

SANDRA REGINA NISHIO

**Avaliação da comunidade microbiana procarionte
através de técnicas moleculares – FISH, PCR/DGGE e
sequenciamento em sistemas artificiais de redução de
cargas: ênfase ao estudo de lagoa de estabilização
facultativa**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari

São Paulo
2010

RESUMO

NISHIO, S. R. **Avaliação da comunidade microbiana procarionte através de técnicas moleculares – FISH, PCR/DGGE e sequenciamento em sistemas artificiais de redução de cargas:** ênfase ao estudo de lagoa de estabilização facultativa. 2010. 102 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Lagoas de estabilização são sistemas de tratamento de esgoto que apresentam diversas vantagens como custo baixo que as tornam muito utilizadas em países em desenvolvimento. Os microorganismos estão entre os maiores responsáveis pela transformação dos compostos orgânicos do esgoto e são a chave do sucesso deste tratamento. Porém, o estudo de lagoas de estabilização ainda é muito básico, limitando-se ao estudo da dinâmica e eficiência, sendo necessário um estudo específico sobre a comunidade microbiana. Muitos organismos não podem ser facilmente cultivados em meios seletivos, o que pode subestimar a diversidade, então a alternativa é a utilização de técnicas de biologia molecular em conjunto para obter resultados mais confiáveis. A combinação de duas ou mais técnicas de biologia molecular para esse tipo de estudo, permite obter resultados mais verdadeiros acerca de uma comunidade microbiana. A estrutura da comunidade microbiana na lagoa de estabilização facultativa da estação de tratamento de esgoto doméstico do Município de Cajati foi descrita baseada nos padrões dos fragmentos do gene RNAr 16S na reação em cadeia da polimerase e eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE), hibridização *in situ* com fluorescência (FISH e CARD-FISH), biblioteca de clones de gene RNAr 16S e sequenciamento. Os padrões obtidos com o DGGE foram correlacionados com as variáveis ambientais coletadas por análise de redundância (RDA). As amostras foram coletadas em três períodos para o estudo da variação temporal, coletou-se em três profundidades (superfície, 0,7 m e 1,5 m) para o estudo espacial vertical e em nove pontos a 0,7 m de profundidade para o estudo espacial horizontal da comunidade. A utilização das técnicas em conjunto para caracterizar a comunidade microbiana da lagoa mostrou que a comunidade da lagoa variou temporalmente e na sua distribuição horizontal, formando duas comunidades distintas, uma no início da lagoa, onde o esgoto bruto entra e outra na região final da lagoa, onde o efluente tratado é despejado no Rio Jacupiranguinha. A técnica de CARD-FISH revelou que a lagoa é dominada pelo filo *Cyanobacteria* enquanto as técnicas de ARDRA, biblioteca de clones do gene RNAr 16S e sequenciamento concomitantemente, revelaram que o filo *Chloroflexi* é o mais representativo. As técnicas de biologia molecular utilizadas simultaneamente revelaram ser eficientes para avaliar a comunidade microbiana da lagoa de estabilização facultativa do município de Cajati.

Palavras-chave: Lagoa de estabilização. Comunidade microbiana. DGGE. FISH. Sequenciamento.

