

DIEGO DIAS FASSARELA MARQUIOLI

**ANALISE METAGENOMICA DA COMUNIDADE DE BACTERIA E ARCHAEA
DO ESGOTO BRUTO, DE REATORES UASB E DOS EFLUENTES DAS
ETAPAS DE PÓS-TRATAMENTO DA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE
ESGOTO - ARRUDAS, BELO HORIZONTE-MG**

Belo Horizonte

2017

Diego Dias Fassarela Marquioli

Análise metagenômica da comunidade de Bacteria e Archaea do esgoto bruto, de reatores UASB e dos efluentes das etapas de pós-tratamento da estação de tratamento de esgoto Arrudas, Belo Horizonte-MG

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Luiz de Macêdo Farias

Co-orientadora: Paula Prazeres Magalhães

Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas
UFMG

Belo Horizonte

2017

COLABORAÇÃO

Andréa Maria Amaral Nascimento
Laboratório de Genética de Microrganismos
Departamento de Biologia Geral/ICB/UFMG

Luciano dos Santos Rodrigues
Laboratório de Saneamento
Escola de Veterinária/UFMG

Anna Gabriella Guimarães Oliveira
Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios
Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG

APOIO FINANCEIRO

CNPq
FAPEMIG
CAPES
PRPq/UFMG

À Mãe Natureza.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ailton e Jacira, que com amor, me concederam a vida e se empenharam, sem medir esforços, para me educar e fornecer todo apoio necessário nesta vida, sobretudo durante a realização deste trabalho.

À Vanessa Marquioli, minha irmã, que me impulsiona, veementemente, desde o início de minha vida acadêmica e ainda persiste nesta ideia até hoje. Obrigado!

Aos meus familiares que me apoiaram e enviaram energias positivas. Em especial, à minha amada avó Maria Dias (*in memorian*) que, em vida, sempre se preocupou com minha formação.

À Carolina Rosa, namorada que entrou na minha vida trazendo amor, carinho, companheirismo e engrandecendo minha caminhada. Sua presença me fez sentir ainda mais forte!

Aos meus amigos que sempre estiveram comigo, pela compreensão de minha ausência em momentos importantes, pelos conselhos, por terem, simplesmente, me colocado para cima quando perceberam a necessidade.

Aos meus orientadores, professores Luiz e Paula, que desde o início de minha trajetória como estagiário de iniciação científica, sempre me inspiraram pela competência, inteligência e honestidade. Sou muito grato por terem acreditado no meu potencial para desenvolver este trabalho. A confiança, o respeito, a inteligência e o carinho com que nos orienta são indispensáveis.

Ao professor Luciano Rodrigues, pela disponibilidade na colaboração e pelas valiosas contribuições nas análises físico-químicas.

À professora Andrea Nascimento, pela colaboração nesta pesquisa, sobretudo por ter disponibilizado equipamentos de seu laboratório para a realização de alguns experimentos.

À Marcela Dias, pelas valiosas contribuições na bioinformática.

Aos professores e estudantes da “família MOA”: companheirismo, apoio, conhecimento, estímulo, mensagens positivas, etc.. Em especial à “equipe metagenômica” (André Leal, Anna Gabriella e João Fernando), juntos fomos mais fortes em todos os momentos, sobretudo na coleta de esgoto.

À Anna Gabriella por toda colaboração. Desde o início estive comigo, compartilhando seu conhecimento, me auxiliando nas tomadas de decisões difíceis, etc.. Sua contribuição foi primordial!

Aos diretores das escolas onde atuo profissionalmente, que se mostraram compreensíveis em momentos delicados e por sempre terem me incentivado durante o mestrado.

Aos colegas professores e demais funcionários, pelas conversas inspiradoras ou pelo simples bom dia.

Aos meus alunos, minha evolução pessoal e profissional certamente tem muita influência de vocês, afinal, a sala de aula é um espaço de mútuo aprendizado. Vocês me ajudaram a superar muitos desafios, só por existirem!

Ao Rafael Mangerotti, biólogo e grande amigo que me apresentou o laboratório de microbiologia, onde me encontrei.

À Carolina Vallef, que me ensinou o “be-a-bá” da rotina do laboratório e me fez despertar ainda mais a aptidão para a pesquisa.

Ao Senhor Raimundo do Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG-COPASA, pelos ensinamentos transmitidos e pelas prosas que aliviaram o cansaço nos dias de coleta de esgoto.

Á todos que, direta ou indiretamente, participaram da minha caminhada por esses dois anos de evolução pessoal e profissional.

“Hágua

O seco deserto está tomando conta do planeta

A água doce, bebível, potável, está acabando

Poluição, devastação, queimadas

Desequilíbrio mental

Desequilíbrio do meio ambiente

Segundo as previsões dos cientistas

De padres, pastores e budistas

De ciganos, pais de santo e hare krishnas

O tempo vai secar e o sol vai carcomer

Água pra beber não vai ter

Água pra lavar não vai dar

Água pra benzer, água pra nadar

Nada, nada”

Seu Jorge, Gabriel Moura e Jovi Joviano

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE QUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 ÁGUA E RECURSOS HÍDRICOS	19
1.1.1 ÁGUA NO MUNDO	19
1.1.2 ÁGUA NO BRASIL	21
1.2 POLUIÇÃO DAS ÁGUAS	21
1.3 SANEAMENTO BÁSICO	22
1.4 ESGOTO	24
1.4.1 CONCEITO	24
1.4.2 CARACTERÍSTICAS DO ESGOTO	24
1.4.3 PARÂMETROS DO ESGOTO	25
1.4.3.1 PARÂMETROS FÍSICOS	25
1.4.3.2 PARÂMETROS QUÍMICOS	26
1.4.3.3 PARÂMETROS BIOLÓGICOS	29
1.5 ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO	29
1.6 ETE ARRUDAS	32
1.7 REATOR UASB	34
1.8 ETAPAS DE PÓS-TRATAMENTO	38
1.8.1 FILTRO BIOLÓGICO PERCOLADOR (FBP)	38
1.8.2 LAGOA DE POLIMENTO EM SÉRIE	38
1.8.3 LAGOA DE POLIMENTO COM FILTRO GROSSEIRO	39

1.8.4	LEITO SUBMERGIDO DE FLUXO HORIZONTAL (WETLANDS)	39
1.9	DIGESTÃO ANAERÓBIA DE EFLUENTES	40
1.10	DOMÍNIO ARCHAEA	42
1.11	ESTUDOS DA COMPOSIÇÃO DE COMUNIDADES MICROBIANAS	44
1.12	METAGENÔMICA	45
1.13	CRONÔMETRO EVOLUTIVO	47
1.14	TECNOLOGIAS PARA O SEQUENCIAMENTO DE DNA	48
2	JUSTIFICATIVA	50
3	OBJETIVOS	51
3.1	OBJETIVO GERAL	51
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4	MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1	ÁREA DE ESTUDO	52
4.2	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	53
4.3	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA	56
4.4	EXTRAÇÃO DO DNA	56
4.5	ANÁLISE DA COMUNIDADE DE BACTERIA E ARCHAEA	57
4.6	ANÁLISE DE DADOS	58
5	RESULTADOS	60
5.1	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA.	60
5.2	DADOS GERAIS DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS.	60
5.3	ANÁLISE DA COMUNIDADE DE BACTERIA E ARCHAEA.	60
5.4	COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE BACTERIA E ARCHAEA EM DIFERENTES PONTOS DE REATORES UASB.	72
5.5	INVESTIGAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE NA COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE DE BACTERIA E ARCHAEA EM REATORES UASB E SISTEMAS DE PÓS-TRATAMENTO.	80

5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DIFERENTES SISTEMAS DE TRATAMENTO DE ESGOTO EM BACTÉRIAS POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS EM ROTA DE TRANSMISSÃO FECAL-ORAL.	80
6 DISCUSSÃO	83
7 SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES	97
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultado das análises físico-químicas das amostras coletadas no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG/COPASA, Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Arrudas.	61
Tabela 2	Quantidade de sequências brutas e processadas (Mothur) a partir das amostras coletadas no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG/COPASA, Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Arrudas.	63
Tabela 3	OTUs com abundância relativa superior a 1% em todos os pontos de coleta no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG/COPASA, Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Arrudas.	65
Tabela 4	Alfa diversidade das amostras coletadas no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG/COPASA, Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Arrudas, avaliada pelos índices de riqueza (ACE e Chao1) e diversidade (Shannon e Simpson).	68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Níveis de tratamento de esgoto e seus objetivos.	30
Quadro 2	Quadro comparativo entre os domínios Bacteria e Archaea.	42
Quadro 3	Principais características e condições operacionais dos reatores UASB em escala de demonstração localizados no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento UFMG/COPASA, instalado na Estação de Tratamento de Esgotos Arrudas.	53
Quadro 4	Descrição das amostras estudadas.	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição do total de água (a) e água doce (b) na Terra.	18
Figura 2	Distribuição típica dos sólidos com base em suas características.	25
Figura 3	Estação de tratamento de esgoto típica e simplificada.	28
Figura 4	Desenho esquemático de um reator UASB.	34
Figura 5	Etapas de pós-tratamento do CePTS (a) FBP aberto; (b) FBP acoplado (*) e cilíndrico (#); (c) Lagoa de polimento em série – sem chicanas (#) e com chicanas (*); (d) Lagoa de polimento com filtro grosseiro; (e) <i>Wetlands</i> – WHP (#) e WHNP.	37
Figura 6	Digestão anaeróbia em reator UASB.	39
Figura 7	Fluxograma dos sistemas de tratamento em escala de demonstração localizados no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento UFMG/COPASA, instalado na Estação de Tratamento de Esgotos Arrudas, com os pontos de amostragem.	51
Figura 8	Abundância relativa dos domínios Bacteria e Archaea das amostras coletadas no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG/COPASA, Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Arrudas.	63
Figura 9	Distribuição dos filos de Bacteria e Archaea detectados com maior abundância relativa em cada amostra coletada no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG/COPASA, Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Arrudas.	65
Figura 10	Distribuição dos gêneros de Bacteria e Archaea detectados com maior abundância relativa em cada amostra coletada no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG/COPASA, Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Arrudas.	66

Figura 11	Alfa diversidade das amostras coletadas no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG/COPASA, Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Arrudas, avaliada pelos índices de diversidade (Shannon e Simpson) e de riqueza (ACE e Chao1).	68
Figura 12	Beta diversidade - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada em UniFrac.	70
Figura 13	Composição dos 10 filós mais abundantes das amostras da porção inferior (UASB_B) de cada reator e em cada período de coleta.	71
Figura 14	Composição dos 10 filós mais abundantes das amostras da porção intermediária (UASB_M) de cada reator e em cada período de coleta.	72
Figura 15	Composição dos 10 filós mais abundantes das amostras da porção superior (UASB_A) de cada reator e em cada período de coleta.	72
Figura 16	Composição das 10 classes mais abundantes das amostras da porção inferior (UASB_B) de cada reator e em cada período de coleta.	73
Figura 17	Composição das 10 classes mais abundantes das amostras da porção intermediária (UASB_M) de cada reator e em cada período de coleta.	74
Figura 18	Composição das 10 classes mais abundantes das amostras da porção superior (UASB_A) de cada reator e em cada período de coleta.	74
Figura 19	Composição dos gêneros com abundância relativa média igual ou maior que 1% da porção inferior (UASB_B) de cada reator e em cada período de coleta.	75
Figura 20	Composição dos gêneros com abundância relativa média igual ou maior que 1% da porção inferior (UASB_M) de cada reator e em cada período de coleta.	76

- Figura 21** Composição dos gêneros com abundância relativa média igual ou maior que 1% da porção inferior (UASB_A) de cada reator e em cada período de coleta. 77
- Figura 22** Abundância relativa de gêneros bacterianos potencialmente patogênicos e com rota de transmissão fecal-oral: (a) *Arcobacter*, (b) *Aeromonas*, (c) *Enterococcus* e (d) *Escherichia-Shigella*. 80

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACE: Abundance Coverage Estimator
APHA: American Public Health Association
AWWA: American Water Works Association
ANA: Agência Nacional de Águas
ANOVA: Testes estatísticos para analisar diferenças significativas entre os índices de diversidade - dados com distribuição normal
CBH: Comitê de Bacia Hidrográfica
CePTS: Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento
ChIP-Seq: Combining chromatin immunoprecipitation-assays with sequencing
COPASA: Companhia de Saneamento de Minas Gerais
COT: Carbônico Orgânico Total
DBOt: Demanda Bioquímica de Oxigênio Total
DBOu: Demanda Última de Oxigênio
DQO: Demanda Química de Oxigênio
DQOt: Demanda Química de Oxigênio total
DNA: ácido desoxirribonucléico
EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ETE: Estação de Tratamento de Esgoto
FBP: Filtro Biológico Percolador
FG: Filtro Grosseiro
FP: Filtro de Pedra
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGAM: Instituto Mineiro de Gestão das Águas
INMET: Instituto Nacional de Meteorologia
LP: Lagoa de Polimento
MMA: Ministério do Meio Ambiente
OD: Oxigênio Dissolvido
OTU: Unidade Taxonômica Operacional
PCoA: Análise de Coordenadas Principais
pH: potencial Hidrogeniônico

PT: Fósforo Total

qPCR: Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction

RAFA: Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente em Manta de Lodo

rDNA: DNA ribossomal

rDNAs: plural de rDNA

ReCESA: Rede Nacional de Extensão e Capacitação Tecnológica em Saneamento Ambiental

RNA: ácido ribonucléico

SBS: *Sequencing by Synthesis*

SCBH: Subcomitê de Bacia Hidrográfica

SD: Sólidos Dissolvidos

SF: Sólidos Fixos

SNIS: Sistema Nacional de Informações sobre o Saneamento

SOLiD: *Sequencing by Oligo Ligation Detection*

SS: Sólidos Suspensos

SSF: Sólidos Suspensos Fixos

SST: Sólidos Suspensos Totais

SSV: Sólidos Suspensos Voláteis

ST: Sólidos Totais

STF: Sólidos Totais Fixos

STV: Sólidos Totais Voláteis

SV: Sólidos Voláteis

TDH: tempo de detenção hidráulica.

UASB: *Upflow Anerobic Sludge Blanket*

UASB_A: Porção interna superior do reator UASB

UASB_B: Porção interna inferior do reator UASB

UASB_M: Porção interna intermediária do reator UASB

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UniFrac: Distance Metric Used for Comparing Biological Communities

WHNP: *Wetlands* não-plantada

WHP: *Wetlands* plantada

RESUMO

A utilização da água doce requer cuidados, tanto para sua obtenção como para seu descarte. O aumento da geração de esgoto, principalmente nos centros urbanos, requer a implantação de sistemas que impeçam a disseminação de doenças. As estações de tratamento de esgoto (ETEs) aceleram a depuração do esgoto e os reatores UASB apresentam vantagens para as regiões tropicais. No entanto, ainda são necessários sistemas de pós-tratamento para que o efluente possa, com segurança, ser dirigido aos corpos hídricos receptores. O desconhecimento da dinâmica das comunidades de Bacteria e Archaea, responsáveis pelo metabolismo da matéria orgânica nestes reatores e nas etapas de pós-tratamento e possíveis contaminantes presentes no esgoto, motivou a realização desse estudo. Quarenta amostras de efluentes foram coletadas, em dois períodos sazonais, em pontos estratégicos dos sistemas de tratamento de esgoto em escala de demonstração da ETE Arrudas (BH/MG). Sequenciamento de nova geração da região V4 do rDNA 16S foi empregado e as sequências foram comparadas com o banco de dados Silva v.123, utilizando o programa Mothur. Após agrupamento em unidades taxonômicas operacionais, considerando 97% de similaridade genética, os dados foram processados (programa R). A abundância relativa de Archaea decresceu à medida que o efluente ascendeu nos reatores, enquanto Bacteria predominou nas comunidades analisadas. Proteobacteria (43%), Bacteroidetes (15%), Firmicutes (13%) e Euryarchaeota (6%) foram os filos mais abundantes. Apenas associação entre nitrato e diversidade (Shannon) foi observada. Entre os patógenos de transmissão fecal-oral, destacou-se *Arcobacter*. Resultados preocupantes relativos à eficiência dos sistemas de tratamento de esgoto avaliados foram obtidos.

Palavras-chave: reator UASB, metagenômica, sequenciamento de rDNA 16S, tratamento de esgoto.

ABSTRACT

The water is obtained for human use mainly from rivers and lakes, and after this returns polluted to receptor water bodies becoming a potential source of pathogens. With the increase of population density in urban centers, measures to optimize the sewage treatment have become a priority. Wastewater treatment plants (WWTPs) accelerate the clearance of sewage and UASB reactors are regarded as adequate presenting low cost and easy operation. However post-treatment systems are still required in order to safely direct the effluent to receptor water bodies. The dynamics of bacterial communities responsible for metabolizing organic matter inside these reactors are poorly understood. This study aimed to analyze the profile of the bacterial community associated with sewage before and after treatment using metagenomics. Forty effluent samples were collected at strategic locations of demonstration scale sewage treatment systems of the Arrudas WWTP, BH/MG. New generation sequencing based on hypervariable regions of 16S rDNA was used and the evaluation of microbial communities was conducted through comparison with the Silva v.123 database by employing the MOTHUR software. After grouping as operational taxonomic units (97% similarity) data was processed (R software). The relative abundance of Archaea diminished in the superior portions of UASB reactors and Bacteria prevailed in all analyzed communities. Proteobacteria (43%), Bacteroidetes (15%), Firmicutes (13%), and Euryarchaeota (6%) were the most abundant phyla. Only association was between nitrate and diversity (Shannon) was detected. Among fecal-oral transmissible pathogens *Arcobacter* should be highlighted. Our data raised some concern regarding the efficacy of the wastewater treatments evaluated.

Keywords: UASB reactor, metagenomics, 16S rDNA sequencing, wastewater treatment.

1 INTRODUÇÃO

5 1.1 ÁGUA E RECURSOS HÍDRICOS

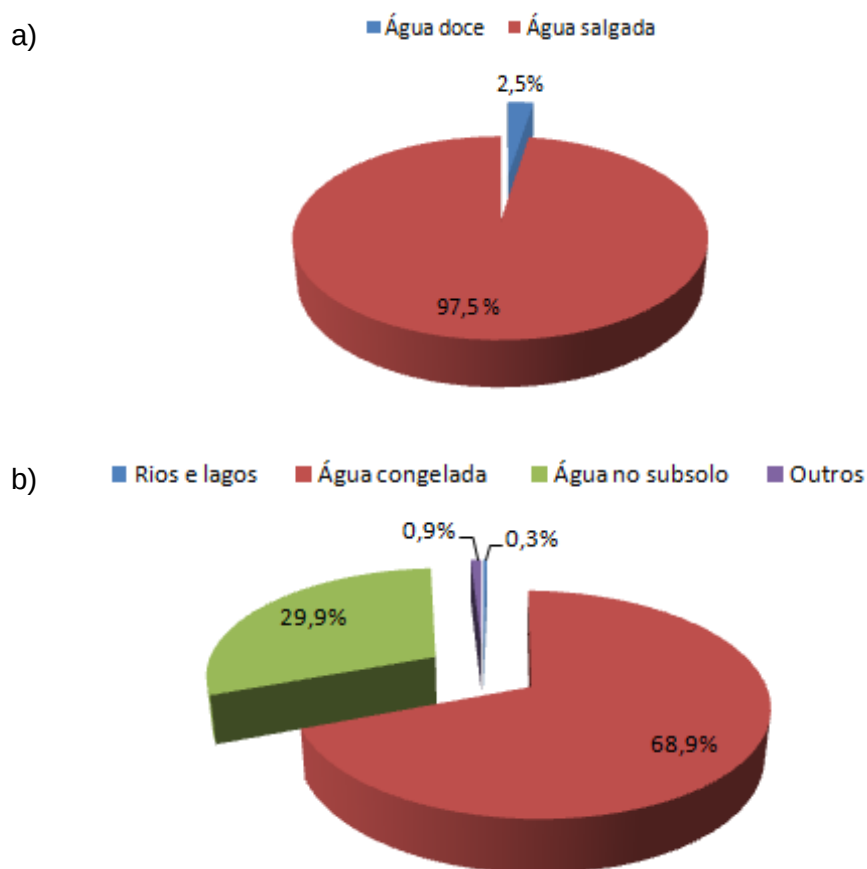
10 A água, molécula essencial para a existência de vida, manutenção e equilíbrio dos ecossistemas, se refere, de modo geral, ao elemento natural desvinculado de qualquer uso ou utilização. Ao se considerar a água como um elemento necessário a diversas atividades humanas, tais como as industriais e agrícolas, o termo recurso hídrico é utilizado (EMBRAPA, 2001; Rebouças, 2006). A água é utilizada em todos os segmentos da sociedade e está presente no uso doméstico, comercial, industrial, político, público e agrícola (Gonçalves; Jordão, 2006).

15

1.1.1 ÁGUA NO MUNDO

20 Acredita-se que, durante os últimos 500 milhões de anos, a quantidade total estimada de água na Terra, 1.386 milhões de km³, permaneceu praticamente inalterada. Este volume está em constante circulação entre diferentes reservatórios (calotas polares, atmosfera, águas subterrâneas, oceanos, rios e lagos) e variou substancialmente, entre eles, ao longo deste período de tempo. Do total de água supracitado, 2,5% correspondem a água doce, dos quais 0,3% se referem a água doce presente em rios e lagos, 29,9% a água subterrânea, 68,9% a calotas polares e geleiras e 0,9% a outros reservatórios (Fig. 1) (Rebouças, 2006).

Figura 1. Distribuição do total de água (a) e água doce (b) na Terra.



5 Fonte: adaptado de Rebouças, 2006.

Há um constante movimento das águas na Terra, entre diferentes reservatórios, o
10 que constitui o ciclo hidrológico (EMBRAPA, 2001). Esse ciclo sofre influências
dos regimes climáticos e, conseqüentemente, há uma distribuição heterogênea
deste recurso entre as diversas regiões do planeta, bem como dentro do território
de uma nação, sobretudo daquelas com grandes áreas territoriais, como o Brasil
(Rebouças, 2006).

15 As águas para consumo direto pelo homem ou para suas atividades
socioeconômicas são captadas, principalmente, de rios e lagos. Nestes
reservatórios, os recursos hídricos estão mais acessíveis ao uso humano,
representando, como mencionado, 0,3% do volume de água doce da Terra e,

aproximadamente, 0,007% do volume total de água (EMBRAPA, 2001; Rebouças, 2006).

5 1.1.2 ÁGUA NO BRASIL

O Brasil apresenta uma grande área territorial, de 8.515.767,049 km² (IBGE, 2015), e uma projeção populacional de 207.141.139 habitantes (IBGE, 2017). Apesar de possuir cerca de 13% da água doce disponível do planeta, o Brasil tem
10 uma distribuição de recursos hídricos superficiais bastante heterogênea (Rebouças, 2006; MMA/ANA, 2007). Com aproximadamente 81% dos recursos hídricos disponíveis no País, a região Norte engloba cerca de 5% da população brasileira, enquanto que, nas bacias hidrográficas junto ao Oceano Atlântico, há
15 uma concentração de 45,5% da população total do País e apenas 2,7% dos recursos hídricos (ANA, 2015).

1.2 POLUIÇÃO DAS ÁGUAS

20

O ser humano, desde que se tornou parte dominante dos sistemas, tem influenciado negativamente a manutenção do equilíbrio ambiental, pois impõe uma pressão cada vez maior sobre o ambiente. Dentre suas atividades geradoras
25 de pressão, a liberação de produtos residuais, transportados pela água, pode degradar significativamente os corpos de água receptores. Além disto, a poluição da água está diretamente relacionada a doenças causadas por microrganismos, principalmente, em regiões com densidade populacional elevada (Moraes; Jordão, 2002).

30 Dentre as causas da contaminação bacteriológica e química dos ambientes aquáticos, destaca-se o lançamento de águas residuais domésticas e industriais, envolvendo, portanto, processos de ordem física, química e biológica. Os esgotos e excrementos humanos estão associados, de maneira importante, à deterioração

da qualidade da água, principalmente, em países em desenvolvimento (Moraes; Jordão, 2002).

5

1.3 SANEAMENTO BÁSICO

10 Com o desenvolvimento científico e tecnológico, intensificado após o período do renascimento, compreendido entre os séculos XIV e XVII, houve algumas mudanças de hábito da população. O aparecimento de água encanada e a propagação do uso de peças sanitárias são exemplos dessas mudanças. Dessa forma, o ser humano passou a se preocupar com o abastecimento de água potável e a coleta de águas residuárias. Consequentemente, surgiram os
15 primeiros passos para a criação de sistemas de saneamento eficazes, que garantissem um descarte favorável dos esgotos nos corpos receptores naturais (Fernandes, 1997).

A formação preferencial de comunidades em áreas adjacentes aos reservatórios de água gerou uma alta densidade populacional nas mesmas. Dessa forma,
20 houve um aumento das fontes de poluição da água e uma consequente e prioritária preocupação com a criação de processos sanitários capazes de remover contaminantes (poluentes químicos, matéria orgânica e microrganismos) da água antes de seu lançamento nos ambientes (Vaz-Moreira; Nunes; Manaia, 2014).

25 O consumo de água como uma necessidade básica e a consequente geração de águas residuárias são características comuns do ser humano. As águas residuárias produzidas pelo homem devem ser coletadas e transportadas para Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs), para serem depuradas adequadamente, antes de serem lançadas nos corpos receptores naturais. Essa
30 medida visa preservar o equilíbrio ecológico no ambiente, evitando que os recursos naturais da região sejam destruídos, além de facilitar o aproveitamento desses recursos naturais pelo homem (Fernandes, 1997).

Com a intenção de prevenir doenças, a Organização Mundial de Saúde propôs o conceito de saneamento, na conferência de Ottawa, em 1948, como “o controle de todos os fatores do meio físico do homem que exercem ou podem exercer efeito deletério sobre o seu bem-estar físico, mental ou social” (Lins, 2010). De

5 acordo com a lei nº 11.445, de 5 de janeiro de 2007 (Brasil, 2007), saneamento básico é o conjunto de serviços, infraestruturas e instalações operacionais que garantem o abastecimento de água potável, esgotamento sanitário, limpeza urbana, manejo de resíduos sólidos e drenagem e manejo das águas pluviais urbanas. Um sistema de coleta, transporte, tratamento e disposição final
10 adequados dos esgotos sanitários, desde as ligações prediais até o seu lançamento final no meio ambiente, fazem parte do saneamento básico. A rede coletora de esgotos é formada por um conjunto de condutos que levam os esgotos para uma ETE (Fernandes, 1997).

Dentre as finalidades do saneamento básico, mais especificamente, as finalidades
15 sanitárias, destacam-se: coletar e remover rápida e seguramente as águas residuárias; eliminar a poluição e a contaminação de áreas a jusante do lançamento final; devolver os efluentes ao ambiente em condições de reuso; e reduzir ou eliminar doenças de veiculação hídrica (Fernandes, 1997).

