

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Departamento de Hidráulica e Saneamento

MERCIA REGINA DOMINGUES

**“INVESTIGAÇÃO SOBRE A DIVERSIDADE MICROBIANA E A
FILOGENIA DE ARQUÉIAS E BACTÉRIAS EM CONSÓRCIOS
ANAERÓBIOS METANOGÊNICOS, ORIGINADOS DE SEDIMENTOS
ESTUARINOS ENRIQUECIDOS COM CLOROFENÓIS”**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Civil.
Área de Concentração: Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller

São Carlos

2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP**

D671e Domingues, Mercia Regina
Investigação sobre a diversidade microbiana e a filogenia de arqueias e bactérias em consórcios anaeróbios metanogênicos, originados de sedimentos estuarinos enriquecidos com clorofenóis / Mercia Regina Domingues; orientadora Rosana Filomena Vazoller. -- São Carlos, 2007.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2007.

1. Microrganismos anaeróbios. 2. Diversidade microbiana.
3. Relações filogenéticas. 4. Bibliotecas genômicas.
5. DGGE. 6. Sedimento estuarino.
I. Título.

*Dedico este trabalho à minha família e
ao meu querido marido Evandro.*

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller pela orientação e pela importante contribuição para o meu desenvolvimento acadêmico. Obrigada pela oportunidade dada para estudar o fantástico mundo dos microrganismos anaeróbios na área de saneamento ambiental, pela amizade e compreensão.

Ao Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann, pessoa e profissional admirável, pela orientação na área da biologia molecular. Agradeço imensamente sua generosidade em disponibilizar toda a infra-estrutura, os equipamentos e os materiais necessários para a realização deste trabalho, além da imensa contribuição para o meu crescimento profissional. Obrigada pela confiança e por ter acreditado no trabalho.

A Profa. Maria Bernadete Varesche pela contribuição para a realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (SHS/EESC/USP). Um agradecimento especial para a Pavi, que sempre me ajudou com eficiência e carinho.

Aos queridos técnicos e amigos do Laboratório de Processos Biológicos (EESC) e do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos (IFSC), principalmente à Susana A. Sculacio, pelo profissionalismo e amizade, fundamentais para a execução do trabalho e pelos momentos doces vividos nesse período.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

A flozinha Cristina Rossi Nakayama pela amizade e por ter dado a oportunidade de continuar seu trabalho maravilhoso sobre a diversidade dos microrganismos anaeróbios.

A grande amiga Isabel Kimiko Sakamoto, especialista em DGGE, pelo auxílio e ensinamento sobre esta técnica maravilhosa e trabalhosa. E também pelo carinho e amizade de tantos anos.

A Dani Vich pelo grande auxílio nas repetições do DGGE e pelos momentos divertidos.

Ao Daniel Silvestre, doutorando do IFSC, pela construção da árvore filogenética, pela boa vontade e paciência.

Ao querido Tiago Henrique Martins pela ajuda bem-humorada em todos os momentos e

principalmente na fase final do trabalho, além da grande amizade.

Aos queridos padrinhos Luana Marelli e “Fablito” Guerrini pelo acolhimento caloroso, pelo carinho, paciência e amizade. Muitíssimo obrigada por me hospedarem tantas vezes, e sempre, com muita amabilidade.

Aos também padrinhos e queridos amigos Rodrigo Maia e Mariana que também sempre me acolheram com muito carinho.

As minhas queridas amigas de república e do coração Dirlane Fátima do Carmo, Isabel Sakamoto e Luana Marelli. Quanta saudade...muitos momentos felizes...

Aos meus amigos do coração Flavinha Talarico e Gunther Brucha pela cumplicidade, apertos, risos e por vencermos juntos tantos desafios. E também pelas festas!

Aos queridíssimos amigos de laboratório e de São Carlos (em ordem alfabética) André Mineiro, Ari, Arnaldo, Betão, Bruna, Caê, Claudinha Megda, Cristina Iamamoto, Dani Vich, Déia Patê, Dick Trace, Dona Terezinha, Eloisa Pozzi, Fernanda Marciano, Eduardo Chuchu, Estelinha, Gabriel Souto, Glauce, Glaucito, Janja, Joel, Júlia, Larita, Leonídia, Luis Ricardo, Karina Kao, Katita, Madalena, Monique, Profa. Beth, Rinaldinho e Júlia, Rose, Roseli, Sidnei, Tiago Martins, Thiago Momenti, Tininha, Vítinho. E a todos que fazem parte da minha vida e que tenho muita estima...me perdoe se não citei alguém...todos já passaram por uma dissertação ou tese...então sabem que a cabeça não funciona direito!

Aos novos amigos que fiz na Universidade de Brasília (UnB) pela força e compreensão: Profa. Ariuska, Bia, Boy, Carolzinha, Eneida, Flavitcha, Helena, Jaque e Zago, Júnior, Lorena, Luciano, Renan, Rinaldinho, Roseli, Lilica, Marcilene, Marcos, Wendy e Yovanka.

A toda minha família pelo carinho e compreensão pela ausência devido à distância e ao trabalho. Pela força e torcida que me ajudam tanto a enfrentar os desafios. Só tenho que agradecer a vocês. Principalmente aos meus sobrinhos maravilhosos Victor e Carolina.

Ao meu querido esposo e amigo Evandro pelo apoio incondicional em todos os momentos, pelo carinho, paciência e por tornar meus dias melhores.

Obrigada a todos!

RESUMO

DOMINGUES, M. R. (2007). Investigação sobre a diversidade microbiana e a filogenia de arqueias e bactérias em consórcios anaeróbios metanogênicos, originados de sedimentos estuarinos enriquecidos com clorofenóis. 163f. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Este trabalho investigou a diversidade microbiana e a filogenia de arqueias e bactérias em consórcios anaeróbios metanogênicos, originados de sedimentos estuarinos enriquecidos com pentaclorofenol (PCP) e 2,6-diclorofenol (2,6-DCP). Para tanto foram construídas bibliotecas genômicas e utilizados métodos moleculares independentes de cultivo como a Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) e o sequenciamento de segmentos específicos do DNAr 16S microbiano. Os resultados da DGGE permitiram verificar alterações na estrutura das comunidades microbianas, as quais provavelmente ocorreram devido às adversidades ocorridas nos sistemas durante o período de incubação como a entrada de oxigênio nos frascos e o acúmulo de compostos clorados no meio de cultivo, principalmente o 2,6-DCP. A estimativa da diversidade beta, realizada pela comparação dos padrões de bandas da DGGE, também permitiu inferir que as alterações nas composições das comunidades de arqueias e bactérias foram devidas às duas estratégias empregadas para o enriquecimento da microbiota autóctone do estuário estudado, ou seja, a pasteurização/não pasteurização das amostras de sedimentos estuarinos. Os resultados das análises filogenéticas revelaram que as seqüências analisadas dos clones bacterianos foram relacionadas ao grupo das bactérias Gram-positivas com baixo conteúdo de G+C pertencentes à Ordem *Clostridiales* (100%) do Filo *Firmicutes* e as das arqueias relacionadas ao grupo das metanogênicas pertencentes às Ordens *Methanobacteriales* (7,1%), *Methanosarcinales* (14,3%), *Methanomicrobiales* (57,1%) e arqueias não identificadas (21,4%) do Filo *Euryarchaeota*. Em relação às bactérias, alguns clones foram identificados como pertencentes aos gêneros *Sedimentibacter*, *Clostridium* e *Alkalibacter*, os quais são representados por microrganismos que apresentam metabolismo fermentativo e requerem a presença de extrato de levedura para o crescimento. Provavelmente as bactérias analisadas neste trabalho fermentaram a glicose e o piruvato, os quais foram utilizados como doadores de elétrons, com conseqüente produção de lactato, etanol, butirato, acetato, formiato e hidrogênio/gás carbônico, que podem ter sido utilizados por outros grupos de microrganismos no processo global da digestão anaeróbia. Tais bactérias foram importantes para o processo global de degradação dos clorofenóis, pois também utilizaram como doadores de elétrons os produtos parcialmente degradados por outras bactérias fazendo com que não houvesse acúmulo desses compostos no sistema. Enquanto que algumas arqueias foram relacionadas a organismos hidrogenotróficos pertencentes aos gêneros *Methanoculleus* e *Methanocalculus*, *Methanobacterium*, e acetotróficos do gênero *Methanosaeta*, as quais utilizaram como substratos para a metanogênese os subprodutos da fermentação bacteriana, ou seja, o H₂/CO₂, o formiato e o acetato, contribuindo assim para a manutenção do equilíbrio das demais reações ocorridas no sistema. Desta forma, os dados obtidos neste trabalho poderão auxiliar na compreensão do funcionamento de ecossistemas contaminados por compostos clorados, bem como contribuir para o desenvolvimento de novos processos biotecnológicos aplicados aos problemas ambientais.

Palavras-chave: microrganismos anaeróbios, diversidade microbiana, relações filogenéticas, bibliotecas genômicas, DGGE, sedimento estuarino.

ABSTRACT

DOMINGUES, M. R. (2007). *Investigation on the microbial diversity and phylogeny of archaea and bacteria in anaerobic methanogenic consortium from enriched estuarine sediments with pentachlorophenol (PCP) and 2,6-dichlorophenol (2,6-DCP)*. 163f. Doctoral Thesis. São Carlos School of Engineering, University of São Paulo (USP), São Carlos (SP).

This work aimed to investigate microbial diversity and phylogeny of archaea and bacteria microorganisms methanogenic in estuarine sediment samples enriched with organic sources under methanogenic and halophilic conditions. The samples were obtained from previous study on anaerobic degradation of pentachlorophenol (PCP) and 2,6-dichlorophenol (2,6-DCP). Microbial studies were done by the molecular methods without cultivation requirement, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and specific segments of 16S rDNA sequencing. DGGE-profile showed structure changes in microbial community. Probably, as a consequence of O₂ intake and accumulation of chlorinated compounds, mainly 2,6-DCP, in the culture medium. The beta diversity estimation showed that changes in archaea and bacteria communities probably occurred as a consequence of the two enrichment strategies used for estuarine indigenous microorganisms, pasteurization and non-pasteurization of the estuarine sediments samples. Phylogenetic analysis indicated the presence of gram-positive bacterium with low G+C content related to *Clostridiales* Order (100%) belonging to *Firmicutes* Phylum, as well as related to methanogenic archaea from *Methanobacteriales* (7,1%), *Methanosarcinales* (14,3%) and *Methanomicrobiales* (57,1%) Order. Non-identified archaeas from *Euryarchaeota* Phylum were also found (21,4%). Concerning to bacterias, it was identified clones related to genera *Sedimentibacter*, *Clostridium* and *Alkalibacter*, which have fermentative metabolism and require yeast extract to grow. Probably, bacterial cells analysed in this work fermented glucose and pyruvate producing lactate, ethanol, butyrate, acetate, formate and hydrogen/carbon dioxide. All these products could be used for other microbial groups in the global process of anaerobic digestion. The bacterial microorganisms were important to global process of chlorophenol degradation because contributed in the overall process utilizing the products partially degraded by other bacterias and preventing its accumulation in the system. Identified archaeal cells were related to hydrogenotrophs microorganisms of the genera *Methanosaeta*, *Methanoculleus*, *Methanocalculus* and *Methanobacterium*, which utilized the bacterial fermentation sub-products as acetate, H₂/CO₂ and formate as substrate for the methanogenesis, contributing for the maintenance of the balance of other reactions occurred in the system. The results of this work give advanced knowledge about understanding biotechnological process of contaminated ecosystems by chlorinated compounds. Therefore, it could contribute to development of new biotechnological processes applied to environmental problems.

Keywords: anaerobic microorganisms, microbial diversity, phylogenetic relations, microbial, genomic library, estuarine sediment.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Diagrama esquemático de um estuário hipotético, onde S representa a salinidade e Q_R a vazão de água 10
- Figura 2. Processos envolvidos no transporte de contaminantes em estuários 12
- Figura 3. Descrição cronológica dos principais eventos ocorridos entre os anos de 1952 e 2000. Os fatos relacionados aos processos de urbanização e industrialização da Baixada Santista, da contaminação do seu sistema estuarino por compostos organoclorados e os esforços realizados para a recuperação desta área 14
- Figura 4. Os 19 isômeros de clorofenóis existentes. Em destaque o 2,6-DCP e o PCP que são objetos de estudo neste trabalho 24
- Figura 5. Modelo simplificado da substituição dos átomos de cloro pelos de hidrogênio na reação de desalogenação redutiva do PCP e os congêneres produzidos 31
- Figura 6. Vias de desalogenação do PCP. Via A: *orto* clivagem seguida de *orto* e *para* clivagens, com formação dos congêneres 2,3,4,5-TeCP, 3,4,5-TCP e 3,5-DCP, respectivamente. Via B: *para* clivagem seguida de duas *orto* clivagens, com formação dos congêneres 2,3,5,6-TeCP, 2,3,5-TCP e 3,5-DCP, respectivamente 35
- Figura 7. Degradação do PCP em 3,4-DCP e 4-MCP. As setas largas representam a via predominante da desalogenação redutiva durante o experimento. As setas simples cheias e tracejadas representam as vias de descloração do PCP durante e após 14 meses de operação, respectivamente 37
- Figura 8. Possíveis vias de descloração dos 19 isômeros de clorofenóis por consórcios microbianos oriundos de lodo metanogênico nunca exposto a contaminantes. As linhas sólidas representam as vias em que as porcentagens de ocorrência foram superiores a 60% e as tracejadas as que foram inferiores a 40% 38
- Figura 9. Esquema do grampo de GC ancorado na extremidade 5' da seqüência senso do iniciador. A região destacada em preto é a seqüência do fragmento amplificado 44

- Figura 10. Representação esquemática da técnica de DGGE. (a) gradiente linear de desnaturação, (b) dissociação e migração do fragmento de DNA na matriz de poliacrilamida, (c) término da migração e dissociação devido ao *GC clamp* ancorado a extremidade 5' da seqüência senso do iniciador e (d) "impressão digital" da comunidade microbiana 46
- Figura 11. Esquema dos artifícios utilizados para clonar produtos amplificados da PCR: (a) polinucleotídeos sintetizados pela *Taq* DNA-polimerase com adenosinas extras nas terminações 3', (b) vetor especial com timidina nas extremidades e (c) obtenção de um produto de PCR com uma extremidade coesiva pelo uso de um iniciador cuja seqüência inclui um sítio de restrição 52
- Figura 12. Esquema da ligação do inserto em vetor apropriado pela ação da enzima DNA-ligase 53
- Figura 13. Representação esquemática da transformação e identificação de recombinantes em células bacterianas: (a) célula bacteriana, (b) célula competente, (c) DNA recombinante incorporado à célula hospedeira, (d) multiplicação do DNA recombinante, (e) divisão da célula hospedeira e (f) colônias recombinante (branca) e não-recombinante (azul), crescendo em ágar com ampicilina, X-gal e IPTG 54
- Figura 14. Esquema da estratégia de seqüenciamento realizada por Sanger-Coulson pelo método da terminação em cadeia. (a) reação da DNA polimerase, (b) estrutura do dideoxinucleotídeo (c), mistura de reação com dNTP:ddNTP e (d) eletroforse em gel e autoradiografia 56
- Figura 15. Esquema da estratégia utilizada no seqüenciamento automatizado 58
- Figura 16. Área de estudo. (a) localização da Baixada Santista no Estado de São Paulo (destacada em vermelho), (b) ponto de coleta das amostras de sedimento no terminal portuário da COSIPA e (c) imagem de satélite do sistema estuarino de Santos e São Vicente. 64
- Figura 17. Digrama esquemático do histórico da obtenção dos consórcios microbianos anaeróbios originados de amostras de sedimentos estuarinos enriquecidos com clorofenóis. As siglas R1, P1, P2, NP1, NP2, NP3, NP4 e DCPpir referem-se aos consórcios microbianos estudados neste trabalho 66
- Figura 18. Diagrama esquemático das atividades experimentais que utilizaram ferramentas de biologia molecular. 71

- Figura 19. Mapa circular do vetor de clonagem *pGEM*[®]-T. 87
- Figura 20. Mapa da região de clonagem do vetor *pGEM*[®]-T linearizado. As timidinas presentes nas extremidades 3' do vetor estão destacadas em negrito. 87
- Figura 21. Eletroforese em gel de agarose (1%) da extração de DNA das comunidades dos consórcios microbianos. À esquerda estão apresentados os tamanhos de fragmentos de DNA correspondentes ao marcador (*ladder*) 96
- Figura 22. Eletroforese em gel de agarose (1%) da amplificação dos fragmentos de DNAr 16S das comunidades bacterianas dos consórcios microbianos, pela técnica de PCR. À esquerda estão apresentados os tamanhos de fragmentos de DNA correspondentes ao marcador (*ladder*) 97
- Figura 23. Padrões de bandas representantes das comunidades dos consórcios microbianos obtidos a partir da DGGE com gradientes de desnaturação de 40% e 60%. (a) Domínio *Bacteria*. (b) Domínio *Archaea*. Os retângulos e as setas indicam as bandas que foram extraídas do gel 103
- Figura 24. Perfis das comunidades bacterianas nos consórcios R1, P1, P2, NP1, NP2, NP3, NP4 e DCPpir obtidos a partir da DGGE com gradientes de desnaturação de 40% e 60%. Os retângulos mostram as populações presentes em mais de uma amostra e as setas as populações presentes em apenas uma amostra 105
- Figura 25. Frasco R1 pasteurizado e (b) Frasco J “PCP” pasteurizado. Valores das concentrações de PCP (-♦-), 2,6-DCP (-■-), 2,3,4-TCP (-▲-) e da produção de metano (-●-). As setas pretas indicam os períodos em que os consórcios foram coletados. * A produção do gás metano foi de 1% durante todo o ensaio 106
- Figura 26. Frasco J “NP” não pasteurizado. Valores das concentrações de PCP (-♦-), 2,6-DCP (-■-), 2,3,4-TCP (-▲-) e da produção de metano (-●-). As setas azuis e lilases indicam o número de realimentações do sistema com fontes orgânicas e PCP e os pontos em que os consórcios foram coletados, respectivamente. 108

- Figura 27. Perfis das comunidades de arqueias nos consórcios R1, P1, P2, NP1, NP2, NP3, NP4 e DCPpir obtidos a partir da DGGE com gradientes de desnaturação de 40% e 60%. Os retângulos mostram as populações presentes em mais de uma amostra e as setas as populações presentes em apenas uma amostra 112
- Figura 28. Diversidade beta das comunidades bacterianas dos consórcios originados de amostras de sedimentos estuarinos submetidas e não submetidas ao processo de pasteurização, estimada a partir da análise de agrupamento com coeficiente de Sorensen e método de ligação UPGMA. 117
- Figura 29. Diversidade beta das comunidades de arqueias dos consórcios originados de amostras de sedimentos estuarinos submetidas e não submetidas ao processo de pasteurização, estimada a partir da análise de agrupamento com coeficiente de Sorensen e método de ligação UPGMA 119
- Figura 30. Árvore filogenética construída a partir de seqüências do DNAr 16S de bactérias, pelo método da Máxima Verossimilhança (MV), utilizando 1000 replicações. A sigla BNC significa Bactéria Não Cultivada. O grupo externo foi representado pelo microrganismo *Thermotoga maritima* 122
- Figura 31. Árvore filogenética construída a partir de seqüências do DNAr 16S de arqueias, pelo método da Máxima Verossimilhança (MV), utilizando 1735 replicações. A sigla ANC significa Arquéia Não Cultivada. O grupo externo foi representado pelo microrganismo *Sulfolobus acidocaldarius*. 132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Aceptores e doadores de elétrons utilizados por microrganismos anaeróbios desalogenadores de diversos compostos clorados	33
Tabela 2.	Compostos intermediários formados a partir da descloração de distintos clorofenóis	36
Tabela 3.	Caracterização das variáveis físicas e químicas do local de coleta	65
Tabela 4.	Volume de sedimento e composição do meio de cultivo utilizada na etapa de inoculação	67
Tabela 5.	Características gerais dos diferentes iniciadores utilizados na amplificação dos fragmentos de DNAr 16S das comunidades microbianas de arqueias e bactérias, pela técnica da PCR	77
Tabela 6.	Composição da mistura para a reação de amplificação dos fragmentos de DNAr 16S pela PCR	78
Tabela 7.	Condições utilizadas no termociclador para a amplificação dos fragmentos de DNA com os diferentes iniciadores, pela técnica de PCR	79
Tabela 8.	Iniciadores e as correspondentes seqüências dos grampos de GC utilizados na DGGE	79
Tabela 9.	Componentes utilizados na preparação das soluções desnaturantes	82
Tabela 10.	Volumes das soluções utilizadas para a confecção dos géis de acrilamida com diferentes gradientes de desnaturação	82
Tabela 11.	Composição da mistura para a adição de deoxiadenosina (dATP)	86
Tabela 12.	Número total de seqüências obtidas a partir de bibliotecas genômicas dos consórcios microbianos NP3 e DCPpir	98
Tabela 13.	Coefficientes de similaridade de Sorensen para as diferentes comunidades bacterianas	118
Tabela 14.	Coefficientes de similaridade de Sorensen para as diferentes comunidades de arqueias	119
Tabela 15.	Origem e nomenclatura dos clones referentes às bactérias e arqueias dos consórcios microbianos	120
Tabela 16.	Classificação das seqüências dos clones de bactérias e arqueias referentes consórcios microbianos	121

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	07
3. REVISÃO DA LITERATURA	09
3.1. Ambientes estuarinos	09
3.2. Transporte e deposição de contaminantes em sedimentos estuarinos	11
3.3. A Baixada Santista	13
3.3.1. <i>A ocupação urbana e industrial da região estuarina da Baixada Santista</i>	15
3.3.2. <i>Histórico da contaminação da Baixada Santista por organoclorados</i>	17
3.3.3. <i>Esforços para a recuperação do sistema estuarino da Baixada Santista</i>	20
3.4. Utilização e origem dos clorofenóis 2,6-diclorofenol e do pentaclorofenol	23
3.5. Problemas de saúde pública e ambiental causados pelo PCP e pelo 2,6-DCP	25
3.6. Mecanismos de transporte do PCP e do 2,6-DCP em ambientes estuarinos	27
3.7. Degradação do PCP e do 2,6-DCP por consórcios microbianos anaeróbios	28
3.8. Vias de degradação de organoclorados sob condições anaeróbias	30
3.9. Ecologia molecular microbiana	39
3.9.1. <i>Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)</i>	43
3.9.2. <i>Construção de bibliotecas genômicas</i>	50
3.9.2.1. <i>Vetores de clonagem baseados em plasmídeos bacterianos</i>	51
3.9.2.2. <i>Clonagem a partir de produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR)</i>	52
3.9.2.3. <i>Ligação do fragmento de DNA amplificado ao vetor de clonagem</i>	53
3.9.2.4. <i>Transformação e identificação de recombinantes em células bacterianas</i>	54
3.9.3. <i>Seqüenciamento de DNA pelo método de terminação em cadeia</i>	55
3.9.3.1. <i>Seqüenciamento automático de DNA</i>	57
4. MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1. Área de estudo	63
4.1.1. <i>Caracterização física e química do sedimento e da água</i>	64
4.2. Origem dos consórcios microbianos anaeróbios	65
4.2.1. <i>Etapa 1: Inoculação das amostras de sedimentos estuarinos</i>	67
4.2.2. <i>Etapa 2a: Repique dos consórcios microbianos cultivados nos “Frascos A PCP pasteurizados”</i>	68

4.2.3. <i>Etapa 2b: Realimentação dos frascos de cultivo com fontes orgânicas e/ou clorofenóis</i>	68
4.2.4. <i>Etapa 3: Transferência dos consórcios microbianos para frascos adaptados</i>	69
4.2.5 <i>Etapa 3a: Re.pique dos consórcios microbianos cultivados nos “Frasco J DCP não-pasteurizado”</i>	69
4.2.6. <i>Etapa 4: Amostragem dos consórcios microbianos para análise</i>	70
4.3. Atividades experimentais e métodos moleculares utilizados nas análises de diversidade e filogenia microbiana	70
4.3.1. <i>Armazenamento e extração do DNA total dos consórcios microbianos</i>	72
4.3.1.1. <i>Armazenamento das amostras dos consórcios microbianos</i>	72
4.3.1.2. <i>Extração do DNA total das comunidades microbianas</i>	72
4.4. Quantificação e análise da qualidade dos extratos de DNA das comunidades microbianas	73
4.5. Purificação dos extratos de DNA das comunidades microbianas	74
4.6. Precipitação dos extratos de DNA purificados das comunidades microbianas	76
4.6.1. <i>Condições para as reações de amplificação dos fragmentos de DNA pela PCR</i>	76
4.7. Iniciadores utilizados nas amplificações dos fragmentos de DNAr 16S purificados das comunidades microbianas, pela técnica da PCR	76
4.7.1. <i>Condições para as reações de amplificação dos fragmentos de DNAr 16S</i>	78
4.8. Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)	79
4.8.1. <i>Preparação dos produtos da PCR utilizados na técnica de DGGE</i>	80
4.8.2. <i>Procedimento para a realização da técnica de DGGE</i>	80
4.8.3. <i>Padrões de “bandas” obtidos na DGGE: análise da estrutura das comunidades e estimativa da diversidade microbiana</i>	82
4.9. Amplificação e purificação do DNAr 16S presente nas “bandas” do gel de DGGE	83
4.10. Clonagem dos fragmentos de DNAr 16S de interesse	85
4.10.1. <i>Adenilação dos fragmentos de DNA</i>	86
4.10.2. <i>Ligação dos fragmentos de DNA aos vetores de clonagem</i>	86
4.10.3. <i>Transformação de recombinantes em células bacterianas</i>	87
4.10.4. <i>Identificação e cultivo das colônias recombinantes</i>	89
4.10.5. <i>Extração do DNA recombinante das células bacterianas</i>	90
4.11. <i>Seqüenciamento dos fragmentos do DNAr 16S</i>	91
4.12. Processamento e análise filogenética das seqüências do DNAr 16S	92

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
5.1. Avaliação do método de extração do DNA total das comunidades microbianas	95
5.2. Amplificação dos fragmentos de DNAr 16S das comunidades microbianas pela técnica da PCR	96
5.3. Obtenção das seqüências de DNAr 16S das comunidades microbianas a partir de bibliotecas genômicas e DGGE	97
5.3.1. <i>Consórcios microbianos NP3 e DCPpir: bibliotecas genômicas</i>	97
5.3.2. <i>Consórcios microbianos R1, P1, P2, NP1, NP2, NP3, NP4 e DCPpir: DGGE</i>	100
5.4. Análise das comunidades microbianas	104
5.4.1. <i>Análise da estrutura das comunidades de bactérias e arqueias</i>	104
5.4.1.1. <i>Domínio Bacteria</i>	105
5.4.1.2. <i>Domínio Archaea</i>	111
5.4.2. <i>Estimativa da diversidade beta</i>	116
5.4.3. <i>Filogenia de bactérias e arqueias</i>	120
6. CONCLUSÕES	136
7. RECOMENDAÇÕES	137
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
9. ANEXOS	159

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, as três divisões que definem a organização filogenética dos seres vivos são os Domínios *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*. Os microrganismos, representados em sua grande maioria pelos dois primeiros grupos, constituem as formas de vida mais abundantes e diversificadas presentes na natureza (Whitman *et al.*, 1998) e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção dos ecossistemas como componentes fundamentais de cadeias alimentares e dos ciclos biogeoquímicos (Canhos & Manfio, 2001). Apesar da grande importância destes seres para a manutenção da biosfera, estima-se que apenas uma pequena fração das espécies microbianas existentes tenha sido descrita e caracterizada. No entanto, em virtude do desenvolvimento de ferramentas de biologia molecular baseadas em análises de seqüências específicas do RNA ribossomal 16S ou de genes cromossomais que os codificam, notadamente o DNAr 16S, e da bioinformática que é uma ciência que emprega métodos computacionais, matemáticos e estatísticos para organizar e analisar dados biológicos em grande escala e de maneira integrada, está surgindo um novo cenário para os estudos de caracterização e identificação dos microrganismos no meio ambiente (Ogata, 2005).

Mediante a evolução tecnológica para a identificação e classificação dos microrganismos, nas últimas décadas, os microbiologistas vêm desvendando a enorme

diversidade microbiana existente e correlacionando-a com o funcionamento dos ecossistemas, por meio de técnicas moleculares. De acordo com Canhos & Manfio (2001), o conhecimento da diversidade microbiana ambiental constitui um objeto de grande valor para o desenvolvimento de processos tecnológicos para a biorremediação de áreas degradadas e contaminadas com compostos tóxicos e recalcitrantes, pois muitas espécies de microrganismos são capazes de degradar ou auxiliar na transformação de tais substâncias.

Em todo o mundo, inclusive no Brasil, as preocupações com a qualidade de vida e a conservação do meio ambiente incentivaram a realização de vários estudos moleculares sobre a biodiversidade e a ecologia microbiana de ecossistemas contaminados com produtos de origem antrópica. Neste sentido, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) proporcionou a realização do projeto temático Biota, intitulado “Ecologia Molecular e Taxonomia Polifásica de Bactérias de Interesse Ambiental e Agroindustrial”, na região estuarina de Santos e São Vicente, situada na Baixada Santista (SP). Esta área foi escolhida por se tratar de uma região degradada devido às intensas e desordenadas ocupações urbana e industrial, bem como pela contaminação de solos e sistemas aquáticos por diversos tipos de compostos tóxicos e recalcitrantes como os organoclorados, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, os solventes orgânicos, as dioxinas, os furanos, os metais pesados, entre outros (Piza, 2004; Nakayama, 2005).

No grupo dos organoclorados, os clorofenóis têm recebido atenção especial por parte da comunidade científica e das autoridades locais por se tratar de uma das maiores classes de contaminantes antropogênicos lançadas neste sistema estuarino, através de despejos de efluentes de indústrias oriundos da produção de pesticidas, plásticos, solventes, desengraxantes e conservantes de madeira (Huang *et al.*, 2000). Além disso, a deposição inadequada desses compostos em terrenos com características morfológicas impróprias ocasionou a poluição de áreas adjacentes da região, pelo processo de lixiviação (Matheus, 1998). Nesta classe de

compostos clorados, destaca-se o pentaclorofenol, um contaminante tóxico que causa impactos negativos aos ecossistemas, pois persiste por longos períodos no ambiente e tende a se acumular em organismos componentes de diversas cadeias alimentares, além dos sérios problemas que causa à saúde humana (Jones & Voogt, 1999). Também existem evidências que esse composto pode ser transportado para localidades distantes, atingindo regiões onde nunca foram usados ou produzidos. Apesar dessas características, as concentrações de pentaclorofenol em ambientes naturais podem ser reduzidas, pois diferentes grupos microbianos utilizam esse composto como fonte de energia e crescimento. Desta forma, o pentaclorofenol e seus congêneres podem ser degradados e/ou transformados em compostos menos tóxicos, principalmente, pela ação conjunta e coordenada de diversos microrganismos (Yan *et al*, 2006).

Atualmente, diversos trabalhos têm demonstrado a importância dos microrganismos aeróbios e anaeróbios na degradação do pentaclorofenol e seus congêneres (Hagblom, *et al*. 2000). No entanto, os últimos têm sido objetos de estudos de muitos pesquisadores, pois a biodegradação de compostos clorados ocorre com maior facilidade em ambientes sob condições anaeróbias e também porque esses microrganismos são capazes de mineralizar completamente os clorofenóis, ou seja, convertê-los ao final do processo em produtos como o metano e a água (Mohn & Tiedje, 1992). Estes fatores têm estimulado a utilização de consórcios microbianos anaeróbios na aplicação de medidas mitigadoras para a descontaminação ambiental *in situ* ou *ex situ*.

Devido ao histórico de contaminação e a ocorrência pretérita de clorofenóis em sedimentos do sistema estuarino de Santos e São Vicente, o projeto Biota FAPESP incentivou a realização de diversas pesquisas nessa região para avaliar a diversidade de microrganismos anaeróbios autóctones e o seu potencial para degradar compostos clorados. Neste contexto, Nakayama (2005) realizou um estudo pioneiro sobre a degradação anaeróbia do

pentaclorofenol (PCP), 2,3,4-triclorofenol (2,3,4-TCP) e 2,6-diclorofenol (2,6-DCP) por culturas enriquecidas a partir de sedimento contaminado do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, sob condições metanogênicas e mesofílicas, através de uma abordagem polifásica combinando técnicas tradicionais de cultivo e métodos moleculares. Os resultados obtidos por Nakayama (2005) contribuíram com importantes informações para o avanço do conhecimento sobre as variáveis ambientais e as características dos processos envolvidos na degradação anaeróbia dos clorofenóis analisados. Porém, a autora fez algumas sugestões para aprimorar as informações obtidas sobre a diversidade microbiana para que, num futuro próximo, possam auxiliar no desenvolvimento e na aplicação de técnicas seguras de biorremediação no estuário de Santos e São Vicente. Dentre as recomendações citadas foi estabelecida a necessidade de conhecer com segurança os consórcios metanogênicos anaeróbios, originados de sedimentos estuarinos enriquecidos, envolvidos direta e/ou indiretamente na degradação do PCP, do 2,3,4-TCP e do 2,6-DCP.

Neste sentido, o presente trabalho procurou avaliar com mais detalhes, a partir de dados confiáveis, a diversidade, a estrutura e a filogenia de microrganismos pertencentes aos Domínios *Archaea* e *Bacteria* presentes em consórcios metanogênicos anaeróbios originados de amostras pasteurizadas e não pasteurizadas de sedimentos estuarinos enriquecidos com pentaclorofenol e 2,6-diclorofenol, utilizando métodos moleculares independentes de cultivo como a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), a construção de bibliotecas genômicas e a análise de seqüências dos DNAr 16S microbiano. Portanto, esta pesquisa teve o compromisso não só de complementar um trabalho, mas de fornecer dados relevantes sobre a ecologia microbiana no processo de degradação anaeróbia do PCP e do 2,6-DCP e colaborar com informações pertinentes à temática do projeto Biota FAPESP, as quais serão disponibilizadas para a sociedade no sítio eletrônico do SinBiota ([http:// sinbiota.cria.org.br](http://sinbiota.cria.org.br)), um importante sistema de informação sobre a biodiversidade do Estado de São Paulo. Desta

forma, o conhecimento gerado poderá auxiliar na compreensão dos processos de biodegradação e biotransformação de compostos tóxicos em ambientes contaminados com clorofenóis e contribuir para o desenvolvimento de novos processos biotecnológicos aplicados aos problemas ambientais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar os microrganismos, pertencentes aos Domínios *Archaea* e *Bacteria*, em consórcios metanogênicos anaeróbios originados de amostras pasteurizadas e não pasteurizadas de sedimentos estuarinos enriquecidos com pentaclorofenol e 2,6-diclorofenol, a partir da construção de bibliotecas genômicas e de métodos moleculares independentes de cultivo como a Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE).

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a diversidade e a estrutura das comunidades microbianas anaeróbias no processo de degradação dos clorofenóis e seus subprodutos;
- Analisar a filogenia dos microrganismos anaeróbios envolvidos direta e/ou indiretamente na degradação dos clorofenóis, a partir de seqüências específicas do DNAr 16S.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Ambientes estuarinos

Atualmente, os ambientes estuarinos têm sido estudados por muitos pesquisadores devido à importância ambiental e sócio-econômica destes ecótonos, os quais representam o elo entre os ecossistemas fluvial e marinho (Meyer & Diniz, 2005).

Os complexos processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem em um estuário, aliados às características geológicas da área, fazem com que este ecossistema seja altamente produtivo e que atue como berçário e abrigo para o desenvolvimento de muitos organismos importantes para a manutenção e sustentabilidade desse ambiente, além daqueles de interesse comercial. Tais peculiaridades podem ser explicadas, resumidamente, com base em informações organizadas há algum tempo por Odum (1988):

a. a elevada produtividade do estuário se deve, principalmente, aos subsídios oriundos dos fluxos de água doce e salgada, que promovem a mistura e o revolvimento dos nutrientes, tornando-os disponíveis aos organismos produtores em quantidades superiores às aquelas encontradas nos habitats adjacentes, fluvial ou marinho. Desta forma, os seres autótrofos que compõem o fitoplâncton, as algas bentônicas e as macrófitas fornecem uma variedade de recursos alimentares para os heterótrofos durante todo o ano;

b. os estuários são considerados locais apropriados para o desenvolvimento de vários organismos por causa da disponibilidade e da abundância de alimentos, bem como para a sobrevivência dos mesmos que ficam protegidos da ação dos predadores. As larvas e as formas jovens de muitas espécies de mariscos, ostras, caranguejos, camarões e peixes, dotados de valores econômicos, se abrigam e se desenvolvem nesses ambientes. Em função da riqueza e da diversidade faunística, estes ecossistemas contribuem significativamente para o sustento de muitas famílias e para o crescimento econômico e turístico de uma dada região estuarina.

De acordo com a ACIESP (1997), um estuário pode ser definido como um corpo de água costeiro semi-fechado, que tem uma conexão com o mar aberto, o qual é influenciado pela ação das marés (Figura 1).

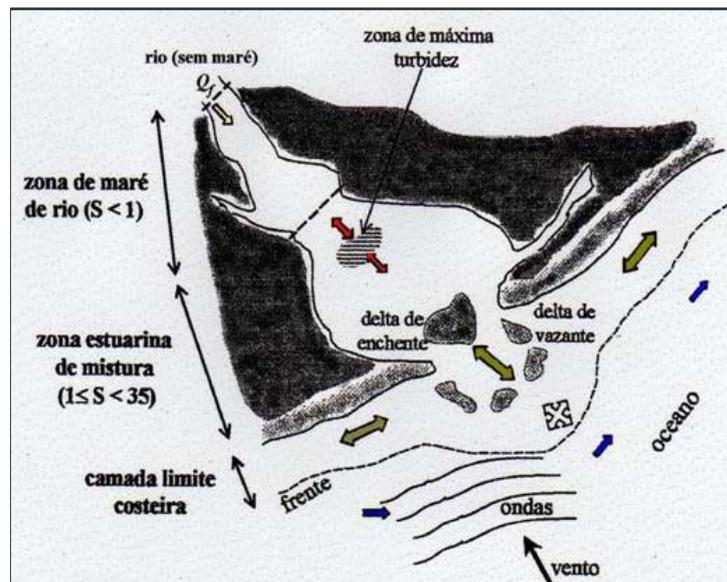


Figura 1. Diagrama esquemático de um estuário hipotético, onde S representa a salinidade e Q_r a vazão de água doce (Kjerfve, 1990).

A água do mar, mais densa, entra no estuário em direção a montante por baixo da corrente de água doce proveniente da drenagem terrestre, produzindo um gradiente de salinidade. Nos sistemas estuarinos, os processos de mistura, circulação e estratificação são influenciados basicamente pela descarga de água doce, pelas correntes de maré e pelo cisalhamento do vento em sua superfície; aos quais somam-se às influências exercidas pela

geometria do estuário, pela salinidade e pelos padrões de circulação da região costeira adjacente.

3.2. Transporte e deposição de contaminantes em sedimentos estuarinos

Nas últimas décadas, a sociedade e o governo de muitos países se conscientizaram sobre a importância da conservação dos ecossistemas estuarinos e, assim, passaram a controlar esses ambientes devido ao preocupante quadro de contaminação dos sedimentos e das águas por substâncias tóxicas de origem antrópica como os clorofenóis, os metais pesados, os solventes orgânicos, entre outros.

Pesquisadores e tomadores de decisão trabalharam conjuntamente para desenvolverem programas de manejo integrados em sistemas estuarinos e também promoverem o planejamento participativo do ambiente junto à população da região. Entretanto, é importante salientar que antes da realização de qualquer ação mitigadora para tentar reverter ou minimizar os impactos negativos causados pela poluição é preciso conhecer a hidrodinâmica dos estuários. Segundo Kjerfve (1990), este parâmetro condiciona a distribuição de materiais no sistema e permite compreender os processos ecológicos relacionados ao transporte de metais e micropoluentes orgânicos adsorvidos aos sedimentos finos, ao funcionamento dos ambientes estuarinos, bem como a sua contribuição na produtividade (importação/exportação) nas zonas costeiras.

Os estuários atuam como receptáculos de matéria orgânica particulada, sedimentos, nutrientes, clorofila, larvas e inclusive contaminantes. A introdução de xenobióticos¹ nesses ambientes, associada ao processo de sedimentação, pode causar sérios problemas aos organismos aquáticos e à saúde humana. Muitos destes compostos químicos são hidrofóbicos e tendem a adsorver ao material particulado e se depositarem no sedimento sub-superficial, em

¹ Xenobióticos: substâncias químicas não consideradas como componentes naturais do organismo a ele exposto. Sinônimos: substância ou composto estranho, exógeno, alóctone (Zagatto & Bertoletti, 2006).

níveis mais elevados que aqueles observados na coluna d'água. De acordo com Taniguchi (2001) os sedimentos agem como um substrato cromatográfico, pois as características das partículas que os compõem influenciam diretamente na afinidade de compostos orgânicos e inorgânicos às mesmas, determinando assim os diferentes tipos de processos que envolvem a deposição e/ou transporte de contaminantes no sistema (Figura 2).

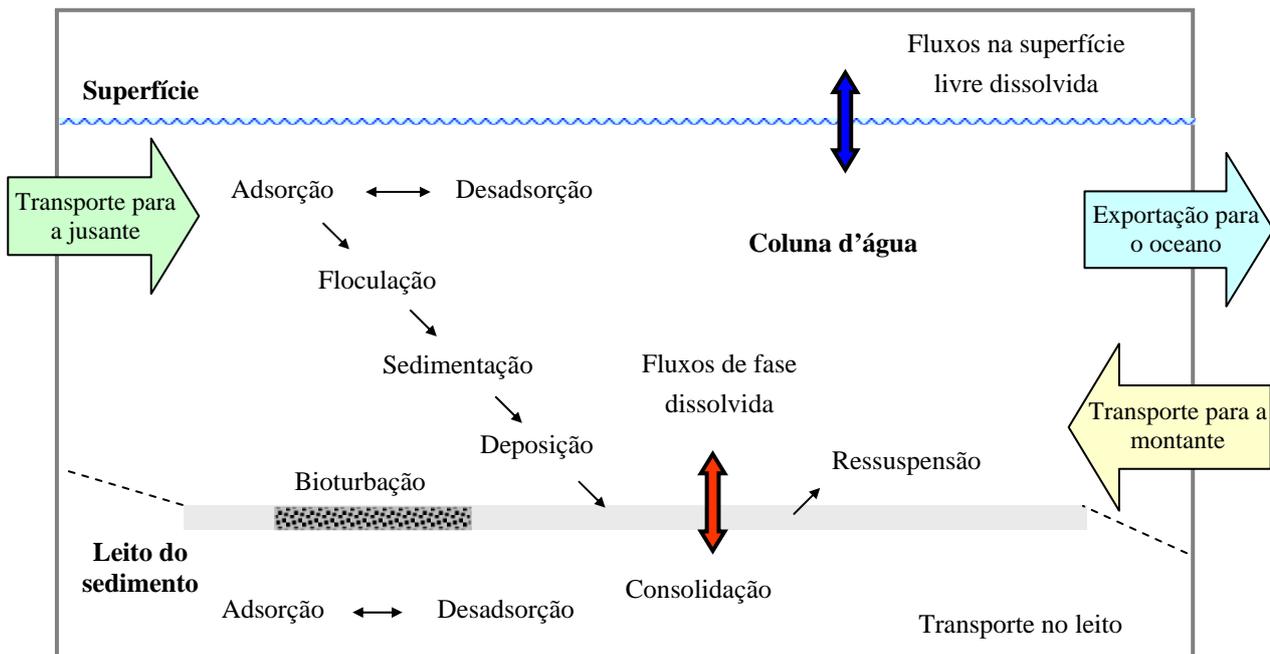


Figura 2. Processos envolvidos no transporte de contaminantes em estuários (Fernandes, 2001)

No processo de transporte, as concentrações de compostos contaminantes orgânicos e inorgânicos podem sofrer alterações quantitativas, ou seja, diminuir quando houver diluição ou aumentar quando houver reconcentração ou sofrer transferência de fase. Em relação à qualidade, os compostos podem ser molecularmente alterados em função da degradação e das múltiplas reações químicas que os mesmos podem participar, resultando no aumento, na diminuição ou mesmo na inativação do seu poder tóxico. Já no processo de deposição, os contaminantes que adentram no ambiente aquático invariavelmente se associam de alguma forma, pelos processos de superfície, aos particulados suspensos preexistentes no ambiente e subsequentemente tendem a se depositar no fundo, passando assim a fazer parte dos

sedimentos (Zagatto & Bertolotti, 2006). Segundo os autores, a reatividade dos sólidos suspensos e de fundo será maior quanto menor for o diâmetro da partícula. Este processo ocorrerá ativamente em qualquer ambiente onde houver apreciáveis quantidades de particulados finos como a areia, o silte e a argila, especialmente em ambientes estuarinos.