ABSTRACT

NISHIO, S. R. **Prokariotic microbial community assessment by molecular techniques – FISH, PCR/DGGE and sequencing in load reduction artificial systems:** emphasis on the study of facultative stabilization pond. 2010. 102 p. Thesis (Doctorate on Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Stabilization ponds are sewage treatment systems that present several advantages such as low cost make their applicability very high in underdeveloped countries. Microorganisms are among the most responsible for the conversion of sewage organic compounds and they are the key of the treatment success. However, stabilization pond study is still very superficial, narrowing to efficiency and dynamic studies, lacking a specific investigation on microbial community. Many organisms cannot be easily identified if cultivated in selective mediums which might underestimate its diversity. Therefore, another option is the usage of molecular biology techniques combined to each other to obtain reliable results. The combination of two or more molecular techniques in this kind of assessment allows getting more accurate results concerning a microbial community. The facultative stabilization pond microbial community structure of domestic sewage treatment from Cajati city was characterized based on 16S RNAr gene fragments patterns from a polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE), fluorescent in situ hybridization, 16S RNAr gene clone library and sequencing. The patterns obtained by DGGE were co-related to environmental variables by redundancy analysis (RDA). The samples were collected in three intervals to study the seasonal variation, it was collected in three depth (surface, 0,7 m and 1,5 m) to the vertical assessment and in nine spots at 0,7 m depth for the horizontal assessment of the microbial community. The combination of the techniques to characterize the microbial community pond showed that pond community shifted seasonally and horizontally arranging two distinct communities, one at the beginning of the pond on the inflow and another at the end of pond, where the sewage treated outflows to Jacupiranguinha River. CARD-FISH technique showed that *Cyanobacteria* is the dominant phylum whereas ARDRA, 16S RNAr gene clone library and sequencing altogether revealed *Chloroflexi* phylum to be the most representative been efficient to evaluate the facultative stabilization pond microbial community from Cajati city.

Keywords: Stabilization pond. Microbial community. DGGE. FISH. Sequencing.

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A água é imprescindível para a manutenção da vida. Nos últimos anos, com o constante crescimento populacional, a explosão industrial e a falta de preocupação da utilização sustentável dos recursos naturais acarretaram danos nas reservas de água doce. Além disso, a falta de investimentos para sanar problemas de sérias dimensões como este agrava ainda mais a situação atual da escassez de água doce (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB, 2004).

Aproximadamente 75 % da superfície terrestre são ocupadas por água e, deste valor, 3% é água doce. Ainda, desta parcela, os rios e lagos correspondem a apenas 0,001% (CETESB, 2004). A partir da metade do século passado o consumo de água mundial triplicou e, para cada 1.000 litros de água consumida, o ser humano produz 10.000 litros de água poluída (Organização das Nações Unidas – ONU¹, 1993 apud CETESB, 2004). Calcula-se um gasto de 160 bilhões de metros cúbicos de água dos aquíferos por ano (CETESB, 2004).

No Brasil, é muito comum o despejo de esgoto diretamente em corpos naturais de água (CALIJURI et al., 2003). Mais de 90% dos esgotos domésticos e aproximadamente 70% dos efluentes industriais do Brasil são lançados diretamente em corpos de água sem tratamento prévio contaminando-os com poluentes e patógenos e transformando-os em vetores de transmissão de diversas doenças que os tornam inadequados para o consumo (CETESB, 2004; VAZOLLER, 1989; MENDONÇA, 2000). A maioria dos ecossistemas aquáticos brasileiros recebe resíduos produzidos pela atividade humana, com poucas exceções (VAZOLLER, 1996).

Apesar dos receptores naturais de água serem sistemas redutoras de cargas poluidoras devido a sua grande capacidade de autodepuração, a prática excessiva de despejo de esgotos proporcionou um problema ambiental preocupante, uma vez que a quantidade lançada superou a capacidade de suporte de depuração do ambiente natural (CALIJURI et al., 2003).

É imprescindível que soluções para o tratamento das águas residuárias devam ser urgentemente adotadas, pois os sistemas naturais já não conseguem assimilar e depurar o excesso de resíduos humanos lançados na natureza. Com o tratamento dos esgotos sanitários, a matéria orgânica é convertida em produtos oxidados e estáveis que podem ser despejados com segurança em reservatórios naturais sem causar danos ecológicos ou à saúde pública (GRAY, 1989). O esgoto tratado despejado nos sistemas naturais minimiza e, pode até neutralizar a poluição, preservando os corpos d'água receptores e reduzindo a disseminação

¹ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. 1993. Conforme fonte consultada.

de doenças e impactos sócio-econômico (UEHARA; VIDAL, 1989; GRAY, 1989; World Health Organization - WHO, 1989).