De acordo com o Sistema Nacional de Informações sobre o Saneamento (SNIS)
20 (Brasil, 2014), o esgotamento sanitário é o tipo de saneamento com menor porcentagem de atendimento à população brasileira. O diagnóstico dos serviços de água e esgotos (ano base 2015) produzido pelo SNIS em 2017 (Brasil, 2017), relatou que apenas 50,3% da população tinha seu esgoto coletado e somente 39% do esgoto gerado no Brasil era tratado antes de ser lançado em corpos
25 hídricos receptores. A falta de esgotamento sanitário, além de poluir os cursos d'água, tem, por consequência, favorecer o acometimento da população por várias doenças. A elaboração de projetos de esgotamento sanitário depende, dentre outros detalhes, do conhecimento das características qualitativas do efluente a ser tratado (von Sperling, 2005).

1.4 ESGOTO

1.4.1 CONCEITO

5

O esgoto é definido como o conjunto de águas residuárias de uma comunidade. Ele é composto por despejos domésticos veiculados pela água, detritos industriais e por águas provenientes do lençol freático, da superfície e/ou da atmosfera, que, porventura, entrem no sistema de esgoto (Pelczar; Chan; Krieg, 1996). Os
10 esgotos podem ser classificados, com base em sua origem, em esgoto doméstico (também denominado sanitário ou comum), esgoto industrial e esgoto pluvial.

1.4.2 CARACTERÍSTICAS DO ESGOTO

15

Os esgotos domésticos são constituídos por, aproximadamente, 0,1% de material sólido; os 99,9% restantes referem-se, essencialmente, a água. A parcela de 0,1% é responsável por diversas consequências prejudiciais, uma vez que é composta por sólidos orgânicos e inorgânicos, suspensos e dissolvidos, nutrientes
20 e microrganismos, inclusive patogênicos. Apesar de pequena, essa porcentagem justifica a necessidade de tratamento do esgoto (Fernandes, 1997; von Sperling, 2005).

Grande parte da matéria orgânica presente nos esgotos sanitários é composta por microrganismos provenientes, principalmente, do intestino de seres humanos
25 usuários de peças sanitárias. Estes microrganismos, em sua maioria absoluta, são essenciais ao bom funcionamento do trato intestinal dos indivíduos e são liberados juntamente com as fezes. Outros esgotos podem ser reunidos ao esgoto bruto afluente em uma ETE, desde que apresentem composição orgânica de natureza qualitativa similar, para não alterar negativamente a depuração das
30 águas residuárias (Fernandes, 1997).

O metabolismo dos principais microrganismos responsáveis pela depuração do esgoto é sensível a quaisquer alterações nas características físico-químicas do

ambiente. Portanto, tais mudanças podem influenciar negativamente o funcionamento de uma ETE (Fernandes, 1997).

O conhecimento dos poluentes presentes no esgoto e de suas características físicas, químicas e biológicas é essencial para determinar alguns aspectos operacionais das unidades de tratamento, visando atender às exigências da legislação ambiental. Dentre esses aspectos, destacam-se a quantidade de lodo gerado e a frequência de limpeza das unidades. Além disso, a noção dessas características permite prever o potencial impacto no ambiente consequente à liberação das águas residuárias nos corpos receptores sem o devido tratamento (ReCESA, 2008; Lins, 2010).

1.4.3 PARÂMETROS DO ESGOTO

Os principais parâmetros utilizados para caracterizar o esgoto e avaliar a eficiência do seu tratamento são indicadores de matéria orgânica e de contaminação fecal e avaliação da presença de sólidos e nutrientes (ReCESA, 2008). Com base nestes parâmetros, é possível reutilizar os esgotos, quando dentro de certos limites, ou, em outras situações, é necessário descartá-los (Lins, 2010).

1.4.3.1 Parâmetros físicos

Os parâmetros físicos dos esgotos são determinados com base nas características cor, turbidez, temperatura e presença de sólidos (Lins, 2010). A cor e a turbidez são causadas, respectivamente, pela presença de matéria orgânica em solução e matéria orgânica em suspensão na água. O esgoto fresco tem uma tonalidade marrom ou cinza, enquanto que o tardio se apresenta na tonalidade negra (Jordão; Pessoa, 2009).

A temperatura afeta a saturação de oxigênio dissolvido em uma relação inversamente proporcional. Esta característica também afeta as taxas de reações químicas e de reações biológicas em uma relação diretamente proporcional. Além disso, o aumento da temperatura reduz a viscosidade do esgoto, facilitando as

condições de sedimentação (Lins, 2010). Afirma-se que a digestão anaeróbia praticamente não ocorre em temperaturas abaixo de 15 °C (Jordão; Pessôa, 2009).

5 Apesar de constituírem a menor parte dos esgotos, cerca de 0,1% de sua composição, como já mencionado, os sólidos, quando separados da parte líquida, apresentam uma quantidade elevada e de difícil destinação final, podendo até resultar em impactos ambientais (Jordão; Pessôa, 2009). Os sólidos podem ser subdivididos com base em suas características (Fig. 2) em: sólidos totais (ST), sólidos suspensos (SS) ou sólidos dissolvidos (SD) e sólidos fixos (SF) ou sólidos voláteis (SV) (ReCESA, 2008; Lins, 2010). Para se quantificar a matéria orgânica, os nutrientes e os organismos patogênicos, são utilizados os parâmetros relacionados aos sólidos presentes nos esgotos (ReCESA, 2008).

1.4.3.2 Parâmetros químicos

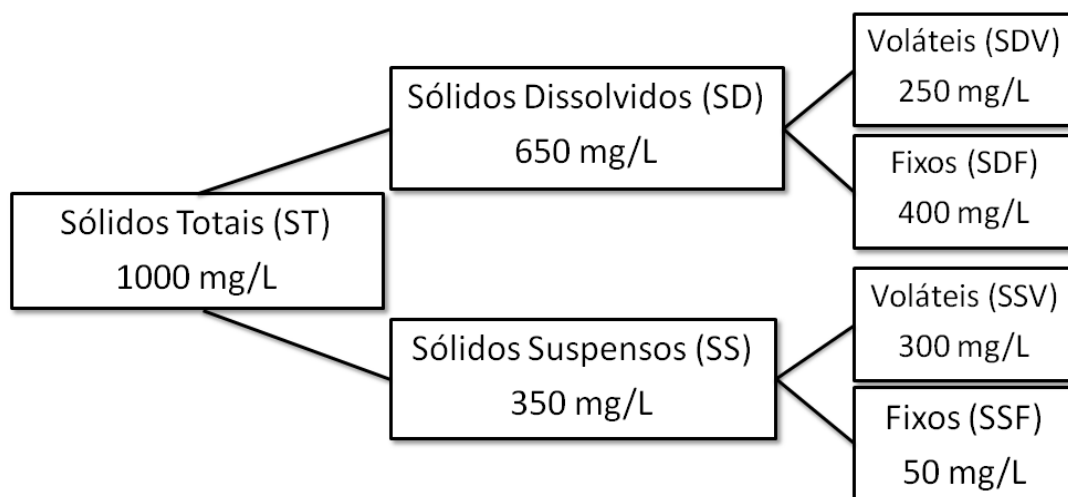
15

Os parâmetros químicos, geralmente, são analisados em conjunto com os parâmetros físicos e/ou biológicos. As características analisadas são: pH, cloreto, nitrogênio e fósforo, oxigênio dissolvido, óleos e graxas, metais, demanda bioquímica de oxigênio (DBOt), demanda química de oxigênio (DQO) e matéria orgânica carbonácea (Lins, 2010).

20

O pH do esgoto varia entre 6,5 e 7,5. Os esgotos velhos apresentam pH inferior a 6,0 (Jordão; Pessôa, 2009). A corrosão é acelerada em baixos valores de pH, enquanto que pH elevado facilita a incrustação nas peças e tubulações (Von Sperling, 2005).

Figura 2. Distribuição típica dos sólidos com base em suas características.



5 Fonte: adaptado de Von Sperling, 2005.

As excretas humanas contribuem para a permanência constante de cloretos nos esgotos e sua remoção é praticamente insignificante nos tratamentos convencionais (Jordão; Pessôa, 2009). O nitrogênio presente nos esgotos é proveniente tanto da decomposição de proteínas celulares, como de fontes antropogênicas, tais como esgotos domésticos e industriais, fezes de animais e fertilizantes (Von Sperling, 2005). O fósforo, por sua vez, é proveniente tanto do intemperismo das rochas e da decomposição da matéria orgânica, como de efluentes industriais, esgotos sanitários e fertilizantes. Além disso, o uso de sabões e detergentes pela população contribui para a introdução de fósforo nos sistemas sanitários (Jordão; Pessôa, 2009).

A concentração de nitrogênio e fósforo pode influenciar na dinâmica populacional de organismos aquáticos, inclusive dos microrganismos, responsáveis pelo tratamento de esgoto (ReCESA, 2008). Além disso, pode ocasionar a queda abrupta dos níveis de oxigênio dissolvido nos corpos aquáticos, devido à oxidação da biomassa formada, principalmente, por algas (Jordão; Pessôa, 2009).

O oxigênio dissolvido é o parâmetro químico de maior importância para a caracterização da qualidade de um ambiente aquático, uma vez que é essencial para a decomposição da matéria orgânica por microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos (Lins, 2010). Além disso, sua ausência é um fator preponderante para a ocorrência do metabolismo anaeróbio no esgoto, como por exemplo, nos reatores *upflow anaerobic sludge blanket* (UASB) (Von Sperling, 2013).

A presença de óleos e graxas nos esgotos é esperada, visto que as atividades domésticas humanas (tais como a preparação e o uso de alimentos) exercem grande contribuição (Jordão; Pessôa, 2009).

Os metais podem ser encontrados naturalmente nos ambientes aquáticos, mas, sua concentração aumenta nas águas residuárias, podendo causar danos ambientais. Dentre os danos, destaca-se a biomagnificação trófica, pois os metais não podem ser metabolizados. Os principais metais encontrados nos esgotos são: prata (Ag), arsênio (As), cádmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), mercúrio (Hg), níquel (Ni), chumbo (Pb), antimônio (Sb), selênio (Se) e zinco (Zn) (Von Sperling, 2005; Lins, 2010).

A DBOt refere-se à quantidade de oxigênio consumido por microrganismos aeróbios ou facultativos, durante cinco dias, sob temperatura padrão (normalmente, 20 °C), para degradar a matéria orgânica de uma amostra. A DQO refere-se à quantidade de oxigênio consumido para a oxidação química da matéria orgânica de uma amostra. Este teste demanda poucas horas e valores elevados podem indicar um alto potencial poluidor (ReCESA, 2008; Lins, 2010).

A DBOt e a DQO são os parâmetros mais utilizados indiretamente para quantificar a matéria orgânica dos esgotos. Além disto, estes parâmetros são utilizados no monitoramento e na avaliação do desempenho das unidades de uma ETE, visando confirmar a adequação do efluente aos padrões preconizados pela legislação ambiental (ReCESA, 2008).

Embora sejam os mais utilizados, DBOt e DQO não são os únicos parâmetros utilizados para quantificar a matéria orgânica. Existem métodos diretos que medem a quantidade de carbono orgânico, como a dosagem de carbono orgânico total (COT), que mede todo o carbono liberado na forma de CO₂. No entanto, sua

utilização é insignificante no Brasil (Lins, 2010). Outro parâmetro empregado, porém, de maneira indireta, é a demanda última de oxigênio (DBOu), que corresponde ao consumo de oxigênio exercido até determinado tempo, a partir do qual não há consumo representativo (Lins, 2010).

5

1.4.3.3 Parâmetros biológicos

Além dos parâmetros físicos e químicos, existem os parâmetros biológicos. A presença de microrganismos é indispensável aos processos de depuração da matéria orgânica presente no esgoto. Alguns microrganismos são utilizados como indicadores de contaminação da água por fezes, caracterizando-a como potencial transmissora de doenças (Von Sperling, 2005). Os indicadores tradicionalmente utilizados são *Enterococcus* e *Escherichia coli* (Mclellan *et al.*, 2013). No entanto, sugerem-se, atualmente, os gêneros *Blautia* e *Prevotella* como potenciais alternativas para indicadores de poluição fecal (Koskey *et al.*, 2014). Esta indicação é devido à capacidade de diferenciação das fontes de poluição entre *Homo sapiens* e outros animais, diferentemente dos gêneros tradicionalmente utilizados (Mclellan *et al.*, 2013; Koskey *et al.*, 2014). Ainda sobre esses dois gêneros, Koskey e colaboradores (2014) relataram um aumento significativo da concentração de oligótipos específicos humanos ao longo de um transecto no rio Jiquiriçá, na Bahia, enquanto que os níveis de *Enterococcus* e *E. coli* permaneceram constantes (Koskey *et al.*, 2014).

25

1.5 ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO (ETE)

As ETEs são unidades projetadas com o objetivo de adequar os efluentes, com base em processos físicos, químicos e/ou biológicos, para que possam ser lançados corretamente em corpos de água receptores, tais como rios e lagos. Uma ETE acelera a depuração do esgoto, pois simula e intensifica as condições de autodepuração encontradas na natureza, mas dentro de uma área delimitada

e, de certa maneira, controlada (Lins, 2010). Dessa forma, a carga orgânica do efluente será suportada pelo corpo receptor e o efluente poderá ser lançado no meio ambiente (Fernandes, 1997; La Rovere *et al.*, 2002).

O esgoto, após ser coletado dos estabelecimentos geradores, é transportado até uma ETE, onde será devidamente tratado, até atingir as características preconizadas na legislação ambiental. De um modo geral, as ETEs podem ser divididas em tipos de tratamento, denominados preliminar, primário, secundário e terciário (Naidoo; Olaniran, 2014).

O tratamento preliminar é composto por grades de barras (podendo ter diferentes espaçamentos entre as barras), peneiras, desarenadores e medidor de Paschall (medidor de vazão). O tratamento primário apresenta um decantador primário convencional ou o reator UASB, que é o foco deste trabalho. Por outro lado, o tratamento secundário pode apresentar a tecnologia de lodos ativados e suas variantes, além de filtros em geral. Por fim, o tratamento terciário é composto por tecnologias que visam remover nutrientes e as variantes do lodo ativado, embora seja ainda muito pouco utilizado no Brasil (ReCESA, 2008; Naidoo; Olaniran, 2014). A Fig. 3 é um fluxograma que ilustra um sistema típico de tratamento de esgoto e o Quadro 1 resume os objetivos de cada nível do tratamento.

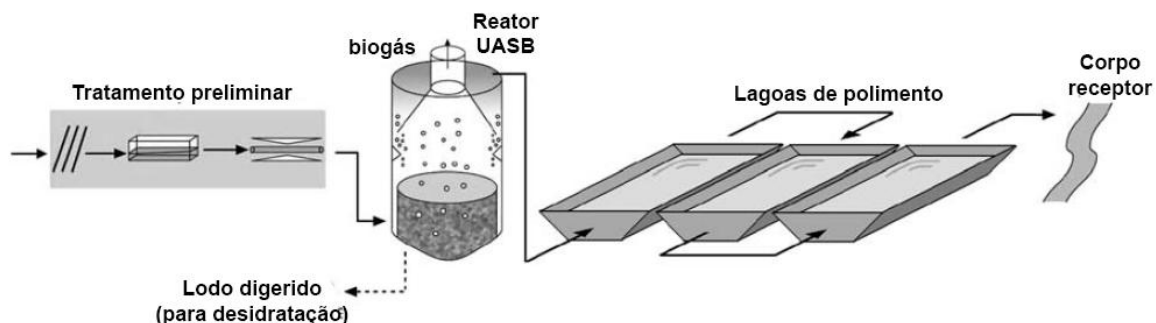


Figura 3. Estação de tratamento de esgoto típica e simplificada.

Fonte: adaptado de Von Sperling & Chernicharo, 2005.

O esgoto afluyente à ETE contém componentes indesejáveis que podem obstruir e/ou danificar os processos e equipamentos ao longo da estação, tais como sólidos grosseiros e sólidos minerais (areia, por exemplo). Dessa forma, esses elementos indesejáveis devem ser removidos para preservar tanto as etapas posteriores do tratamento como o próprio corpo hídrico receptor. Aconselha-se que o esgoto que segue para as demais etapas seja composto por matéria orgânica, alguns sólidos e microrganismos (Naidoo; Olaniran, 2014).

10 Quadro 1. Níveis de tratamento de esgoto e seus objetivos.

Tratamento	Objetivo
Preliminar	Remoção de sólidos grosseiros e areia.
Primário	Remoção de sólidos sedimentáveis e parte da matéria orgânica.
Secundário	Remoção da matéria orgânica e, eventualmente, nutrientes.
Terciário	Remoção de nutrientes, organismos patogênicos e poluentes específicos (compostos tóxicos, não biodegradáveis etc).

Fonte: adaptado de ReCESA, 2008.

Com o objetivo de retirar esses elementos indesejáveis, a etapa preliminar, um processo físico de remoção dos sólidos grosseiros e da areia, é aplicada na maioria dos sistemas de tratamento de esgotos, principalmente aquelas que recebem esgotos de uma grande quantidade de domicílios contribuintes. Em ETEs que recebem uma vazão menor que 1,0 L/s, esta etapa é dispensável, visto que a geração de sólidos grosseiros e sólidos minerais é insignificante. Além disso, ETEs que recebem esgotos originados de poucos domicílios e de redes coletoras de pequena extensão também geram quantidade insignificante de sólidos grosseiros e sólidos minerais (Naidoo; Olaniran, 2014).

A etapa preliminar pode ser composta por três partes: grades de barras, peneiras e desarenador (Naidoo; Olaniran, 2014). Como os reatores UASB são mais suscetíveis a inconvenientes operacionais provocados por sólidos grosseiros e

minerais, recomenda-se o uso do tratamento preliminar com grades e/ou peneiras. Por fim, o desarenador presente no tratamento preliminar é essencial para a remoção de areia, que é bastante prejudicial aos sistemas de tratamento, principalmente, reatores UASB (Jordão; Pessôa, 2009). A areia é retirada com base em sua maior densidade, que permite sua sedimentação mais rápida no fundo do tanque desarenador, e as partículas com menor densidade passam para as próximas etapas (Naidoo; Olaniran, 2014).

Enquanto a etapa supradescrita almeja remover sólidos grosseiros e areia, a próxima etapa, denominada tratamento primário, visa remover parcialmente, por processos físicos, os sólidos em suspensão sedimentáveis, além de óleos e graxas. Para realizar o tratamento primário, os sistemas de tratamento de esgotos convencionais utilizam o decantador primário, por onde o esgoto afluente passa com uma velocidade que permite a sedimentação dos sólidos no fundo, além de formar um complexo de óleos e graxas, chamado espuma (Naidoo; Olaniran, 2014). A classificação do reator UASB como tratamento primário ou secundário é confusa na literatura. Sua estrutura de funcionamento será descrita posteriormente.

Nos vários processos de tratamento de esgotos, observa-se alternância entre predominância de organismos facultativos e anaeróbios. Os primeiros são encontrados nos filtros biológicos e lodos ativados, enquanto que, em reatores UASB e digestores de lodo, microrganismos anaeróbios prevalecem (Fernandes, 1997).

1.6 ETE ARRUDAS

A ETE Arrudas é responsável pelo tratamento do esgoto, predominantemente doméstico, gerado na bacia do ribeirão Arrudas, a qual compreende parte dos territórios de Belo Horizonte e Contagem, ambos em Minas Gerais (Bastos, 2006). A nascente do ribeirão Arrudas encontra-se no Parque Estadual da Serra do Rola

Moça e seu curso segue até a foz do Rio das Velhas, principal afluente do Rio São Francisco. A extensão do seu curso d'água principal é de, aproximadamente, 47 km. Destes, cerca de 37 km estão localizados no município de Belo Horizonte, influenciando, de maneira relevante, a ocupação urbana da região (CBH Rio das Velhas; SCBH Ribeirão Arrudas, 2015).

Apesar da existência de infraestrutura responsável pela captação e condução dos esgotos, a bacia do ribeirão Arrudas em Contagem recebe o lançamento clandestino de águas residuárias, o que influencia negativamente a qualidade da água da bacia (Contagem, 2013). No que se refere a Belo Horizonte, o Município apresenta 163,63 km² de área territorial inserida na bacia do ribeirão Arrudas. Embora haja uma ampla rede de esgotamento sanitário, o município ainda apresenta cerca de 108.000 habitantes cujas residências não são atendidas pelo serviço de coleta de esgotos (Belo Horizonte, 2011).

A bacia do ribeirão Arrudas é um dos principais afluentes do rio das Velhas, mais precisamente do alto rio das Velhas, e os municípios de Belo Horizonte e Contagem pertencem a esta região. Com base em estudos realizados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), ao longo dos 30 anos estudados, a população do alto rio das Velhas, notoriamente em Belo Horizonte e Contagem, teve um considerável aumento, superior à média das demais regiões do Estado. Por exemplo, na década de 1970, houve um crescimento da ordem de 86%. Este crescimento está atrelado ao desenvolvimento econômico dos municípios supracitados (IGAM, 2005).

De acordo com o Plano Diretor de Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica do Rio das Velhas, o alto rio das Velhas apresenta algumas características peculiares, como maior taxa de alfabetização da população, principalmente na capital, Belo Horizonte; número elevado de leitos por habitante (5,34 e 1,39 leitos por mil habitantes, respectivamente, para Belo Horizonte e Contagem), acima do recomendado pela Organização Mundial de Saúde; maior número de óbitos, em comparação com o médio e baixo rio das Velhas, consequentes a doenças do aparelho digestivo associadas à veiculação hídrica (242 e 47 casos para Belo Horizonte e Contagem, respectivamente) (IGAM, 2005).

O tratamento do esgoto em escala real nesta estação é feito pelo sistema convencional de lodos ativados. Nesse processo, o efluente do decantador primário, onde são removidos sólidos sedimentáveis do esgoto bruto, é conduzido ao reator de lodos ativados (tanque de aeração), onde ocorre a remoção da matéria orgânica. O tanque de aeração pode receber ar por aeradores mecânicos ou por difusão. O efluente segue para o decantador secundário, onde são sedimentados os sólidos (biomassa), formado por microrganismos com metabolismo ainda ativos, que são enviados novamente para a etapa anterior (recirculação do lodo). Dessa forma, aumenta-se a concentração de biomassa em suspensão, promovendo maior remoção da DBO. No entanto, uma parte do lodo equivalente à produzida pela multiplicação das populações de microrganismos (lodo biológico em excesso) deve ser retirada do reator e estabilizada, auxiliando na manutenção de sua alta eficiência. Como vantagens do sistema de lodos ativados, destacam-se a maior permanência da biomassa em relação a massa líquida, pequeno tempo de detenção hidráulico e dimensões do reator reduzidas (von Sperling, 2016; Isaac; Abe, 2017)

A ETE Arrudas ainda compreende o Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG/COPASA. O esgoto *in natura* é enviado para diversas unidades de pesquisa onde o tratamento em diversos níveis e modalidades é executado (CePTS-Cartilha).

1.7 REATOR UASB

25

O reator anaeróbio de fluxo ascendente em manta de lodo (RAFA), cuja sigla mais utilizada é UASB (do inglês *upflow anaerobic sludge blanket*), foi desenvolvido na década de 1970, na Holanda, por Lettinga e colaboradores (Van Haandel; Letinga, 1994). No Brasil, foi implantado na década seguinte, quando os estudos sobre sua utilização para tratamento de esgotos sanitários foram iniciados (Sobrinho; Jordão, 2001).

30

Apesar do destaque alcançado nos grupos de pesquisa, alguns profissionais dificultaram sua aceitação junto aos órgãos estaduais e municipais de saneamento básico e aos órgãos de controle de poluição das águas, devido à exploração inadequada dos reatores UASB, levando a resultados aquém dos prometidos (Sobrinho; Jordão, 2001). No entanto, com base em pesquisas desenvolvidas posteriormente, foram alcançados merecidos credibilidade e respeito para o tratamento de esgotos sanitários por reatores UASB, permitindo sua propagação por diversos estados do Brasil (Sobrinho; Jordão, 2001).

Segundo Sobrinho e Jordão (2001) e Von Sperling (2005), as principais vantagens que solidificaram a utilização dos sistemas anaeróbios de tratamento de esgotos, particularmente os reatores UASB, foram simplicidade operacional, baixo custo, baixo consumo de energia, baixa demanda de área, baixa produção de sólidos, características operacionais favoráveis em relação à predominância de temperaturas elevadas no Brasil, produção de lodo já estabilizado e a um custo atrativo, altas taxas de tratamento em comparação com os tratamentos primários, produção de metano, possibilidade de preservação da biomassa por longos períodos sem alimentação manual, tolerância a cargas orgânicas elevadas e consumo de nutrientes baixo.

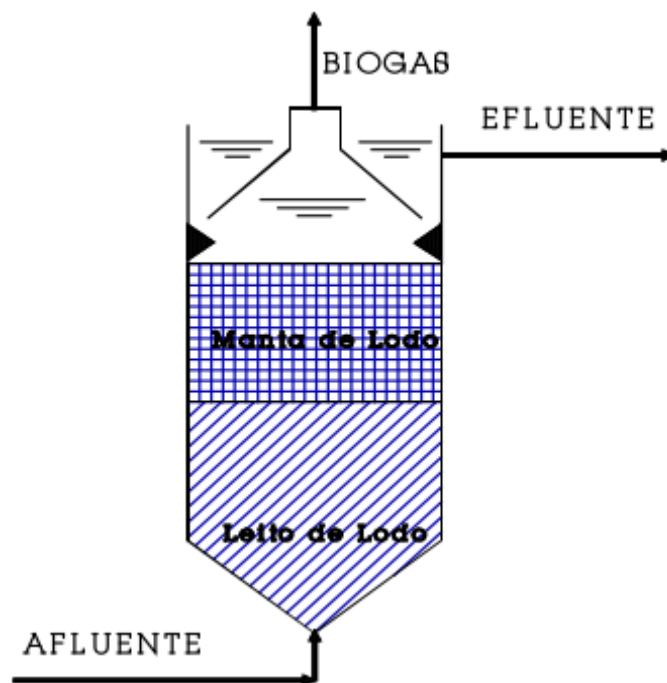
Neste sistema de tratamento anaeróbio, ocorre a formação de flocos ou biogrânulos, pela agregação de células microbianas, que originam, por sua vez, camadas subdivididas em “leito de lodo” e “manta de lodo”. Essas camadas são diferenciadas pela densidade dos biogrânulos, sendo que o “leito de lodo” localiza-se no fundo (Van Haandel; Letinga, 1994; Lucena, 2008).

O efluente adentra no fundo do reator UASB e, então, entra em contato com o “leito de lodo”, que contém sólidos muito densos, e com partículas granulares de elevada capacidade de sedimentação, onde grande parte da matéria orgânica é adsorvida pela biomassa. Em seguida, passa pela “manta de lodo”, que contém um lodo mais disperso e menos denso e, posteriormente, chega ao separador trifásico (sólidos, líquidos e gases). Neste separador, a zona de sedimentação permite tanto a saída do efluente clarificado pelas laterais da parte superior como o retorno da biomassa (parte sólida), carregada pelo biogás, à “manta de lodo”, aumentando sua concentração no sistema. A zona de coleta de gás recolhe os

gases (principalmente metano e gás carbônico) provenientes da atividade anaeróbia de microrganismos na parte superior, que são conduzidos para reaproveitamento ou queima (Von Sperling, 2005; Lucena, 2008).

5 A matéria orgânica é estabilizada tanto no “leito de lodo” como na “manta de lodo”, sendo ambas denominadas zonas de reação. A digestão anaeróbia com produção de gás acontece nas duas regiões de lodo (Machado, 1997). A Fig. 4 apresenta um desenho esquemático de um reator UASB típico.

