

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS *CAMPUS* SOROCABA
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ISADORA SOARES DE LIMA

**ANÁLISE *IN SILICO* PARA DEFINIÇÃO DE *COMMON CORE* MICROBIANO
ASSOCIADO A CONDIÇÕES COM DEGRADAÇÃO DE SURFACTANTE
ANIÔNICO ALQUILBENZENO LINEAR SULFONADO (LAS)**

SOROCABA - SP
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS *CAMPUS* SOROCABA
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ISADORA SOARES DE LIMA

**ANÁLISE *IN SILICO* PARA DEFINIÇÃO DE *COMMON CORE* MICROBIANO
ASSOCIADO A CONDIÇÕES COM DEGRADAÇÃO DE SURFACTANTE
ANIÔNICO ALQUILBENZENO LINEAR SULFONADO (LAS)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Biológicas da Universidade Federal de São Carlos, como requisito para a obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientação: Profa. Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte

Co-orientação: Prof. Dr. Tiago Palladino Delforno

SOROCABA - SP
2023

Lima, Isadora Soares de

Análise in silico para definição de common core microbiano associado a condições com degradação do surfactante aniônico alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) / Isadora Soares de Lima -- 2023.
57f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos,
campus Sorocaba, Sorocaba
Orientador (a): Iolanda Cristina Silveira Duarte
Banca Examinadora: Cleoni dos Santos Carvalho, André
Cordeiro Alves dos Santos
Bibliografia

1. Biodegradação do LAS. 2. Gene 16S rRNA. 3. Águas residuais de lavanderia. I. Lima, Isadora Soares de. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano -
CRB/8 6979

Folha de aprovação

Isadora Soares de Lima


“ANÁLISE *IN SILICO* PARA DEFINIÇÃO DE *COMMON CORE* MICROBIANO ASSOCIADO A CONDIÇÕES COM DEGRADAÇÃO DE SURFACTANTE ANIÔNICO ALQUILBENZENO LINEAR SULFONADO (LAS)”

Trabalho de Conclusão de Curso

Universidade Federal de São Carlos – *campus* Sorocaba


Sorocaba, 24 de março de 2023.

Orientadora

Documento assinado digitalmente
 IOLANDA CRISTINA SILVEIRA DUARTE
Data: 27/03/2023 10:02:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Profa. Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte

Membro 1

Documento assinado digitalmente
 CLEONI DOS SANTOS CARVALHO
Data: 24/03/2023 19:09:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho

Membro 2

Documento assinado digitalmente
 ANA CLAUDIA LESSINGER
Data: 27/03/2023 09:39:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Ana Cláudia Lessinger

Membro 3

Documento assinado digitalmente
 JULIANA CRISTINA RAMOS DE OLIVEIRA
Data: 24/03/2023 14:29:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Ma. Juliana Cristina Ramos de Oliveira

Dedico este trabalho à minha família, que sempre me transmitiu os maiores bens deste mundo: o conhecimento, a sabedoria e a curiosidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à minha família, que sempre acreditou na minha capacidade e nunca, em momento algum, me deixou esmorecer diante das dificuldades. À minha mãe, Claudia, que por muitas vezes se sacrificou para investir nos meus estudos e por ser uma mãe e mulher que possui toda a minha admiração, por sua perseverança e força. À minha avó, Devaci, minha segunda mãe, por me contar as histórias da sua infância, rodeada de conhecimentos a respeito da natureza, fazendo-me perceber que minha escolha profissional é um reflexo de todas essas histórias que viveu, e por ser a mulher mais guerreira que eu conheço. À minha irmã, Isabella, por segurar a minha mão desde o dia em que abri os meus olhos para esse mundo e me apoiar nos momentos bons e ruins, e por ser a minha inspiração como uma mulher que batalha diariamente pela igualdade feminina no mercado de trabalho, influenciando tantas outras mulheres a buscarem seus lugares de direito. Ao meu padrasto, Gilmar, que é o meu pai de criação e de coração, por me incentivar a buscar e encarar novos desafios, tanto na minha carreira quanto na minha vida pessoal, e por sempre estar disposto a conversar comigo sobre assuntos científicos. Ao meu cunhado, Luciano, por me apoiar nas minhas conquistas profissionais e por me aturar falando durante horas sobre as pesquisas que fiz para concluir este trabalho.

À minha orientadora, Iolanda, por confiar em mim desde o meu primeiro dia no Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA), e por sempre me fazer sentir acolhida e parte da equipe de pesquisa. Ao meu coorientador, Tiago, por ter me ensinado tanto ao longo destes anos, pela paciência, por ter apostado na minha capacidade de concluir este trabalho, por todas as conversas, por me incentivar a participar de eventos científicos e mostrar às pessoas tudo o que eu sei. Me espelho muito em você, e espero fazer jus à tudo o que você me ensinou.

Ainda, agradeço aos meus amigos de graduação Bianca Cristina, Anna Carolina, Tifani, Carina, Martha e Esteban, pois cada um de vocês contribuiu, de alguma forma, no processo de criação deste trabalho, seja com incentivo para prosseguir nessa caminhada, seja promovendo os momentos de descontração de que precisei. Aos meus colegas de laboratório, em especial à minha amiga Gabriela Fiori, por toda a ajuda e conhecimento que me ofereceram ao longo dos meus mais de dois anos de Iniciação Científica.

Meus professores de graduação, pelo conhecimento compartilhado e por nos encorajarem a sermos profissionais cada vez mais engajados.

Ao Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA), pelo espaço físico cedido para realização desta pesquisa.

À UFSCar, por ser a minha segunda casa durante cinco anos e meio.

Por fim, à mim mesma, por ter enfrentado o medo de não conseguir realizar este trabalho enquanto frequentava as aulas da graduação; por ter insistido na busca por um auxílio financeiro para esta pesquisa, mesmo que não acreditasse mais que conseguiria; e pela dedicação para entregar um bom trabalho não apenas para meus orientadores, mas para mim também.

“O conhecido é finito, o desconhecido infinito; intelectualmente estamos numa ilha no meio do oceano ilimitado de inexplicabilidade. O nosso dever em cada geração é recuperar um pouco mais de terra.”

Thomas Henry Huxley (1825-1895)

RESUMO

O alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) é o tensoativo aniônico de maior interesse econômico mundial. Sua rota de biodegradação envolve reações de adição de fumarato, β -oxidação, clivagem do anel aromático e dessulfonação. Por se tratar de um processo complexo, o uso de conjuntos variados de microrganismos possibilita o aproveitamento de diferentes metabolismos e enzimas na degradação do LAS. No entanto, há falta de literatura sobre os microrganismos que desempenham um papel fundamental na degradação do surfactante em reatores biológicos. Este estudo teve como objetivo definir o *common core* microbiano associado à degradação do surfactante aniônico alquilbenzeno linear sulfonado em biorreatores, a partir da mineração de dados disponíveis em bancos de dados públicos contendo sequências brutas do gene 16S rRNA. Quarenta e seis amostras do gene 16S rRNA, obtidas de 12 artigos científicos, foram analisadas usando ferramentas de bioinformática combinadas com um fluxo de trabalho no software R. Os gêneros mais abundantes entre as amostras foram *Methanosaeta* (4,6%) e *C39* (2,3%). O gênero *SJA-28* foi predominante nos núcleos comuns e esteve presente em seis dos sete núcleos construídos, seguido por *Reyranella* e *Christensenellaceae R-7 group*, encontrado em cinco núcleos comuns, e *Candidatus Magasanikbacteria*, em quatro núcleos. Pela análise do perfil funcional, foram encontradas enzimas relacionadas às etapas de adição de fumarato, dessulfonação e β -oxidação da biodegradação do LAS.

Palavras-chave: biodegradação do LAS, gene 16S rRNA, diversidade microbiológica, águas residuais de lavanderia.

ABSTRACT

Linear alkylbenzene sulfonate (LAS) is the anionic surfactant of greatest economic interest worldwide. Its biodegradation route involves reactions of fumarate addition, β -oxidation, cleavage of the aromatic ring and desulfonation. Since this is a complex process, the use of varied sets of microorganisms makes it possible to take advantage of different metabolisms and enzymes in the degradation of LAS. However, there is a lack of literature on the microorganisms that play a key role in the degradation of surfactant in biological reactors. This study aimed to define the microbial common core associated with the degradation of anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonate in bioreactors, from data mining available in public databases containing raw 16S rRNA gene sequences. Forty-six 16S rRNA gene samples, obtained from 12 scientific papers, were analyzed using bioinformatics tools combined with a workflow in R software. The most abundant genera among the samples were *Methanosaeta* (4.6%) and *C39* (2.3%). The genus *SJA-28* was predominant in the common core clusters and was present in six of the seven clusters constructed, followed by the *Reyranella* and *Christensenellaceae R-7 group*, found in five common cores, and *Candidatus Magasanikbacteria*, in four cores. By functional profile analysis, enzymes were found related to the fumarate addition, desulfonation and β -oxidation steps of LAS biodegradation.

Keywords: LAS biodegradation, 16S rRNA gene, microbiological diversity, laundry wastewater

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura química do alquilbenzeno linear sulfonado.....17
- Figura 2** - Curvas de rarefação, ao nível de gênero, das amostras agrupadas por artigo.....27
- Figura 3** - Relação entre a riqueza específica de ASVs observada e esperada segundo o estimador Chao1, e de diversidade alfa segundo o Índice de Diversidade Shannon.....30
- Figura 4** - Heatmap de cluster relacionando as amostras analisadas com os gêneros mais abundantes. Uma coluna foi adicionada à direita do mapa para designar o filo referente a cada um dos gêneros.....31
- Figura 5** - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada no índice Bray-Curtis. Cada ponto no gráfico representa uma amostra, onde os pontos de mesma cor possuem o mesmo tipo de inóculo, e pontos de mesmo formato compartilham o mesmo tipo de reator.....32
- Figura 6** - *Common core* microbiano existente entre as amostras com os maiores porcentagens médias de eficiência de remoção de LAS (a), reatores EGSB (b), reatores UASB (c), reatores FBR (d) e inóculo de abatedouro de aves (e), outro (f), e suinocultura (g) com as maiores porcentagens médias de eficiência de remoção de LAS para cada agrupamento.....34
- Figura 7** - Abundância de categorias de nível 1 de KEGG Orthology em cada amostra, agrupadas por reator e inóculo. Os nomes das categorias são mostrados na legenda à direita do gráfico.....37
- Figura 8** - Composição das categorias de nível 2 da via 09100 Metabolism de KEGG Orthology em cada amostra, agrupada por reator e inóculo. Os nomes das categorias são mostrados na legenda à direita do gráfico.....38
- Figura 9** - Abundância de perfis funcionais de KEGG Orthology propostas por Lara-Martín et al. (2010) em cada amostra, agrupadas por reatores (a) e inóculos (b). (BO) – β -oxidação; (D) – dessulfonação; (FA) – adição de fumarato.....40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Qualidade dos dados de sequenciamento das amostras analisadas.....	28
Tabela 2 - Comparação entre gêneros microbianos presentes nos <i>common core</i> das amostras agrupadas por inóculo, por reator e das amostras com maior eficiência média de remoção de LAS.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Alquilbenzeno Sulfonado
ASV	<i>Amplicon Sequence Variant</i> Sequências Biológicas Únicas
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> Ácido Desoxirribonucleico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EGSB	<i>Expanded Granular Sludge Bed</i> Reator de Leito Granular Expandido
FBR	<i>Fluidized Bed Reactor</i> Reator de Leito Fluidizado
HPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas
KO	<i>KEGG Orthology</i> Ortologia KEGG
LAS	Alquilbenzeno Linear Sulfonado
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> Centro Nacional para Informação Biotecnológica

PCBs	<i>Polychlorinated Biphenyls</i> Bifenilas Policloradas
PCoA	Análise de Coordenadas Principais
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> Reação em Cadeia da Polimerase
PubMed	<i>National Library of Medicine</i> Biblioteca Nacional de Medicina
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> Ácido Ribonucleico
SciELO	<i>Scientific Electronic Library Online</i> Biblioteca Eletrônica Científica Online
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i> Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3 METODOLOGIA	21
3.1 Procedimento Experimental.....	21
3.1.1 Seleção dos Artigos.....	22
3.1.2 Triagem das Sequências.....	22
3.2 Ferramentas de Bioinformática.....	23
3.2.1 Levantamento de abundâncias relativas e índices de diversidade.....	24
3.2.2 Agrupamentos para definição de <i>common core</i>	24
3.3 Predição Funcional.....	25
3.4 Construção de Tutoriais.....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Número de reads analisadas e ASVs geradas.....	26
4.2 Classificação taxonômica das ASVs e composição da comunidade microbiana.....	28
4.3 Comunidades do <i>common core</i>	32
4.4 Perfis funcionais.....	37
4.5 Relação entre reatores, inóculos e maiores médias de remoção de LAS.....	41
4.6 Tutoriais das etapas de análise.....	41
5 CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICE A - LEVANTAMENTO DAS INFORMAÇÕES DISPONÍVEIS SOBRE CADA REFERÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO UTILIZADA NO PRESENTE TRABALHO	51
APÊNDICE B - METADADOS SOBRE OS ASPECTOS QUÍMICOS E FÍSICOS DO BIORREATOR DE CADA ARTIGO	55

1 INTRODUÇÃO

Surfactantes, ou tensoativos, representam um dentre os principais componentes para a fabricação de produtos com propriedades detergentes. Tal aplicação se deve à estrutura química de suas moléculas, que são compostas por grupos apolares (porção hidrofóbica) constituídos por cadeias alquílicas, e por grupos polares (porção hidrofílica) que podem ser iônicos ou não (Curbelo, 2006; Cali, 2018). De acordo com a natureza do grupo polar da molécula do tensoativo, ele pode ser classificado como: aniônico (moléculas com região polar de carga negativa), não-iônico (moléculas com região polar com carga verdadeira, ou seja, seus grupos hidrofílicos não possuem carga), catiônico (moléculas com região polar de carga positiva) ou anfótero (moléculas com agrupamentos de carga positiva e negativa) (Bain & Company, 2014). Os tensoativos são substâncias que possuem como característica a tendência físico-química natural de adsorção às superfícies, reduzindo a tensão interfacial das mesmas, uma vez que as suas moléculas do surfactante se acumulam na superfície de um solvente, diminuindo a força de coesão entre as moléculas deste solvente (Curbelo, 2006; Felipe & Dias, 2017).

Atualmente, estas substâncias tornaram-se constantes nos ecossistemas aquáticos devido ao despejo de esgoto doméstico e industrial não tratado ou com tratamentos ineficientes, gerando grande variedade de impactos ambientais, como a formação de espuma na superfície de corpos d'água (Cali, 2018); a diminuição da penetração da luz solar, interferindo em processos fotossintéticos; impedindo processos de autodepuração; e reduzindo a solubilidade de oxigênio na água (Felipe & Dias, 2017). Os tensoativos também podem infiltrar no subsolo e contaminar reservatórios subterrâneos de água (Cali, 2018).

Os tensoativos aniônicos representam, no Brasil, o subsegmento de surfactantes mais utilizado, devido ao seu baixo custo, boas propriedades de limpeza e alta detergentência. Dentre os produtos aniônicos, os sabões em pó para roupas se destacam, representando 59% da demanda brasileira de tensoativos deste grupo, seguido pelos detergentes para limpeza de louças (14%), xampus (10%) e sabões líquidos para roupas (7%). Do subsegmento em questão, o surfactante de maior interesse econômico é o alquilbenzeno linear sulfonado (LAS), correspondendo a 84% do mercado de aniônicos no Brasil, e 45% no mundo (Bain & Company, 2014; Silva et al., 2017).