Davies *et al.* (1999) ressaltam ainda questões sobre a biodisponibilidade de contaminantes para as micro e macrofaunas bentônicas estuarinas, tais como a importância da coluna d'água *versus* as partículas de sedimento; a heterogeneidade dos sedimentos em diferentes perfis de profundidade, pois estes refletem mudanças na idade dos mesmos, condições do potencial redox local, degradação e disponibilidade dos xenobióticos; e finalmente os fatores biológicos como o padrão de alimentação dos macrorganismos.

Portanto, devido a sua importância em estudos ecológicos os sedimentos têm sido utilizados como indicadores da saúde dos ecossistemas, aquáticos por fornecerem uma série de informações associadas ao aporte de contaminantes (Martins, 2005).

3.3. A Baixada Santista

A seguir será apresentado um breve histórico sobre os principais eventos relacionados aos processos de urbanização e industrialização na região da Baixada Santista, bem como o da contaminação do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente por compostos organoclorados e os esforços realizados para a recuperação desta área degradada. A ocorrência cronológica dos eventos ocorridos na região da Baixada Santista durante os anos de 1952 e 2000 está apresentada na Figura 3.

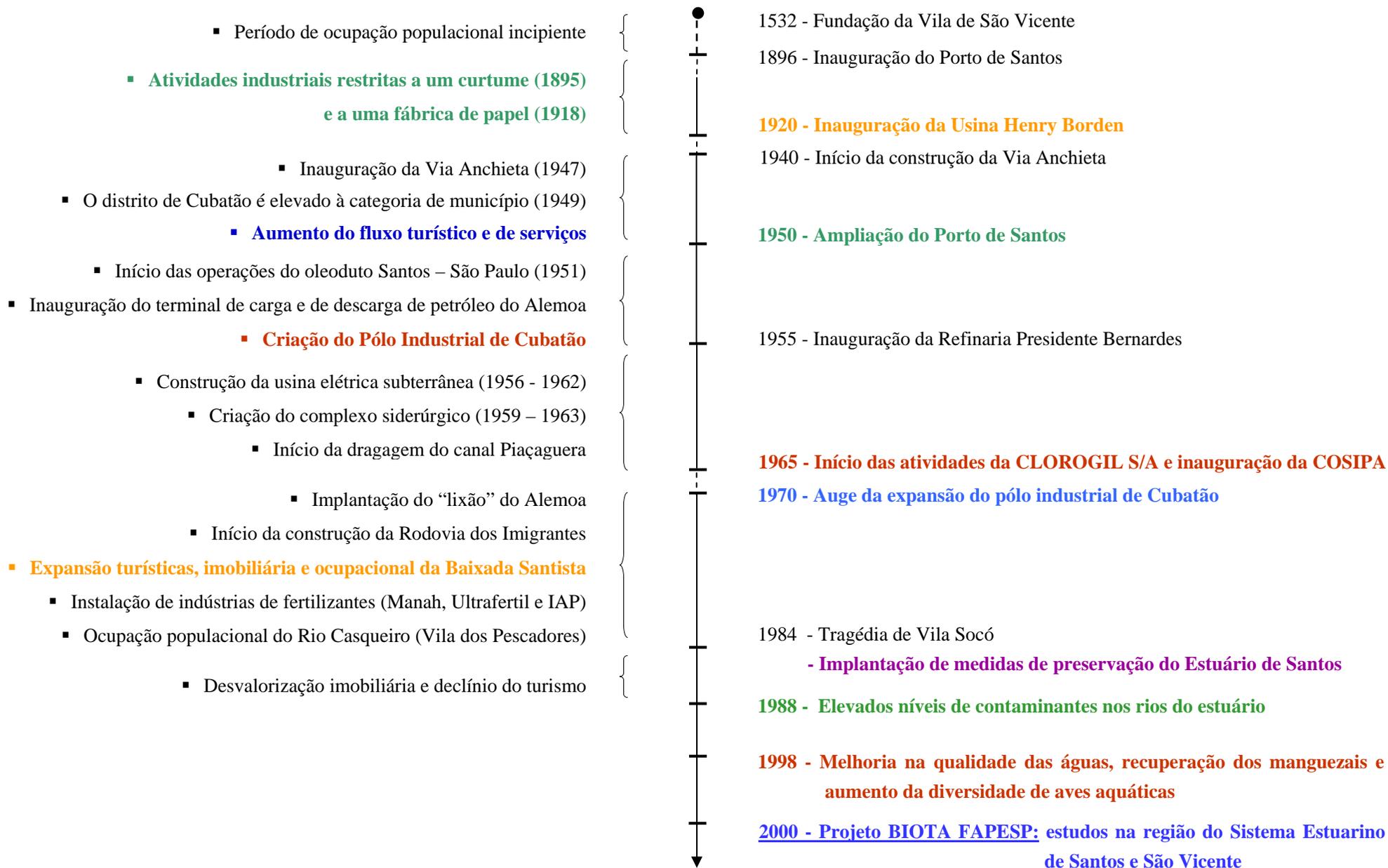


Figura 3. Descrição cronológica dos principais eventos ocorridos entre os anos de 1952 e 2000. Os fatos relacionados aos processos de urbanização e industrialização da Baixada Santista, da contaminação do seu sistema estuarino por compostos organoclorados e os esforços realizados para a recuperação desta área degradada relatados neste capítulo estão destacados em cores (Modificado de Martins, 2005).

3.3.1. A ocupação urbana e industrial da região estuarina da Baixada Santista

Em todo o mundo, importantes cidades se estabeleceram em regiões costeiras, próximas aos estuários, devido às condições favoráveis para os desenvolvimentos urbano, industrial e econômico; para a instalação de portos comerciais e navais; e para a realização de atividades relacionadas ao turismo e ao lazer. Segundo Quinones (2000), a privilegiada localização geográfica das regiões estuarinas também facilita o escoamento de matéria-prima e de produtos para os mercados interno e externo.

No Brasil, das 25 regiões metropolitanas, 14 se desenvolveram e prosperaram em localidades de estuário (Diegues, 1987). De acordo com Bérghamo (2000), algumas características naturais desses ambientes como a capacidade de renovação periódica das águas sob a influência da maré; a comunicação com regiões de manguezais; a beleza e a riqueza da fauna e da flora local; a utilização como abrigo e ancoradouro para as embarcações; a facilidade para a captação de água doce para o consumo humano e demais atividades antrópicas contribuíram diretamente para o estabelecimento e o crescimento de aglomerados urbanos e industriais.

A Região Metropolitana da Baixada Santista, localizada no Estado de São Paulo e que inclui os municípios de Santos, São Vicente e Cubatão, se destaca como um dos principais pólos econômicos do país. Abriga o grande parque industrial de Cubatão, composto principalmente por indústrias de base como siderúrgicas, petroquímicas e de fertilizantes; e o complexo portuário de Santos, o maior da América do Sul, responsável por mais de um terço de todo o comércio exterior do país (Bordo, 2005). Destaca-se ainda pela aptidão turística da região em razão das praias e da interessante história dessa localidade, pois São Vicente foi a primeira vila fundada no Brasil (Martins, 2005).

Apesar da importância estratégica que ocupa no litoral paulista, como uma das regiões macroeconômicas mais dinâmicas do mundo, a Baixada Santista também é conhecida pelos

problemas ambientais decorrentes dos processos de ocupação desordenada e das intensas atividades industriais e portuárias (Lima, 2005). Ao longo dos anos as águas e os sedimentos do sistema estuarino de Santos e São Vicente foram contaminados pela introdução direta e/ou indireta de várias categorias de compostos xenobióticos persistentes² ou recalcitrantes³, por efluentes domésticos e outras substâncias tóxicas provenientes das indústrias, do Porto de Santos e das cidades vizinhas (Miranda *et al.*, 2002), e pelos derramamentos de óleo decorrentes de acidentes com navios (CETESB, 2001). Estes impactos negativos afetaram diretamente a biota do ecossistema estuarino e ocasionaram muitos problemas de saúde pública, além de prejuízos para as atividades pesqueiras, de turismo e de lazer.

O primeiro empreendimento implantado na região do alto estuário foi o de um curtume, no ano de 1895. Porém, o processo de industrialização da Baixada Santista teve início mesmo com a instalação de uma fábrica de papel, em 1918, e com a construção da Usina Hidrelétrica Henry Borden em 1920. Em decorrência dessas atividades ocorreu a primeira alteração significativa na dinâmica do estuário, pois a fábrica captava água do rio Cubatão para alimentar a planta industrial e utilizava esse corpo d'água como receptor de seus rejeitos de processamento; e a usina liberava um volume significativo de água doce, no mesmo canal fluvial, alterando a salinidade e os processos de mistura, estratificação e circulação estuarina (Martins, 2005).

A partir da segunda metade do século XX, o processo de ocupação industrial se intensificou, principalmente, devido à ampliação e ligação do Porto de Santos com as importantes redes ferroviárias e rodoviárias existentes na época; e à instalação do primeiro

² Persistentes: compostos com meia-vida superior ao seu tempo de residência. Acumulam-se em função do uso e taxas de remoção, persistindo por longos períodos, mesmo após seu uso ter sido interrompido (Zagatto & Bertolotti, 2006).

³ Recalcitrantes: compostos com biodegradação próxima a zero e que não mostram evidência de mineralização significativa por microrganismos. Acumulam-se em função direta de seu uso e não atingem concentrações de equilíbrio (Zagatto & Bertolotti, 2006).

complexo industrial do país, no município de Cubatão (Martins, 2005). Esses fatores, aliados ao crescimento econômico e ao desenvolvimento da região, incrementaram os fluxos de migração de pessoas para fixar residência ou para realizar atividades relacionadas ao turismo e ao lazer. Com isso, também se iniciaram os problemas de disposição inadequada de efluentes e resíduos sólidos de origem antrópica no sistema estuarino da Baixada Santista.

3.3.2. Histórico da contaminação da Baixada Santista por organoclorados

Durante as décadas de 60 e 70, grandes indústrias como a Carbocloro, a Copebrás, a Cosipa e a Ultrafértil atraíram, para a Baixada Santista, várias empresas de pequeno e médio porte como a Clorogil/Rhodia, a Engeclor, a Liquid Química, a Petrocoque, entre outras.

A indústria química Clorogil S.A., criada em 1965 pela associação da própria Carbocloro com a *Progil Socyété Anonyme*, de origem francesa, se instalou em Cubatão com o intuito de aproveitar os subprodutos das grandes indústrias como matéria-prima e fornecer a estas insumos básicos de sua linha de produção. Essa nova empresa utilizava como matéria prima o cloro, o fenol e a soda cáustica para produzirem solventes e fungicidas como o pentaclorofenol (PCP) e o seu respectivo sal, o pentaclorofenato de sódio, conhecido como pó da China (Couto, 2003). Além desses, a empresa produzia também o diclorodifeniltricloroetano (DDT), o hexaclorociclohexano (HCH), o hexaclorobenzeno (HCB) e o hexaclorobutadieno (HCBd) (Couto, 2003). De acordo com este autor, até 1974 a Clorogil ainda era considerada uma indústria de pequeno porte, com produção entre 1.000 e 1.500 toneladas/ano. No entanto, ainda neste ano, com a inauguração da nova unidade de tetracloreto de carbono e percloroetileno a empresa passou a ser considerada de porte médio, com capacidade de produzir 60.000 toneladas/ano. Em 1976, a Rhodia que pertencia ao grupo francês *Rhône-Poulenc*, comprou a Progil e a partir de então a Clorogil passou a se chamar Rhodia S/A. Em 1978, a nova unidade fechou a fábrica de pentaclorofenato diante da pressão sindical e da sociedade, pois vários operários foram intoxicados por este composto e dois

faleceram por intoxicação aguda. Em 1993, a Rhodia S/A foi interditada pelo Ministério Público, em caráter preventivo, pela constatação de um depósito de 15.000 toneladas de resíduos quase puros dentro de um aterro instalado na área da própria fábrica, tornando o local impróprio para os trabalhadores. Com a privatização do Grupo *Rhône-Poulenc* pelo governo francês e uma ação civil movida contra a empresa pelo Ministério Público do Estado em conjunto com as Promotorias de Justiça do Meio Ambiente de Cubatão, São Vicente, Santos e Itanhaém a Rhodia declarou a desativação da unidade de Cubatão, em 2002.

A acusação contra a Rhodia era referente ao não cumprimento do passivo ambiental adquirido na compra da Clorogil, pois a empresa deveria se responsabilizar pela adequada deposição e tratamento dos resíduos organoclorados produzidos durante sua atividade. De acordo com Boligian & Nascimento (2001) a deposição dos resíduos foi realizada sem nenhum estudo ou planejamento, sendo apenas transportados para diversas áreas da Baixada Santista que na época não eram urbanizadas. O principal problema gerado foi a contaminação de uma extensa área por compostos clorados depositados inadequadamente em locais extremamente críticos como em margens e cabeceiras de rios, além de zonas de mangue.

Segundo Matheus (1998), no período de 1966 a 1988, aproximadamente 12 mil toneladas de dois tipos de resíduos tóxicos, gerados pela Clorogil e pela Rhodia, foram dispostos inadequadamente em vários locais da planície arenosa da Baixada Santista; ambos com elevadas concentrações principalmente de pentaclorofenol (PCP) e hexaclorobenzeno (HCB). Ainda segundo o autor, em 1988, por exigência da Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB) a Rhodia foi obrigada a construir um incinerador para queimar seus resíduos tóxicos e os solos que foram contaminados por organoclorados. Porém, até finalizar a instalação do incinerador foi preciso construir uma “Estação de Espera” no Bairro Quarentenário, situado na Planície do Samaritá, para armazenar cerca de 33 mil toneladas dos solos contaminados removidos de três áreas do Distrito de Samaritá, em São

Vicente. Nascimento (1999) realizou um estudo sobre a poluição dos solos por PCP e HCB neste bairro e verificou a existência de um fluxo de escoamento subsuperficial que juntamente com uma frente de lixiviação da matéria orgânica formaram a base de disseminação direta desses organoclorados pela região, tanto nas áreas limítrofes quanto nas opostas ao local de depósito. Geralmente os clorofenóis causam sérios impactos ambientais em localidades adjacentes às indústrias que exercem esta atividade, pois são detectados em solos e sedimentos marinhos por até centenas de metros de onde são fabricados ou estocados (Kahkonen *et al.*, 1998). Atualmente, o material depositado na “Estação de Espera” ainda aguarda a oportunidade de ser tratado adequadamente, uma vez que a incineração dos mesmos provocou a liberação de resíduos tóxicos para a atmosfera, levando à interdição do incinerador. De acordo com Baker & Hites (1999), subprodutos complexos formados a partir da combustão de clorofenóis durante a incineração, como as dioxinas e furanos que são altamente prejudiciais à saúde pública e ao ambiente, quando lançados na atmosfera podem ser transportados para locais bem distantes do seu ponto de origem.

Ainda em relação aos problemas ocasionados pelos organoclorados no Bairro Quarentenário, Boligian & Nascimento (2001) compilaram estudos que mostram que além do solo, a água, os animais marinhos e a população local foram contaminados. Vários moradores do bairro apresentaram sintomas característicos de exposição crônica ao HCB como porfiria cutânea com fotosensibilidade e hepatomegalia, atrofia na pele e dores de cabeça.

Durante muitos anos o lixão de Pilões, situado em Cubatão, também contribuiu para a contaminação da região, pois acondicionava inadequadamente os resíduos sólidos urbanos juntamente com os compostos clorados oriundos da Carbocloro, da Rhodia S/A e de outras fábricas de fertilizantes (CETESB, 2001). Apesar do lixão ter sido coberto com material inerte e desativado há quase 20 anos, os estudos realizados por Filho *et al.* (2003) revelaram que os catadores de lixo e suas famílias, que continuam residindo próximos a essa localidade, ainda

apresentam elevadas concentrações de praguicidas organoclorados no sangue, como o pentaclorofenol, o hexaclorobenzeno e o diclorodifeniltricloroetano. Tais compostos são responsáveis por enfermidades graves como o enfraquecimento do sistema imunológico, o câncer, os distúrbios do sistema nervoso central, entre outros problemas que podem levar o indivíduo à morte. De acordo com os pesquisadores, em Pilões, até os bebês com menos de 1 ano de idade estão contaminados por esses compostos e alertam sobre a necessidade urgente de medidas saneadoras do ponto de vista de saúde pública como a remoção dos resíduos perigosos ou, na sua inviabilidade, a remoção das pessoas do local de risco.

Outras empresas que contribuíram para a contaminação da região estuarina da Baixada Santista foram a Companhia Siderúrgica Paulista (COSIPA) e o Porto de Santos, devido à inadequação dos processos de descarga e de armazenamento de matérias-primas em seus portos. Além disso, a remoção dos sedimentos para desobstruir os canais de navegação também contribuiu diretamente para a propagação dos compostos tóxicos para outros locais anteriormente livres de contaminação (CETESB, 2001).

3.3.3. Esforços para a recuperação do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente

Diante da crítica situação de degradação ambiental na região da Baixada Santista, bem como da contaminação da água e do sedimento do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, a CETESB iniciou em 1984 um intensivo programa de controle da poluição do ar, das águas e do solo, no pólo industrial de Cubatão denominado “Recuperação da Qualidade Ambiental”. Uma das medidas tomadas foi a implantação de sistemas de tratamento de efluentes industriais em todas as fábricas da região, e como consequência houve uma acentuada redução da carga dos poluentes lançados nos corpos d’água (CETESB, 2001). Porém, os resultados do levantamento realizado em 1988, sobre a contaminação nos diversos rios que desembocam nos estuários de Santos e São Vicente, incluindo os rios Cubatão, Perequê, Mogi e Piaçaguera, mostraram que elevadas concentrações de compostos persistentes como os organoclorados e os

metais pesados, respectivamente, ainda estavam presentes na água, nos sedimentos e nos organismos aquáticos (CETESB, 1990).

Na década de 90, houve a continuidade e o aperfeiçoamento do programa de controle de poluição na região. Algumas indústrias passaram a utilizar sistemas de recirculação de seus efluentes líquidos e aumentaram a reutilização de suas águas servidas, além disso, sistemas de coleta e tratamento das águas subterrâneas foram implementados com o objetivo de recuperar os sedimentos contaminados por hidrocarbonetos e resíduos de organoclorados (Martins, 2005). Conseqüentemente, os primeiros sinais de recuperação nos sistemas estuarinos de Santos e São Vicente foram observados, como por exemplo, a melhora na qualidade das águas da região, a recuperação substancial dos manguezais e o aumento da diversidade das aves e organismos aquáticos (CETESB, 2001).

Em 1999, a CETESB realizou um novo levantamento da contaminação das águas, dos sedimentos e dos organismos aquáticos em 26 pontos de amostragem, incluindo o sistema estuarino de Santos e São Vicente e o mar adjacente onde estão situados o Porto de Santos e a COSIPA. Os resultados desse estudo revelaram que apesar da significativa diminuição dos lançamentos de contaminantes no sistema estuarino com redução de 93% e 97% dos compostos orgânicos e metais pesados, respectivamente (Monteiro Filho, 2002); as classes de substâncias tóxicas, persistentes e recalcitrantes como os pesticidas organoclorados, organoclorados aromáticos, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, os solventes aromáticos e halogenados, as dioxinas, os furanos e também os metais pesados foram detectados, em concentrações acima das permitidas pela legislação pertinente, na coluna da água e no sedimento desses sistemas. Neste levantamento, o composto orgânico clorado pentaclorofenol não foi encontrado nas amostras de sedimentos, porém esses resultados contrastam com os dados divulgados, pela mesma entidade no ano de 1990, onde os valores deste foram de até 35,4µg/kg de sedimento da Bacia do Rio Cubatão, indo de encontro às expectativas criadas em função do histórico da

contaminação da região pelo PCP (Nakayama, 2005).

No ano 2000, outros esforços somaram-se aos estudos realizados no Estuário de Santos-São Vicente a fim de compreender os processos de contaminação local, bem como elucidar o papel dos procariontes degradadores de compostos tóxicos. Nesse sentido, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), através do Programa Biota-Fapesp possibilitou a realização do projeto temático “Ecologia molecular e taxonomia polifásica de bactérias de interesse ambiental e agroindustrial” na região estuarina da Baixada Santista. Tal projeto permitiu a integração de diversas linhas de pesquisa para estudar a diversidade das comunidades microbianas autóctones envolvidas direta e/ou indiretamente na degradação aeróbia e anaeróbia de contaminantes clorados; e produziu trabalhos relevantes para o futuro desenvolvimento de estratégias de biorremediação do estuário em questão, tais: “Caracterização polifásica da biodiversidade de isolados degradadores de poluentes xenobióticos na Baixada Santista” (Rodrigues, 2002), “Distribuição e biodiversidade de consórcios microbianos degradadores de compostos xenobióticos na Baixada Santista” (Lopez, 2002), “Ecologia molecular microbiana associada a sedimentos do estuário de Santos-São Vicente (SP, Brasil) (Piza, 2004), “Degradação anaeróbia do pentaclorofenol (PCP), 2,3,4-triclorofenol (2,3,4-TCP) e 2,6-diclorofenol (2,6-DCP) por culturas enriquecidas a partir do sedimento contaminado do sistema estuarino Santos e São Vicente” (Nakayama, 2005), “Contribuição à exploração tecnológica dos estudos microbianos realizados no programa Biota FAPESP: avaliação do potencial da degradação anaeróbia do pentaclorofenol (PCP) em reator horizontal de leito fixo” (Saia, 2005) e “Influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo na degradação anaeróbia do pentaclorofenol e na diversidade microbiana natural dos sedimentos do Estuário de Santos-São Vicente, Estado de São Paulo” (Brucha, 2007).

3.4. Utilização e origem dos clorofenóis 2,6-diclorofenol e do pentaclorofenol

Os impactos ambientais causados pela poluição química global são motivos de grande preocupação em todo o mundo devido às conseqüências desastrosas para o meio ambiente e para a humanidade. De acordo com o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), Artigo 48, Decreto 88351/83, Resolução n.001/1986: “Impacto ambiental significa qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente, causada por qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas que, direta ou indiretamente, afetem: a saúde, a segurança e o bem estar da população; as atividades sociais e econômicas; a biota; as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente e as qualidades dos recursos ambientais”.

Nos últimos 200 anos o rápido crescimento da população mundial, e o conseqüente desenvolvimento das atividades industriais, agrícolas e domésticas; novos compostos orgânicos foram sintetizados e continuamente introduzidos em grandes quantidades na atmosfera, na água e no solo, provocando sérios desequilíbrios ecológicos e danos para a saúde pública (Higgins *et al.*, 1985; Mesquita, 2004). Segundo Dearden *et al.* (1994), dos 100.000 compostos químicos comercialmente disponíveis, cerca de 20.000 podem ser perigosos e apenas 2.500 são efetivamente classificados com fichas toxicológicas detalhadas e confiáveis. Em 1995, Young & Cerniglia também alertaram a respeito da precariedade de informações sobre os impactos que estes potenciais contaminantes podem causar à saúde humana e ao meio ambiente, por isso muitos países proibiram ou controlaram o uso de tais compostos, inclusive dos aromáticos halogenados como os organoclorados (Thao *et al.*, 1993; Del Grande *et al.*, 2003).

No grupo dos organoclorados destacam-se os clorofenóis, que são compostos orgânicos formados a partir do fenol (1-hidroxibenzeno) pela substituição dos hidrogênios do anel aromático por um ou mais átomos de cloro (Damianovic, 1997). Representam a maior classe de contaminantes antropogênicos liberada no ambiente por diversos processos industriais como,

por exemplo, na produção de inseticidas, herbicidas, fungicidas, plásticos, solventes, desengraxantes e conservantes de madeira (Huang *et al.*, 2000). Na Figura 4 estão apresentados os 19 isômeros de clorofenóis existentes, conforme a posição e o número de átomos de cloro na molécula (Carmo, 2000).

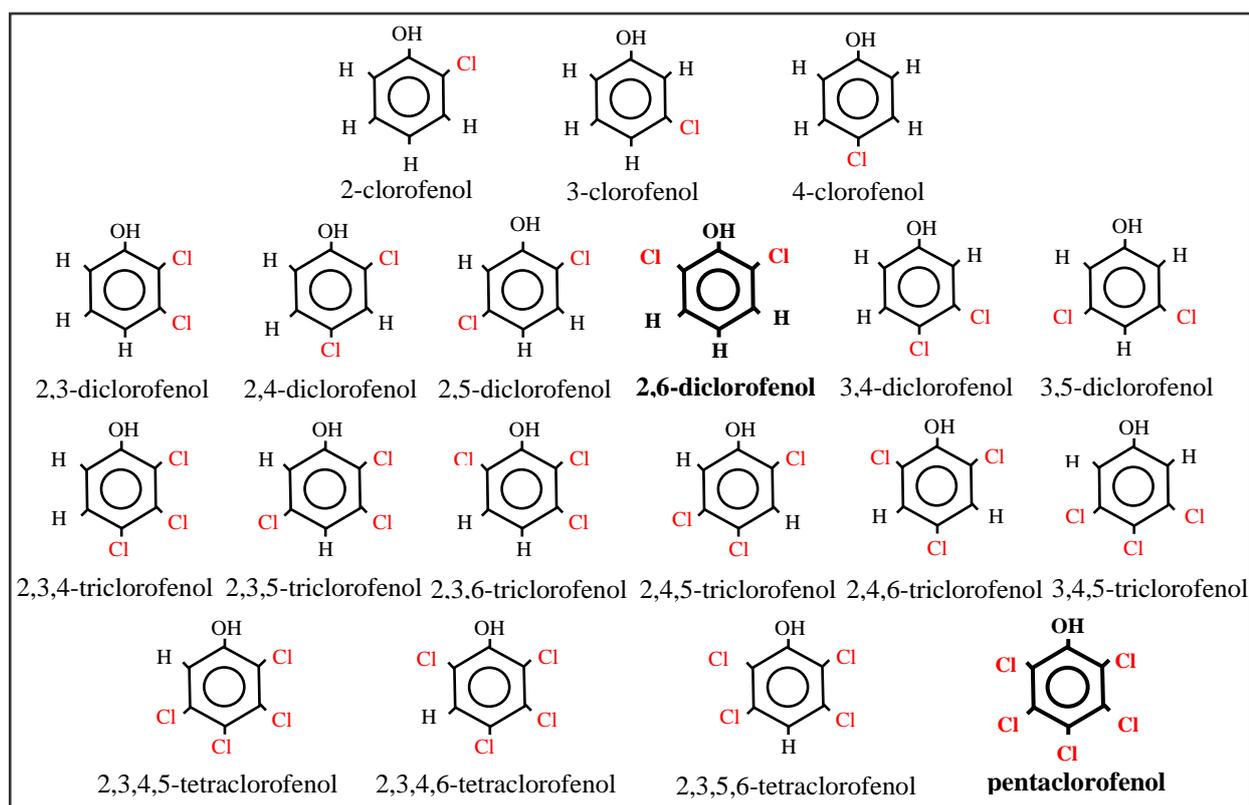


Figura 4. Os 19 isômeros de clorofenóis existentes. Em destaque o 2,6-diclorofenol (2,6-DCP) e o pentaclorofenol (PCP) que são objetos de estudo neste trabalho.

O 2,6-diclorofenol (2,6-DCP) é formado principalmente a partir de processos de desinfecção de água potável, que utilizam cloro ou hipoclorito de sódio, e de branqueamento de papel (Contrerasa *et al.*, 2003). Pode também ser produzido naturalmente por alguns microrganismos como bactérias e fungos, porém em quantidades não impactantes ao meio ambiente (World Health Organization, 1989).

O pentaclorofenol (PCP) pode ser obtido pela cloração direta do fenol, pela queima de madeiras tratadas, incineração de resíduos industriais, transformação do hexaclorobenzeno e do γ -hexaclorociclohexano (lindano), processos de cloração para os tratamentos de água e esgoto

e indústrias produtoras de papel e celulose (World Health Organization, 1989; Chaudhry & Chapalamadugu, 1991; Basu *et al.*, 1996). Em grande parte do mundo, inclusive no Brasil, o processo de produção da polpa de celulose é denominado *Kraft*, o qual apresenta um estágio de branqueamento que elimina a lignina restante, por meio do gás cloro e de reagentes clorados, gerando assim efluentes com elevadas concentrações de contaminantes ambientais como o PCP e o 2,6-DCP (Brasileiro *et al.*, 2001). Kahkonen *et al.* (1998) reportaram que, as atividades papelarias são grandes causadoras da contaminação ambiental na Finlândia, uma vez que os clorofenóis são freqüentemente detectados em sedimentos marinhos de regiões adjacentes a essas indústrias.

3.5. Problemas de saúde pública e ambiental causados pelo PCP e pelo 2,6-DCP

Neste item daremos ênfase ao pentaclorofenol em relação ao 2,6-diclorofenol, por se tratar de uma molécula com maior número de cloros e causar impactos em maiores proporções que seu congêneres. No entanto é importante ressaltar que os efeitos de ambos sobre a saúde humana e ao ambiente são semelhantes, porém em diferentes escalas.

O PCP tem recebido atenção especial ser extremamente tóxico, com características de longa persistência no meio ambiente e acumulação em solos, em sedimentos e na biota. Além disso, sua síntese também produz micropoluentes extremamente tóxicos para o homem e para os animais como as dibenzodioxinas e os dibenzofuranos (Yu *et al.*, 2006).

O PCP pode atuar como um potente inibidor da fosforilação oxidativa em diversos tipos de organismos (Escher *et al.*, 1996). Em humanos, os efeitos e os sintomas causados pelo PCP e seus subprodutos geralmente estão ligados aos sistemas nervoso central e periférico, digestivo, cardiovascular, renal e hematológico; ao aparelho locomotor; às lesões musculares e às manifestações cutâneas. Existem ainda evidências de causarem alterações nos órgãos reprodutivos masculinos e femininos, que podem causar a infertilidade. Além disso, estão associados a muitos casos de câncer, mutagenicidade e teratogenicidade. Em gestantes e

lactentes expostas ao PCP, o feto e o bebê correm grande risco de serem contaminados porque este clorofenol pode se acumular no sangue e na gordura do leite materno (Bologian & Nascimento, 2001).

Por ser dificilmente degradado em condições naturais, o PCP pode persistir no ambiente por anos ou décadas (Jones & Voogt, 1999), devido à estabilidade química da molécula e de algumas condições ambientais desfavoráveis a mineralização do mesmo (Bro-Rsamussen, 1996). É importante lembrar que a persistência de um composto no ambiente é definida como o tempo de residência deste em um compartimento especificamente definido como o solo, a água, o ar e a biota. Geralmente é expressa em termos de meia-vida, a qual significa o tempo necessário para que metade da quantidade inicial seja degradada ou transformada (Greenhalgh, 1980 *apud* Nakagawa, 2003)⁴.

A molécula do pentaclorofenol apresenta caráter lipofílico e baixa taxa de metabolização, por isso esse composto tende a se biomagnificar ao longo das cadeias alimentares. A absorção do PCP, por vertebrados e invertebrados, pode ocorrer pela membrana do trato intestinal, por brânquias ou pulmões e também pelo tegumento ou pele (Vidal, 1991). Depois de absorvido é distribuído para vários tecidos, principalmente para aqueles que apresentam alto teor de lipídeos em sua constituição, estabelecendo um fluxo entre estes tecidos e o sangue (Todoir & Sittert, 1994).

Apesar de o PCP ser utilizado desde 1930, principalmente como agente conservante de madeiras devido sua eficiência contra a maioria dos agentes xilófagos (Fetzner, 1998), este clorofenol está listado como um dos principais poluentes dos solos e dos sedimentos pela Agência de Proteção Ambiental Americana e da Comunidade Européia (Oubina *et al.*, 1997; Beaudet *et al.*, 1998; Montenegro, 2001). A utilização do PCP foi proibida em vários países desde a década de 70, no entanto a produção mundial do mesmo aumentou de 100.000

⁴ Greenhalgh, R. (1980). Definition of persistence in pesticide chemistry. *Pure Applied Chemistry*, vol. 52, 2563 -2566.

toneladas/ano em 1985 (World Health Organization, 1989) para 200.000 toneladas/ano em 1995 (Haggblom *et al.*, 1995). No Brasil, pela Resolução nº005 de 20 de novembro de 1985 do CONAMA, o PCP e o pentaclorofenato de sódio são classificados como compostos potencialmente poluidores e seu transporte, estocagem e uso dependem de licenciamento prévio por órgão estadual competente, integrante do Sistema Nacional do Meio Ambiente ou da Secretaria Especial do Meio Ambiente (Carmo, 2000).

3.6. Mecanismos de transporte do PCP e do 2,6-DCP em ambientes estuarinos

Após seu lançamento no ambiente, o PCP e o 2,6-DCP podem ser transportados por processos físicos e químicos para outros ecossistemas por solubilização, volatilização e adsorção-desadsorção.

A adsorção-desadsorção é o principal mecanismo de transporte do PCP e do 2,6-DCP em ambientes estuarinos (Park & Bielefeldt, 2003; Burton *et al.*, 2004). A adsorção pode ser definida pela ligação do contaminante em solução a uma matriz sólida e a desadsorção é o processo no qual a espécie adsorvida é novamente liberada para a fase líquida (Engwal, 1999). A dinâmica de dissipação desses clorofenóis, por este processo, em estuários é influenciada pelas características físicas, químicas e biológicas do sedimento como: distribuição do tamanho das partículas, qualidades e quantidades de matéria orgânica presente no meio, valores de pH, salinidade, temperatura, potencial redox, biomassa microbiana, além da estrutura, tamanho e difusão destes contaminantes na solução aquosa, entre outros (Yan *et al.*, 2006). Scheunert (1993 *apud* Nakagawa, 2003)⁵ e Benoit *et al.* (1996) relataram que tanto o PCP quanto o 2,6-DCP são facilmente adsorvidos a sedimentos finos como a areia, a argila e o silte, ricos em matéria orgânica.

⁵ Scheunert, I. (1993). Transport and transformation of pesticides in soil. *In*: Fate and prediction of environmental chemicals in soil, plants, and aquatic systems. Lewis Publishers, London, 1 – 22.

Cea *et al.* (2007) avaliaram em laboratório a adsorção do PCP e do 2,4-DCP em função de diferentes valores de pH (4.5, 6.0 e 7.5) e profundidades de solos (0-20cm, 20-40cm e 40-60cm), em tubos de policarbonato contendo solução de KCl (0.1M), a 25 °C. Os autores verificaram que a adsorção dos clorofenóis testados diminuiu com o aumento do pH indicando que as formas não dissociadas, que são mais tóxicas, foram adsorvidas às partículas de solo.

Moreschi (2000) citou que em condições favoráveis a salinidade de ambientes estuarinos e marinhos pode promover a dessorção do pentaclorofenol do sedimento, tornando-o novamente disponível para a coluna d'água. Isto ocorre porque apesar da molécula do PCP apresentar características hidrofóbicas, a mesma pode ser solubilizada pelo cloreto de sódio (NaCl) presente ambientes aquáticos salinos.

3.7. Degradação do PCP e do 2,6-DCP por consórcios microbianos anaeróbios

No ambiente o PCP e o 2,6-DCP podem ser transformados, acumulados e degradados por fotólise ou processos biológicos (Nakayama, 2005). No entanto, a degradação microbiana é a única via que pode levar à completa mineralização desses compostos a dióxido de carbono, metano e água e conseqüentemente à eliminação de ambos (Sponza & Ulukoy, 2005; Choi *et al.*, 2007). De acordo com Smidt (2000), as maiores eficiências de degradação são obtidas por consórcios em sistemas que apresentam diferentes espécies de microrganismos, devido a maior diversidade de enzimas e vias metabólicas capazes de realizar efetivamente a transformação e/ou degradação destes compostos tóxicos.

Diversos estudos têm demonstrado a importância de microrganismos aeróbios e anaeróbios na degradação do PCP e do 2,6-DCP (Haggblom *et al.*, 2000). Contudo, nos últimos 20 anos a biodegradação de compostos persistentes sob condições anaeróbias tem sido objeto de interesse por parte de muitos pesquisadores (Mohn & Tiedje, 1992; Sanford *et al.*, 1996). Estudos nessa área são de fundamental importância para a efetiva remoção de clorofenóis do ambiente, pois o conhecimento sobre os microrganismos envolvidos na

degradação anaeróbia e o tipo de aceptores e doadores de elétrons utilizados, fornecerão informações importantes que poderão auxiliar na aplicação segura da tecnologia de biorremediação em sítios contaminados.

Nakayama (2005) realizou estudos em amostras de sedimentos contaminados provenientes do sistema estuarino de Santos e São Vicente, para detectar e caracterizar os processos de degradação anaeróbia do PCP, do 2,3,4-TCP e do 2,6-DCP por consórcios microbianos, sob condições metanogênicas a 30°C. As amostras foram coletadas no terminal portuário da COSIPA, uma das localidades mais contaminadas da região estuarina; e no Largo de Canéus, considerado menos impactado ambientalmente. Para tanto, foram realizados ensaios prévios de enriquecimento das culturas degradadoras em microcosmos inoculados com o sedimento em meio mineral salino, suplementado inicialmente com os doadores de elétrons piruvato (20mM), formiato (2g/L), glicose (1g/L) e extrato de levedura (0,05%), além dos respectivos compostos clorados PCP (18,77µM), 2,3,4-TCP (21,6 µM) e 2,6-DCP (27,6 µM). Os resultados mostraram que as culturas provenientes do ponto de coleta da COSIPA degradaram com maior eficiência o PCP o 2,3,4-TCP e o 2,6-DCP, adicionados pelo período de 15 dias, que as culturas do Largo de Canéus. No entanto, o mesmo não foi observado a longo prazo, pois ocorreu a formação de metabólitos com taxas de degradação mais lentas que as dos compostos de interesse. O trabalho também revelou que o formiato foi o melhor doador de elétrons utilizado para a degradação do PCP, enquanto que o piruvato foi o substrato preferencial para a degradação do 2,3,4-TCP e do 2,6-DCP. Os resultados indicaram que o enriquecimento e a adição de doadores de elétrons contribuíram para o estabelecimento do processo de digestão anaeróbia por consórcios microbianos complexos na degradação dos clorofenóis, com conseqüente produção de metano.

Saia *et al.* (2007) estudaram sedimentos estuarinos previamente enriquecidos, coletados nos mesmos pontos de Nakayama (2005), para avaliar o potencial de aplicação biotecnológica

de microrganismos anaeróbios em áreas contaminadas com pentaclorofenol e congêneres menos clorados em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF), sob condições metanogênicas a 30°C. Os tempos de operação e detenção hidráulica foram de 126 dias e 18 horas, respectivamente, com meio de cultivo salino contendo glicose (1g/L) como principal aceptor de elétrons e o sal pentaclorofenato de sódio em concentrações de 5, 13, 15 e 21 mg/L. A degradação de PCP foi de 99% com detecção de intermediários menos clorados e produção de 20% de metano no biogás. Os resultados do trabalho mostraram que os consórcios microbianos autóctones, formados por arqueias e bactérias, foram capazes de degradar o PCP quando estimulados em ensaios de enriquecimento e sob as condições impostas.

Brucha (2007) também pesquisou a degradação do PCP em RAHLF, preenchido com espumas de poliuretano, inoculado com sedimentos previamente enriquecidos do estuário de Santos-São Vicente, em condições anaeróbias e mesofílicas (30°C). O tempo de detenção hidráulica foi o mesmo estipulado por Saia (2005) durante os 270 dias de operação do reator. Neste estudo, o autor testou 12 relações diferentes de nitrogênio (5 a 130mg N/L) e fósforo (1 a 45mg P/L) com o objetivo de otimizar o sistema RAHLF para a degradação do PCP, via metanogênese. Para tanto, foram utilizados como fontes dos macronutrientes o NH₄Cl (25,0g N/L) e o KH₂PO₄ (4,98 g P/L) e doadores de elétrons a glicose (500mg DQO/L) e o formiato (500mg DQO/L). As concentrações utilizadas de PCP foram 1,0 mg/L, 5,0mg/L e 12mg/L. Nessas condições, aproximadamente 93% do PCP foi degradado com conseqüente produção de metano e subprodutos menos clorados, como o 2,4,6-TCP e o 2,6-DCP. De acordo com o autor, o PCP e seus congêneres foram degradados por um complexo consórcio microbiano formado por diversas comunidades de arqueias e bactérias.

3.8. Vias de degradação de organoclorados sob condições anaeróbias

De acordo com El Fantroussi *et al.* (1998), os microrganismos anaeróbios são capazes de degradar organoclorados através das seguintes rotas metabólicas:

- co-metabolismo: conjunto de reações que resultam na modificação acidental do composto clorado por enzimas e cofatores normalmente envolvidos com outras reações;
- utilização de organoclorado como fonte de carbono e energia: rota normalmente utilizada por organismos que usam hidrocarbonetos clorados como substrato;
- desalogenação redutiva: utilização de compostos clorados como aceptores de elétrons. A energia para o crescimento dos microrganismos que recorrem a essa rota é gerada por reações exergônicas de desalogenação.

Em condições anaeróbias, compostos organoclorados podem ser mais facilmente degradados por microrganismos via desalogenação redutiva (Susarla *et al.*, 1998). Do ponto de vista ecotoxicológico isto é muito importante porque uma variedade de clorofenóis presentes em sedimentos estuarinos pode ser completamente degradada ou transformada em congêneres menos tóxicos para o ambiente.

A reação de desalogenação redutiva consiste na substituição do átomo de cloro por um de hidrogênio, resultando como subproduto um composto orgânico menos clorado (Figura 5). A probabilidade de ocorrência dessa reação é diretamente proporcional ao número de átomos de cloros na molécula. Assim, quanto maior o grau de cloração de um composto, mais oxidado ele se encontra, sendo mais suscetível à reação (Adriaens & Vogel, 1995).

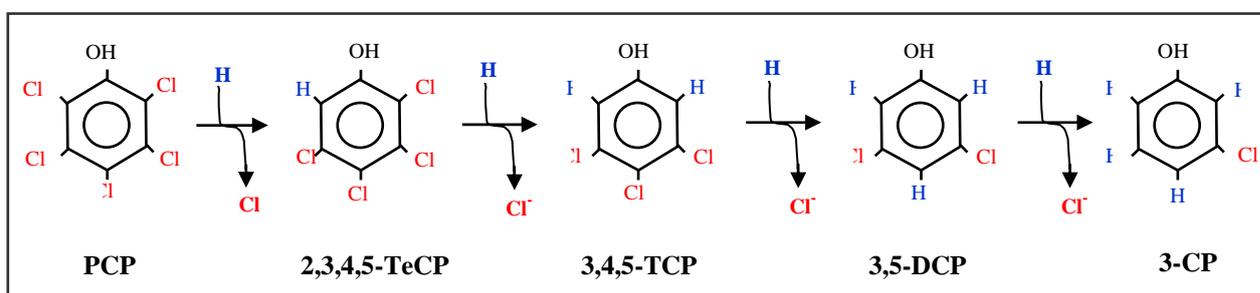


Figura 5. Modelo simplificado da substituição dos átomos de cloro pelos de hidrogênio na reação de desalogenação redutiva do PCP e os congêneres produzidos. Modificado de Madsen & Aamand, 1990).

A descloração inicial de clorofenóis via desalogenação redutiva podem ocorrer nas posições *orto*, *para* e *meta* (Wild *et al.*, 1993). Os congêneres formados pelo primeiro tipo de

substituição geralmente apresentam menor toxicidade porque o cloro substituído na posição *orto* parece proteger o grupo hidroxila (OH), o qual aparentemente interage com o sítio ativo de organismos aquáticos (Grinwood & Mascharenhas, 1997 *apud* Pêra-Titus *et al.*, 2004)⁶.

A maioria dos microrganismos anaeróbios desalogenadores de compostos organoclorados aromáticos pertence às subdivisões δ - e ϵ -Proteobacteria do Domínio *Bacteria* e apresentam baixo conteúdo de G+C (El Fantroussi *et al.*, 1998). O maior número espécies isoladas até o momento está relacionado ao gênero *Desulfitobacterium* sp. (Smidt, 2000). Segundo Fathepure *et al.* (1987), algumas espécies de arqueias metanogênicas do gênero *Methanosarcina* também são capazes de desalogenar compostos clorados.