Figura 4. Desenho esquemático de um reator UASB.



10 Fonte: adaptado de Machado (1997).

Por ter uma baixa produção de lodo que já sai adensado e estabilizado, a decantação primária, processo típico do sistema de tratamento convencional de efluentes, é dispensável. Além disto, outra característica vantajosa do reator UASB é seu tempo de detenção hidráulica e de retenção da biomassa que são, respectivamente, baixo e alto. Este fato permite que o reator UASB receba uma alta concentração de matéria orgânica (Van Haandel; Letinga, 1994; Von Sperling, 2005).

A formação de bolhas de gás e sua consequente expansão, aliada ao fluxo ascendente dentro do reator, intensificam a mistura da biomassa do sistema (Van Haandel; Letinga, 1996).

Embora tenha alta eficiência, o esgoto que sai do reator UASB, geralmente, apresenta valores de DBO_t e de sólidos em suspensão acima dos limites preconizados pela legislação. Por isso, é sugerido aplicar etapas de pós-tratamento para elevar a eficiência global do sistema. Ainda, etapas de pós-tratamento são aconselhadas para adequar os níveis de organismos patogênicos e de nutrientes (principalmente, nitrogênio e fósforo), pouco afetados na digestão anaeróbia, aos padrões da legislação (Chernicharo, 2006).

Mesmo com vantagens em relação a outros sistemas de tratamento de efluentes, o sucesso dos reatores anaeróbios, incluindo o UASB, é dependente de um monitoramento eficaz. Este monitoramento deve, no geral, promover a avaliação da eficiência e da estabilidade do biodigestor por meio, respectivamente, da remoção de sólidos suspensos e matéria orgânica e da determinação da alcalinidade e do pH. Além disso, o monitoramento deve tanto garantir o correto desempenho das unidades do sistema, sobretudo aquelas do pré-tratamento, como determinar a biomassa no reator em qualidade e quantidade (Van Haandel; Letinga, 1994).

1.8 ETAPAS DE PÓS-TRATAMENTO

O esgoto parcialmente tratado nos reatores UASB do CePTS são conduzidos para etapas de pós-tratamento, descritas brevemente a seguir:

1.8.1 Filtro Biológico Percolador (FBP)

Sistema aeróbio de tratamento de esgotos formado por um meio suporte de material grosseiro (pedras e esponjas, por exemplo). O esgoto proveniente é distribuído em sua parte superior, de onde percola e, então, é tratado por processos biológicos realizados por biofilmes aderidos ao meio de enchimento (Nascimento, 2001).

O CePTS apresenta três tipos de FBP, denominados aberto, acoplado e cilíndrico.

FBP aberto (Filtro de pedra): Apresenta como material de enchimento brita 3 e pedra de mão, nesta ordem. É um sistema economicamente atrativo, visto que não apresenta paredes maciças de concreto, facilitando, assim, a circulação de ar (Fig. 5 – (a)).

FBP acoplado: Adjacente ao reator UASB, recebendo efluente do mesmo. Apresenta esponja de poliuretano como meio de suporte (Fig. 5 – (b)).

FBP cilíndrico: Formado por uma torre cilíndrica preenchida pelo mesmo meio de suporte do FBP acoplado (Fig. 5 – (b)) (Almeida *et al.*, 2013).

1.8.2 Lagoa de polimento em série

Sistema composto por duas lagoas rasas em série, sendo que a segunda apresenta chicanas que aumentam o tempo de detenção hidráulica. (Fig. 5 – (c)).

1.8.3 Lagoa de polimento com filtro grosseiro

É uma lagoa rasa semelhante à anteriormente descrita, porém apresenta um filtro grosseiro, composto por brita 3, albergado dentro da unidade (Fig. 5 – (d)).

5

1.8.4 Leito submerso de fluxo horizontal (*Wetlands*)

Há dois tipos de leito submerso de fluxo horizontal, ambos em paralelo: um leito plantado com taboa (*Typha latifolia*), chamado neste trabalho de *Wetlands* plantada (WHP), e outro sem plantas, denominado de *Wetlands não-plantada* (WHNP). Esse tipo de pós-tratamento permite estudar a influência de plantas no processo de tratamento de esgoto (CePTS-Cartilha) (Fig. 5 – (e)).

Figura 5. Etapas de pós-tratamento do CePTS (a) FBP aberto; (b) FBP acoplado (*) e cilíndrico (#); (c) Lagoa de polimento em série – sem chicanas (#) e com chicanas (*); (d) Lagoa de polimento com filtro grosseiro; (e) *Wetlands* – WHP (#) e WHNP (*).



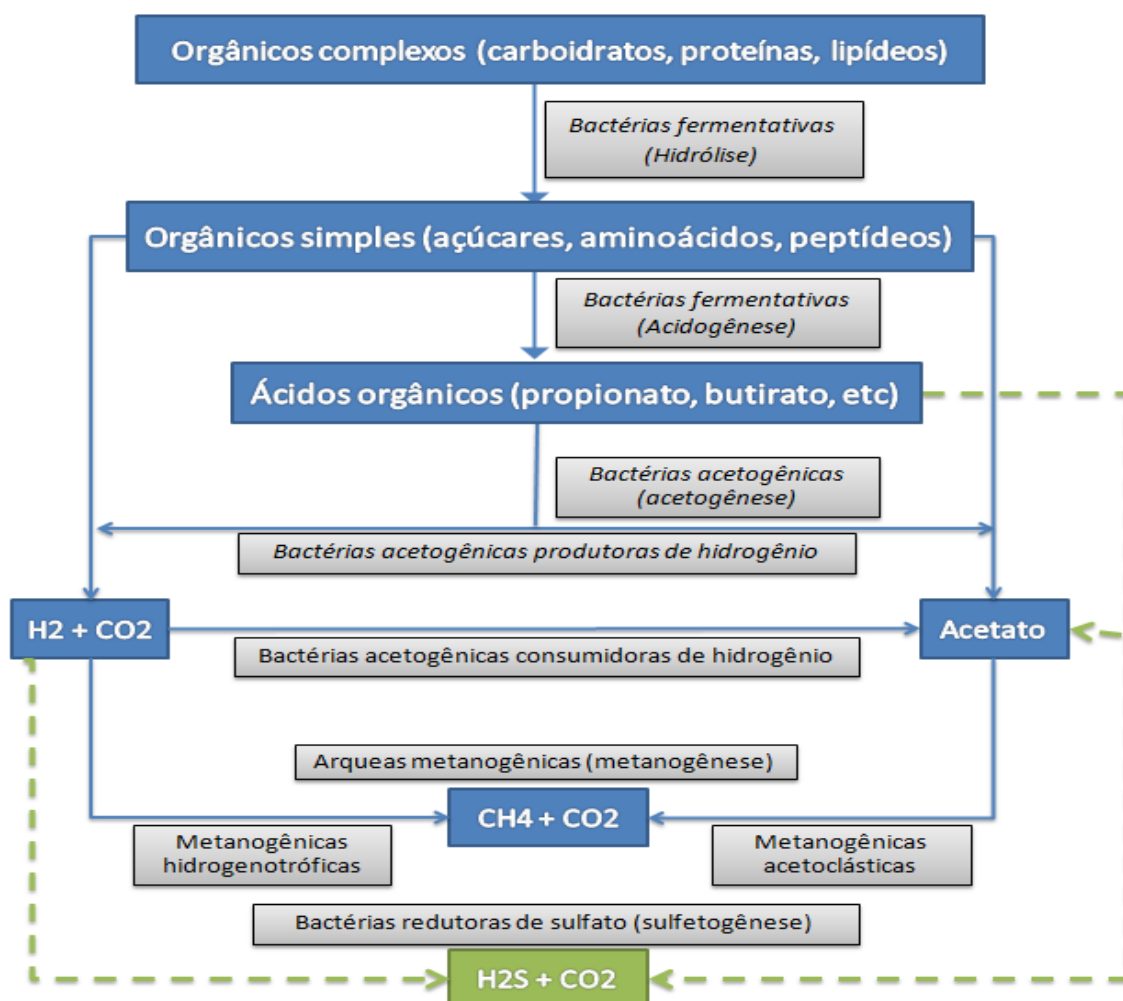
1.9 DIGESTÃO ANAERÓBIA DE EFLUENTES

A matéria orgânica presente nos efluentes pode ser oxidada, em anaerobiose, pelos processos de fermentação e/ou por respiração. O primeiro ocorre na ausência de um aceptor final de elétrons; no segundo, aceptores de elétrons inorgânicos como SO_4^{2-} (sulfato reduzido) ou CO_2 (gás carbônico) são utilizados. O metano (CH_4) é formado, preferencialmente, em ambientes onde o oxigênio, o nitrato e o sulfato não estejam prontamente disponíveis como aceptores de elétrons (Chernicharo, 2007).

A digestão anaeróbia ocorre em um ecossistema onde várias etapas metabólicas são inter-relacionadas. Para a realização da digestão anaeróbia, são necessários, pelo menos, três grupos fisiológicos de microrganismos: bactérias fermentativas (hidrolíticas e acidogênicas), bactérias acetogênicas (sintróficas) e microrganismos metanogênicos. Esses grupos realizam as principais etapas sequenciais responsáveis pela metabolização da matéria orgânica de maneira interativa, convertendo a matéria orgânica complexa em outros compostos mais simples, tais como metano, gás carbônico, água, gás sulfídrico e amônia, além de novas células bacterianas, conforme demonstrado na Fig. 6 (excetuando-se as linhas pontilhadas) (Chernicharo, 2007).

As bactérias fermentativas hidrolíticas transformam, por hidrólise e com o uso de exoenzimas, os compostos orgânicos complexos (carboidratos, proteínas e lipídios) em seus monômeros (açúcares, aminoácidos etc.), que são capazes de atravessar a parede celular dos microrganismos (Lettinga *et al.*, 1996; Chernicharo, 2007). As bactérias fermentativas acidogênicas convertem os produtos da etapa hidrolítica em ácidos orgânicos (propionato, butirato, acetato etc.), etanol, CO_2 e hidrogênio. A etapa posterior é realizada por microrganismos acetogênicos, que podem transformar os produtos da etapa acidogênica em acetato, hidrogênio e CO_2 , que são substratos úteis para a etapa seguinte, metanogênica. As arqueias metanogênicas convertem o acetato e o hidrogênio produzidos em CH_4 e CO_2 . A atuação das arqueias é primordial para a ocorrência das reações acetogênicas, que só podem ser realizadas em ambientes com baixas concentrações de hidrogênio e de acetato (Chernicharo, 2007).

Figura 6. Digestão anaeróbia em reator UASB.



5

Rotas metabólicas sem sulfetogênese em linhas contínuas e com sulfetogênese em linhas pontilhadas.

Fonte: adaptado de Lettinga (1996).

10

Alguns microrganismos, durante a digestão anaeróbia, são capazes de reduzir sulfato, sulfito e outros compostos sulfurados a sulfetos, processo conhecido por sulfetogênese. As bactérias sulforredutoras são muito versáteis, capazes de utilizar uma diversidade de substratos, tais como toda a cadeia de ácidos orgânicos voláteis, diversos ácidos aromáticos, hidrogênio, metanol, etanol, glicerol, açúcares, aminoácidos e vários compostos fenólicos. Com base no modo

15

como ocorre o metabolismo dos seus substratos, completo ou incompleto, as bactérias sulforredutoras podem ser subdivididas em dois grupos. No primeiro, ocorre o metabolismo incompleto dos substratos, produzindo acetato e, no segundo, os substratos são metabolizados completamente a CO₂ (Forest *et al.*, 1999).

Na presença de sulfato (SO₄) no meio, as bactérias sulforredutoras competem com as bactérias fermentativas, acetogênicas e metanogênicas, pelos substratos formados nas rotas metabólicas intermediárias apresentadas na Fig. 6 (linhas contínuas). O resultado desta competição está esquematizado na própria Fig. 6 (incluindo as linhas pontilhadas) (Chernicharo, 2007).

A sulfetogênese, apesar de atuar melhor na remoção de DQO na fase líquida do tratamento de efluentes, possui como produto o gás sulfídrico (H₂S), que tem potencial corrosivo, produz maus odores e torna o meio tóxico. Além disso, a sulfetogênese não produz metano, gás que tem grande potencial energético (Chernicharo, 2007; Ziemiński; Frac, 2012; Shah *et al.*, 2014).

1.10 DOMÍNIO ARCHAEA

O domínio Archaea foi proposto na década de 1970 (Woese, 1987; Woese; Kandler; Wheelis, 1990). Dentre os diversos integrantes, as arqueias metanogênicas desempenham várias funções em ambientes anaeróbios, inclusive nos reatores anaeróbios: removem o carbono orgânico presente na fase líquida do esgoto, convertendo-o em gás metano (insolúvel); alteram as características do ecossistema, permitindo que as bactérias fermentativas e formadoras de ácidos realizem um metabolismo mais eficiente; mantêm a pressão parcial de hidrogênio do meio em níveis suficientemente baixos (Chernicharo, 2007; Shah *et al.*, 2014).

O domínio Archaea compreende microrganismos procariotos, unicelulares, anaeróbios e com uma gama de metabolismo bastante diversa. O Quadro 2

apresenta uma comparação entre os domínios Bacteria e Archaea. Podem ser encontrados em *habitats* extremos, tais como ambientes hipertermófilos (ex. fontes geotermiais), hiperhalófilos (concentração salina elevada), solos e em ambientes aquáticos com acidez e alcalinidade elevadas (Woese, 1987; Woese; Kandler; Wheelis, 1990; Vazoller; Manfio; Canhos, 1999). Em ambientes anaeróbios, as arqueias desempenham um papel indispensável por remover o excesso de hidrogênio e os produtos da fermentação, originados das fases intermediárias da digestão anaeróbia da matéria orgânica (Chernicharo, 2007; Ziemiński; Frac, 2012; Shah *et al.*, 2014).

10

Quadro 2. Quadro comparativo entre os domínios Bacteria e Archaea.

Características	Bacteria	Archaea
Parede celular	Contém peptideoglicano.	Não contém peptideoglicano; possui um polissacáride similar, denominado pseudopeptideoglicano.
Membrana lipídica	Composta por éster de ácidos graxos, formando cadeias retas.	Composta por éter de ácidos graxos, formando cadeias longas e ramificadas.
RNA polimerase	Existe um único tipo, com uma estrutura quaternária simples (estrutura tridimensional).	Existem vários tipos, que são estruturalmente mais complexos. Como consequência, alguns aspectos da síntese de proteínas são diferentes do processo realizado por bactérias.

Fonte: adaptado de Chernicharo, 2007.

15 Atualmente, em Archaea, são conhecidos os filos Thaumarchaeota (Spang *et al.*, 2010), Crenarchaeota, Korarchaeota, Nanoarchaeota e Euryarchaeota. Neste último, estão incluídas as cinco ordens de arqueias produtoras de metano: Methanobacteriales, Methanococcales, Methanomicrobiales, Methanosarcinales e

Methanopyrales (Vazoller *et al.*, 1999; Chernicharo, 2007; Shah *et al.*, 2014). Para facilitar o estudo das arqueias metanogênicas, as cinco ordens supracitadas são agrupadas, com base em critérios fisiológicos, em dois grupos: metanogênicas acetoclásticas e metanogênicas hidrogenotróficas. O primeiro grupo engloba 5 arqueias que produzem metano a partir do ácido acético ou metanol e o segundo grupo transforma hidrogênio e gás carbônico em gás metano (Vazoller *et al.*, 1999; Chernicharo, 2007; Shah *et al.*, 2014).

A maior parte da produção de metano (60 a 70%) é feita pelas arqueias acetoclásticas de dois gêneros, *Methanosaeta* e *Methanosarcina*, pertencentes à 10 ordem Methanosarcinales (Chernicharo, 2007). Das arqueias hidrogenotróficas, os principais gêneros encontrados em reatores anaeróbios são *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, *Methanobrevibacter*, *Methanoculleus* e *Methanocorpusculum* (Chernicharo, 2007; Ziemiński; Fraç, 2012).

15

1.11 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DE COMUNIDADES MICROBIANAS

Os métodos convencionais empregados para estudo da composição de 20 comunidades microbianas apresentam uma limitação importante, decorrente do fato de utilizarem técnicas dependentes de cultivo, que é a impossibilidade de detecção de microrganismos não cultiváveis. Assim, os resultados gerados não refletem com fidelidade a realidade (Handelsman, 2004). Mesmo antes do 25 desenvolvimento de técnicas independentes de cultivo, esta ideia foi confirmada pela discrepância entre o tamanho populacional determinado pela contagem de colônias isoladas e aquele estimado por meio de contagem direta em microscópio (Staley; Konopka, 1985). Especula-se que a técnica de cultivo permita a detecção de apenas 1% ou menos dos microrganismos presentes em amostras ambientais 30 (Riesenfeld; Schloss; Handelsman, 2004).

Com o objetivo de suplantar as limitações do método dependente de cultivo, outras técnicas foram e vêm sendo idealizadas. Estas técnicas, frequentemente baseadas na detecção do material genético do organismo alvo, independem do

cultivo microbiano. Assim, resultados mais acurados, mais próximos da realidade, podem ser alcançados. Entre elas, destaca-se, atualmente, a abordagem metagenômica, que permite acesso ao genoma de toda uma comunidade microbiana alvo (Handelsman, 2004; Riesenfeld; Schloss; Handelsman, 2004; Wang *et. al.*, 2015; de Jonge, 2017, no prelo).

1.12 METAGENÔMICA

Entende-se por metagenômica o conjunto de técnicas utilizadas no estudo baseado na sequência de um conjunto de DNA (metagenoma) proveniente de uma amostra, sem que organismos individuais sejam previamente isolados ou identificados. O estudo pode fornecer informações relativamente imparciais sobre a diversidade e riqueza de espécies, sobre o seu potencial metabólico e sobre os organismos no contexto da comunidade de um ambiente específico (Riesenfeld; Schloss; Handelsman, 2004; Rodrigues, 2011; Sharon; Banfield, 2013).

O prefixo *meta*, do grego “transcendente”, indica que as pesquisas ultrapassam as análises genômicas. Com os dados obtidos por meio da metagenômica, vários estudos estão sendo conduzidos, para determinar a diversidade de uma comunidade, a presença de microrganismos e/ou genes específicos e também a presença de microrganismos dominantes. Com a metagenômica é possível responder a perguntas clássicas da microbiologia ambiental: (1) Quem são?, (2) Quantos são? e (3) O que fazem? (Rodrigues, 2011).

O desenvolvimento da técnica de sequenciamento foi um marco na microbiologia (Sanger; Nicklen; Coulson, 1977). Os primeiros sequenciamentos completos de genomas microbianos foram divulgados em 1995. Na época, foram sequenciados os genomas de *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995) e *Mycoplasma genitalium* (Fraser *et al.*, 1995).

Ao contrário da genômica, que permite o sequenciamento completo do genoma de um organismo, a metagenômica envolve uma amostragem da sequência dos

genomas dos organismos de uma comunidade que habita determinado ambiente (Hugenholtz; Tyson, 2008). A metagenômica pode ser aplicada a qualquer ambiente, desde que seja possível a extração do material genético da amostra. Atualmente, esta técnica tem sido aplicada, principalmente, a estudos de solo, cavidade oral, fezes e ambientes aquáticos (Riesenfeld; Schloss; Handelsman, 2004; Hugenholtz; Tyson, 2008).

A metagenômica sofreu algumas alterações em seus processos ao longo de sua história. As primeiras análises por metagenômica envolviam o isolamento do DNA de uma amostra ambiental, a clonagem do DNA em um vetor adequado, a transformação de uma célula hospedeira bacteriana e o rastreamento dos transformantes (Handelsman, 2004). Dessa forma, uma biblioteca de DNA era construída a partir de uma população microbiana ambiental e, então, a análise das sequências e funções dos genes poderia ser realizada (Riesenfeld; Schloss; Handelsman, 2004).

Atualmente, pode-se utilizar a metagenômica para diferentes abordagens: análise *shotgun*, utilizando o sequenciamento do genoma; investigar funções específicas, com estudos conduzidos em atividades genômicas; analisar a expressão gênica filogenética ou funcional, como estudos de sequência genômica; e determinar o conteúdo completo de amostras do ambiente, utilizando tecnologias de sequenciamento de nova geração. As abordagens supracitadas podem ser subdivididas em dois grupos, com base nos métodos: não seletivos e direcionados. O primeiro inclui a análise *shotgun* e o sequenciamento com tecnologias de nova geração, enquanto as abordagens do segundo são orientadas pela atividade e estudo de uma sequência específica, como o rDNA 16S (Neelakanta; Sultana, 2013).

A análise da sequência do DNA de microrganismos é uma ferramenta muito útil para classificá-los e para determinar as relações evolutivas entre eles. Devido ao fato do DNA sofrer alterações aleatórias em sua sequência, que se acumulam ao longo do tempo, esta molécula pode ser utilizada para indicar a distância evolutiva entre organismos, por meio da análise do número de diferenças entre elas (Rodrigues, 2011). Uma molécula cuja sequência se altera aleatoriamente ao longo do tempo pode ser considerada um cronômetro evolutivo (Woese, 1987).

1.13 CRONÔMETRO EVOLUTIVO

Uma das moléculas que menos sofreu alterações ao longo da evolução e que está presente em todos os seres vivos é o RNA ribossomal, componente dos ribossomos bacterianos, juntamente com proteínas. Ele é codificado por sequências de DNA denominadas rDNAs. Duas subunidades principais compõem o ribossomo bacteriano: a subunidade maior (50S) e a subunidade menor (30S). A molécula rDNA 16S faz parte da subunidade menor, juntamente com 21 proteínas, enquanto que as moléculas rDNA 23S, rDNA 5S e mais 31 proteínas compõem a subunidade maior (Woodson; Leontis, 1998).

O rDNA é um dos cronômetros evolutivos mais utilizados atualmente. Dentre suas características vantajosas, destacam-se: (1) apresenta estabilidade funcional; (2) ocorre em todos os organismos; (3) posições diferentes em suas sequências se alteram a taxas muito variáveis, permitindo que a maioria das relações filogenéticas seja medida; (4) possui tamanho grande e muitos domínios; e (5) pode ser sequenciado rapidamente por métodos diretos (Woese, 1987).

A composição do rDNA 16S, que possui regiões altamente conservadas intercaladas por regiões variáveis, permite maior facilidade nas pesquisas de populações microbianas baseadas em metagenômica e é o cronômetro evolutivo mais utilizado (Illumina, 2014), mesmo entre os organismos filogeneticamente mais distantes (Weisburg; Barns; Pelletier, 1991).

Embora seja a base de vários trabalhos, existem algumas críticas sobre a utilização do rDNA 16S como cronômetro evolutivo. Uma delas refere-se ao seu envolvimento em eventos de transferência horizontal de genes. Ainda, pode haver mais de uma cópia por indivíduo, o que promove uma sobrestimação dos organismos com alto número de cópias e uma subestimação daqueles com menores quantidades. Apesar disso, esta molécula ainda é o melhor marcador filogenético, pois é a base de diversos bancos de dados disponíveis, facilitando, portanto, a análise comparativa com outros trabalhos publicados (Moreira, 2015).

1.14 TECNOLOGIAS PARA O SEQUENCIAMENTO DE DNA

As tecnologias para o sequenciamento de DNA devem, idealmente, ser rápidas,
precisas, fáceis de operar e baratas. Nos últimos 30 anos, as tecnologias e as
aplicações do sequenciamento de DNA sofreram grandes avanços e atuam como
uma máquina da era do genoma, que é caracterizada por um vasto conjunto de
dados genômicos e sua subsequente e ampla análise por diversas áreas de
pesquisa, visando a aplicações múltiplas (Liu *et al.*, 2012).

- 10 A primeira técnica para o sequenciamento de DNA foi idealizada por Frederick
Sanger e colaboradores (1977). Conhecida como “sequenciamento de Sanger”,
baseia-se na terminação da síntese da cadeia em formação como resultado da
incorporação de um dideoxynucleotídeo (Liu *et al.*, 2012). A partir daí, outras
técnicas de primeira geração foram aprimoradas (Rodrigues, 2011). Entre elas,
15 citam-se a modificação química de DNA e subsequente clivagem de bases
específicas, desenvolvida por Maxam e Gilbert (1977) e a primeira máquina
automatizada de sequenciamento (AB370), cuja base de funcionamento é a
eletroforese em um tubo capilar, mais rápida e mais precisa, introduzida em 1987
pela Applied Biosystems (Liu *et al.*, 2012).
- 20 As tecnologias de sequenciamento de nova geração surgiram após o Projeto
Genoma Humano, em 2001. Elas apresentam vantagens importantes em relação
ao sequenciamento de Sanger, tais como alto rendimento, análise paralela e
custo reduzido. Algumas das principais técnicas/plataformas incluídas neste grupo
são o pirosequenciamento (*Roche 454 System*), o sequenciamento por detecção
25 de ligações oligo (SOLiD, do inglês *Sequencing by Oligo Ligation Detection*) e o
sequenciamento por síntese (SBS, do inglês *sequencing by synthesis*). Mais
recentemente, surgiram os sequenciadores compactos, com tamanhos reduzidos
e taxas elevadas de rotatividade, mas, com transferência de dados limitada. *Ion
Personal Genome Machine* (Ion Torrent) e MiSeq (Illumina) são exemplos desta
30 categoria (Liu *et al.*, 2012).

A *Ion Personal Genome Machine* utiliza a tecnologia de sequenciamento em
semicondutores. A incorporação de um nucleotídeo na molécula de DNA pela

polimerase promove a liberação de um próton. Dessa forma, a consequente alteração do pH permite descobrir se o nucleotídeo foi ou não acrescentado (Liu *et al.*, 2012).

- 5 Já o sequenciador MiSeq ainda utiliza a tecnologia do sequenciamento por síntese. Tanto a geração de *clusters* como a análise dos dados são realizadas em um único aparelho e os resultados podem ser fornecidos em, aproximadamente, oito horas. Além disso, o MiSeq possibilita uma vasta área de aplicação com alta integridade de dados, incluindo o sequenciamento de *amplicons*, verificação de clones, ChIP-Seq e o sequenciamento de pequenos genomas (Liu *et al.*, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

5 Atualmente, o esgotamento sanitário, uma das medidas preconizadas pelo saneamento básico, ainda não está totalmente difundido no território brasileiro. Considerando a importância desse serviço para a saúde pública, bem como a necessidade da criação de sistemas eficazes e que sejam capazes de aproveitar o clima do País, é importante um maior conhecimento dos sistemas de tratamento
10 de esgoto. Nos últimos anos, foram incrementados os estudos sobre os sistemas anaeróbios de tratamento de esgotos, mas, devido às limitações técnicas, não existem informações precisas sobre a diversidade, a composição e a dinâmica dos ecossistemas microbianos presentes nestes sistemas. Portanto, novos estudos que visem avaliar a composição microbiana nos sistemas anaeróbios de
15 esgotos são necessários para uma possível otimização das condições de operação dos reatores anaeróbios. O processo de tratamento de efluentes é dependente da ação de microrganismos decompositores da matéria orgânica que, por sua vez, podem sofrer variações em seu metabolismo, em decorrência de alterações de características físico-químicas do ambiente. Nesse sentido, faz-se
20 necessário um conhecimento aprofundado do microbioma do reator UASB, bem como das características físico-químicas do efluente. Assim, será possível caracterizar o sistema tanto de forma qualitativa como quantitativa e, simultaneamente, relacionar as variações do microbioma com as propriedades do esgoto. Por fim, espera-se que este trabalho forneça resultados que possam
25 contribuir para melhorar a eficiência do processo de tratamento de esgoto em reatores UASB.

