o Etinilestradiol foram construídos os mesmos gráficos apresentados para os demais estrogênios, representados nas Figuras 19 e 20. Observa-se que a coluna 1 apresentou uma mediana de remoção de 99% de remoção do Estradiol presente no afluente do sistema (efluente da ETE analisada), a coluna 2 apresentou uma mediana de remoção de 98% enquanto as colunas 3 e 4 apresentaram mediana de 97% e 98% respectivamente.

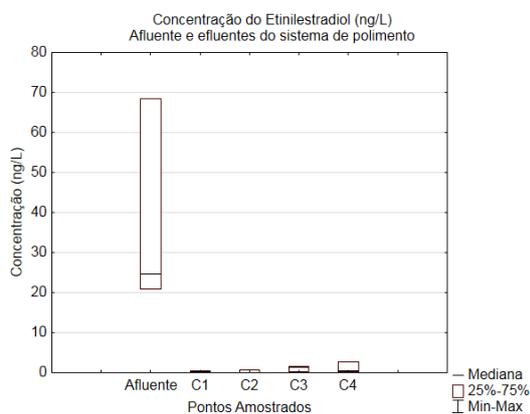


Figura 19 Concentração de EE2 para o afluente e efluente do sistema de polimento

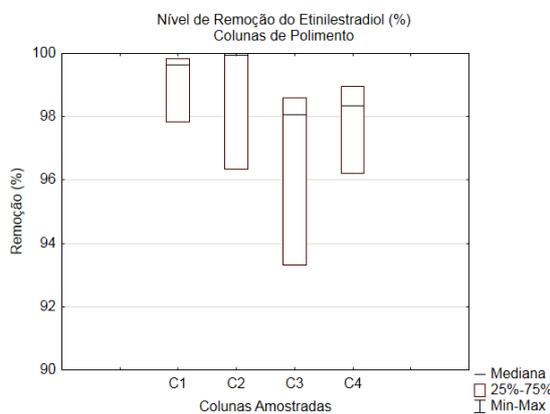


Figura 20 Nível de remoção do EE2 no sistema de polimento

Observa-se um comportamento muito semelhante entre os três estrogênios apresentados ao serem submetidos a uma unidade de polimento que conjuga sorção e biodegradação para promover o tratamento de microcontaminantes. Isso ocorre, pois, a conformação molecular e propriedades químicas deles são similares. Segundo Tadkaew *et al.*, (2011) a composição de uma determinada substância está relacionada às taxas de degradação dessa em um dado sistema, é o que ocorre no caso dos estrogênios avaliados nesse trabalho. Os três possuem estruturação semelhante que os conferem com característica de possuir elevada degradação na unidade de polimento proposta. Aliado a isso foram encontrados nos três casos biofilme formado na unidade

com a presença das bactérias *Leptothrix discophora*, *P. putida*, *Rhodococcus equi*, *Rhodococcus erythropolis*, que de acordo com Sabirova *et al.* (2008) e Forrez *et al.* (2009) estão relacionadas com a degradação dos estrogênios.

A Tabela 2 resume as espécies encontradas nos meios filtrantes das colunas assim como o nível de remoção dos microcontaminantes estudados nesse trabalho. É importante salientar que o nível de remoção encontrado está relacionado à biodegradação e a sorção, mecanismos presentes na unidade de polimento proposta. Não foi objeto desse estudo quantificar a parcela dos microcontaminantes removidos por sorção ou biodegradação.