LAS é uma substância orgânica, composta por uma mistura de homólogos e isômeros de posição, contendo um anel aromático sulfonado na posição “para”, conectado a uma cadeia

alquil linear, que pode possuir entre 10 e 14 átomos de carbono (homólogos C_{10} a C_{14} , respectivamente) (Figura 1). Por ser um tensoativo aniônico, o grupo ativo de sua molécula muda de carga, tornando-se negativo (ânion), quando em dissolução (Penteado et al., 2006; Bonfim, 2006; Silva et al., 2017). A estrutura molecular do LAS pode formar 26 moléculas diferentes, isto quando ocorrem alterações por substituição do grupo fenila em todas as posições dos átomos de carbono da cadeia linear, com exceção do carbono 1. As reorganizações no número de átomos de carbono e da posição do grupo fenila na cadeia linear modificam as propriedades físico-químicas do composto, além de afetar sua biodegradação (Penteado et al., 2006).

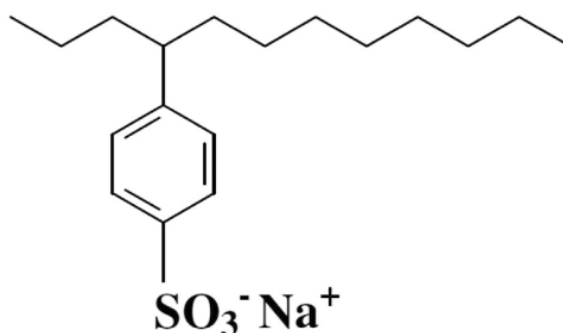


Figura 1. Estrutura química do alquilbenzeno linear sulfonado.
Fonte: Heibati *et al* (2016).

No que diz respeito às suas interações com o meio, quando se encontra na forma solúvel, o LAS possui a capacidade de se concentrar na fase líquida do meio líquido que se encontra, ou entre interfaces ar-líquido ou líquido-líquido, reduzindo a tensão superficial ou interfacial, ou na interface sólido-líquido, podendo se dissociar, dispersando partículas sólidas no meio. Ainda nessa conformação solúvel, o LAS interage com partículas presentes no meio líquido, de forma a induzir a formação de agregados com outros materiais (Souza, 2013).

Quando em meio sólido, o tensoativo pode ser adsorvido na interface sólido-líquido de diversas maneiras. Uma delas se dá através da adsorção por troca ou pareamento iônico, onde ocorre uma interação entre a extremidade do radical sulfofenil com os sítios positivos do solo. Essa relação dependerá diretamente da carga elétrica da superfície, uma vez que esta pode atraí-lo ou repeli-lo. Outra forma seria o LAS se adsorver no LAS já adsorvido na superfície. Para isso, deverá ocorrer a interação das cadeias alquílicas dos dois compostos, de forma que a força de atração entre elas seja maior que a repulsão dos radicais sulfofenil (Souza, 2013).

O alquilbenzeno linear sulfonado foi desenvolvido com o objetivo de substituir o alquilbenzeno sulfonado (ABS), um tensoativo aniônico sintético criado na década de 40, muito utilizado no mercado de detergentes para uso doméstico e industrial (Penteado et al., 2006; Souza, 2013). A produção e consumo mundial em larga escala do ABS se deu devido ao seu melhor desempenho quando comparado ao sabão, o principal produto que, até então, era utilizado para tal finalidade. Contudo, o alquilbenzeno sulfonado é uma substância altamente prejudicial ao meio ambiente em consequência de sua estrutura molecular composta por uma cadeia alquílica ramificada, que torna difícil a sua degradação por microrganismos (Penteado et al., 2006).

O LAS, por sua vez, possui uma cadeia alquílica linear, o que o torna mais facilmente degradado por microrganismos. Por esse motivo, este tensoativo é considerado biodegradável (Souza, 2013). A biodegradação do surfactante em questão ocorre devido à atividade metabólica dos microrganismos, onde alguns utilizam a molécula como fonte de carbono e enxofre (Bonfim, 2006). A rota de degradação do LAS envolve clivagem do anel aromático, dessulfonação, reações de β - e ω -oxidação, tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias (Okada et al., 2014). No caso de degradação em ambientes anóxicos, ainda não existe consenso entre os pesquisadores sobre como esses processos acontecem, onde parte destes estudiosos acredita que a degradação do LAS por microrganismos anaeróbios acontece somente após a reação de ω -oxidação, ou seja, após a reação direta do tensoativo com o oxigênio; outros autores afirmam que as reações de dessulfonação ocorrem apenas quando microrganismos aeróbios estão presentes; por último, alguns pesquisadores propõem que os microrganismos anaeróbios seriam capazes de realizar oxidações anaeróbias (Souza, 2013).

Em condições aeróbias, a biodegradação de LAS é bem definida atualmente, com taxas de eficiência de degradação uniformes entre os diversos trabalhos feitos na área (Silva et al., 2017). Scott e Jones (2000) explica que a degradação aeróbica do LAS pelos microrganismos ocorre por duas etapas, sendo elas a biodegradação primária e a final. Na primária, a estrutura do tensoativo sofre alteração, de forma que a molécula perde sua propriedade surfactante. Na etapa final, ocorre a completa mineralização do composto, ou seja, sua conversão a gás carbônico, água e sais minerais.

No caso da biodegradação anaeróbia do LAS, estudos recentes vêm tentando igualar as taxas de eficiência de degradação que ainda se encontram variadas, além de mostrar a importante contribuição de consórcios bacterianos para o processo. Por se tratar de um processo complexo, o uso de conjuntos variados de microrganismos possibilita usufruir de diferentes metabolismos e enzimas que auxiliam na degradação de LAS, uma vez que apenas

um único organismo não seria capaz, neste tipo de condição anaeróbia, de completar a operação, transformando uma macromolécula em moléculas menores e estáveis (Penteado et al., 2006). Dessa maneira, deve ser feito um tratamento nas águas residuárias nas quais será realizada a degradação de LAS, com o objetivo de repor os nutrientes da mesma, para que todas as diferentes populações bacterianas sejam favorecidas e possam realizar seus processos metabólicos (Granatto et al., 2019).

Comparando previamente os resultados de diversidade microbiana nos reatores utilizados nos estudos de Okada et al. (2014), Delforno et al. (2014), Callewaert et al. (2015), Delforno et al. (2015), Braga et al. (2015a), Braga et al. (2015b), Macedo et al. (2015), Delforno (2016), Andrade et al. (2017), Faria et al. (2017) e Granatto et al. (2019), os gêneros que apareceram em comum a quase todos foram somente dois: *Desulfobulbus* e *Geobacter*, ambos do filo Proteobacteria. Somente no trabalho de Callewaert et al. (2015) ambas as classificações não foram citadas. Outros gêneros de destaque foram *Dechloromonas*, *Desulfomicrobium*, *Desulfomonile*, *Desulfovibrio*, *Soehngenia*, *Sporomusa*, *Synergistes*, *Syntrophorhabdus*, *Syntrophus* e *Zoogloea*. Dados sobre espécies abundantes nos reatores foram pouco abordados pelos autores.

Com os avanços nas pesquisas de ecologia microbiana, se tem consciência de que a diversidade de microrganismos é muito vasta. Contudo, muitos desses microrganismos ainda não são amplamente conhecidos. Essa carência pode estar relacionada com o fato de que o principal método utilizado, até pouco tempo, para caracterização dos microrganismos se baseava no cultivo dos mesmos em laboratório (Silveira, 2004; Wetler-Tonini et al., 2011).

Da mesma forma que essas técnicas de cultivo auxiliam no isolamento dos micróbios, propiciando a compreensão detalhada das características e do metabolismo dos organismos, apenas uma pequena porcentagem (1-10%) dos microrganismos podem ser cultivados em laboratório por métodos de cultura, seja em meio sólido ou líquido (Silveira, 2004). Contudo, estudos têm mostrado que esses mesmos organismos podem ser úteis em pesquisas biotecnológicas, pois são responsáveis, por exemplo, por grande parte da atividade biodegradante presente na natureza (Wetler-Tonini et al., 2011).

Dessa forma, os métodos tradicionais de caracterização dos micróbios tornaram-se insuficientes, uma vez que não abrangem os aspectos ecológicos destes (Silveira, 2004). Como consequência, novas metodologias começaram a ser produzidas a partir da década de 80, onde o caráter molecular se tornou o alvo das análises. As primeiras aplicações foram feitas para identificação direta de bactérias presentes, principalmente, no solo, nas quais o gene 16S rRNA, obtido a partir de células existentes nas amostras, foi analisado (Silveira,

2004; Wetler-Tonini et al., 2011). Nestes métodos, é feita a extração do DNA genômico total do microrganismo, um fragmento de RNA ribossomal é selecionado e amplificado via PCR. A partir desse método, desenvolveram-se novos entendimentos acerca destas bactérias vivas agentes nos processos biogeoquímicos dos solos e sedimentos, uma vez que informações começaram a ser obtidas, sendo estas últimas utilizadas, dentre diversas finalidades, para fins taxonômicos (Wetler-Tonini et al., 2011). Outras aplicações que estão sendo feitas incluem estudos de genes patogênicos presentes em bactérias, história evolutiva de organismos, prognósticos de câncer, entre outros, através de genômica comparativa entre genomas. Para estes e diversos outros objetivos, novas ferramentas de bioinformática estão em constante desenvolvimento e, em sua grande maioria, são disponibilizadas via Internet (Santos & Ortega, 2002).

A vasta gama de informação adquirida através dos estudos genômicos pode ser organizada, analisada e interpretada com o apoio de técnicas de informática. Para isso, uma nova área foi inaugurada na ciência, a bioinformática, fundamental para a manipulação de dados biológicos. Santos e Ortega (2002) definiram a bioinformática como “uma modalidade que abrange todos os aspectos de aquisição, processamento, armazenamento, distribuição, análise e interpretação da informação biológica”. Tais processamentos, realizados por diversos laboratórios todos os anos, geram uma grande quantidade de dados, que precisam ser organizados e disponibilizados para futuras análises. Assim, bancos de dados, como a NCBI, foram construídos para armazenar sequências e genomas inteiros obtidos pelos cientistas, contribuindo para a investigação em outras áreas, como biotecnologia e medicina (Santos & Ortega, 2002).

Utilizando as análises *in silico* (ou seja, de bioinformática), uma das formas de se determinar taxonomias presentes em maior abundância entre populações microbianas é através da configuração de um *common core*. Segundo Risely (2019), o *common core* de um microbioma identifica os componentes microbianos mais difundidos dentro de uma população.

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo identificar taxonomicamente o *common core* bacteriano entre amostras obtidas em pesquisas presentes na literatura envolvidas na degradação de LAS. Para isso, sequências de estudos anteriores serão usadas como base para as análises, com a intenção de se determinar um ou mais gêneros que sejam comuns entre estes trabalhos. Com isso, consórcios bacterianos mais eficientes poderão ser produzidos ou estimulados e empregados em novos estudos sobre remoção do surfactante alquilbenzeno linear sulfonado em reatores biológicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Definir o *common core* microbiano associado a condições com degradação do surfactante aniônico alquilbenzeno linear sulfonado, a partir de mineração de dados disponíveis em banco de dados públicos contendo sequências brutas do gene 16S rRNA.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a diversidade e a riqueza microbiana do Domínio Archaea e Bacteria por meio da análise *in silico* de dados oriundos de bancos de dados públicos contendo sequências do gene 16S rRNA;
- Predizer o perfil funcional das taxonomias obtidas por meio da ferramenta Tax4Fun;
- Analisar de forma integrada os dados físico-químicos disponíveis nos artigos publicados com as taxonomias obtidas nas análises propostas;
- Definir e elaborar tutoriais específicos para análises de bioinformática no LINUX e estatística no R para difusão das ferramentas computacionais no laboratório.

3 METODOLOGIA

3.1 Procedimento Experimental

Para a elaboração do presente trabalho, foram utilizados como base 12 artigos presentes na literatura, cujo objetivo principal destes foi estudar a remoção biológica de LAS em águas residuárias (Apêndice A). Por meio de ferramentas de bioinformática foram analisadas 46 amostras obtidas em bancos de dados públicos. Vale ressaltar que as amostras foram anteriormente sequenciadas pelos pesquisadores utilizando três diferentes plataformas de sequenciamento, sendo elas 454-pyrosequencing, Illumina MiSeq e Ion Torrent PGM. Além disso, a qualidade de cada amostra não foi afetada, pois foram utilizados os dados brutos disponibilizados.

A partir dos dados apresentados em cada trabalho, foi realizada uma revisão prévia sobre aspectos químicos e físicos de cada amostra e, com isso, uma tabela foi feita com informações como: título do artigo, número de amostras por artigo, ID de cada amostra,

configuração do reator, plataforma de sequenciamento, primers utilizados, tamanho da amostra (MB), formato do arquivo onde estão as sequências, local de retirada do inóculo, tipo de água residuária, concentração de LAS no afluente (mg/L), porcentagem de remoção do surfactante, porcentagem de remoção de DQO e pH do efluente (Apêndice B).

Através do software R (R Core Team, 2013), estes dados físico-químicos foram utilizados para comparar, por exemplo, a diversidade de bactérias e arqueias entre cada reator, inóculo e plataforma de sequenciamento. Dessa forma, tornou-se possível inferir quais condições apresentaram não só maior número de gêneros, como também uma abundância superior de bactérias e arqueias diretamente relacionadas à degradação de LAS. Além da diversidade, também foram analisadas as similaridades e dessemelhanças dos dados, utilizando o método de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) (Gower, 2015).

3.1.1 Seleção dos Artigos

Para a seleção dos artigos, utilizaram-se as bases de dados National Library of Medicine (PUBMED), Scientific Electronic Library Online (SCIELO) e o Portal de Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Foram definidos como critérios de inclusão: a utilização de reatores biológicos para biodegradação de LAS presente em águas residuárias; e o uso de técnicas de sequenciamento em larga escala do gene rRNA 16S, com posterior depósito das sequências obtidas em bancos de dados públicos. Outros critérios que foram considerados dizem respeito ao ano, local e idioma de publicação dos mesmos. Foi estipulado o intervalo de tempo máximo de publicação de 10 anos, sem seleção do país de origem, com a intenção de obter maior abrangência de referencial teórico, além de maior variedade metodológica entre os trabalhos.

3.1.2 Triagem das Sequências

Seguindo os preceitos propostos, optou-se por utilizar sequências do gene 16S rRNA, sem preferência por uma ou mais regiões do gene. Para a aquisição destas, acessou-se o site do banco de dados referenciado nos trabalhos, e nele foi inserido o número de acesso do projeto pertencente a cada artigo. Com a intenção de realizar uma análise de qualidade posterior, arquivos do tipo FASTQ foram definidos como opção principal, pois estes possuem pontuações (*score*) de qualidade do sequenciamento para cada fragmento.