3 OBJETIVOS

5 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição microbiana em diferentes subunidades do Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG/COPASA, da Estação
10 de Tratamento de Esgoto (ETE) Arrudas do município de Belo Horizonte/MG, por abordagem metagenômica.

15 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil da comunidade de Bacteria e Archaea de efluentes e afluentes de reatores UASB e sistemas de pós-tratamento.
- 20 • Comparar a composição de Bacteria e Archaea em diferentes pontos de reatores UASB.
- Investigar a influência da sazonalidade na composição da comunidade de Bacteria e Archaea em reatores UASB e sistemas de pós-tratamento.
- Avaliar o efeito dos diferentes sistemas de tratamento de esgoto em bactérias
25 potencialmente patogênicas com rota de transmissão fecal-oral.

4 MATERIAL E MÉTODOS

5 Autorização específica para coleta de amostras na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Arrudas não é necessária. Consentimento verbal foi fornecido pelo setor responsável pelo Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG/COPASA.

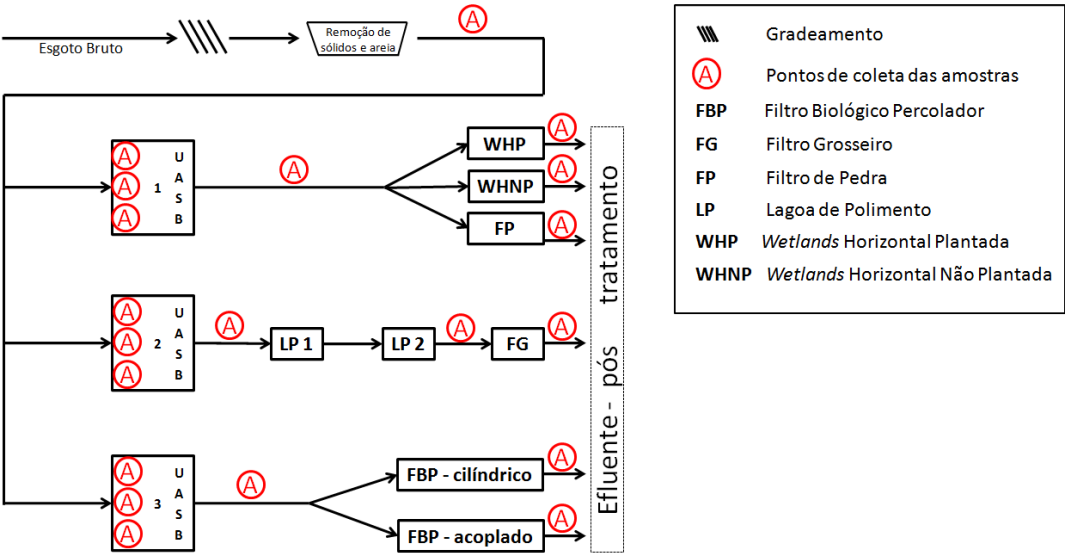
10

4.1 ÁREA DE ESTUDO

15 A coleta do material empregado no estudo foi realizada em sistema de tratamento de esgoto, em escala de demonstração, compreendido por três reatores UASB e seus respectivos sistemas de pós-tratamento (Fig. 7). Esse sistema está localizado no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG/COPASA, instalado na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Arrudas,
20 Belo Horizonte/MG (coordenadas 19°53'42" S e 43°52'42" O, altitude 800 m). Os reatores são alimentados com uma parcela do esgoto proveniente dos decantadores primários em escala real, localizados à montante da planta, após serem submetidos ao tratamento preliminar para a remoção de sólidos e areia. Assim, o material utilizado para alimentar os reatores UASB representa o típico
25 esgoto urbano. As principais características e condições operacionais dos reatores UASB estudados estão descritas no Quadro 3.

Figura 7. Fluxograma dos sistemas de tratamento em escala de demonstração localizados no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento UFMG/COPASA, instalado na Estação de Tratamento de Esgotos Arrudas, com os pontos de amostragem.

5



4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de esgoto foram coletadas em dois momentos distintos, um deles no período chuvoso (17/02/2016) e outro no período seco (02/08/2016), visando avaliar a influência sazonal no perfil da comunidade de bactérias e arqueias. As chuvas acumuladas nos 30 dias anteriores aos dias das coletas foram de 311,6 mm e 0,0 mm, respectivamente (INMET, 2017). As amostras foram obtidas em 20 pontos, identificados na Fig. 7, totalizando 40 amostras/coleta. De cada um dos 20 pontos supracitados, foi coletado 1 L de amostra.

Quadro 3. Principais características e condições operacionais dos reatores UASB em escala de demonstração localizados no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento UFMG/COPASA, instalado na Estação de Tratamento de Esgotos Arrudas.

Características e Parâmetros	UASB 1	UASB 2	UASB 3
Material	Fibra de Vidro	Ferrocimento	Aço Carbono
Per capita de esgoto (L/hab.d)	125	125	125
Equivalente populacional (hab)	640	320	380
Área superficial (m)	4,9	-	3,5
Altura (m)	4,5	4,5	4,8
Volume (m ³)	22,0	14,2	16,8
TDH médio (h)	7,0	7,5	8,5

5 TDH, tempo de detenção hidráulica.

Fonte: CePTS-Cartilha

10 As amostras foram acondicionadas em garrafas plásticas previamente higienizadas e em tubos plásticos de 50 mL previamente esterilizados e, imediatamente, transportadas, sob refrigeração, ao Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

15 Para facilitar a compreensão do desenho experimental, está apresentada, no Quadro 4, a lista de amostras obtidas em cada uma das coletas.

Quadro 4. Descrição das amostras estudadas.

Amostra		Sigla	Ponto de coleta
1D1	1D2	EB	esgoto bruto
2D1	2D2	UASB1_B	inferior do UASB 1
3D1	3D2	UASB1_M	intermediária do UASB 1
4D1	4D2	UASB1_A	superior do UASB 1
5D1	5D2	UASB1_S	saída do UASB 1
6D1	6D2	UASB2_B	inferior do UASB 2
7D1	7D2	UASB2_M	intermediária do UASB 2
8D1	8D2	UASB2_A	superior do UASB 2
9D1	9D2	UASB2_S	saída do UASB 2
10D1	10D2	UASB3_B	inferior do UASB 3
11D1	11D2	UASB3_M	intermediária do UASB 3
12D1	12D2*	UASB3_A	superior do UASB 3
13D1	13D2	UASB3_S	saída do UASB 3
14D1	14D2	WHP	saída da <i>wetland</i> com plantas
15D1	15D2	WHNP	saída da <i>wetland</i> sem plantas
16D1	16D2	FP	saída do filtro de pedra
17D1	17D2	LP	saída da lagoa de polimento
18D1	18D2	FG	saída do filtro grosseiro
19D1	19D2	FBP_C	saída o filtro biológico percolador cilíndrico
20D1	20D2	FBP_A	saída do filtro biológico percolador acoplado ao UASB 3

D1, coleta em 17/02/2016; D2, coleta em 02/08/2016; *, amostra retirada do estudo por conter menos de 500 sequências.

4.3 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

Os parâmetros físico-químicos analisados foram pH, alcalinidade, demanda
5 bioquímica de oxigênio total (DBOt), demanda química de oxigênio total (DQOt),
sólidos totais (ST), sólidos totais voláteis (STV), sólidos totais fixos (STF), sólidos
suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV), sólidos suspensos
fixos (SSF), amônia, nitrito (NO₂), nitrato (NO₃), fósforo total (Ft) e oxigênio
10 dissolvido (OD). As amostras obtidas de dentro dos reatores UASB (2 a 4, 6 a 8 e
10 a 12) foram analisadas apenas para ST, STV e STF, devido à impossibilidade
de filtração.

Todas as análises foram conduzidas no Laboratório de Saneamento da Escola de
Veterinária da UFMG, conforme preconizado no *Standard Methods for the*
Examination of Water and Wastewater (APHA; AWWA; WEF, 2012), com exceção
15 da alcalinidade, avaliada segundo a metodologia descrita por Jenkins, Sawyer
Morgan (1983) e Ripley, Boyle e Converse (1986).

20 4.4 EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras coletadas nos tubos plásticos foram centrifugadas (7826 x g, 30 min)
e, aproximadamente, 0,5 g do sedimento obtido foi utilizado para extração de
25 DNA utilizando-se o *E.Z.N.A.[®] Soil DNA Kit¹*, em conformidade com as instruções
do fabricante. A concentração de DNA de cada amostra foi medida em fluorímetro
Qubit[®] 2.0², conforme orientações do fabricante.

¹ Omega Bio-Tek, Norcross, GA, EUA.

² Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA.

4.5 ANÁLISE DA COMUNIDADE DE BACTERIA E ARCHAEA

A biblioteca de rDNA 16S foi construída utilizando-se os iniciadores 515 (F) 5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3' e 806 (R) 5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3', que têm como alvo a região hipervariável V4, que possibilita a detecção de microrganismos dos domínios Bacteria e Archaea (*amplicon* 292 pb). Os iniciadores foram previamente descritos por Caporaso e colaboradores (2012) e modificações quanto à degeneração de bases nitrogenadas foram feitas por Aprill e colaboradores (2015).

Os *primers* F e R foram marcados com as sequências adaptadoras: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3' e 5'-GTC TCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3', respectivamente, necessárias para a etapa seguinte de sequenciamento. A amplificação foi conduzida no termociclador *Mastercycler Eppendorf*³, utilizando o *KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit*⁴. A mistura de reação (30 µL) constou de 15 ng de DNA, 1 µL dos iniciadores (6 µM) e 15 µL de *KAPA HiFi HotStart ReadyMix*. O protocolo da reação foi: 95 °C/3 min; 95 °C/30 s, 55 °C/30 s, 72 °C/30 s - 25 x e 72 °C/5 min. Os *amplicons* foram quantificados pelo *Qubit dsDNA HS Assay Kit*⁵ e submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,2%), em tampão TBE, pH 8,0. A corrida foi realizada a 100 V por 1 h.

Os *amplicons* foram purificados empregando-se o *Agencourt® AMPure® XP PCR Purification*⁶. Posteriormente, foram preparados para o sequenciamento, empregando-se o *Nextera XT Index Kit*⁷, novamente purificados com o auxílio do *Agencourt® AMPure® XP PCR Purification* e, por último, quantificados por qPCR empregando-se o *KAPA Library Quantification Kit*⁸. A biblioteca de V4 rDNA 16S foi, então, finalizada, formando-se um *pool*, contendo 4 nM de cada amostra e

³ Eppendorf, Hamburgo, Alemanha.

⁴ Kapa Biosystems, Boston, MA, EUA.

⁵ Invitrogen.

⁶ Agencourt Bioscience, Beverly, MA, EUA.

⁷ Illumina, San Diego, CA, EUA.

⁸ Illumina.

30% de *PhiX Control Kit v3*⁹, desnaturado com hidróxido de sódio e adicionado no cartucho de sequenciamento *MiSeq Reagent Kit v2*¹⁰, para 500 ciclos. O sequenciamento foi realizado empregando-se o *MiSeq Desktop Sequencer*¹¹, conforme instruções do fabricante.

- 5 Os dados gerados foram, primeiramente, tratados pelo software *MiSeq Reporter*¹². As sequências geradas foram processadas no programa *MOTHUR* v.1.38.1 (Schloss *et al.*, 2009), utilizando um limiar de pontuação de qualidade de base nucleotídica (*Phred score*) igual a $Q \geq 20$. As sequências quiméricas foram removidas pelo método Uchime (Edgar *et al.*, 2011). Posteriormente, foram
- 10 alinhadas e classificadas de acordo o banco de dados de referência Silva v.123 (Quast *et al.*, 2013) para a região V4 do rDNA 16S e agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) considerando 97% de similaridade genética.

15

4.6 ANÁLISE DOS DADOS

- As análises de alfa diversidade, beta diversidade e abundância relativa foram
- 20 realizadas pelo programa R (R Core Team, 2014), utilizando os pacotes Phyloseq (McMurdie; Holmes, 2013) e ggplot2 (Wickham, 2009). Amostras com número insuficiente de sequências (< 500) foram removidas. A alfa diversidade foi mensurada por meio dos índices de diversidade Shannon (Shannon; Weaver, 1963) e Simpson (Simpson, 1949) e de riqueza ACE (Chao, 1987) e Chao1 (Chao,
- 25 1984). Para avaliar a similaridade entre os grupos observados, também empregou-se o método multivariado de Análise de Coordenadas Principais (PCoA), com base na matriz de distância UniFrac (Lozupone; Knight, 2005).

Para comparação entre os índices de diversidade foram empregados os testes estatísticos ANOVA *one-way* para dados com distribuição normal e Kruskal-Wallis

⁹ Illumina.

¹⁰ Illumina.

¹¹ Illumina.

¹² Illumina.

one-way para dados com distribuição não paramétrica. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

Os resultados referentes às análises físico-químicas estão apresentados na Tabela 1.

10

5.2 DADOS GERAIS DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS

15

A quantidade de sequências geradas antes e após o processamento das amostras no programa MOTHUR estão descritas na Tabela 2.

20

5.3 ANÁLISE DA COMUNIDADE DE BACTERIA E ARCHAEA

As sequências de rDNA 16S geradas foram processadas e agrupadas em OTUs. A abundância relativa dos domínios Bacteria e Archaea, para cada uma das amostras, está representada na Fig. 8. Das 8.946 OTUs observadas, 141 (1,58%) correspondem a Archaea e 8.805 (98,42%) a Bacteria. Em relação à quantidade total de sequências encontradas (2.126.260 sequências), 6% foram classificadas como Archaea e 94% como Bacteria. As maiores abundâncias relativas de sequências de Archaea foram detectadas nas amostras coletadas na parte inferior (UASB_B) e intermediária (UASB_M) dos reatores UASB, totalizando 67%. No que se refere às sequências de Archaea de UASB_B, 76% foram provenientes da primeira coleta. Já para UASB_M, o número de sequências obtidas em cada uma

das duas coletas foi semelhante. As sequências de Archaea provenientes de UASB_A totalizaram 20%, mesmo com a eliminação da amostra 12D2 das análises.

Em relação à abundância relativa de sequências de Bacteria, observou-se predomínio em todas as amostras. Os menores valores foram encontrados nas amostras provenientes do interior dos reatores UASB. Os valores 46% e 54% foram as abundâncias relativas de Bacteria encontrados, respectivamente, na primeira e na segunda coletas.

Apenas 21 do total de 8.946 OTUs foram detectadas em valor igual ou superior a 1% em todos os pontos amostrados. Uma amostra (12D2) foi excluída das análises, devido ao número insuficiente de sequências (< 500; Tabela 2). A Tabela 3 apresenta a identificação das OTUs com abundância relativa superior a 1%.

Os 10 filos detectados com a maior abundância relativa foram Proteobacteria (43%), Bacteroidetes (15%), Firmicutes (13%), Euryarchaeota (6%), Bacteria_unclassified (4%), Actinobacteria (3%), Acidobacteria (2%), Synergistetes (1%), Chloroflexi (1%) e Chlorobi (1%). A distribuição destes 10 grupos em cada amostra estudada está apresentada na Fig. 9.

Da mesma forma, os 10 gêneros mais abundantes em cada amostra estudada estão apresentados na Fig. 10. Em ordem decrescente de abundância, citam-se *Arcobacter* (8%), *Acinetobacter* (6%), *Methanobacterium* (4%), *Cloacibacterium* (4%), Bacteria_unclassified (4%), Comamonadaceae_unclassified (3%), Peptostreptococcaceae_unclassified (2%), WCHB1-69_unclassified (2%), *Clostridium_sensu_stricto_1* (2%) e *Moraxella* (2%).

Os índices de riqueza (ACE e Chao1) e diversidade (Shannon e Simpson) para cada um dos 39 pontos de coleta analisados estão expressos na Tabela 4 e na Fig. 11.

Tabela 1. Resultado das análises físico-químicas das amostras coletadas no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG/COPASA, Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Arrudas.

Amostra	pH	Alcalinidade	DBOt	DQOt	ST	STV	STF	SST	SSV	SSF	Amônia	NO ₂	Nitrato	PT	OD
1D1	7,49	85	450	1200	3000	2400	600	2090	2090	0	75	0,0128	2,23	3,30	0
2D1	-	-	-	-	10000	8900	1100	-	-	-	-	-	-	-	-
3D1	-	-	-	-	5500	4800	700	-	-	-	-	-	-	-	-
4D1	-	-	-	-	4500	4200	300	-	-	-	-	-	-	-	-
5D1	7,65	90	220	480	650	500	150	40	40	0	90	0,0013	1,33	2,10	0
6D1	-	-	-	-	20450	18452	1998	-	-	-	-	-	-	-	-
7D1	-	-	-	-	18540	17450	1090	-	-	-	-	-	-	-	-
8D1	-	-	-	-	12500	11200	1300	-	-	-	-	-	-	-	-
9D1	7,66	75	240	600	460	350	110	50	50	0	110	0,0016	1,20	1,10	0
10D1	-	-	-	-	18900	16500	2400	-	-	-	-	-	-	-	-
11D1	-	-	-	-	13400	12200	1200	-	-	-	-	-	-	-	-
12D1	-	-	-	-	8500	7000	1500	-	-	-	-	-	-	-	-
13D1	7,60	77	195	480	420	400	20	10	10	0	110	0,0017	1,45	1,10	0
14D1	7,60	84	65	460	280	260	20	90	90	0	60	0,0023	1,29	0,85	0,5
15D1	7,97	70	40	260	250	245	5	10	10	0	25	0,0024	1,80	0,25	0,7
16D1	8,29	78	40	320	450	420	30	90	90	0	45	0,0564	1,40	0,85	2,4
17D1	9,26	85	35	480	350	320	30	150	150	0	55	0,0065	1,40	0,90	4
18D1	8,25	80	45	260	380	300	80	50	50	0	85	0,0018	1,25	2,10	0,7
19D1	8,04	90	36	420	390	360	30	20	20	0	92	0,0450	2,03	1,45	3,5
20D1	8,42	80	45	160	345	325	20	50	50	0	42	0,0038	1,65	1,19	2,5

(continuação)

Amostra	pH	Alcalinidade	DBOt	DQOt	ST	STV	STF	SST	SSV	SSF	Amônia	NO ₂	Nitrato	PT	OD
1D2	6,07	82	60	840	2792	2220	572	3500	3400	100	43,700	0,0321	6,31	2,67	0
2D2	-	-	-	-	9548	6476	3072	-	-	-	-	-	-	-	-
3D2	-	-	-	-	160	76	84	-	-	-	-	-	-	-	-
4D2	-	-	-	-	124	48	76	-	-	-	-	-	-	-	-
5D2	6,55	66	160	200	352	236	116	120	100	20	72,800	0,0025	2,07	0,18	0
6D2	-	-	-	-	19096	10056	9040	-	-	-	-	-	-	-	-
7D2	-	-	-	-	16776	10968	5808	-	-	-	-	-	-	-	-
8D2	-	-	-	-	8544	5612	2932	-	-	-	-	-	-	-	-
9D2	6,59	66	173	200	272	272	0	90	75	15	95,200	0,0016	1,51	0,17	0
10D2	-	-	-	-	14172	9096	5076	-	-	-	-	-	-	-	-
11D2	-	-	-	-	7356	4864	2492	-	-	-	-	-	-	-	-
12D2	-	-	-	-	6928	4604	2324	-	-	-	-	-	-	-	-
13D2	6,55	66	173	180	312	244	68	60	50	10	134,400	0,0021	1,94	0,12	0,4
14D2	6,75	68	40	60	304	304	0	135	90	45	62,700	0,0013	1,09	0,13	0
15D2	6,87	69	32	100	312	32	280	50	10	40	19,000	0,0021	1,09	0,17	1
16D2	7,03	70	48	140	348	328	20	120	90	30	23,000	0,0063	1,29	0,23	1,2
17D2	7,04	70	42	180	280	84	196	150	120	30	33,600	0,0031	1,74	0,44	3,5
18D2	7,03	70	54	60	332	156	176	80	45	35	45,400	0,0028	1,42	0,35	3,0
19D2	6,99	70	42	140	364	140	224	65	35	30	33,629	0,0103	1,62	0,00	2,8
20D2	6,86	69	36	1100	332	148	184	75	45	30	36,400	0,0100	1,71	0,19	2,2

Valores expressos em mg/mL, exceto pH e alcalinidade; D1, coleta realizada em 17/02/2016; D2, coleta realizada em 02/08/2016; DBOt, demanda bioquímica de oxigênio total; DQOt, demanda química de oxigênio total; ST, sólidos totais; STV, sólidos totais voláteis; STF, sólidos totais fixos; SST, sólidos suspensos totais; SSV, sólidos suspensos voláteis; SSF, sólidos suspensos fixos; NO₂, nitrito; Pt, fósforo total; OD – Oxigênio Dissolvido-, dados não obtidos.

Tabela 2. Quantidade de sequências brutas e processadas (Mothur) a partir das amostras coletadas no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG/COPASA, Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Arrudas.

Amostras	Número sequências		Amostras	Número sequências	
	antes P	após P		antes P	após P
1D1	419082	75108	1D2	572556	80862
2D1	524696	93941	2D2	320627	39991
3D1	232028	27586	3D2	386364	45789
4D1	520948	90032	4D2	355332	36178
5D1	464356	88140	5D2	301026	69760
6D1	387526	62616	6D2	348511	79766
7D1	442993	58754	7D2	194250	36780
8D1	395021	55264	8D2	324637	43035
9D1	359042	13791	9D2	340678	84471
10D1	308971	51162	10D2	111948	5418
11D1	148414	11731	11D2	482908	101555
12D1	357655	50569	12D2	2848	67
13D1	303050	48367	13D2	360841	76526
14D1	297016	15236	14D2	265909	50870
15D1	340903	30658	15D2	209504	31778
16D1	221347	27479	16D2	515701	94073
17D1	307547	26511	17D2	265871	35846
18D1	354657	38184	18D2	330783	39064
19D1	257663	8899	19D2	70459	66372
20D1	1080462	135282	20D2	484295	98832
TOTAL	7723377	1009310	TOTAL	6245048	1117033

antes P, antes do processamento; após P, após o processamento.

Figura 8. Abundância relativa dos domínios Bacteria e Archaea das amostras coletadas no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG/COPASA, Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Arrudas.

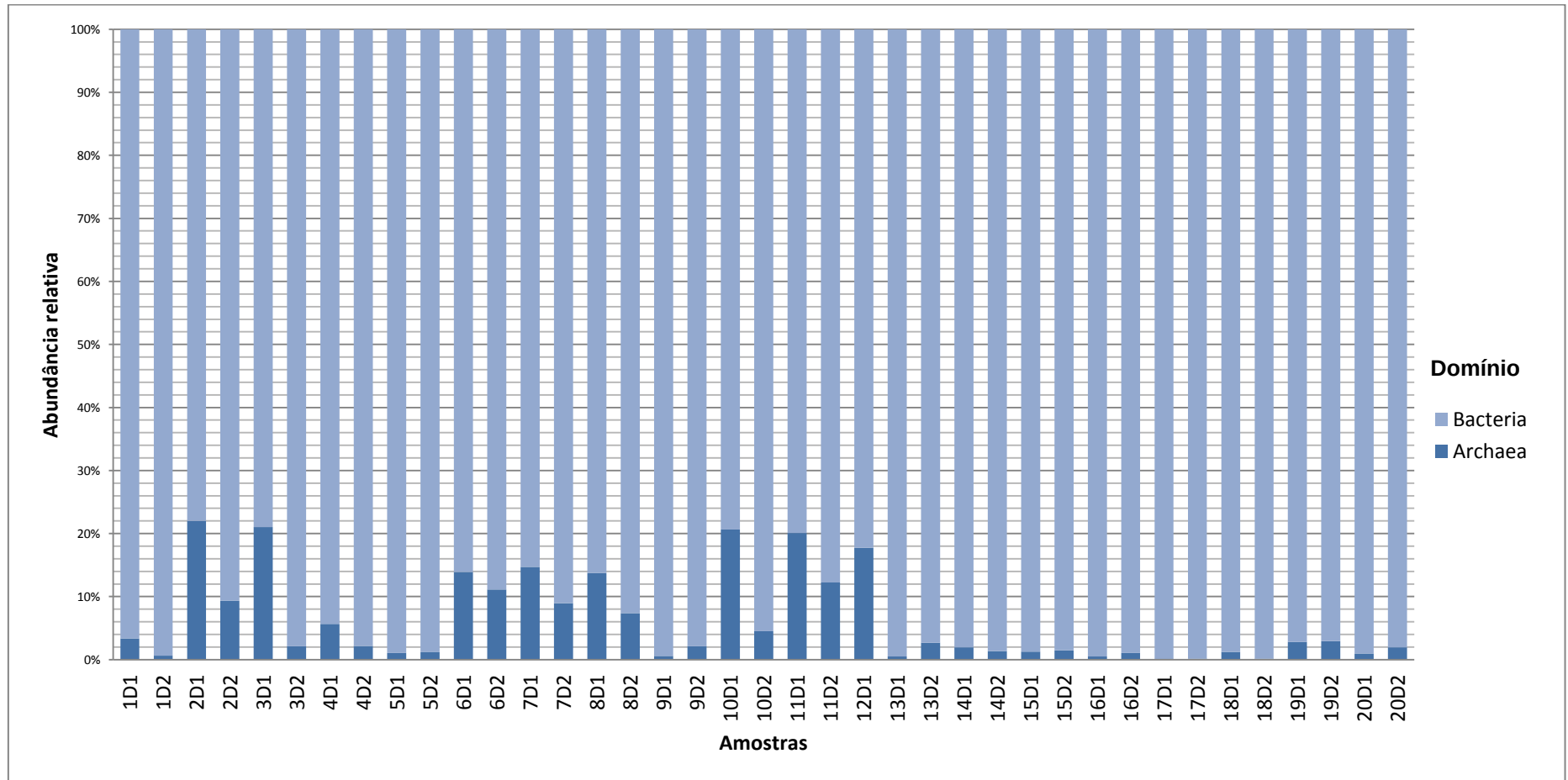


Tabela 3. OTUs com abundância relativa superior a 1% em todos os pontos de coleta no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG/COPASA, Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Arrudas.