Tabela 2 Remoção dos microcontaminantes e espécies relacionadas encontradas

Média de remoção do microcontaminante nas unidades de polimento	Coluna de polimento	Média de remoção	Espécies encontradas relacionadas à biodegradação	Referência
Estrona - E1	C1 - Areia	87	<i>Leptothrix discophora</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. putida</i> <i>MnB6</i> , <i>Rhodococcus equi</i> e <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Sabirova <i>et al.</i> (2008) e Forrez <i>et al.</i> (2009)
Estradiol - E2		99		
Etinilestradiol - EE2		99		
Estrona - E1	C2 – Areia + Vermiculita	80		
Estradiol - E2		99		
Etinilestradiol - EE2		98		
Estrona - E1	C3 – Areia + Carvão Vegetal não Ativo	88		
Estradiol - E2		97		
Etinilestradiol - EE2		97		
Estrona - E1	C4 – Areia + Carvão Vegetal Ativo	86		
Estradiol - E2		95		
Etinilestradiol - EE2		98		

CONCLUSÕES / RECOMENDAÇÕES

O presente trabalho visou contribuir para o conhecimento e caracterização do biofilme formado em filtros de polimento para remoção de microcontaminantes em estações de tratamento de esgoto doméstico, assunto esse escasso na literatura pertinente. Este é o primeiro passo para a investigação da remoção de tais contaminantes, se ocorre por meio físico (sorção no meio) ou por degradação biológica. A comparação entre dados físicos com as espécies encontradas dará um melhor entendimento acerca do assunto, pesquisa essa que, já se encontra em andamento.

Foi possível observar que ocorre uma estratificação do biofilme em diferentes alturas dos filtros e que uma vez as condições e a microbiota estabilizadas, ocorre pouca variação dos mesmos, caso não haja uma perturbação. Grande parte dessa diferença pode ser explicada pela dominância de alguns grupos em cada estrato. É de

importância que se investigue quais condições seriam essas, afim de se entender os processos biológicos que ocorrem, a seleção de espécies e consequentemente, otimizar o processo de remoção.

Ademais, é possível concluir, a partir dos resultados apresentados que as colunas foram eficientes para a remoção dos três estrogênios avaliados, independentemente do meio filtrante utilizado para o tratamento. Observou-se estruturação química semelhante entre os compostos avaliados, o que justifica a equidade de comportamento desses no sistema de polimento proposto para esse trabalho. Tal semelhança também foi observada pela análise estatística a partir dos dados de espécies encontradas.

Além disso, as três substâncias apresentam $\log K_{ow} > 3,0$ o que lhes conferem a característica de serem lipofílicas e possuem tendência moderada de estarem absorvidas nas matrizes sólidas. Outro fator importante é o $\log K_d > 2,7$ para os três compostos. Esse fator demonstra alta tendência do contaminante para a adsorção no lodo da ETE. Com essas características o contaminante se torna biodisponível para degradação biológica, que ocorre devido à uma terceira particularidade dos estrogênios de possuírem o $K_{bio} > 10$ o que caracteriza um grande potencial para remoção por biodegradação em determinadas unidades.