3.2 Ferramentas de Bioinformática

Para a análise das sequências e posterior obtenção da diversidade e riqueza microbiana, inicialmente foi avaliada a qualidade das sequências utilizando a ferramenta FastQC v.0.11.5 (Andrews, 2010), sendo que as sequências com qualidade inferior a 30 (Phred score) e tamanho menor que 100 pares de bases serão filtradas com o Trimmomatic 0.39 (Bolger et al., 2014). As análises de bioinformática serão realizadas utilizando a plataforma Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME2, version 2019.7, <https://docs.qiime2.org/2019.7>) (Bolyen et al., 2018) e seus *plug-ins*. O *plug-in* “*cutadapt*” (Martin, 2011) foi utilizado para retirada dos primers e o “Qiime tools import” para importar os “paired-ends reads” demultiplexados e filtrados pela qualidade, e criar o arquivo “artefatos” (tipo ‘SequencesWithQuality’). Em seguida, foram realizados o “denoising”, a remoção de quimeras (pelo método consenso) e o agrupamento em sequências biológicas únicas (ASV) utilizando o *plug-in* “*dada2*” (Callahan et al., 2016) (via q2-dada2). Neste tipo de agrupamento, os erros das sequências nucleotídicas podem ser minimizados de forma que as ASVs possam ser definidas de forma exata, permitindo apenas um único nucleotídeo de diferença, de acordo com a região do gene sequenciado (Callahan et al., 2017; Forster et al., 2019). O uso de ASVs também oferece grandes vantagens quando amostras de diferentes estudos são analisadas no mesmo contexto, uma vez que as ASVs representam entidades biológicas consistentes, fornecendo altos níveis de reprodutibilidade e comparabilidade entre estudos independentes. Além disso, abordagens ASV reproduzem com muito mais precisão a diversidade das comunidades (Callahan et al., 2016; Forster et al., 2019).

As ASVs foram então alinhadas, utilizando *mafft* (Katoh et al., 2002) (via q2-alignment) e os alinhamentos aplicados para a construção da filogenia com *fasttree2* (Price et al., 2010) (via q2-phylogeny). Para a classificação taxonômica das ASVs, foi aplicado o *q2-feature-classifier plug-in* (Bokulich et al., 2018) *classify-consensus-vsearch* (Rognes et al., 2016), tendo como base o banco de dados Silva Ribosomal RNA Gene versão 138 (www.arb-silva.de/documentation/release-138) (Quast et al., 2013), usando 97% de similaridade.

3.2.1 Levantamento de abundâncias relativas e índices de diversidade

Os arquivos resultantes (*output*) do Qiime contendo as abundâncias das ASVs nas amostras foram analisados, usando o pacote Phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013) e

Heatmaply (Galili et al., 2018) do software R (R Core Team, 2013) para análises estatísticas e computação gráfica dos dados. Para a confecção das curvas de rarefação, as amostras não foram previamente normalizadas e foram baseadas no parâmetro ASV e não na espécie, o que elimina erros decorrentes de classificação incorreta/incompleta (Kuzniar et al, 2020).

A riqueza específica e diversidade alfa das ASVs foram calculadas e representadas graficamente pelos pacotes PhyloSeq e ggplot, e avaliadas a partir do estimador Chao1 e Índice de Diversidade Shannon, respectivamente, comparando com a riqueza de ASVs observadas nas amostras. Já a diversidade beta, que é a comparação da composição de espécies entre as amostras (Nogueira et al., 2008), foi realizada pelo método de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) (Gower, 2015), verificando as similaridades dos dados, segundo o Índice Bray-Curtis (Gauch Jr., 1973), para as amostras de todos os artigos.

3.2.2 Agrupamentos para definição de *common core*

De forma a analisar a composição taxonômica das amostras, estas foram separadas em oito agrupamentos: 1) todas as amostras analisadas no presente estudo; 2) amostras dos artigos que obtiveram as maiores médias de eficiência de remoção de LAS; 3) amostras obtidas de reatores EGSB (Expanded Granular Sludge Bed) e, a partir destas, foram filtradas as amostras dos artigos que obtiveram uma dentre as três maiores médias de eficiência de remoção de LAS; 4) amostras obtidas de reatores UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket), sem filtragem de maiores médias de eficiência de remoção de LAS, uma vez que este reator foi utilizado em apenas um dos artigos; 5) amostras obtidas de reatores FBR (Fluidized Bed Reactor) e, a partir destas, foram filtradas as amostras dos artigos que obtiveram uma dentre as três maiores médias de eficiência de remoção de LAS; 6) amostras obtidas dos estudos cujo inóculo utilizado era proveniente de abatedouro de aves e, a partir destas, foram filtradas as amostras dos artigos que obtiveram uma dentre as três maiores médias de eficiência de remoção de LAS; 7) amostras obtidas dos estudos cujo inóculo utilizado não foi especificado pelos autores, sem filtragem de maiores médias de eficiência de remoção de LAS, uma vez que este inóculo foi utilizado em apenas um dos artigos; 8) amostras obtidas dos estudos cujo inóculo utilizado era proveniente de suinocultura e, a partir destas, foram filtradas as amostras dos artigos que obtiveram uma dentre as três maiores médias de eficiência de remoção de LAS.

Para cada grupo, foram construídos diferentes diagramas de Venn, onde foi feita uma análise de associação que considera os táxons compartilhados que estão presentes em

diferentes microbiomas, baseando-se na presença ou ausência de ASVs compartilhadas (Shade & Handelsman, 2012).

3.3 Predição Funcional

Para a predição do perfil funcional das taxonomias obtidas, foi utilizada a ferramenta Tax4Fun (<http://tax4fun.gobics.de/>), que possibilita criar perfis de comunidades funcionais com base em dados de gene 16S rRNA. O método utilizado pelo Tax4Fun fornece uma previsão de perfis funcionais com base em abundâncias de agrupamentos (ASVs, no caso do presente trabalho), cujas identidades taxonômicas foram obtidas utilizando o banco de dados Silva Ribosomal RNA Gene. Estes agrupamentos foram transformados em perfis taxonômicos do banco de dados Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/>) e classificados por meio do banco de dados KEGG Orthology (KOs) (<https://www.genome.jp/kegg/ko.html>), de bactérias e arqueias. A transformação foi realizada por uma matriz de associação pré-computada construída a partir de uma análise BLASTN. Em seguida, as abundâncias estimadas de organismos KEGG foram normalizadas pelo número de cópias dos genes 16S rRNA obtido a partir das anotações do genoma do NCBI. Por fim, as abundâncias taxonômicas normalizadas foram usadas para combinar os perfis funcionais pré-computados dos organismos KEGG para a predição do perfil funcional da comunidade microbiana (Abhauer et al, 2015).

A ferramenta foi aplicada em todas as amostras de sequências de gene 16S rRNA, e as tabelas funcionais geradas foram unidas em um único arquivo e, posteriormente, analisadas utilizando o pacote PhyloSeq.

3.4 Construção de Tutoriais

Um tutorial com as primeiras etapas de análise das sequências de gene 16S rRNA no sistema operacional LINUX foi elaborado. Para isso, foi utilizada a plataforma online HackMD (<https://hackmd.io>). Neste, foram descritas todas as ferramentas e comandos necessários para realizar: a instalação da plataforma Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME2); o download de amostras dos bancos de dados European Nucleotide Archive (ENA) e National Center for Biotechnology Information (NCBI) via linha de comando; instalação e avaliação de qualidade pela ferramenta FastQC; instalação da ferramenta Trimmomatic e trimagem das sequências com baixa qualidade; instalação do

plug-in “*cutadapt*” e retirada de primers; importação dos “paired-ends reads” demultiplexados para construção do arquivo “artefatos”; “denoising” das sequências; remoção de quimeras; clusterização em unidades ASVs utilizando o *plug-in* “*dada2*”; alinhamento das sequências para a construção da filogenia; download dos bancos de dados Silva Ribosomal RNA Gene e Greengenes; treinamento de bancos de dados, utilizando diferentes *primers* diretos (*forward*) e reversos (*reverse*); e classificação taxonômica das ASVs.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Número de reads analisadas e ASVs geradas

Um resumo da qualidade dos dados de sequenciamento utilizados no presente estudo está apresentado na Tabela 1. Um total de 3.617.577 sequências brutas foram obtidas, com comprimento médio de 297 pares de bases, sendo 2.111.746 sequências (~58,4%) para o reator EGSB, 1.393.326 sequências (~38,5%) para o reator FBR e 35.398 sequências (~1%) para o reator UASB. As amostras de sequências advindas de experimentos realizados em outros tipos de reatores somaram 77.107 (~2,1%). Em relação a origem dos inóculos, as sequências obtidas foram: 786.847 (~22%) para suinocultura, 2.147.144 (~59%) para abatedouro de aves e 77.107 (~2%) para água de lavanderia. Amostras de sequências cujos inóculos não foram especificados pelos autores dos artigos somaram 606.479 (17%). Em relação às plataformas de sequenciamento, 140.930 (~3,9%) sequências foram obtidas na plataforma 454-pyrosequencing, 1.354.786 (~37,45%) sequências no Ion Torrent PGM, e a plataforma Illumina, por sua vez, apresentou 2.121.861 (~58,65%) sequências.

Após a filtragem, “denoising” e remoção de quimeras, 56% das sequências de entrada foram utilizadas para realizar a etapa de determinação de ASVs. A redução na quantidade de sequências analisadas ocorreu devido à combinação de altos valores de pontuação de qualidade (Phred quality score = 30) e de corte de comprimento de 100 pares de bases. Seis amostras foram retiradas das análises por possuírem menos de 550 sequências. Após a identificação taxonômica, foram obtidas 1.753 ASVs, com 99% de similaridade, e estas foram usadas para as análises de diversidade e riqueza.

Curvas de rarefação foram geradas (a partir de dados não normalizados) para todas as amostras, agrupadas por artigo (Figura 2), onde foi possível observar que todas as curvas alcançaram a estabilidade, o que significa que toda a riqueza esperada nas amostras foi alcançada nos dados observados (Kim et al., 2017).

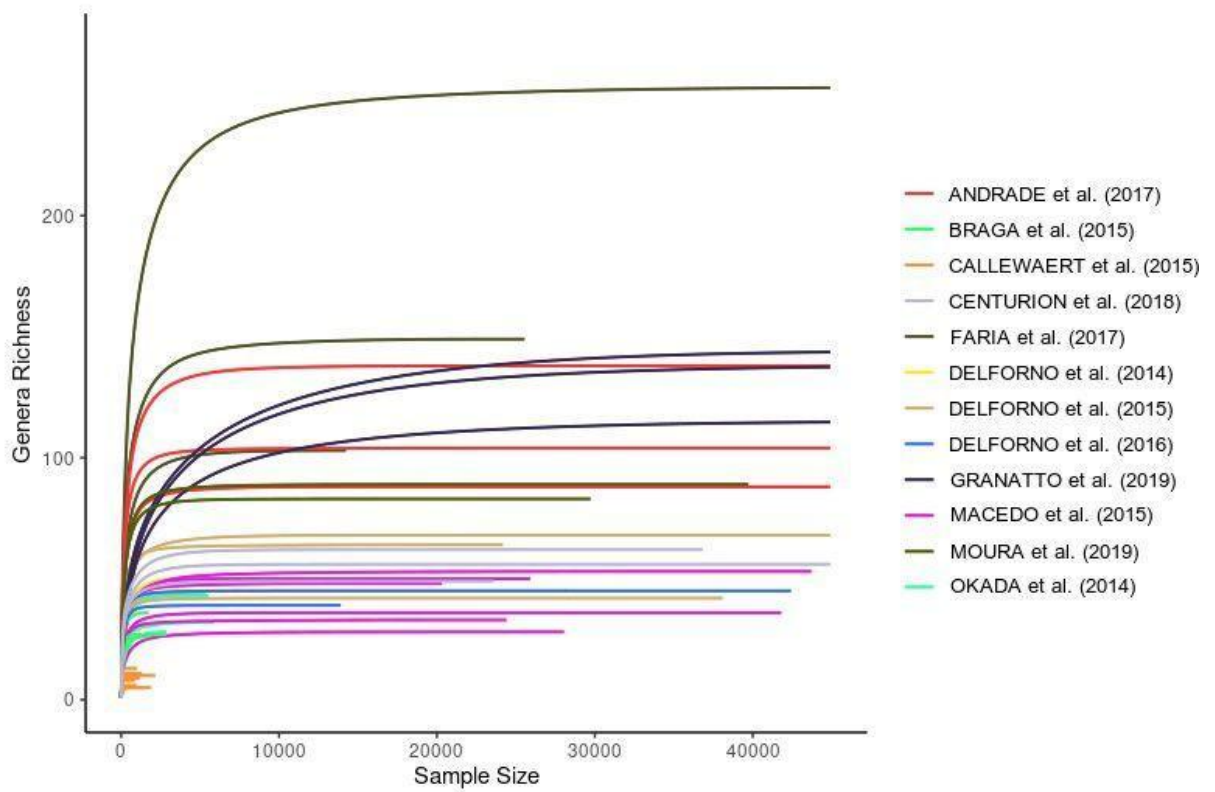


Figura 2. Curvas de rarefação, ao nível de gênero, das amostras agrupadas por artigo.

Tabela 1

Qualidade dos dados de sequenciamento das amostras analisadas.

Amostras	Entrada	Trimmed SE	Trimmed F	Trimmed R	Merged	Denoised	Nonchim	% aprovada
AS1A1	8,994	7,508				6,720	6,720	74.72
AS2A1	7,224	6,700				6,278	6,278	86.90
AS3A1	10,950	8,336				7,628	7,011	64.03
AS4A1	8,230	6,124				5,658	5,658	68.75
AS1A2	3,200	2,700				2,231	2,231	69.72
AS2A2	6,517	5,489				4,986	4,892	75.06
AS1A3	153,390	98,446				97,139	54,682	35.65
AS2A3	84,419	54,010				52,566	28,815	34.13
AS3A3	115,910	69,107				68,302	31,482	27.16
AS4A3	167,565	92,617				91,118	50,717	30.27
AS5A3	140,033	80,119				78,075	53,396	38.13
AS6A3	106,822	63,071				60,308	32,961	30.86
AS1A4	4,607	3,770				3,356	3,320	72.06
AS2A4	4,641	3,758				3,292	3,292	70.93
AS3A4	4,098	3,285				3,050	2,912	71.06
AS4A4	5,362	4,108				3,758	3,758	70.08
AS1A5	96,442	56,709				54,322	46,006	47.70
AS2A5	140,686	91,946				87,801	76,075	54.07
AS3A5	81,282	52,634				51,859	47,946	58.99
AS4A5	78,408	39,653				38,397	36,094	46.03
AS1A8	41,787	25,784				23,735	22,241	53.22
AS2A8	148,042	82,486				80,809	61,737	41.70
AS1A9	47,061		46,056	40,440	*	43,045	19,454	41.34
AS2A9	92,441		85,568	7,455	*	83,780	35,287	38.17
AS3A9	172,887		169,001	144,745	*	158,486	76,522	44.26
AS1A11	223,806	215,497				207,192	142,621	63.72
AS2A11	168,826	162,811				159,829	77,444	45.87
AS3A11	213,847	202,808				198,796	117,219	54.81
AS1A13	159,084	156,679				152,661	146,554	92.12
AS2A13	157,734	154,505				150,642	143,589	91.03
AS3A13	154,572	151,569				147,029	138,566	89.64
AS1A15	8,582	5,986				5,320	5,320	61.99
AS2A15	5,148	3,946				3,681	3,103	60.27
AS3A15	6,270	4,547				4,239	4,199	66.97
AS1A16	4,761	3,421				2,907	2,341	49.17
AS3A16	5,762	4,496				3,911	3,510	60.92
AS4A16	11,441	5,806				4,756	4,455	38.94
AS9A16	4,049	3,665				2,840	2,840	70.14
AS10A16	7,724	5,565				4,996	4,799	62.13
AS12A16	4,598	3,282				2,960	2,960	64.37
AS13A16	5,487	3,405				2,830	2,691	49.04
AS14A16	126,115	124,627				99,362	58,360	46.27
AS15A16	109,779	108,360				85,676	43,385	39.52
AS16A16	139,349	137,890				125,687	63,018	45.22
AS1A17	119,241	117,951				107,457	45,566	38.21
AS2A17	237,119	234,474				218,713	88,073	37.14

Entrada - número de sequências presentes nos arquivos FASTQ brutos; Trimmed SE - número de sequências após filtragem de qualidade de amostras de extremidade única; Trimmed F - número de sequências diretas (*forward*) após filtragem de qualidade de amostras de extremidades pareadas; Trimmed R - número de sequências reversas (*reverse*) após filtragem de qualidade de amostras de extremidades pareadas; Merged - sequências diretas e reversas que foram mescladas; Denoised - número de leituras após o processo de denoising; Nonchim - número de sequências após a remoção das quimeras; % aprovada - número relativo de leituras aprovadas após todas as etapas acima em comparação com o número de sequências de entrada. Apenas as amostras AS1A9, AS2A9 e AS3A9 possuíam arquivos de sequências brutas direta e reversa e, portanto, são as únicas que possuem dados nas colunas Trimmed F, Trimmed R e Merged. As amostras restantes tinham apenas arquivos de sequência bruta de extremidade única e seus dados são apresentados na coluna Trimmed SE.