Existem diferentes processos biológicos para o tratamento dos esgotos sanitários, tais como lagoas facultativas, lodos ativados, filtros biológicos e reatores anaeróbios (VON SPERLING, 1995).

Sistemas de tratamento biológico são muito utilizados para melhorar a qualidade do efluente a ser lançado no ambiente a fim de atenuar o impacto causado a natureza. O desempenho deste sistema pode estar associado à composição e à atividade microbiana da população presente (AKARSUBASI et al., 2005). Os microrganismos decompõem a matéria orgânica do esgoto em inorgânica permitindo que esta esteja disponível para a produção primária novamente e as bactérias são organismos que dominam em número e biomassa (AMMAN; LEMMER; WAGNER, 1998).

A lagoa de estabilização é uma lagoa artificial utilizada como um reator biológico para reduzir o material orgânico, sólidos e patógenos presentes no esgoto bruto antes deste ser despejado em um corpo d'água. Apresenta como características a alta eficiência e custos de operação e construção muito baixos, necessitando apenas de uma área extensa para a sua construção, além de altas temperaturas que aumentam a eficiência da redução (CAIRNCROS; FEACHEM, 1993; YU; TAY; WILSON, 1997; AGUNWAMBA, 2001). Assim, o sistema torna-se muito adequado para países como o Brasil, em desenvolvimento, de área extensa e de clima tropical.

O tratamento se baseia na autodepuração do esgoto pela própria comunidade de microrganismos presentes, como bactérias, algas e protozoários (MASSERET; AMBLARD; BOURDIER, 1998). O processo sofre influência da sedimentação, radiação solar, pH, níveis de CO₂, concentração do O₂ dissolvido, quantidade de algas e tempo de retenção (CAMPOS; GUERRERO; CÁRDENAS, 2002).

Em todos os sistemas de tratamento de esgoto existentes, os microrganismos procariontes são os mais abundantes e os principais responsáveis pela transformação de compostos orgânicos complexos no sistema (AMMAN; LEMMER; WAGNER, 1998; WAGNER et al., 2002; MOURA et al, 2009). Assim, caracterizar a estrutura, dinâmica e composição de uma comunidade microbiana é fundamental para se compreender a ecologia desta comunidade (DAIMS; STOECKER; WAGNER, 2005; SIYAMBALAPITIYA; BLACKALL, 2005).

A compreensão sobre a estrutura da comunidade microbiana de qualquer processo de tratamento de esgoto pode permitir o melhor funcionamento e a desempenho do sistema. A caracterização da comunidade também possibilitará o conhecimento dos processos específicos à microbiota envolvidos na autodepuração da água residuária (BOON et al., 2002), uma vez que mudanças na diversidade de tais comunidades podem comprometer o processo (FOSTER et al., 2003).

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular e grande utilização na área da ecologia microbiana, permitiu que os problemas associados aos métodos dependentes de cultura que levam a subestimação da verdadeira diversidade fossem superados.

Este trabalho integrou o projeto temático “Estudo dos sistemas redutores de cargas naturais e artificiais para a sustentabilidade dos Recursos Hídricos do Baixo Ribeira de Iguape – SP” e visou o estudo da diversidade da comunidade procariótica presente na lagoa de estabilização facultativa de tratamento de esgotos domésticos do município de Cajati, SP na bacia do Rio do Ribeira de Iguape.

Objetivos

A proposta da presente tese de doutorado foi analisar a estrutura da comunidade bacteriana da lagoa de estabilização facultativa da estação de tratamento de esgoto doméstico do município de Cajati, SP:

- verificar a composição desta comunidade
- sua variação temporal e espacial.
- analisar a aplicabilidade das técnicas de biologia molecular utilizadas isoladas e conjuntamente.

Para a realização do estudo da comunidade foram utilizadas as técnicas de hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH e CARD-FISH), reação em cadeia da polimerase, eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE), biblioteca de clonages do gene RNAr 16S, sequenciamento e análises estatísticas e análises de parâmetros ambientais.