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio e financiamento por parte do Governo do Reino Unido, através do *Foreign & Commonwealth Office* e da Embaixada Britânica no Brasil, à COPASA-MG e a Universidade de Newcastle pela parceria no desenvolvimento do trabalho, à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais) e ao Programa de Pós-Graduação em Saneamento Meio Ambiente e Recursos Hídricos (SMARH-UFMG) pelo apoio no desenvolvimento deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBERS, Sonja Verena; SIEBERS, Bettina. *The family sulfolobaceae*. [S.l.: s.n.], 2014. v. 9783642389.
2. ALVES, Dilson Neander Botelho. *Remoção de Ferro em água de irrigação através de filtragem em areia e zeólita*. 2008. 129 f. Universidade Federal de Lavras, MG, 2008.
3. ANDRADE, Michele R.; COSTA, Jorge A.V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*, v. 264, n. 1, p. 130–134, 2007.
4. ASLAN, Sebnem; KAPDAN, Ilgi Karapinar. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. v. 8, p. 64–70, 2006.
5. BACTERIA, Oxygenic Photosynthetic. Phylum BX . Cyanobacteria. [S.d.].
6. BARKA, Essaid Ait *et al.* Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 80, n. 1, p. 1–43, 2016.
7. BERMAN-FRANK, Ilana; LUNDGREN, Pernilla; FALKOWSKI, Paul. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Research in Microbiology*, v. 154, n. 3, p. 157–164, 2003.
8. BUSSE, H; KA, P. *Thermomonas haemolytica* gen . nov ., sp . nov ., a γ -proteobacterium from kaolin slurry. n. 2002, p. 473–483, 2017.
9. BVI, Garrity G M Holt J G Phylum. *Chloroflexi phy nov In Garrity GM Boone DR Castenholz RW eds Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. . [S.l.]: Springer, New York. , 2001
10. CAI, Ting; PARK, Stephen Y; LI, Yebo. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae : Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 19, p. 360–369, 2013.
11. CHINNASAMY, Senthil *et al.* Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 9, p. 3097–3105, 2010.
12. CHOI, Jeongdong; KIM, Eun Sik; AHN, Youngho. Microbial community analysis of bulk sludge/cake layers and biofouling-causing microbial consortia in a full-scale aerobic membrane bioreactor. *Bioresource Technology*, v. 227, p. 133–141, 2017.
13. CIRJA, Magdalena *et al.* Factors affecting the removal of organic micropollutants from wastewater in conventional treatment plants (CTP) and membrane bioreactors (MBR). *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 7, n. 1, p. 61–78, 27 jan. 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11157-007-9121-8>>.
14. EDWARDS, C. Reviews in Biotechnology Isolation Properties and Potential Applications of Thermophilic Actinomycetes. *Applied Biochemistry and Biochnology*, v. 42, p. 161–174, 1993.
15. FALLOWFIELD, H J; GARRETT, M K. The Photosynthetic Treatment of Pig Slurry in Temperate