4.2 Classificação taxonômica das ASVs e composição da comunidade microbiana

Os domínios mais abundantes encontrados foram Bacteria (97,4%) e Archaea (2,5%). Com relação aos filos, Proteobacteria (25,7%), Bacteroidota (11,4%) e Desulfobacterota (8,9%), foram os mais abundantes do Domínio Bacteria, enquanto que, do Domínio Archaea, o filo de maior destaque foi Halobacterota (6%). Os gêneros predominantes foram *Methanosaeta* (4,6%), do Domínio Archaea, e *C39* (2,3%), do Domínio Bacteria.

Na literatura, o gênero *Methanosaeta* já foi descrito como persistente em ambientes recalcitrantes e na presença de sulfeto (Moura, 2019), produtor de metano utilizando acetato como substrato (Gao et al., 2014) em ambientes com concentrações extremamente baixas de O_2 , além de serem microrganismos que podem estar indiretamente relacionados com as vias metabólicas de degradação de compostos tóxicos, como LAS (Centurion et al., 2018; Motteran et al., 2018; Granatto et al., 2020).

Bactérias pertencentes ao gênero *C39*, da família Rodocyclaceae, são amplamente difundidas e abundantes em sistemas de tratamento de efluentes, uma vez que desempenham atividades benéficas para a degradação e transformação de poluentes, como nitrogênio e fósforo (Chen et al., 2019), podendo, algumas espécies, estarem associadas ao acetato no processo de desnitrificação (Gao et al, 2017).

De acordo com o índice de Shannon, a riqueza específica e diversidade alfa apresentaram grande amplitude nos valores de diversidade observados entre as amostras (Figura 3). As amostras com maiores diversidades foram as provenientes de reatores EGSB (amostras S1P9, S2P9, S3P9, S1P17 e S2P17) e inóculos obtidos em abatedouros de aves (amostras S1P9, S2P9, S3P9, S1P17 e S2P17). As riquezas observadas e estimadas para cada amostra foram muito semelhantes, confirmando os resultados observados nas curvas de rarefação. As amostras S2P9, S3P9 e S3P11 destacaram-se por apresentarem valores elevados

tanto de riqueza quanto de diversidade.

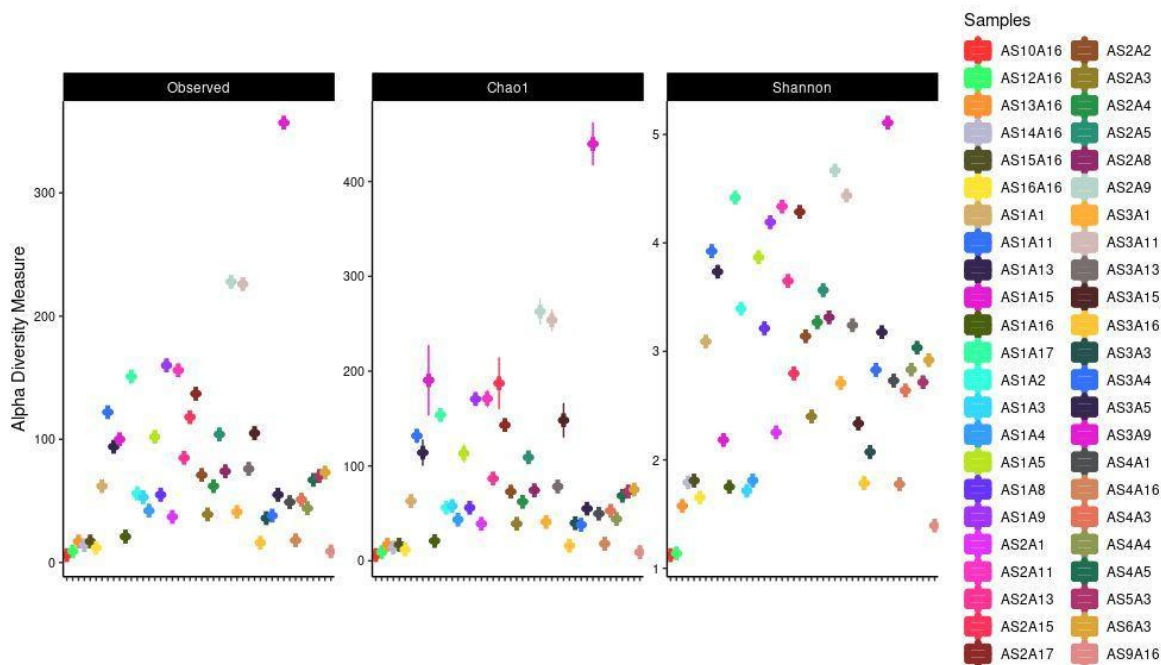


Figura 3. Relação entre a riqueza específica de ASVs observada e esperada segundo o estimador Chao1, e de diversidade alfa segundo o Índice de Diversidade Shannon.

Um heatmap de cluster foi gerado para visualização da abundância de gêneros (Figura 4). Os dados brutos foram transformados em porcentagem pois, dessa forma, os valores comporiam uma escala significativa e comparável (Galili et al., 2018), e os 35 gêneros mais abundantes dentre o total de obtido (694 gêneros) foram filtrados para a construção do mapa. Dois gêneros se destacaram por possuírem elevada abundância em uma única amostra, sendo eles os gêneros *Desulfobulbus*, na amostra S1P4, e *C39*, na amostra S3P3.

O gênero *Desulfobulbus* agrupa bactérias anaeróbias, onde algumas de suas espécies são capazes de usar compostos orgânicos simples, ácidos de cadeia longa ou álcoois como doadores de elétrons e fontes de carbono (Okada et al., 2014; Macedo et al., 2015). Adicionalmente, estão relacionadas à redução do sulfato a sulfeto durante a respiração anaeróbia, e à quebra de compostos aromáticos na degradação de LAS (Delforno et al., 2014;

Okada et al., 2014; Braga et al., 2015a; Braga et al., 2015b; Delforno et al., 2015).

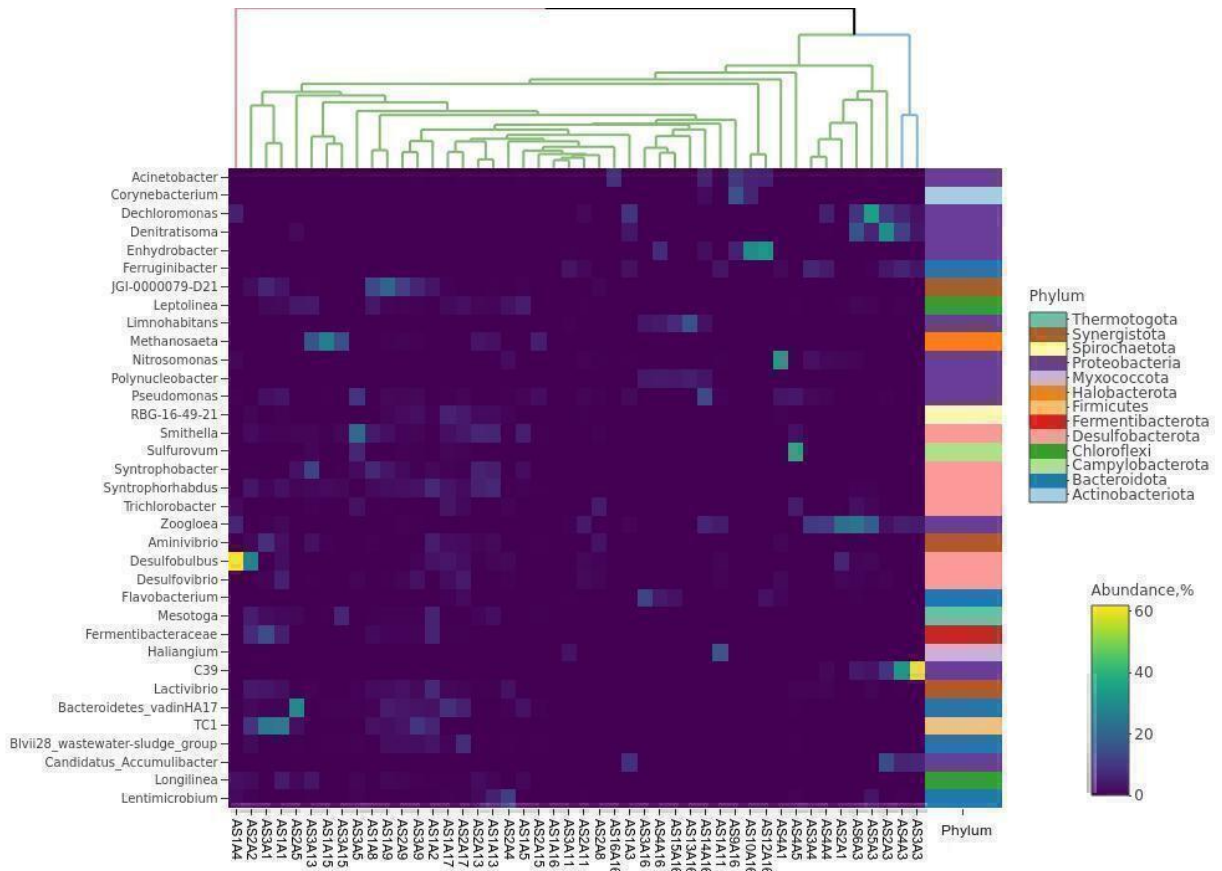


Figura 4. Heatmap de cluster relacionando as amostras analisadas com os gêneros mais abundantes. Uma coluna foi adicionada à direita do mapa para designar o filo referente a cada um dos gêneros.

Análises de Coordenadas Principais (PCoA) das amostras separadas por inóculo e reator foram realizadas. Na Figura 5, o eixo X representa o primeiro componente principal, enquanto que o eixo Y representa o segundo componente principal. As porcentagens referentes a cada eixo representam a contribuição do componente para a diferença entre as amostras (Wu et al., 2020). As amostras mais próximas umas das outras, segundo o Índice Bray-Curtis, indicam elevada similaridade entre suas comunidades microbianas. As comunidades microbianas presentes nas amostras do inóculo água de lavanderia formaram um agrupamento muito próximo de outro conjunto composto por apenas três amostras de inóculo

de abatedouro de aves e reator EGSB.

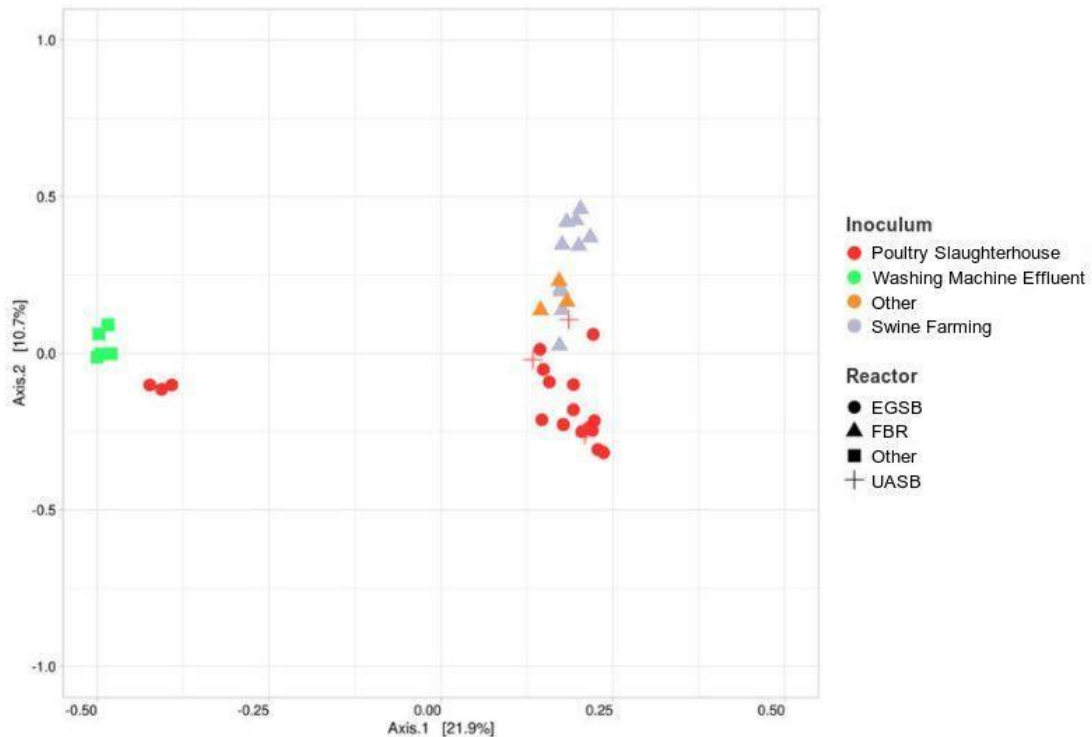


Figura 5. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada no índice Bray-Curtis. Cada ponto no gráfico representa uma amostra, onde os pontos de mesma cor possuem o mesmo tipo de inóculo, e pontos de mesmo formato compartilham o mesmo tipo de reator.

As amostras que possuíam o mesmo tipo de inóculo e diferentes reatores apresentaram-se próximas. O mesmo foi observado entre as amostras com inóculos diferentes e mesmo reator, o que pode indicar uma média ou baixa influência da interação entre inóculo e reator nas comunidades microbianas.