OTU	M	D	Fi	C	O	Fa	G
1	7,79%	B	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	<i>Arcobacter</i>
2	5,83%	B	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>
4	4,43%	A	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i>
20	4,19%	B	-	-	-	-	-
3	3,76%	B	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Cloacibacterium</i>
10	2,77%	B	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	-
5	2,19%	B	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	-
11	1,98%	B	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	WCHB1-69	-
9	1,91%	B	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Chromatiaceae	<i>Nitrosococcus</i>
8	1,84%	B	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae_1	<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>
7	1,61%	B	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Moraxella</i>
13	1,61%	B	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophaceae	<i>Smithella</i>
35	1,49%	B	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>
37	1,48%	B	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	-	-
12	1,29%	B	Chlorobi	Chlorobia	Chlorobiales	SJA-28	-
22	1,25%	B	Proteobacteria	-	-	-	-
29	1,24%	B	Firmicutes	-	-	-	-
16	1,14%	B	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	-
26	1,11%	B	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Deltaproteobacteria_Incertae_Sedis	Syntrophorhabdaceae	<i>Syntrophorhabdus</i>
15	1,04%	B	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	<i>Macellibacteroides</i>
17	1,00%	B	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophaceae	<i>Syntrophus</i>

OTU, unidade taxonômica operacional; M, média; D, domínio; Fi, filo; C, classe; O, ordem; Fa, família; G, gênero; A, Archaea; B, Bacteria; -, dado não obtido

Figura 9. Distribuição dos filos de Bacteria e Archaea detectados com maior abundância relativa em cada amostra coletada no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG/COPASA, Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Arrudas.

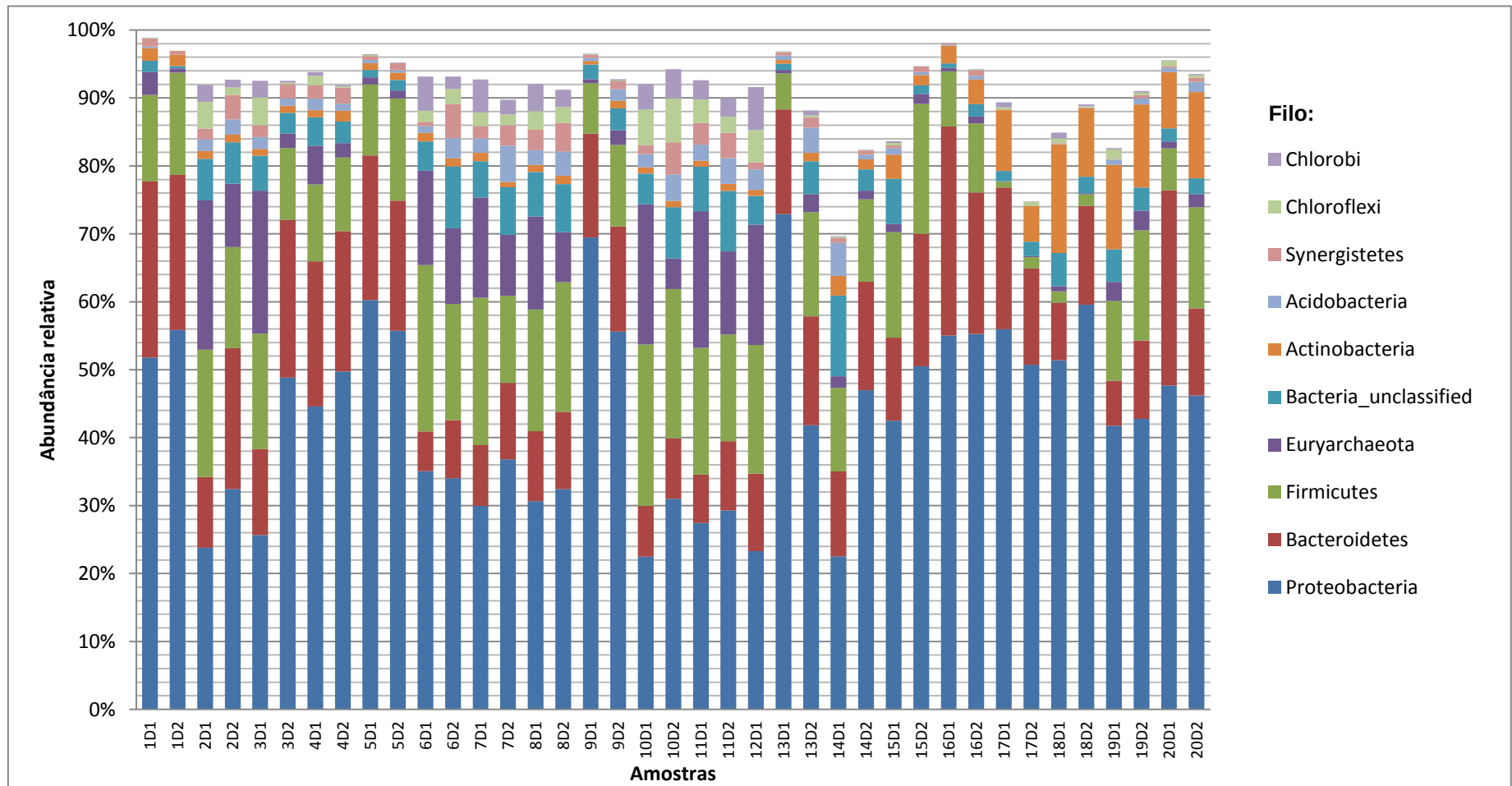


Figura 10. Distribuição dos gêneros de Bacteria e Archaea detectados com maior abundância relativa em cada amostra coletada no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG/COPASA, Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Arrudas.

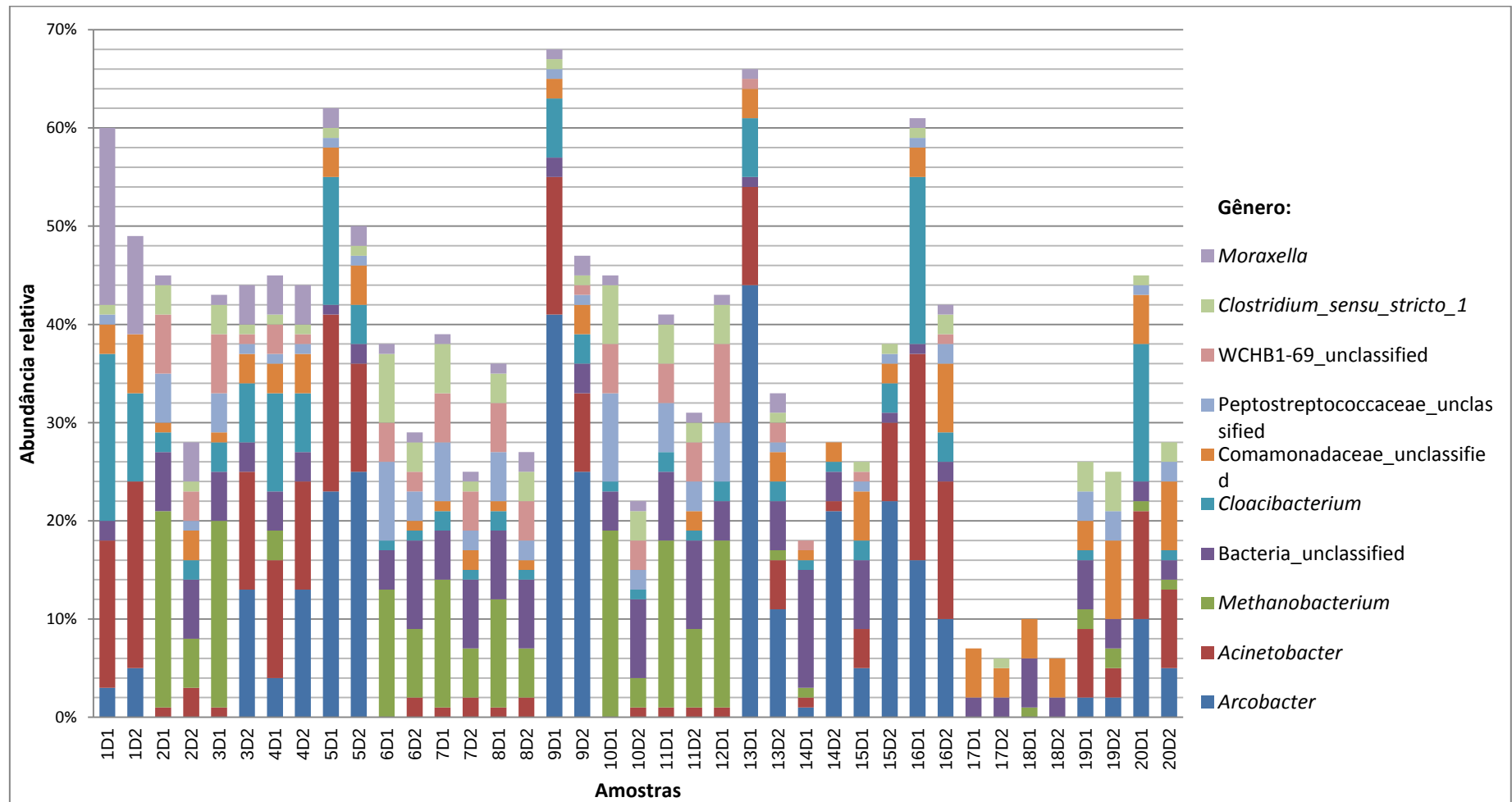
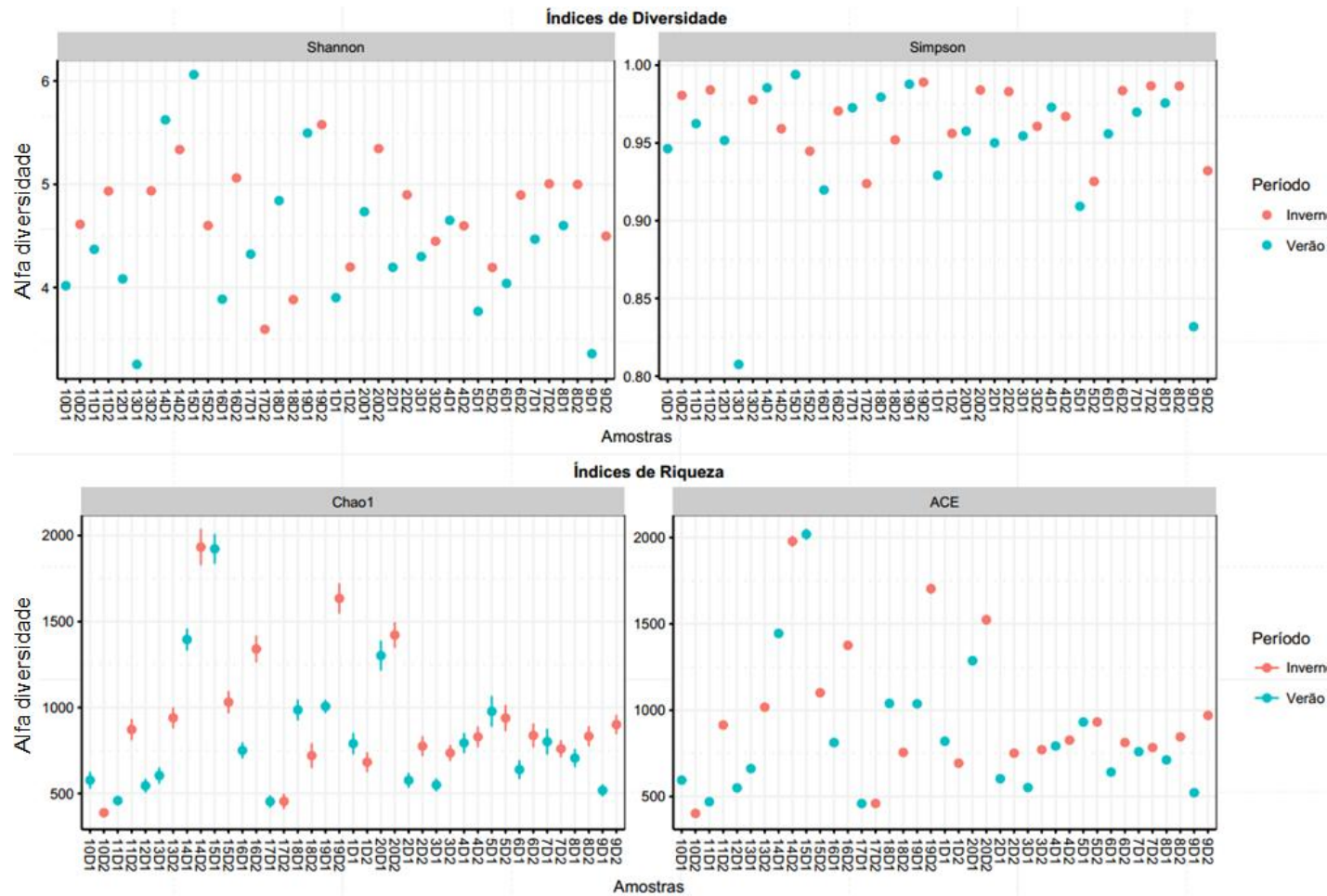


Tabela 4. Alfa diversidade das amostras coletadas no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG/COPASA, Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Arrudas, avaliada pelos índices de riqueza (ACE e Chao1) e diversidade (Shannon e Simpson).

5

Amostra	Riqueza		Diversidade	
	Chao1	ACE	Shannon	Simpson
1D1	790,15	819,93	3,9	0,9291
2D1	576,45	602,98	4,2	0,9500
3D1	549,86	551,8	4,3	0,9545
4D1	793,73	792,79	4,65	0,9729
5D1	977,51	931,23	3,77	0,9092
6D1	638,9	641,53	4,04	0,9558
7D1	801,63	759,59	4,47	0,9698
8D1	705,94	711,97	4,6	0,9757
9D1	518	522,25	3,36	0,8318
10D1	577,33	594,8	4,02	0,9463
11D1	458,64	469,49	4,37	0,9624
12D1	545,13	550,02	4,08	0,9516
13D1	604,46	661,73	3,26	0,8076
14D1	1395,33	1444,58	5,62	0,9854
15D1	1922,75	2018,89	6,06	0,9939
16D1	750,51	812,18	3,89	0,9197
17D1	453,59	459,29	4,32	0,9726
18D1	985,91	1038,78	4,84	0,9794
19D1	1006,61	1036,96	5,5	0,9877
20D1	1301,91	1286,83	4,73	0,9576
1D2	682,16	693,2	4,2	0,9561
2D2	775,13	750,87	4,9	0,9830
3D2	735,54	771,01	4,45	0,9607
4D2	829,24	826,32	4,6	0,9670
5D2	938,72	931,64	4,19	0,9252
6D2	837,62	812,59	4,9	0,9836
7D2	760,21	783,66	5	0,9867
8D2	832,89	845,78	5	0,9866
9D2	900,86	969,59	4,5	0,9321
10D2	388,2	402,2	4,61	0,9806
11D2	871,94	914,04	4,93	0,9840
13D2	939,94	1017,56	4,94	0,9776
14D2	1932,85	1978,33	5,34	0,9591
15D2	1030,81	1100,67	4,6	0,9447
16D2	1340,33	1375,64	5,06	0,9705
17D2	454,33	459,93	3,6	0,9238
18D2	720,26	755,39	3,88	0,9519
19D2	1634,32	1703,41	5,58	0,9890
20D2	1421,68	1523,54	5,34	0,9840

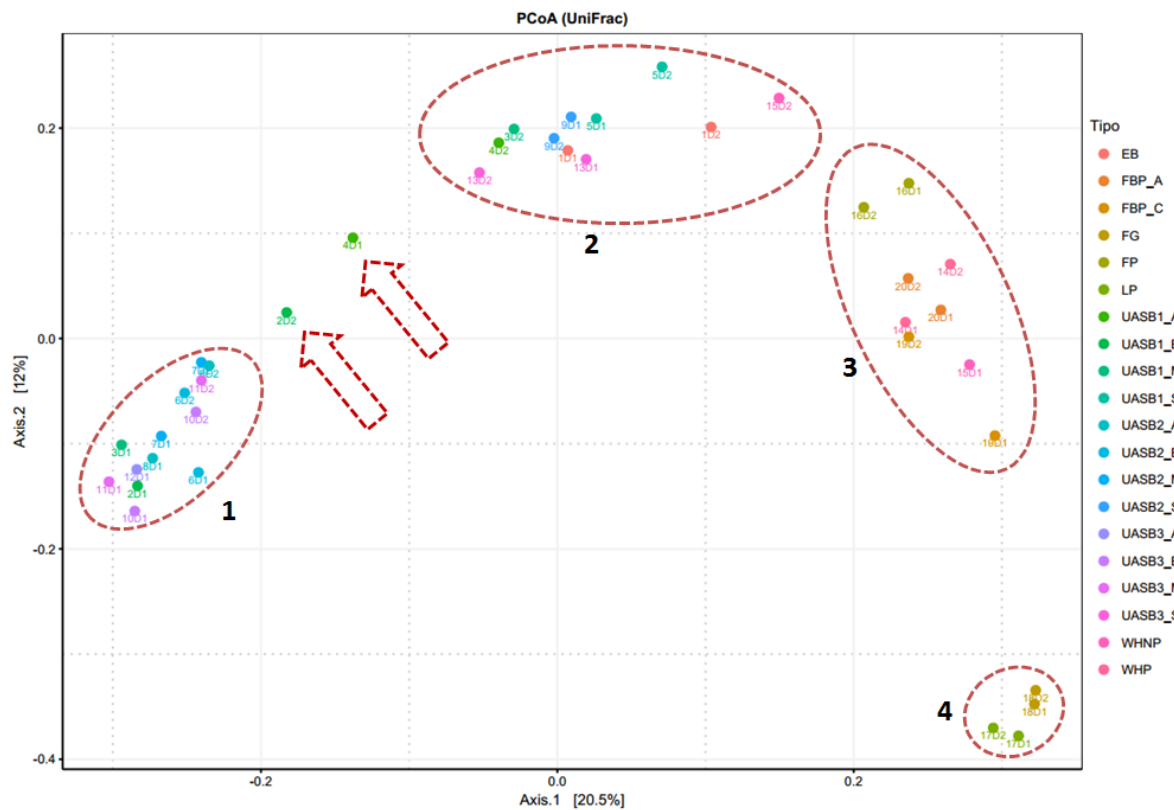
Figura 11. Alfa diversidade das amostras coletadas no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG/COPASA, Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Arrudas, avaliada pelos índices de diversidade (Shannon e Simpson) e de riqueza (ACE e Chao1).



No que se refere à beta diversidade, como mostrado na Fig. 12, há uma tendência das comunidades microbianas a formarem quatro subgrupos (círculos tracejados) entre os tipos de amostra. Apenas duas amostras, do mesmo reator UASB, mas, provenientes de alturas distintas, não foram devidamente agrupadas (setas tracejadas). No entanto, há uma maior proximidade da amostra de leito de lodo do reator UASB1 (2D2) com o grupo 1 e da amostra da porção superior do mesmo reator (4D1) com o grupo 2.

O agrupamento 1 reúne amostras coletadas, predominantemente, na zona de reação do reator, com exceção das amostras 8D1 e 8D2, ambas provenientes de um *pool* dos dois pontos mais altos (1,5 m + 2,0 m) do reator UASB2 e da amostra 12D1, obtida do ponto mais alto dentro do reator UASB3. O agrupamento 2 aglomera, predominantemente, amostras coletadas das saídas e de pontos internos próximos às saídas dos três reatores, exceto 15D2, amostra coletada na saída do WHNP durante o período seco. O agrupamento 3 congrega, predominantemente, amostras coletadas nas saídas de diferentes tipos de pós-tratamento. Por fim, o agrupamento 4 reúne amostras obtidas após lagoa de polimento e filtro grosseiro, que são pós-tratamentos interligados, que recebem, na ordem mencionada acima, o efluente do UASB 2.

Figura 12. Beta diversidade - análise de coordenadas principais (PCoA) baseada em UniFrac.



5

5.4 DISTRIBUIÇÃO DE BACTERIA E ARCHAEA EM DIFERENTES PONTOS DOS REATORES UASB

10 Para a comparação entre os diferentes pontos dos reatores UASB, foram considerados, inicialmente, os 10 filos com maior abundância relativa em cada uma das três subdivisões internas dos reatores UASB (UASB_B, UASB_M e UASB_A). Nas amostras de UASB_B e UASB_M, os filos com abundância

15 relativa expressiva ($\geq 10\%$) foram, respectivamente, Proteobacteria (30% e 33%), Firmicutes (20% e 16%), Euryarchaeota (14% e 13%) e Bacteroidetes (10% e 12%), conforme Fig. 13 e 14. Diferentemente das subdivisões inferiores, UASB_A

(Fig. 15) apresentou apenas três filós com abundância relativa expressiva, Proteobacteria (42%), Bacteroidetes (15%) e Firmicutes (14%).

5

Figura 13. Composição, considerando os 10 filós mais abundantes, das amostras da porção inferior (UASB_B) de cada reator UASB em cada coleta.

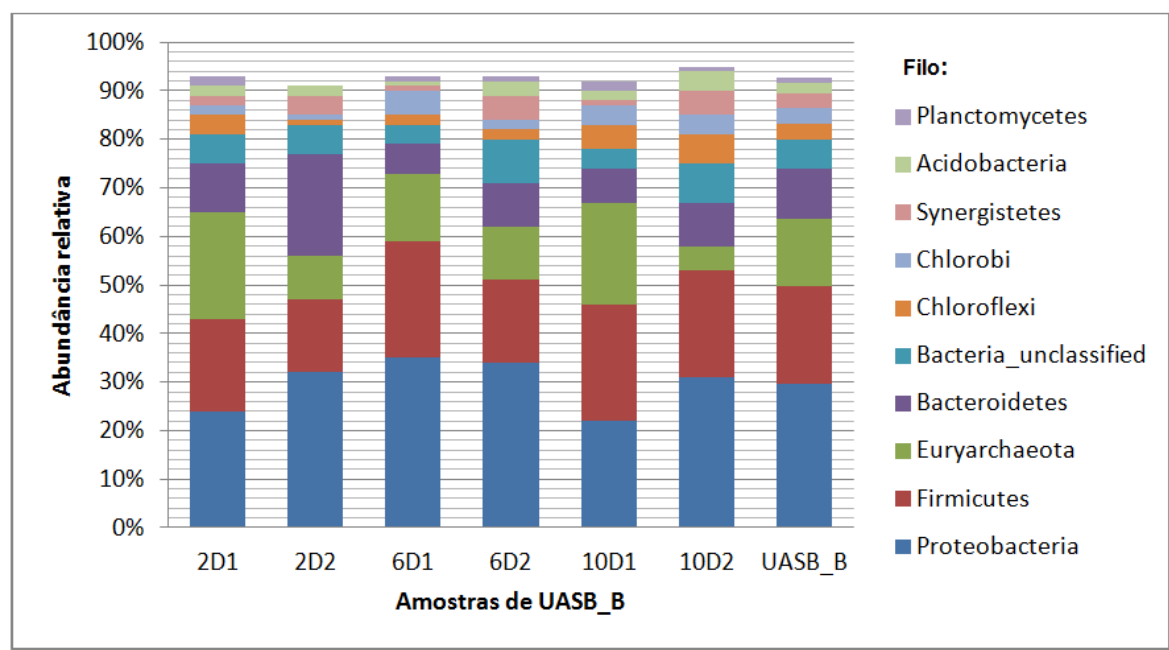
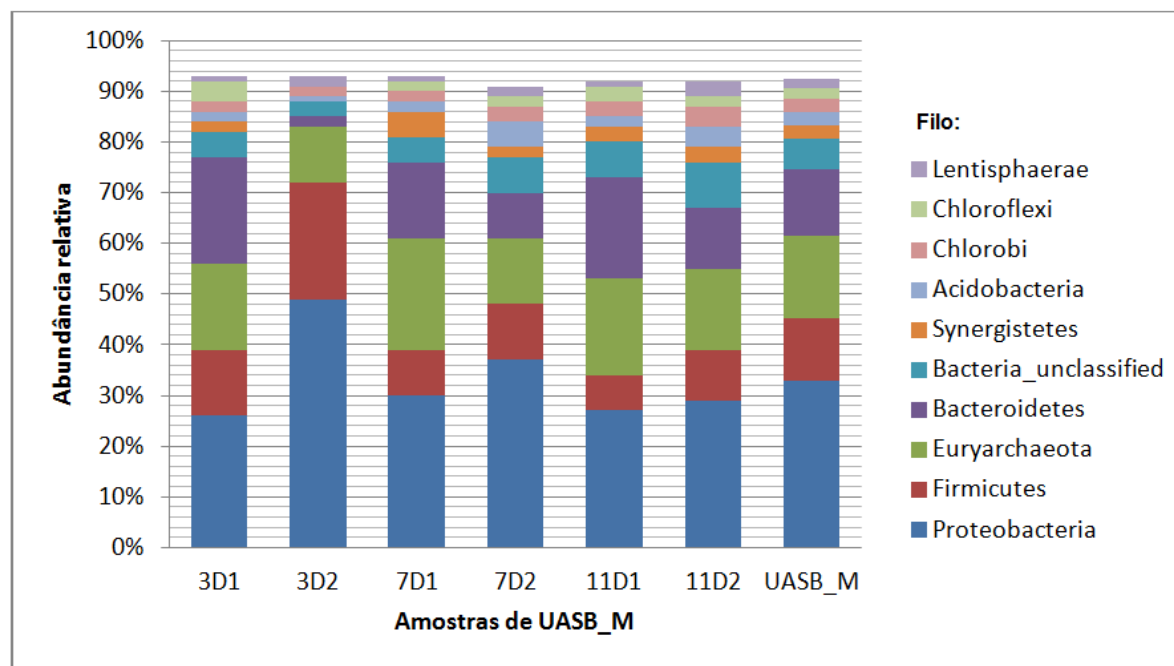
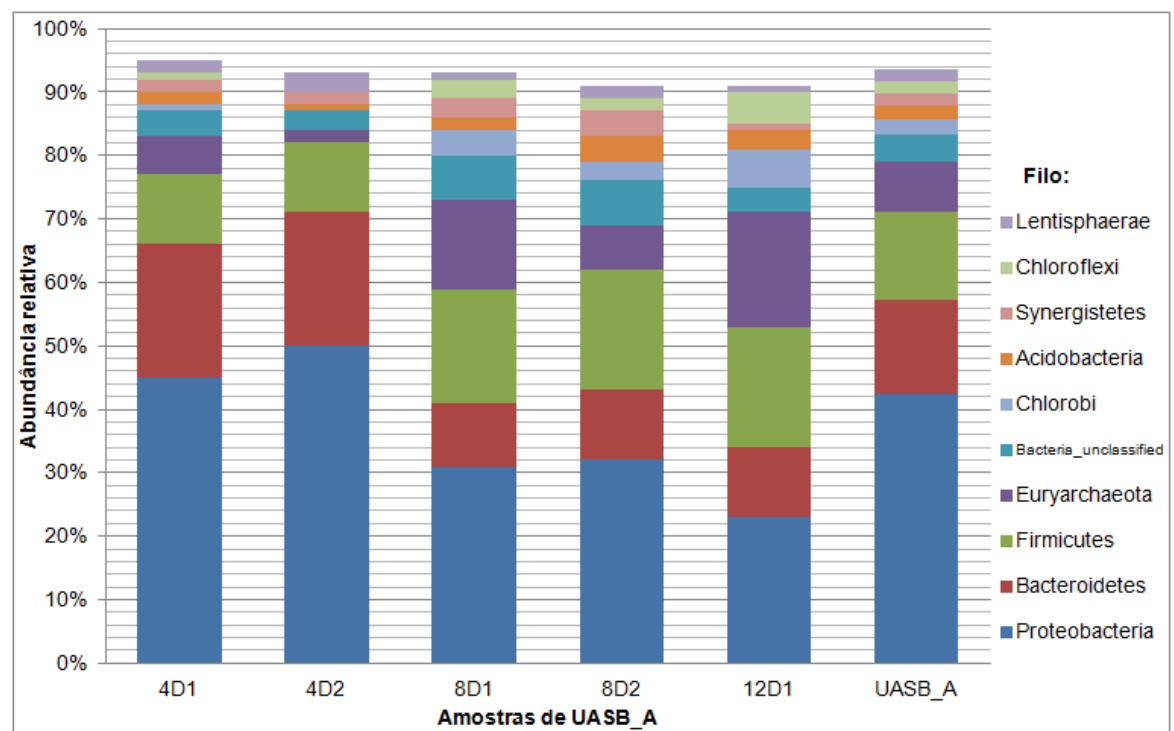


Figura 14. Composição, considerando os 10 filós mais abundantes, das amostras da porção intermediária (UASB_M) de cada reator em cada coleta.