- Climatic Conditions : A Pilot-Plant Study. v. 12, p. 111–136, 1985.
16. FORREZ, Ilse *et al.* Influence of manganese and ammonium oxidation on the removal of 17 α -ethinylestradiol (EE2). *Water Research*, v. 43, n. 1, p. 77–86, 2009.
 17. GONÇALVES, Ana L.; PIRES, José C.M.; SIMÕES, Manuel. Wastewater polishing by consortia of *Chlorella vulgaris* and activated sludge native bacteria. *Journal of Cleaner Production*, v. 133, p. 348–357, 2016.
 18. GONZFILEZ, Luz Estela. EFFICIENCY OF AMMONIA AND PHOSPHORUS REMOVAL FROM A COLOMBIAN AGROINDUSTRIAL WASTEWATER BY THE MICROALGAE *CHLORELLA VULGARIS* AND *SCENEDESMUS DIMORPHUS*. v. 60, p. 259–262, 1997.
 19. GUCHI, Ephrem. Review on Slow Sand Filtration in Removing Microbial Contamination and Particles from Drinking Water. *American Journal of Food and Nutrition*, v. 3, n. 2, p. 47–55, 2015.
 20. GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. *AlgaeBase. World-wide electronic publication*. Disponível em: <http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=27676>. Acesso em: 4 jun. 2017.
 21. GUPTA, Radhey S. The phylogeny of proteobacteria: Relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 24, n. 4, p. 367–402, 2000.
 22. HAMMER, Øyvind. *Manual de Referência Past version 2.16*. Oslo: [s.n.], 2012.
 23. HAMMER, Øyvind; HARPE, R.A.T. David; RYAN, Paul D. PAST: PALEONTOLOGICAL STATISTICS SOFTWARE PACKAGE FOR EDUCATION AND DATA ANALYSIS. *Palaeontologia Electronica*, v. 4, n. 1, p. 99, 15 set. 2001. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>.
 24. HARRIS, S *et al.* SEPARATION OF ALGAL CELLS FROM WASTEWATER LAGOON EFFLUENTS. VOLUME I: INTERMITTENT SAND FILTRATION TO UPGRADE WASTE STABILIZATION LAGOON EFFLUENT. Ohio: [s.n.], 1978. Disponível em: <https://play.google.com/store/books/details?id=_gwp3KwDfU8C&rdid=book-_gwp3KwDfU8C&rdot=1>.
 25. HOLO, Helge; SIREVÅG, Reidum. Autotrophic growth and CO₂ fixation of *Chloroflexus aurantiacus*. *Archives of microbiology*, v. 145, n. 2, p. 173–180, 1986.
 26. HUGENHOLTZ, P; GOEBEL, B M; PACE, N R. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, v. v, n. 18, p. 180p4765-4774, 1998.
 27. HUSS, V A R; SOGIN, M L. Phylogenetic Position of Some *Chlorella* Species within the Chlorococcales Based upon Complete Small-Subunit Ribosomal RNA Sequences. p. 432–442, 1990.
 28. JOSS, Adriano *et al.* Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. *Water Research*, v. 40, n. 8, p. 1686–1696, maio 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135406001126>>.
 29. KHAN, M. R.; WILLIAMS, S. T. Studies on the ecology of actinomycetes in soil - VIII. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 7, n. 1971, p. 345–348, 1975.
 30. KOLPIN, Dana *et al.* Pharmaceuticals , Hormones , and Other Organic Wastewater Contaminants in U . S . Streams , 1999-2000 : A National Reconnaissance. *Journal of Environmental Science and Technology*, v. 36, n. 6, p. 1202–1211, 2002.
 31. KONG, Yunhong; NIELSEN, Jeppe Lund; NIELSEN, Per Halkjær. Identity and ecophysiology of uncultured actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 7, p. 4076–4085, 2005.
 32. LEE, Kwangyong; LEE, Choul-gyun. Effect of Light / dark Cycles on Wastewater Treatments by Microalgae Cell Growth under Different Light Conditions. p. 194–199, 2001.
 33. LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION. *Ion Torrent: The Chip is the Machine*. EUA: [s.n.], 2011.
 34. LUDWIG, Wolfgang *et al.* Road map of the phylum Actinobacteria. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, n. 2001, p. 1–28, 2012.
 35. LUO, Yunlong *et al.* A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of The Total Environment*, v. 473–474, p. 619–641, mar. 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969713015465>>.
 36. MA, Zhun *et al.* Effect of temperature variation on membrane fouling and microbial community structure in membrane bioreactor. *Bioresour. Technol.*, v. 133, p. 462–468, 2013.
 37. MADIGAN, M T; BROCK, T D. CO₂ fixation in photosynthetically-grown *Celroroflexus aurantiacus*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 1, n. 5, p. 301–304, 1977.
 38. MARKOU, Giorgos; GEORGAKAKIS, Dimitris. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*, v. 88, n. 10, p. 3389–3401, 2011.
 39. MARTIN, K. *et al.* *Janibacter limosus* gen. nov., sp. nov., a New Actinomycete with meso-