Poucos estudos sobre a estrutura da comunidade de lagoas de estabilização já foram realizados, e nenhum envolvendo as três técnicas moleculares aqui citadas. Uma das finalidades de se utilizar as três técnicas é também de comparar os resultados obtidos entre os três diferentes métodos para observar e testar os pontos fracos e fortes de cada técnica e como

elas afetam o estudo geral da caracterização da estrutura da comunidade da lagoa facultativa de Cajati, SP.

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. As análises de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e *catalysed reported deposition fluorescence in situ Hybridization* (CARD-FISH) foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade de Aarhus, Dinamarca, coordenado pelo Prof. Andreas Schramm. A análise dos parâmetros físico-químicos foi realizada no Laboratório de Engenharia Hidráulica e Sanitária da Escola Politécnica da USP, coordenado pelo Prof. Dr Roque de Passos Bueno e no laboratório do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, USP.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

As lagoas de estabilização são sistemas de tratamento biológico onde são armazenados resíduos líquidos como esgotos domésticos e despejos industriais visando a diminuição de patógenos e resíduos sólidos. O tratamento nas lagoas de estabilização ocorre através de processos naturais, físicos, químicos e biológicos, em sua maioria sem a adoção de máquinas ou gastos com energia elétrica (CAIRNCROSS; FEACHEM, 1993). Do ponto de vista biológico, a cadeia trófica é composta por algas, protozoários flagelados e ciliados, zooplâncton e células procariontes responsáveis pela degradação dos compostos orgânicos (MASSERET; AMBLARD; BOURDIER, 1998; GRAY, 1989).

A lagoa de estabilização facultativa é dividida em três camadas, aeróbia, facultativa e anaeróbia. Na primeira camada as bactérias facultativas e aeróbias degradam a matéria orgânica e liberam nitrogênio e fósforo inorgânicos que são utilizados pelas algas. As algas e cianobactérias produzem oxigênio pela fotossíntese e este é utilizado pelos microrganismos procariontes, que também demandam o oxigênio que entra por difusão na água (UEHARA; VIDAL, 1989; JORDÃO; PESSOA, 1995).

Na camada inferior, ocorre a formação de lodo, a matéria orgânica sólida é hidrolisada pelo metabolismo anaeróbio e os gases metano, nitrogênio, dióxido de carbono e outros produtos degradados são liberados. A degradação anaeróbia depende da temperatura, que deve ser superior a 17 °C para se obter uma boa atividade (UEHARA; VIDAL, 1989). Na zona

facultativa, onde o oxigênio dissolvido não está disponível o tempo todo, é uma zona intermediária entre as duas camadas adjacentes. (UEHARA; VIDAL, 1989).

Os principais decompositores primários na lagoa facultativa são os procariontes facultativos e os aeróbios. Os tipos microbianos dominantes neste sistema são similares àqueles encontrados em outros sistemas de tratamento aeróbios e pertencem, principalmente, aos gêneros *Pseudomonas* sp., *Achromobacter* sp. e *Flavobacterium* sp.; além de grupos como os coliformes, as arqueias metanogênicas, bactérias redutoras de sulfato e as púrpuras do ciclo do enxofre (GRAY, 1989).

Há muito se sabe que apenas uma pequena fração dos microrganismos encontrados no ambiente pode ser isolada em culturas puras (MUYZER, 1999), somente 1% desses organismos podem ser cultivados. Isto é conhecido como “great plate anomaly”, que ocorre devido à inabilidade de reproduzir o ambiente adequado para o crescimento em laboratório dos microrganismos o que tornou os métodos dependentes de cultivo insuficiente para a quantificação e qualificação dos microrganismos nas amostras ambientais (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995; MUYZER; SMALLA, 1998).