5

Figura 15. Composição, considerando os 10 filós mais abundantes, das amostras da porção superior (UASB_A) de cada reator em cada coleta.



Da mesma forma, as 10 classes com maior abundância relativa foram consideradas para comparação entre os diferentes pontos dos reatores UASB. Para UASB_B, quatro classes totalizaram abundância relativa de 50%; são elas, Clostridia (17%), Deltaproteobacteria (14%), Methanobacteria (11%) e Gammaproteobacteria (8%; Fig. 16). No que se refere UASB_M, destacam-se as classes Deltaproteobacteria (14%), Clostridia (13%), Methanobacteria (10%) e Gammaproteobacteria (9%), que somam abundância relativa de 46% (Fig. 17). Nas amostras de UASB_A, seis classes, Gammaproteobacteria (12%), Clostridia (12%), Deltaproteobacteria (11%), Methanobacteria (7%), Bacteroidia (5%) e Betaproteobacteria (5%) somaram abundância relativa de 52% (Fig. 18).

Figura 16. Composição, considerando as 10 classes mais abundantes, das amostras da porção inferior (UASB_B) de cada reator em cada coleta.

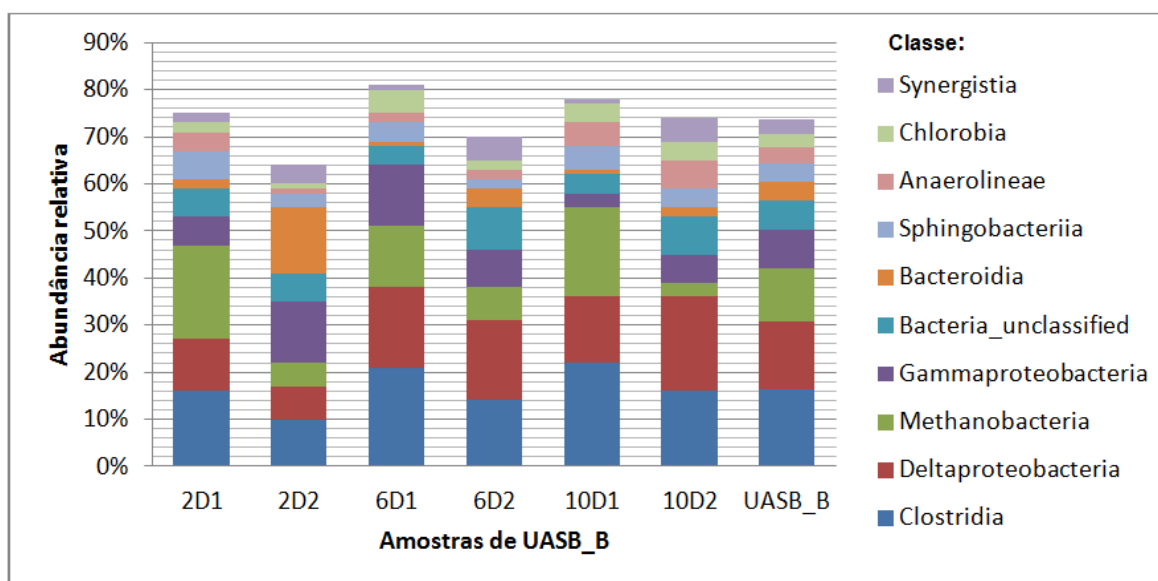
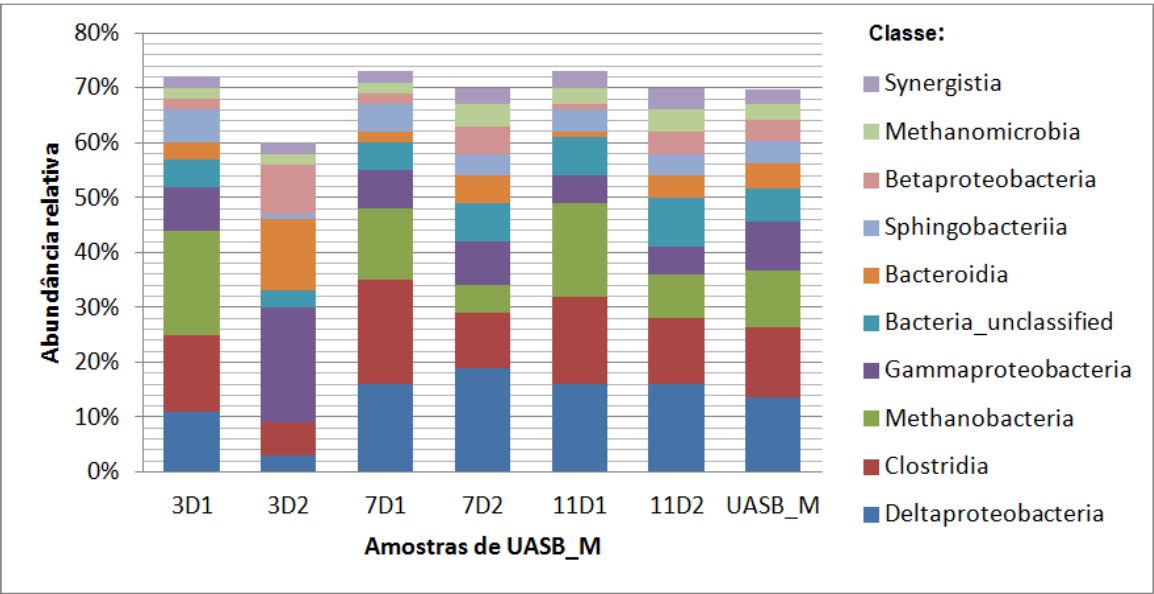
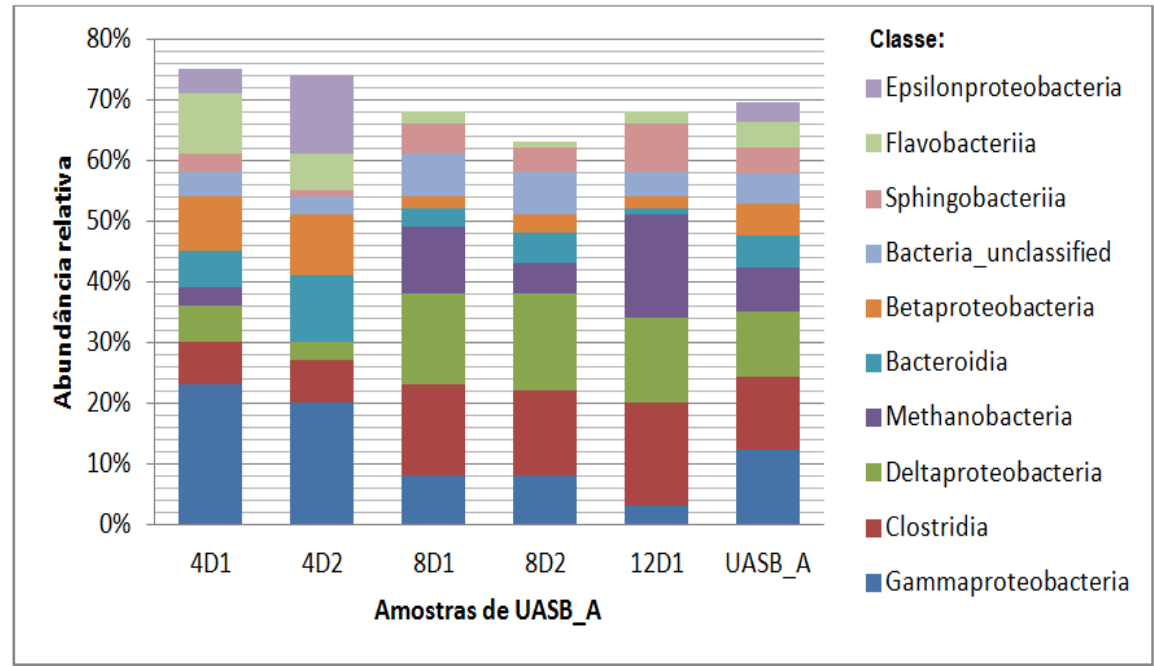


Figura 17. Composição, considerando as 10 classes mais abundantes, das amostras da porção intermediária (UASB_M) de cada reator em cada coleta.



5

Figura 18. Composição, considerando as 10 classes mais abundantes, das amostras da porção superior (UASB_A) de cada reator em cada coleta.



Os gêneros com abundância relativa média igual ou superior a 1% foram descritos para cada uma das três subdivisões internas dos reatores. *Methanobacterium* foi o gênero mais abundante em todas as amostras estudadas. Nas amostras relacionadas a UASB_B, a soma da abundância de todos os gêneros com, no mínimo, 1% de abundância relativa em relação a todas as amostras, totalizou 62%. A Fig. 19 apresenta os gêneros predominantes. Para as amostras de UASB_M, 60% foi o resultado da soma da média das abundâncias relativas, conforme Fig. 19. A Fig. 20 apresenta a distribuição dos gêneros mais abundantes nas amostras correspondentes às porções superiores dos reatores (UASB_A). A soma das médias das abundâncias relativas totalizou 61%.

Figura 19. Composição, considerando os gêneros com abundância relativa média igual ou maior que 1%, das amostras da porção inferior (UASB_B) de cada reator em cada coleta.

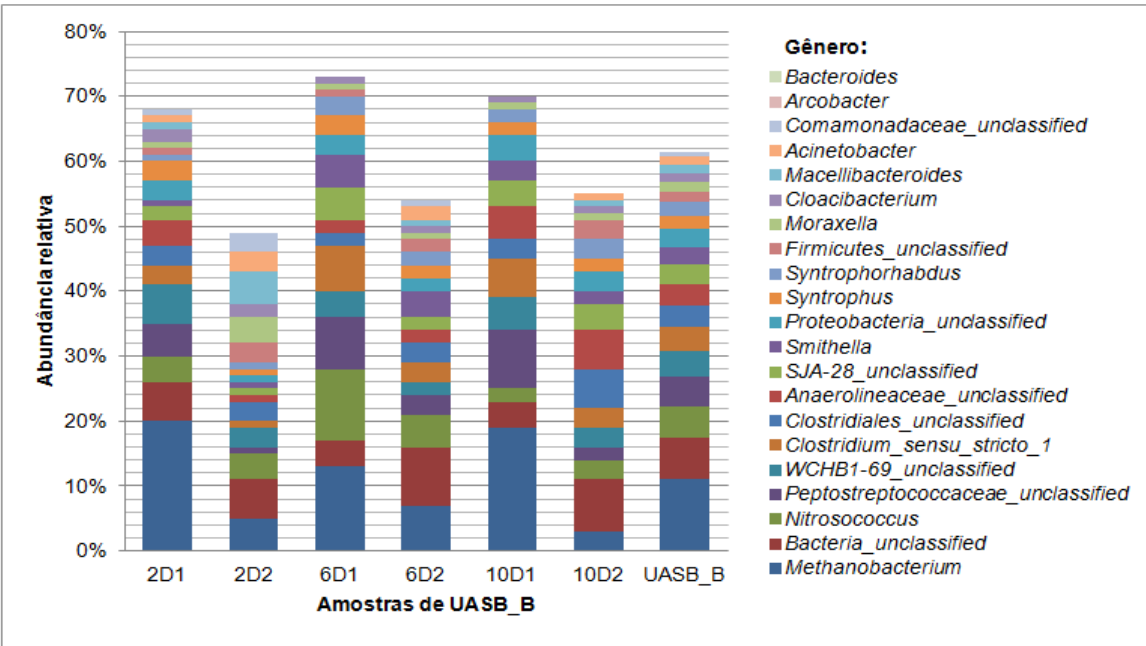


Figura 20. Composição, considerando os gêneros com abundância relativa média igual ou maior que 1%, da porção inferior (UASB_M) de cada reator em cada coleta.

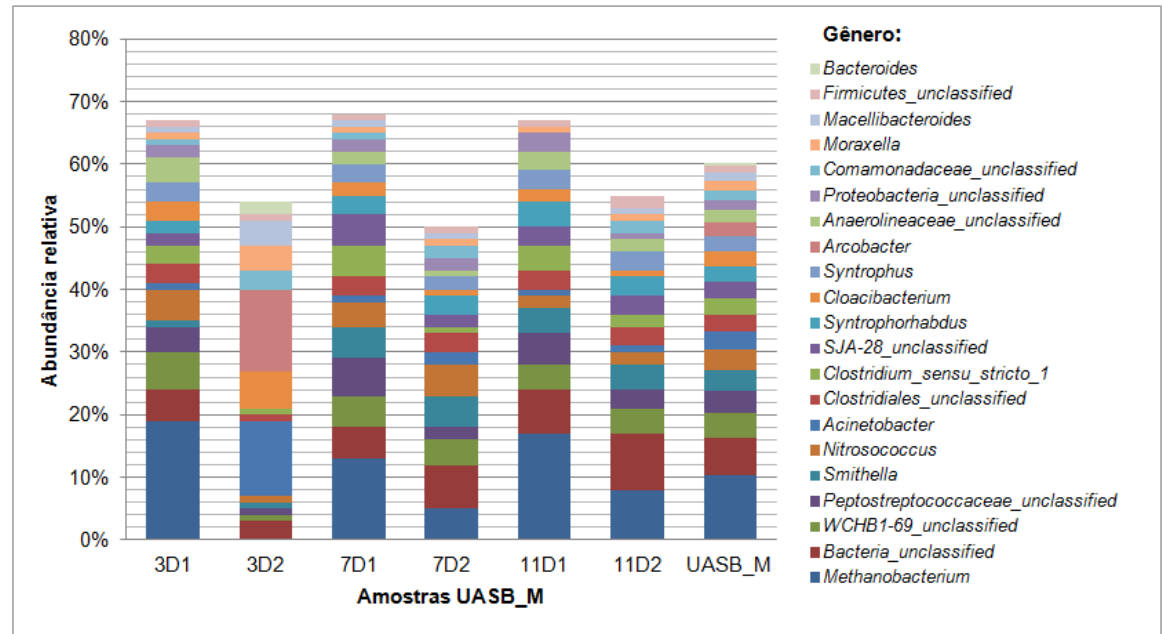
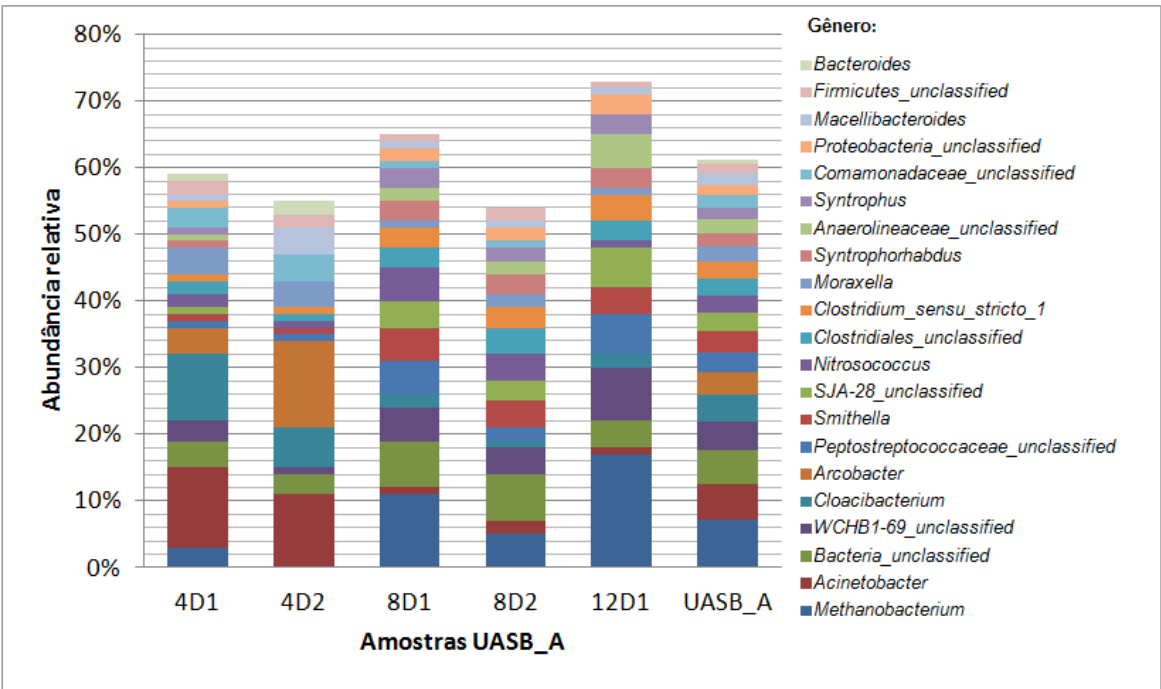


Figura 21. Composição dos gêneros com abundância relativa média igual ou maior que 1% da porção inferior (UASB_A) de cada reator e em cada período de coleta.



5.5 INVESTIGAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE E DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS NA ALFA-DIVERSIDADE DA COMUNIDADE DE BACTERIA E ARCHAEA EM REATORES UASB E SISTEMAS DE PÓS-TRATAMENTO DE ESGOTO

5

Não se detectou influência da sazonalidade na diversidade (índice de Shannon) de Bacteria e Archaea. No que se refere aos parâmetros físico-químicos, observou-se associação estatisticamente significativa apenas entre concentração de nitrato e diversidade avaliada pelo índice de Shannon ($p = 0,0002463$).

10 A diversidade (índice de Simpson) e a riqueza (índices de Chao1 e ACE) não foram influenciadas significativamente por sazonalidade ou pelos parâmetros físico-químicos analisados.

15

5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DIFERENTES SISTEMAS DE TRATAMENTO DE ESGOTO EM BACTÉRIAS POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS COM ROTA DE TRANSMISSÃO FECAL-ORAL

20

Das 21 OTUs descritas (Tabela 3), resultado da soma de todas as médias correspondentes às OTUs incluídas em um mesmo gênero totalizando 1% ou mais de abundância relativa média em relação a todos os pontos de coleta, apenas *Arcobacter* destaca-se como patógenos potencial com rota de transmissão fecal-oral. As demais OTUs correspondentes ao táxon gênero não se relacionam a organismo com esta rota de transmissão.

25

Alguns gêneros cujos representantes são potenciais patógenos que podem ser transmitidos via fecal-oral também foram encontrados nas amostras correspondentes aos efluentes de saída, porém com baixíssima abundância relativa (<1%). Mencionam-se *Aeromonas* (0,47%), *Enterococcus* (0,07%) e *Escherichia-Shigella* (0,21%). A Fig. 22 ilustra as abundâncias relativas dos gêneros supracitados em cada um dos pontos estudados.

30

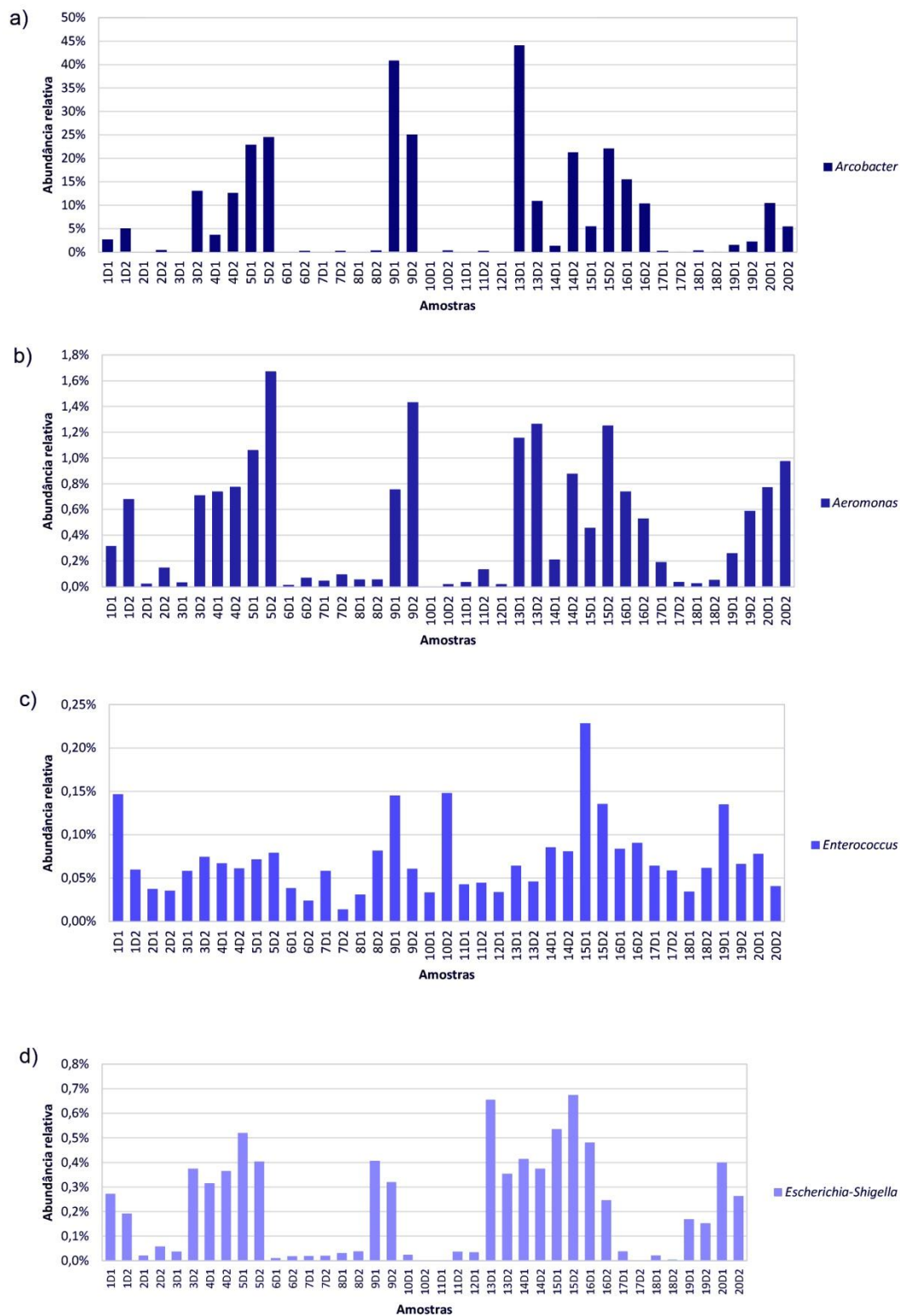
A abundância relativa de *Arcobacter* foi de 3% e 5% nas amostras de esgoto bruto, primeira e segunda coleta, respectivamente. Esses valores aumentam nas amostras coletadas nas saídas dos três reatores UASB, em ambas as coletas (amostras 5D1, 5D2, 9D1, 9D2, 13D1 e 13D2). Após passarem pelas etapas de pós-tratamento, apenas os efluentes correspondentes às amostras 14D1, 17D1, 17D2, 18D1, 18D2, 19D1 e 19D2 reduziram a abundância relativa para nula ou menor do que aquelas provenientes do esgoto bruto.

A abundância relativa de *Aeromonas* no esgoto bruto foi de 0,32% e 0,68% nas coletas 1 e 2, respectivamente. Esses valores aumentaram nas amostras coletadas nas saídas dos três reatores UASB. Nas amostras coletadas pós-tratamento, 14D1, 17D1, 18D1 e 19D1 (primeira coleta) e 16D2, 17D2, 18D2 e 19D2 (segunda coleta) apresentaram menor abundância relativa média quando comparada com as respectivas amostras iniciais (esgoto bruto).

A abundância relativa de *Enterococcus* nas amostras 1D1 e 1D2 foi de 0,15% e 0,06%, respectivamente. Os reatores UASB1 e UASB3 lançaram efluentes com abundância menor que 0,15% na primeira coleta, assim como todos os pós-tratamentos, com exceção de 15D1. Por outro lado, somente o UASB3 foi capaz de reduzir a abundância relativa dos representantes de *Enterococcus* para menos de 0,06% na segunda coleta e, no pós-tratamento, apenas a amostra 20D2 apresentava abundância relativa deste gênero menor do que aquela presente no seu respectivo esgoto bruto.

Os valores 0,27% e 0,19% correspondem, respectivamente, às abundâncias relativas de *Escherichia-Shigella* nas amostras 1D1 e 1D2. Todos os efluentes dos reatores UASB, nas duas coletas, apresentaram valores de abundância relativa maiores que os iniciais. As amostras 17D1, 17D2, 18D1, 18D2, 19D1 e 19D2 apresentaram redução da abundância relativa em relação aos seus respectivos esgotos brutos.

Figura 22. Abundância relativa de gêneros bacterianos potencialmente patogênicos com rota de transmissão fecal-oral.



6 DISCUSSÃO

5 Ambientes aquáticos são ótimos propagadores de microrganismos. É de especial relevância a possibilidade de veiculação de amostras patogênicas, sobretudo, nos corpos de água que recebem afluentes contaminados. As estações de tratamento de esgoto, instalações que objetivam adequar os efluentes para seu devido lançamento nos corpos de água receptores, são cada vez mais importantes,
10 principalmente, no que se refere ao acompanhamento do aumento de fontes poluidoras, como aquelas encontradas em ambientes urbanos e industriais, dentre outros (Von Sperling; Chernicharo, 2005).

A aceleração da depuração do esgoto pode ser feita com diversos tipos de sistemas de tratamento que compõem as ETEs (Lins, 2010). Os reatores
15 anaeróbios de fluxo ascendente em manta de lodo são uma ótima alternativa para o tratamento de esgotos, tanto pela alta eficiência de funcionamento em regiões tropicais, como pela menor necessidade de espaço para sua instalação (Sobrinho; Jordão, 2001; Von Sperling, 2005). Esses reatores, no entanto, não são capazes de, sozinhos, adequar o esgoto a níveis físicos, químicos e
20 biológicos adequados para lançamento no ambiente e, portanto, necessitam de etapas de pós-tratamento (Chernicharo, 2006).

Considerando a importância da água e a necessidade de depuração do esgoto para preservação desse recurso e do ambiente como um todo, conhecer a comunidade de bactérias e arqueias presentes em cada etapa do tratamento é
25 primordial, tanto para a tomada de decisões sobre os processos a serem empregados como para a constante melhoria do processo. Assim, conduzimos esta investigação com o objetivo de avaliar a composição de Bacteria e Archaea no esgoto bruto, reatores UASB e afluentes de etapas de pós-tratamento do CePTS UFMG/COPASA. A CePTS UFMG/COPASA é uma planta experimental,
30 que recebe o mesmo esgoto *in natura* que a ETE Arrudas e conta, entre outros, com reatores UASB, lagoas de polimento, diversos filtros e *wetlands*.