Embora muitos esforços tenham sido feito na área, ainda são poucas as informações sobre a desalogenação redutiva de compostos clorados realizado por culturas puras. Algumas espécies anaeróbias isoladas e os respectivos aceptores e doadores de elétrons utilizados na reação de desalogenação estão apresentados na Tabela 1.

A desalogenação redutiva tem sido observada com frequência em consórcios de microrganismos anaeróbios, sob condições metanogênicas e sulfetogênicas, pois estes se sucedem na degradação das fontes orgânicas e dos substratos clorados, produzindo subprodutos que serão utilizados por outras espécies em uma relação de interdependência (Haggbloom, 1992; Field *et al.*, 1995; Nakayama, 2005). A eficiência de degradação de diversos tipos de compostos clorados por consórcios microbianos está estreitamente relacionada à grande diversidade de enzimas e co-fatores.

⁶ Grinwood, M.; Mascarenhas, R. (1997). Proposed environmental quality standards for 2-, 3- and 4-chlorophenol and 2,4-dichlorophenol in water. *Environment Agency Technical Report*, WRc Report n° EA4215.

Tabela 1. Aceptores e doadores de elétrons utilizados por microrganismos anaeróbios desalogenadores de diversos compostos clorados.

Microrganismos	Aceptores de elétrons	Doadores de elétrons	Referência
<i>Desulfomonile tiedjei</i>	pentacloroetileno, 3-clorobenzoato, pentaclorofenol	formiato, hidrogênio, piruvato	DeWeerd <i>et al.</i> (1991)
Isolado 2CP-1	2-clorofenol 2,6-diclorofenol	acetato	Cole <i>et al.</i> (1994)
Isolado JW/IU-DC1	3-cloro-4-hidroxifenilacetato, diclorofenóis (2,3-DCP, 2,4-DCP, 2,6-DCP), triclorofenóis (2,3,4-TCP, 2,3,6-TCP, 2,4,6-TCP), pentaclorofenol	piruvato, lactato, formiato, hidrogênio	Utkin <i>et al.</i> (1994) Utkin <i>et al.</i> (1995)
<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	3-Cl-4-OH-fenilacetato pentaclorofenol	piruvato, triptofano	Christiansen & Ahring (1996)
<i>Desulfitobacterium</i> spp. linhagem PCE-1	tetracloroeteno, 2-clorofenol, 3-cloro-4-hidroxifenilacetato, sulfito, tiosulfato, fumarato	L-lactato, piruvato, butirato, formiato, succinato, etanol	Gerritse <i>et al.</i> (1996) Gerritse <i>et al.</i> (1999)
<i>Desulfitobacterium frappieri</i> linhagem PCP-1	2,4,6-triclorofenol pentaclorofenol	piruvato, extrato de levedura	Bouchard <i>et al.</i> (1996)
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	bifenilos policlorados tetracloroeteno 2,4,6-triclorofenol	formiato, hidrogênio, piruvato	Wiegel <i>et al.</i> (1999)
<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	3-Cl-4-hidroxifenilacetato pentaclorofenol	piruvato, triptofano	Christiansen & Ahring (1996)
<i>Desulfitobacterium frappieri</i>	2,4,6-triclorofenol, Pentaclorofenol	piruvato	Bouchard <i>et al.</i> (1996) Smidt, 2000
<i>Sedimentibacter hydroxibenzoicum</i>	2,4-diclorofenol,	extrato de levedura	Zhang <i>et al.</i> (1994)
<i>Methanosarcina mazei</i>	Tetracloroetileno	metanol	Fathepure <i>et al.</i> (1987)
<i>Methanosarcina barkeri</i> M. <i>thermoautotrophicum</i>	Cloroetano	metanol e acetato	Hollinger <i>et al.</i> , 1990
<i>Methanosaeta soehngeni</i>	1,2-dicloroetano	metanol	Hollinger <i>et al.</i> , 1990

Larsen *et al.* (1991) estudaram a degradação do PCP via desalogenação redutiva em sedimentos enriquecidos de pântano e de lago de regiões frias (15°C), sob condições anaeróbias e termofílicas. A inoculação foi realizada em frascos de antibióticos (50mL) contendo meio mineral acrescido de extrato de levedura (0,1g/L) e solução de etanol (3,4mM) na qual o PCP foi dissolvido em concentração final de 37,5µM. Os frascos foram incubados sem agitação a 50°C, na ausência de luz, durante 8 meses. Os autores verificaram que as eficiências de remoção do PCP foram de 99,9% e 99,3% para os experimentos contendo sedimentos de pântano e de lago, respectivamente, e atribuíram esses valores à diversidade de microrganismos encontrados em inóculos oriundos de ambientes frios. Devido aos excelentes resultados obtidos, os frascos foram novamente alimentados, nas mesmas condições iniciais, e em 30 dias o clorofenol havia sido totalmente degradado em taxas de 7,5µmol/L/dia para o sedimento de lago (A) e de 8,0µmol/L/dia para o de pântano (B). Os autores explicam que isto ocorreu porque as culturas enriquecidas haviam sido expostas ao PCP anteriormente e, portanto estavam aclimatadas ao estresse proporcionado pelo contaminante. As vias de desalogenação e os congêneres formados durante o período foram distintos para as duas condições indicando que mais de um organismo esteve envolvido na descloração primária das duas vias (Figura 6 - A e B). O valor da taxa de descloração na via B foi maior que o encontrado na via A porque o 2,3,5,6-TeCP é degradado mais rapidamente que o 2,3,4,5-TeCP pelos microrganismos.

Masunaga *et al.* (1996) avaliaram durante 1 ano as vias de descloração de 13 clorofenóis realizadas por consórcios microbianos anaeróbios presentes em amostras de sedimentos estuarinos, com características sulfetogênicas, contaminados com xileno, tolueno, etilbenzeno, tri- e hexa-clorobenzenos. Os valores de cloreto de sódio, sulfato e nitrato na água intersticial do sedimento e na água do rio foram de 1,7%, 1,98x10³ mg/L, abaixo do limite de detecção e 1,5%, 1,84x10³ mg/L, 4 mg/L, respectivamente. O sedimento (pH 5,6) foi misturado à água do rio até atingir consistência pastosa para ser utilizado como inóculo.

Soluções estoques para todos os clorofenóis foram preparadas em metanol (2×10^{-3} mol/L). A inoculação foi realizada em câmara anaeróbia em frascos de vidro (16mm x 10mm) contendo 5mL de inóculo e 4×10^{-6} mol/L de cada composto testado, os quais foram posteriormente incubados a 25°C. Os resultados mostraram que houve consumo de sulfato durante a descloração dos diferentes clorofenóis, indicando a importância deste para o processo. Os autores verificaram ainda que todos os CPs, especialmente os mais clorados, foram desalogenados por mais de uma via, sendo mais rapidamente degradados quando desclorados na posição *orto*. Pelos dados obtidos foi concluído que a elevada capacidade de degradação dos diferentes CPs nas amostras de sedimento estuarino ocorreu devido a aclimação dos microrganismos aos diferentes tipos de contaminantes presentes no ambiente de origem.

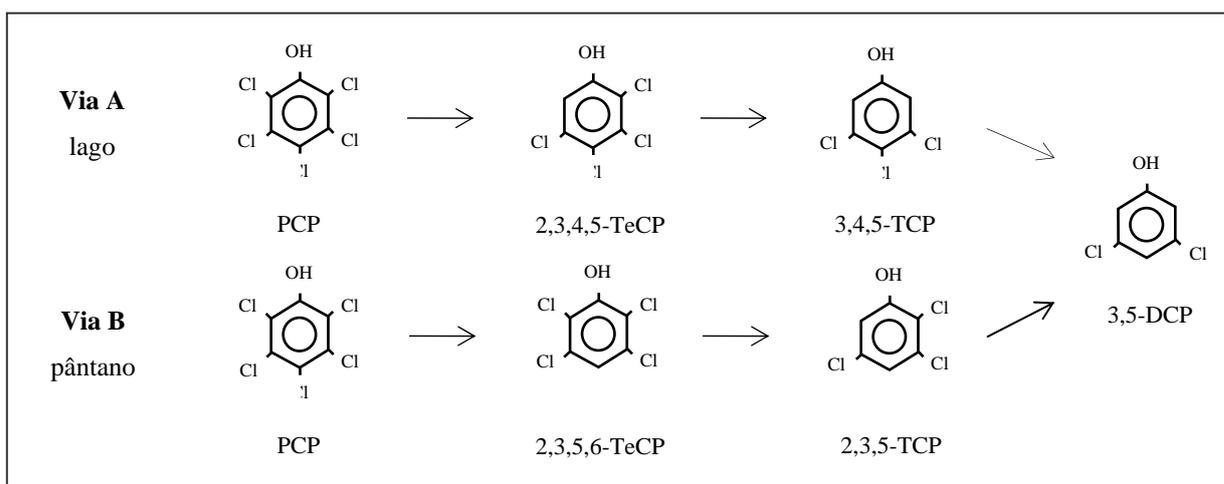


Figura 6. Vias de desalogenação do PCP. Via A: *orto* clivagem seguida de *orto* e *para* clivagens, com formação dos congêneres 2,3,4,5-TeCP, 3,4,5-TCP e 3,5-DCP, respectivamente. Via B: *para* clivagem seguida de duas *orto* clivagens, com formação dos congêneres 2,3,5,6-TeCP, 2,3,5-TCP e 3,5-DCP, respectivamente. (Larson, *et al.*, 1991).

Todos os clorofenóis analisados, os intermediários formados e as posições de descloração para em alguns produtos estão sumarizados na Tabela 2. Os picos obtidos por cromatografia dos compostos 3- e 4-MCP e 2,4- e 2,5-DCP não puderam ser separados.

Tabela 2. Compostos intermediários formados a partir da descloração de distintos clorofenóis.

Substrato		Intemediários
monoclorofenóis	2-MCP	não detectado
	3-MCP	não detectado
	4-MCP	não detectado
diclorofenóis	2,3-DCP	3-MCP <i>orto</i>
	2,4-DCP	4-MCP <i>orto</i> > 2-MCP <i>meta</i>
	2,5-DCP	3-MCP <i>orto</i> > 2-MCP <i>meta</i>
	2,6-DCP	2-MCP <i>orto</i>
	3,4-DCP	3- e 4-MCP <i>para e meta</i> , respectivamente
	3,5-DCP	3-MCP <i>meta</i>
triclorofenóis	2,3,4-TCP	3,4-DCP <i>orto</i> > 2,3-DCP <i>para</i> ; 3- e 4-MCP
	3,4,5-TCP	3,4-DCP <i>meta</i> > 3,5-DCP <i>para</i> ; 3- e 4-MCP
tetraclorofenol	2,3,4,5-TeCP	3,4,5-TCP <i>orto</i> = 2,4,5-TCP <i>meta</i> > 2,3,5-TCP <i>para</i> = 2,3,4-TCP <i>meta</i> 3,4-DCP > 3,5-DCP > 2,4- e 2,5-DCP = 3,5-DCP 3- e 4-MCP
pentaclorofenol	PCP	2,3,4,5-TeCP <i>orto</i> 2,4,5-TCP = 3,4,5-TCP > 2,3,5-TCP 3,4-DCP > 2,4- e 2,5-DCP = 3,5-DCP 3- e 4-MCP

Fonte: Masunaga *et al.* (1996).

Magar *et al.* (1999) avaliaram a via de descloração do pentaclorofenol e seus intermediários em um reator de leito fluidizado (RLF) inoculado com culturas anaeróbias degradadoras de PCP oriundas de lodo de um digestor que havia sido alimentado com esse composto durante 2 anos. O RLF (450mL) preenchido com cerâmica como meio suporte foi operado, por 18 meses a 35°C, com tempo de detenção hidráulica de 1 dia e alimentado continuamente com meio mineral reduzido tamponado com bicarbonato de sódio (2g/L) e suplementado com PCP (5mg/L) e lactato (400mg/L), esse último como doador de elétrons. Durante os 3° e 14° meses de operação, os autores observaram que o consórcio microbiano presente no reator havia transformado o PCP inicialmente na posição *meta* em 2,3,4,6-TeCP e 2,4,6-TCP, sendo este último desclorado sequencialmente em 2,4-DCP e 4-MCP. Os 20% restantes de 2,3,4,6-TeCP foram desclorados até 3,4-DCP na posição *orto*. Após este período,

foi verificada a *orto* descloração do PCP em 2,3,4,5-TeCP, o qual foi posteriormente degradado em 3,4-DCP a partir dos 2,4,5- e 3,4,5-TCPs (Figura 7).

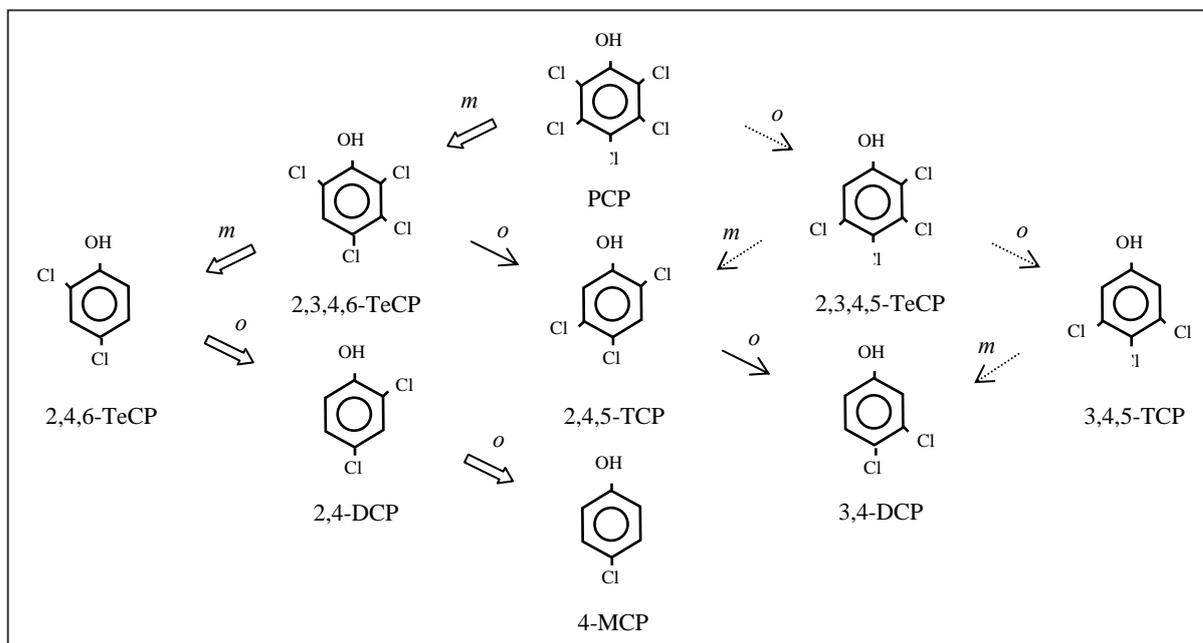


Figura 7. Degradação do PCP em 3,4-DCP e 4-MCP. As setas largas representam a via predominante da desalogenação redutiva durante o experimento. As setas simples cheias e tracejadas representam as vias de descloração do PCP durante e após 14 meses de operação, respectivamente (Magar *et al.*, 1999)

Takeuchi *et al.* (2000) investigaram todas as possíveis vias de transformação dos 19 isômeros de clorofenóis por consórcios microbianos de lodo anaeróbio metanogênico, nunca exposto aos contaminantes, a 25°C. O lodo utilizado no experimento foi proveniente de um reator anaeróbio alimentado em sistema de batelada com água residuária sintética contendo glicose (1,1 g/L), extrato de levedura (0,11g/L) e solução traço de metais. A inoculação, as condições de anaerobiose e as concentrações dos clorofenóis e metanol foram às mesmas descritas por Masunaga *et al.* (1996), exceto o período de incubação que foi de 8 meses. Neste estudo, a descloração inicial dos compostos mais clorados ocorreu preferencialmente na posição *orto* e apresentou as maiores taxas de transformação. Já os compostos desclorados na posição *para*, como o 3,4,5-TCP, 3,4-DCP e 4-CP, apresentaram valores até duas vezes menores que os observados para os demais. Todas as possíveis vias de transformação dos

clorofenóis estudados, bem como as posições em que ocorreram as desclorações estão apresentadas na Figura 8.

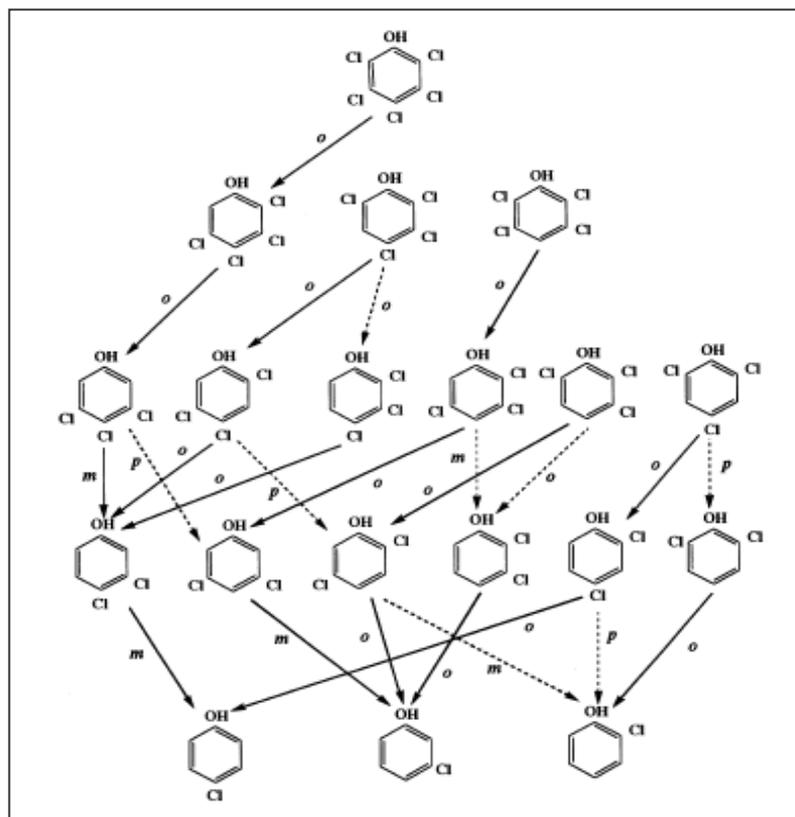


Figura 8. Possíveis vias de descloração dos 19 isômeros de clorofenóis por consórcios microbianos oriundos de lodo metanogênico nunca exposto a contaminantes. Linhas sólidas e linhas tracejadas: vias em que as porcentagens de ocorrência foram superiores a 60% e inferiores a 40%, respectivamente (Takeuchi *et al.*, 2000).

Os autores concluíram que os dados obtidos no trabalho utilizando comunidades microbianas não expostas previamente aos contaminantes resultaram em importantes informações sobre a transformação anaeróbia dos compostos. Principalmente porque foi possível fazer uma comparação com os resultados de Masunaga *et al.* (1996) que trabalharam com sedimento sulfetogênico contaminado. Foi observado que as taxas das constantes de transformação dos CPs (k) nos sedimento contaminado foi de $0,1 \times 10^{-3}$ a $0,327/\text{dia}$ e, portanto, 0,4 a 64 vezes superiores aos encontrados para o lodo metanogênico ($0,2 \times 10^{-3}$ - $0,161/\text{dia}$), indicando que a capacidade de descloração pela comunidade microbiana anaeróbia é maior em

ambientes contaminados. As vias desalogenação reductiva também foram menos diversas no lodo mostrando que a descloração na posição *orto* parece ser inerente em muitas comunidades anaeróbias de ambientes naturais e que as *meta* e *para* são desenvolvidas depois da exposição dos microrganismos a contaminantes.

Os trabalhos citados neste item não avaliaram a degradação dos monoclorofenóis e fenóis. No entanto, é importante ressaltar que estes também podem ser degradados por microrganismos anaeróbios. Hagblom & Young (1990) relataram que monoclorofenóis foram degradados em sedimentos marinhos via desalogenação reductiva e condições sulfetogênicas. O fenol pode ser transformado em ácido benzóico quando desalogenado na posição *meta*, por bactérias acetogênicas sintróficas, seguida de uma desidroxilação ou em ciclohexanol pela redução do anel benzênico (Silva, 2004).

Embora muitos trabalhos tenham contribuído para elucidar as vias de degradação anaeróbia de vários compostos clorados, muitas questões ainda precisam ser esclarecidas e entendidas como, por exemplo, quais os microrganismos, as enzimas e os co-fatores envolvidos no processo. Estas respostas poderão ser obtidas aliando-se os estudos bioquímicos aos de ecologia microbiana, com o auxílio das diversas técnicas moleculares existentes.

3.9. Ecologia Molecular Microbiana

Até o advento das técnicas moleculares, a avaliação da diversidade microbiana proveniente de amostras ambientais era realizada apenas por métodos tradicionais de isolamento seletivo e de cultivo para identificar as espécies ou os grupos funcionais, estimar a abundância relativa e determinar a estrutura da comunidade (Amman *et al.*, 1995). Por exemplo, a detecção e a identificação dos microrganismos eram baseadas somente nas suas necessidades nutricionais, nas fontes de carbono e energia específicas e nas condições de cultivo favoráveis ao seu crescimento, além da observação direta da morfologia em microscópio (Kennedy, 1999; Ritchie *et al.*, 2000). No entanto, mesmo sendo de suma

importância para o estudo dos microrganismos os métodos tradicionais fornecem dados insuficientes para analisar a diversidade microbiana em amostras ambientais, pois os resultados subestimam os valores reais encontrados na natureza. Isto ocorre devido à escassez de informações sobre a ecologia microbiana, como a dependência de outros microrganismos na cadeia alimentar e substratos específicos para a sobrevivência e crescimento, além de fatores como a frequência de ocorrência das populações e a sazonalidade (Torsvik & Ovreas, 2002).

Nos últimos 15 anos, importantes avanços na área da biologia molecular possibilitaram analisar as comunidades microbianas, empregando-se métodos moleculares independentes de cultivo, permitindo um considerável avanço no estudo da sistemática e da ecologia microbiana (O'Donnel & Gores, 1999; Leckie, 2005). Tais métodos utilizam estratégias para analisar regiões específicas de DNA e/ou RNA extraídos diretamente de amostras ambientais, não requerendo ensaios preliminares de cultivo e isolamento dos microrganismos (Ranjard *et al.*, 2000). As análises de ácidos nucléicos fornecem dados que permitem estimar as diversidades taxonômica, genética e funcional, além de gerar informações a respeito da composição da comunidade, das relações filogenéticas e do estado metabólico dos microrganismos presentes nas amostras (Pizza, 2004).

Para muitos pesquisadores, esses métodos possibilitaram explorar a “caixa preta” da diversidade microbiana existente em solos e sedimentos (Tiedje *et al.*, 1999), pois detectaram um grande número de espécies ainda pouco conhecidas e/ou de difícil cultivo em laboratório (Muyzer *et al.*, 1999), bem como contribuíram para a investigação e descoberta de inúmeras espécies ainda não identificadas pelos métodos tradicionais. De acordo com Amann *et al.* (1995), menos de 1% dos microrganismos encontrados em ambientes aquáticos, sedimentos e solos são recuperados em cultivos já desenvolvidos. Isto significa que, até o presente momento, apenas 0,1% a 10% das espécies existentes foram descobertas e identificadas, dependendo do habitat estudado (Rosseló-Mora & Amman, 2001). Dessa forma, as técnicas moleculares

contribuem para a construção do conhecimento sobre a estrutura e a funcionalidade da comunidade microbiana propiciando importantes informações sobre um número muito maior de espécies, a distribuição geográfica, as relações ecológicas, a atividade celular e a proporção numérica entre diferentes populações microbianas em seus ambientes naturais. Essas informações são de grande utilidade para o desenvolvimento de estratégias de isolamento e cultivo de novos organismos em laboratório, permitindo assim a realização de estudos mais aprofundados sobre a morfologia, a fisiologia e a bioquímica dessas células e contribuindo para o aumento do conhecimento sobre os ciclos naturais ou processos desenvolvidos pelo homem (Nakayama, 2005).

Os métodos moleculares são importantes ferramentas para estudar a estrutura e a diversidade microbiana em amostras ambientais a partir da análise de fragmentos específicos de RNAr 16S ou de genes cromossomais que os codificam, notadamente o DNAr 16S. Segundo Amman & Ludwig (2000), tais seqüências são consideradas como importantes marcadores moleculares por que:

- a. estão presentes em todos os organismos, pois são essenciais para a síntese de proteínas;
- b. são conservadas estrutural e funcionalmente;
- c. apresentam tanto regiões conservadas como variáveis e altamente variáveis, nas estruturas primária e secundárias;
- d. apresentam aparente ausência de transferência gênica horizontal;
- e. têm tamanho satisfatório, com cerca de 1500 nucleotídeos, suficientes para fazer inferências filogenéticas.

Importantes informações sobre a ecologia dos microrganismos provenientes de ambientes naturais podem ser obtidas utilizando diferentes estratégias para analisar a estrutura da comunidade microbiana (Leckie, 2005). Por exemplo, as técnicas de “impressão digital” baseadas no princípio da separação de fragmentos de DNA por eletroforese como a

Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE), a Eletroforese em Gel de Gradiente de Temperatura (TGGE), a Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA), o Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos com Restrição Terminal (T-RFLP), o DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD), a Análise Intergênica de Espaçadores Ribossomais (RISA) são importantes ferramentas moleculares utilizadas em estudos de microbiologia ambiental (Muysen, 1998; Kozdrój & van Elsas, 2001).

Outra estratégia bastante utilizada, no campo da ecologia microbiana, tem sido a construção de bibliotecas genômicas (Kozdrój & van Elsas, 2001). Tal estratégia permite que seqüências específicas do RNAr 16S sejam obtidas e possam ser analisadas com o auxílio programas computacionais, possibilitando assim a identificação de microrganismos presentes em amostras ambientais (Sanz & Köchling, 2007). Atualmente existem bancos de dados que podem ser consultados livremente, os quais permitem a realização de análises e comparações entre as seqüências de DNAr 16S obtidas e as já publicadas como o *Ribosomal Database Project* (RPD), o *GenBank*, o *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) e o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Araneda, 2004).

Desde o início dos anos 90 as bibliotecas genômicas têm sido empregadas extensivamente, e com sucesso, em análises de amostras ambientais. Prova disso é que metade das 240.000 seqüências depositadas no banco de dados do NCBI, até abril de 2006, pertence ao grupo de organismos não conhecidos ou não cultiváveis, ou seja, que foram detectados a partir de clones de fragmentos de DNAr 16S em bibliotecas genômicas (Ward *et al.*, 1990). Contudo, Sanz & Köchling (2007) ressaltam que a construção de tais bibliotecas requer muito tempo para ser realizada, principalmente quando se monitora várias amostras para avaliar as mudanças nas comunidades microbianas em processos de tratamento em reatores. E que apesar de ser aplicada com freqüência em estudos de ambientes naturais este método ainda é pouco utilizado em departamentos de engenharia, pois sua execução necessita de mão-de-obra e

equipamentos especializados. Apesar da consideração feita pelos autores é importante salientar que no Brasil existem laboratórios e profissionais qualificados que trabalham diretamente com este método. Um exemplo é o Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos (LPB/SHS/ESSC/USP) que tem realizado importantes trabalhos de identificação de microrganismos, envolvidos em processos de tratamento de compostos tóxicos em reatores e ambientes contaminados, a partir da análise de fragmentos específicos de DNA obtidos em bibliotecas genômicas. Esta realidade tornou-se possível graças ao trabalho conjunto dos biólogos atuantes na área de Engenharia com profissionais qualificados na área de biologia molecular do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IFSC/USP).

Atualmente, a utilização de métodos moleculares independentes de cultivo tem sido de fundamental importância para auxiliar na compreensão da degradação de contaminantes por microrganismos, facilitando assim o desenvolvimento de novas estratégias de remediação de áreas degradadas. A seguir serão apresentados com detalhes os métodos de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) e a construção de bibliotecas genômicas, os quais têm sido bastante utilizados em estudos sobre a ecologia microbiana de ambientes contaminados com compostos xenobióticos, como os clorofenóis.

3.9.1. Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

A eletroforese em gel de gradiente desnaturante é uma das técnicas moleculares mais utilizadas e adequadas para avaliar as comunidades microbianas na área ambiental (Teske *et al.*, 1996; Boon *et al.*, 2000), alimentícia (Ampe *et al.*, 2001) e médica (Walter *et al.*, 2001; Donskey *et al.*, 2003), pois é confiável, reprodutível, rápida e de custo relativamente baixo. Além disso, permite analisar várias amostras ao mesmo tempo, inclusive de microrganismos não cultiváveis em laboratório (Muyser *et al.*, 1993).

Ao longo da última década, esta técnica vem sendo empregada para estimar a diversidade microbiana, comparar a composição, a estrutura e a dinâmica de comunidades complexas em diferentes ambientes, tais como sistemas aquáticos, solo, sedimento e biorreatores (Muyser *et al.*, 1993; Teske *et al.*, 1996; Leckie, 2005). Propicia também testar a pureza de linhagens microbianas, monitorar o isolamento de microrganismos provenientes de amostras ambientais, estudar a dinâmica das populações de acordo com as variações espaço-temporais de sucessões ecológicas, das alterações no ambiente ou das condições operacionais de um sistema (Sanz, 2002).

A DGGE exige a realização de algumas etapas preliminares como a extração do DNA total da comunidade presente na amostra e a amplificação de uma pequena região do gene RNAr 16S pela reação em cadeia da polimerase (PCR), com *primers* específicos com *GC clamp* ancorado a extremidade 5' da seqüência senso (Figura 9).

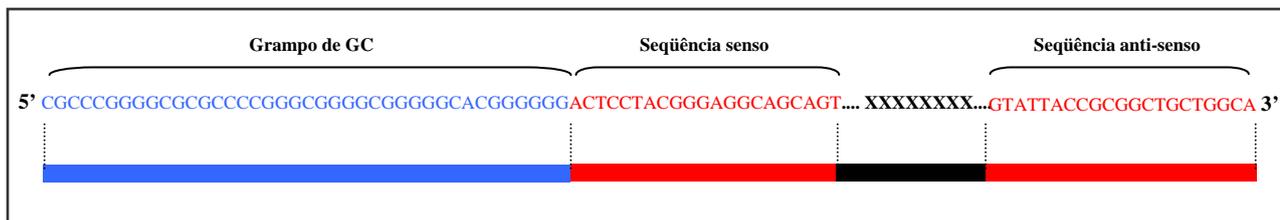


Figura 9. Esquema do grampo de GC ancorado na extremidade 5' da seqüência senso do iniciador. A região destacada em preto é a seqüência do fragmento amplificado.

O princípio desta técnica consiste na separação dos fragmentos de DNAr 16S de mesmo tamanho, porém com diferentes seqüências de nucleotídeos, em gel de poliacrilamida com gradiente linear de uréia e formamida (Muyser *et al.*, 1993). O comportamento de migração dos fragmentos de DNA no gel é governado pelas variações nas composições dos nucleotídeos (conteúdo de G+C), como também pelas interações destes dentro da molécula (Sugimoto *et al.*, 1996; Muyser *et al.*, 1999), resultando no posicionamento de bandas em diferentes pontos da matriz de poliacrilamida (Leckie, 2005). Esta técnica permite detectar até 95% das diferenças de única base em seqüências de tamanho com até 500 pares de bases

(Valleys *et al.*, 1997). A representação esquemática da técnica de DGGE pode ser observada na Figura 10.

Possíveis problemas na extração e na amplificação do DNA, bem como a manipulação inadequada da amostra podem interferir diretamente nos resultados das análises feitas por DGGE. Além disso, esta técnica também apresenta algumas limitações tais como analisar genes ricos em G+C, pela dificuldade em separar as bandas no gel; o baixo poder de detecção, apenas 1% a 2% das espécies dominantes; sobreposição de bandas, pois diferentes fragmentos de DNA com o mesmo número de nucleotídeos (A, T, C e G) apresentam o mesmo domínio de dissociação (Amann *et al.*, 1995). Teoricamente, cada banda obtida representa uma população microbiana (Ferris *et al.*, 1996), porém já foram observadas duas ou mais bandas representando a mesma população, isso pode ter ocorrido devido a heterogeneidade de seqüências de operons RNAr (Leckie, 2005). A técnica é qualitativa e separa apenas fragmentos amplificados com tamanhos entre 100pb e 500pb. Apesar dessas limitações, a técnica de DGGE tem sido aplicada cada vez mais em estudos para estudar a biodiversidade genética em amostras ambientais e cultivadas em laboratório. Além disso, quando associado à técnica de seqüenciamento e análise filogenética, o DGGE fornece importantes informações sobre a composição de comunidades microbianas (Muyser *et al.*, 1996, Leckie, 2005).

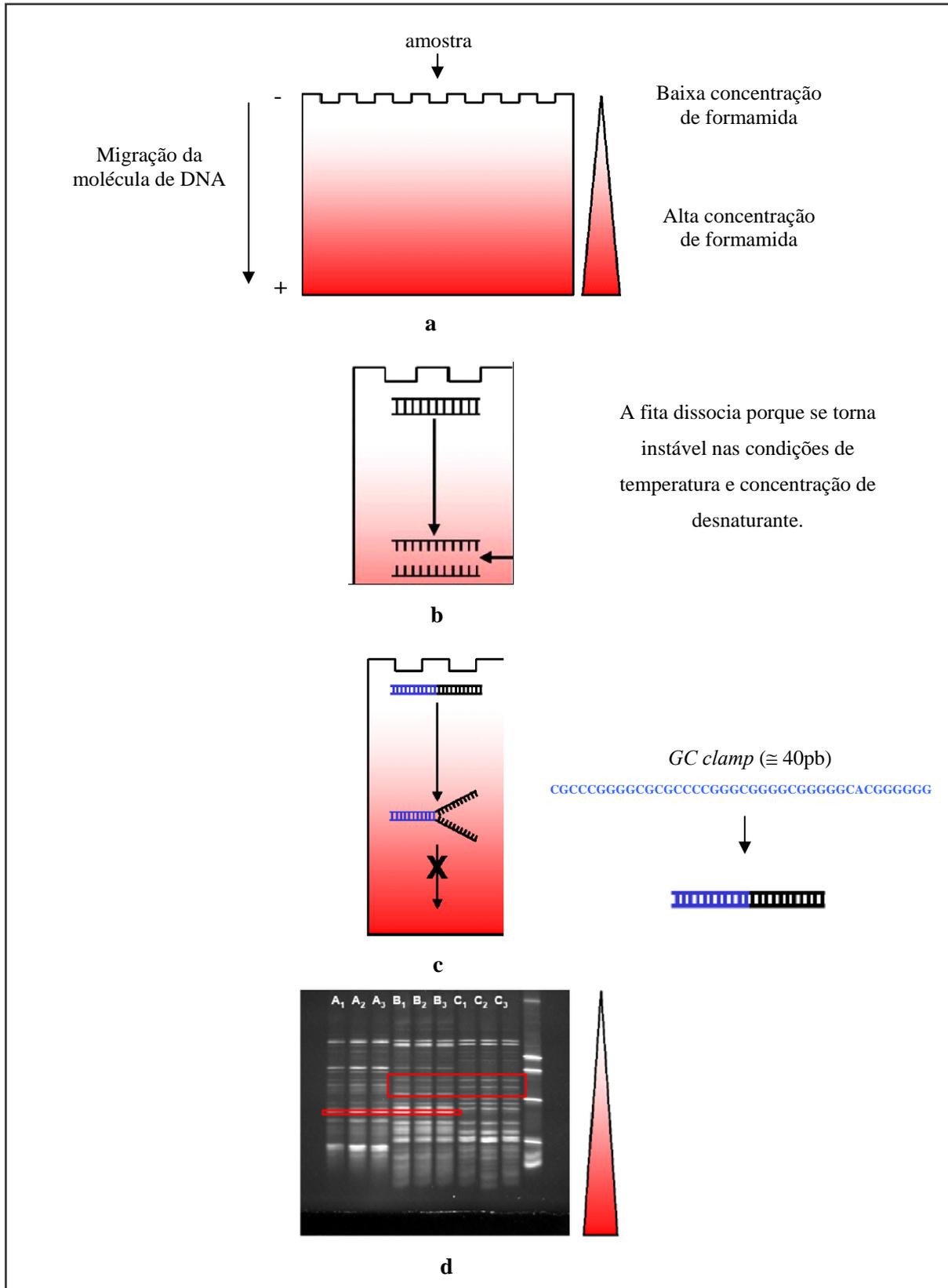


Figura 10. Representação esquemática da técnica de DGGE. (a) gradiente linear de desnaturação, (b) dissociação e migração do fragmento de DNA na matriz de poliacrilamida, (c) término da migração e dissociação devido ao *GC clamp* ancorado a extremidade 5' da seqüência senso do *primer* e (d) “impressão digital” da comunidade microbiana. Adaptado da disciplina de Microbiologia Molecular Ambiental (Profa. Dra. Marli Fiore – ESALQ).

Toffin *et al.* (2004) utilizaram a técnica de DGGE seguida de seqüenciamento para estudar a dinâmica e a composição das populações bacterianas anaeróbias provenientes de sedimentos profundos do Oceano Pacífico. Os estudos foram realizados sob distintas condições de enriquecimento, pois o sedimento natural apresentou pouca quantidade de biomassa e baixa concentração de carbono orgânico (0,6 a 0,8% do peso seco). A primeira condição utilizou meio mineral seletivo específico para o crescimento de grupos microbianos acetogênicos, metanogênicos e redutores de sulfato, com diferentes porcentagens de sedimento 1%, 0,1%, 0,01% e 0,001% (v/v). A segunda utilizou meio de cultivo salino não-seletivo, 1% (v/v) de inóculo e concentrações de carbono orgânico variando de 0,1 a 1000mgC/L. E a terceira, nas mesmas condições que utilizaram meio de cultivo não seletivo, porém com a adição de ácido casamínico. Ambos os experimentos foram inoculados sob condições anaeróbias e incubados a 25°C, na ausência de luz. As análises de DGGE revelaram mudanças na composição das comunidades nas amostras inoculadas com diferentes quantidades de sedimento, apesar da baixa diversidade de microrganismos. Nos enriquecimentos, cujos volumes de sedimento foram variáveis, foi observada a presença de bandas representativas do gênero *Acetobacterium*, indicando a dominância desse microrganismo em todas as diluições (1% a 0,001%). Nas condições em que o inóculo foi diluído entre 0,1% e 0,001% verificou-se a presença do gênero *Spirochaeta* enquanto que nas amostras menos diluídas (1% e 0,1%) apareceram bandas correspondentes ao gênero *Carnobacterium*. Além disso, os resultados indicaram que os microrganismos identificados em condições similares de enriquecimento estavam presentes em números relativamente semelhantes. Os ensaios com diferentes concentrações de carbono orgânico apresentaram maior diversidade, devido ao meio não ser seletivo, com predomínio do gênero *Spirochaeta*. *Desulfofrigus* e *Bacillus* foram observados nas concentrações de 1mgC/L e 10mgC/L, respectivamente. Espécies dos gêneros *Clostridium* e *Pseudomonas* foram observadas nos ensaios com ácido casamínico.

Nakayama (2005) analisou a estrutura das comunidades anaeróbias envolvidas direta e/ou indiretamente na degradação dos clorofenóis PCP, 2,3,4-TCP e 2,6-DCP, em sedimentos estuarinos, por meio de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE). Os resultados mostraram diferenças significativas nos padrões de bandas obtidos para os Domínios *Archaea* e *Bacteria*, dependendo do tipo de clorofenol testado e das condições experimentais. Além disso, foi constatado que a re-alimentação dos frascos com os respectivos compostos clorados afetou diretamente o grupo das bactérias, indicando a sensibilidade destas às alterações no meio de cultivo, uma vez que as mesmas foram associadas às primeiras etapas da digestão anaeróbia. O mesmo não foi verificado para as arqueias, que utilizaram os produtos menos tóxicos provenientes da degradação bacteriana dos compostos como substratos para a obtenção de energia e, portanto foram menos afetadas. Essas análises permitiram inferir que nas complexas comunidades microbianas estudadas, as bactérias estavam associadas à degradação dos clorofenóis enquanto as arqueias ao consumo dos ácidos orgânicos resultantes da digestão anaeróbia.

Saia (2005) empregou a técnica de DGGE para estudar a variação da estrutura da comunidade dos grupos microbianos pertencentes aos Domínios *Archaea* e *Bacteria* durante a operação do RAHLF inoculado com sedimento estuarino e diferentes concentrações de PCP. As análises foram realizadas em determinados pontos ao longo do reator (0, 5, 13, 15 e 21mg/L). Os resultados mostraram que não houve alteração significativa na estrutura das comunidades de arqueias nos pontos amostrados, indicando que a dinâmica dessas populações não variou em função das diferentes concentrações de PCP aplicadas, pelos mesmos motivos sugeridos por Nakayama (2005). Na ausência do clorofenol, também não houve variação na estrutura da comunidade, porém o padrão de bandas encontrado revelou maior diversidade populacional, isso pode ter ocorrido porque os microrganismos não foram expostos ao composto tóxico e o processo de digestão anaeróbia levou os componentes presentes no meio de cultivo à completa

mineralização. Para o Domínio *Bacteria*, foram notadas alterações na estabilidade das comunidades principalmente no trecho correspondente à entrada do reator, onde a concentração do PCP era maior devido ao sistema de alimentação. A adição progressiva do clorofenol resultou no desaparecimento de algumas populações e no surgimento de outras duas novas. Estas últimas provavelmente relacionadas à degradação do PCP pela reação de desalogenação redutiva. A maior diversidade de bactérias foi encontrada nos trechos finais do reator devido à produção de intermediários menos clorados oriundos da degradação do PCP. Na ausência do clorofenol, os resultados foram semelhantes aos observados para as arqueias.

Brucha (2007) também estudou a estrutura das comunidades de arqueias e bactérias em amostras de sedimentos, da mesma região estuarina, em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) enriquecido com fontes orgânicas e PCP. Pelos resultados obtidos na DGGE, o autor pôde verificar que a composição e a riqueza das comunidades bacterianas mudavam de acordo com as diferentes concentrações de PCP (5mg/L, 10mg/L e 12mg/L) aplicadas ao sistema. O mesmo não foi observado nas comunidades de arqueias, as quais não apresentaram alterações significativas em suas estruturas durante toda a operação do reator, exceto quando a concentração de PCP foi superior a 10mg/L e houve o acúmulo do 2,4,6-TCP no meio. Estas informações, aliadas aos resultados obtidos sobre a degradação do PCP, permitiram o autor inferir que algumas populações bacterianas estiveram envolvidas diretamente na degradação deste clorofenol e seus congêneres, enquanto que as populações de arqueias foram as responsáveis pela utilização de ácidos orgânicos, diminuindo a concentração destes últimos no sistema, favorecendo assim, o processo de digestão anaeróbia no reator.

Yoshida *et al.* (2007) caracterizaram as estruturas das comunidades microbianas anaeróbias associadas à degradação do PCP em amostras enriquecidas e naturais de solo de um arrozal, nunca exposto a este contaminante, pela técnica de DGGE. Antes de iniciar os testes de degradação, o teor de umidade do solo foi ajustado de 35% para 65%, em seguida essa

“pasta” foi acondicionada em sacos plásticos a 22°C, durante algumas semanas. Inicialmente, o solo (10g) foi incubado em um frasco de vidro (60mL) contendo água destilada (10mL), resazurina (1mg/L), soluções de lactato de sódio (20mM) e PCP (50µM), durante 10 dias a 30°C. Após esse período, 500µL dessa mistura foram transferidos para um novo frasco nas mesmas condições descritas anteriormente, porém em volume final de 20mL e com 2,4g de solo. A partir desse frasco, foram realizados 20 sub-cultivos mantendo-se as mesmas condições, inclusive o mesmo volume transferido (5%). Os resultados indicaram que a via de degradação ocorreu na seguinte ordem: PCP, 2,3,4,5-TeCP, 3,4,5-TCP, 3,5-DCP, 3-CP e fenol. As análises de DGGE indicaram que houve uma drástica alteração nas estruturas das comunidades durante os primeiros 31 dias de incubação (5 sub-cultivos), pois houve uma diminuição do número de populações de arqueias e bactérias, em relação à amostra de solo natural. Esse resultado mostrou que, neste período, o PCP inibiu o crescimento de algumas populações e favoreceu apenas aquelas envolvidas na degradação inicial do composto, bem como as resistentes a ele. Isso foi confirmado nos 60 dias subsequentes (15 sub-cultivos), nos quais foi observada relativa estabilidade nas estruturas das comunidades e um pequeno aumento das populações em ambos os grupos, pois o PCP havia sido totalmente consumido e transformado em compostos menos tóxicos. Os autores também realizaram o seqüenciamento de algumas bandas obtidas a partir do gel de DGGE e verificaram que a população de arqueia predominante no experimento estava relacionada a uma linhagem não-cultivável obtida de sedimento marinho, enquanto três populações de bactérias foram associadas a espécies do gênero *Clostridium*, capazes de fermentar o lactato, açúcares e alguns compostos clorados.