4.3 Comunidades do *common core*

Para se determinar as semelhanças entre as comunidades microbianas, as ASVs compartilhadas entre as amostras agrupadas por inóculo, amostras agrupadas por reatores e por amostras com as maiores médias de eficiência de remoção de LAS foram calculadas, a nível de gênero. De acordo com os diagramas de Venn gerados (Figura 6), cerca de 0,34% das

ASVs geradas foram comuns entre as 4 maiores médias de remoção de LAS. As amostras de reatores FBR e inóculos de suinocultura obtiveram as maiores porcentagens, com, respectivamente, 1,5% e 2,5% de ASVs comuns. Não foram gerados resultados no diagrama de Venn referente ao agrupamento composto por todas as amostras analisadas por este estudo, demonstrando que não existem gêneros compartilhados por elas.

Não foram encontrados gêneros comuns entre os três tipos de reatores, e apenas o gênero *SJA-28* foi compartilhado entre os três tipos de inóculo (Tabela 2). Este gênero também se destaca por estar presente em seis dos sete diagramas, com a única ausência no reator UASB. Presentes em cinco *common core* estão *Reyranella* e *Christensenellaceae R-7 group* e, em quatro *common core*, *Candidatus Magasanikbacteria*.

Embora nenhum estudo anterior tenha apontado qualquer um dos gêneros de destaque encontrados nos *common core* como atuantes diretos ou indiretos na degradação de LAS, bactérias do gênero *Reyranella* são heterotróficas potencialmente redutoras de nitrato (Kim et al., 2020; Roy et al., 2020), dominantes nos lençóis freáticos, cujas fontes de nitrogênio são sal de amônio e nitrogênio orgânico, sendo esta última em menor proporção (Tang et al., 2020). Além disso, são onipresentes em processos de tratamento biológico de águas residuais (Roy et al., 2020), pois estão relacionados com a redução de biopolímeros (como polissacarídeos e, principalmente, de proteínas), que resulta na diminuição das taxas de desenvolvimento de incrustações nas membranas de filtração destes sistemas de tratamento de água (Deng et al., 2019). Bactérias pertencentes ao gênero *Reyranella* também são capazes de degradar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (Watari et al., 2020), que muito se relacionam com o LAS, pois dentre os problemas ambientais decorrentes do acúmulo de LAS nos recursos hídricos está o aumento da concentração de compostos xenobióticos, como PCBs e HPAs presentes no sedimento, por solubilização micelar e, dessa forma, sua degradação é inibida (Penteado et al., 2006).

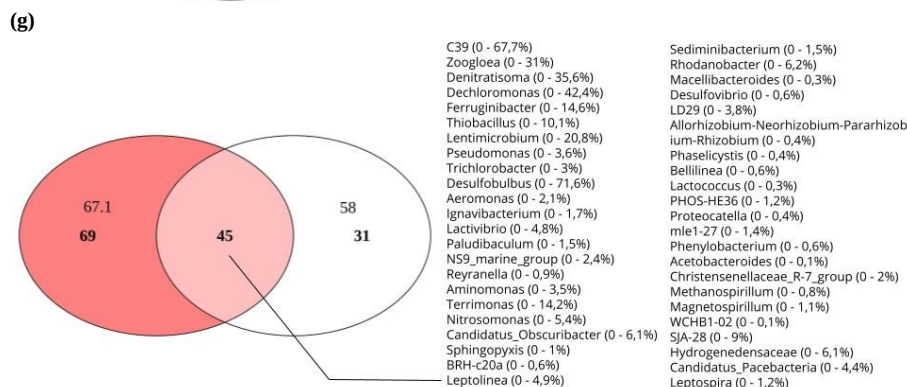
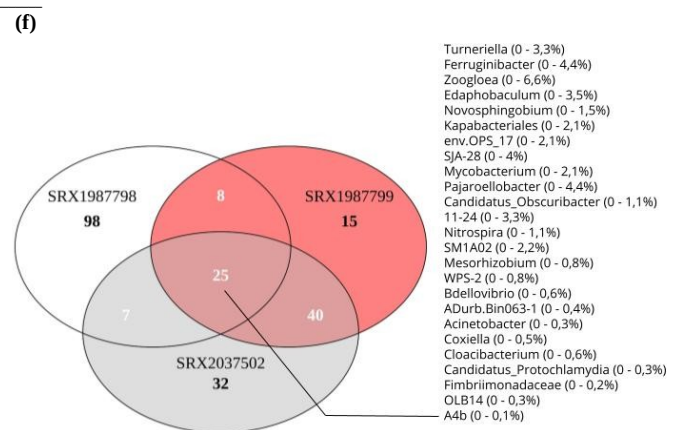
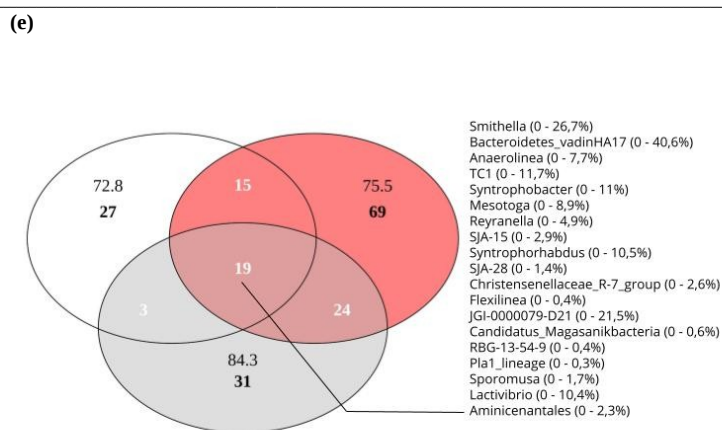
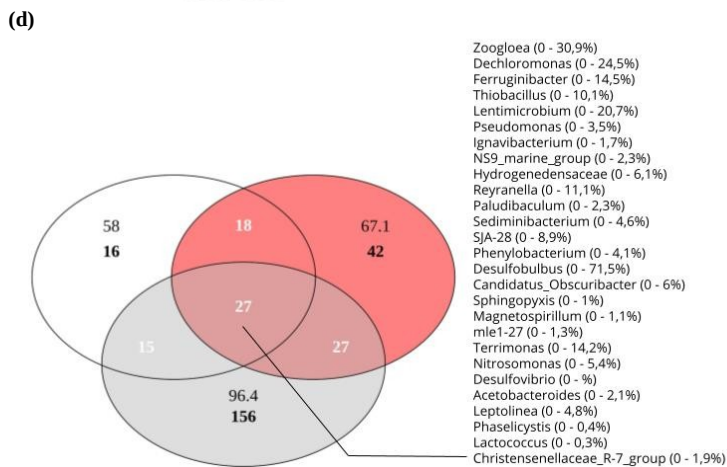
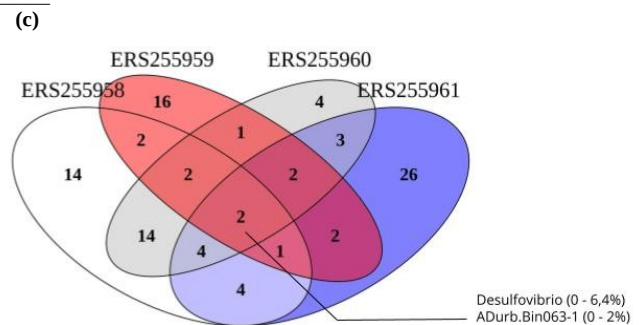
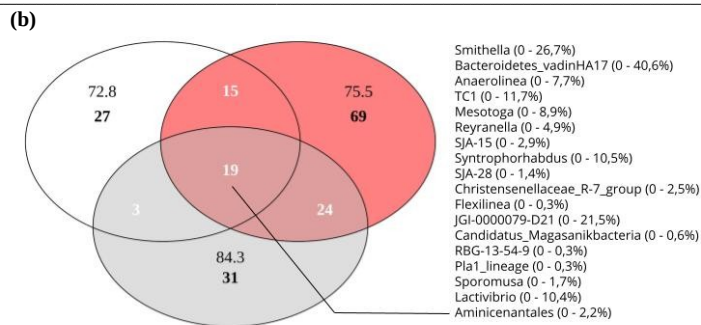
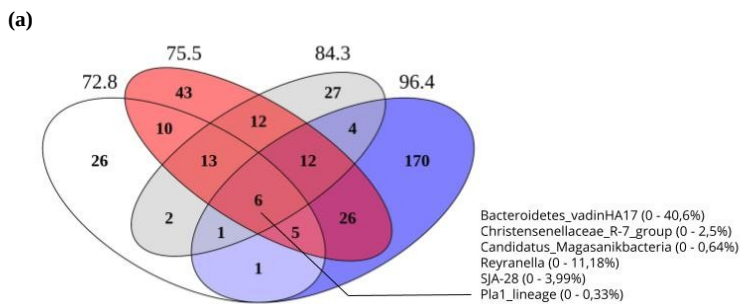


Figura 6. Common core microbiota existente entre as amostras das maiores médias de porcentagem de remoção de LAS (a), reatores EGSB (b), reatores UASB (c), reatores FBR (d), e inóculos provenientes de abatedouro de aves (e), outros (f) e suinocultura (g) com as maiores médias de porcentagem de remoção de LAS para cada agrupamento.

Tabela 2

Comparação dos gêneros microbianos presentes no *common core* das amostras agrupadas por inóculo, por reator e das amostras com maior eficiência média de remoção de LAS.

Gênero	Quatro maiores médias de eficiência de remoção	Reator			Inóculo		
		EGSB + maiores médias de eficiência de remoção	FBR + maiores médias de eficiência de remoção	UASB	Abatedouro de aves + maiores médias de eficiência de remoção	Outro	Suinocultura + maiores médias de eficiência de remoção
Bacteroidetes_vadinHA17	*	*			*		
Christensenellaceae_R-7_group	*	*	*		*		*
Candidatus_Magasanikbacteria	*	*	*		*		
Reyranela	*	*	*		*		*
SJA-28	*	*	*		*	*	*
Pla1_lineage	*	*			*		
Smithella		*			*		
Anaerolinea		*			*		
TC1		*			*		
Mesotoga		*			*		
SJA-15		*			*		
Syntrophorhabdus		*			*		
Flexilinea		*			*		
JGI-000079-D21		*			*		
RBG-13-54-9		*			*		
Sporomusa		*			*		
Lactivibrio		*			*		*
Aminicenantales		*			*		
Zoogloea			*			*	*
Dechloromonas			*				*
Ferruginibacter			*			*	*
Thiobacillus			*			*	*
Lentimicrobium			*			*	*
Pseudomonas			*			*	*
Ignavibacterium			*			*	*
NS9_marine_group			*			*	*
Hydrogenedensaceae			*			*	*
Paludibaculum			*			*	*
Sediminibacterium			*			*	*
Phenylobacterium			*			*	*
Desulfobulbus			*			*	*
Candidatus_Obscuribacter			*			*	*
Sphingopyxis			*			*	*
Magnetospirillum			*			*	*
mle1-27			*			*	*
Terrimonas			*			*	*
Nitrosomonas			*	*		*	*
Desulfovibrio			*			*	*
Acetobacteroides			*			*	*
Leptolinea			*			*	*
Phaselicystis			*			*	*
Lactococcus			*			*	*
Syntrophobacter							
Turneriella						*	
Edaphobaculum						*	
Novosphingobium						*	
Kapabacteriales						*	
env.OPS_17						*	
Mycobacterium						*	
Pajaroellobacter						*	
11-24						*	
Nitrospira						*	
SM1A02						*	
Mesorhizobium						*	
WPS-2						*	
Bdellovibrio				*		*	
ADurb.Bin063-1						*	
Acinetobacter						*	
Coxiella						*	
Cloacibacterium						*	
Candidatus_Proteochlamydia						*	
Fimbriimonadaceae						*	
OLB14						*	
A4b						*	
C39							*
Denitratisoma							*
Trichlorobacter							*
Aeromonas							*
Aminomonas							*
BRH-c20a							*
Rhodanobacter							*
Macellibacteroides							*
LD29							*
Allorhizobium-Neorhizobium-							*
Pararhizobium-Rhizobium							*
Bellilinea							*
PHOS-HE36							*
Proteocatella							*
Methanospirillum							*
WCHB1-02							*
Candidatus_Pacebacteria							*
Leptospira							*

Bactérias do gênero *Christensenellaceae R-7 group* caracteriza-se por serem anaeróbias, podendo serem encontradas na mucosa ruminal de cabras e digestores anaeróbios mesofílicos de resíduos alimentares (Li et al., 2019; Kappell et al., 2020). Além disso, o gênero foi identificado como um grupo de bactérias potencialmente sintróficas, que pode estabelecer transferência direta de elétrons com microrganismos metanogênicos para a degradação de ácidos graxos voláteis (Jiang et al., 2022; Lee et al., 2019).

Com relação ao gênero *Candidatus Magasanikbacteria*, a única informação encontrada acerca de possíveis funções metabólicas é a de que estas bactérias podem contribuir para o processo Feammox (Hu et al., 2022), que consiste na oxidação anaeróbia do amônio (NH_4^+) em nitrito (NO_2^-), transferindo os elétrons para o Fe(III), reduzindo-o (Ruiz-Urigüen et al., 2018; Yang et al., 2018).

Acerca do gênero *SJA-28*, pesquisas recentes levantaram a hipótese de que as bactérias deste gênero são capazes de realizar atividades metabólicas de desnitrificação, uma vez que estas têm atuado como desnitrificadoras ou desnitrificadoras intermediárias em reatores de nitrificação parcial-anammox (González-Martínez et al., 2021).

Pode-se observar que a maioria dos gêneros de destaque encontrados ao longo do estudo (*C39*, *Reyranella*, *Candidatus Magasanikbacteria* e *SJA-28*) se relacionam com algum processo metabólico do ciclo do nitrogênio. Uma explicação possível seria a de que os processos de degradação de LAS em sistemas anaeróbios dependem de receptores de elétrons alternativos, como, por exemplo, nitrato, nitrogênio molecular (N_2) e/ou amônia (NH_3) (Mungray & Kumar, 2009). Dessa forma, estes gêneros podem ter sido encontrados devido à presença destes receptores, uma vez que a presença do LAS interfere negativamente no ciclo do nitrogênio, inibindo a conversão oxidativa da amônia em nitrato, prejudicando os organismos que necessitam de nitrato como fonte de nitrogênio (Souza, 2009).

4.4 Perfis funcionais

Um total de 5.920 perfis KO foram obtidos ao final do processamento. Os valores de abundância de cada predição funcional foram transformados em porcentagem, novamente com o objetivo de se compor uma escala significativa e comparável de valores (Galili et al., 2018). As amostras apresentaram elevada abundância nas categorias de nível 1 09180 Brite Hierarchies (pertencente ao banco de dados KEGG Brite do KEGG Orthology), correspondendo a 35,7% dos perfis, e 09100 Metabolism (pertencente ao banco de dados KEGG Pathway do KEGG Orthology), representando 30,8% do total (Figura 7).