- Diaminopimelic Acid in the Cell Wall. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 47, n. 2, p. 529–534, abr. 1997. Disponível em: <<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-47-2-529>>.
40. MCGRIFF, E Corbin; Y, Ross E Mckinn. T H E R E M O V A L O F N U T R I E N T S A N D O R G A N I C S B Y A C T I V A T E D A L G A E and. v. 6, p. 1155–1164, 1972.
 41. MCLELLAN, S L *et al.* Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in wastewater treatment plant influent. *Environmental microbiology*, v. 12, n. 2, p. 378–392, 2010.
 42. MENG, Fangang; HE, Xiang. Effects of naturally occurring grit on the reactor performance and microbial community structure of membrane bioreactors. *Journal of Membrane Science*, v. 496, p. 284–292, 2015.
 43. MERGAERT, Joris; CNOCKAERT, Margo C.; SWINGS, Jean. *Thermomonas fusca* sp. nov. and *Thermomonas brevis* sp. nov., two mesophilic species isolated from a denitrification reactor with poly(E-caprolactone) plastic granules as fixed bed, and emended description of the genus *Thermomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, n. 6, p. 1961–1966, 2003.
 44. MIURA, Yuki *et al.* Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: relationship between community stability and reactor performance. *Water Research*, v. 41, n. 3, p. 627–637, 2007.
 45. MOREIRA, Cristiana; VASCONCELOS, Vitor; ANTUNES, Agostinho. Phylogeny and Biogeography of Cyanobacteria and Their Produced Toxins. *Marine Drugs*, v. 11, n. 11, p. 4350–4369, nov. 2013.
 46. MUNOZ, Raul; ROSSELLÓ-MÓRA, Ramon; AMANN, Rudolf. Revised phylogeny of Bacteroidetes and proposal of sixteen new taxa and two new combinations including *Rhodothermaeota* phyl. nov. *Systematic and applied microbiology*, v. 39, n. 5, p. 281–96, jul. 2016.
 47. NAKADA, Norihide *et al.* Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Research*, v. 40, n. 17, p. 3297–3303, out. 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135406003952>>.
 48. NGUYEN, Hien Thi Thu *et al.* High diversity and abundance of putative polyphosphate-accumulating Tetrasphaera-related bacteria in activated sludge systems. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 76, n. 2, p. 256–267, 2011.
 49. OLGUÍN, Eugenia J.; SÁNCHEZ-GALVÁN, Gloria. Heavy metal removal in phytofiltration and phycoremediation: The need to differentiate between bioadsorption and bioaccumulation. *New Biotechnology*, v. 30, n. 1, p. 3–8, 2012.
 50. PAREDES, L. *et al.* Understanding the fate of organic micropollutants in sand and granular activated carbon biofiltration systems. *Science of The Total Environment*, v. 551–552, p. 640–648, maio 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969716302194>>.
 51. PHANG, S M *et al.* Spirulina cultivation in digested sago starch factory wastewater. *Journal of Applied Phycology*, v. 12, n. 3, p. 395–400, 2000.
 52. PRUDEN, Amy *et al.* Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. *Environmental science & technology*, v. 40, n. 23, p. 7445–50, 1 dez. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17181002>>.
 53. SABIROVA, Julia S *et al.* Manganese-oxidizing bacteria mediate the degradation of 17 a - ethinylestradiol. *Microbial biotechnology*, v. 1, n. 6, p. 507–512, 2008.
 54. SEVIOUR, Robert J.; MINO, Takashi; ONUKI, Motoharu. The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 27, n. 1, p. 99–127, 2003.
 55. SHAPIRO, Howard M. Using Flow Cytometers: Applications, Extensions, and Alternatives. *Practical Flow Cytometry*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2005. p. 443–542. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/0471722731.ch10>>.
 56. SILVA-BENAVIDES, Ana Margarita; TORZILLO, Giuseppe. Nitrogen and phosphorus removal through laboratory batch cultures of microalga *Chlorella vulgaris* and cyanobacterium *Planktothrix isothrix* grown as monoalgal and as co-cultures. *Journal of Applied Phycology*, v. 24, n. 2, p. 267–276, 2012.
 57. SINGH, Anoop; OLSEN, Stig Irving. A critical review of biochemical conversion, sustainability and life cycle assessment of algal biofuels. *Applied Energy*, v. 88, n. 10, p. 3548–3555, 2011.
 58. SNAIDR, Jiri *et al.* Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 7, p. 2884–2896, 1997.
 59. SNYDER, Shane A. *et al.* Pharmaceuticals, Personal Care Products, and Endocrine Disruptors in Water: Implications for the Water Industry. *Environmental Engineering Science*, v. 20, n. 5, p. 449–469, set. 2003. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/109287503768335931>>.
 60. SOROKIN, Dmitry Y *et al.* Nitrification expanded: discovery, physiology and genomics of a nitrite-oxidizing bacterium from the phylum Chloroflexi. *The ISME journal*, v. 6, n. 12, p. 2245–2256, 2012.
 61. STANIER, Roger Y. *et al.* Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Microbiology*, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1979.