3.9.2. Construção de Bibliotecas Genômicas

Na década de 70 a biologia experimental foi revolucionada pelo desenvolvimento de uma metodologia completamente nova: a clonagem de fragmentos de ácidos nucléicos. Este grande feito viabilizou o planejamento e a realização de experimentos previamente

impossíveis, como por exemplo, a construção de bibliotecas genômicas que utilizam a clonagem de fragmentos de DNAr 16S amplificados pela PCR e permitem a obtenção de clones recombinantes que podem ser analisados posteriormente por técnicas rápidas e eficientes de seqüenciamento (Brown, 2003). O princípio da técnica de clonagem, a qual possibilita a obtenção de cópias idênticas de uma molécula de DNA, baseia-se na inserção de um segmento de DNA de interesse em um vetor apropriado, o qual é introduzido numa célula hospedeira compatível para produzir numerosas cópias do material inserido, num processo denominado transformação. Todas as etapas envolvidas na construção de uma biblioteca genômica que utilizam a estratégia de clonagem de fragmentos de DNAr 16S amplificados pela PCR estão apresentadas a seguir:

3.9.2.1. Vetores de clonagem baseados em plasmídeos bacterianos

Vários vetores de clonagem têm sido construídos com o objetivo de facilitar a identificação, o seqüenciamento e a análise funcional do gene ou do cDNA clonado. Os vetores comerciais mais comumente empregados na clonagem gênica são baseados em plasmídeos bacterianos por se tratar de moléculas que apresentam uma origem de replicação “*ori*” que possibilita sua propagação com alta eficiência, independente do DNA genômico da célula hospedeira (Watson *et al.*, 1997).

Os plasmídeos construídos por técnicas de engenharia genética e utilizados como vetores de clonagem apresentam as seguintes características (Voet & Voet, 1990):

- a. são relativamente pequenos;
- b. possuem genes específicos que conferem resistência a vários antibióticos;
- c. contêm marcadores convenientes para a seleção de recombinantes;
- d. apresentam sítios múltiplos de clonagem para a atuação de várias endonucleases de restrição que permitem a inserção de DNA exógeno e sua posterior recuperação da molécula híbrida;

- e. possibilitam a clonagem de fragmentos de DNA de tamanhos de até 8kb;
- f. podem ser introduzidos em células hospedeiras pelo processo de transformação.

Geralmente, a bactéria *Escherichia coli* é a mais utilizada como hospedeira para a manutenção e a amplificação de moléculas de DNA recombinante derivadas de organismos procariotos ou eucariotos, por ser facilmente manipulada e propagada.

3.9.2.2. Clonagem a partir de produtos da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a realização da clonagem de produtos da PCR é necessário que estes sejam ligados a vetores apropriados para que possam ser posteriormente examinados por algum dos métodos utilizados em biologia molecular. Este processo parece simples, mas para isso acontecer é preciso que as extremidades desses produtos sejam compatíveis com as do vetor utilizado.

Na amplificação de fragmentos de DNA pela PCR, a enzima *Taq* DNA-polimerase tende a acrescentar um nucleotídeo na extremidade de cada fita sintetizada, geralmente uma adenosina. Isso faz com que a maioria das terminações 3' dos fragmentos de DNA apresente um único nucleotídeo sobressalente (Figura 11a).

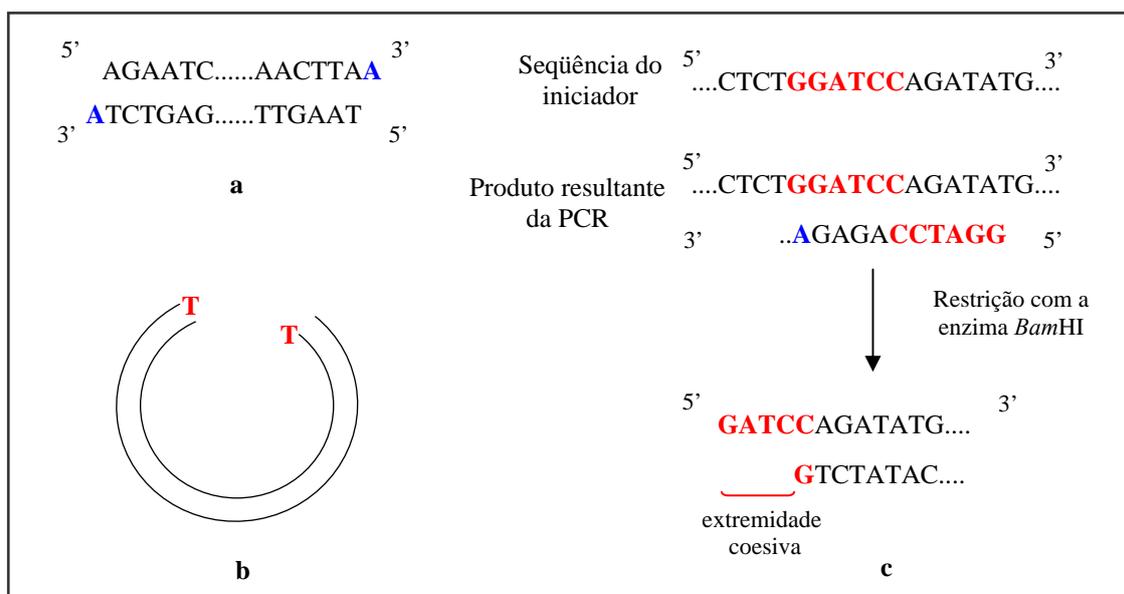


Figura 11. Esquema dos artifícios utilizados para clonar produtos amplificados da PCR: (a) polinucleotídeos sintetizados pela *Taq* DNA-polimerase com adenosinas extras nas terminações 3' (b) vetor especial com timidina nas extremidades e (c) obtenção de um produto de PCR com uma extremidade coesiva pelo uso de um iniciador cuja sequência inclui um sítio de restrição.

Para que isso não se torne um problema na ligação do inserto ao vetor pode-se optar entre duas alternativas. A primeira é utilizar um vetor de clonagem especial que contenha timidinas em suas extremidades para que possam se ligar às adenosinas do produto da PCR (Figura 12b). A segunda é utilizar *primers* na PCR que possuam sítios de restrição, para que os produtos sejam tratados com uma endonuclease de restrição e então gerar extremidades coesivas que possam ser eficientemente ligadas a um vetor de clonagem padrão (Figura 12c) (Brown, 2003).

3.9.2.3. Ligação do fragmento de DNA amplificado ao vetor de clonagem

A ligação é o processo pelo qual o fragmento de DNA amplificado (inserto) é unido ao vetor de clonagem, o qual passará a ser denominado molécula de DNA recombinante, pela ação da enzima DNA-ligase (Figura 12).

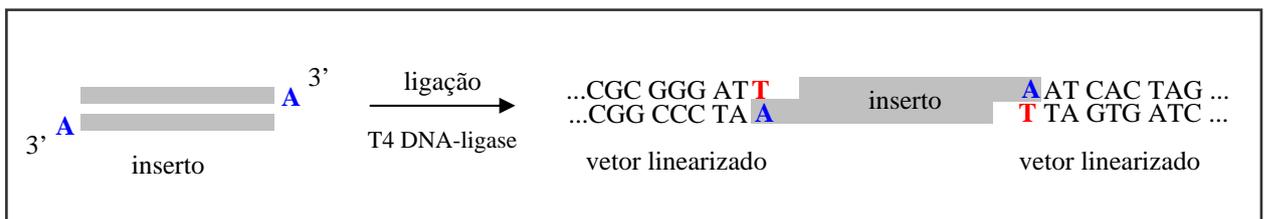


Figura 12. Esquema da ligação do inserto em vetor apropriado pela ação da enzima DNA-ligase.

A enzima mais utilizada na engenharia genética é a T4 DNA-ligase, a qual é obtida a partir de *Escherichia coli* infectada com o fago T4. Em experimentos *in vitro* a DNA-ligase purificada repara as descontinuidades das fitas simples e também unem moléculas de DNA individuais ou as extremidades de uma mesma molécula.

O sucesso da ligação é muito importante para a obtenção de cópias de fragmentos de DNA na etapa de transformação e na posterior obtenção das colônias recombinantes. Isso pode ser prejudicado caso a mistura de ligação apresente uma quantidade significativa de moléculas de vetores não ligados ou re-circularizados sem a inserção de qualquer DNA (“autoligados”) e também de fragmentos de DNA não ligados ou inseridos incorretamente (Brown, 2003).

3.9.2.4. Transformação e identificação de recombinantes em células bacterianas

O processo de transformação consiste na incorporação e multiplicação do DNA recombinante em células bacterianas denominadas competentes, as quais são previamente tratadas por processos físicos e/ou químicos.

A identificação das células transformadas dependerá do tipo de marcador de seleção presente no vetor utilizado, pois este irá conferir uma nova característica às células. Por exemplo, após a transformação com um vetor que contenha como marcadores de seleção o gene de resistência à ampicilina e o gene *lacZ'*, que codifica parte da enzima β -galactosidase, os recombinantes serão identificados pela incapacidade de sintetizar tal enzima, na presença do antibiótico (Matheus *et al.*, 1999). Um esquema simplificado da seleção de recombinantes clonados pela inativação da β -galactosidase está apresentado na Figura 13.

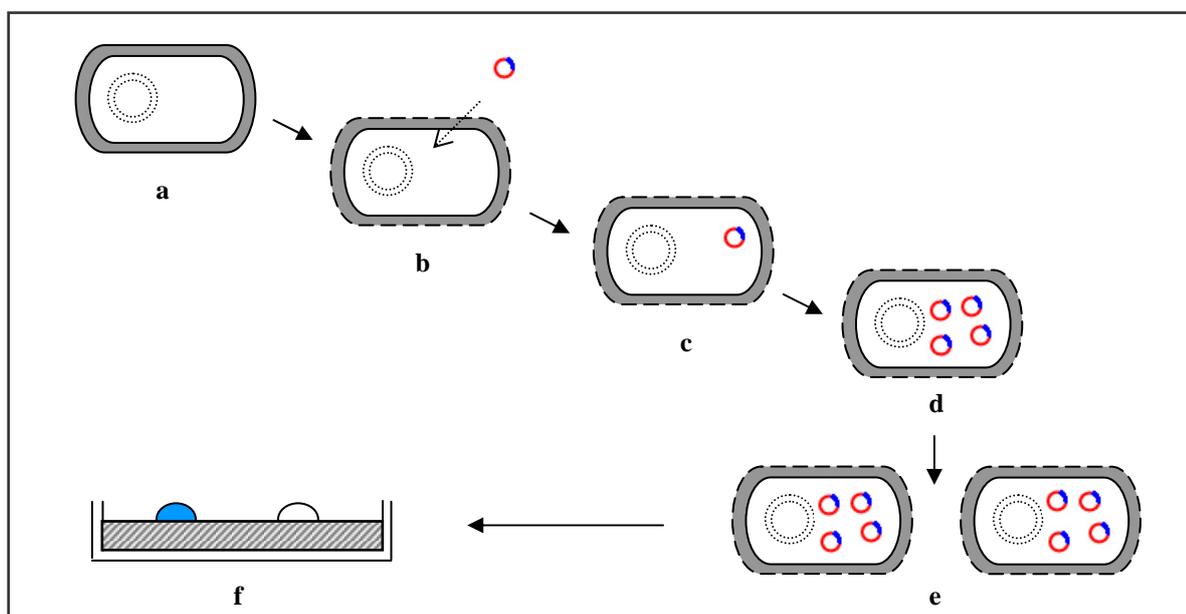


Figura 13. Representação esquemática da transformação e identificação de recombinantes em células bacterianas: (a) célula bacteriana, (b) célula competente, (c) DNA recombinante incorporado à célula hospedeira, (d) multiplicação do DNA recombinante, (e) divisão da célula hospedeira e (f) colônias recombinante (branca) e não-recombinante (azul), crescendo em agar com ampicilina, X-gal e IPTG .

A presença ou ausência da β -galactosidase nas colônias clonadas é facilmente detectada em meio ágar contendo ampicilina, o açúcar X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-

galactopiranosídeo) e o indutor da enzima isopropiltiogalactosídeo (IPTG). As colônias não-recombinantes, formadas por células que sintetizam a β -galactosidase, apresentarão coloração azul enquanto que as recombinantes, que contém o gene *lacZ'* interrompido e portanto incapazes de produzir a enzima, serão brancas (Brown, 2003). Depois de identificadas, as colônias recombinantes são cultivadas em meios e condições específicas para se multiplicarem e produzirem inúmeras cópias do DNA clonado. Em seguida, são submetidas a métodos físicos e químicos que permitem o rompimento da membrana celular e a conseqüente extração das cópias do DNA recombinante.

3.9.3. Seqüenciamento de DNA pelo método de Terminação em Cadeia

O seqüenciamento de fragmentos do gene do RNAr 16S é considerado uma das técnicas mais importante disponível para explorar a diversidade microbiana de células cultivadas e provenientes de ambientes naturais, pois determina a exata seqüência dos nucleotídeos no segmento de DNA (Muyser, 1999).

No final da década de 70 foram desenvolvidas duas técnicas distintas que permitiram pela primeira vez a obtenção da seqüência completa de genes: o método de degradação química de Maxam e Gilbert e o método de terminação em cadeia de Sanger e Coulson (Watson *et al.*, 1997). A Figura 14 apresenta o esquema do princípio do método da terminação em cadeia de Sanger-Coulson para o seqüenciamento de DNA.

O princípio básico de ambos consiste na redução do DNA em quatro grupos de fragmentos marcados (Sterky & Lunderberg, 2000). Neste trabalho daremos enfoque apenas ao segundo método, pois este possibilita a realização tanto do seqüenciamento de fragmentos de DNA clonados como também diretamente de produtos de PCR, além de permitir a automatização do processo.

No método enzimático de Sanger-Coulson, os terminadores específicos, 2',3'-dideoxynucleotídeos trifosfato ou ddNTP, são incorporados na cadeia crescente de DNA pelos

seus grupos 5' trifosfato. No entanto, estes não podem formar ligações fosfodiésteres com o próximo deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) a ser incorporado, fazendo com que o crescimento da cadeia de DNA seja interrompido. Este tipo de reação de seqüenciamento consiste de uma fita de DNA a ser seqüenciada; um pequeno fragmento de DNA marcado (*primer*) complementar à extremidade da outra fita; uma proporção controlada de um determinado ddNTP e seu dNTP normal, além dos outros três dNTPs (Old & Prinrose, 1991).

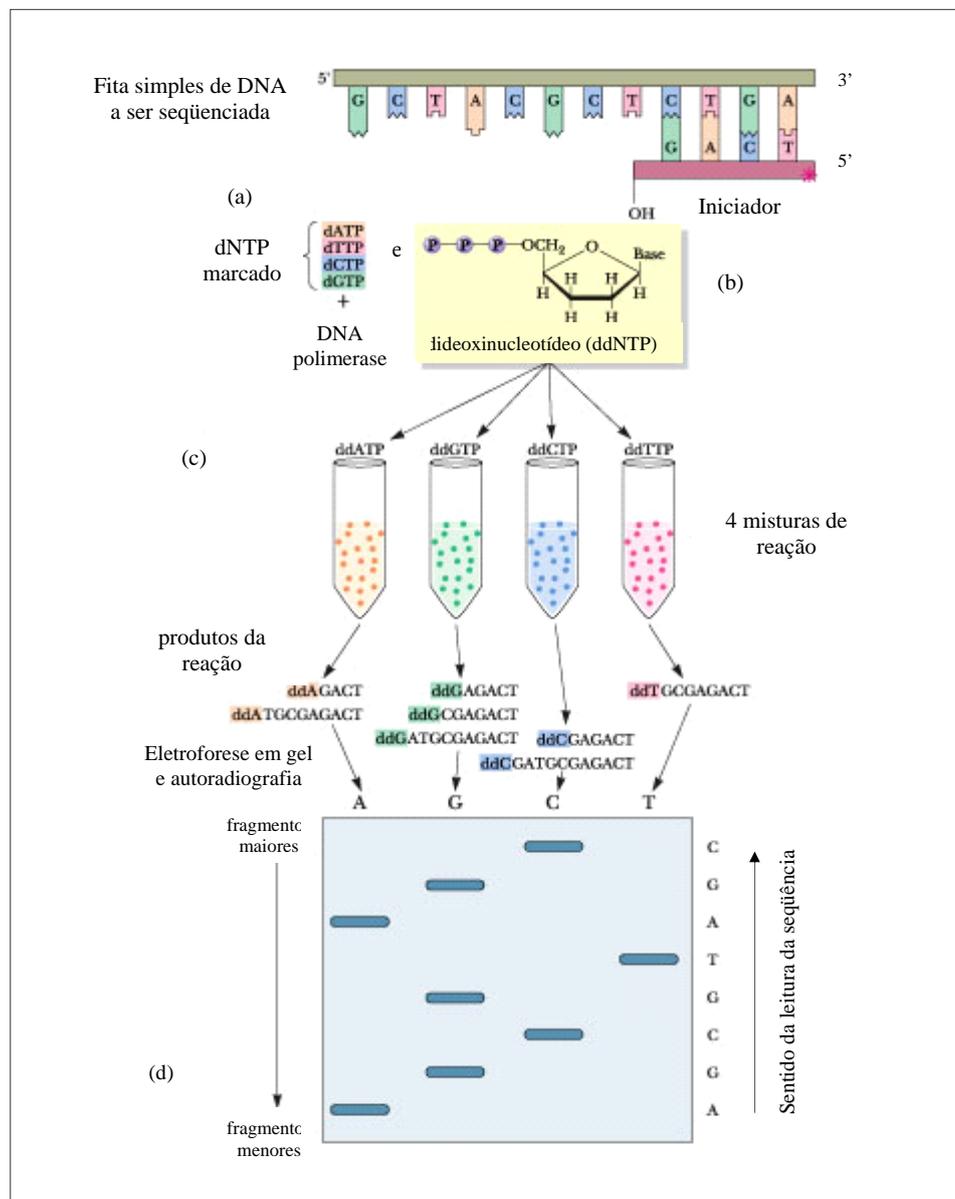


Figura 14. Esquema da estratégia de seqüenciamento realizada por Sanger-Coulson pelo método da terminação em cadeia. (a) reação da DNA polimerase, (b) estrutura do dideoxinucleotídeo (c), mistura de reação com dNTP:ddNTP e (d) eletroforese em gel e autoradiografia (www.web.virginia.edu).

A polimerização normal é iniciada a partir do *primer*, pela ação da DNA-polimerase, e finalizada quando o ddNTP é incorporado no final da cadeia. Isso acontece porque os ddNTPs não apresentam o grupo hidroxila na extremidade 3' da molécula de açúcar e portanto impedem que a enzima continue a aumentar a fita de DNA complementar (Stryer, 1992). A proporção correta de ddNTP e dNTP faz com que a reação resulte em uma série de fitas marcadas, cujos comprimentos dependem da localização de uma determinada base em relação à extremidade da molécula de DNA. A partir dessa idéia foi possível realizar quatro reações, cada uma contendo um ddNTP diferente, as quais podem ser separadas e ordenadas por tamanho em gel de poliacrilamida, para obter a seqüência de DNA (Sanger *et al.*, 1977).

3.9.3.1. Seqüenciamento automático do DNA

No método original de seqüenciamento de Sanger-Coulson utilizavam-se marcadores radioativos para que os padrões de bandas pudessem ser visualizados no gel por autoradiografia. Atualmente, este tipo de marcação vem sendo substituído por substâncias fluorescentes, as quais são incorporadas às extremidades das fitas complementares sintetizadas. Cada um dos quatro ddNTP é marcado com um fluorocromo diferente permitindo que as reações ocorram em um mesmo tubo e que os fragmentos que incorporaram um desses nucleotídeos sejam identificados quando excitados a laser, uma vez que o detector de fluorescência consegue distinguir os diferentes sinais emitidos (Lehninger *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos no seqüenciamento podem ser interpretados por meio de eletroferogramas, em que cada pico representa determinada base (A, T, C ou G). No entanto, os picos podem ficar espaçados de maneira irregular e se sobrepõem devido aos problemas ocorridos durante o processo de seqüenciamento ou de eletroforese, dificultando a interpretação dos dados (Sculaccio, 2002). Porém, o desenvolvimento e a utilização de seqüenciadores automáticos e novos programas computacionais tornaram o processo de seqüenciamento mais rápido e eficiente (Ogata, 2005). A Figura 15 mostra um esquema

resumido de todas as etapas envolvidas no seqüenciamento automatizado de fragmentos de DNA pelo método da terminação de cadeia.

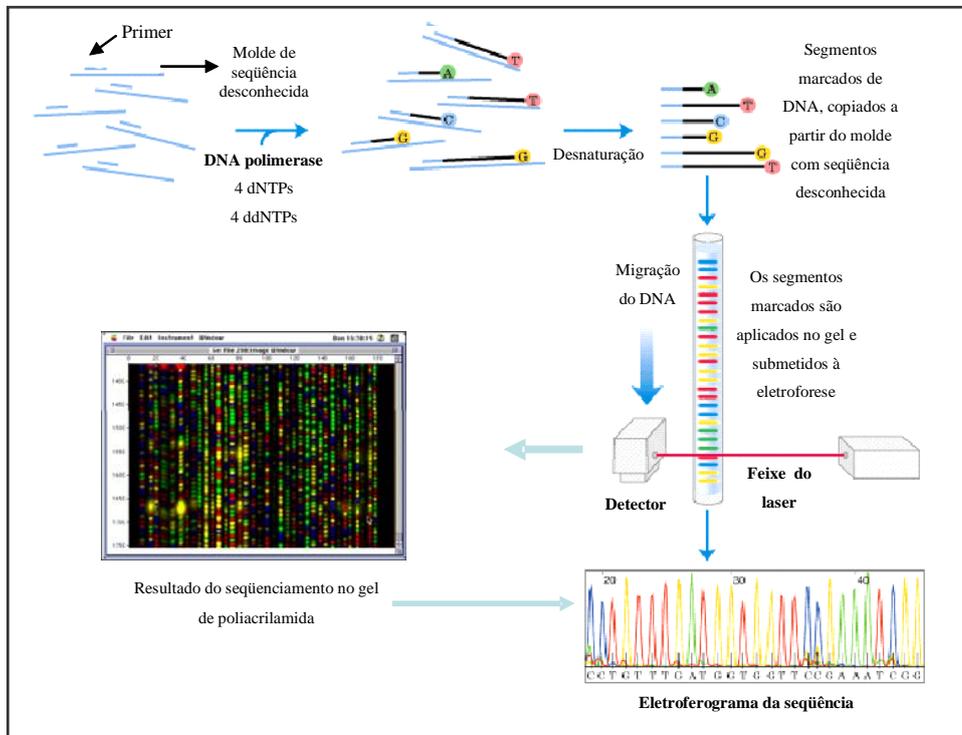


Figura 15. Esquema da estratégia utilizada no seqüenciamento automatizado (Nelson & Cox, 2000).

Piza (2004) caracterizou e comparou a diversidade e a estrutura de comunidades dos Domínios *Archaea* e *Bacteria*, em sedimentos estuarinos coletados na região da Baixada Santista, pela técnica de seqüenciamento a partir de clones de bibliotecas de DNAr 16S. Os sedimentos foram coletados em dois pontos distintos: no terminal portuário da COSIPA, exposto às elevadas concentrações de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos; e na baía de Santos, um compartimento relativamente abrigado onde as principais fontes de poluição direta são os esgotos domésticos e os sedimentos dragados do canal portuário, que no passado foram lançados indevidamente nesta área. Os dados obtidos indicaram, para o Domínio *Bacteria*, maior diversidade genética na amostra da baía de Santos que na da COSIPA. Estatisticamente, as composições das comunidades provenientes das bibliotecas das duas amostras também diferiram. Já as comparações entre as taxocenoses do Domínio *Archaea* mostraram que não

houve diferenças significativas entre as diversidades presentes em ambas as bibliotecas, ao contrário do observado nos resultados relativos à composição das mesmas. Os resultados deste trabalho, aliados ao desenvolvimento do programa estatístico destinado à análise de diversidade microbiana empregando inventários construídos a partir de bibliotecas genômicas proporcionaram uma nova perspectiva para as investigações sobre os efeitos de estresse e perturbações antropogênicas em comunidades microbianas, no sistema estuarino de Santos e São Vicente.

Ballerstedt *et al.* (2004) utilizaram a técnica de seqüenciamento para estudar a diversidade bacteriana de espécies anaeróbias degradadoras de dioxinas, presentes em culturas mistas provenientes de sedimentos de rio. Após 16 sub-cultivos (5% v/v), a cultura mista enriquecida em meio basal suplementado com selenito de sódio (121nM), tungstato de sódio (12nM), 1,4-naftaquinona (63nM), extrato de levedura (0,05g/L), piruvato (20mM), fumarato (10mM) degradou via desalogenação redutiva os 1,2,3- e 1,2,4-triclorodibenzo-*p*-dioxinas (TCDD), subprodutos da combustão do pentaclorofenol. O seqüenciamento do gene RNAr 16S e as análises filogenéticas indicaram que alguns microrganismos pertenciam aos gêneros *Trichococcus*, *Sulforospirillum* e *Desulfitobacterium*. De acordo com os autores, os membros de *Trichococcus* e *Sulforospirillum* fermentam o piruvato e o fumarato, respectivamente, enquanto que os membros pertencentes ao gênero *Desulfitobacterium* fermentam ambos e são capazes de degradar diversos tipos de compostos clorados, via desalogenação redutiva. A união das informações obtidas pelos ensaios de degradação e filogenia permitiram mostrar a relação de inter-dependência dos microrganismos envolvidos direta e indiretamente na degradação anaeróbia dos contaminantes estudados.

Narasingarao & Häggblom (2006) analisaram seqüências do gene do RNAr 16S para caracterizar uma nova bactéria anaeróbia isolada a partir de amostras de sedimentos estuarinos mesofílicos (28°C). Os ensaios de enriquecimento foram realizados com meio de cultivo

mineral salino, solução redutora de sulfato de sódio (0,01%), selenito de sódio (10mM) e 4-hidroxibenzoato (250 μ M), comoceptor e doador de elétrons, respectivamente. A linhagem isolada, denominada AK4OH1, foi capaz de associar a redução do selenato à oxidação do ácido aromático, com produção de selenito. As análises filogenéticas mostraram que a linhagem apresentou alta similaridade com três microrganismos não identificados pertencentes à subdivisão Gamaproteobacteria, sendo um redutor de selenato, outro redutor de perclorato e por fim um redutor de ácidos húmicos. Porém, o grupo representado pela AK4OH1 foi totalmente distinto de todos os outros organismos conhecidos, justificando assim a denominação de um novo gênero e uma nova espécie para esta linhagem, que foi classificada como *Sedimenticola selenatireducens*.

Bae *et al.* (2006) realizaram a caracterização polifásica de uma nova linhagem anaeróbia facultativa em águas profundas contaminadas por vários solventes clorados. A linhagem isolada BL-10^T foi capaz de fermentar a glicose e produzir propionato, acetato, formiato, lactato e succinato, na presença dos compostos 1,2-dicloroetano (9,8mM) e 1,1,2-tricloroetano (5,9mM). As comparações filogenéticas das seqüências do DNAr 16S do isolado com outros membros do Domínio *Bacteria* mostraram que a BL-10^T representa uma linhagem pertencente ao Filo Actinobacteria e forma um ramo filogenético independente relacionado com espécies dos gêneros *Propionicimonas* e *Micropruina*. Um dado interessante neste trabalho foi a constatação de que embora a linhagem isolada não tenha sido capaz de utilizar o 1,2-dicloroetano e o 1,1,2-tricloroetano como aceptores de elétrons, ela foi capaz de crescer na presença dos mesmos indicando que BL-10^T é tolerante a estes solventes clorados e portanto podem desenvolver um papel muito importante na biodegradação e biorremediação de áreas contaminadas.

Marcon *et al.* (2007) isolaram 2 linhagens bacterianas em amostras de sedimentos de um lago contaminado com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. O isolamento foi realizado

pela inoculação de 2g de sedimento previamente enriquecido na presença de naftaleno (2% v/v), obtido em estudos prévios dos autores, em meio mineral salino (100mL) e pH 6,6. Após 4 semanas de incubação a 28°C, volumes de 100,0μL foram transferidos e plaqueados em meio sólido suplementado com naftaleno ou bifenilo e, posteriormente, incubados na mesma temperatura citada. O DNA total genômico foi extraído de apenas uma colônia representativa de cada hidrocarboneto testado e a identificação e as análises filogenéticas foram realizadas a partir do seqüenciamento do DNAr 16S. Os resultados obtidos mostraram que ambas as linhagens isoladas SN1 e SB1 apresentaram estreita relação à espécie *Pseudomonas stutzeri*, a qual foi obtida em amostras de sedimento do mesmo lago. Porém, apesar da SN1 e SB1 terem sido identificadas como uma mesma espécie, as diferenças nas seqüências do DNAr 16S de ambas mostraram claramente que elas pertencem a linhagens bacterianas distintas. Essas informações confirmaram as diferenças fenotípicas de cada colônia, bem como as diferenças encontradas nos genes que expressam as enzimas envolvidas nas vias de degradação aeróbia do naftaleno e do bifenil. Os autores sugeriram que as linhagens de *Pseudomonas* SN1 e SB1 podem ser utilizadas na biorremediação *in situ* dos sedimentos do lago estudado.

Briée *et al.* (2007) estudaram a composição da comunidade de um sedimento anóxico sufetogênico, oriundo de um pântano, utilizando a ferramenta molecular de seqüenciamento. As amostras foram amplificadas pela técnica de PCR com *primers* específicos para os Domínios *Archaea* e *Bacteria* e clonadas em bibliotecas genômicas. As análises das seqüências do DNAr 16S bacteriano mostraram que as amostras apresentavam alta diversidade de microrganismos, os quais tinham representantes nos Filos α , β , γ , δ , e ϵ -*Proteobacteria* e também dos grupos de *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi*, *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Spirochaetes* e *Fibrobacteres*. As arqueias apresentaram menor diversidade em relação às bactérias, com representantes das Ordens

Methanomicrobiales e Methanosarcinales.

Atualmente, muitos trabalhos têm estudado a taxonomia de comunidades microbianas anaeróbias autóctones em ambientes contaminados. No entanto o conhecimento sobre a diversidade microbiana de arqueias e bactérias em ambientes tropicais, principalmente em habitats anaeróbios, ainda é incipiente. Portanto, o estudo sobre a diversidade dos microrganismos anaeróbios em ecossistemas contaminados, como a região da Baixada Santista, pode contribuir para o desenvolvimento de novas técnicas de biorremediação e conseqüentemente para a recuperação de outras áreas degradadas encontradas no território brasileiro.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho investigou a diversidade microbiana e a filogenia de arqueias e bactérias em consórcios metanogênicos anaeróbios, originados de sedimentos estuarinos enriquecidos com pentaclorofenol (PCP) ou 2,6-diclorofenol (2,6-DCP), utilizando métodos moleculares como a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e a construção de bibliotecas genômicas, além de análises das seqüências de fragmentos específicos do DNAr 16S microbiano. Para facilitar a leitura do texto e a compreensão deste trabalho serão apresentadas a seguir as descrições da área de estudo, local onde as amostras de sedimento estuarino foram coletadas; da origem dos consórcios microbianos obtidos a partir de ensaios de enriquecimento, bem como todas as atividades experimentais realizadas para a execução das análises moleculares. Todas as soluções empregadas na preservação dos consórcios microbianos e na realização das técnicas moleculares estão descritas em Anexo (Parte 1).

4.1. Área de estudo

A área de estudo está localizada entre as coordenadas 23°52'65''S e 46°22'67''W na região estuarina de Santos e São Vicente, localizada da Baixada Santista do Estado de São Paulo. As amostras de sedimentos foram coletadas em frente ao terminal portuário da

Companhia Siderúrgica Paulista (COSIPA), uma área fortemente contaminada por compostos tóxicos (Nakayama, 2005). As localizações desta área e do ponto de coleta das amostras de sedimentos estão apresentadas esquematicamente na Figura 16.

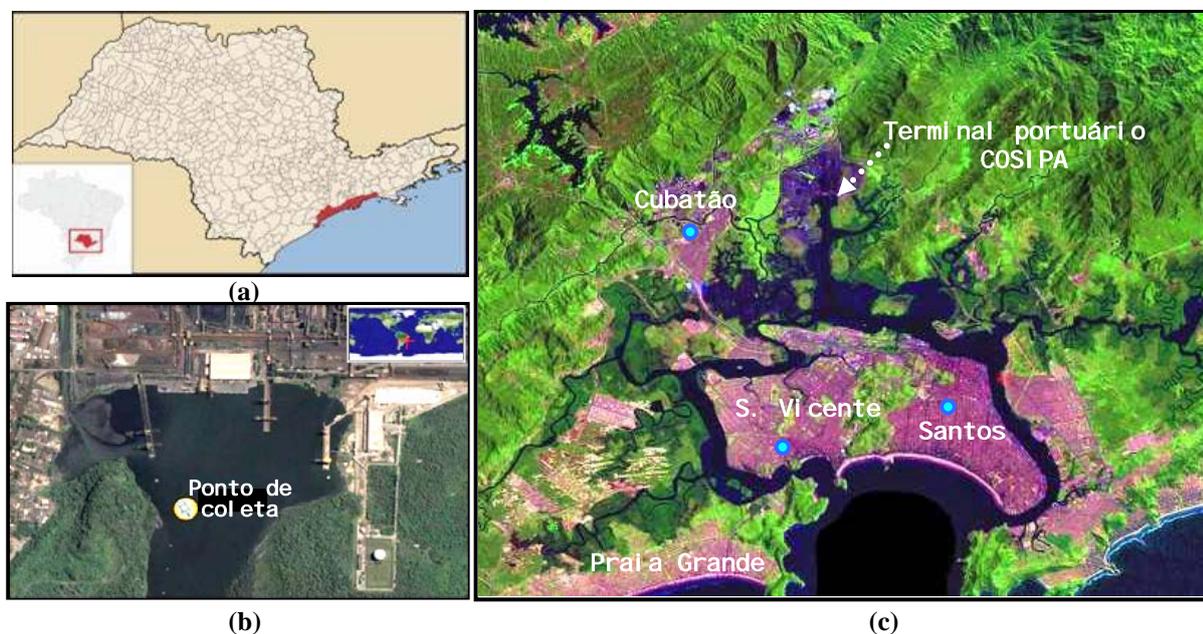


Figura 16. Área de estudo. (a) localização da Baixada Santista no Estado de São Paulo (destacada em vermelho), (b) ponto de coleta das amostras de sedimento no terminal portuário da COSIPA e (c) imagem de satélite do sistema estuarino de Santos e São Vicente. Fonte: Miranda & Coutinho (2004).

O testemunho do perfil do sedimento foi coletado em profundidade de 2 metros, em quintuplicata, com amostrador cilíndrico de acrílico (50,0 cm comprimento x 5,4 cm diâmetro) acoplado a uma peça de metal, para facilitar a entrada do cilindro no sedimento e evitar a perda das amostras durante o recolhimento do aparelho. Após a coleta os cilindros foram fechados com tampas de cloreto de polivinil (PVC), transportados ao laboratório em isopor contendo gelo, e o sedimento transferido para frasco Duran (2L), sob fluxo de nitrogênio para manter as condições anaeróbias. O frasco foi fechado com batoque de butila e tampa de rosca e armazenado em geladeira (4 °C) até a realização dos ensaios de enriquecimento.

4.1.1. Caracterização física e química do sedimento e da água

Algumas informações sobre as características físicas e químicas do sedimento estuarino e da água estão apresentadas neste trabalho para caracterizar as condições do habitat natural

das comunidades microbianas encontradas no local de estudo. As medidas de temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica, pH e salinidade da água foram realizadas *in situ*, próximas à superfície da água e do sedimento utilizando-se um aparelho com sensor múltiplo (Horiba). Os valores de todas as medidas estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Caracterização das variáveis físicas e químicas do local de coleta.

Variáveis	Valores		
	Água (superfície)	Água (fundo)	Sedimento (superfície)
Profundidade (m)	0	2,0	2,5
Temperatura (°C)	26,0	24,8	24,8
Condutividade (ms/cm)	9,4	30,0	-
Salinidade (‰)	5,3	19,4	-
Oxigênio dissolvido (mg/L)	6,3	3,9	-
pH	7,6	-	7,7
Potencial redox Eh (mV) ²	-	-	- 326,0

Fonte: Nakayama (2005) e Saia (2005).

4.2. Origem dos consórcios microbianos anaeróbios

Os consórcios microbianos analisados no presente trabalho foram obtidos a partir de ensaios de enriquecimento, realizados por Nakayama (2005), em microcosmos anaeróbios inoculados com amostras de sedimentos do estuário de Santos e São Vicente (SP), sob condições metanogênicas e mesofílicas. Todas as etapas realizadas nos ensaios de enriquecimento, desde a inoculação das amostras de sedimento estuarino até a obtenção dos consórcios microbianos, estão representadas na Figura 17 e descritas resumidamente nos próximos subitens. As condições de preparo das amostras de sedimento e das soluções estoques, bem como a composição do meio basal utilizados nos ensaios de enriquecimento encontram-se descritos detalhadamente na tese “Degradação anaeróbia de pentaclorofenol, 2,3,4-triclorofenol e 2,6-diclorofenol por culturas enriquecidas a partir de sedimento contaminado do sistema estuarino de Santos e São Vicente” (Nakayama, 2005).

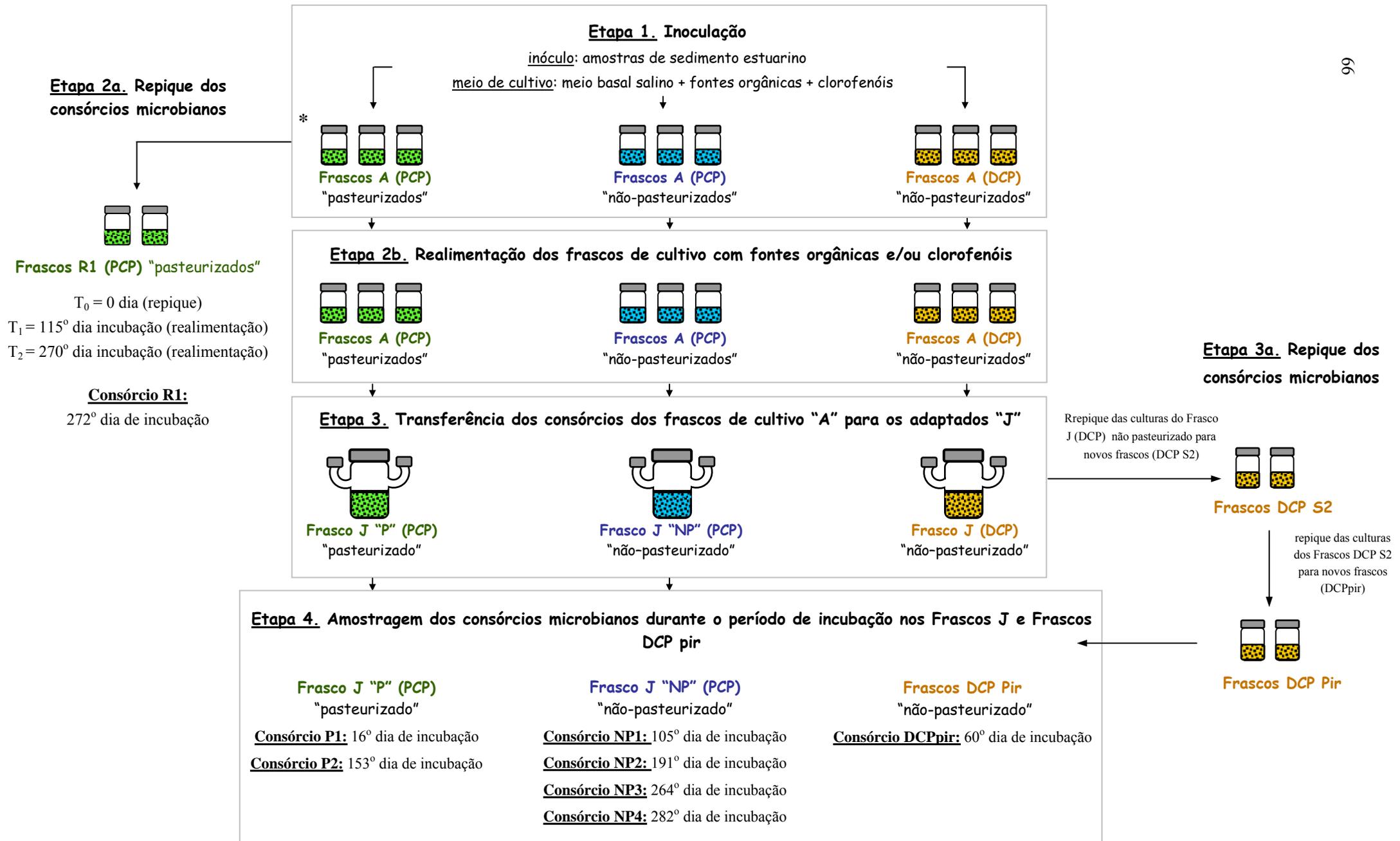


Figura 17. Diagrama esquemático do histórico da obtenção dos consórcios microbianos anaeróbios originados de amostras de sedimentos estuarinos enriquecidos com clorofenóis. As siglas R1, P1, P2, NP1, NP2, NP3, NP4 e DCPpir referem-se aos consórcios microbianos estudados neste trabalho. *Frascos submetidos ao processo de pasteurização.

4.2.1. Etapa 1: Inoculação das amostras de sedimentos estuarinos

As amostras de sedimentos estuarinos foram inoculadas, sob condições de assepsia e anaerobiose, em frascos de vidro (100mL) contendo meio basal salino suplementado com fontes orgânicas (formiato, glicose, piruvato), vitaminas, pentaclorofenol (PCP) ou 2,6-diclorofenol (DCP), soluções de bicarbonato de sódio (tampão), extrato de levedura (fonte de aminoácidos), sulfito de sódio (aceptor de elétrons) e L-cisteína (agente redutor). O volume de sedimento utilizado como inóculo, em cada frasco, e as concentrações das soluções estoques adicionadas ao meio basal salino estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Volume de sedimento e composição do meio de cultivo utilizada na etapa de inoculação.

Componentes	Inoculação		
	Frascos A (PCP) “pasteurizados”	Frascos A (PCP) “não-pasteurizados”	Frascos A (DCP) “não-pasteurizados”
Inóculo (sedimento)	10mL	10mL	10mL
Bicarbonato de sódio	0,1%	0,1%	0,1%
Solução de vitaminas	10% (v/v)	10% v/v	10% v/v
Extrato de levedura	0,05%	0,05%	0,05%
Formiato de sódio	2g/L	2g/L	2g/L
Glicose	1g/L	1g/L	1g/L
Piruvato de sódio	20mM	20mM	20mM
Sulfito de sódio	5mM	5mM	5mM
L-cisteína	2mM	2mM	2mM
PCP*	18,7µM	18,7µM	-
2,6-DCP*	-	-	27,6µM
Meio basal salino (q.s.p.)	50mL	50mL	50mL

* Adicionados individualmente em cada frasco de cultivo (Fonte: Nakayama, 2005).

Após a inoculação das amostras de sedimento, os frascos de cultivo denominados “*Frascos A PCP não-pasteurizados*” e “*Frascos A DCP não-pasteurizados*” (Figura 17) foram lacrados e incubados a 30 °C, sem agitação, ao abrigo da luz, durante 176 dias. Já os “*Frascos A PCP pasteurizados*” (Figura 17) foram lacrados e imediatamente submetidos ao

processo de pasteurização, em banho-maria durante 30 minutos a 80 °C, com o objetivo de promover a seleção de linhagens de bactérias desalogenadoras de clorofenóis, pertencentes ao gênero *Desulfitobacterium*. Em seguida os frascos foram incubados durante o mesmo período e condições descritas anteriormente (Nakayama, 2005).