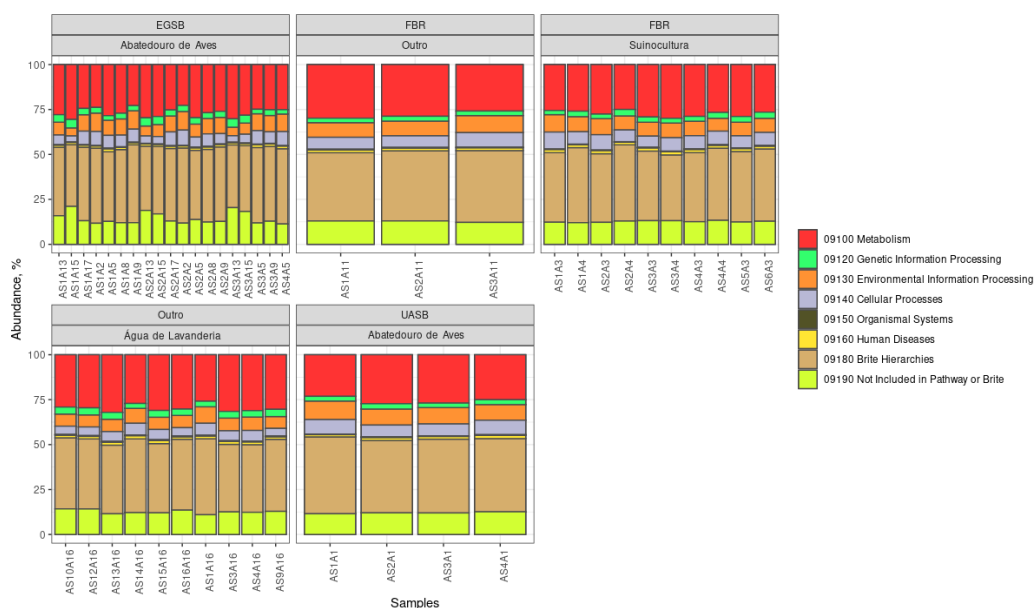


Figura 7. Abundância de categorias de nível 1 de KEGG Orthology em cada amostra, agrupadas por reator e inóculo. Os nomes das categorias são mostrados na legenda à direita do gráfico.

Filtrando apenas na via 09100 Metabolism, na Figura 8 foi possível observar a pouca variação na distribuição das categorias de nível 2 entre as amostras. A categoria de metabolismo de carboidratos (K09101) foi predominante, representando valor médio de 22,4% da abundância de categorias nas amostras, seguido por metabolismo de aminoácidos (K09105) (~15,8%), metabolismo de energia (K09102) (15,3%), metabolismo de cofatores e vitaminas (K09108) (~14,6%), metabolismo de nucleotídeos (K09104) (~6,1%), metabolismo

de terpenóides e poliketóides (K09109) (~ 5,2%), metabolismo de lipídeos (K09103) (~3,9%), metabolismo e biossíntese de glicano (K09107) (~ 3,9%), metabolismo de outros aminoácidos (K09106) (~ 3,1%) e biossíntese de outros metabólitos secundários (K09110) (~1,9%).

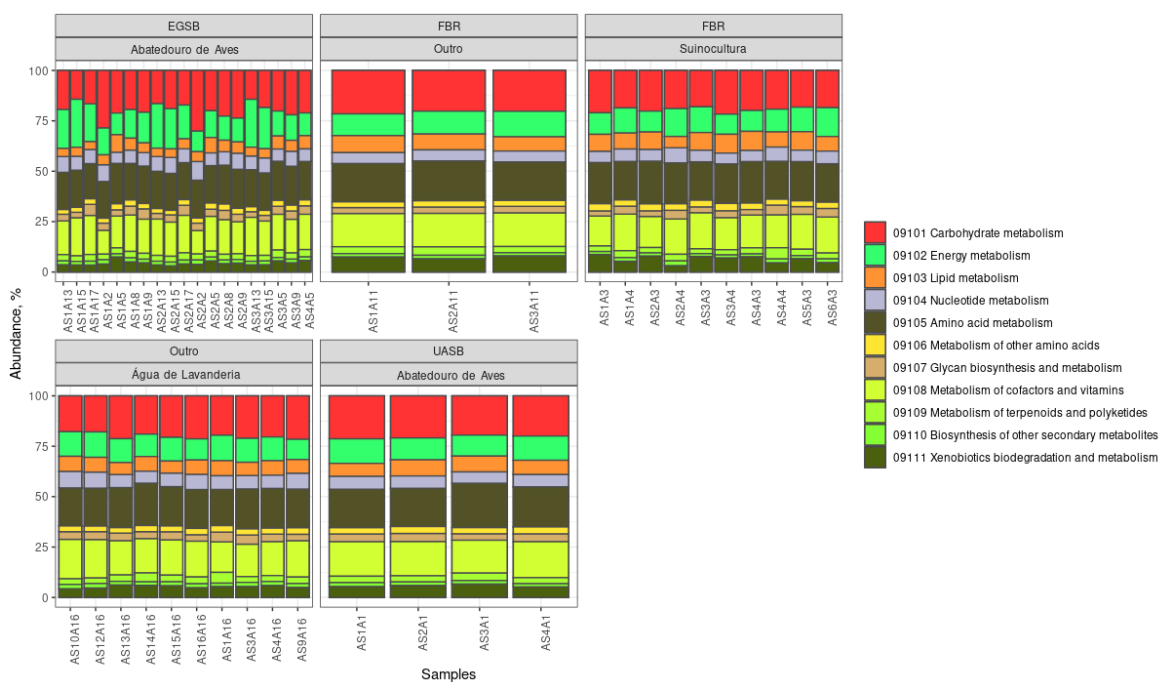


Figura 8. Composição de categorias de nível 2 da via 09100 Metabolism do KEGG Orthology em cada amostra, agrupadas por reator e inóculo. Os nomes das categorias são mostrados na legenda à direita do gráfico.

Para filtrar os perfis funcionais diretamente relacionados com a biodegradação anaeróbia de LAS, foram utilizadas as vias propostas por Lara-Martín et al. (2010), trabalhadas posteriormente no estudo de Delforno et al. (2019). Gráficos de composição das categorias de KEGG Orthology, ainda separadas pela via de metabolismo, foram construídos com as amostras agrupadas segundo seus inóculos e reatores (Figura 9). As amostras pertencentes ao inóculo abatedouro de aves foram as que mais apresentaram variação entre si, o que pode se relacionar com o número reduzido de gêneros compartilhados entre elas. A mesma relação não pode ser feita com o agrupamento de reator outro, onde se observou uma grande sobreposição em relação ao potencial funcional, ainda que também compartilhem poucos gêneros quando comparado ao número de gêneros presentes em cada amostra

individualmente.

A semelhança entre os gráficos de composição do reator EGSB e inóculo abatedouro de aves - assim como observado entre os diagramas de Venn destes - seria o fato de que as amostras obtidas de reator EGSB foram inoculadas com microrganismos provenientes de abatedouro de aves. A mesma justificativa pode ser atribuída aos gráficos de reator outro e o inóculo água de lavanderia.

Lara-Matín et al. (2010) separou as categorias propostas em seu estudo de acordo com as reações envolvidas na rota de degradação do LAS. Relacionado à adição de fumarato na cadeia alquil, o número KO K00246 (fumarate reductase) foi pouco abundante entre as amostras, de forma geral. Todas as enzimas relacionadas ao processo de dessulfonação relatadas em Delforno et al. (2019) foram encontradas no presente trabalho. Dentre elas, a enzima K00390 (phosphoadenosine phosphosulfate reductase) foi de maior predominância nas amostras de EGSB, quando comparadas às amostras dos outros agrupamentos de reatores e, entre os inóculos, naquelas referentes ao inóculo abatedouro de aves. O número KO K00395, correspondente a subunidade B da enzima adenylylsulfate reductase não foi tão abundante, mas destacou-se nas amostras AS1A1 (inóculo abatedouro de aves e reator UASB), AS6A3 (inóculo suinocultura e reator FBR), e nas provenientes do inóculo abatedouro de aves e reator EGSB.

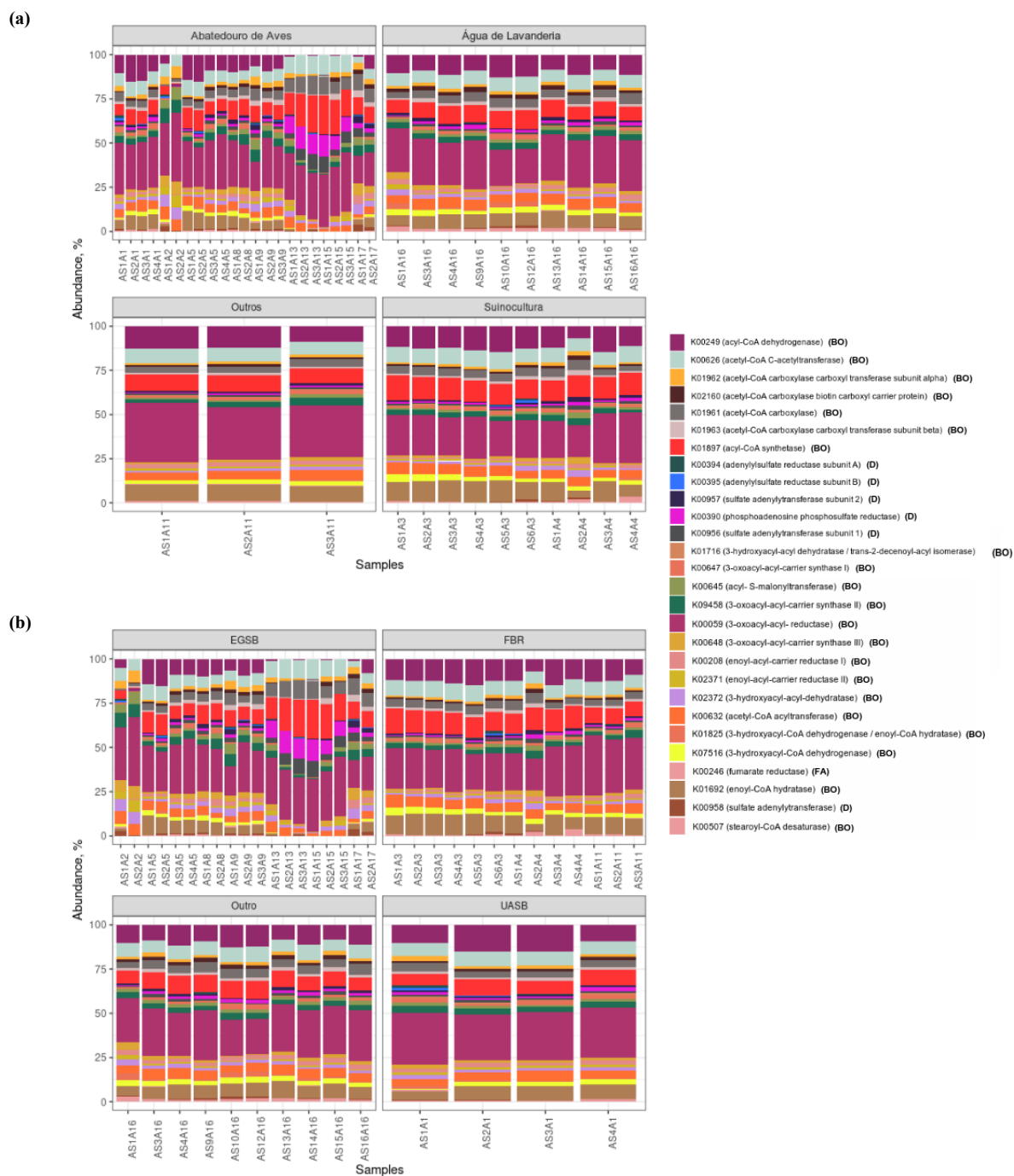


Figura 9. Abundância de perfis funcionais de KEGG Orthology propostas por Lara-Martín et al. (2010) em cada amostra, agrupadas por reatores (a) e inóculos (b). (BO) – β -oxidação; (D) – dessulfonação; (FA) – adição de fumarato.

Quanto à clivagem do anel aromático, a enzima K07539 (6-oxocyclohex-1-ene-carbonyl-CoA hydrolase) não foi registrada durante a análise. Por fim, para a reação de β -oxidação, a enzima K00059 (3-oxoacyl-acyl-reductase) foi majoritariamente predominante entre todas as amostras, seguida por K00249 (acyl-CoA

dehydrogenase), K00626 (acetyl-CoA C-acetyltransferase), K01897 (acyl-CoA synthetase) e K01692 (enoyl-CoA hydratase).

4.5 Relação entre reatores, inóculos e maiores médias de remoção de LAS

Dos artigos selecionados como base para o presente estudo, o trabalho de Andrade et al. (2017) foi o que obteve a maior média de porcentagem de eficiência de remoção de LAS (96.4%). Foram utilizados dois reatores FBR, preenchidos com areia (1,4 - 1,7 mm) como material de suporte, operados em modo contínuo e em circuito fechado, durante 20 dias. Os reatores foram inoculados com biomassa de lodo ativado (diferentemente dos demais, que inocularam, na maioria dos casos, com lodo granular). Segundo os autores, este tipo de inóculo foi escolhido “devido a sua versatilidade de microrganismos capazes de remoção de nitrogênio”. Em uma das etapas da operação, os reatores foram alimentados com etanol e nitrato, sendo que este último foi utilizado apenas por esse trabalho para tal finalidade.

Os dois artigos que utilizaram o reator EGSB e inóculo de abatedouro de aves (pois obtiveram maiores valores de diversidade alfa), e obtiveram média de porcentagem de eficiência de remoção de LAS acima de 75%, foram de Delforno et al. (2016) e Delforno et al. (2015). Quando comparados aos demais trabalhos que usaram o mesmo tipo de reator e inóculo, mas que atingiram uma média de porcentagem de eficiência de remoção de LAS inferior a 75%, os dois estudos apresentaram estratégias de degradação semelhantes a pelo menos um dos artigos de comparação (seja no tipo de lodo, meio sintético, cossustratos, entre outros), o que pode indicar que as taxas de degradação mais elevadas obtidas por estes trabalhos devem-se à modificações específicas das estratégias de degradação.

4.6 Tutoriais das etapas de análise

O tutorial com as etapas das análises das sequências do gene 16S rRNA no LINUX e os scripts tutoriais criados para exploração e representação gráfica dos dados no software R foram depositados na plataforma GitHub (<https://github.com/>). Os mesmos podem ser acessados, de forma online, por meio do seguinte link: <https://github.com/IsadoraSoares/Tutoriais-para-analise-de-gene-16S-rRNA-usando-Linux-e-RStudio>

5 CONCLUSÕES

Este estudo determinou a diversidade de gêneros de bactérias e arqueias e os núcleos comuns existentes nas comunidades microbianas associadas à biodegradação anaeróbia do LAS. Os gêneros predominantes foram *Methanosaeta* e *C39*. A interação entre inóculo e reator teve pouca influência na diferenciação das comunidades microbianas entre as amostras. Não foram encontrados gêneros comuns entre todas as amostras da obra analisada. O gênero *SJA-28* foi predominante, sendo relacionado com processos de desnitrificação em reatores de nitrificação parcial-anammox. Para uma futura elaboração de inóculo bacteriano para a degradação de LAS em águas residuárias, o gênero *SJA-28* deve ser visto como um potencial grupo bacteriano a ser incluído, assim como os demais gêneros predominantes nos *common core*. Pela análise do perfil funcional, foram encontradas enzimas relacionadas às etapas de adição de fumarato, dessulfonação e β -oxidação da biodegradação do LAS.