No que se refere à análise a comunidade de Bacteria e Archaea, no nível de domínio, observou-se grande predomínio de Bacteria. Apenas 6% das sequências encontradas correspondiam a Archaea. Embora este seja um percentual baixo, não se deve subestimar a participação do grupo taxonômico no tratamento de efluentes, principalmente em reatores UASB, visto que as arqueias desempenham um papel primordial na decomposição da matéria orgânica. Deve-se mencionar, ainda, que é possível que a presença de arqueias esteja subestimada, ou seja, OTUs não identificadas possam corresponder a arqueias cujas sequências ainda não estejam incluídas no banco de dados utilizado, Silva v.123 (Quast *et al.*, 2013).

As arqueias são microrganismos que apresentam uma série de exigências bioquímicas que podem ser encontradas dentro dos reatores UASB, mais especificamente, na zona de reação, onde estão localizadas a manta de lodo e o leito de lodo (Chernicharo, 2007). A detecção de dosagens elevadas de sólidos nas partes internas dos reatores estudados, conforme descrito para ambas as coletas, reforça esta observação, pois são fonte de matéria orgânica e, logo, de nutrientes.

Todas as amostras do período chuvoso provenientes da zona de reação dos reatores apresentaram maior abundância de arqueias em relação às suas correspondentes do período seco. Na amostra 12D1 também se detectou grande quantidade de arqueias, mas, ela não pôde ser comparada com a amostra correspondente obtida no período seco, porque esta foi excluída das análises estatísticas em decorrência do número baixo de sequências obtidas. Um erro nas etapas prévias ao sequenciamento é uma hipótese para explicar o fato. A razão para a exclusão da amostra é a possibilidade de geração de viés estatístico por amostras com um número de sequências menor que 500.

A grande maioria das sequências de Archaea detectadas pertence ao filo Euryarchaeota, cujos representantes são metanogênicos (Chernicharo, 2007; Ziemiński; Frac, 2012; Shah *et al.*, 2014). Como já pré-estabelecido para o contexto da digestão anaeróbia de matéria orgânica, a presença de microrganismos metanogênicos, sobretudo representantes do filo Euryarchaeota, em reatores UASB é primordial para a realização da etapa

metanogênica. Ainda, foram encontradas sequências correspondentes a Thaumarchaeota, filo recentemente incorporado ao domínio Archaea após diversas análises moleculares (Brochier-Armanet *et al.*, 2008; Spang *et al.*, 2010). Microrganismos incluídos neste filo participam de ciclos biogeoquímicos, como o ciclo do nitrogênio (Brochier-Armanet *et al.*, 2008). Thaumarchaeota possui genes que oxidam a amônia, etapa inicial do processo de nitrificação que, anteriormente, era relacionado apenas a grupos especializados de Beta e Gamaproteobacteria (Kowalchuk and Stephen 2001; Stieglmeier, 2014). No entanto, estudos sobre a descoberta de Thaumarchaeota em estações de tratamento de esgoto ainda são raros, necessitando, portanto, de novas pesquisas na área.

Em relação às sequências de Bacteria, no que se refere a filos, Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes dominaram o conjunto de dados e estiveram presentes em todas as amostras, mesmo nos efluentes lançados após as etapas de pós-tratamento. A predominância desses filos também foi relatada em outros estudos que avaliaram águas residuárias.

Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes foram os filos encontrados com maior abundância, em composições relativas distintas, em trabalhos que analisaram a comunidade bacteriana em sistemas de tratamento de esgoto (Nelson, 2011; Lee, 2012; Enitan, 2014; Jang *et al.*, 2014; Lee, 2014). Em especial, representantes de Proteobacteria, geralmente, ocupam o topo do *ranking* dos microrganismos tipicamente mais abundantes em água doce (Williams *et al.*, 2004; Zwart *et al.*, 2002; Eichler *et al.*, 2006; Pinto, 2012). Isto pode explicar a predominância do filo nas amostras estudadas. A abundância relativa elevada de Bacteroidetes e Firmicutes podem ser explicadas por sua presença massiva na microbiota intestinal humana, como já relatado em diversos trabalhos (Zoetendal; Rajilic-Stojanovic; de Vos, 2008; Li, 2009; Mariat *et al.*, 2009; Arumugam *et al.*, 2011; Gerritsen *et al.*, 2011). Ainda sobre os filos, Paiva e colaboradores (2015), utilizando a região V6 do rDNA 16S para o sequenciamento, encontraram Proteobacteria e Firmicutes em maior abundância relativa no esgoto bruto da mesma ETE, ao passo que os níveis de Bacteroidetes foram menores, em relação ao presente trabalho.

Entre os 10 filos mais abundantes, houve a presença de grupos que foram classificados como “Bacteria_unclassified”. O termo se refere a um conjunto de microrganismos sabidamente pertencentes ao domínio Bacteria, para os quais o grupo taxonômico hierarquicamente inferior não pôde ser determinado.

5 No que se refere aos 10 grupos mais abundantes no nível de gênero, cinco deles correspondem a táxons já descritos, quais sejam *Arcobacter*, *Acinetobacter*, *Cloacibacterium*, *Methanobacterium* e *Moraxella*. Entretanto, os outros cinco grupos não puderam ser definidos. São eles, Bacteria_unclassified, Comamonadaceae_unclassified, Peptostreptococcaceae_unclassified, WCHB1-69_unclassified e *Clostridium_sensu_stricto_1*. Comamonadaceae_unclassified e Peptostreptococcaceae_unclassified relacionam-se a agrupamentos não identificados das famílias Comamonadaceae e Peptostreptococcaceae, respectivamente. *Clostridium_sensu_stricto_1* é um agrupamento filogenético incluído no gênero *Clostridium* que não forma um grupo filogeneticamente coerente (Gupta; Gao, 2009) e WCHB1-69 é um agrupamento que pertence à família Bacteroidaceae.

A explicação para esse tipo de achado que não permite a definição no nível do táxon analisado pode ser a limitação do banco de dados de referência utilizado, Silva v.123 (Quast *et al.*, 2013). Outra hipótese é a possibilidade de que algumas sequências encontradas sejam potenciais representantes de novas espécies. Paiva e colaboradores (2015), trabalhando com lodos ativados, encontraram diversas OTUs que não puderam ser classificadas, sugerindo, também, potenciais representantes de novas espécies.

No que se refere aos gêneros que puderam ser definidos, *Arcobacter* é frequentemente encontrado em amostras de esgoto (Fisher *et al.*, 2014). *Acinetobacter* também é um grupo comumente detectado em esgoto. Shanks e colaboradores (2013), em um trabalho que compara comunidades microbianas de esgotos não tratados, relataram que *Acinetobacter* e outros seis gêneros, incluindo, *Arcobacter* e *Cloacibacterium*, também observados no presente estudo, foram as OTUs com abundâncias relativas mais proeminentes. Os autores também descreveram a presença de Comamonadaceae_unclassified que, em

conjunto com os gêneros mencionados acima somaram 40% das sequências encontradas.

A alfa diversidade foi avaliada para todas as amostras com base nos índices de diversidade Shannon e Simpson e nos índices de riqueza Chao1 e ACE. O primeiro grupo é utilizado para padronizar os valores para abundância e riqueza em um único valor, ao passo que o segundo grupo, por sua vez, estima o número total de espécies presentes em uma comunidade (Guralnick, 2007; Feest, 2010; Magurran, 2011).

Os índices de Shannon mensurados variaram de 3,26 (saída do UASB 3, primeira coleta) a 6,06 (saída da *wetland* horizontal não plantada, primeira coleta). Dentre os quatro menores índices de Shannon, três foram observados em amostras provenientes das saídas dos três reatores UASB. Considerando que o índice de Shannon considera igual peso entre espécies raras e abundantes (Magurran, 2011) e que, para atingir um resultado máximo, cada espécie representada deve ser composta por um número igual de indivíduos (Shannon; Weaver, 1963), é possível que, nessas amostras, os números de sequências para cada OTU relatada sejam bastante heterogêneas. Em contrapartida, as quatro amostras com maiores valores de Shannon são originárias de pontos de saídas de pós-tratamentos (WHP, WHNP e filtro biopercolador cilíndrico). Utilizando a mesma lógica, houve menor heterogeneidade na distribuição do número de sequências entre as amostras.

Os valores de diversidade obtidos empregando-se o índice de Simpson, por sua vez, apresentaram uma pequena variação em relação ao índice anterior para cada amostra. O menor (0,8076) e o maior (0,9939) valor foram observados para as mesmas amostras para as quais os índices de Shannon menos e mais elevados foram detectados, respectivamente. Da mesma forma, três dos quatro menores valores foram oriundos das saídas dos mesmos reatores UASB para os quais os menores índices de Shannon foram relatados. Ainda, três das quatro amostras com maiores índices de Simpson foram originárias de amostras de pós-tratamentos (WHNP, filtro biopercolador cilíndrico, ambas as coletas), como observado quando a diversidade foi avaliada pelo índice de Shannon.

Chao1 é um teste que se baseia no número de OTUs raras (*singleton* e *doubletons*), sendo que amostras com muitos *singletons* (OTU representada por apenas uma sequência na comunidade) tendem a ser superestimadas para riqueza (Bunge *et al.*, 2012). ACE, por sua vez, é um teste que, além dos
5 *singletons* e *doubletons*, baseia-se, também, naquelas OTUs representadas por mais de 10 sequências (Basualdo, 2011).

Nesta investigação, os sete menores valores para o teste de ACE foram encontrados exatamente nas mesmas amostras com os sete menores valores para o teste de Chao1, na mesma ordem. Isso significa que o número de OTUs
10 abundantes (> 10 sequências) não influenciaram significativamente em algumas amostras. Em contrapartida, as duas amostras com maiores valores nos dois testes para riqueza ocuparam posições inversas. Assim, a amostra originada da saída do WHP da segunda coleta apresentou 1932,9 e 1978,33 para os testes de Chao1 e ACE, respectivamente e a amostra proveniente da saída do WHNP da
15 primeira coleta exibiu os valores 1922,8 para Chao1 e 2018,89 para ACE. Em seguida, as próximas seis amostras coincidiram em suas posições no ranking com maiores índices de riqueza.

A PCoA com base na métrica de distância empregada, UniFrac, permitiu uma identificação visual da matriz de similaridade. Quatro agrupamentos principais e
20 duas amostras sem um perfil determinado foram identificados e analisados. A amostra 2D2, proveniente do leito de lodo do reator, apesar de não ser incluída em nenhum dos quatro subgrupos, permaneceu mais próxima do subgrupo 1. Esta proximidade pode ser explicada pela presença de outras amostras coletadas das porções internas inferiores dos reatores. Esses ambientes, por terem
25 características físico-químicas típicas, acabam exercendo fortes pressões seletivas, formando, portanto, comunidades peculiares. A amostra 4D1, proveniente da porção mais alta no interior do mesmo reator, ficou mais próxima do agrupamento 2, que engloba, em sua grande maioria, amostras originárias das saídas dos reatores UASB e também a amostra 4D2. Dessa forma, é
30 compreensível tal aproximação.

A aglomeração das amostras oriundas dos três diferentes filtros percoladores biológicos (FP, FBP_C e FBP_A) e dos dois diferentes *wetlands* fortalece a

hipótese de que todas as combinações de tratamento do CePTS, a partir do esgoto bruto, passando pelos UASBs, até os efluentes dos pós-tratamentos, criam um padrão na comunidade de bactérias e arqueias.

5 Apesar de também ser composto por amostras obtidas das etapas de pós-tratamento, o subgrupo 4 ficou visivelmente afastado do anterior. Uma hipótese que explica esse fato é que as características físico-químicas sejam peculiares, tornando o ecossistema seletivo. Além disso, o maior tempo de detenção hídrica do efluente na lagoa de polimento (17D1 e 17D2), bem como sua exposição ao ar atmosférico, fazem com que apenas alguns microrganismos consigam se estabelecer no local. As lagoas de polimento em série permitem remover, principalmente, organismos patogênicos e amônia, embora também reduzam os valores de fósforo (CePTS-Cartilha). Os valores de concentração de amônia das amostras 9D1/9D2 e 17D1/17D2 evidenciam um dos objetivos principais deste sistema de pós-tratamento. No entanto, a redução de fósforo só ocorreu para as amostras da primeira coleta (17D1 em relação a 9D1).

O filtro grosseiro (18D1 e 18D2) tem por objetivo retirar parcialmente algas, contribuindo para a remoção adicional de sólidos em suspensão e matéria orgânica (CePTS-Cartilha). Nossos dados demonstram que os valores de SST das amostras 17D1/17D2 são reduzidos nas amostras 18D1/18D2, ratificando, assim, um dos objetivos deste sistema de pós-tratamento.

Além da avaliação da comunidade de Bacteria e Archaea no esgoto bruto e em amostras obtidas após as diferentes etapas de tratamento, este estudo também comparou a composição microbiana em diferentes pontos dos reatores UASB. Assim, foram obtidas amostras de três pontos diferentes em cada reator, nas porções inferior, intermediária e superior.

Os três reatores, UASB 1, UASB 2 e UASB 3, exibem características estruturais diferentes, conforme descrito anteriormente no corpo deste trabalho. Apesar das características distintas, acredita-se que os três reatores apresentem comunidades de Bacteria e Archaea semelhantes. Entretanto, esperava-se perceber variações dessas comunidades entre as porções internas dos reatores (UASB_B, UASB_M e UASB_A).

Inicialmente, foi feita a média da abundância relativa das porções internas UASB_B, UASB_M e UASB_A, dos três reatores UASB 1, UASB 2 e UASB 3. Então, a amostra de cada porção foi comparada com a média daquela porção.

5 Dentre os filos de Bacteria mais abundantes, destacam-se Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes, nesta ordem. Proteobacteria foi o filo com abundância relativa predominante em todas as comunidades estudadas, com exceção da amostra 10D1 (UASB_B, primeira coleta), na qual ocupou a segunda posição, atrás de Firmicutes. Os três filos mencionados ocuparam os três primeiros lugares em termos de abundância relativa de Bacteria em todas as amostras, embora
10 nem sempre na mesma ordem. A predominância desses três filos também foi relatada por Cardinali-Rezende e colaboradores (2013), com base no sequenciamento de bibliotecas de clones de genes rRNA 16S provenientes de amostras do reator UASB 3 também utilizado neste trabalho.

Em relação a Archaea, apenas Euryarchaeota foi encontrado entre os 10 filos
15 mais abundantes. O grupo inclui arqueias que desempenham funções primordiais na zona de reação do reator UASB (Vazoller, 1999; Chernicharo, 2007; Shah, 2014).

Dentre as 10 classes mais abundantes dentro dos reatores, apenas Methanobacteria foi relatada na maior parte das amostras. Observou-se maior
20 quantidade do grupo nas porções inferiores e menor quantidade nas porções superiores dos reatores. Considerando que a produção de metano é maior na porção inferior do reator (Chernicharo, 2007), o resultado encontrado está coerente com a literatura.

Methanomicrobia estava entre as 10 classes mais abundantes com base na
25 média de UASB_M. Sua abundância relativa nesta porção variou de 2 a 4%, dependendo do reator e do período de coleta.

Entre as ordens de Euryarchaeota presentes em reatores UASB, destacam-se aquelas produtoras de metano, entre elas, Methanobacteriales (classe Methanobacteria), Methanococcales (classe Methanococci), Methanomicrobiales
30 (classe Methanomicrobia), Methanosarcinales (classe Methanomicrobia) e Methanopyrales (classe Methanopyri) (Vazoller, 1999; Chernicharo, 2007; Shah, 2014). Nesta investigação, Methanobacteriales, Methanocellales (classe

Methanomicrobia), Methanomicrobiales e Methanosarcinales foram encontradas. Methanosarcinales foi a ordem mais predominante relatada no trabalho de Cardinali-Rezende e colaboradores (2013).

5 O único gênero de arqueia detectado com abundância relativa igual ou superior a 1% foi *Methanobacterium*. Em termos de distribuição, a composição relativa média do organismo nos três reatores UASB estudados foi de 11%, 10% e 7% nas porções inferior, intermediária e superior, respectivamente, como esperado (Leclerc, 2001; Chernicharo, 2007).

10 Relativo a Bacteria, filo Proteobacteria, quatro classes foram encontradas entre as 10 mais abundantes em pelo menos uma das porções internas dos reatores. São elas Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Betaproteobacteria e Epsilonproteobacteria. A presença dessas classes em reatores UASB também foi relatada por Lucena (2008).

15 Os gêneros de Gammaproteobacteria encontrados com abundância relativa igual ou maior que 1% foram *Acinetobacter*, *Moraxella* e *Nitrosococcus*. Todos eles participam do ciclo do nitrogênio (Ward *et al.*, 2002).

Em relação aos gêneros de Deltaproteobacteria com abundância mínima de 1%, foram encontrados *Smithella*, *Syntrophorhabdus* e *Syntrophus*. *Smithella* parece desempenhar função importante na oxidação de enxofre (Aida *et al.*, 2014).
20 *Syntrophorhabdus* inclui bactérias anaeróbias obrigatórias, compatível com a ausência de oxigênio dentro dos reatores (Qiu *et al.*, 2008). *Syntrophus* contém espécies que degradam ácidos graxos (Jackson *et al.*, 1999).

Para Betaproteobacteria, apesar de alguns representantes exercerem papéis importantes na remoção de nutrientes de matéria orgânica (Cyzdik-Kwiatkowska;
25 Zielińska, 2016), apenas organismos não classificados no nível de gênero foram detectados no presente estudo.

Epsilonproteobacteria foi uma classe relatada para apenas três amostras, duas provenientes da porção superior do UASB1 nas duas coletas e outra originária da porção intermediária do mesmo reator na segunda coleta. *Arcobacter* foi o único
30 representante encontrado na lista dos gêneros com abundância mínima de 1%.

Microrganismos desse gênero despertam preocupação especial por serem patógenos potenciais para seres humanos (Moreno *et al.*, 2003).

5 No filo Firmicutes, a classe Clostridia foi a única encontrada com abundância significativa. De um modo geral, a abundância relativa dessa classe foi maior nas amostras da porção inferior dos reatores, quando comparadas com as demais porções. A ordem Clostridiales foi identificada, mas, categorias taxonômicas hierarquicamente inferiores não puderam ser identificadas. Firmicutes são relacionados a processos de fermentação e acetogênese (Nelson; Morrison; Yu, 2011; de Vrieze *et al.*, 2015). A concentração de Firmicutes foi maior nas
10 comunidades provenientes da porção inferior dos reatores e menor nas partes superiores.

O filo Bacteroidetes apresentou uma dinâmica de abundância relativa inversa ao de Firmicutes, sendo maior na parte superior dos reatores UASB. As classes Bacteroidia, Sphingobacteriia e Flavobacteriia foram as mais abundantes. Em
15 Bacteroidia, o gênero *Bacteroides* foi relatado nas mesmas amostras onde *Arcobacter* estava presente. *Clostridium* e *Bacteroides* são gêneros de bactérias acidogênicas comumente encontrados em reatores anaeróbios (Chernicharo, 2007). *Macellibacteroides*, também um gênero de Bacteroidia, também foi observado. O grupo apresenta atividade fermentativa (Jabari *et al.*, 2012). Dentro
20 da classe Sphingobacteriia, apenas representantes não classificados do agrupamento WCHB1-69 foram relatados. Já para a classe Flavobacteriia, o gênero *Cloacibacterium* foi detectado em maior ou igual abundância nas amostras de UASB_A em relação às amostras de UASB_M e UASB_B, em todos os reatores. Esse gênero foi relatado em estudos referentes à caracterização
25 microbiana em reator anaeróbio de leito fluidificado (Oliveira, 2010).

A presença de microrganismos com capacidade hidrolítica no processo de digestão anaeróbia é primordial para o funcionamento do processo. A hidrólise de polímeros é necessária para adaptar o tamanho da matéria orgânica para que possam atravessar as paredes celulares das bactérias fermentativas presentes no
30 interior do reator. Conforme estudos anteriores, exoenzimas (lipases, amilases e proteases) são produzidas por bactérias fermentativas hidrolíticas, principalmente, pelos gêneros *Clostridium*, *Micrococcus* e *Staphylococcus* (lipases); *Bacteroides*,

Butyivibrio, *Clostridium* e *Bacillus* (proteases); e *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Acetivibrio* e *Eubacterium* (amilases). A abundância relativa desses grupos é influenciada pelo tipo de substrato. A hidrólise permite a atuação de bactérias fermentativas acidogênicas (Chernicharo, 2007), como *Bacteroides* e *Clostridium_sensu_stricto_1*, encontrados neste estudo.

Ainda sobre o processo de digestão anaeróbia, o metabolismo realizado por bactérias sintróficas acetogênicas também influencia no processo (Chernicharo, 2007). Estão nesse grupo *Syntrophus* (Stams *et al.*, 2012) e *Syntrophorhabdus* (Qiu *et al.*, 2008), ambos descritos nas composições dos gêneros com abundância relativa média igual ou maior que 1% das porções UASB_B, UASB_M e UASB_A. Esse grupo atua em conjunto com microrganismos metanogênicos (Archaea), o que foi evidenciado, sobretudo, pela presença significativa de *Methanobacterium* nas amostras provenientes do interior dos reatores UASB.

A influência da sazonalidade, no que se refere a período seco ou chuvoso, na composição das comunidades de Bacteria e Archaea também foi objeto desta investigação. Para isto, os índices de Shannon (ANOVA), Simpson, Chao1 e ACE (Kruskal-Wallis) foram comparados. Demonstrou-se ausência de variações sazonais. O resultado poderia ser esperado, considerando que o esgoto que chega à CePTS UFMG/COPASA é canalizado, não recebendo, oficialmente, água da chuva.

Ainda, a associação entre os parâmetros físico-químicos avaliados e a composição das comunidades de Bacteria e Archaea foi também investigada no esgoto bruto e nas amostras submetidas aos diversos tratamentos. Observou-se associação apenas entre concentração de nitrato e diversidade medida pelo índice de Shannon. Considerando que o nitrato é um substrato utilizado por diversos grupos bacterianos, a associação poderia ser esperada.

Considerando o potencial da água como veículo de transmissão de patógenos, a comunidade microbiana de um efluente proveniente de uma estação de tratamento de esgoto deve ser bem conhecida. Um corpo de água receptor desse efluente pode sofrer consequências negativas diretas e indiretas, visto que a presença de microrganismos patogênicos pode inviabilizar o uso da água (Von Sperling; Chernicharo, 2005). Alguns patógenos comumente veiculados pela água

contaminada são *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Salmonella* e *Arcobacter*. Geralmente, são eliminados nas fezes, sendo veiculados pelo esgoto até as estações de tratamento. Assim, nas regiões desenvolvidas, raramente são relatados no contexto de água para consumo.

- 5 Entretanto, em locais com condições sanitárias precárias, o risco de transmissão fecal-oral é considerável (Ashbolt, 2015).

Nesse sentido, conhecer a dinâmica de microrganismos possivelmente patogênicos dentro da planta de tratamento é muito importante, permitindo, assim, verificar as concentrações no esgoto de entrada, nos efluentes de cada etapa do
10 tratamento e, por fim, no efluente a ser lançado no corpo de água receptor (Von Sperling; Chernicharo, 2005). Assim, investigou-se, neste estudo, o efeito dos diferentes sistemas de tratamento de esgoto em bactérias potencialmente patogênicas com rota de transmissão fecal-oral. Quatro gêneros foram selecionados para esta avaliação e, com base nos diferentes caminhos que cada
15 um dos efluentes dos três reatores UASB segue, foi possível verificar alguns achados preocupantes.

Espera-se que, em relação ao esgoto bruto, a concentração dos patógenos seja menor, gradativamente, na medida em que o efluente passa pelas etapas subsequentes de tratamento. Entretanto, isto não foi observado sempre.

- 20 Para *Arcobacter*, o fato da abundância relativa ter aumentado nos efluentes de todos os reatores permite que se questione a eficiência desse processo. No entanto, a concentração desse gênero foi zero na grande maioria das amostras, com exceção das porções superiores do UASB 1 e na porção intermediária do mesmo reator na segunda coleta. Mesmo assim, a concentração na amostra de
25 saída do reator 1 aumentou significativamente. Tal fato sugere que houve um favorecimento para o estabelecimento do gênero entre o ponto mais alto onde foi possível coletar amostras e a tubulação de saída do efluente. Este dado deve ser melhor investigado. Além disso, é preocupante saber que apenas os pós-tratamentos 14D1, 17D1, 17D2, 18D1, 18D2, 19D1, 19D2 e 20D2 foram capazes
30 de reduzir a concentração de *Arcobacter* para a mesma ou menor que a encontrada no esgoto bruto.

Esse gênero foi descrito em 1992 por Vandamme e difere do gênero ao qual pertencia anteriormente, *Campylobacter*, por sua habilidade de multiplicação em condições aeróbias. Além disso, Fisher e colaboradores (2014) sugeriram que são bastante flexíveis metabolicamente e podem sobreviver sob uma variedade de condições. Os mesmos autores relataram a presença do gênero em águas residuárias. Sobre a preocupação supracitada, representantes do gênero foram considerados, em estudos anteriores, como enteropatógenos emergentes (Ho; Lipman; Gaastra, 2006; Snelling, 2006; Fisher *et al.*, 2014). Considerando sua importância no contexto clínico, *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* foram associadas a doenças gastrointestinais (Kopilovic *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2010). Além disso, *Arcobacter* também foi associado com situações negativas em animais, como abortos, mastites e diarreias (Logan; Neill; Mackie, 1982; Vandamme *et al.*, 1992).

Em relação ao gênero *Aeromonas*, sua abundância relativa no esgoto bruto foi menor que 1% e sua população chegou a dobrar nos efluentes dos reatores UASB. Sua concentração relativa retornou, na maior parte das amostras, a níveis semelhantes aos iniciais, após passarem pelas etapas de pós-tratamento, mas, sua remoção não foi eficaz. Os representantes do gênero *Aeromonas* estão relacionados à etiopatogenia da doença diarreica aguda proveniente de contaminação alimentar (Tavares; Cereser; Timm, 2014) e foram detectados em infecções associadas a desastres naturais (furacão e tsunamis, por exemplo) (Janda; Abbott, 2010). A presença de *Aeromonas* em águas residuárias já foi relatada em estudos anteriores (Monfort; Baleux, 1990; VandeWalle, 2012). Ainda sobre *Aeromonas*, o principal veículo para contaminação de alimentos, inclusive os de origem animal, e para a infecção direta do ser humano é a água (Bizani; Brandelli, 2001; Janda; Abbott, 2010). Em 2011, Nagar e colaboradores relataram *Aeromonas* em 11,7% das amostras de frango, peixe e brotos vegetais prontos para comer. Outros alimentos como carne, leite e seus derivados e ambientes de processamento, tais como laticínios, frigoríficos e abatedouros foram alguns locais onde representantes deste gênero também já foram isolados (Tavares; Cereser; Timm, 2014).

Enterococcus, por sua vez, apresentou oscilações entre sua abundância relativa no esgoto bruto e as etapas de tratamento, embora os valores tenham sempre

permanecido muito próximos a zero. A preocupação com a presença desse gênero em águas residuárias é sempre necessária. Segundo Fisher e Phillips (2009), ambientes estressantes e hostis, por exemplo, com temperaturas extremas (5-65 °C), não impedem seu estabelecimento. O organismo pode estar

5 relacionados com infecções do trato urinário, entre outras e já foi relatado em águas residuárias anteriormente (Vilanova, 2002; Boehm; Sassoubre, 2014).