4.2.2. Etapa 2a: Repique dos consórcios microbianos cultivados nos “Frascos A PCP pasteurizados”

Os consórcios microbianos cultivados nos “Frascos A PCP pasteurizados”, durante 176 dias, foram repicados para novos frascos de vidro (50mL) contendo os mesmos componentes apresentados na Tabela 4. Em seguida os novos frascos de cultivo, agora denominados “Frascos R1 PCP pasteurizados”, foram lacrados e incubados por aproximadamente 350 dias, contados a partir do momento do repique ($T_0 = 0$ dia), nas mesmas condições descritas no item anterior. É importante salientar que os “Frascos R1 PCP pasteurizados” foram realimentados duas vezes durante o período de incubação: a primeira apenas com fontes orgânicas ($T_1 = 115$ dias) e a segunda com fontes orgânicas e PCP ($T_2 = 270$ dias), nas mesmas concentrações descritas na Tabela 4. As amostras dos consórcios microbianos, denominados R1, foram coletadas no 272º dia de incubação durante os ensaios de enriquecimento (Figura 17), para que fossem analisadas a diversidade e a filogenia de arqueias e bactérias.

4.2.3. Etapa 2b: Realimentação dos frascos de cultivo com fontes orgânicas e/ou clorofenóis

Logo após a realização do repique dos consórcios microbianos, descritos no item anterior, todos os frascos de cultivo “pasteurizados” e “não pasteurizados” (Figura 17) foram realimentados com fontes orgânicas, doadores de elétrons, soluções tampão e redutora, nas mesmas concentrações apresentadas na Tabela 4. O pentaclorofenol e o 2,6-diclorofenol foram

adicionados em concentrações iguais ao dobro das iniciais. Tal procedimento foi realizado porque foram constatados os consumos dos substratos orgânicos e a degradação dos clorofenóis pelos consórcios microbianos anaeróbios, provenientes das amostras de sedimentos enriquecidos, durante o período de incubação (176 dias) (Nakayama, 2005).

4.2.4. Etapa 3: Transferência dos consórcios microbianos para frascos adaptados

Depois de 252 dias de cultivo, as culturas provenientes de todos os “*Frascos A*” foram transferidas para frascos Duran adaptados (250mL) (“*Frascos J*”), com o objetivo de facilitar a coleta das amostras (Figura 17). A manutenção dessas culturas foi realizada de acordo com as condições descritas na Tabela 4, excetuando as concentrações dos compostos clorados que passaram para 37,5 μ M de PCP e 61,5 μ M de DCP. Após a transferência, os novos frascos contendo o inóculo inicial não pasteurizado (*Frasco J “NP” PCP*), pasteurizado (*Frasco J “P” PCP*) e aquele contendo o DCP (*Frasco J DCP*) foram realimentados 12, 1 e 1 vezes, respectivamente de acordo com a resposta a degradação de cada clorofenol. Estes frascos também foram mantidos a 30 °C, sem agitação, sob o abrigo de luz (Nakayama, 2005).

4.2.5. Etapa 3a: Repique dos consórcios microbianos cultivados nos “*Frasco J DCP não-pasteurizado*”

No 16° dia, após a transferência das culturas para os “*Frascos J*”, foi observada a oxidação do meio de cultivo e a formação de precipitados no “*Frasco J DCP não-pasteurizado*” (Nakayama, 2005). Para garantir o crescimento dos microrganismos, alíquotas de 50mL das culturas degradadoras de DCP foram transferidas do “*Frasco J DCP não-pasteurizado*” para novos frascos de antibiótico (100mL), em duplicata, e incubadas durante 250 dias (“*Frascos DCP S2*”). Para minimizar a oxidação, foi utilizada inicialmente a solução de sulfeto de sódio (0,012%) como agente redutor e nas demais realimentações a solução redutora cisteína-sulfeto (1%), a qual proporcionou a manutenção das condições anaeróbias

nos frascos. A concentração de 2,6-DCP foi de 30,6 μ M, as concentrações dos demais componentes e as condições de incubação foram mantidas. Neste ensaio foram realizadas 6 realimentações, sendo que na segunda foi adicionado apenas o DCP, sem adição das demais fontes, e na última os frascos foram alimentados com 5mg/L de PCP ao invés de 2,6-DCP.

A partir do 250^o dia de incubação dos “*Frascos DCP S2*”, as culturas provenientes destes frascos foram repicadas e cultivadas em novos frascos de antibiótico (30mL) contendo meio basal e apenas com piruvato de sódio (20mM) como fonte orgânica na presença de 2,6-DCP (30,6 μ M) (“*Frascos DCP Pir*”) (Figura 17). Nesta etapa foram mantidas as mesmas condições realizadas nos repiques anteriores, porém com diferentes concentrações de inóculo (10% v/v) e solução redutora de cisteína-sulfeto (0,02% de cada componente). Os “*Frascos DCP Pir*” foram incubados durante 60 dias.

4.2.6. Etapa 4: Amostragem dos consórcios microbianos para análise

As amostras dos consórcios microbianos P1 e P2 (*Frascos J “P” PCP*); NP1, NP2, NP3 e NP4 (*Frascos J “NP” PCP*) e DCPpir (*Frascos DCP Pir*) foram coletadas para as análises de diversidade e filogenia de arqueias e bactérias em períodos distintos de incubação das culturas durante os ensaios de enriquecimento (Figura 17). É importante lembrar que as amostras dos consórcios microbianos, denominados R1, foram coletadas para análise no 272^o dia de incubação.

4.3. Atividades experimentais e métodos moleculares utilizados nas análises de diversidade e filogenia microbiana

Todas as atividades experimentais realizadas neste trabalho, bem como os métodos moleculares utilizados nas análises de diversidade e filogenia de arqueias e bactérias estão descritos a seguir e representadas esquematicamente na Figura 18.

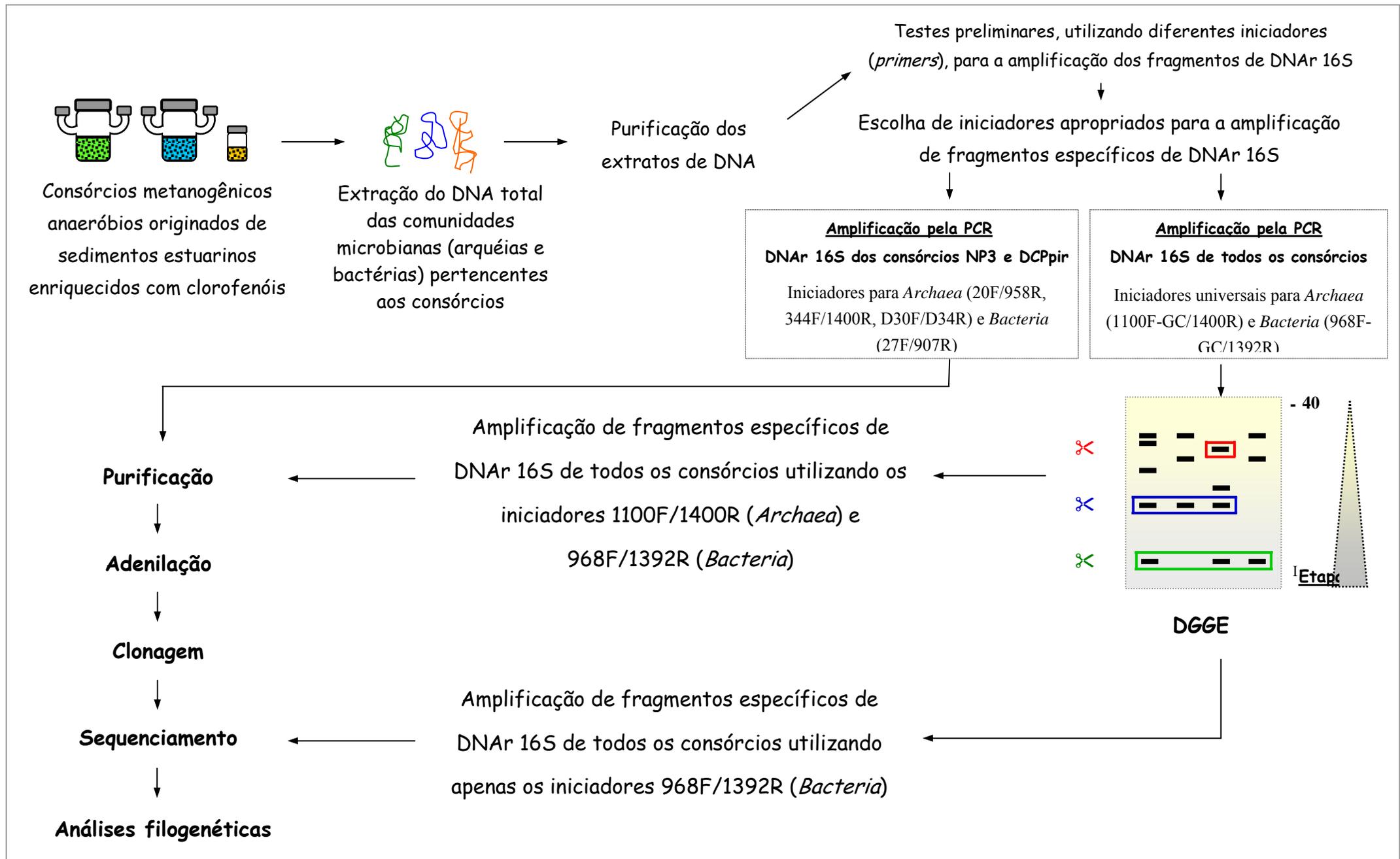


Figura 18. Diagrama esquemático das atividades experimentais que utilizaram ferramentas de biologia molecular.

4.3.1. Armazenamento e extração do DNA total dos consórcios microbianos

O armazenamento e a extração do DNA total de arqueias e bactérias provenientes dos consórcios microbianos (R1, P1, P2, NP1, NP2, NP3, NP4 e DCPpir) foram realizados de acordo com o método de obtenção de ácidos nucleicos para comunidades microbianas oriundas de ambientes naturais, modificado a partir de Griffiths *et al.* (2000).

4.3.1.1. Armazenamento das amostras dos consórcios microbianos

As amostras dos consórcios microbianos foram previamente tratadas e armazenadas em temperatura de -20°C, pois as mesmas vieram do Laboratório de Microbiologia Ambiental do Instituto de Ciências Biomédicas (USP) e não foram submetidas ao procedimento de extração de DNA imediatamente. Os procedimentos realizados para o tratamento e armazenamento estão apresentados a seguir:

1. Coletar e acondicionar 13,0mL de amostra de sedimento em tubo Falcon (15,0mL);
2. Centrifugar cada amostra, sob refrigeração (4°C), durante 10 minutos a 1.000rpm;
3. Descartar o sobrenadante;
4. Ressuspender o *pellet* em 5,0mL de PBS 1x [tampão salino fosfato pH 8,0: NaCl (130mM), Na₂HPO₄ (7mM), Na₂H₂PO₄ (3mM)];
5. Centrifugar, sob refrigeração (4°C), a 1.000rpm, por 10 minutos;
6. Descartar o sobrenadante;
7. Repetir os passos descritos nos itens 4, 5, 6 e 7, por cinco vezes*;
8. Acondicionar e armazenar o *pellet* em tubo Falcon, a temperatura de -20°C, até o momento da extração do DNA da amostra.

* Devido à possível presença de ácidos húmicos e compostos inorgânicos provenientes do sedimento, os *pellets* foram lavados várias vezes com PBS (1x) com o intuito de minimizar a interferência dessas substâncias nas análises moleculares.

4.3.1.2. Extração do DNA total das comunidades microbianas

Antes de iniciar o procedimento de extração do DNA total das comunidades

microbianas, os *pellets* das amostras dos consórcios foram acondicionados em freezer e posteriormente transferidos e mantidos em geladeira (4°C), durante 1 hora. Todo o procedimento realizado está apresentado a seguir.

1. Colocar o tubo Falcon, contendo 1,0g de *pellet*, em banho de gelo;
2. Adicionar 0,5g de pérolas de vidro (*glass beads* de 150 - 212µm de diâmetro) ao tubo;
3. Adicionar 1,0mL de fenol tamponado* (pH 8,0: equilibrado com Tris), 1,0mL de clorofórmio* e 1,0mL de PBS (1x), respectivamente;
4. Agitar em vórtex durante 60 segundos**;
5. Centrifugar sob refrigeração (4°C), por 10 minutos, a 6.000rpm;
6. Transferir a camada líquida (≈ 0,8 a 1,0mL) para um tubo de microcentrífuga (1,5mL);
7. Completar o volume do tubo com fenol tamponado;
8. Agitar em vórtex durante 10 segundos para formar uma emulsão;
9. Centrifugar por 10 minutos, a 10.000rpm e 4°C;
10. Transferir o sobrenadante para outro tubo de microcentrífuga (1,5mL);
11. Completar o volume do tubo com clorofórmio;
12. Agitar em vórtex durante 10 segundos para formar uma emulsão;
13. Centrifugar por 10 minutos, a 10.000rpm e 4°C;
14. Repetir 3 vezes os passos que utilizaram o clorofórmio;
15. Transferir a camada líquida superior contendo o DNA extraído para outro tubo de microcentrífuga (1,5mL) e armazenar em freezer a -20°C.

* A mistura dos solventes orgânicos fenol e clorofórmio na proporção de 1:1 foi utilizada para precipitar as proteínas e permitir que os ácidos nucleicos se mantivessem na solução. Fenol tamponado: *Ultra Pure TM Buffer-Saturated* (Invitrogen).

** No passo 4, todas as amostras foram agitadas em vórtex por 60 segundos, exceto a amostra P2 a qual foi agitada durante 80 segundos.

4.4. Quantificação e análise da qualidade dos extratos de DNA das comunidades microbianas

A quantificação dos extratos de DNA das comunidades microbianas presentes nos

consórcios nos foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1% (Pharmacia), utilizando o padrão de massa molecular *High DNA Mass Ladder* (Invitrogen). Este marcador foi escolhido por ser composto de uma mistura equimolar de 6 fragmentos de 10, 6, 4, 3, 2 e 1 kb de DNA que, quando submetidos à eletroforese, resulta em “bandas” distintas contendo 200, 120, 80, 60, 40 e 20ng de DNA, as quais permitem estimar por comparação a quantidade de DNA em cada amostra analisada.

Os volumes de alíquotas utilizados para a migração no gel dos marcadores, dos extratos de DNA das amostras e do corante *Loading Dye* (Promega) foram de 2 μ L, 5 μ L e 2 μ L, respectivamente. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (Modelo Horizon[®] 58 da Gibco) contendo tampão TAE 1x (Tris-acetato 0,04M, EDTA 0,001M) e tempo de corrida de 50 minutos, a 60v e 400mA. Em seguida o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (1 μ L/mL), durante 10 minutos, e lavado em recipiente contendo água destilada para retirar o excesso do corante, por 5 minutos. Esta substância foi utilizada por permitir a visualização dos fragmentos de DNA em “bandas” quando expostos à irradiação de luz ultra-violeta. Posteriormente, o gel foi observado em um transluminador acoplado ao aparelho de fotodocumentação modelo *Eagle Eye TMIII* (Stratagene), equipado com o *software Eagle Sight*. A análise do gel em luz ultra-violeta propiciou a verificação da qualidade dos produtos de extração, ou seja, se as amostras estavam livres da presença de interferentes utilizados no processo, como por exemplo, o fenol.

4.5. Purificação dos extratos de DNA das comunidades microbianas

Os extratos de DNA das comunidades microbianas foram purificados em *kit Wizard DNA Clean-Up System* (Promega), com o objetivo de minimizar os efeitos adversos de possíveis interferentes, presentes nas amostras de sedimentos, nas reações de amplificação dos fragmentos de DNAr 16S, pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), bem como tentar melhorar a qualidade dos produtos amplificados. Depois de purificados, os extratos de

DNA das comunidades microbianas foram precipitados com etanol e diluídos em água ultra-pura (0,5mL) para manter as concentrações dos mesmos entre 10ng/ μ L e 20ng/ μ L.

O procedimento de purificação dos extratos de DNA das comunidades microbianas foi realizado porque, de acordo com Nakayama (comunicação pessoal) e Saia (2005), o sedimento coletado em frente ao terminal portuário da COSIPA apresentava aspecto lodoso e consistência viscosa semelhante à graxa, além de uma coloração preta com brilho furta cor, indicando a presença de substâncias oleaginosas no ponto de coleta amostrado, as quais poderiam interferir nas reações de amplificação do DNAr 16S das comunidades microbianas, pela PCR.

O procedimento de purificação foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, com algumas modificações, conforme apresentado a seguir.

1. Remover o êmbolo de uma seringa estéril (3,0mL) e deixá-lo ao lado da mesma;
2. Acoplar a micro-coluna na extremidade da seringa;
3. Aquecer o frasco contendo a resina *Wizard DNA Clean-Up*, a 37 °C por 10 minutos;
4. Agitar o mesmo vigorosamente para dissolver os cristais presentes na solução;
5. Resfriar o frasco até atingir a temperatura de 25 °C;
6. Adicionar 1,0mL da resina mais 500 μ L do extrato de DNA em um tubo de microcentrífuga (1,5mL);
7. Inverter gentilmente o tubo para homogeneizar a mistura (5 vezes);
8. Transferir a mistura (resina + DNA ligado) para a seringa, inserir e empurrar o êmbolo com cuidado até todo o volume ter passado pela microcoluna;
9. Desacoplar a microcoluna da seringa, remover o êmbolo e acoplá-lo novamente à seringa;
10. Adicionar à seringa 2,0mL de isopropanol 80% (Synth), inserir e empurrar o êmbolo gentilmente até que toda a solução passe pela microcoluna;
11. Transferir a microcoluna para o tubo de microcentrífuga (1,5mL);
12. Centrifugar a mistura, por 2 minutos a 13.000x g, para secar a resina;
13. Deixar a microcoluna em temperatura ambiente para evaporar o isopropanol (5 minutos);

14. Transferir a microcoluna para outro tubo de microcentrífuga, adicionar à mesma 50 μ L de água deionizada aquecida (65 °C) e aguardar 5 minutos;
15. Centrifugar a microcoluna para eluir o DNA ligado, por 20 segundos, a 13.000x g;
16. Descartar a microcoluna e estocar o DNA purificado em freezer (-20 °C).

4.6. Precipitação dos extratos de DNA purificados das comunidades microbianas

Todos os extratos de DNA purificados foram submetidos ao processo de precipitação com etanol (Mallinckrodit) com a intenção de concentrar as quantidades desses ácidos nucléicos. Todas as etapas realizadas estão descritas a seguir.

1. Adicionar 1,0mL de etanol gelado (100%) em um tubo de microcentrífuga (1,5mL) contendo 1,0mL da amostra de DNA purificado;
2. Homogeneizar a mistura invertendo o tubo gentilmente por 5 vezes;
3. Deixar o tubo em repouso à temperatura ambiente, durante 2 minutos;
4. Centrifugar o tubo a 6.000rpm, por 3 minutos;
5. Descartar o sobrenadante;
6. Adicionar à mistura 50 μ L de etanol gelado (70%);
7. Repetir os passos 5 e 6;
8. Transferir a mistura para outro tubo de microcentrífuga (1,5mL);
9. Colocar o tubo, com a tampa aberta, em uma gaveta até todo o etanol evaporar (\approx 4 horas);
10. Diluir o precipitado com água ultra-pura estéril (0,5mL);
11. Armazenar a amostra em freezer (-20 °C) até o momento da utilização.

4.7. Iniciadores utilizados nas amplificações dos fragmentos de DNAr 16S purificados das comunidades microbianas, pela técnica da PCR

Inicialmente, os extratos purificados do DNA total das comunidades microbianas dos consórcios NP3 e DCPpir foram submetidos à reação em cadeia da polimerase para amplificar os fragmentos dos genes de interesse utilizando pares de iniciadores específicos 20F/958R,

344F/1400R e D30F/D40R, os quais foram descritos em trabalhos que detectaram microrganismos pertencentes ao Domínio *Archaea*, incluindo os grupos metanogênicos e halofílicos extremos (Arahal *et al.*, 1996; Kudo *et al.*, 1997; Béja *et al.*, 2000; Casamayor *et al.*, 2000; Orphan *et al.*, 2001). Para o Domínio *Bacteria* foram utilizados os iniciadores 27F/907R (So & Young, 1999). Os produtos de amplificação dos fragmentos de DNA dessas amostras foram utilizados para a construção de bibliotecas genômicas.

Por sua vez, os fragmentos de genes presentes nos extratos purificados de DNA das comunidades microbianas de todas as amostras dos consórcios proveniente dos sedimentos submetidos ou não ao processo de pasteurização, inclusive a NP3 e DCPpir, foram amplificados com os iniciadores 1100F/1400R (Kudo *et al.*, 1997) e 968F/1392R (Nielsen *et al.*, 1999) denominados universais para os grupos de arqueias e bactérias, respectivamente. Os produtos de amplificação dos fragmentos de DNA de todas essas comunidades foram utilizados na realização da DGGE. As seqüências de todos os iniciadores e os tamanhos dos fragmentos de genes amplificados estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Características gerais dos diferentes iniciadores utilizados na amplificação dos fragmentos de DNAr 16S das comunidades microbianas de arqueias e bactérias, pela técnica da PCR.

	Iniciadores	Seqüência (5'- 3')	Tamanho dos fragmentos amplificados	Fragmentos de DNA amplificados
<i>Domínio Bacteria</i>	27F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	880pb	Biblioteca genômica clonagem e seqüenciamento
	907R	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT		
	968F	AAC GCG AAG AAC CTT AC	424pb	DGGE (grupo de GC) clonagem seqüenciamento
	1392R	ACG GGC GGT GTG TAC		
<i>Domínio Archaea</i>	20F	TTC CGG TTG ATC CYG CCR G	938pb	Biblioteca genômica clonagem e seqüenciamento
	958R	YCC GGC GTT GAM TCC AAT T		
	344F	AC GGG GYG CAG CAG GCG CGA	1056pb	Biblioteca genômica clonagem e seqüenciamento
	1400R	CGG CGA ATT CGT CGA AGG AGC AGG GAC		
	D30F	ATT CCG GTT GAT CCT GC	1107pb	Biblioteca genômica clonagem e seqüenciamento
	D34R	GGT CTC GCT CGT TGC CTG		
	1100F	AAC CGT CGA CAG TCA GGY AAC GAG CGA C	300pb	DGGE (grupo de GC) clonagem seqüenciamento
	1400R	CGG CGA ATT CGT CGA AGG AGC AGG GAC		

4.7.1. Condições para as reações de amplificação dos fragmentos de DNAr 16S

As reações para a PCR foram preparadas com reagentes do *Kit Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante, com algumas modificações. As concentrações finais de cada reagente na mistura de reação estão apresentadas na Tabela 6. Os volumes de DNA molde utilizados nas reações variaram entre 1,0µL e 7,0µL, de acordo com as concentrações, desses ácidos nucléicos, presentes nas amostras dos consórcios microbianos. Os microrganismos *Methanosaeta* sp. e *Rhodopseudomonas* sp. (ATCC[®])⁷ foram utilizados como controles positivos nas amplificações dos fragmentos do DNAr 16S dos microrganismos pertencentes aos Domínios *Archaea* e *Bacteria*, respectivamente. Os mesmos foram utilizados como controles negativos para os Domínios opostos.

As condições para as reações de amplificação foram realizadas de acordo com as características dos diferentes iniciadores em um termociclador *Gene Amp PCR System 2400* (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn) e estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 6. Composição da mistura para a reação de amplificação dos fragmentos de DNAr 16S pela PCR.

Reagentes	Volume utilizado de reagentes na reação da PCR	Concentração final dos reagentes na reação da PCR (50µL)
Tampão sem magnésio (10 x)	5,0µL	1 x
MgCl ₂ (50 mM)	1,5µL	1,5 mM
dNTPs* (2 mM)	5,0µL	0,2 mM
Iniciador F (100 pmol)	0,5µL	1 pmol
Iniciador R (100 pmol)	0,5µL	1 pmol
Taq DNA polimerase (5 U)	0,5µL	2,5 U
DNA molde	1,0µL - 7,0µL	5ng - 20ng
Água deionizada	30,0µL - 36,0µL	-

*N = adenina, timina, citosina e guanina

⁷ ATCC: American Type Culture Collection – The Global Bioresource Center (<http://www.atcc.org/Home.cfm>).

Tabela 7. Condições utilizadas no termociclador para a amplificação dos fragmentos de DNAr 16S com os diferentes iniciadores, pela técnica de PCR.

Iniciadores	Ciclos	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Final da extensão	Resfriamento
27F	20	95° C 5 min	94 °C 30 s	45 °C 40 s	72 °C 1 min	-	-
907R	15	-	94 °C 30 s	40 °C 40 s	72 °C 1 min	72 °C 7 min	4 °C
968F/968F-GC 1392R	35	94° C 5 min	94 °C 45 s	63 °C 60 s	72 °C 2 min	72 °C 10 min	4 °C
20F 958R	35	94 °C 1,5 min	94 °C 30 s	55 °C 30 s	72 °C 1,5 min	72 °C 7 min	4 °C
344F 1400R	35	94 °C 1,5 min	94 °C 30 s	55 °C 30 s	72 °C 1,5 min	72 °C 3 min	4 °C
D30F D34R	35	94 °C 1,5 min	94 °C 45 s	50 °C 45 s	72 °C 1,5 min	72 °C 15 min	4 °C
1100F-GC 1400R	35	94 °C 5 min	94 °C 30 s	55 °C 30 s	72 °C 1,5 min	72 °C 5 min	4 °C

4.8. Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

Para a realização da DGGE foram utilizados os fragmentos de DNAr 16S amplificados, de todos os consórcios microbianos (R1, P1, P2, NP1, NP2, NP3, NP4, DCPpir), com iniciadores contendo grampos de GC ligados à terminação 5' do iniciador da seqüência senso. Para o Domínio *Bacteria* foram utilizados os iniciadores 968F-GC/1392R e para o Domínio *Archaea* os iniciadores 1100F-GC/1400R, nas mesmas condições descritas na Tabela 7. As seqüências dos grampos de GC para cada iniciador estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8. Iniciadores e as correspondentes seqüências dos grampos de GC utilizados na DGGE.

Iniciador	Seqüência do grampo de GC (5'- 3')
968F-GC	CGC CCG GGG CGC GCC CCG
1100R-GC	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G

Fonte: Kudo *et al.* (1997) e Nielsen *et al.* (1999).

Os microrganismos *Methanosarcina barkeri* (ATCC[®]) e *Escherichia coli* (FAT)⁸ foram utilizados como controles positivos e negativos para os fragmentos de DNAr 16S amplificados com os iniciadores específicos para os Domínios *Archaea* e *Bacteria*, respectivamente.

Na DGGE, foram testados dois gradientes lineares de desnaturação (30% e 70%, 40% e 60%) em géis de acrilamida (16cm x 16cm x 1mm) para analisar a melhor condição de separação dos fragmentos dos genes amplificados pela PCR. Os agentes desnaturantes utilizados foram a uréia (Promega) e a formamida (Mallinckrodit). A montagem dos géis e a separação dos fragmentos de DNA pela técnica de DGGE foram realizadas em um sistema formador de gradiente Modelo 475 (Bio-Rad). Os géis foram fotografados e analisados em fotodocumentador *Eagle Eye TMIII* (Stratagene) acoplado ao computador equipado com o *Software Eagle Sight*. Os procedimentos de todas as etapas realizadas na DGGE, assim como a operacionalização do aparelho e a preparação das soluções utilizadas foram descritas detalhadamente por Sakamoto (2001) e Brucha (2001). A seguir serão apresentados resumidamente o preparo das amostras e o procedimento para a realização desta importante ferramenta molecular.

4.8.1. Preparação dos produtos da PCR utilizados na técnica de DGGE

1. Adicionar 4µL do corante *loading dye* (2x) em 20µL do produto de PCR proveniente do DNAr 16S de cada amostra de consórcio.

4.8.2. Procedimento para a realização da técnica de DGGE

1. Preparar as soluções desnaturantes em concentrações de 0%, 30%, 40%, 60% e 70% (Tabela 9);
2. Dissolver a uréia nos reagentes líquidos, completar o volume para 100,0mL com água deionizada e armazenar a solução a 4 °C;

⁸ FAT: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello (<http://www.bdt.fat.org.br/>).

3. Montar o “sanduíche” do gel em gradiente em paralelo com o conjunto de placas de vidro e suporte;
4. Preparar separadamente as soluções para a confecção dos géis de acrilamida em concentrações de 0%, 30%, 40%, 60% e 70% em tubos Falcon (15,0mL) mantidos em gelo, de acordo com a Tabela 10;
5. Transferir as soluções dos tubos nas concentrações desejadas (30%-70% ou 40%-60%) simultaneamente para o “sanduíche” de placas de vidro, com auxílio de duas seringas acopladas ao aparelho de injeção;
6. Aguardar 10 minutos e inserir o “pente” na parte superior do gel para formar as canaletas;
7. Injetar a solução 0% (*stacking gel*) com micropipeta e deixar o gel polimerizar por 14 horas;
8. Adicionar 140,0mL de TAE 50x (Tris-acetato 0,04M, EDTA 0,5M) em cuba eletroforética, completar o volume para 7,0L com água deionizada e aquecer o tampão de corrida a 60 °C;
9. Transferir o “sanduíche” para a cuba, retirar o pente e lavar as canaletas do gel com o tampão, com auxílio de micropipeta;
10. Aplicar as amostras com ponteiras de seqüenciamento nas respectivas canaletas;
11. Ligar a bomba de agitação, conectar os eletrodos em 130V;
12. Aguardar o tempo de corrida de 6h;
13. Após a eletroforese, desligar o sistema, retirar o “sanduíche” de placas e deixar secar sobre papel absorvente para retirar o excesso de tampão;
14. Transferir o gel das placas para bandeja contendo solução diluída do corante brometo de etídeo em água (1µL/mL), durante 10 minutos;
15. Secar o excesso da solução com papel absorvente;
16. Deixar o gel durante 5 minutos em água deionizada para retirar o excesso de corante;
17. Colocar o gel no transluminador e analisar as imagens;

18. Recortar as “bandas” de interesse do gel com um bisturi e armazená-las individualmente em tubos de microcentrífuga (1,5mL) contendo 30µL de água deionizada;
19. Armazenar os tubos a 4 °C, durante 24 horas;
20. Centrifugar os tubos a 6.000rpm, por 10 segundos, para que o DNA presente nas “bandas” migre para a água deionizada;
21. Armazenar os tubos em geladeira por no máximo 1 semana.

Tabela 9. Componentes utilizados na preparação das soluções desnaturantes.

Componentes	Concentrações				
	0%	30%	40%	60%	70%
Acrilamida 40% (mL)	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Solução TAE 50x (mL)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Formamida deionizada (mL)	0	12,0	16,0	24,0	28,0
Uréia (g)	0	12,6	16,8	25,2	29,4

Tabela 10. Volumes das soluções utilizadas para a confecção dos géis de acrilamida com diferentes gradientes de desnaturação.

Componentes	Concentrações				
	0%	30%	40%	60%	70%
Solução desnaturante (mL)	3,0	14,0	14,0	14,0	14,0
Persulfato de amônia 10% (µL)	20,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Tetrametiletilenodiamina (TEMED) (µL)	2,0	10,0	10,0	10,0	10,0

4.8.3. Padrões de “bandas” obtidos na DGGE: análise da estrutura das comunidades e estimativa da diversidade microbiana

Os padrões de “bandas” obtidos na DGGE foram utilizados para auxiliar na análise da estrutura das comunidades de bactérias e arqueias, em função da composição e riqueza de espécies, bem como na diversidade entre as comunidades, utilizando o conceito de diversidade beta sugerido por Whittaker⁹ (1960) *apud* Odum (1988). A estimativa da diversidade beta foi

⁹ Whittaker, R. H. (1960). Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. *Ecological Monographs*, Arizona, vol. 30, 279 – 338.

realizada pela análise de agrupamento do tipo *cluster* a partir de uma matriz com dados de presença e ausência das “bandas” verificadas em cada amostra. Nesta análise foi utilizada a medida de dissimilaridade de Sorensen (Equação 1), empregada para dados qualitativos, como coeficiente de associação da análise de agrupamento (Magurran, 1989) e o método de ligação baseado na média do grupo (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean - UPGMA*), os quais também foram empregados por Nakayama (2005). Toda a análise de agrupamento foi realizada utilizando o programa computacional livre “R” (versão 2.2.1), disponível gratuitamente no sítio eletrônico <http://www.r-project.org>.

Equação 1:

$$C_s = 2 \cdot j \cdot (a + b)$$

Onde:

j = Número de espécies comuns entre as amostras a e b

a = Número de espécies da amostra a

b = Número de espécies da amostra b

4.9. Amplificação e purificação do DNAr 16S presente nas “bandas” do gel de DGGE

Os fragmentos de DNAr 16S, presentes em cada banda recortada do gel de DGGE, correspondentes os respectivos consórcios microbianos (R1, P1, P2, NP1, NP2, NP3, NP4 e DCPpir), foram novamente amplificados pela técnica da PCR utilizando os mesmos iniciadores descritos no item 4.7, porém sem os grampos de GC acoplados à extremidade 5' da seqüência senso. As concentrações dos reagentes e as condições para as reações de amplificação também foram as mesmas descritas nas Tabelas 6 e 7, respectivamente, exceto os volumes de DNA molde que variaram entre 8,0 e 15,0 µL. Os produtos da PCR foram submetidos à separação eletroforética em gel de agarose 1% utilizando o padrão de massa molecular *Low DNA Mass Lader* (Invitrogen) que permite estimar a quantidade de DNA obtido na reação de

amplificação. As quantidades do marcador, das amostras e do corante *Loading Dye* utilizados na eletroforese, bem como a quantificação do DNA e a visualização das “bandas” no gel de agarose foram às mesmas descritas no item 4.4 deste capítulo.

As “bandas” obtidas no gel de agarose 1%, contendo os fragmentos de DNA amplificados de cada consórcio, pela PCR, foram recortadas e acondicionadas individualmente em tubos de microcentrífuga (1,5mL). Em seguida cada “banda” foi purificada em kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), de acordo o procedimento descrito neste item. O processo de purificação, descrito a seguir, foi necessário para separar os fragmentos de DNAr 16S do gel e também retirar os resíduos dos reagentes utilizados na reação, pois estes últimos podem interferir no sucesso das etapas de clonagem e/ou seqüenciamento. Depois de purificadas, alíquotas de 2 μ L de cada amostra foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, conforme descrito anteriormente, para verificar se o processo de purificação foi efetivo, ou seja, se havia a presença de uma única banda para cada amostra analisada.

1. Adicionar 10 μ L de *Membrane Binding Solution* para cada 10mg de gel de agarose armazenado no tubo de microcentrífuga (1,5mL);
2. Agitar o tubo em vórtex para que a solução entre em contato com o gel;
3. Colocar o tubo em banho termostático, em temperatura entre 50 °C e 60 °C, até o gel ser dissolvido completamente;
4. Acoplar a mini-coluna ao tubo coletor;
5. Transferir o gel dissolvido mais a *Membrane Binding Solution* para a mini-coluna;
6. Incubar a mistura à temperatura ambiente durante 1 minuto;
7. Centrifugar a 10.000x g por 1 minuto, descartar o líquido do tubo coletor e inserir novamente a mini-coluna ao mesmo;
8. Adicionar 700 μ L de *Membrane Wash Solution* (com etanol) e repetir o passo 7;

9. Repetir o passo anterior com 500 μ L de *Membrane Wash Solution* e centrifugar a 10.000x g por 5 minutos;
10. Transferir com cuidado a mini-coluna para um tubo de microcentrífuga limpo (1,5mL);
11. Adicionar 25 μ L de água deionizada, incubar a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugar a 10.000x g por 1 minuto;
12. Descartar a mini-coluna e armazenar o DNA a 4°C ou -20°C, até o momento de ser utilizado nas etapas de clonagem e seqüenciamento.

4.10. Clonagem dos fragmentos de DNAr 16S de interesse

Os fragmentos de DNAr 16S dos consórcios microbianos (R1, P1, P2, NP1, NP2, NP3, NP4 e DCPpir), amplificados e purificados conforme descrito no item anterior, foram clonados com o objetivo de produzir várias cópias idênticas das seqüências do DNA recombinante. Todas as etapas envolvidas direta e indiretamente neste processo estão descritas nos próximos itens (4.10.1 a 4.10.5) e os fragmentos de DNAr 16S clonados foram as seguintes:

a. Consórcios NP3 e DCPpir (bibliotecas genômicas): os fragmentos de DNAr 16S destes consórcios microbianos foram clonados, a partir dos produtos da PCR amplificados com os iniciadores 20F/958R, 344F/1400R, D30F/D34R (*Archaea*) e 27F/907R (*Bacteria*), descritos no item 4.7. É importante ressaltar que antes de serem utilizados no processo de clonagem estes produtos da PCR também foram purificados pelo mesmo procedimento descrito no item 4.9, exceto nos três primeiros passos, os quais foram substituídos pela adição da *Membrane Binding Solution* em volume igual ao do produto de PCR.

b. Consórcios R1, P1, P2 e NP1, NP2, NP3, NP4 e DCPpir (DGGE): nestes consórcios a clonagem foi realizada utilizando os fragmentos de DNAr 16S amplificados com os iniciadores 968F/1392R (*Bacteria*) e 1100F/1400R (*Archaea*) oriundos das “bandas” de interesse correspondente a cada consórcio, as quais foram recortadas do gel de DGGE, conforme descrito nos itens 4.8 e 4.9.

4.10.1. Adenilação dos fragmentos de DNA

A adenilação, ou seja, a adição de deoxiadenosinas (dATP) às extremidades dos fragmentos de DNA amplificados foi realizada para garantir e também aumentar a eficiência de ligação dos mesmos ao vetor de clonagem. É necessário lembrar que durante a amplificação dos fragmentos pela PCR, a enzima *Taq* DNA-polimerase tende a acrescentar esse nucleotídeo na extremidade 3' de cada fita sintetizada, contudo pode ocorrer falha neste processo e a adenosina não ser adicionada. Tal fato dificulta ou até mesmo impossibilita a ligação desses fragmentos aos vetores de clonagem que contenham timidinas (dTTPs) em suas extremidades.

Os reagentes e os volumes utilizados na composição da mistura de adenilação estão descritos na Tabela 11 e foram preparados de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen). A adenilação de cada amostra foi realizada em temperatura de 72 °C, durante 30 minutos, em um termociclador modelo *PTC-100*TM (*Programable Thermal Controller* da Marca MJ Research Inc.), sem a utilização de ciclos.

Tabela 11. Composição da mistura para a adição de deoxiadenosina (dATP).

Reagentes	Volume utilizado na mistura para a mistura de adenilação (µL)
Tampão (10x)	1,5
dATP (1mM)	1,0
Taq DNA Polimerase (50x)	0,5
Produto de PCR purificado	10,0

4.10.2. Ligação dos fragmentos de DNA aos vetores de clonagem

Após a adenilação os fragmentos de DNA foram ligados a vetores de clonagem especiais de 3000pb, os quais continham timidinas (dTTP) em suas extremidades. Os marcadores de seleção presentes no vetor eram o gene de resistência a ampicilina e o gene *lacZ'*. A ligação desses fragmentos de DNA foi realizada pela ação da enzima T4 DNA-ligase e todo o processo foi executado de acordo com as instruções do fabricante do *pGEM*[®]-*T Vector*

SystemI (Promega), em câmara fria (4°C), durante 12 horas. Os reagentes utilizados e suas concentrações finais dos mesmos na mistura para a reação de ligação (10µL) foram as seguintes: Tampão de ligação T4 DNA ligase (2x), vetor de clonagem (50ng/µL), enzima T4 DNA ligase (3U/ µL). O volume dos produtos adenilados foi de 7,0µL. O mapa circular e linearizado do vetor de clonagem estão apresentados nas Figuras 19 e 20, respectivamente.

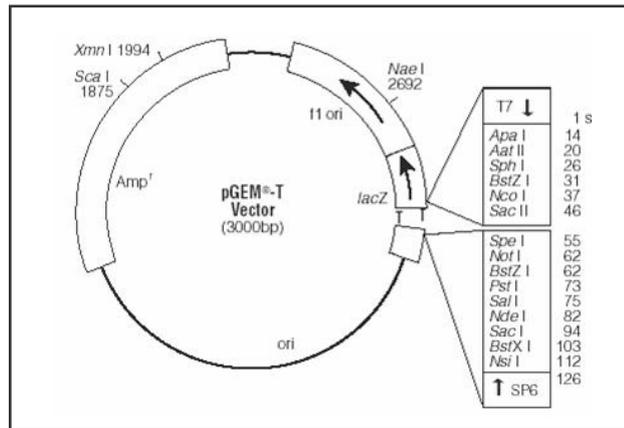


Figura 19. Mapa circular do vetor de clonagem *pGEM*[®]-T. (Fonte: Manual Técnico da Promega. Disponível no sítio eletrônico: www.promega.com).

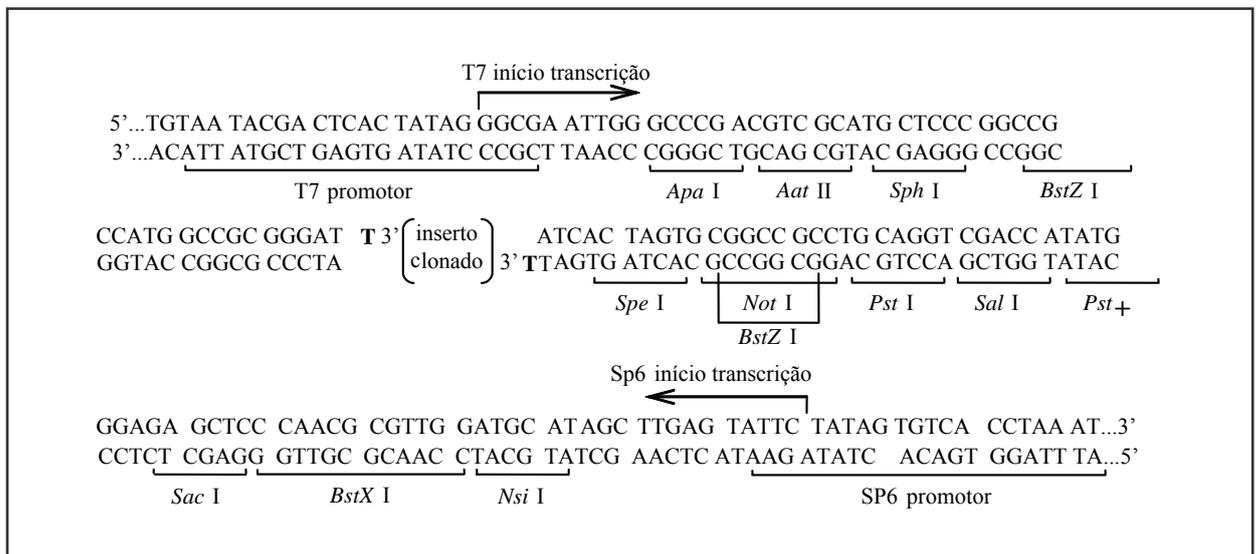


Figura 20. Mapa da região de clonagem do vetor *pGEM*[®]-T linearizado. As timidinas presentes nas extremidades 3' do vetor estão destacadas em negrito (Modificado a partir do Manual Técnico da Promega).

4.10.3. Transformação de recombinantes em células bacterianas

A etapa de transformação foi realizada de acordo com Sambrook *et al.* (1989) utilizando células competentes da linhagem de *E. coli* DH5α, as quais foram tratadas por um

processo químico com cloreto de cálcio (CaCl_2) para aumentar a capacidade de assimilação dos fragmentos de DNA exógenos (Ausubel *et al.*, 2001). Os materiais e reagentes utilizados para a obtenção das células recombinantes foram preparados sob condições de assepsia e todo o procedimento realizado em câmara de fluxo laminar.

▪ ***Preparo do meio sólido para o cultivo das colônias***

1. Liquefazer o meio sólido estéril LB (*Luria Bertane Medium*) em microondas;
2. Distribuir 20,0mL do meio em Tubo Falcon (50,0mL);
3. Esfriar o meio até uma temperatura agradável ao toque da mão;
4. Adicionar ao meio LB (40,0mL): 8,8 μL do antibiótico ampicilina (170mg/mL), 12,5 μL de isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG 1M) e 40,0 μL do açúcar X-Gal (50mg/mL);
5. Fechar o tubo e agitar suavemente para homogeneizar as soluções adicionadas ao meio;
6. Verter 20,0mL desse meio em uma placa de Petri;
7. Deixar o meio esfriar até o momento de ser utilizada.