Os tutoriais elaborados, disponíveis de forma online, servirão como uma alternativa teórica didática para atuais e futuros pesquisadores interessados em análises de genes 16S rRNA, além de serem produções para divulgação científica.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. V. F.; SAKAMOTO, I. K.; CORBI, J. J.; SILVA, E. L.; VARESCHE, M. B. A. Effects of hydraulic retention time, co-substrate and nitrogen source on laundry wastewater anionic surfactant degradation in fluidized bed reactors. **Bioresource Technology**, 224, 246–254, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.001>

ANDREWS S. **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data**. [Http://Www.Bioinformatics.Babraham.Ac.Uk/Projects/Fastqc](http://www.Bioinformatics.Babraham.Ac.Uk/Projects/Fastqc). 183. 2010.

ABHAUER, K. P.; WEMHEUER, B.; DANIEL, R.; MEINICKE, P. Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. **Bioinformatics**, 31(17), 2882-2884, 2015. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv287>

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, 30, 2014. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

BOLYEN, E.; RIDEOUT, J. R.; DILLON, M. R.; BOKULICH, N. A.; ... CAPORASO, J. G. QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. **PeerJ Preprints**, 2018.

BOKULICH, N. A.; KAEHLER, B. D.; RIDEOUT, J. R. et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. **Microbiome**, 6(90), 2018. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>

BONFIM, J. H. **Remoção De Surfactantes (Las) No Tratamento Anaeróbio de Esgotos Domésticos**. 2006. Dissertação de Mestrado. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 112 f.

BRAGA, J. K.; MOTTERAN, F. I.; MACEDO, T. Z.; SAKAMOTO, I. K.; DELFORNO, T. P.; OKADA, D. Y.; ... VARESCHE, M. B. A. Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate in commercial laundry wastewater by an anaerobic fluidized bed reactor. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, 50(9), 946–957, 2015(a). <https://doi.org/10.1080/10934529.2015.1030290>

BRAGA, J. K.; MOTTERAN, F.; SILVA, E. L.; VARESCHE, M. B. A. Evaluation of bacterial community from anaerobic fluidized bed reactor for the removal of linear alkylbenzene sulfonate from laundry wastewater by 454-pyrosequence. **Ecological Engineering**, 82, 231–240, 2015(b). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.0>

BAIN & COMPANY. **Relatório 4 – Tensoativos**. 52. 2014.

CALI, M. L. M. **Determinación de la efectividad de agentes microbianos para la degradación de tensoactivos dodecil bencen sulfonato de sodio lineal presente en detergentes**. 2018. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Engenharia em Biotecnologia Ambiental) – Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador. 87 f.

CALLAHAN B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from amplicon data. **Nature Methods**, 13:581–583, 2016. <https://doi.org/10.1101/024034>

CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. **ISME J**, 11:2639-2643, 2017. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>

CALLEWAERT, C.; VAN NEVEL, S.; KERCKHOF, F. M.; GRANITSOTIS, M. S.; BOON, N. Bacterial exchange in household washing machines. **Frontiers in Microbiology**, 6(DEC), 1–11, 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01381>

CENTURION, V. B.; MOURA, A. G. L.; DELFORNO, T. P.; OKADA, D. Y.; SANTOS, V. P.; VARESCHE, M. B. A.; OLIVEIRA, V. M. Anaerobic co-digestion of commercial laundry wastewater and domestic sewage in a pilot-scale EGSB reactor: The influence of surfactant concentration on microbial diversity. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 127, 77–86, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.11.017>

CHEN, G.; HUANG, J.; FANG, Y.; ZHAO, Y.; TIAN, X.; JIN, Y.; ZHAO, H. Microbial community succession and pollutants removal of a novel carriers enhanced duckweed treatment system for rural wastewater in Dianchi Lake basin. **Bioresource Technology**, 276, 8–17, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.102>

CURBELO, F. D. S. **Recuperação avançada de petróleo utilizando tensoativos**. 2006. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 190 f. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502002000800001>

DELFORNO, T. P.; MOURA, A. G. L.; OKADA, D. Y.; VARESCHE, M. B. A. Effect of biomass adaptation to the degradation of anionic surfactants in laundry wastewater using EGSB reactors. **Bioresource Technology**, 154(0), 114–121, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.102>

DELFORNO, T. P.; MOURA, A. G. L.; OKADA, D. Y.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. Microbial diversity and the implications of sulfide levels in an anaerobic reactor used to remove an anionic surfactant from laundry wastewater. **Bioresource Technology**, 192, 37-45, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.050>

DELFORNO, T. P.; OKADA, D. Y.; FARIA, C. V.; VARESCHE, M. B. A. Evaluation of anionic surfactant removal in anaerobic reactor with Fe (III) supplementation. **Journal of Environmental Management**, 183, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.09.026>

DELFORNO, T. P.; MACEDO, T.Z.; MIDOUX, C.; LACERDA, G. V.; RUÉ, O.; MARIADASSOU, M.; ... OLIVEIRA, V. M. Comparative metatranscriptomic analysis of anaerobic digesters treating anionic surfactant contaminated wastewater. **Science of The Total Environment**, 649:482-494, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.328>

DENG, L.; NGO, H.-H.; GUO, W.; ZHANG, H. Pre-coagulation coupled with sponge-membrane filtration for organic matter removal and membrane fouling control during drinking water treatment. **Water Research**, 157, 155-166, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.052>

FARIA, C. V. D.; DELFORNO, T. P., OKADA, D. Y.; VARESCHE, M. B. A. Evaluation of anionic surfactant removal by anaerobic degradation of commercial laundry wastewater and domestic sewage. **Environmental Technology** (United Kingdom), 40(8), 988-996, 2017. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1414317>

FELIPE, L. O.; DIAS, S. C. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes: vantagens e desvantagens. **Química Nova Na Escola**, 39(3), 228–236, 2017. <https://doi.org/10.21577/0104-8899.20160079>

FORSTER, D.; LENTENDU, G.; FILKER, S. et al. Improving eDNA -based protist diversity assessments using networks of amplicon sequence variants. **Environmental Microbiology**, 21(11):4109-4124, 2019. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14764>

GALILI, T.; O'CALLAGHAN, A.; SIDI, J.; SIEVERT, C. heatmaply: an R package for creating interactive cluster heatmaps for online publishing. **Bioinformatics**, 34(9):1600–1602, 2018. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx657>

GAO, P. K.; LI, G. Q.; ZHAO, L. X.; DAI, X. C.; TIAN, H. M.; DAI, L. B.; ... & MA, T. Dynamic processes of indigenous microorganisms from a low-temperature petroleum reservoir during nutrient stimulation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 117(2), 215–221, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.07.009>

GAO, L.; ZHOU, W.; HUANG, J.; HE, S.; YAN, Y.; ZHU, W.; ... ZHANG, X. Nitrogen removal by the enhanced floating treatment wetlands from the secondary effluent. **Bioresource Technology**, 234, 243–252, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.036>

GAUCH, H. G. Jr. A quantitative evaluation of the Bray-Curtis ordination. **Ecology**, 54(4):829-836, 1973. <https://doi.org/10.2307/1935677>

GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, A.; MUNOZ-PALAZON, B.; KRUGLOVA, A.; VILPANEN, M.; KUOKKANEN, A.; MIKOLA, A.; HEINONEN, M. (2021). Performance and microbial community structure of a full-scale ANITATMMox bioreactor for treating reject water located in Finland. **Chemosphere**, 271, 129526, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.12.9526>

GRANATTO, C. F.; MACEDO, T. Z.; GEROSA, L. E.; SAKAMOTO, I. K.; SILVA, E. L.; VARESCHE, M. B. A. Scale-up evaluation of anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate from sanitary sewage in expanded granular sludge bed reactor. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 138 (August 2018), 23–32, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.12.010>

GRANATTO, C. F.; GROSSELI, G. M.; SAKAMOTO, I. K.; FADINI, P. S.; VARESCHE, M. B. A. Methanogenic potential of diclofenac and ibuprofen in sanitary sewage using metabolic cosubstrates. **Science of The Total Environment**, 140530, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140530>

GOWER, J. C. Principal Coordinates Analysis. **Wiley StatsRef: Statistics Reference Online**, 1–7, 2015. <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat05670.pub2>

HEIBATI, B.; GHOOCHANI, M.; ALBADARIN, A. B.; MESDAGHINIA, A.; MAKHLOUF, A. S. H.; ASIF, M.; MAITY, A.; TYAGI, I.; AGARWAL, S.; GUPTA, V. K. Removal of linear alkyl benzene sulfonate from aqueous solutions by functionalized multi-walled carbon nanotubes. **Journal of Molecular Liquids**, 213, 339-344, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.08.046>

HU, Y.; LI, N.; JIANG, J.; XU, Y.; LUO, X.; CAO, J. Simultaneous Feammox and anammox process facilitated by activated carbon as an electron shuttle for autotrophic biological nitrogen removal. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, 16(7), 1-13, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11783-021-1498-z>

JIANG, J.; LIU, J.; WANG, C.; WANG, C.; ZHAO, X.; YIN, F.; ... ZHANG, W. Long-Term Biocatalytic Methanation of Hydrogen and Carbon Dioxide Based on Closed Nutrient Recycling and Microbial Community Succession. **Available at SSRN 3963578**. 2022.

KAPPELL, A. D.; CAREY, D. E.; ZITOMER, D. H.; MCNAMARA, P. J. Effect of antimicrobial washout from anaerobic digesters on microbial community composition. **Environmental Science: Water Research & Technology**, 6, 1658-1671, 2020. <https://doi.org/10.1039/D0EW00094A>

KATOH, K.; MISAWA, K.; KUMA, K. I.; MIYATA, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic acids research**, 30(14):3059-3066, 2002. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>

KIM, B. R.; SHIN, J.; GUEVARRA, R. et al. Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 27:2089–2093, 2017. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>

KIM, N.; ZABALOY, M. C.; RIGGINS, C. W.; RODRÍGUEZ-ZAS, S.; VILLAMIL, M. B. Microbial Shifts Following Five Years of Cover Cropping and Tillage Practices in Fertile Agroecosystems. **Microorganisms**, 8(11), 1773, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganism8111773>

KUŹNIAR, A.; WŁODARCZYK, K.; GRZĄDZIEL, J.; GORAJ, W.; GAŁĄZKA, A.; WOLIŃSKA, A. Culture-independent analysis of an endophytic core microbiome in two species of wheat: *Triticum aestivum* L.(cv.‘Hondia’) and the first report of microbiota in *Triticum spelta* L.(cv.‘Rokosz’). **Systematic and applied microbiology**, 43(1):126025, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.126025>

LARA-MARTÍN, P. A.; GÓMEZ-PARRA, A.; SANZ, J. L.; GONZÁLEZ-MAZO, E. Anaerobic degradation pathway of linear alkylbenzene sulfonates (LAS) in sulfate-reducing marine sediments. **Environmental Science and Technology**, 44 (2010), 1670-1676, 2010. <https://doi.org/10.1021/es9032887>

LEE, J.; KOO, T.; YULISA, A.; HWANG, S. Magnetite as an enhancer in methanogenic degradation of volatile fatty acids under ammonia-stressed condition. **Journal of Environmental Management**, 241, 418–426, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.038>

LI, X.; O’MOORE, L.; SONG, Y.; BOND, P. L.; YUAN, Z.; WILKIE, S.; ... JIANG, G. The rapid chemically induced corrosion of concrete sewers at high H₂S concentration. **Water Research**, 162, 95-104, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.06.062>

MACEDO, T. Z.; OKADA, D. Y.; DELFORNO, T. P.; BRAGA, J. K.; SILVA, E. L.;

VARESCHE, M. B. The comparative advantages of ethanol and sucrose as co-substrates in the degradation of an anionic surfactant: microbial community selection. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 38(10), 1835-1844, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1424-5>

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, 17(1):10-12, 2011. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLoS ONE**, 8(4), e61217, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

MOTTERAN, F.; NADAI, B. M.; BRAGA, J. K.; SILVA, E. L.; VARESCHE, M. B. A. Metabolic routes involved in the removal of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) employing linear alcohol ethoxylated and ethanol as co-substrates in enlarged scale fluidized bed reactor. **Science of the Total Environment**, 640-641, 1411-1423, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.375>

MOURA, A. G. L.; CENTURION, V. B.; OKADA, D. Y.; MOTTERAN, F.; DELFORNO, T. P.; OLIVEIRA, V. M.; VARESCHE, M. B. A. Laundry wastewater and domestic sewage pilot-scale anaerobic treatment: Microbial community resilience regarding sulfide production. **Journal of Environmental Management**, 251, 109495, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109495>

MUNGRAY, A. K.; KUMAR, P. Fate of linear alkylbenzene sulfonates in the environment: A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 63(8), 981-987, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.03.012>

NOGUEIRA, I. S.; NABOUT, J. C.; OLIVEIRA, J. E.; SILVA, K. D. Diversidade (alfa, beta e gama) da comunidade fitoplanctônica de quatro lagos artificiais urbanos do município de Goiânia, GO. **Hoehnea**, 35(2):219-233, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S2236-89062008000200005>

OKADA, D. Y.; DELFORNO, T. P.; ETCHEBEHERE, C.; VARESCHE, M. B. A. Evaluation of the microbial community of upflow anaerobic sludge blanket reactors used for the removal and degradation of linear alkylbenzene sulfonate by pyrosequencing. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 96, 63-70, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.09.017>

PENTEADO, J. C. P.; SEOUD, O. A. E.; CARVALHO, L. R. F. Linear alkylbenzene sulfonates: Chemistry, environmental impact and analysis. **Química Nova**, 29(5), 1038-1046, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000500025>

PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. **PloS ONE**, 5(3), e9490, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The Silva ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, 41(D1), 590–596, 2013. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>

R CORE TEAM, R., et al. **R: A language and environment for statistical computing**. 2013.

RISELY, A. Applying the core microbiome to understand host–microbe systems. **Journal of Animal Ecology**, (March), 1–10, 2020. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13229>

ROGNES, T.; FLOURI, T.; NICHOLS, B.; QUINCE, C.; MAHÉ, F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. **PeerJ**, 4, e2584, 2016. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>

ROY, D.; DROGUI, P.; RAHNI, M.; LEMAY, J.-F.; LANDRY, D.; TYAGI, R. D. Effect of cathode material and charge loading on the nitrification performance and bacterial community in leachate treating Electro-MBRs. **Water Research**, 115990, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115990>

RUIZ-URIGÜEN, M.; SHUAI, W.; JAFFÉ, P. R. Electrode colonization by the Feammox bacterium Acidimicrobiaceae sp. strain A6. **Applied and Environmental Microbiology**, 84:e02029-18, 2018. <https://doi.org/10.1128/AEM.02029-18>

SANTOS, F. R.; ORTEGA, J. M. Bioinformática aplicada à Genômica. **Melhoramento Genômico, Minas Gerais: UFV**, p. 93-98, 2003.

SCOTT, M. J.; JONES, M. N. The biodegradation of surfactants in the environment. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, 1508(1–2), 235–251, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00013-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00013-7)

SHADE, A.; HANDELSMAN, J. Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. **Environmental microbiology**, v. 14, n. 1, p. 4-12, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x>

SILVA, L. G.; SILVA, D. C.; OLIVEIRA, L. M.; FLORENCIO, L.; GAVAZZA, S.; KATO, M. T. Degradação dos homólogos do alquilbenzeno linear sulfonato em lodo anaeróbio disperso. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, 22(2), 391–401, 2017. <https://doi.org/10.1590/S1413-41522016153982>

SILVEIRA, E. L. **Identificação de comunidades bacterianas de solo por sequenciamento do gene 16S rRNA**. 2004. Dissertação de Mestrado. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

SOUZA, L. F. C. de. **Avaliação da degradação de alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) em reatores anaeróbicos**. 2009. Dissertação de Mestrado. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 74 f.