62. STEVENS, Heike *et al.* Phylogeny of Proteobacteria and Bacteroidetes from oxic habitats of a tidal flat ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 54, n. 3, p. 351–365, nov. 2005.
63. SUBASHCHANDRABOSE, Suresh R. *et al.* Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation. *Environment International*, v. 51, p. 59–72, 2013.
64. TADKAEW, Nichanan *et al.* Removal of trace organics by MBR treatment: The role of molecular properties. *Water Research*, v. 45, n. 8, p. 2439–2451, 2011.
65. TAN, Benjamin L.L. *et al.* Modelling of the fate of selected endocrine disruptors in a municipal wastewater treatment plant in South East Queensland, Australia. *Chemosphere*, v. 69, n. 4, p. 644–654, set. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004565350700313X>>.
66. WAGNER, Michael; LOY, Alexander. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, n. 3, p. 218–227, jun. 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166902003154>>.
67. WANG, Liang *et al.* Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 162, n. 4, p. 1174–1186, 2010.
68. WANG, Meng *et al.* Kinetics of nutrient removal and expression of extracellular polymeric substances of the microalgae, *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp., in wastewater treatment. *Bioresource Technology*, v. 154, p. 131–137, 2014.
69. WANG, Zhiping *et al.* Deciphering Cyanide-Degrading Potential of Bacterial Community Associated with the Coking Wastewater Treatment Plant with a Novel Draft Genome. *Microbial Ecology*, v. 70, n. 3, p. 701–709, 2015.
70. WHO. *International Programme on Chemical Safety. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors.* . Geneve, Suíça: [s.n.], 2002.
71. WOESE, C R. Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, v. 51, n. 2, p. 221–71, 1987.
72. WOO, P.C.Y. *et al.* Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 14, n. 10, p. 908–934, out. 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x>>.
73. XIA, Siqing *et al.* Bacterial community structure in geographically distributed biological wastewater treatment reactors. *Environmental science & technology*, v. 44, n. 19, p. 7391–7396, 2010.
74. XIA, Yun *et al.* Identification and ecophysiological characterization of epiphytic protein-hydrolyzing Saprospiraceae (“*Candidatus epiflobacter*” spp.) in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 7, p. 2229–2238, 2008.
75. XING, Wei *et al.* Nitrate removal and microbial analysis by combined micro-electrolysis and autotrophic denitrification. *Bioresource Technology*, v. 211, p. 240–247, 2016.
76. YABE, Shuhei *et al.* *Thermosporothrix hazakensis* gen. nov., sp. nov., isolated from compost, description of *Thermosporotrichaceae* fam. nov. within the class *Ktedonobacteria* Cavaletti *et al.* 2007 and emended description of the class *Ktedonobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 60, n. 8, p. 1794–1801, 2010.
77. YAMADA, Takeshi *et al.* *Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* classis nov. and *Caldilineae* classis nov. in the . *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, n. 6, p. 1331–1340, 2006.
78. YAMADA, Takeshi; SEKIGUCHI, Yuji. Cultivation of Uncultured Chloroflexi Subphyla: Significance and Ecophysiology of Formerly Uncultured Chloroflexi “Subphylum I” with Natural and Biotechnological Relevance. *Microbes and Environments*, v. 24, n. 3, p. 205–216, 2009.
79. ZHANG, Tong; SHAO, Ming-Fei; YE, Lin. 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *The ISME Journal*, v. 6, n. 6, p. 1137–1147, 2012.
80. ZIMMERMANN, W. Degradation of lignin by bacteria. *Journal of Biotechnology*, v. 13, n. 2–3, p. 119–130, 1990.