Para a caracterização de um sistema de tratamento de esgoto são necessárias análises não apenas biológicas, mas também físicas e químicas para dimensionar e medir a eficiência das estações de tratamento (UEHARA; VIDAL, 1989), e também a relação entre os microrganismos e os processos biogeoquímicos que ocorrem neste sistema. A microbiologia molecular pode ser aplicada para investigar a relação entre a composição dos microrganismos presentes no sistema e os parâmetros dos processos. Em sistemas aquáticos é importante a avaliação das mudanças na estrutura da comunidade microbiana devido a sua base nos ciclos biogeoquímicos (WETZEL², 2001 apud SEKIGUCHI et al., 2001). Sabendo-se a correlação entre os dois fatores, é possível melhorar o controle do sistema microbiano nos sistemas de tratamento de esgoto e também de selecionar estratégias de processo sob medidas para a operação dos sistemas (WILDERER et al., 2002).

Wilderer et al. (2002) ainda afirmaram que, em alguns casos, é necessário saber a composição completa dos organismos em um reator ou em um sistema de tratamento de esgoto e, uma vez que a grande maioria das bactérias não é cultivável, uma alternativa é um banco de dados de genes específicos que possa ser utilizado para identificar as células. Uma

² WETZEL, R. G. The nitrogen cycle. In: WETZEL, R. G (Ed). Limnology. Lake and river ecosystems, 3. Ed. Academic Press: New York. 2001.

biblioteca de clones do gene RNAr 16S ribossômico da população microbiana pode ser sequenciada e o microrganismo identificado. Entretanto, os autores ainda afirmam que o resultado de uma biblioteca de clones ambiental não pode estimar quantitativamente a abundância microbiana.

Revelar a estrutura da comunidade microbiana de um ambiente, sua dinâmica e função são o principal objetivo de muitos estudos ecológicos microbianos (SIYAMBALAPITIYA BLACKALL, 2005; DAIMS; STOECKER; WAGNER, 2005).

1.1.1 Biologia molecular e a ecologia microbiana

A análise do gene RNAr 16S é o método mais utilizado para o estudo filogenético de microrganismos pois este gene é encontrado em todas as células vivas, ocorre em elevado número de cópias e é muito estável (HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998; ZWIRGLMAIER, 2005) além de conter regiões muito conservadas (DAIMS; STOECKER; WAGNER, 2005; NEUFELD; MOHN, 2006; SANZ; KÖCHLING, 2007) que podem ser utilizadas para hibridizar com sondas e iniciadores de PCR (NEUFELD; MOHN, 2006). Podem ainda ser usado para estimar a relação filogenética entre os organismos (ZWIRGLMAIER, 2005). Sequências de RNAr podem ser obtidas de qualquer amostra de origem ambiental ou clínica sem cultivo prévio (AMMAN; KÜHL, 1998). O RNAr 16S permite a comparação entre organismos de diferentes grupos do mesmo domínio (SANZ; KÖCHLING, 2007).

Embora a análise molecular seja considerada um método revolucionário para estudar a comunidade e diversidade microbiana, assim como para complementar e suprir as limitações dos métodos dependentes de cultivo, essa está sujeita a erros que devem ser levados em consideração na análise de dados. O tipo de lise empregado na extração de DNA, os iniciadores escolhidos para amplificação de DNA, amplificação preferencial a certos tipos de sequências e a possibilidade de resultar em formação de quimeras e artefatos na amplificação (REYSENBACH et al., 1992; FARRELLY; RAINEY; STACKERBRANDT, 1995; VON WINTZINGERODE; GÖBEL; STACKERBRANDT, 1997; OSBORNE et al., 2005).

As técnicas de biologia molecular vêm sendo utilizadas em sistemas de tratamento de esgotos, principalmente para o estudo de comunidades ou grupos específicos presentes em EBPR (Enhanced Biological Phosphorus Removal), UASB (digestor anaeróbio de fluxo ascendente em língua inglesa), *wetland*, lodos ativados e reatores anaeróbios em batelada (CROCETTI et al., 2000; AHN et al., 2002; IBEKWE; GIEVE; LYON, 2003; SIN et al., 2006; CALLI et al., 2007; MÜLLER; SCHADE; LEMMER, 2007; WILÉN et al., 2007; AHN

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