SOUZA, L. F. C. de. **Fatores interferentes na degradação anaeróbia do alquilbenzeno linear sulfonado**. 2013. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 125 f.

TANG, S.; ZHENG, C.; CHEN, M.; DU, W.; XU, X. Geobiochemistry characteristics of rare earth elements in soil and ground water: a case study in Baotou, China. **Scientific Reports**, 10, 11740, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68661-4>

WATARI, T.; HATA, Y.; HIRAKATA, Y.; NGUYET, P. N.; NGUYEN, T. H.; MAKI, S.; ... YAMAGUCHI, T. Performance evaluation of down-flow hanging sponge reactor for direct treatment of actual textile wastewater; Effect of effluent recirculation to performance and microbial community. **Journal of Water Process Engineering**, 101724, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101724>

WETLER-TONINI, R. M. C.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Bacterial biodegradation of petroleum and oil compounds. **Revista Virtual de Química**, 3(2), 78–87, 2011. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20110013>

WU, Y.; QU, M.; PU, X.; LIN, J.; SHU, B. Distinct microbial communities among different tissues of citrus tree *Citrus reticulata* cv. Chachiensis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 6068, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62991-z>

YANG, Y.; JIN, Z.; QUAN, X.; ZHANG, Y. Transformation of nitrogen and iron species during nitrogen removal from wastewater via Feammox by adding ferrihydrite. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, 6(11), 14394-14402, 2018. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b03083>

APÊNDICE A - LEVANTAMENTO DAS INFORMAÇÕES DISPONÍVEIS SOBRE CADA REFERÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO UTILIZADA NO PRESENTE TRABALHO

Artigo	Referência	Reator	Plataforma de Sequenciamento	Dados Disponíveis		
				Link (NCBI e ENA)	ID Amostra (na referência)	ID Amostra (no presente estudo)
1	Okada, D. Y., Delforno, T. P., Etchebehere, C., & Varesche, M. B. A. (2014). Evaluation of the microbial community of upflow anaerobic sludge blanket reactors used for the removal and degradation of linear alkylbenzene sulfonate by pyrosequencing. <i>International Biodeterioration and Biodegradation</i> , 96, 63–70. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.09.017	UASB	Pyrosequencing	https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB4151	ERS255958	AS1A1
					ERS255959	AS2A1
					ERS255960	AS3A1
					ERS255961	AS4A1
2	Delforno, T. P., Moura, A. G. L., Okada, D. Y., & Varesche, M. B. A. (2014). Effect of biomass adaptation to the degradation of anionic surfactants in laundry wastewater using EGSB reactors. <i>Bioresource Technology</i> , 154(0), 114–121. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.102	EGSB	Pyrosequencing	https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB4790	ERS361031	AS1A2
					ERS361032	AS2A2
3	Macedo, T. Z., Okada, D. Y., Delforno, T. P., Braga, J. K., Silva, E. L., & Varesche, M. B. (2015). The comparative advantages of ethanol and sucrose as co-substrates in the degradation of an anionic surfactant: microbial community selection. <i>Bioprocess and Biosystems Engineering</i> , 38(10), 1835-1844. https://doi.org/10.1007/s00449-015-1424-5	FBR	Ion Torrent PGM	https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB7621	ERS573648	AS1A3
					ERS573649	AS2A3
					ERS573650	AS3A3
					ERS573651	AS4A3
					ERS573652	AS5A3
					ERS573653	AS6A3

4	Braga, J. K., Motteran, F. I., Macedo, T. Z., Sakamoto, I. K., Delforno, T. P., Okada, D. Y., ... Varesche, M. B. A. (2015a). Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate in commercial laundry wastewater by an anaerobic fluidized bed reactor. <i>Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering</i> , 50(9), 946–957. https://doi.org/10.1080/10934529.2015.1030290	FBR	Pyrosequencing	https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB5054	ERS377587 ERS377588 ERS377589 ERS377590	AS1A4 AS2A4 AS3A4 AS4A4
5	Delforno, T. P., Moura, A. G. L., Okada, D. Y., Sakamoto, I. K., & Varesche, M. B. A. (2015). Microbial diversity and the implications of sulfide levels in an anaerobic reactor used to remove an anionic surfactant from laundry wastewater. <i>Bioresource Technology</i> , 192, 37-45. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.050	EGSB	Ion Torrent PGM	https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB8003	ERS629278 ERS629279 ERS629280 ERS629281	AS1A5 AS2A5 AS3A5 AS4A5
8	Delforno, T. P., Okada, D. Y., Faria, C. V., Varesche, M. B. A. (2016). Evaluation of anionic surfactant removal in anaerobic reactor with Fe(III) supplementation. <i>Journal of Environmental Management</i> , 183, 687-693. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.09.026	EGSB	Ion Torrent PGM	https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB15116	ERR1578862 ERR1578863	AS1A8 AS2A8
9	Faria, C. V. D., Delforno, T. P., Okada, D. Y., & Varesche, M. B. A. (2017). Evaluation of anionic surfactant removal by anaerobic degradation of commercial laundry wastewater and domestic sewage. <i>Environmental Technology (United Kingdom)</i> , 40(8), 988-996. https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1414317	EGSB	Illumina MiSeq (2 × 250 bp)	https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB15156	ERS1294201 - File 1 (forward) and File 2 (reverse) ERS1294202 - File 1 (forward) and File 2 (reverse) ERS1294203 - File 1 (forward) and File 2 (reverse)	AS1A9 AS2A9 AS3A9

11	<p>Andrade, M. V. F., Sakamoto, I. K., Corbi, J. J., Silva, E. L., & Varesche, M. B. A. (2017). Effects of hydraulic retention time, co-substrate and nitrogen source on laundry wastewater anionic surfactant degradation in fluidized bed reactors. <i>Bioresource Technology</i>, 224, 246–254. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.001</p>	FBR	MiSeq Illumina platform (2 x 250bp)	<p>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/study/?acc=PRJNA335799</p>	<p>SRX1987798 SRX1987799 SRX2037502</p>	<p>AS1A11 AS2A11 AS3A11</p>
13	<p>Centurion, V. B., Moura, A. G. L., Delforno, T. P., Okada, D. Y., Dos Santos, V. P., Varesche, M. B. A., & Oliveira, V. M. (2018). Anaerobic co-digestion of commercial laundry wastewater and domestic sewage in a pilot-scale EGSB reactor: The influence of surfactant concentration on microbial diversity. <i>International Biodeterioration & Biodegradation</i>, 127, 77–86. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.11.017</p>	EGSB	MiSeq Illumina platform (2 x 250bp)	<p>https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB19914</p>	<p>ERR1878057 ERR1878058 ERR1878059</p>	<p>AS1A13 AS2A13 AS3A13</p>
15	<p>Granatto, C. F., Macedo, T. Z., Gerosa, L. E., Sakamoto, I. K., Silva, E. L., & Varesche, M. B. A. (2019). Scale-up evaluation of anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate from sanitary sewage in expanded granular sludge bed reactor. <i>International Biodeterioration and Biodegradation</i>, 138 (August 2018), 23–32. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.12.010</p>	EGSB	MR DNA by the Illumina - MiSeq platform	<p>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/study/?acc=PRJNA411779</p>	<p>SRR10418405 SRR10418424 SRR10418431</p>	<p>AS1A15 AS2A15 AS3A15</p>
16	<p>Callewaert, C., Van Nevel, S., Kerckhof, F. M., Granitsiotis, M. S., & Boon, N. (2015). Bacterial exchange in household washing machines. <i>Frontiers in Microbiology</i>, 6(DEC), 1–11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01381</p>	---	454-pyrosequencing	---	<p>MID02 MID03 MID04 MID05 MID06 MID07</p>	<p>AS1A16 AS2A16 AS3A16 AS4A16 AS5A16 AS6A16</p>

MID08	AS7A16
MID09	AS8A16
MID10	AS9A16
MID11	AS10A16
MID15	AS11A16
MID16	AS12A16
MID17	AS13A16
MID18	AS14A16
MID19	AS15A16
MID20	AS16A16

17	Moura, A. G. L., Centurion, V. B., Okada, D. Y., Motteran, F., Delforno, T. P., Oliveira, V. M., & Varesche, M. B. A. (2019). Laundry wastewater and domestic sewage pilot-scale anaerobic treatment: Microbial community resilience regarding sulfide production. <i>Journal of Environmental Management</i> , 251, 109495. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109495	EGSB	MiSeq Illumina platform (2 x 250bp)	https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB31622	ERR3209488 ERR3209489	AS1A17 AS2A17
----	--	------	-------------------------------------	---	--------------------------	------------------

APÊNDICE B - METADADOS SOBRE OS ASPECTOS QUÍMICOS E FÍSICOS DO BIORREATOR DE CADA ARTIGO

Artigo	ID Amostra	Reator	Plataforma de Sequenciamento	Primers	Tamanho da Amostra (MB) do Arquivo	Formato do Arquivo	Inóculo	Água Residuária	Concentração de LAS no Efluente (mg/L) ¹	Remoção de Surfactante (%) ²	Remoção de DQO (%) ³	pH do Efluente ⁴	Substrato Sintético
OKADA et al. (2014)	AS1A1	UASB	454-Pyrosequencing	563F 802R	5,3	Fastq	Abatedouro de Aves	Real	10,5	72,5	---	11,6	Meio mineral com MgCl ₂ .6H ₂ O na concentração de 25 mg.L ⁻¹ , solução vitamínica, bicarbonato de sódio (NaHCO ₃ : 400 mg/L) e co-substratos: etanol (30 mg COD.L ⁻¹), metanol (30 mg COD .L ⁻¹) e extrato de levedura (30 mg/L).
	AS2A1				4,3								
	AS3A1				6,5								
	AS4A1				4,9								
DELFORNO et al. (2014)	AS1A2	EGSB	454-Pyrosequencing	563F 802R	2	Fastq	Abatedouro de Aves	Real	12	72,8	91	7	Meio mineral com MgCl ₂ na concentração de 25 mg/L, vitaminas, bicarbonato de sódio (NaHCO ₃ : 400 mg/L) e co-substratos: etanol (250 mg COD.L ⁻¹), metanol (250 mg COD.L ⁻¹) e extrato de levedura (250 mg COD.L ⁻¹).
	AS2A2				4								
MACEDO et al. (2015)	AS1A3	FBR	Ion Torrent PGM	577F 924R	74,2	Fastq	Suinocultura	Real	21,2	67,1	88,8	6,5	Extrato de levedura (500 mg/L), bicarbonato de sódio (NaHCO ₃ : 400 mg/L) e 0,5 mL de solução salina (50,0 g/L NaCl, 1,4 g/L MgCl ₂ .6H ₂ O e 0,9 g/L CaCl ₂ .2H ₂ O) e sacarose e/ou etanol como co-substratos.
	AS2A3				43,9								
	AS3A3				54,3								
	AS4A3				75,4								
	AS5A3				64,7								
AS6A3	53,1												
BRAGA et al. (2015)	AS1A4	FBR	454-Pyrosequencing	563F 802R	2,7	Fastq	Suinocultura	Real	20,6	58	88,68	5,4	Extrato de levedura (500 mg/L), sacarose (80 mg/L), bicarbonato de sódio (NaHCO ₃ : 400 mg/L) e 0,5 mL de solução salina (50,0 g/L NaCl, 1,4 g/L MgCl ₂ .6H ₂ O e 0,9 g /L CaCl ₂ .2H ₂ O)
	AS2A4				2,7								
	AS3A4				2,4								
	AS4A4				3,1								
DELFORNO et al. (2015)	AS1A5	EGSB	Ion Torrent PGM	577F 924R	43,1	Fastq	Abatedouro de Aves	Real	20,4	75,5	66	9,6	Meio mineral (com concentração ajustada de MgCl ₂ a 25 mg/L), vitaminas, bicarbonato de sódio (NaHCO ₃ : 400 mg/L) e co-substratos: etanol (250 mg COD.L ⁻¹), metanol (250 mg COD.L ⁻¹) e extrato de levedura (250 mg COD.L ⁻¹).
	AS2A5				70,4								
	AS3A5				40,2								
	AS4A5				31,3								
DELFORNO(2016)	AS1A8	EGSB	Ion Torrent PGM	577F 924R	23,5	Fastq	Abatedouro de Aves	Real	16,4	84,3	53	7,2	Meio mineral contendo MgCl ₂ na concentração de 25 mg/L, vitaminas, bicarbonato de sódio (NaHCO ₃ : 800 mg/L) e co-substratos: etanol (250 mg COD.L ⁻¹), metanol (250 mg COD.L ⁻¹) e extrato de levedura (250 mg COD.L ⁻¹).
	AS2A8				71,7								
FARIA et al. (2017)	AS1A9	EGSB	Illumina MiSeq	341F 785R	25	Fastq	Abatedouro de Aves	Real	18,4	69	60,6	9,1	Meio mineral contendo MgCl ₂ .6H ₂ O na concentração de 36 mg.L ⁻¹ , vitaminas, bicarbonato de sódio (NaHCO ₃ : 400 mg/L) e co-substratos: etanol (0,16 mL.L ⁻¹), metanol (0,23 mL/L) e extrato de levedura (270 mg/L).
	AS2A9				49,1								
	AS3A9				92								
ANDRADE et al. (2017)	AS1A11	FBR	Illumina MiSeq	341F 758R	97,7	Fastq	Outro	Real	22	96	92	---	---
	AS2A11				123,9								
	AS3A11				129,7								
CENTURION et al. (2018)	AS1A13	EGSB	Illumina MiSeq	515F 806R	29,6	Fastq	Abatedouro de Aves	Real	6,7	69,7	61	7,8	---
	AS2A13				24,7								
	AS3A13				48,7								
GRANATTO et al. (2019)	AS1A15	EGSB	Illumina MiSeq	515F 806R	133	Fastq	Abatedouro de Aves	Real	6,2	60	77	7,26	---
	AS2A15				113,9								
	AS3A15				221,2								

CALLEWAERT et al. (2015)	AS1A16				9,2								
	AS2A16				0,63								
	AS3A16				5,6								
	AS4A16				6,5								
	AS5A16				0,81								
	AS6A16				1,2								
	AS7A16				0,72								
	AS8A16	Outro	454-Pyrosequencing	338F 518R	1,4	Fastq	Efluente de Máquina de Lavar	Real	---	---	---	---	---
	AS9A16				4,8								
	AS10A16				6,2								
	AS11A16				1,1								
	AS12A16				7,5								
	AS13A16				4,4								
	AS14A16				6,6								
	AS15A16				5								
	AS16A16				4,2								
MOURA et al. (2019)	AS1A17	EGSB	Illumina MiSeq	515F 806R	121,6	Fastq	Abatedouro de Aves	Real	20	52,6	51,6	7,7	---
	AS2A17				106,4								

¹ Média da soma das concentrações de cada amostra no artigo

² Média da soma das remoções de surfactante de cada amostra do artigo

³ Média da soma das remoções de COD de cada amostra do artigo

⁴ Média do pH de cada amostra do artigo