▪ ***Condições utilizadas para a transformação de recombinantes em células bacterianas***

1. Retirar do *freezer* (-80 °C) o tubo contendo as células competentes (40,0 μL) e transferi-lo imediatamente para uma caixa de isopor contendo gelo picado;
2. Esperar o descongelamento das células competentes;
3. Adicionar 10,0 μL do produto de ligação aos 40,0 μL de células competentes;
4. Transferir essa mistura para um tubo de microcentrífuga de 1,5mL;
5. Colocar o tubo contendo a mistura em banho de gelo por 30 minutos;
6. Transferir o tubo para o banho termostaticado a 42°C, durante 1 minuto;
7. Colocar novamente o tubo em banho de gelo por 1 minuto;
8. Adicionar 250,0 μL de meio LB líquido à mistura;
9. Colocar, em posição inclinada, o tubo em um agitador a 37°C por 1 hora e 200rpm;

10. Adicionar 200µL dessa mistura à placa preparada anteriormente com meio sólido LB;
11. Adicionar 200µL dessa mistura à placa preparada anteriormente com meio sólido LB;
12. Distribuir esse volume na placa até que toda a amostra tenha sido absorvida pelo meio, com auxílio de uma alça de Drigauski esterelizada;
13. Incubar a placa a 37°C durante aproximadamente 14 horas.

4.10.4. Identificação e cultivo das colônias recombinantes

Após o período de incubação foi realizada a identificação das colônias que cresceram em meio LB suplementado com ampicilina, IPTG e *X-Gal*. As colônias recombinantes, as quais incorporaram os fragmentos de DNA exógenos ligados ao vetor plasmidial, apresentaram coloração branca, enquanto que as não recombinantes foram identificadas pela coloração azul.

Com o intuito de aumentar o número de células recombinantes e conseqüentemente a quantidade de DNA recombinante, as colônias brancas foram transferidas individualmente para frascos de vidro com tampas de rosca contendo meio líquido LB esterelizado (5,0mL) acrescido de 3,0µL de ampicilina (100µg/mL). Este antibiótico foi utilizado com o intuito de permitir apenas o crescimento das células recombinantes, as quais apresentam em seu plasmídeo o gene de resistência à ampicilina, impedindo assim o desenvolvimento de microrganismos oportunistas no meio. O número de colônias transferidas do meio sólido para o líquido foi:

- a. 10 a 69 colônias recombinantes** representantes das comunidades microbianas dos consórcios NP3 e DCPpir, cujos fragmentos do DNAr 16S foram amplificados com os iniciadores 27F/907R (*Bacteria*) e 20F/958R (*Archaea*) (obtidas de bibliotecas genômicas);
- b. 5 colônias recombinantes representantes** representantes das comunidades microbianas dos consórcios R1, P1, P2, NP1, NP2, NP3, NP4, DCPpir, cujos fragmentos de DNAr 16S foram amplificados com os iniciadores 968F/1392R (*Bacteria*) e 1100F/1400R (*Archaea*) (obtidas das “bandas” recortadas do gel de DGGE);

c. 4 colônias não recombinantes, escolhidas aleatoriamente, para serem utilizadas como controles negativos na etapa de verificação da qualidade do DNA recombinante obtido pelo método da lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989).

As condições propícias para o crescimento das colônias foram mantidas por aproximadamente 14 horas, em uma incubadora com temperatura e agitação constantes de 37°C e 250rpm, respectivamente. É importante salientar que os frascos contendo o meio líquido e as células foram incubados com as tampas semi rosqueadas para permitir a entrada de oxigênio nos mesmos.

4.10.5. Extração do DNA recombinante das células bacterianas

As células representativas de cada consórcio, que cresceram em meio líquido durante 14 horas, foram submetidas ao método da lise alcalina conforme descrito em Sambrook *et al.* (1989). Apesar de trabalhoso este método foi escolhido para romper as membranas celulares e permitir a extração do DNA recombinante. Os resultados da extração foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% com o padrão de massa molecular *High DNA Mass Ladder*, conforme descrito no item 4.4, para verificar a eficiência da clonagem. Este passo foi realizado com o intuito de analisar a qualidade do DNA recombinante extraído da célula bacteriana sem a necessidade de fazer novas reações da PCR, o que seria muito oneroso neste trabalho, devido aos custos dos reagentes utilizados na ferramenta molecular citada. A seguir está descrito detalhadamente o processo da lise alcalina.

1. Transferir todo o volume do meio líquido LB contido no frasco de vidro para um tubo de microcentrífuga* (1,5mL);
2. Centrifugar o tubo a 13.000rpm por 1 minuto,
3. Descartar o sobrenadante final e retirar o excesso do meio líquido do tubo de microcentrífuga invertendo-o sobre a superfície de um papel absorvente limpo;

4. Ressuspender o *pellet* em 100,0 μ L de GTE (Glicose-Tris-EDTA) e agitar o tubo em vórtex até a completa homogeneização da mistura;
5. Adicionar ao tubo 200,0 μ L de solução de NaOH/SDS;
6. Inverter gentilmente os tubos por 5 vezes e deixá-los em repouso em banho de gelo por 5 minutos;
7. Adicionar 150,0 μ L de acetato de potássio (5M, pH 5.0) e repetir o passo anterior;
8. Centrifugar o tubo por 5 minutos a 13.000rpm;
9. Transferir 400,0 μ L do sobrenadante para outro tubo de microcentrífuga (1,5mL);
10. Adicionar 800,0 μ L de etanol 100% e deixar o tubo em repouso a temperatura ambiente durante 2 minutos;
11. Centrifugar o tubo por 4 minutos a 13.000rpm e descartar o sobrenadante gentilmente;
12. Lavar o *pellet* com 1,0mL de etanol 70%;
13. Centrifugar novamente o tubo por 1 minuto a 13.000rpm e descartar o sobrenadante;
14. Deixar o *pellet* secar durante 12 horas**;
15. Adicionar 30,0 μ L de água ultra-pura e 1,0 μ L de RNase (10mg/mL);
16. Armazenar o tubo na geladeira durante 12 horas;
17. Centrifugar o tubo por 10 minutos a 13.000rpm para separar o *pellet* do sobrenadante;
18. Transferir o sobrenadante para outro tubo de microcentrífuga (1,5) e armazenar a amostra em temperatura de -20°C .

* Repetir os passos 1 e 2 até transferir todo o volume do meio de cultivo e observar a formação um *pellet* no fundo do tubo.

** Nesta etapa é importante deixar o tubo com a tampa aberta dentro de uma gaveta para evitar a entrada de poeira.

4.11. Seqüenciamento dos fragmentos do DNAr 16S

O seqüenciamento dos fragmentos do gene do RNAr 16S dos consórcios microbianos foi realizado para determinar a ordem dos nucleotídeos em cada segmento de DNA analisado.

Os seqüenciamentos dos fragmentos de gene dos consórcios NP3 e DCPpir, clonados diretamente dos produtos de amplificação pela PCR com os iniciadores 20F/958R, 344F/1400R, D30F/D34R e 27F/907R (biblioteca genômica) e dos consórcios R1, P1, P2 e NP1, NP2, NP3, NP4 e DCPpir, clonados a partir dos produtos de amplificação das “bandas” recortadas do gel de DGGE com os iniciadores 1100F/1400R e 968F/1392R específicos para os Domínios *Archaea* e *Bacteria*, respectivamente, foram realizados utilizando o kit *BigDye™ Terminator* (Applied Biosystems) em seqüenciador automático *ABI 377 DNA Sequencer* (Perkin Elmer), no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP). Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de seqüenciamento foram o T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG'-3') e o SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3') (Gibco BRL).

É importante salientar que os fragmentos de DNAr dos consórcios microbianos R1, P1, P2, NP1, NP2, NP3, NP4 e DCPpir amplificados apenas com os iniciadores 968F/1392R (*Bacteria*), a partir das “bandas” recortadas do gel de DGGE, também foram submetidos ao seqüenciamento direto dos produtos da PCR utilizando o kit *Dyynamic ET Dye Terminator* (GE) em seqüenciador de capilar automático *MegaBace 1000 DNA Analysis System* (Amersham Biosciences), utilizando os mesmos oligonucleotídeos descritos no item anterior (T7 e SP6), no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências (ICB-USP).

4.12. Processamento e análise filogenética das seqüências do DNAr 16S

A qualidade das seqüências do DNAr 16S foi verificada com o auxílio do programa *SeqMan* (*Lasergene Sequence Analysis Software* – DNASTar), através da análise dos eletroferogramas. As seqüências de alta qualidade foram então analisadas no programa *Bellerophon* (<http://foo.maths.uq.edu.au/%7Ehuber/bellerophon.pl>) (Huber *et al.*, 2004) para verificar se as mesmas não eram quimeras. As seqüências de baixa qualidade e as consideradas quiméricas não foram utilizadas na reconstrução das árvores filogenéticas.

Em seguida, na tentativa de identificar homólogos já caracterizados, as seqüências consenso foram comparadas com as depositadas nos Bancos de Dados Públicos *Ribosomal Database Project (RDP-II* - <http://rdp.cme.msu.edu/html> - versão 9.53) (Cole *et al.*, 2003) e *National Center for Biotechnology Information (NCBI* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando o programa *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)* (Altschul *et al.*, 1997).

As árvores filogenéticas foram construídas pelo método da máxima verossimilhança (MV) utilizando o programa *PhyML* (<http://atgc.lirmm.fr/phyml>) (Guindon & Gascuel, 2003) compilado em um *Intel C Compiler 10.0*, e executadas em um *PC Intel Core 2 Duo 2.4Ghz* com sistema operacional *Ubuntu 7.10*. O modelo utilizado do *PhyML* foi o tradicional *HKY*, com Ts/Tv , p -*invar* estimados, heterogeneidade entre os sítios obedecendo um modelo com distribuição gamma, com parâmetro estimado e quatro categorias. Os parâmetros de entrada foram as seqüências alinhadas no programa *MUSCLE 3.6* (<http://www.drive5.com/muscle/download3.6.html>) (Edgar, 2004), utilizando o esquema padrão.

As árvores consenso foram feitas utilizando programa *Consense* da distribuição *Phylip* (versão 3.67), usando a regra da maioria extendida, e tratadas como não enraizadas. Os números de replicações para os Domínios *Archaea* e *Bacteria* foram de 1735 e 1000, respectivamente. Os grupos externos (*outgroup*) foram *Thermotoga maritima* (*Bacteria*) e *Sulfolobus acidocaldarius* (*Archaea*).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação do método de extração do DNA total das comunidades microbianas

O emprego do método, modificado a partir de Griffiths *et al.* (2000) foi adequado para a extração do DNA total das comunidades microbianas dos consórcios presentes nas amostras de sedimentos estuarinos enriquecidos com fontes orgânicas, na presença de PCP ou DCP. A eficiência do método foi comprovada pela análise das imagens obtidas na eletroforese em gel de agarose (1%), na qual foi possível verificar que os extratos de DNA de todas as comunidades dos consórcios estudados apresentaram concentrações superiores a 20ng/μL e fragmentos de tamanhos com aproximadamente 10.000pb, ou seja, valores adequados para a amplificação dos fragmentos de DNAr pela técnica da PCR. Além disso, o método apresentou outros aspectos positivos como, por exemplo, a relativa simplicidade na execução de todas as etapas e a utilização de apenas 1,0g de sedimento para a extração do DNA total das amostras. Devido a essas características, Saia (2005) e Brucha (2007) também utilizaram este método para extrair o DNA total das comunidades microbianas presentes em um reator anaeróbico de leito fixo inoculado com sedimento estuarino enriquecido e PCP. A Figura 21 apresenta os resultados da extração do DNA total das comunidades microbianas dos consórcios estudados (R1, P1, P2, NP1, NP2, NP3, NP4 e DCPpir).

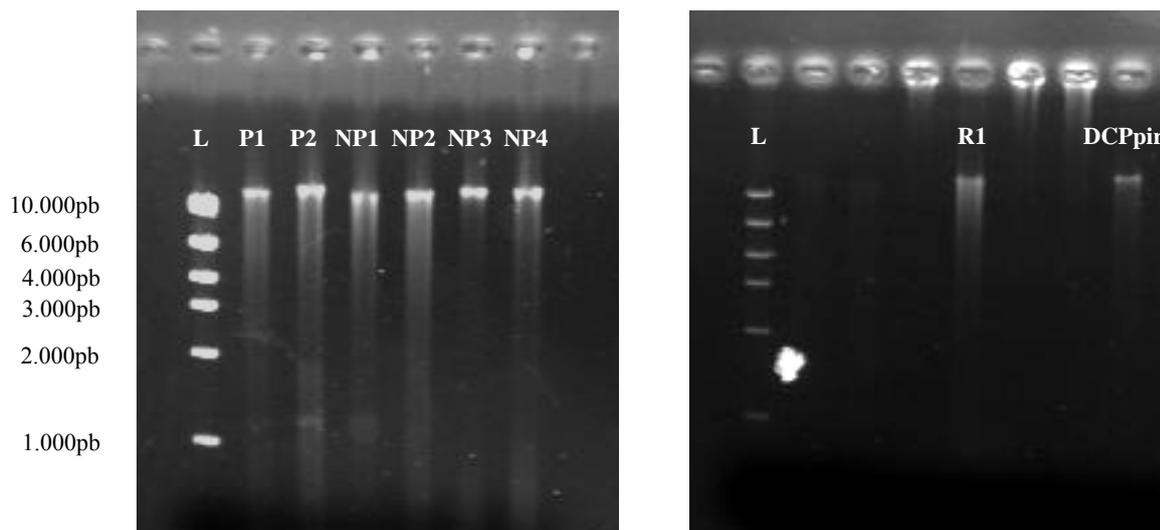


Figura 21. Eletroforese em gel de agarose (1%) da extração de DNA das comunidades dos consórcios microbianos. À esquerda estão apresentados os tamanhos de fragmentos de DNA correspondentes ao marcador (*ladder*).

5.2. Amplificação dos fragmentos de DNAr 16S das comunidades microbianas pela técnica da PCR

Depois de purificados, os extratos de DNAr 16S das comunidades microbianas dos consórcios estudados foram submetidos à técnica de PCR, utilizando diferentes pares de iniciadores, para verificar se os produtos de amplificação apresentariam concentrações de DNA suficientes para serem utilizadas nas técnicas de DGGE e de seqüenciamento. Os resultados mostraram que as concentrações desses produtos variaram entre 5 ng/ μ L e 20ng/ μ L, indicando que os fragmentos de DNA amplificados com os diferentes iniciadores poderiam ser empregados na realização das técnicas propostas. A Figura 22 apresenta apenas os resultados das amplificações dos fragmentos de DNAr 16S das comunidades de bactérias nos consórcios, pela técnica da PCR. A figura com os resultados referentes às comunidades de arqueias não será apresentados devido à má qualidade das imagens obtidas na eletroforese em gel de agarose (1%).

A utilização dos microrganismos *Methanosaeta* sp. e *Rhodopseudomonas* sp., como controles positivos e negativos, possibilitou a verificação da especificidade dos produtos

amplificados na técnica de PCR para os Domínios *Archaea* e *Bacteria*, respectivamente.

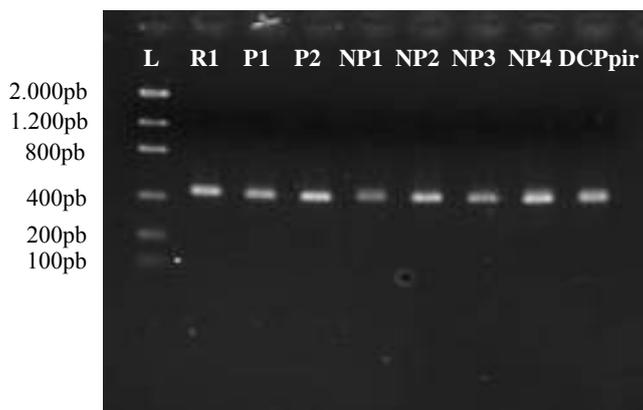


Figura 22. Eletroforese em gel de agarose (1%) da amplificação dos fragmentos de DNAr 16S das comunidades bacterianas dos consórcios microbianos, pela técnica de PCR. À esquerda estão apresentados os tamanhos de fragmentos de DNA correspondentes ao marcador (*ladder*).

5.3. Obtenção das seqüências de DNAr 16S das comunidades microbianas a partir de bibliotecas genômicas e DGGE

Esta etapa experimental teve como objetivo obter seqüências específicas de DNAr 16S para investigar a diversidade das comunidades de arqueias e bactérias nos consórcios microbianos, bem como analisar a filogenia dos microrganismos encontrados. As seqüências correspondentes às regiões do DNAr 16S de arqueias e bactérias foram obtidas a partir de bibliotecas genômicas e da técnica de DGGE, seguidas de clonagem e seqüenciamento.

5.3.1. Consórcios microbianos NP3 e DCPpir: bibliotecas genômicas

Inicialmente, os fragmentos de DNAr 16S de todos os consórcios microbianos estudados (R1, P1, P2, NP1, NP2, NP3, NP4, DCPpir) foram submetidos à PCR com os iniciadores 20F/958R, 344F/1400R, D30F/D40R (*Archaea*) e 27F/907R (*Bacteria*) com o intuito de utilizar os produtos da amplificação na construção de bibliotecas genômicas e, desta forma, obter seqüências de fragmentos de DNA com tamanhos entre 850pb e 1000pb para analisar a diversidade e a filogenia dos microrganismos. Esta estratégia foi adotada porque, de acordo com Briée *et al.* (2007), vários trabalhos realizados com consórcios microbianos

oriundos de amostras de sedimentos enriquecidos, provenientes de ambientes contaminados com compostos tóxicos, obtiveram informações valiosas sobre a diversidade e filogenia microbiana a partir da análise de seqüências de fragmentos de DNAr 16S com tamanhos entre 850pb e 1000pb. Para verificar se esta estratégia produziria seqüências de boa qualidade e com tamanhos entre 850pb e 1000pb, foram construídas inicialmente bibliotecas genômicas apenas com os consórcios microbianos NP3 e DCPpir. Tais consórcios foram escolhidos à priori, por questões de praticidade e economia, pois ambos apresentaram menor riqueza de espécies em relação aos demais, conforme relatado em Nakayama (2005), facilitando assim a manipulação e a análise de menores quantidades de clones e seqüências, respectivamente. O número total de seqüências obtidas em ambos os consórcios, a partir dos fragmentos de DNA amplificados com os diferentes iniciadores, está apresentado na Tabela 12.

Tabela 12. Número total de seqüências obtidas a partir de bibliotecas genômicas dos consórcios microbianos NP3 e DCPpir.

Domínio	Iniciadores utilizados na amplificação dos fragmentos de DNAr	Número total de seqüências	
		NP3	DCPpir
<i>Archaea</i>	20F/958R	69	59
	344F/1400R	20	25
	D30F/D40R	10	11
<i>Bacteria</i>	27F/907R	68	44

Em relação ao Domínio *Archaea*, notou-se que o maior número de seqüências foi obtido a partir da clonagem dos fragmentos de DNAr amplificados com os iniciadores universais 20F/958R. A análise das seqüências revelou que as mesmas apresentaram boa qualidade, porém com tamanhos menores que 800pb. Por exemplo, no sentido senso (*forward*) a maioria das seqüências apresentou tamanho de aproximadamente 350pb, sendo que algumas o tamanho foi entre 500pb e 700pb, e no sentido anti-senso (*reverse*), encontrou-se tamanho de apenas 200pb. Somente as seqüências com tamanhos maiores que 350pb foram utilizadas para

analisar a diversidade das comunidades e a filogenia de arqueias e bactérias presentes nos consórcios NP3 e DCPpir.

As seqüências obtidas a partir da clonagem dos fragmentos de DNAr dos consórcios NP3 e DCPpir, amplificadas com os iniciadores específicos para grupos metanogênicos (344F/1400R), apresentaram baixa qualidade e tamanhos menores que 300pb e, portanto, não foram utilizadas. Estes resultados não corresponderam à expectativa, levando-se em conta as seqüências de boa qualidade com tamanhos de aproximadamente 1000pb, obtidas por Piza (2004) aplicando os mesmos iniciadores para amplificar fragmentos de DNAr de arqueias em amostras de sedimentos estuarinos coletados em frente ao terminal portuário da COSIPA e bastante semelhantes às estudadas na presente tese. Os resultados da autora permitiram identificar diversos grupos de microrganismos metanogênicos e caracterizar a diversidade das comunidades de arqueias, a partir de bibliotecas genômicas.

Os fragmentos de DNAr amplificadas com os iniciadores D30F/D40R foram submetidos à clonagem, porém foram obtidas poucas colônias recombinantes nas bibliotecas genômicas representantes de cada consórcio microbiano (Tabela 12). Para verificar se havia ocorrido algum problema na execução do processo, os fragmentos de DNAr dos consórcios foram novamente amplificadas e clonados. Para tanto, foram utilizados novos reagentes e células competentes recém preparadas. Mesmo assim, não se observou aumento no número de clones na construção das novas bibliotecas genômicas. As poucas seqüências obtidas nessas condições apresentaram tamanhos inferiores a 50pb e também não puderam ser utilizadas no estudo sobre a composição das comunidades microbianas. Isto pode ter ocorrido devido à elevada especificidade dos iniciadores, os quais amplificam regiões específicas do DNAr 16S de arqueias hiperhalófilas.

Para o Domínio *Bacteria*, a clonagem e o seqüenciamento dos fragmentos de DNAr, amplificadas com os iniciadores 27F/907R resultaram em seqüências de boa qualidade e com

tamanhos entre 400pb e 550pb no sentido senso e aproximadamente 100pb no sentido anti-senso. Apesar de não terem sido obtidas seqüências de 880pb, àquelas com tamanhos superiores a 400pb foram utilizadas para analisar a diversidade das comunidades e a filogenia dos microrganismos presentes nas amostras.

Os resultados revelaram que a minoria das seqüências obtidas a partir das bibliotecas genômicas, correspondentes aos Domínios *Archaea* e *Bacteria* dos consórcios microbianos NP3 e DCPpir, apresentou a qualidade e o tamanho superior a 800pb. Por esse motivo, não foi realizada a construção das bibliotecas genômicas dos demais consórcios (R1, P1, P2, NP1, NP2 e NP4), como proposto inicialmente, pois o custo para a realização das mesmas poderia ser muito elevado e a probabilidade de obter seqüências de baixa qualidade e tamanhos indesejados seria alta, tomando como base os resultados dos consórcios NP3 e DCPpir. Desta forma foi resolveu-se utilizar outra estratégia, pela técnica de DGGE, para obter seqüências de fragmentos de DNAr e conseqüentemente informações sobre a diversidade e a filogenia dos microrganismos anaeróbios, presentes nos consórcios analisados.

5.3.2. Consórcios R1, P1, P2, NP1, NP2, NP3, NP4 e DCPpir: DGGE

Devido às razões citadas acima, optou-se em estudar a diversidade e a filogenia das comunidades de arqueias e bactérias presentes nos consórcios microbianos (R1, P1, P2, NP1, NP2, NP3, NP4, DCPpir) a partir de seqüências menores de fragmentos de DNAr 16S, com o auxílio da técnica de DGGE.

Como a técnica de DGGE possibilita apenas a separação de fragmentos de DNAr com tamanhos entre 100pb e 500pb, os fragmentos de todas as amostras foram amplificados, utilizando os iniciadores universais 1100F/1400R (*Archaea*) e 968F/1392R (*Bacteria*), para obter seqüências com extensões amplificadas de 300pb e 424pb, respectivamente. Vários autores utilizaram estes iniciadores para analisar a estrutura e a diversidade das comunidades microbianas em função da composição de espécies e relataram que o tamanho das seqüências

obtidas, pelo emprego dos mesmos, foi suficiente para tal propósito. Por exemplo, Nakayama (2005), Saia (2005) e Brucha (2007) utilizaram essa estratégia em seus estudos sobre as comunidades anaeróbias envolvidas indiretamente na degradação do pentaclorofenol e seus congêneres, em amostras de sedimentos estuarinos contaminados, e obtiveram informações valiosas sobre a estrutura, diversidade e filogenia desses microrganismos. Buzzini *et al.* (2005) também recomendaram a utilização desses iniciadores para estudar a diversidade de arqueias e bactérias em reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), alimentado água residuária de indústria de papel e celulose contendo clorofenóis. Cattony *et al.* (2005) apresentaram resultados importantes sobre a diversidade e a variação da estrutura da comunidade microbiana, degradadora de um hidrocarboneto mono-aromático tóxico, exposta a diferentes concentrações de tolueno em um reator anaeróbio de fluxo horizontal, utilizando os mesmos iniciadores.

Depois de amplificados, os fragmentos de DNAr dos consórcios estudados foram submetidos à DGGE para analisar a estrutura das comunidades e a diversidade dos microrganismos, a partir dos padrões de bandas formados, utilizando gradientes lineares de desnaturação de 30% - 70% e 40% - 60%. No entanto, os últimos foram adotados por propiciarem melhor separação das bandas no gel de poliacrilamida, promovendo assim melhores condições para analisar a estrutura das comunidades microbianas em função da composição e riqueza de espécies. O estudo sobre a filogenia de arqueias e bactérias também foi realizado a partir das seqüências do DNAr 16S provenientes de algumas bandas presentes no gel de DGGE (Figura 23 a e b). Para o Domínio *Archaea* foram selecionadas 11 bandas e para o Domínio *Bacteria* 13 bandas, as quais foram extraídas do gel, reamplificadas, clonadas e seqüenciadas.

Todas as seqüências representantes das populações de arqueias apresentaram boa qualidade e tamanho de 300pb, como o esperado e, portanto, puderam ser utilizadas para

analisar a filogenia dos microrganismos. O mesmo não foi verificado para o Domínio *Bacteria*, pois das 13 bandas selecionadas, apenas 4 resultaram em seqüências com as características necessárias para serem utilizadas nas análises propostas. Com o intuito de obter informações sobre todas as populações bacterianas amostradas e eliminar possíveis dúvidas sobre a qualidade das bandas, os fragmentos de DNAr amplificados de todas as amostras foram novamente submetidos à DGGE, clonagem e seqüenciamento, no entanto não houve alteração nos resultados.

Como não foi obtido sucesso nas tentativas anteriores, optou-se em seqüenciar diretamente os produtos re-amplificados de cada banda. Porém, as seqüências obtidas por esse processo apresentaram baixa qualidade e muitas ambigüidades e, assim, não puderam ser incluídas nas análises de diversidade e filogenia. Diversos trabalhos realizados com consórcios microbianos anaeróbios provenientes de ensaios de enriquecimento de sedimentos também relataram as dificuldades em obter seqüências de boa qualidade para a identificação de bactérias, a partir de bandas extraídas do gel de DGGE. Por exemplo, Nakayama (2005) e Brucha (2007), descreveram o mesmo problema e não conseguiram utilizar as seqüências para identificar as espécies presentes nas comunidades bacterianas envolvidas indiretamente na degradação do PCP em amostras de sedimentos estuarinos de Santos-São Vicente. Nastasi (2005) também não obteve sucesso na obtenção de seqüências de boa qualidade e por esse motivo não conseguiu investigar a diversidade de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos e de bifenilos policlorados (PCB's) em consórcios microbianos originados de amostras de sedimentos marinhos coletados no Brasil e na Antártica.

De acordo com Kowalchuk *et al.* (1997), a técnica de DGGE apresenta algumas limitações como, por exemplo, a sobreposição de bandas. Segundo o autor, a visualização de uma banda no gel não garante que a mesma contenha apenas o fragmento de DNA de um determinado microrganismo. Isto significa que a identificação de espécies microbianas

realizadas a partir de bandas recortadas do gel de DGGE pode ser prejudicada pelo fato das mesmas conterem seqüências de dois ou mais microrganismos, gerando assim, resultados de má qualidade.

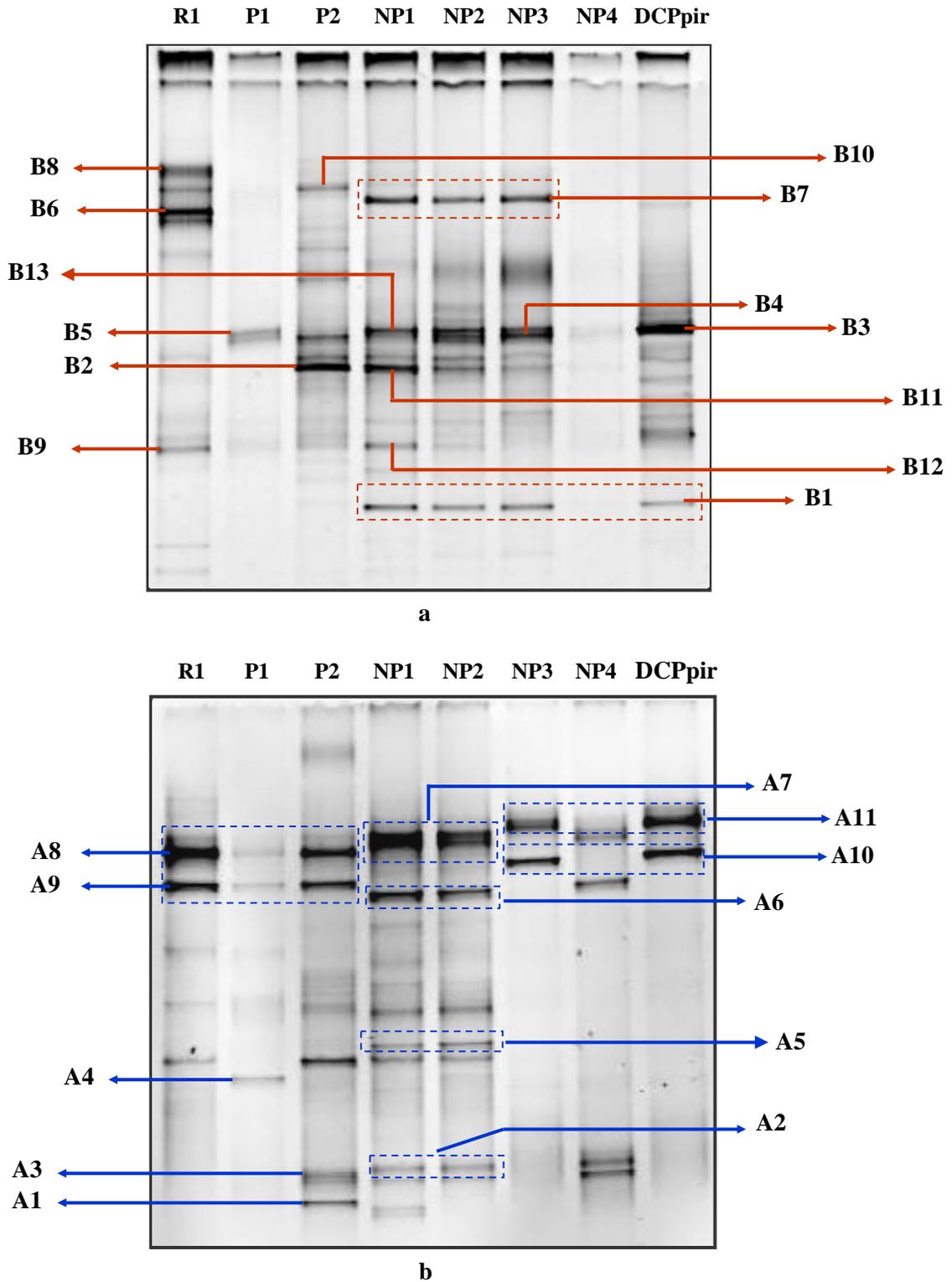


Figura 23. Padrões de bandas representantes das comunidades dos consórcios microbianos obtidos a partir da DGGE com gradientes de desnaturação de 40% e 60%. (a) Domínio *Bacteria*. (b) Domínio *Archaea*. Os retângulos e as setas indicam as bandas que foram extraídas do gel.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, verificou-se que a obtenção de seqüências do DNAr 16S de bactérias foi mais efetiva pela estratégia de utilização de bibliotecas genômicas, pois a mesma gerou seqüências de boa qualidade e com tamanhos entre 400pb e 550pb, revelando que este método pode resultar em dados mais seguros para o estudo da diversidade e filogenia dos microrganismos presentes nas amostras analisadas do que pela técnica de DGGE.

5.4. Análise das comunidades microbianas

A seguir estão apresentadas as análises sobre a estrutura, a diversidade e a filogenia das comunidades de arqueias e bactérias oriundas dos consórcios microbianos anaeróbios.

5.4.1. Análise da estrutura das comunidades de bactérias e arqueias

A estrutura das comunidades foi analisada em função da composição e riqueza de espécies de bactérias e arqueias nos consórcios microbianos, a partir dos resultados da DGGE (Figuras 24 e 27) e dos ensaios de degradação do PCP, do 2,3,4-TCP e do 2,6-DCP realizados por Nakayama (2005), os quais estão apresentados nas Figuras 25 e 26, respectivamente.

Foram analisados os padrões de bandas obtidos na DGGE, na qual cada banda foi considerada como uma população distinta na comunidade. De acordo com a definição, uma população é constituída por indivíduos da mesma espécie, portanto considerou-se que cada banda representou uma única espécie microbiana.

É importante salientar que a técnica de DGGE, quando realizada com fragmentos de DNAr amplificados com iniciadores universais, é capaz de detectar apenas as populações mais abundantes nas amostras (Low *et al.*, 2007). Deste modo, neste trabalho, as estimativas e inferências realizadas sobre a composição e a riqueza de espécies nas comunidades, referem-se apenas às populações de arqueias e bactérias que apresentaram tamanhos populacionais significativos nas amostras para serem detectadas pela DGGE. Isto posto, faz-se aqui a ressalva

que outras espécies estiveram presentes nas comunidades em questão, porém em tamanhos populacionais insuficientes para sensibilizar a técnica e por isso não puderam ser detectadas e analisadas. Portanto, o termo ausência de espécies, aqui utilizado, pode ser interpretado como se as mesmas não estivessem presentes nas amostras ou que não tenham sido detectadas pela técnica empregada.

5.4.1.1. Domínio *Bacteria*

Os consórcios microbianos R1, P1 e P2 apresentaram diferentes padrões de bandas entre si indicando que as comunidades bacterianas foram compostas por espécies distintas (Figura 24). Tal constatação pode ser explicada a partir dos resultados obtidos por Nakayama (2005) nos ensaios de degradação do PCP e do 2,6-DCP (Figuras 25 e 26).

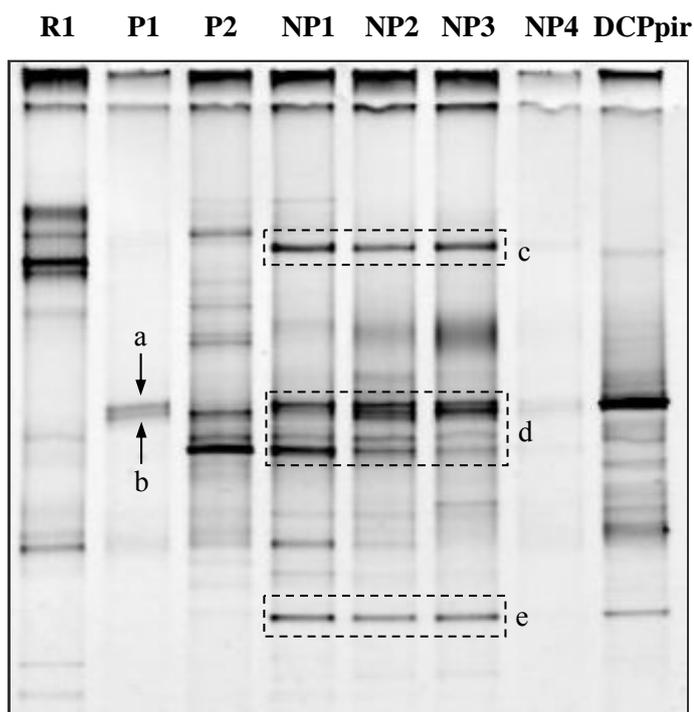


Figura 24. Perfis das comunidades bacterianas nos consórcios R1, P1, P2, NP1, NP2, NP3, NP4 e DCPpir obtidos a partir da DGGE com gradientes de desnaturação de 40% e 60%. Os retângulos mostram as populações presentes em mais de uma amostra e as setas as populações presentes em apenas uma amostra.

O consórcio R1 foi coletado no 272^o dia de incubação, período em que foi verificado o acúmulo de PCP e elevada concentração do 2,3,4-TCP (Figura 25a) no sistema. O excesso

desses compostos no meio pode ter atuado como um fator para a seleção dos microrganismos, ou seja, pode ter desfavorecido ou inibido o crescimento de determinadas espécies bacterianas. Em compensação, as populações desta comunidade que apresentaram tamanhos populacionais significantes, para serem detectadas pela DGGE, podem ter sido favorecidas pelas condições do enriquecimento do meio devido à disponibilidade de fontes orgânicas e doadores de elétrons.

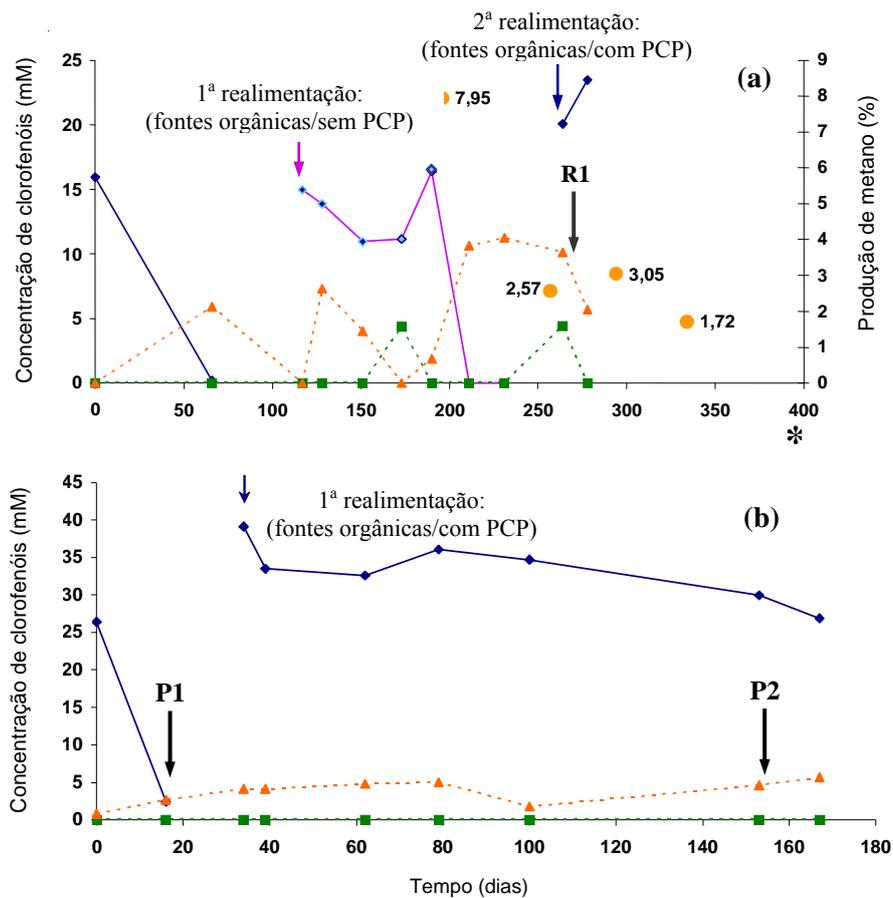


Figura 25. (a) Frasco R1 pasteurizado e (b) Frasco J "PCP" pasteurizado. Valores das concentrações de PCP (-♦-), 2,6-DCP (-■-), 2,3,4-TCP (-▲-) e da produção de metano (-●-). As setas pretas indicam os períodos em que os consórcios foram coletados. * A produção do gás metano foi de 1% durante todo o ensaio. Fonte: modificado de Nakayama (2005).

Os consórcios P1 e P2, originários do mesmo frasco de cultivo, foram coletados em momentos nos quais o sistema apresentava condições abióticas muito distintas (Figura 25b). O consórcio P1 foi coletado no 16º dia de incubação, período em que foi verificada a ocorrência de diversos problemas no sistema tais como a oxidação do meio de cultivo, a formação de material particulado insolúvel, a alteração do pH para valores próximos a 9,0 e a baixa

concentração do pentaclorofenol. Provavelmente, estes fatores desfavoreceram ou até mesmo inibiram o crescimento da maioria das espécies que já estavam aclimatadas às condições impostas no início da incubação do sistema, justificando assim a presença de poucas espécies na comunidade. Enquanto que o consórcio P2 foi coletado no final do ensaio (153^o dia), momento em que o sistema havia recuperado a estabilidade e conseqüentemente as condições para a degradação anaeróbia do PCP. Esses fatores positivos refletiram diretamente na composição da comunidade de P2, uma vez que as condições voltaram a ser favoráveis para o crescimento de um maior número de espécies em relação ao observado em P1 e R1.

As maiores riquezas de espécies foram observadas em P2, R1 e P1, respectivamente. Este resultado mostra que a comunidade de P2 foi composta por maior número de espécies que as demais porque foi coletada num momento em que o sistema apresentava condições mais favoráveis para o crescimento de várias populações de bactérias. É importante ressaltar que as espécies representadas pelas letras a e b foram encontradas apenas na comunidade do consórcio P1, mostrando que estas encontraram condições favoráveis para o seu crescimento apesar das adversidades verificadas no sistema.

Pelos resultados obtidos pode-se inferir que as adversidades ocorridas no meio como a entrada de oxigênio no sistema e o acúmulo de subprodutos clorados exerceram maior pressão seletiva sobre as comunidades bacterianas dos consórcios R1, P1 e P2 do que o processo de pasteurização. Isto mostra que populações bacterianas presentes nos consórcios das amostras de sedimentos resistiram ao calor excessivo promovido no processo de pasteurização realizado (80°C por 30 minutos) e conseguiram crescer até atingir densidades populacionais significativas para serem detectadas pela técnica de DGGE. Indicando assim que estas populações podem estar relacionadas ao grupo das bactérias Gram-positivas, esporulantes e com baixo conteúdo de G+C pertencentes à Ordem *Clostridiales*, na qual estão alocadas várias espécies estritamente anaeróbias e que apresentam metabolismo fermentativo, inclusive as responsáveis

pela desalogenação redutiva de clorofenóis. De acordo com Madigan (2004), microrganismos pertencentes a esta Ordem estão presentes em amostras ambientais de solos e sedimentos e são capazes de sobreviver a este tipo de tratamento térmico, e também às variações de pH e potencial redox, pois os esporos permanecem viáveis até que as condições do meio voltem a ser favoráveis ao seu crescimento.

Possivelmente, o processo de pasteurização das amostras de sedimentos estuarinos realizado por Nakayama (2005), realizado com o objetivo de facilitar a seleção de linhagens bacterianas pertencentes ao gênero *Desulfitobacterium*, foi efetivo para selecionar tais microrganismos capazes de desalogenar compostos clorados como o PCP e seus congêneres (Bouchard *et al.*, 1996), e também populações de bactérias tolerantes à presença de compostos tóxicos no sistema como o PCP, o 2,3,4-TCP e o 2,6-DCP.

Os consórcios microbianos NP1, NP2 e NP3 apresentaram padrões de bandas semelhantes, ou seja, suas comunidades foram compostas por muitas espécies em comum como, por exemplo, as destacadas nos retângulos c, d e e (Figura 24). É possível que a ocorrência das mesmas espécies nessas amostras esteja relacionada à constância nas taxas de degradação do PCP após cada realimentação, bem como na regularidade da produção e do consumo do 2,3,4-TCP e 2,6-DCP (Figura 26).

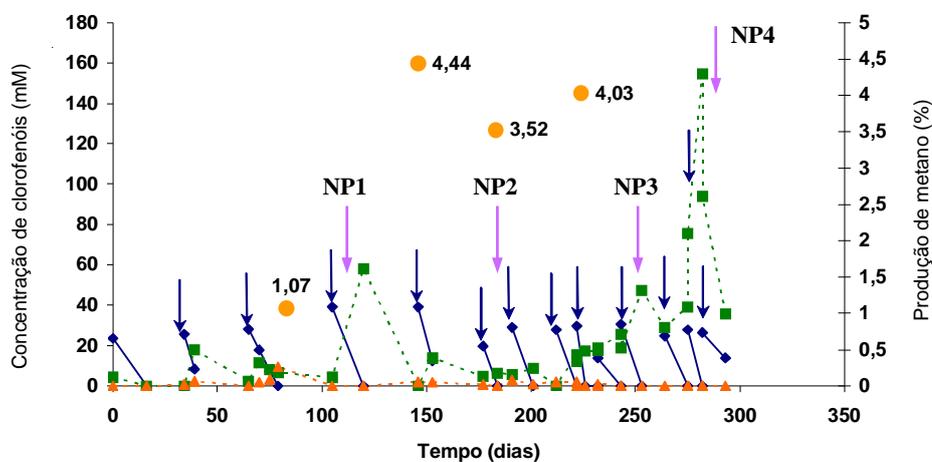


Figura 26. Frasco J “NP” não pasteurizado. Valores das concentrações de PCP (-♦-), 2,6-DCP (-■-), 2,3,4-TCP (-▲-) e da produção de metano (-●-). As setas azuis e lilases indicam o número de realimentações do sistema com fontes orgânicas e PCP e os pontos em que os consórcios foram coletados, respectivamente. Fonte: adaptado de Nakayama (2005).