Por último, mas não menos importante, *Escherichia-Shigella*, agrupamento de dois gêneros intimamente relacionados em termos genéticos, é famoso por suas relações com enteropatogenicidade (Falkow *et al.*, 1963; Regua-Mangia *et al.*,

10 2003; Beraldo, 2015). Sua abundância no esgoto bruto ficou entre aquelas relatadas para *Aeromonas* e *Enterococcus*. A presença de *Escherichia coli* e *Shigella* em águas residuárias também já foi reportada (Wang; Stuart; Boer, 1956; Anastasi *et al.*, 2012; Machnicka, 2014).

7 SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

5 A técnica de sequenciamento de nova geração baseada na região V4 do rDNA 16S possibilitou descrever as comunidades de Bacteria e Archaea presentes nas diversas etapas de tratamento de esgoto do CePTS.

Dentro dos reatores UASB, as composições das populações de Bacteria e Archaea eram diversificadas. Os representantes de Archaea, principalmente do
10 filo Euryarchaeota, foram mais abundantes na porção inferior do reator (leito de lodo), apresentando redução gradativa à medida em que ocorreu a ascensão do efluente. Por outro lado, a composição relativa dos representantes de Bacteria foi menor no leito de lodo e aumentou, gradualmente, até a porção superior amostrada. De um modo geral, Bacteria sempre foi mais abundante nas amostras
15 estudadas.

Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Euryarchaeota foram os filos mais abundantes, tanto pela composição média total dentro dos reatores como se considerando a abundância relativa com base em todas as amostras.

Foram encontrados representantes de todos os grupos essenciais para a
20 realização das quatro principais etapas da digestão anaeróbia da matéria orgânica, quais sejam hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese.

Diversas OTUs não tiveram suas classificações determinadas até o nível de gênero. Esse fato permite sugerir possíveis novas espécies ou, ainda, que as
25 sequências referentes a esses microrganismos não estejam presentes no banco de dados utilizado para análise.

Não houve influência significativa da sazonalidade (período seco e chuvoso) na diversidade e riqueza das comunidades de Bacteria e Archaea das diversas amostras avaliadas nesta investigação. Entre os parâmetros físico-químicos avaliados, associação estatisticamente significativa foi observada apenas entre
30 concentração de nitrato e alfa diversidade conforme índice de Shannon. Considerando que o esgoto recebido pela CePTS UFMG/COPASA é canalizado e

que o nitrato é um substrato metabolizável por diversos grupos bacterianos, o resultado é esperado.

5 Bactérias possivelmente patogênicas com via de transmissão fecal-oral foram detectadas entre as OTUs determinadas. No entanto, mesmo com baixa composição relativa (<1%), mais da metade das diferentes combinações de tratamento de esgoto não foram capazes de reduzir os níveis desses patógenos abaixo daqueles observados no esgoto bruto. O fato mais preocupante foi o aumento dos níveis desses microrganismos, principalmente de *Arcobacter*, que atingiu uma abundância relativa maior que 20%, em uma das etapas de pós-
10 tratamento.

O presente estudo contribui para o conhecimento relativo às comunidades de Bacteria e Archaea do esgoto antes e após o tratamento, mas, certamente, outras investigações devem ser realizadas para melhor esclarecimento do tema, tão relevante, em especial, para países em desenvolvimento como o Brasil.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 5 Aida, A. A. *et al.* Molecular characterization of anaerobic sulfur-oxidizing microbial communities in up-flow anaerobic sludge blanket reactor treating municipal sewage. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 118, p. 540-545, 2014.
- Almeida, P. G. S. *et al.* Performance of plastic- and sponge-based trickling filters treating effluents from an UASB reactor. *Water Sci. Technol.*, v. 67, p. 1034-1042,
10 2013.
- ANA (Agência Nacional de Águas). *Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil: informe 2014 / Agência Nacional de Águas*. Brasília: ANA, 2015. 107 p.
- Anastasi, E. M. *et al.* Pathogenic *Escherichia coli* Found in Sewage Treatment Plants and Environmental Waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 78, p. 5536-5541,
15 2012.
- APHA; AWWA; WEF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21.ed., Washington, 2012, 1.569 p.
- Aprill, A. *et al.* Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.*, v. 75, p.
20 129–137, 2015.
- Arumugam, M. *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.*, v. 473, p. 174-80, 2011.
- Ashbolt, N. J. Microbial Contamination of Drinking Water and Human Health from Community Water Systems. *Curr. Environ. Health Rep.*, v.2, p. 95-106, 2015.
- 25 Bastos, G. S. M. *Avaliação da eficiência da radiação gama na desinfecção de esgoto doméstico bruto e esgoto tratado em reator UASB*. 2006. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Basualdo, C. V. Choosing the best non-parametric richness estimator for benthic macroinvertebrates databases. *Rev. Soc. Entomol. Argent.*, v. 70, p. 27-38, 2011.

Belo Horizonte. Prefeitura Municipal. *Plano municipal de saneamento de Belo Horizonte 2012-2015*. Belo Horizonte: Prefeitura Municipal, 2011. Vol. I (texto), 147 p.

Beraldo, L. G. *Análise molecular de estirpes de Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) isoladas de animais e humanos*. 2015. 51 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal.

10 Bizani, D.; Brandelli, A. Antimicrobial susceptibility, hemolysis and hemagglutination among *Aeromonas* spp. isolated from water of a bovine abattoir. *Braz. J. Microbiol.*, v.32, p.334-339, 2001.

Boehm, A. B.; Sassoubre, L. M. *Enterococci as Indicators of Environmental Fecal Contamination*. In: Gilmore, M. S. et al. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190421/>. Acesso em: 19 ago. 2015.

Brasil. Lei nº 11.445, de 5 de janeiro de 2007. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/lei/l11445.htm. Acesso em: 25 ago. 2015.

Brasil. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. *Sistema nacional de informações sobre saneamento (SNIS): diagnóstico dos serviços de água e esgotos – 2013*. Brasília: SNSA/MCIDADES, 2014. 181 p.

Brasil. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. *Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS): diagnóstico dos serviços de água e esgotos – 2015*. Brasília: SNSA/MCIDADES, 2017. 212 p.

Brochier-Armanet, C. et al. Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature*, v. 6, p. 245-252, 2008.

Bunge, J. *et al.* Estimating population diversity with CatchAll. *Bioinformatics*, v. 28, p. 1045-1047, 2012

Caporaso, J. G. *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.*, v. 6, p. 1621-1624, 2012.

- 5 Cardinali-Resende, J. *et al.* Organic loading rate and food-to-microorganism ratio shape prokaryotic diversity in a demo-scale up-flow anaerobic sludge blanket reactor treating domestic wastewater. *Antonie Leeuwenhoek*, v. 104, p. 993–1003, 2013.

- 10 CBH Rio das Velhas; SCBH Ribeirão Arrudas. Projetos hidroambientais do comitê do rio das Velhas – Arrudas. 2015. Disponível em <http://www.agbpeixevivo.org.br/nascentesurbanas/index.php/ribeirao-arrudas>. Acesso em: 28 ago. 2015.

CePTS-Cartilha. Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento UFMG/COPASA. Belo Horizonte: DESA/UFMG, sem ano, 31 p.

- 15 Chao, A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics.*, v. 43, p. 783–791, 1987.

Chao, A. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J. Stat.*, v. 11, p. 265-270, 1984.

- 20 Chernicharo, C. A. L. Pos-treatment options for the anaerobic treatment of domestic wastewater. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, v. 5, p. 73-92, 2006.

Chernicharo, C. A. L. *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: reatores anaeróbios*. 2.ed. Belo Horizonte: DESA-UFMG, 2007. v. 5, 379 p.

Contagem. Prefeitura Municipal. *Plano municipal de saneamento básico de Contagem*. Contagem: Prefeitura Municipal, 2013. 201 p.

- 25 Cydzik-Kwiatkowska, A.; Zielińska, M. Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 32 p. 66, 2016.

- de Jonge, N. Microbial population dynamics in continuous anaerobic digester systems during start up, stable conditions and recovery after starvation. *Bioresource Technol.*, 2017. No prelo.
- de Vrieze, J. *et al.* Ammonia and temperature determine potential clustering in the anaerobic digestion microbiome. *Water Res.*, v. 75, p. 312–323, 2015.
- Edgar, R.C. *et al.* UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, v. 27, p. 2194-2200, 2011.
- Eichler, S. *et al.* Composition and Dynamics of Bacterial Communities of a Drinking Water Supply System as Assessed by RNA- and DNA-Based 16S rRNA Gene Fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol. March.*, vol. 72, p. 1858-1872, 2006.
- EMBRAPA; Lima, J. E. F. W. *Recursos hídricos no Brasil e no mundo*. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2001, 46 p.
- Enitan, A. M. *Microbial Community Analysis of a UASB Reactor and Application of an Evolutionary Algorithm to Enhance Wastewater Treatment and Biogas Production*. 2014. 208 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Philosophy (Biotechnology), Durban University of Technology, South Africa.
- Falkow, S. *et al.* Virulence of *Escherichia-Shigella* genetic hybrids for the guinea pig. *J. Bacteriol.*, v. 86, p. 1251–1258, 1963.
- Feest, A.; Aldred, T. D.; Jedamzik, K. Biodiversity quality: a paradigm for biodiversity. *Ecol. Indic.*, v. 10, p. 1077–1082, 2010.
- Fernandes, C. *Esgotos sanitários*. João Pessoa: UFPB, 1997, 435 p.
- Fisher, J. C. *et al.* Population Dynamics and Ecology of *Arcobacter* in Sewage. *Front. Microbiol.*, v. 5, p. 525, 2014.
- Fisher, K., Phillips, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, v. 155, p. 1749–1757, 2009.
- Fleischmann, R. D. *et al.* Whole genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* rd. *Science*, v. 269, p. 496–512, 1995.

Foresti, E. *et al.* Fundamentos do tratamento anaeróbio. In: Campos, J. R. (coordenador). *Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo*. Rio de Janeiro: PROSAB, 1999. p. 29-52.

Fraser, C. M. *et al.* The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, v. 270, p. 397–404, 1995.

Gerritsen, J. *et al.* Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes & Nutrition*., v. 6, p. 209-240, 2011.

Gonçalves, R. F.; Jordão, E. P. Introdução. In: Gonçalves, R. F. (Coord.). *Uso racional da água em edificações*. Rio de Janeiro: ABES, 2006, p. 1-28.

10 Gupta, R. S.; Gao, B. Phylogenomic analyses of clostridia and identification of novel protein signatures that are specific to the genus *Clostridium* sensu stricto (cluster I). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 59, p. 285-294, 2009.

Guralnick, R. P.; Hill, A. W.; Lane, M. Towards a collaborative global infrastructure for biodiversity assessment. *Ecol. Lett.*, v. 8, p. 663–672, 2007.

15 Handelsman, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. R.*, v. 68, p. 669–685, 2004.

Ho, H. T.; Lipman, L. J.; Gaastra, W. *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent. *Vet. Microbiol.*, v. 115, p. 1-13, 2006.

Hugenholtz, P.; Tyson, G. W. Microbiology: metagenomics. *Nature*, v. 455, p. 481-483, 2008.

IBGE. *Área territorial brasileira*. 2015. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/cartografia/default_territ_area.shtm>. Acesso em: 25 ago. 2015.

IBGE. *Projeção da população do Brasil e das unidades da federação*. 2017. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/>. Acesso em: 23 fev. 2017.

- IGAM; Camargos, L. de M. M. *Plano diretor de recursos hídricos da bacia hidrográfica do rio das Velhas: resumo executivo dezembro 2004*. Belo Horizonte: Instituto Mineiro de Gestão das Águas - IGAM, Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio das Velhas, 2005. 228 p. Disponível em: 5 <http://www.manuelzao.ufmg.br/assets/files/Textos%20mobilizacao/plano_diretor_completo.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2015.
- Illumina. 16S metagenomics studies with the MiSeq® system. *Applic. Note*, p. 1-4, 2014.
- INMET. *Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa*. 2017. 10 Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>>. Acesso em 23 mar. 2017.
- Isaac, R.L.; Abe, Y.T. Biblioteca Didática de Tecnologias Ambientais - Lodos Ativados, 2017. Disponível em: 15 <<http://www.fec.unicamp.br/~bdta/esgoto/lodosativados>>. Acesso em: 23 de mar. 2017.
- Jabari, L. *et al.* *Macellibacteroides fermentans* gen. nov., sp. nov., a member of the family Porphyromonadaceae isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 62, p. 2522-2527, 2011.
- Jackson, B. E. *et al.* *Syntrophus aciditrophicus* sp. nov., a new anaerobic 20 bacterium that degrades fatty acids and benzoate in syntrophic association with hydrogen-using microorganisms. *Arch. Microbiol.*, v. 171, p. 107–114. 1999.
- Janda, J. M.; Abbott, S. L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 23, p. 35-73, 2010.
- Jang, H. M. *et al.* Bacterial and methanogenic archaeal communities during the 25 single-stage anaerobic digestion of high-strength food wastewater. *Biores. Tech.*, v. 165, p. 174-182, 2014.

- Jenkins, S. R.; Morgan, J. M.; Sawyer, C. L. Measuring anaerobic sludge digestion and growth by a simple alkalimetric titration. *J. Water Pollut. Control. Fed.*, v. 55, p. 448-453, 1983.
- Jiang, Z. D., *et al.* Microbial etiology of travelers' diarrhea in Mexico, Guatemala and India importance of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and *Arcobacter* species. *J. Clin. Microbiol.*, v.48, p.1417–1419, 2010.
- Jordão, E. P.; Pessôa, C. A. *Tratamento de esgotos domésticos*. 5ª ed. Rio de Janeiro: ABES, 2009, 941 p.
- Kopilovic, B., V. *et al.* Waterborne outbreak of acute gastroenteritis in a costal area in Slovenia in June and July. *Euro Surveill.*, v.13, p.1–3, 2008.
- Koskey, A.M., *et al.* Blautia and Prevotella sequences distinguish human and animal fecal pollution in Brazil surface waters. *Environ. Microbiol. Rep.*, v.6, p. 696–704, 2014.
- Kowalchuk G. A.; Stephen, J. R. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annu. Rev Microbiol.*, v. 55, p. 485–529, 2001.
- La Rovere, E. L. *et al.* *Manual de auditoria ambiental para estações de tratamento de esgotos domésticos*. Rio de Janeiro: Qualitymark, 2002. 145 p.
- Leclerc, M. *et al.* Single strand conformation polymorphism monitoring of 16S rDNA Archaea during start-up of an anaerobic digester. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v.34, p. 213-220, 2001.
- Lee, S. H. Monitoring bacterial community structure and variability in time scale in full-scale anaerobic digesters. *J. Environ. Monitor.*, v. 14, p. 1893-1905, 2012.
- Lee, S. H.; Jung, J. Y.; Jeon, C. O. Effects of temperature on microbial succession and metabolite change during saeu-jeot fermentation. *Food Microbiol.*, v. 38, p. 16-25, 2014.
- Lettinga, G.; Hulshoff Pol, L. W.; Zeeman, G. Biological Wastewater Treatment. Part I: Anaerobic wastewater treatment. Lecture Notes. *Wageningen Agricultural University*, ed. January, 1996.

Li, F. Human Gut Bacterial Communities Are Altered by Addition of Cruciferous Vegetables to a Controlled Fruit- and Vegetable-Free Diet. *J. Nutrition.*, v.139, p.1685-1691, 2009.

Lins, G. A. *Impactos ambientais em estações de tratamento de esgotos (ETEs)*. 2010. 285 f. Dissertação (Mestrado Profissional) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – PPGE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Liu, L. *et al.* Comparison of next-generation sequencing systems. *J. Biomed. Biotechnol.*, v. 2012, p. 1-11, 2012.

10 Logan, E. F., *et al.* Mastitis in dairy cows associated with an aerotolerant *Campylobacter*. *Vet. Rec.*, v.110, p.229–230, 1982.

Lozupone, C.; Knight, R. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 71, p.8228-8235, 2005.

15 Lucena, R. M. *Identificação molecular da diversidade microbiana em reator UASB de estação de tratamento de esgoto*. 2008. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em genética do departamento de genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Machado, R. M. G. *Estudo da associação em série de reator UASB e filtros anaeróbios para o tratamento de esgotos sanitários*. 1997. 146 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em saneamento, meio ambiente e recursos hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Machnicka, A. *Escherichia coli* in sewage sludge-Detection Method. *Chem. Didact. Ecol. Metrol.*, v. 19, p. 79-85, 2014.

25 Magurran, A. E. Medindo a diversidade biológica. Tradução por Vianna, D. M. Curitiba, Ed. da UFPR. p. 261, 2011.

Mariat, D. *et al.* The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.*, v. 9, p. 123, 2009.

Maxam, A. M.; Gilbert, W. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 74, p. 560-564, 1977.

McLellan, S. L. *et al.* Sewage reflects the distribution of human faecal Lachnospiraceae. *Environ Microbiol.*, v.15, p. 2213–2227, 2013.

- 5 McMurdie, P. J.; Holmes, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, v. 8, p. e61217, 2013.

- 10 MMA/ANA (Ministério do Meio Ambiente/Agência Nacional de Água). *GEO Brasil - Recursos Hídricos: componente da série de relatórios sobre o estado e perspectivas do meio ambiente no Brasil*. Brasília: GEO Brasil série temática: GEO Brasil recursos hídricos. 264 p. 2007. Disponível em: <<http://www.ceivap.org.br/estudos/Geo-Brasil-Recursos-Hidricos-Resumo-Executivo.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2015.

- 15 Monfort, P.; Baleux, B. Dynamics of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae* in a sewage treatment pond. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.56, p. 1999–2006, 1990.

Moraes, D. S. de L.; Jordão, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. *Rev. Saúde Públ.*, São Paulo, v. 36, p. 370-374, 2002.

- 20 Moreira, L. M. *Ciências genômicas: fundamentos e aplicações*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2015. 403 p.

Moreno, Y. *et al.* Specific Detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* Strains in Water and Sewage by PCR and Fluorescent in Situ Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 69, p. 1181-1186, 2003.

- 25 Nagar, V.; Shashidhar, R.; Bandekar, J. Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of *Aeromonas* strains from various retail food products in Mumbai, India. *Food Microbiol. & Saf.*, v.76, p.486-492, 2011.

- Naidoo, S.; Olaniran, A. O. *et al.* Treated Wastewater Effluent as a Source of Microbial Pollution of Surface Water Resources. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v.11, p.249-270, 2014.
- 5 Nascimento, M. C. P. Filtro biológico percolador de pequena altura de meio suporte aplicado ao pós-tratamento de efluente de reator UASB. 2001. 168f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 10 Neelakanta, G.; Sultana, H. The use of metagenomic approaches to analyze changes in microbial communities. *Microbiol. Insights*, v. 6, p. 37-48, 2013.
- Nelson, M. C.; Morrison, M.; Yu, Z. A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. *Biores. Tech.*, v. 102, p. 3730-3739, 2011.
- 15 Oliveira, L. L. Remoção de alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) e caracterização microbiana em reator anaeróbio de leito fluidificado. 2010. 87 f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Paiva, M. C. *et al.* The Microbiota and Abundance of the Class 1 Integron-Integrase Gene in Tropical Sewage Treatment Plant Influent and Activated Sludge. *PLoS ONE*, v. 10, p. 131-135, 2015.
- 20 Pelczar Jr., J. M.; Chan, E. C. S.; Krieg, N. R. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. São Paulo: Makron Books, 1996, vol. 1, 2^a ed., 524 p.
- Pinto, A. J.; Xi, C.; Raskin, L. Bacterial Community Structure in the Drinking Water Microbiome Is Governed by Filtration Processes. *Sci. Technol.*, v.46, p. 8851-8859, 2012.
- 25 Qiu *et al.* Syntrophorhabdus aromaticivorans gen. nov., sp. nov., the first cultured anaerobe capable of degrading phenol to acetate in obligate syntrophic associations with a hydrogenotrophic methanogen. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 74, p. 2051-2058, 2008.

Quast, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.*, v. 42, p. 590-596, 2013.

R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em:

5 <http://www.R-project.org/>. Acesso em 15 de fevereiro de 2017.

Rebouças, A. da C. *Água doce no mundo e no Brasil*. In: Rebouças, A. da C.; Braga, B.; Tundisi, J. G. *Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação*. 3ªed. São Paulo: Escrituras, 2006. Cap. 2, p. 1-35.

10 ReCESA – Rede Nacional de Extensão e Capacitação Tecnológica em Saneamento Ambiental. *Esgotamento sanitário: operação e manutenção de sistemas simplificados de tratamento de esgotos: guia do profissional em treinamento – nível 1*. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental. Belo Horizonte, 2008. 74p.

15 Regua-Mangia, A. H. *et al.* Genetic analysis of *Escherichia coli* strains carrying enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) markers, isolated from children in Rio de Janeiro city, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v. 34, p. 38-41, 2003.

Riesenfeld, C. S.; Schloss, P. D.; Handelsman, J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.*, v. 38, p. 525-552, 2004.

20 Ripley, L. E.; Boyle, W. C.; Converse, J. C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *J. Water Pollut. Control. Fed.*, v. 58, n. 5, p. 406-411, 1986.

Rodrigues, T. B. *Diversidade microbiana de biomas terrestres e marinhos*. 2011. 269 f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

25 Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

- Schloss, P. *et al.* Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microb.*, v. 75, p. 7537-7541, 2009.
- Shah, F. A. *et al.* Microbial ecology of anaerobic digesters: The key players of anaerobiosis. *Sci. World J.*, ID 183752, p. 1-21, 2014.
- Shanks, O. C. *et al.* Comparison of the Microbial Community Structures of Untreated Wastewaters from Different Geographic Locales. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 79, p. 2906-2913, 2013.
- Shannon, C. E.; Weaver, W. *The mathematical theory of communication*. Urbana: Univ. of Illinois Press, 1963, 173 p.
- Sharon, I.; Banfield, J. F. Genomes from metagenomics. *Science*, v. 342, p.1057-1058, 2013.
- Simpson, E. H. Measurement of diversity. *Nature*, v. 163, p. 688, 1949.
- Snelling, W. J. *et al.* Under the microscope: *Arcobacter*. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 42, p. 7-14, 2006.
- Sobrinho, P. A.; Jordão, E. P. *Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios – uma análise crítica*. In: Chernicharo, C. A. L. (Coord.). *Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios - 2001*. Belo Horizonte: 2001. Cap. 9, p. 1-17. Disponível em: http://www.finep.gov.br/images/apoio-e-financiamento/historico-de-programas/prosab/Pos_tratamento_de_efluentes_de reatores anaerobios.rar. Acesso em: 23 ago. 2015.
- Spang, A. *et al.* Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota. *Trends Microbiol.*, v.18, p. 331–340, 2010.
- Staley, J. T.; Konopka, A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 39, p. 321-346, 1985.

- Stams, A. J. M. *et al.* Role of syntrophic microbial communities in high-rate methanogenic bioreactors. *Water Sci. Technol.*, v. 66, p. 352-362, 2012.
- Stieglmeier, M.; Alves, J. E.; Schleper, C. *The Phylum Thaumarchaeota*. In: Rosenberg, E. *et al.*, The Prokaryotes – Other Major Lineages of Bacteria and the Archaea. 4^a ed. New Delhi (India): Springer, 2014. Cap. 26, p. 347-362.
- 5 Tavares, A. B.; Cereser, N. D.; Timm, C. D. Ocorrência de *Aeromonas* spp. em alimentos de origem animal e sua importância em saúde pública. *Arq. Inst. Biol.*, v. XX, p. 1-8, 2014.
- Van Haandel, A. C.; Letinga, G. *Tratamento Anaeróbio de Esgotos: Um Manual Para Regiões de Clima Quente*. Campina Grande: Epgraf, 1994, 199 p.
- 10 Vandamme P. *et al.* Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skiwovii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 42, p. 344-356, 1992.
- 15 VandeWalle, J. L. *et al.* *Acinetobacter*, *Aeromonas*, and *Trichococcus* populations dominate the microbial community within urban sewer infrastructure. *Environ. Microbiol.*, v. 14, p. 2538-2552, 2012.
- Vaz-Moreira, I.; Nunes, O. C.; Manaia, C. M. Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 38, p. 761-778, 2014.
- 20 Vazoller, R. F.; Manfio, G. P.; Canhos, V. P. Domínio Archaea: Reinos Crenarcheota, Euryarcheota e Korarcheota. In: Canhos, V. P.; Vazoller, R. F. (Ed.) Série biodiversidade do estado de São Paulo – microrganismos e vírus. São Paulo, v. 1, 1999.
- 25 Vilanova, X. The effect of a sewage treatment plant effluent on the faecal coliforms and enterococci populations of the reception river Waters. *J. Appl. Microbiol.*, v. 92, p. 210-214, 2002.

von Sperling, M. *Lagoas de estabilização (Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias)*; vol. 3. Belo Horizonte: DESA-UFMG, 2013, 196 p.

von Sperling, M. *Introdução à Qualidade das Águas e ao Tratamento de Esgotos (Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias)*. Belo Horizonte: DESA-UFMG, 2005, vol. 1, 452p.

von Sperling, M. *Lodos Ativados*. Belo Horizonte: DESA-UFMG, 2016, vol. 4, 461p.

von Sperling, M.; Chernicharo, C. A. L. Biological Wastewater Treatment in Warm Climate Regions. *IWA Publishing*, v. 1, p. 836, 2005.

10 Wang, W. L. et al. Application of metagenomics in the human gut microbiome. *World J. Gastroenterol.* v. 21, p. 803–814, 2015.

Wang, W. L. L.; Stuart, G. D.; Robert, G. De B. The Survival of *Shigella* in Sewage: I. An Effect of Sewage and Fecal Suspensions on *Shigella Flexneri*. *Appl. Microbiol.*, v.4, p. 34-38, 1956.

15 Ward, B. B. et al. Distribución Mundial de *Nitrosococcus oceanii*, una proteobacteria marina oxidante de amonio, detectada por PCR y secuenciado dl 16S rARN y genes amoA. *Appl. Environ. Biology*, v. 68, p. 4153-4157, 2002.

Weisburg, W. G.; Barns, S. M.; Pelletier, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, v. 173, p. 697-703, 1991.

20 Wickham, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. *Springer-Verlag New York*, 2009.

Williams, M. M. et al. Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in a distribution system simulator. *J. Appl. Microbiol.*, v. 96, p.954-964, 2004.

Woese, C. R. Bacterial evolution. *Microbiol. Ver.*, v. 51, p. 221-271, 1987.

25 Woese, C. R.; Kandler, O.; Wheelis, M. L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 87, p. 4576-4579, 1990.

Woodson,S. A.; Leontis,N. B. Structure and dynamics of ribosomal RNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v. 8, p. 294-300, 1998.

Ziemiński, K.; Frac, M. Methane fermentation process as anaerobic digestion of biomass: Transformations, stages and microorganisms. *Afr. J. Biotec.*, v. 11, p. 4127-4139, 2012.

Zoetendal, E. G.; Rajilic-Stojanovic, M., de Vos, W. M. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut*, v. 57, p. 1605-1615, 2008.

Zwart, G. *et al.* Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat. Microb. Ecol.*, v. 28, p. 141-155, 2002.