Provavelmente, a estabilidade na degradação dos compostos clorados, seus congêneres e fontes orgânicas; e também nas condições do meio tenha favorecido o crescimento e a manutenção das mesmas populações bacterianas durante o período de incubação do sistema.

A estrutura das comunidades de NP4 apresentou diferença em relação às observadas nos consórcios NP1, NP2 e NP3 (Figura 24). Pode-se inferir que isto tenha ocorrido devido às elevadas concentrações 2,6-DCP devido ao acúmulo desse composto no sistema (Figura 26), alterando assim as condições do meio e, conseqüentemente, a composição das espécies nesta comunidade. Pelos resultados obtidos na DGGE, pode-se notar que a maioria das populações bacterianas presentes nos consórcios NP1, NP2 e NP3 não foram detectadas em NP4, indicando assim que o crescimento das mesmas pode ter sido inibido pela toxicidade imposta no sistema devido ao acúmulo do 2,6-DCP.

Em relação à riqueza, pode-se inferir que as comunidades dos consórcios NP1 e NP2 apresentaram praticamente os mesmos números de espécies. Tal semelhança pode ser explicada pelo fato das condições do meio permanecerem estáveis durante as realimentações realizadas regularmente a cada 20 e 40 dias, durante os 200 primeiros dias. Como as comunidades já estavam aclimatadas (105° e 191° dias) e não foram verificadas alterações no meio, o número de espécies se manteve nos períodos amostrados. De acordo com Toffin *et al.* (2004), o número de espécies permanece praticamente o mesmo em comunidades cultivadas em condições similares de enriquecimento.

A distribuição de espécies no consórcio NP3 foi ligeiramente inferior às encontradas em NP1 e NP2. Isto pode ter ocorrido porque tal amostra foi coletada durante o período de alimentação semi-contínua, a cada 11 dias, quando foi verificado o aumento na concentração do 2,6 DCP (50µM). Apesar desse fator não ter influenciado significativamente na composição das espécies, o mesmo pode ter desfavorecido o crescimento de algumas bactérias que estavam presentes anteriormente na comunidade, justificando assim a ausência das mesmas e a diminuição no número de espécies.

O número de espécies encontrado na comunidade de NP4 foi o menor entre as demais (NP1, NP2 e NP3), provavelmente devido ao acúmulo do 2,6-DCP (154 μ M) no sistema. De acordo com os dados apresentados na Figura 26, pode-se observar que o PCP adicionado no 283º dia foi sendo degradado apenas na medida em que a concentração do 2,6-DCP diminuía. Estes resultados indicam que pode ter ocorrido desvio ou inibição das rotas metabólicas na degradação do PCP, acarretando em alterações desfavoráveis para a manutenção das espécies no sistema. Esta suposição é corroborada pelos resultados obtidos por Nakayama (2005), em seus ensaios de enriquecimento, pois a autora relata que a degradação inicial do PCP pode ter sido realizada por mais de uma espécie microbiana, através de distintas vias, e que durante o processo tenha ocorrido a formação de subprodutos com diferentes graus de toxicidade e persistência inibindo, desta maneira, toda ou parte das vias de funcionamento da cultura.

Tais adversidades parecem ter afetado diretamente a composição e a riqueza das comunidades de NP4 e isto foi comprovado pela diminuição da intensidade e do número de bandas na DGGE, que apesar de não ser uma técnica quantitativa, é capaz de detectar apenas as populações mais abundantes no meio.

A amostra DCPpir foi composta por populações distintas e apresentou a maior riqueza de espécies dentre todas as amostras analisadas (Figura 24). A presença de várias populações na comunidade pode ser devido à aclimação das mesmas ao longo dos sucessivos subcultivos com piruvato como fonte orgânica e doador de elétrons, que estimulou a degradação do 2,6-DCP e a utilização de um clorofenol com estrutura mais simples que o PCP. De acordo com Nakayama (2005), essa cultura foi capaz de degradar todo o composto clorado (7,5 μ M) durante 60 dias.

Pelos resultados obtidos na DGGE pode-se dizer que as variações na composição e riqueza de espécies das comunidades bacterianas dos consórcios microbianos R1, P1, P2, NP1, NP2, NP3 e NP4, cultivadas na presença do PCP, ocorreram principalmente devido aos

seguintes fatores:

- a. realimentação do sistema: o número de vezes e a periodicidade em que os microcosmos foram alimentados influenciaram nas concentrações dos compostos orgânicos e clorados no meio de cultivo. O excesso ou a escassez destes compostos provavelmente estimularam ou inibiram o crescimento de determinadas populações de bactérias;
- b. condições do meio: os consórcios microbianos foram coletados em períodos distintos, nos quais foram verificadas alterações nos valores de pH e potencial redox, modificando assim, as condições para o desenvolvimento de determinadas populações bacterianas.

Desta forma, a comparação dos padrões de bandas obtidos a partir da DGGE, aliados aos resultados dos ensaios de degradação realizados por Nakayama (2005), evidenciaram que as alterações observadas na estrutura, composição e riqueza das comunidades de bactérias correram, principalmente, pelas condições adversas verificadas no meio de cultivo como a entrada de oxigênio no sistema e o acúmulo de compostos clorados.

5.4.1.2. DOMÍNIO ARCHAEA

Os resultados da DGGE mostraram alguma similaridade nos padrões bandas correspondentes às comunidades de arqueias nos consórcios microbianos R1, P1 e P2, indicando que as mesmas foram compostas por algumas espécies em comum, as quais estão destacadas nos retângulos a, b e c (Figura 27).

Em R1, o acúmulo de PCP e as elevadas das concentrações de 2,3,4-TCP e do 2,6-DCP no sistema não desfavoreceram a produção de metano (Figura 25a), indicando que as populações de arqueias metanogênicas não estiveram envolvidas diretamente na degradação dos compostos clorados, mas sim na utilização de compostos mais simples como os subprodutos da digestão anaeróbia realizada pelas bactérias e pelas fontes orgânicas adicionadas na segunda realimentação do meio.

A composição da comunidade em P1 foi bastante similar à observada em R1, com exceção da população d, a qual pode ter sido favorecida pelas alterações ocorridas no início da operação do sistema (Figura 25b). A oxidação e a elevação do pH no meio parecem ter afetado o crescimento das demais populações presentes em P1, destacadas nos retângulos a, b e c, uma vez que as bandas apresentaram intensidades tênues, ou seja, nesta amostra as arqueias apresentaram tamanhos populacionais menores que os observados em R1 e P2. Enquanto que em P2, a estabilidade na degradação dos compostos e a recuperação nas condições do meio voltaram a favorecer o crescimento das diversas populações de arqueias, fato comprovado pelo aumento no número de bandas e pela forte intensidade apresentada pelas mesmas. Estes resultados mostram que as populações de arqueias permaneceram ativas, em P1 e P2, apesar do desequilíbrio ocorrido inicialmente no sistema.

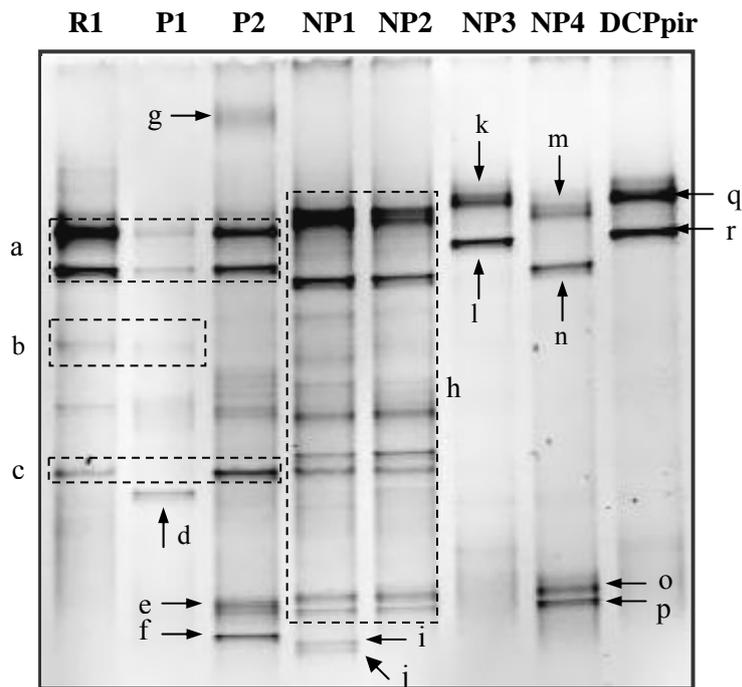


Figura 27. Perfis das comunidades de arqueias nos consórcios R1, P1, P2, NP1, NP2, NP3, NP4 e DCPpir obtidos a partir da DGGE com gradientes de desnaturação de 40% e 60%. Os retângulos mostram as populações presentes em mais de uma amostra e as setas as populações presentes em apenas uma amostra.

É importante ressaltar que o processo de pasteurização pode ter afetado diretamente a maioria das populações de arqueias nas amostras R1, P1 e P2, pois este tratamento térmico é

considerado severo e capaz de eliminar as células presentes no meio. No entanto, tal processo não foi capaz de inibir totalmente o crescimento de determinados grupos metanogênicos, uma vez que foi verificada a existência de bandas no gel de DGGE, confirmando assim, a presença de tais populações nas três amostras. Esta constatação corrobora com os resultados obtidos por Nakayama (2005), nos ensaios de enriquecimento realizados com os consórcios provenientes de amostras de sedimentos submetidos ao processo de pasteurização, nos quais a autora verificou a produção de metano nos dois microcosmos em que tais consórcios foram cultivados (Figura 25). Além disso, por meio de exames microscópicos, a autora constatou a presença de bacilos e cocos fluorescentes em todas essas amostras, indicando que as culturas apresentavam microrganismos metanogênicos metabolicamente ativos.

Em relação às amostras de sedimentos estuarinos não submetidos ao processo de pasteurização, os padrões de bandas revelaram que as comunidades dos consórcios NP1 e NP2 foram compostas praticamente pelas mesmas populações, as quais estão representadas no retângulo *i*, exceto pela presença das populações *i* e *j* (Figura 27). Esta similaridade pode ser devida à estabilidade no processo de degradação dos compostos durante os 200 primeiros dias, onde as bactérias utilizaram os compostos mais complexos e produziram substratos mais simples, os quais foram consumidos pelas populações de arqueias. Além disso, o regime regular de realimentação do sistema disponibilizou quantidades suficientes de fontes orgânicas necessárias para o metabolismo das arqueias metanogênicas, com conseqüente produção de metano (Figura 26). As comunidades dos consórcios NP3 e NP4 apresentaram composições de espécies diferentes entre si e também em relação a NP1 e NP2 (Figura 27). Tais diferenças podem estar relacionadas ao acúmulo do 2,6-DCP no meio, pois a metanogênese praticamente cessou quando elevadas concentrações desse composto foram verificadas no sistema (Figura 26).

Em relação à riqueza, pode-se inferir que o consórcio P2 apresentou maior número de

espécies em relação a P1 e R1, porque o mesmo foi coletado num período em que o sistema apresentava condições mais favoráveis para o crescimento das arqueias.

Nos consórcios, cultivados na presença de PCP, as maiores riquezas de espécies foram observadas em NP1, NP2, NP4 e NP3, respectivamente. Os maiores números de espécies encontrados em NP1 e NP2 também podem ser explicados pela constância na degradação dos clorofenóis e seus subprodutos, com conseqüente produção de metano (1% a 3%). A não detecção da maioria das populações verificadas de NP1 e NP2 nas amostragens subseqüentes (NP3 e NP4) indicaram que tais populações não se aclimataram ao aumento na concentração de 2,6-DCP no sistema, após 225 dias de incubação, e possivelmente seu crescimento tenha sido prejudicado pela toxicidade promovida pelo clorofenol no meio.

A comunidade de NP3 foi composta por 2 populações (k e l) distintas das verificadas anteriormente, as quais podem ter sido favorecidas ou terem resistido ao aumento da concentração do 2,6-DCP no sistema (1,3mM). Em NP4, o número de espécies foi ligeiramente superior ao encontrado em NP3, apesar da elevada concentração do 2,6-DCP no sistema (4mM). Possivelmente, as populações k, l, m, n, o e p se aclimataram às condições do meio e não foram afetadas pelas altas concentrações de 2,6-DCP; e portanto apresentaram tamanhos populacionais significativos, as quais foram representadas por bandas com intensidades fortes. De acordo com Foresti (1999), diversas populações de arqueias metanogênicas toleram o efeito de compostos orgânicos tóxicos e apresentam grande capacidade de adaptação às concentrações tóxicas.

A comunidade do consórcio DCPpir, alimentado com piruvato e 2,6-DCP, foi composta por duas populações (q e r) e portanto apresentou um pequeno número de espécies.

Os padrões de bandas obtidos na DGGE permitiram verificar que a composição e a riqueza de espécies das comunidades de arqueias dos consórcios provenientes das amostras de sedimentos submetidos ao processo de pasteurização foram menos afetadas, em comparação

com as de bactérias, pelas alterações ocorridas no meio de cultivo e pelo número de realimentações realizadas durante o período de incubação dos sistemas. Em relação às amostras de consórcios das amostras de sedimentos não pasteurizadas, cultivados na presença do PCP, verificou-se que as comunidades amostradas no período de realimentações regulares prolongadas (20 a 40 dias) também não sofreram alterações significativas em suas estruturas e apresentaram similaridades em relação à composição e riqueza de espécies. No entanto, o regime de alimentação semi-contínua a cada 11 dias, bem como o acúmulo do 2,6-DCP no sistema promoveram alterações na composição e riqueza das comunidades cultivadas nessas condições. Estas informações corroboram com a hipótese de que as arqueias foram menos afetadas pelas condições do meio, em relação às bactérias, porque estiveram envolvidas nas etapas finais do processo de digestão anaeróbia. A partir disso, foi possível considerar que as arqueias utilizaram os ácidos orgânicos resultantes da fermentação dos compostos complexos pelas bactérias e também os adicionados aos sistemas nas realimentações, como fontes de energia e crescimento. Tais constatações permitiram dizer que:

- a. as arqueias não estiveram envolvidas diretamente na degradação do PCP e do DCP, mas contribuíram para o equilíbrio do processo de digestão anaeróbia, pois converteram os ácidos orgânicos em metano e gás carbônico, impedindo assim o acúmulo daqueles no sistema. É importante ressaltar que, se os ácidos orgânicos voláteis não fossem consumidos pelas arqueias metanogênicas, as concentrações dos mesmos permaneceriam elevadas no meio, acarretando na diminuição do pH e desfavoreceriam assim as condições necessárias para o crescimento das populações bacterianas e a degradação dos clorofenóis;
- b. as diferentes populações de arqueias, apesar de não utilizarem os clorofenóis em seu metabolismo, resistiram à presença desses compostos e às condições adversas ocorridas no meio, indicando que as mesmas foram essenciais para o sucesso da digestão anaeróbia destes compostos tóxicos.

Desta forma, verificou-se que os resultados obtidos no presente trabalho, até o momento, apresentaram similaridades em relação aos observados por Nakayama (2005), apesar das amostras analisadas nos dois trabalhos terem sido coletadas em períodos de incubação bastante distintos e em frascos de cultivos diferentes. A autora relatou em seu trabalho que a estrutura das comunidades bacterianas também variou, dependendo das alterações ocorridas no meio de cultivo, durante os ensaios de enriquecimento. Além disso, observou que as realimentações dos frascos com os respectivos compostos clorados afetaram diretamente o grupo das bactérias, indicando a sensibilidade destas às alterações no meio, uma vez que as mesmas estiveram associadas às primeiras etapas da digestão anaeróbia. Sendo que o mesmo não foi verificado para as comunidades de arqueias, que possivelmente utilizaram como substrato para a obtenção de energia os produtos provenientes da degradação bacteriana e, portanto foram menos afetadas. Saia (2007) e Brucha (2007) também verificaram o mesmo comportamento na estrutura das comunidades de bactérias e arqueias em seus experimentos realizados com amostras de sedimentos estuarinos enriquecidos, provenientes do mesmo ponto coletado por Nakayama (2005), em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF).

5.4.2. ESTIMATIVA DA DIVERSIDADE BETA

A diversidade beta foi estimada, em função da composição de espécies, com o objetivo de avaliar a influência dos processos de pasteurização e não pasteurização das amostras de sedimentos estuarinos sobre a estrutura das comunidades dos consórcios microbianos. Os dendogramas gerados pelas análises de agrupamento e os coeficientes de similaridade correspondentes aos Domínios *Bacteria* e *Archaea* estão apresentados nas Figuras 28 e 29 e nas Tabelas 13 e 14, respectivamente. A matriz de dados de presença/ausência das espécies nas comunidades, a qual fundamentou tal análise, está apresentada em Anexo (Parte 2).

Para o Domínio *Bacteria*, a análise de similaridade revelou que as comunidades bacterianas dos consórcios NP2 e NP3 foram reunidas no mesmo grupo (A), mostrando que as

composições de espécies das mesmas apresentaram mais semelhanças entre si do que em relação às demais. A comunidade de NP1 apresentou similaridade com as de NP2 e NP3, formando assim o agrupamento B. O grupo C foi formado pelas comunidades do consórcio DCPpir com as do grupamento B. Completando o universo dos consórcios originados de amostras de sedimentos não pasteurizados, observou-se a formação do agrupamento E, a partir do conjunto do grupo D com a comunidade de NP4, indicando que as comunidades de todas essas amostras apresentaram similaridades em suas composições de espécies.

Em relação os consórcios originados das amostras de sedimentos pasteurizadas, a comunidade de R1 foi agrupada juntamente com a de P2 formando um grupo distinto dos demais (F). A comunidade de P1 apresentou composição diferente de R1 e P2, possivelmente devido às alterações ocorridas meio, e por esse motivo não foi agrupada com essas amostras. Mesmo assim, a comunidade de P1 ficou mais próxima das comunidades do grupo F do que as do grupo E.

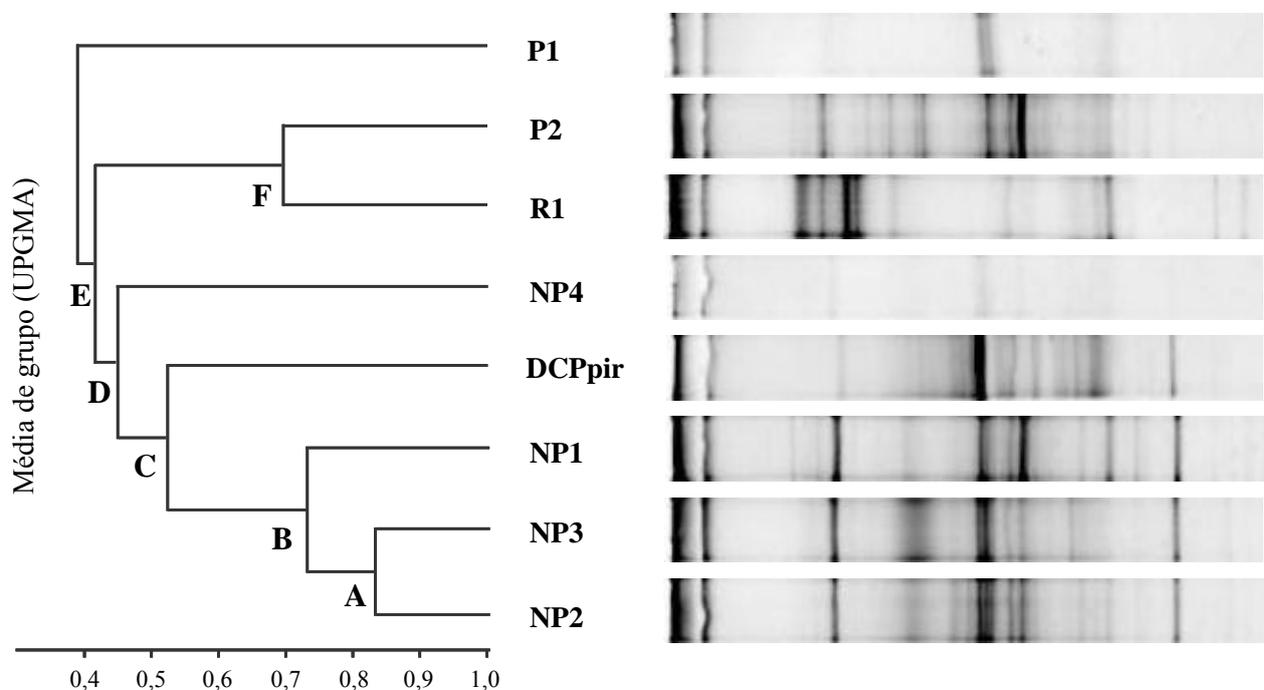


Figura 28. Diversidade beta das comunidades bacterianas dos consórcios originados de amostras submetidas e não submetidas ao processo de pasteurização, estimada a partir da análise de agrupamento com coeficiente de Sorensen e método de ligação UPGMA.

Os resultados das análises de agrupamento e de similaridade mostraram que as comunidades bacterianas de NP1, NP2, NP3, NP4 e DCPpir foram compostas por populações diferentes das encontradas em R1, P1 e P2, sugerindo que os processos de pasteurização e não pasteurização das amostras de sedimentos influenciaram na composição das espécies das comunidades dos consórcios analisados.

Tabela 13. Coeficientes de similaridade de Sorensen para as diferentes comunidades bacterianas.

Amostras	R1	P1	P2	NP1	NP2	NP3	NP4	DCPpir
R1	1	-	-	-	-	-	-	-
P1	0,40	1	-	-	-	-	-	-
P2	0,70	0,43	1	-	-	-	-	-
NP1	0,50	0,44	0,62	1	-	-	-	-
NP2	0,54	0,44	0,55	0,79	1	-	-	-
NP3	0,44	0,37	0,36	0,68	0,84	1	-	-
NP4	0,33	0,40	0,30	0,46	0,45	0,54	1	-
DCPpir	0,23	0,29	0,35	0,49	0,56	0,53	0,36	1

No caso das arqueias, a análise de similaridade revelou que as comunidades dos consórcios originados das amostras de sedimentos pasteurizados apresentaram composições de espécies parecidas e por isso formaram o grupo B, o qual foi composto pela comunidade de P2 juntamente com as de P1 e R1 (grupo A) (Figura 29).

Em relação aos consórcios provenientes das amostras de sedimentos não pasteurizadas, observou-se que as comunidades de arqueias formaram três agrupamentos distintos, indicando que os consórcios foram compostos por diferentes populações. O grupo E foi o que apresentou maior similaridade, ou seja, as comunidades de NP1 e NP2 foram compostas praticamente pelas mesmas populações. O grupo D foi formado pela comunidade de NP4 juntamente com as de NP1 e NP2 (E), enquanto que o grupo F foi constituído pelas comunidades das amostras NP3 e DCPpir (Figura 29). É importante ressaltar, que as baixas similaridades verificadas entre as comunidades dos consórcios microbianos cultivadas com PCP podem ter sido devidas ao acúmulo do DCP no sistema. Apesar das comunidades destes consórcios não terem formado

um único grupo, os resultados indicaram que as mesmas apresentaram maior similaridade entre si do que em relação aos consórcios R1, P1 e P2. Os resultados obtidos nas análises de agrupamento e similaridade permitiram inferir que os processos de pasteurização/não pasteurização das amostras de sedimentos estuarinos também promoveram alterações nas composições das comunidades de arqueias dos consórcios microbianos.

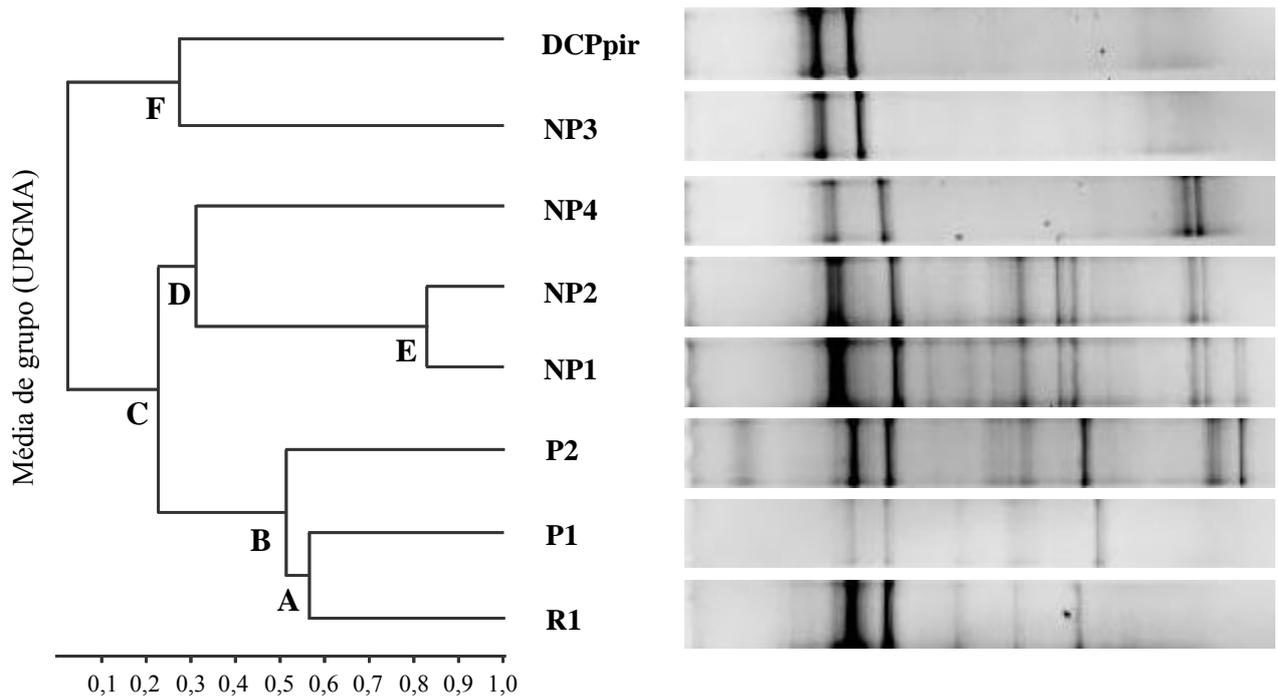


Figura 29. Diversidade beta das comunidades de arqueias dos consórcios originados de amostras de sedimentos estuarinos submetidas e não submetidas ao processo de pasteurização, estimada a partir da análise de agrupamento com coeficiente de Sorensen e método de ligação UPGMA.

Tabela 14. Coeficientes de similaridade de Sorensen para as diferentes comunidades de arqueias.

Amostras	R1	P1	P2	NP1	NP2	NP3	NP4	DCPpir
R1	1	-	-	-	-	-	-	-
P1	0,57	1	-	-	-	-	-	-
P2	0,55	0,50	1	-	-	-	-	-
NP1	0,22	0,08	0,36	1	-	-	-	-
NP2	0,22	0,08	0,36	0,84	1	-	-	-
NP3	0	0	0	0,09	0,09	1	-	-
NP4	0,29	0,17	0,30	0,32	0,32	0,20	1	-
DCPpir	0	0	0	0	0	0,29	0	1

5.4.3. FILOGENIA DE BACTÉRIAS E ARQUÉIAS

As árvores filogenéticas foram construídas a partir de seqüências do DNAr 16S de clones de bactérias e arqueias, oriundos das bibliotecas genômicas e das “bandas” resultantes da técnica de DGGE (Tabela 15), utilizando o método de máxima verossimilhança.

Tabela 15. Origem e nomenclatura dos clones referentes às bactérias e arqueias dos consórcios microbianos.

Origem	Consórcio	Clones
Bibliotecas Genômicas (item 5.3.1)	NP3	AP1, AP2, BP3, BP5, BP6*
	DCPpir	AD1, AD2, BD1, BD3**
DGGE (item 5.3.2)	R1	A8, A9, B6, B8
	P1	A4, A8, A9, B5
	P2	A1, A3, A8, A9
	NP1	A2, A6, A9
	NP2	A2, A6, A9
	NP3	A10, A11, B4
	NP4	-
	DCPpir	A10, A11

*AP e BP = Arquéia PCP e Bactéria PCP / ** AD e BD = Arquéia DCP e Bactéria DCP.

Os resultados das análises filogenéticas revelaram que a maioria das seqüências do DNAr 16S, representantes dos Domínios *Bacteria* e *Archaea*, apresentou similaridade com as de microrganismos não cultiváveis oriundos de amostras ambientais (Figuras 30 e 31). Todas as seqüências analisadas dos clones bacterianos foram relacionadas ao grupo das bactérias Gram-positivas com baixo conteúdo de G+C pertencentes à Ordem *Clostridiales* (100%) do Filo *Firmicutes* e as das arqueias relacionadas ao grupo das metanogênicas pertencentes às Ordens *Methanobacteriales* (7,1%), *Methanosarcinales* (14,3%), *Methanomicrobiales* (57,1%) e arqueias não identificadas (21,4%) do Filo *Euryarchaeota*.

Tabela 16. Classificação das seqüências dos clones de bactérias e arqueias referentes consórcios microbianos.

Domínio	Filo	Ordem	Família	Clones
Bacteria	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Peptostreptococcaceae</i>	B4, B8, BD1, BD3, BP3
			<i>Clostridiaceae</i>	B5, B6, BP5
			<i>Eubacteriaceae</i>	BP6
Archaea	<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>	A3
			<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosaetaceae</i>
		<i>Methanomicrobiales</i>	<i>Methanomicrobiaceae</i>	A4, A9, AD2, AP2
			Não identificada	A6, A7, A8, AP1
			Não identificada	A1, A10, AD1

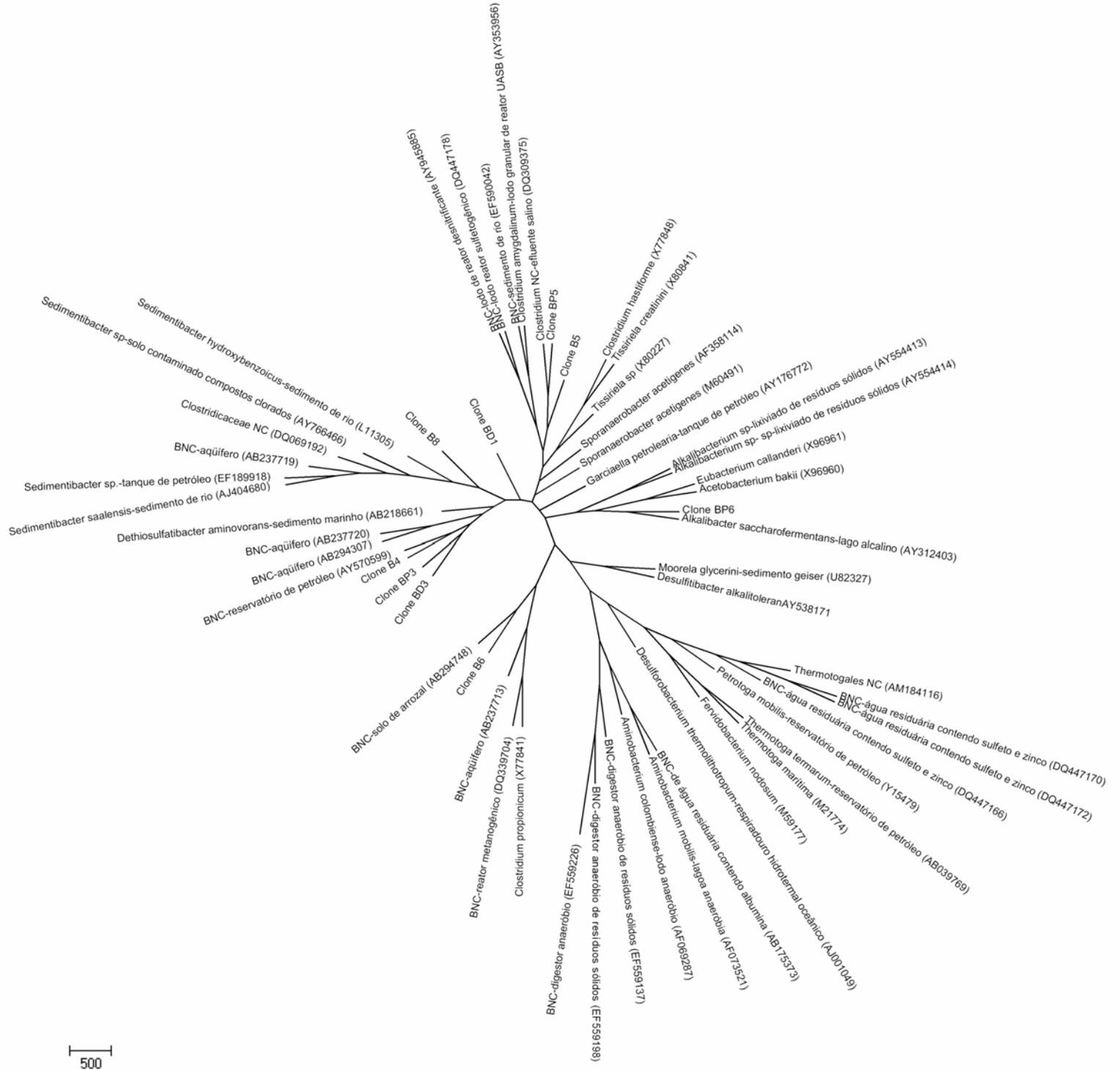


Figura 30. Árvore filogenética construída a partir de seqüências do DNAr 16S de bactérias, pelo método da Máxima Verossimilhança (MV), utilizando 1000 replicações. A sigla BNC significa Bactéria Não Cultivada. O grupo externo foi representado pelo microrganismo *Thermotoga maritima*.

O clone B8 foi identificado como pertencente ao gênero *Sedimentibacter* da Família *Peptostreptococcaceae*, porém não foi estreitamente relacionado a nenhuma espécie descrita

ou proveniente de amostra ambiental. De acordo com Breitenstein *et al.* (2002) este gênero representa uma nova linha descendente do ramo das bactérias Gram-positivas com baixo conteúdo de G+C, as quais são estritamente anaeróbias, crescem em faixas de pH e temperatura de 5,0-8,0 e 14°C-40°C, respectivamente, requerem a presença de extrato de levedura no meio de cultivo e o crescimento depende da fermentação do piruvato ou de aminoácidos. Nakayama (2005) também verificou a presença deste gênero em seu estudo sobre a degradação do PCP por microrganismos anaeróbios em amostras enriquecidas de sedimento estuarino. De acordo com a autora, tal gênero pertence a uma linhagem desalogenadora de clorofenóis e sua presença está relacionada a ambientes salinos. Vários outros trabalhos revelaram a presença destes microrganismos em amostras ambientais, enriquecidas na presença de compostos clorados, e em culturas desalogenadoras.

Zhang *et al.* (1994) isolaram a espécie *Clostridium hydroxybenzoicum* JW/Z-1^T, atualmente classificada como a linhagem tipo *Sedimentibacter hydroxybenzoicum*, a partir de amostras enriquecidas de sedimentos de lagoa durante a investigação da mineralização anaeróbia do 2,4-DCP. A linhagem apresentou características peculiares como a capacidade de desalogenar o composto clorado a fenol e degradar o hidroxibenzoato, via carboxilação. Além disso, foi observado que a espécie produziu enzimas que catalisaram a descarboxilação do 4-hidroxibenzoato e do 3-hidroxibenzoato, porém os produtos da descarboxilação como o fenol e o catecol não foram utilizados como fontes de carbono ou energia. O crescimento de *S. hydroxybenzoicum* foi estimulado pela presença de íons sódio (Na⁺) e acetato em meio mineral contendo extrato de levedura, em faixas de pH e temperatura de 7,2-8,2 e 33°-34°C, respectivamente.

Breitenstein *et al.* (2002) descreveram a espécie *Sedimentibacter saalensis*, a qual foi obtida de uma amostra enriquecida de sedimento do Rio Saale (Alemanha) e isolada de uma cultura mista anaeróbia degradadora do 2,4,6-triclorofenol. O crescimento desta espécie

ocorreu em meio basal contendo fosfato (10mM), Na₂SeO₃ (16nM), Na₂WO₄ (12nM), 1,4-naftoquinona (63nM) e extrato de levedura (0,5%) suplementado com piruvato (25mM), L-arginina (10mM) ou glicina (10mM), sob condições de anaerobiose em tubos Hungate (N₂/CO₂), na ausência de luz. Nestas condições *S. saalensis* utilizou o extrato de levedura como fonte para o crescimento e fermentou o piruvato, produzindo produtos como o acetato e o butirato. Este resultado sugeriu que o piruvato foi oxidado a acetato e este, em parte, serviu como aceptor de elétron para a formação do butirato. Os resultados de análises filogenéticas baseadas no RNAr 16S, juntamente com as propriedades quimiotaxonômicas e fisiológicas encontradas nesta espécie, permitiram inferir sua relação com a espécie *Sedimentibacter hydroxybenzoicus*. No entanto, os autores ressaltaram que apesar de *S. saalensis* apresentar afinidade filogenética estreita com *S. hydroxybenzoicus*, a mesma não apresenta atividade de desalogenação e carboxilação/descarboxilação de compostos clorados e aromáticos.

Van Doesburg *et al.* (2005) estudaram a degradação do β-hexaclorociclohexano (β-HCB) por uma co-cultura anaeróbia, formada pelas espécies *Dehalobacter* sp. e *Sedimentibacter* sp., obtida a partir de amostras enriquecidas de solo contaminado com HCB. Os microrganismos foram cultivados em frascos de antibiótico (120mL) contendo meio mineral contendo a vitamina cianobalamina (50μg/L), peptona (0,05g/L), acetato (2mM) e β-HCB (510μM). Os resultados obtidos no trabalho revelaram que a co-cultura foi capaz de degradar o composto clorado, com conseqüente produção de benzeno e clorobenzeno, via desalogenação redutiva. De acordo com os autores, a espécie *Dehalobacter* foi a responsável pela descloração do β-HCB enquanto que o papel desempenhado pela espécie *Sedimentibacter* não pôde ser esclarecido detalhadamente. No entanto, foi verificado que *Dehalobacter* sp. não conseguiu realizar o processo de descloração na ausência da *Sedimentibacter*, indicando que a presença desta última no meio foi essencial para o crescimento da primeira. A partir dessa constatação os autores sugeriram que *Sedimentibacter* sp. estimulou a transformação do β-

HCB via excreção de fatores de crescimento no meio como vitaminas, aminoácidos e outros.

Bedard *et al.* (2006) caracterizaram a diversidade bacteriana anaeróbia em amostras enriquecidas de sedimentos contaminados com Aroclor 1260, um tipo de bifenila policlorado (PCB), e constataram que os microrganismos realizaram o processo de desalogenação reductiva do composto utilizando extrato de levedura (0,01%), piruvato (5mM), butirato (5mM) ou acetato/hidrogênio (5mM/7,5mM) como fonte de energia para o crescimento e o PCB como acceptor de elétrons. Os autores detectaram a presença de *Sedimentibacter* sp. nas culturas enriquecidas e também relataram que a mesma não foi capaz de realizar o processo de halorespiração, e sim a fermentação do piruvato, na presença de extrato de levedura no meio.

Ainda em relação à Família *Peptostreptococcaceae*, os clones B4, BD3 e BP3 foram agrupados juntamente com clones de bactérias anaeróbias não cultivadas, provenientes de amostras ambientais, em um ramo distinto do verificado para o gênero *Sedimentibacter*. Essa constatação mostra que os referidos clones podem fazer parte de um novo gênero. Um reforço para esta hipótese é que a seqüência do clone B4 foi relacionada à do clone PL-16B6 obtido em ensaios de enriquecimento com amostras de água proveniente de um reservatório de petróleo localizado no Canadá (Grabowski *et al.*, 2005). Neste estudo, os microrganismos foram inoculados em meio basal salino tamponado com bicarbonato de sódio (NaHCO₃) suplementado com vitaminas, elementos-traço, 2-bromoethanosufônico (420mg/L), extrato de levedura (0,05%), metanol (30mM), benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (2mM cada) e alcanos (4 a 10mM) e foram incubados a 30°C. Os resultados das análises filogenéticas, realizadas a partir de seqüências do DNAr 16S, revelaram que o clone PL-16B6 não foi estreitamente relacionado às linhagens isoladas de *Sedimentibacter* (92% de similaridade) indicando que o mesmo provavelmente pode ser um membro de um novo gênero pertencente à Família *Peptostreptococcaceae*.

O clone BD1 também foi alocado na Família *Peptostreptococcaceae* e também em um

ramo bastante distinto, indicando que a seqüência deste microrganismo apresentou pouca similaridade com a dos demais. Este resultado sugere que tal clone também pode pertencer a um outro gênero da Família.

Na Família *Clostridiaceae*, os clones BP5 e B5 foram agrupados a partir de um mesmo ramo enquanto que B6 em outro distante indicando que apesar de estarem alocados na mesma família, as seqüências dos mesmos apresentam poucas similaridades entre si. O clone BP5 foi relacionado ao clone HKT1-48 proveniente de amostra de lodo de uma estação de tratamento de esgotos operada com alta salinidade (Kapley *et al.*, 2007). Estes autores investigaram a diversidade e a filogenia dos microrganismos anaeróbios presentes no lodo, a partir de uma biblioteca genômica de DNAr 16S, e verificaram que a maioria das seqüências dos clones (50,2%) apresentaram similaridade com bactérias não cultivadas, dentre elas o HKT1-48 o qual foi identificado como pertencente ao gênero *Clostridium*.

A seqüência do clone B5 não foi estreitamente relacionada à de nenhuma espécie de clostrídio já descrita, no entanto pode-se verificar que o mesmo também pertence a este gênero uma vez que o mesmo foi agrupado juntamente com outros clostrídios não cultivados provenientes de amostras ambientais.

O clone B6 foi relacionado ao clone UTO-7 obtido em amostras enriquecidas de solo de um arrozal, na presença de pentaclorofenol (Yoshida *et al.*, 2007). Os resultados indicaram que o PCP (80µM) foi completamente degradado a fenol em aproximadamente 100 horas, via desalogenação redutiva, com conseqüente produção dos congêneres 2,3,4,5-TeCP, 3,4,5-TCP e 3-CP. As análises das seqüências de DNAr 16S de 5 populações bacterianas, obtidas a partir das bandas de DGGE, revelaram que 3 foram identificadas como *Clostridium* sp. (Filo *Firmicutes*), 1 como *Parabacteroides* sp. (Filo Bacteroidetes) e 1 como bactéria não cultivável (Filo *Spirochaetes*). Os autores reportaram que não conseguiram identificar as bactérias responsáveis pela desalogenação do PCP e dos congêneres menos clorados, porque as

populações destes microrganismos apresentaram tamanho pequeno e não puderam ser detectadas pela DGGE. De acordo com o primeiro autor (comunicação pessoal) possivelmente o clone OTU-7, identificado como *Clostridium* sp., esteve associado à fermentação do lactato que foi utilizado como único doador de elétrons nos ensaios de enriquecimento.

O clone BP6, alocado na Família *Eubacteriaceae*, foi relacionado à espécie *Alkalibacter saccharofermentans* linhagem Z-79820, a qual foi isolada de uma comunidade microbiana oriunda de lago alcalino de baixa salinidade (Garnova *et al.*, 2004). Os resultados obtidos sobre a fisiologia desta linhagem mesofílica revelaram que a mesma é halotolerante e foi capaz de crescer em meio contendo concentrações elevadas de NaCl (10%), com crescimento ótimo em valores de salinidade e pH de 0 a 4% e 7,2 a 10,2, respectivamente, a 35°C. A linhagem fermentou glicose a formiato, acetato, etanol, hidrogênio e gás carbônico e seu crescimento foi proporcional à concentração de extrato de levedura presente no meio (50 a 1000mg/L) requereu a presença de extrato de levedura. Os autores ressaltaram que o extrato de levedura, juntamente com cloreto de amônio (NH₄Cl) ou nitrato de sódio (NaNO₃), podem ser as possíveis fontes de nitrogênio utilizadas pela linhagem Z-79820, a qual foi incapaz de assimilar o nitrogênio da mistura gasosa (N₂/CO₂). Além disso, o extrato de levedura pode ser a única fonte de enxofre uma vez que essa bactéria não requer a presença de Na₂S no meio.

Os resultados obtidos na análise filogenética indicaram que todos os clones bacterianos analisados, presentes nos consórcios originados nas amostras de sedimentos pasteurizados, foram relacionados ao grupo das bactérias Gram-positivas com baixo conteúdo de G+C, e apresentaram o mecanismo de fermentação para a conservação de energia. Desta forma, pode-se dizer que algumas populações de bactérias estudadas neste trabalho, provenientes dos ensaios de enriquecimento realizados por Nakayama (2005), fermentaram os substratos orgânicos adicionados ao meio de cultivo como fontes de energia e utilizaram o extrato de levedura para o crescimento. Provavelmente, a glicose e o piruvato foram as principais fontes

utilizadas no processo de fermentação, com conseqüente produção de lactato, etanol e butirato, os quais podem ter sido utilizados por outros grupos bacterianos no processo global da digestão anaeróbia, e acetato, formiato, hidrogênio e gás carbônico, que também podem ter servido de substrato para as arqueias metanogênicas. Tais informações podem contribuir para o entendimento da degradação de clorofenóis por consórcios microbianos no processo de digestão anaeróbia, auxiliando assim com informações pertinentes para o desenvolvimento de tecnologias de biorremediação de áreas degradadas com PCP.

A presença de baixa concentração de NaCl no meio também pode ter favorecido o processo de fermentação por parte de algumas destas bactérias, pois de acordo com Madigan (2004), em alguns casos tal reação emprega gradientes iônicos como a base de sua energética. De acordo com o autor, neste tipo de fermentação a síntese de adenosina trifosfato (ATP) não ocorre pela fosforilação em nível de substrato e nem pelo transporte de elétrons, mas sim pela formação quimiosmótica devido a uma bomba de sódio ou hidrogênio (Na^+ ou H^+) associada à descarboxilação de ácidos orgânicos. Desse modo, uma reação química que produza uma quantidade insuficiente de energia livre pode ser acoplada a um gradiente iônico tornando possível a síntese de ATP e o subseqüente crescimento do organismo. A partir destas informações pode-se dizer que as bactérias analisadas:

- (a) as bactérias relacionadas ao gênero *Sedimentibacter* e as algumas bactérias pertencentes a Família *Clostridiaceae* podem ter sido responsáveis pela desalogenação do PCP e seus congêneres;
- (b) as bactérias que não estiveram envolvidas diretamente no processo de desalogenação foram importantes para a ocorrência do processo, pois utilizaram como doadores de elétrons os produtos parcialmente degradados pelas bactérias desalogenadoras fazendo com que não houvesse acúmulo dos compostos clorados e congêneres no sistema;
- (c) o crescimento das bactérias não desalogenadoras pode ter sido estimulado pelas

condições de enriquecimento do meio de cultivo, uma vez que foram adicionados doadores de elétrons como a glicose e o piruvato, os quais são amplamente utilizados no metabolismo fermentativo;

(d) apesar da maioria dos grupos bacterianos analisados possivelmente não degradarem os compostos clorados, algumas dessas bactérias podem ter estimulado a transformação do 2,6-DCP e do 2,3,4-TCP via excreção de fatores de crescimento no meio como vitaminas, aminoácidos e outros compostos necessários para o crescimento das desalogenadoras;

(e) fermentaram a glicose e o piruvato, adicionados ao meio de cultivo, com conseqüente produção de acetato, hidrogênio/gás carbônico (H_2/CO_2), os quais podem servir de substrato para as arqueias metanogênicas no processo de digestão anaeróbia.

Em relação ao Domínio *Archaea*, o clone A3 foi o único representante da Família *Methanobacteriaceae* e sua seqüência foi relacionada à de uma arqueia não cultivada (LCFA_Ac06) proveniente de lodo anaeróbio de um reator metanogênico alimentado com ácidos graxos de cadeia longa como o oleato e o palmitato (Souza *et al.*, 2007). Os autores utilizaram métodos moleculares baseados em seqüências de DNAr 16S, como PCR-DGGE-clonagem-seqüenciamento, para estudar a diversidade de arqueias no lodo e relataram que tal clone foi relacionado à espécie *Methanobacterium formicicum* linhagem FCam, a qual utiliza hidrogênio/dióxido de carbono (H_2/CO_2) e formiato como fontes de energia. Segundo os mesmos as arqueias, descritas como potencialmente vulneráveis ao contato com ácidos graxos de cadeia longa, foram capazes de sobreviver e crescer no meio mesmo quando foi observado o acúmulo desse composto e conseguiram utilizar os produtos da oxidação desses ácidos, realizada por bactérias da Família *Clostridiaceae* mineralizando-os a CO_2 e CH_4 .

Os clones A2 e A5, alocados na Família *Methanosaetaceae*, foram relacionados entre si e agrupados com outras arqueias isoladas e não cultivadas pertencentes ao gênero *Methanosaeta*. As seqüências dos clones apresentaram maior similaridade com a de uma

arqueia não cultivada (clone DI_A01) encontrada em amostras de sedimento coletado no canal portuário da COSIPA localizado no estuário de Santos e São Vicente (Piza, 2004). A autora caracterizou e comparou a diversidade microbiana em amostras de sedimentos altamente contaminados com hidrocarbonetos alifáticos, policíclicos aromáticos e *n*-alcanos empregando métodos moleculares independentes de cultivo e detectou a presença de vários grupos metanogênicos pertencentes às ordens *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales*, *Methanobicrobiales* e *Methanomicrococcales*, inclusive o clone DI_A01 que foi identificado como *Methanosaeta* sp.

A maioria dos clones de arqueias foi alocada na Família *Methanomicrobiaceae*. Pelos resultados obtidos na análise filogenética, o clone A4 foi relacionado ao gênero *Methanoculleus* o qual é composto até o momento por 10 espécies. Os membros pertencentes a este gênero são comumente encontrados em ambientes marinhos e salobros e estão listados como o grupo predominante entre as metanogênicas presentes em bioreatores utilizados para o tratamento de águas residuárias e aterros. Tal clone foi agrupado juntamente com *Methanoculleus marisnigri* linhagem CoCam (Joulian *et al.*, 1998) proveniente do solo de um arrozal e duas arqueias não cultivadas relacionadas a esta espécie oriundas de um reservatório de petróleo (Grabowski *et al.*, 2005) e de um aquífero (dados não publicados). *Methanoculleus marisnigri* foi isolada pela primeira vez em uma amostra de sedimento do Mar Negro, mas a mesma também tem sido encontrada freqüentemente em sedimentos de rios e lagos. Esta espécie pode usar hidrogênio, formiato e alcoóis secundários, como o propanol e o butanol, como substratos para a metanogênese (Rouviere *et al.*, 1992).

O clone AP2, identificado como pertencente ao gênero *Methanocalculus*, foi estreitamente relacionado a uma arqueia não cultivada (clone D-C02), a qual foi também encontrada em amostras de sedimento coletado no canal portuário da COSIPA localizado no estuário de Santos e São Vicente (Piza, 2004). Apenas 4 espécies deste gênero foram isoladas e

descritas até o momento, dentre elas apenas *Methanocalculus pumilus* apresentou similaridade com o clone AP2. *M. pumilus* linhagem MHT-1 foi isolada partir de amostras enriquecidas de lixiviado de um depósito marinho de resíduos sólidos (Mori *et al.* 2000). Os autores verificaram que a linhagem foi capaz utilizar H₂/CO₂ e formiato como fontes de energia e necessitou de acetato para o crescimento. Os valores ótimos de salinidade, temperatura e pH para o crescimento da linhagem foram 1% de NaCl, 35°C e 6,5 - 7,5, respectivamente. Uma particularidade desta linhagem foi a tolerância a elevadas concentrações de metais pesados como de cloreto de cádmio (1mM) e sulfato de cobre (1mM). Os resultados das análises de hibridação de DNA-DNA revelaram que a linhagem isolada apresentou apenas 51% de similaridade com o DNA de *M. halotolerans*, isolada e descrita primeiramente por Ollivier *et al.* (1998), e por isso foi considerada como uma nova espécie do gênero.

Os clones AD2 e A9 também foram alocados na Família *Methanomicrobiacea*, porém não foi possível relacioná-los a nenhum gênero descrito até o momento, pois suas seqüências não apresentaram similaridade com espécies isoladas. O clone AD2 foi relacionado apenas a uma arqueia não cultivada proveniente de amostras de lodo granulado de reator anaeróbio de fluxo ascendente em manta de lodo (UASB), operado em condições metanogênicas (dados não publicados). O clone A9 foi alocado num ramo bastante distinto dos demais representantes desta Família, não apresentando similaridade com os mesmos.

As seqüências dos demais clones não apresentaram estreita similaridade com as dos demais representantes das Famílias analisadas e possivelmente por esse motivo foram alocados em dois ramos bastante distintos. No primeiro ramo, o clone A6 foi agrupado juntamente com uma arqueia não cultivada (clone E-D04), relacionada aos microrganismos ainda não identificados da Ordem *Methanomicrobiales*, encontrada em amostras de sedimento coletadas em uma região do estuário de Santos e São Vicente a qual recebe diariamente elevadas cargas de esgoto doméstico (Piza, 2004). Segundo a autora do trabalho, o clone ED_04 foi

estritamente relacionado com outras arqueias não cultivadas provenientes da mesma amostra e puderam ser identificadas apenas até o nível de Ordem.

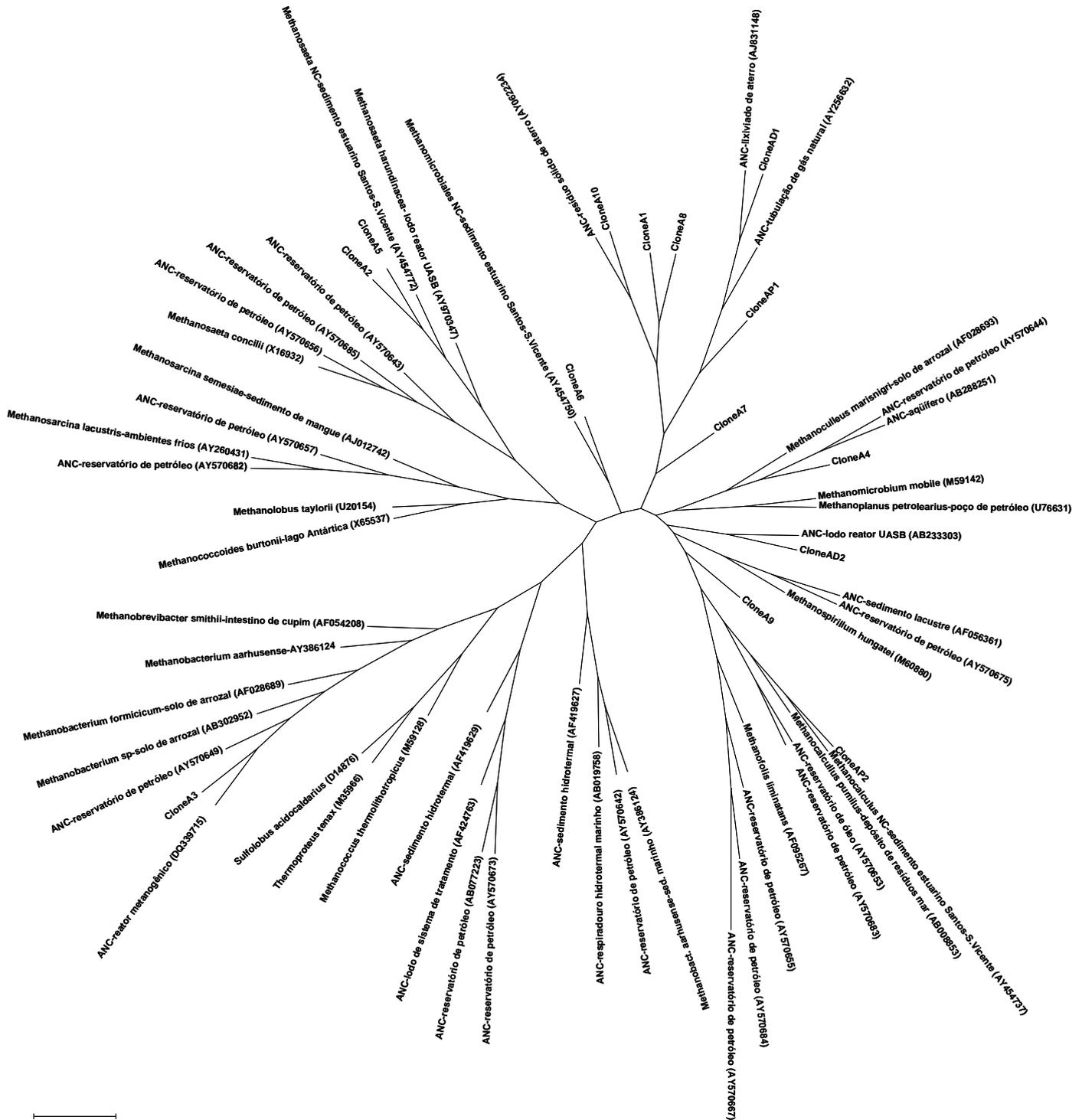


Figura 31 Árvore filogenética construída a partir de seqüências do DNAr 16S de arqueias, pelo método da Máxima Verossimilhança (MV), utilizando 1735 replicações. A sigla ANC significa Arqueia Não Cultivada. O grupo externo foi representado pelo microrganismo *Sulfolobus acidocaldarius*.

No outro ramo, os clones AP1, A7 e A8 apesar de não terem apresentado similaridade com nenhuma arqueia isolada ou não cultivada também foram relacionados à Ordem *Methanomicrobiales*, enquanto que as seqüências dos clones A1, A10 e AD1 permitiram identificá-los apenas como pertencentes ao Filo *Euryarchaeota*. Neste caso por se tratar de arqueias oriundas de ambientes tropicais pouco estudados, onde o conhecimento sobre a diversidade desses microrganismos ainda são incipientes, seria necessário analisar seqüências com tamanhos maiores que os obtidos neste trabalho, de aproximadamente 1500pb, para obter mais informações sobre a filogenia dos mesmos. É importante ressaltar que o fato da maioria das seqüências de RNAr 16S de arqueias, e também das bactérias, das amostras estudadas não terem apresentado similaridade com as seqüências depositadas nos bancos de dados públicos permite concluir sobre o desconhecimento da microbiota de regiões tropicais, como o sistema estuarino de Santos e São Vicente, a qual necessita continuar sendo investigada.

Os resultados das análises filogenéticas indicaram que os clones de arqueias foram relacionados a grupos metanogênicos, ou seja, aqueles que ocupam o último nível trófico no processo de digestão anaeróbio e produzem o gás metano (CH_4) como parte integral do seu metabolismo. A maioria das arqueias analisadas neste trabalho, presentes nas comunidades dos consórcios microbianos originados de amostras de sedimentos estuarinos enriquecidos com clorofenóis (Nakayama, 2005) utilizaram como substratos para a metanogênese os subprodutos da fermentação bacteriana e o formiato adicionado no meio e foram representadas por grupos metabolicamente distintos: (a) as hidrogenotróficas utilizadoras de H_2/CO_2 e formiato, e (b) as acetoclásticas utilizadoras de acetato. No primeiro grupo, a redução do CO_2 a CH_4 pode ter sido conduzida pela utilização do hidrogênio molecular (H_2) ou pelo formiato como doadores de elétrons. Neste caso, pela ação de uma série de enzimas, o dióxido de carbono foi reduzido à formil, subseqüentemente desidratado e novamente reduzido a metil. O grupo metil foi novamente reduzido a metano pelo sistema metil redutase no qual estão intimamente

envolvidas as coenzimas F₄₂₀ e 7-mercaptoetanol-treonina-fosfato (CoB), características dos grupos metanogênicos, as quais atuam como doadoras de elétrons (Madigan, 2004). No segundo grupo o acetato foi utilizado como substrato e, também através da interação de diversas enzimas, o grupo metil foi reduzido a metano enquanto que o grupo carboxílico foi oxidado a gás carbônico.

Assim, os diferentes grupos de arqueias foram importantes para a manutenção do curso da digestão anaeróbia, pois utilizaram os subprodutos da desalogenação e fermentação bacteriana, como o acetato e o H₂/CO₂, e o formiato adicionado ao meio nos ensaios de enriquecimento, como substratos para a metanogênese. Desta forma, tais microrganismos contribuíram para a redução da pressão parcial do hidrogênio no sistema, propiciando condições adequadas para a ocorrência das reações realizadas nas etapas de hidrólise, acidogênese e acetogênese, e indiretamente favorecendo o processo de desalogenação dos compostos clorados pelas bactérias.

Desta forma, as análises de filogenia revelaram que as bactérias pertencentes ao gênero *Sedimentibacter* e a Família dos clostrídeos possivelmente foram as responsáveis pela degradação dos compostos clorados e os outros grupos bacterianos e de arqueias contribuíram indiretamente para o processo global de degradação anaeróbia dos compostos estudados. Os dados obtidos sobre tais microrganismos poderão contribuir para o melhor entendimento da desalogenação redutiva por consórcios microbianos no processo de digestão anaeróbia, auxiliando assim com informações pertinentes para o desenvolvimento de tecnologias de biorremediação de áreas degradadas com PCP.

6. CONCLUSÕES

1. A comparação dos padrões de bandas, obtidos a partir da DGGE, revelou alterações nas estruturas das comunidades dos consórcios microbianos analisados, as quais provavelmente foram relacionadas às adversidades ocorridas durante o período de incubação dos sistemas, como a entrada de oxigênio nos frascos e o acúmulo dos compostos clorados no meio de cultivo, principalmente o 2,6-DCP.

2. A estimativa da diversidade beta também permitiu inferir que as alterações nas composições das comunidades microbianas foram devidas às duas estratégias empregadas nos ensaios de enriquecimento da microbiota autóctone do estuário estudado (pasteurização e não pasteurização do sedimento).

3. A obtenção de seqüências do DNAr 16S de bactérias e de arqueias foi mais efetiva pela estratégia de utilização de bibliotecas genômicas e de DGGE, respectivamente.

4. A maioria das seqüências de DNAr 16S das arqueias e bactérias encontrada nos consórcios microbianos não apresentou similaridade com as depositadas nos bancos de dados públicos, revelando a necessidade da realização de ensaios tradicionais de isolamento que possibilitem a

identificação destes microrganismos provenientes de sedimentos do sistema estuarino de Santos e São Vicente.

5. As análises das seqüências de DNAr 16S indicaram a possibilidade de existir novas espécies de bactérias e arqueias nos consórcios microbianos estudados e confirmaram a presença de linhagens pertencentes aos gêneros *Sedimentibacter*, *Clostridium*, *Alkalibacter* (Domínio *Bacteria*) e *Methanobacterium*, *Methanosaeta*, *Methanocalculus*, *Methanoculleus* (Domínio *Archaea*).

6. As bactérias pertencentes ao gênero *Sedimentibacter* e à Família dos clostrídeos podem ter sido responsáveis pela degradação dos compostos clorados enquanto que os outros grupos bacterianos (Famílias *Peptostreptococcaceae* e *Eubacteriaceae*) de arqueias (*Methanobacterium*, *Methanosaeta*, *Methanocalculus*, *Methanoculleus*, e as não identificadas) contribuíram indiretamente para o processo global de degradação anaeróbia dos compostos estudados.

7. RECOMENDAÇÕES

- Comparar a diversidade microbiana em consórcios anaeróbios originados de amostras de sedimentos do estuário de São Vicente “*in natura*” e provenientes de ensaios de enriquecimento para verificar a influência das diferentes condições sobre o crescimento ou a inibição das populações de arqueias e bactérias, utilizando os mesmos métodos moleculares deste trabalho.

- Utilizar iniciadores específicos na construção de bibliotecas genômicas e na realização da DGGE para obter seqüências de DNAr 16S que propiciem a identificação de outras populações de bactérias que possam estar envolvidas diretamente no processo de desalogenação redutiva. Além disso, utilizar outros iniciadores que permitam melhor seleção dos clones para o seqüenciamento dos fragmentos de DNAr 16S.

- Continuar investigando a fisiologia, ecologia e filogenia dos microrganismos presentes nessa região estuarina para obter mais informações sobre o funcionamento desse importante ecossistema, contribuindo assim para o desenvolvimento e a aplicação de novas técnicas de biorremediação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Academia de Ciências do Estado de São Paulo - ACIESP (1997). Glossário de Ecologia. Segunda Edição. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo.
- Adriaens, P.; Vogel, T. M. (1995). Biological treatment of chlorinated organics. *In: Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. Wiley-Liss, 435 – 486.
- Amman, R. I.; Ludwig, W.; Schleifer, K. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*, vol. 59, 143 – 169.
- Amman, R. I.; Ludwig, W. (2000). Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *Microbiology Reviews*, vol. 24, 555 – 565.
- Ampe, F.; Sirvent, A.; Zakhia, N. (2001). Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cavassa starch fermentation studied by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative rRNA hybridization. *International Journal Food Microbiology*, vol. 65, 45 - 54.
- Arahal, D. R.; Dewhirst, F. E.; Paster, B. J.; Volcani, B. E.; Ventosa, A. (1996). Phylogenetic analyses of some extremely halophilic archaea isolated from dead sea water, determined on the basis of their 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, 3779 – 3786.

- Araneda, P. A. C. (2004). *Suelos contaminados con hidrocarburos: RNA 16S como indicador de impacto*. Memorial para optar al título de Ingeniero Civil em Biotecnología. Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología, Universidade de Chile.
- Ausebel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struthl, K. (2001). *Short protocols in molecular biology*. Third Edition, John Wiley & Sons, Inc., United States.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, vol. 25, 3389 – 3402.
- Bae, H. S.; Moe, W. M.; Yan, J.; Tiago, I., Costa, M. S. (2006). *Propionicicella superfundida* gen. nov., sp. nov., a chlorosolvent-tolerant propionate-forming, facultative anaerobic bacterium isolated from contaminated groundwater. *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 29, 404 – 413.
- Baker, J. I.; Hites, R. A. (1999). Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in the remote North Atlantic marine atmosphere. *Environmental Science and Technology*, vol. 33, 14-20.
- Ballerstedt, H.; Hantke, J.; Bunge, M.; Werner, B.; Gerritse, J.; Sandreesen, J. A.; Lechner, U. (2004). Properties of a trichlorodibenzo-*p*-dioxin-dechlorinating mixed culture with a *Dehalococcoides* as putative dechlorinating species. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 47, 223–234.
- Basu, S. K., Oleszkiewicz, J. A., Sparling, R. (1996). Dehalogenation of 2-chlorophenol (2CP) in anaerobic batch culture. *Water Research*, vol. 30, 315 - 322.
- Beudet, R.; Lévesque, M. J.; Villemur, R. (1998). Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol in a contaminated soil inoculated with a methanogenic consortium or with *Desulfotobacterium frappieri* strain PCP-1. *Applied and Microbiology Biotechnology*, vol. 50, 135 – 141.
- Bedard, D. L.; Bailey, J. J.; Reiss, B. L.; Jerzak, G. S. (2006). Development and characterization of stable sediment-free anaerobic bacterial enrichment cultures that dechlorinate Aroclor 1260. *Applied Environmental Microbiology*, vol. 72, 2460 – 2470.
- Béja, O.; Suzuki, M. T.; Koonin, E. V.; Aravind, L.; Hadd, A.; Nguyen, L. P.; Villacorta, R.; Amjadi, M.; Garrigues, C.; Jovanovich, S. B.; Feldman, R. A.; DeLong, E. F. (2000). Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial

- assemblage. *Environmental Microbiology*, vol. 2, 516 – 529.
- Benoit, P.; Barriuso, E.; Houot, S.; Calvet, R. (1996). Influence of the nature of soil organic matter on the sorption–desorption of 4-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol and the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *European Journal of Soil Science*, vol. 47, 567 –578.
- Bérgamo, A. L. (2000). *Características da hidrografia, circulação e transporte de sal: Barra de Cananéia e Baía do Trapandé*. Dissertação de Mestrado. Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Boligian, A. T. A.; Nascimento, N. R. (2001). Problemas de saúde no Bairro Quarentenário – São Vicente (SP): Uma questão de poluição ambiental? *In: Teoria, técnicas, espaço e atividades: temas da geografia contemporânea*. Instituto de Geociências e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro.
- Boon, N.; Marle, C.; Top, E. M.; Verstraete, W. (2000). Comparison of the spatial homogeneity of physico-chemical parameters and bacterial 16S r RNA genes in sediment samples from a dumping site for dredging sludge. *Applied and Microbiology Biotechnology*, vol. 53, 742 -747.
- Bordo, A. A. (2005). Os eixos de desenvolvimento e a estruturação urbano-industrial do Estado de São Paulo, Brasil. *Scripta Nova: Revista Electrónica de Geografía y Ciencias Sociales*, vol. IX. Disponível em: <<http://www.ub.es/geocrit/sn/sn-194-79.htm>> [ISSN: 1138-9788]
- Bouchard, B.; Beaudet, R.; Villemur, R.; Mcsween, G.; Lepine, F.; Bisailon, J.G. (1996). Isolation and characterization of *Desulfitobacterium frappieri* sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol. *International Journal Systematic Bacteriology*, vol. 46, 1010 - 1015.
- Brasileiro, L. B.; Colodette, J. L.; Pilo-Veloso, D. (2001). Utilização de perácidos na deslignificação e no branqueamento de polpas celulósicas. *Química Nova*, vol. 24, 819 – 829.
- Breitenstein, A.; Juergen, Wiegell, Haertig, C.; Weiss, N.; Andreensen, J. R.; Lechner, U. (2002). Reclassification of *Clostridium hydroxybenzoicum* as *Sedimentibacter hydroxybenzoicus* gen. nov., comb. nov., and description of *Sedimentibacter saalensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 52, 801 – 807.
- Briée, C.; Moreira, D.; Lopez-Garcia, P. (2007). Archaeal and bacterial community composition of sediment and plankton from a suboxic freshwater pond. *Research in Microbiology*, vol. 158, 213 – 227.

- Bro-Rasmussen, F. (1996). Contamination by persistent chemicals in food chain and human health. *The Science of Total Environment*, vol. 188, 45 – 60.
- Brown, T. A. (2003). Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução. Tradução. Quarta edição. Editora Artmaed S. A., Porto Alegre, Brasil.
- Brucha, G. (2001). *Avaliação da diversidade microbiana de consórcios anaeróbios enriquecidos a partir de amostras de sedimento lacustre na degradação anaeróbia do tricloroetileno – TCE, empregando-se a técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante – DGGE*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Brucha, G. (2007). *Influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo na degradação anaeróbia do pentaclorofenol e na diversidade microbiana natural dos sedimentos do Estuário de Santos-São Vicente, Estado de São Paulo*. Tese de Doutorado. Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Burton, E. D.; Phillips, I. R.; Hawker, D. W. (2004). Sorption and desorption behavior of tributyltin with natural sediments. *Environmental Science and Technology*, vol. 38, 6694 – 6700.
- Buzzini, A. P.; Sakamoto, I. K.; Varesche, M. B., Pires, E. C. (2005). Evaluation of the diversity in an UASB reactor treating wastewater from an unbleached pulp plant. *Process Biochemistry*, vol 41, 168 – 176.
- Canhos, V. P.; Manfio, G. (2001). Recursos microbiológicos para biotecnologia. Disponível em <<http://www.mct.gov.br/temas/biotec>>
- Carmo, D. F. (2000). *Avaliação da presença de clorofenóis no reservatório de Salto Grande, situado na região de Americana, Estado de São Paulo*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Casamayor, E. O.; Calderón-Paz, J. I.; Pedrós-Alió, C. (2000). 5S rRNA fingerprints of marine bacteria, halophilic archaea and natural prokaryotic assemblages along a salinity gradient. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 34, 113 – 129.
- Cattony, E. B. M. ; Chinaglia, F.A. ; Ribeiro, R.; Zaiat, M.; Foresti, E.; Varesche, M. B. A. (2005). Ethanol and toluene removal in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor in the presence of sulfate. *Willey Inter Science*. Disponível em <http://www.interscience.wiley.com>.

- Cea, M.; Seaman, J. C.; Jara, A. A.; Fuentes, B.; Mora, M. L.; Diez, M. C. (2007). Adsorption behavior of 2,4-dichlorophenol and pentachlorophenol in an allophanic soil. *Chemosphere*, vol. 67, 1354 – 1360.
- Choi, J.; Kim, Y.; Choi, S. J. (2007). Reductive dechlorination and biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol using sequential permeable reactive barriers: laboratory studies. *Chemosphere*, vol. 67, 1551 – 1557.
- Cole, J. R.; Cascarelli, A. L.; Mohn, W. W.; Tiedje, J. M. (1994). Isolation and characterization of a novel bacterium growing via reductive dehalogenation of 2-chlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, 3536 – 3542.
- Cole, J. R.; Chai, B.; Marsh, T. L.; Farris, R. J.; Wang, Q.; Chandra, S.; McGarrel, D. M.; Schmidt, T. M.; Garrity, G. M.; Tiedje, J. M. (2003). The ribosomal Database project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Research*, vol. 31, 442 – 443.
- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB, (1990). Relatório: Sistema estuarino de Santos e São Vicente. Programa de Controle de Poluição (PROCOP), São Paulo.
- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB, (2001). Relatório: Contaminantes na Bacia do Rio Cubatão e seus reflexos na biota aquática. Programa de Controle de Poluição (PROCOP), São Paulo.
- Contrerasa, S.; Rodriguez, M.; Mornania, F.; Sansa, C.; Esplugasa, S. (2003). Contribution of the ozonation pre-treatment to the biodegradation of aqueous solutions of 2,4-dichlorophenol. *Water Research*, vol. 37, 3164 – 3171.
- Couto, J. M. (2003). *Entre estatais e transnacionais: o pólo industrial de Cubatão*. Tese de Doutorado. Instituto de Economia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Chaudhry, G. R.; Chapalamadugu, S. (1991). Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbiological Reviews*, vol. 55, 23 – 31.
- Christiansen, N.; Ahring, B. K. (1996). *Desulfitobacterium hafniense* sp. nov., na anaerobic, reductively dechlorinating bacterium. *International Journal Systematic Bacteriology*, vol. 46, 442 - 448.
- Damianovic, M. H. R. Z. (1997). *Degradação de pentaclorofenol (PCP) em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo*. Tese de Doutorado. Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

- Davies, N. A.; Edwards, P. A.; Lawrence, M. A. M.; Taylor, M. G.; Simkiss, K. (1999). Influence of particle surfaces on the bioavailability to different species of 2,4-dichlorophenol and pentachlorophenol. *Environmental Science of Technology*, vol. 33, 2465 – 2468.
- Dearden, J. C.; Calow, P.; Watts, C. (1994). A predictable response? *Chemistry in Britain*, vol. 30, 823-826.
- Del Grande, M.; Rezende, M. O. O.; Rocha, O. (2003). Distribuição de compostos organoclorados nas águas e sedimentos da Bacia do Rio Piracicaba/SP – Brasil. *Revista Química Nova*, vol. 26, 678 – 686.
- DeWeerd, K. A.; Mandelco, L.; Tanner, R. S. (1991). *Desulfomonile tiedje* gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reducing bacterium. *Archives of Microbiology*, vol. 154, 23 – 30.
- Diegues, A. C. (1987). Conservação e desenvolvimento sustentado de ecossistemas litorâneos no Brasil. In: Simpoósio sobre ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira. Anais da Academia de Ciências do Estado de São Paulo (ACIESP), Cananéia, São Paulo.
- Donskey, C. J.; Hujer, A. M.; Das, S. M.; Pultz, N. J.; Bonomo, R. A.; Rice, L. B. (2003). Use of denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the stool microbiota of hospitalized patients. *Journal of Microbiology Methods*, vol. 54, 249 – 256.
- Duarte, G., Soares, A., Seldin, L., Araujo, W. Y.; Van Elsas, J. (2001). Analysis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (dsz) genes. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, 1052 – 1062.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, vol. 32, 1792 – 1797.
- El Fantroussi, S.; Naveau, H.; Agathos, S. N. (1998). Anaerobic dechlorination bacteria. *Biotechnology Progress*, vol. 14, 167 – 188.
- Engwal, M. A.; Pignatello, J. J.; Grasso, D. (1999). Degradation and detoxication of wood preservatives creosote and pentachlorophenol in water by photo-fenton reaction. *Water Research*, vol. 33, 1151 – 1158.
- Escher, B. I.; Snozzi, M.; Schwarzenbach, R. P. (1996). Uptake, speciation and uncoupling activity of substituted fenols in energy transducing membranes. *Environmental Science and Technology*, vol. 30, 3071 – 3079.

- Fathepure, B. Z.; Nengu, J. P.; Boyd, S. A. (1987). Anaerobic bacteria that dechlorinate perchloroethene. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 53, 2671 – 2674.
- Fernandes, L. D. F. (2001). *Transporte de poluentes em estuários*. Trabalho de Monografia. Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal.
- Ferris, M. J.; Muyser, G.; Ward, D. M. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, 340 – 346.
- Fetzner, S. (1998). Bacterial dehalogenation. *Applied and Microbiology Biotechnology*, vol. 50, 633 - 657.
- Field, J. A.; Stams, A. J. M.; Kato, M.; Achraa, G. (1995). Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 77, 47 – 77.
- Filho, E. S.; Silva, R. S.; Barreto, H. H. C.; Inomata, O. N. K.; Lemes, Vera. R. R.; Kussumi, T. A.; Rocha, S. O. B. (2003). Grau de exposição a praguicidas organoclorados em moradores de aterro a céu aberto. *Revista de Saúde Pública*, vol. 34, 515 – 522.
- Foresti, E. (1999). Notas de aula: Processos e operações em tratamentos de resíduos. Programa de Pós Graduação em Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos.
- Garnova, E. S.; Zilina, T. N.; Tourova, T. P.; Kostrikina, N. A.; Zavarzin, G. A. (2004). Anaerobic, alkaliphic, saccharolytic bacterium *Alkalibacter saccharofermentans* gen. nov., sp. nov. From a soda lake in the transbaikal region of Russia. *Extremophiles*, vol. 8, 309 – 316.
- Gerritse, J.; Drzyzga, O.; Kloetstra, G.; Keijmel, M.; Wiersum, L. P.; Hutson, R.; Collins, M. D.; Gottschal, J. C. (1999). Influence of different electron donors and acceptors on dehalorespiration of tetrachloroethene by *Desulfitobacterium frappieri* TCE1. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, 5212 – 5221.
- Gerritse, J.; Renard, V.; Gomes, P. T. M.; Lawson, P. A.; Collins, M. D.; Gottschal, J. C. (1996). *Desulfitobacterium* sp. strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or *ortho*-chlorinated phenols. *Archives of Microbiology*, vol. 165, 132 – 140.
- Grabowski, A.; Nercessian, O.; Fayolle, F.; Blanchet, D.; Jeanthon, C. (2005). Microbial diversity in production waters of a low-temperature biodegraded oil reservoir. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 54, 427 - 443.

- Grandlic, C. J.; Geib, I., Pilon, R.; Sandrin, T. R. (2006). Lead pollution in a large, prairie-pothole lake (Rush Lake, WI, USA): effects on abundance and community structure of indigenous sediment bacteria. *Environmental Pollution*, vol. 144, 119 – 126.
- Griffiths, R. I., Whiteley, A. S., O'Donnell, A. G. and Bailey, M. J. (2000). Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, 5488 - 5491.
- Guindon, S.; Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, vol. 52, 696 – 704.
- Hagblom, M. M.; Young, L. Y. (1995) Chlorophenol degradation coupled to sulfate reduction. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 56, 3255 – 3260.
- Hagblom, M. M.; Knight, V. K.; Kerkhof, L. J. (2000). Anaerobic decomposition of halogenated aromatic compounds. *Environmental Pollution*, vol. 107, 199 – 207.
- Hagblom, M. M.; Valo, R. J. (1995). Bioremediation of chlorophenol wastes. In: *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. Willey-Liss, cap. 11, 389 – 434.
- Hagblom, M. M. (1992). Microbial breakdown of halogenated pesticides and related aromatic compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 103, 29 – 72.
- Higgins, I. J.; Best, D. J.; Jones, J. (1985). *Biotechnology principles and applications*. Oxford, Blackwell Science, 213 – 256.
- Hollinger, C.; Schraa, G.; Stams, A. J. M.; Zehnder, A. J. B. (1990). Reductive deschlorination of 1,2-dichloroethane and chloroethane by cell suspension of methanogenic bacteria. *Biodegradation*, vol. 1, 253 – 261.
- Huang, G.; Xiao, H.; Chi, J.; Shiu, W.; Mackay, D. (2000). Effects of pH on the aqueous solubility of selected chlorinated phenols. *Journal of Chemistry Engineering*, vol. 45, 411 – 414.
- Huber, T.; Faulkner, G., Hugenholtz, P. (2004) Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, vol. 20, 2317 – 2319.
- Jones, K. C.; Voogt, P. (1999). Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environmental Pollution*, vol. 100, 209 – 221.

- Joulian, C.; Ollivier, B.; Patel, B. K. C.; Roger, P. A. (1998). Phenotypic and phylogenetic characterization of dominant culturable methanogens isolated from ricefield soils. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 25, 135 – 145.
- Kahkonen, M. A.; Suominen, K. P.; Manninen, P. K. G.; Salkinoja-Salonem, M. S. (1998). 100 years of sediment accumulation history of organic halogens and heavy metals in recipient and nonrecipient lakes of pulping industry in Finland. *Environmental Science and Technology*, vol. 32, 65 – 76.
- Kapley, A.; De Baere, T.; Purohit, H. (2007). Eubacterial diversity of activated biomass from a common effluent treatment plant. *Research in Microbiology*, vol. 158, 494 – 500.
- Kenedy, A. C. (1999). Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, vol. 74, 65 – 76.
- Kjerfve, B. (1990). Manual for investigation of hydrological processes in mangrove ecosystems. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO) and United Nations Development Programme (UNDP), New Delhi.
- Kowalchuk, G. A.; Stephen, J. R.; de Boer, W.; Prosser, J. I.; Embley, T. M.; Woldendorp, J. W. (1997). Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of a beta subdivision of the class Proteobacteria in a coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 63, 1489 – 1497.
- Kozdrój, J.; van Elsas, J. D. (2001). Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 43, 197 – 212.
- Kudo, Y.; Nakajima, T.; Miyaki, T.; Oyaizu, H. (1997). Methanogen flora of paddy soils in Japan. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 22, 39 – 48.
- Larsen, S.; Hendricksen, H. V.; Ahring, B. K. (1991). Potential for thermophilic (50°C) anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in different ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 57, 2085 – 2090.
- Leckie, S. E. (2005). Methods of microbial community profiling and their application to forest soil. *Forest Ecology and Management*, vol. 220, 88 – 106.
- Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. (2004). Principles of biochemistry. Fourth Edition. Freeman & Co. Publishers, United States.

- Lima, E.T. (2005). Problemática dos resíduos sólidos urbanos no sistema estuarino Santos- São Vicente (SP). *In: Olhares geográficos – meio ambiente e saúde*. Organizadora Helena Ribeiro. Editora SENAC, São Paulo.
- Lopez, A. C. (2002). *Distribuição e biodiversidade de consórcios microbianos degradadores de compostos xenobioticos na Baixada Santista*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Low, A.; Schleheck, D.; Khou, M.; Aagaard, V.; Lee, M.; Manefield, M. (2007). Options for in situ remediation sol contaminated with a mixture of perchlorinated compounds. *Bioremediation Journal*, vol. 11, 1 – 12.
- Madsen, T.; Aamand, J. (1990). Effects of sulfuroxy anions on degradation of pentachlorophenol by a methanogenic enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 57, 2453 - 2458.
- Magar, V. S.; Stensel, H. D.; Puhakka, J. A.; Ferguson, J. F. (1999). Sequential anaerobic dechlorination of pentachlorofenol: competitive Inhibition effects and kinetic model. *Environmental Science and Technology*, vol. 33, 1604 – 1611.
- Magurran, A. E. (1989). Ecological diversity and its measurement. Princeton University Press, Princeton, United States.
- Marcon, R.; Bestetti, G., Frati, F., Pepi, M.; Baldi, F. (2007). Naphtalene and biphenyl oxidation by two marine *Pseudomonas* strains isolated from Venice Lagoon sediment. *International Biodeterioration and Biodegradation*, vol. 59, 25 – 31.
- Martins, C. C. (2005). *Marcadores orgânicos geoquímicos em testemunhos de sedimento do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, SP: um registro histórico da introdução de hidrocarbonetos no ambiente marinho*. Tese de Doutorado. Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo São Paulo.
- Masunaga, S.; Susarla, S.; Gundersen, J. L.; Yonezawa, Y. (1996). Pathway and rate of chlorophenol transformation in anaerobic estuarine sediment. *Environmental Science and Technology*, vol. 30, 1253 – 1260.
- Matheus, C. R.; Holde, K. E.; Ahern, K. G. (2000). Biochemistry. Third Edition. Addison Wesley Longman Inc., New York, United States.

- Matheus, D. R. (1988). *Biorremediação de solos contaminados com compostos organoclorados e biodegradação de hexaclorobenzeno por basidiomicetos brasileiros*. Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Mesquita, A. C. (2004). *Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes*. Tese de Doutorado. Coordenação dos programas de Pós-Graduação de Engenharia (COPPE), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Meyer, J. F. C. A.; Diniz, G. L. (2005). Dispersão de poluentes em sistemas estuarinos: modelo matemático, aproximação numérica e simulações. Relatório de Pesquisa. Instituto de Matemática, Estatística e Ciência da Computação. Departamento de Matemática Aplicada, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Miranda, L. B.; Castro, B. M.; Kjerfve, B. (2002). Princípios de oceanografia física de estuários. Editora da Universidade de São Paulo (EDUSP), São Paulo.
- Miranda, E. E.; Coutinho, A. C. (2004). Brasil visto do espaço. Embrapa monitoramento por satélite, Campinas. Disponível em <<http://www.cdbrasil.cnpm.embrapa.br>>.
- Monteiro Filho, M. (2002). Águas degradadas. *Revista Problemas Brasileiros*, número 354. Disponível em <<http://www.sescsp.org.br/sesc/revistas/revistas>>.
- Montenegro, M. A. P. (2001). *Avaliação da performance de um reator anaeróbio híbrido (RAH) e da atividade das populações de microrganismos anaeróbios na ausência e na presença de pentaclorofenol (PCP)*. Tese de Doutorado. Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Mohn, W. W.; Tiedje, J. M. (1992). Microbial reductive dehalogenation. *Microbial Reviews*, vol. 56, 482 - 507.
- Moreschi, J. C. (2000). Produtos preservantes de madeira. Curso de Pós-Graduação para alunos de Engenharia Ambiental. Departamento de Engenharia e Tecnologias Rurais. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Mori, K.; Yamamoto, H.; Kamagata, Y.; Hatsu, M.; Takamizawa, K. (2000). *Meyhanocalculus pumillus* sp. nov., a heavy-metal-tolerant methanogen isolated from a waste-disposal site. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*, vol. 50, 1723 – 1729.
- Muyser, G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion of Microbiology*, vol. 2, 312 – 322.

- Muyser, G. (1998). Structure, function and dynamics of microbial communities: the molecular biological approach. In: G. R. Carvalho (Editor). *Advances in Molecular Ecology*. IOS Press, Amsterdam.
- Muyser, G.; Hottenträger, S.; Teske, A.; Wamer, C. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR – amplified 16S rRNA – A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. *Molecular Methods Ecology Manual*, 1 - 23.
- Muyzer, G.; de Waal, E. S.; Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 59, 695 – 700.
- Nakagawa, L. E. (2003). *Aleração de característica do solo para remoção de hexaclorobenzeno de área contaminada*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Nakayama, C. R. (2005). *Degradação anaeróbia de pentaclorofenol (PCP), 2, 3, 4-triclorofenol (2,3 4-TCP) e 2, 6-diclorofenol (2,6-DCP) por culturas enriquecidas a partir de sedimento contaminado do Sistema Estuarino Santos e São Vicente*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Nakayama, C. R. (1999). *Avaliação da biodegradação de pentaclorofenol por bactérias*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade de Federal de São Carlos, São Carlos.
- Narasimgarao, P.; Häggblom, M. M. (2006). *Sedimenticola selenatireducens*, gen. nov., sp. nov., an anaerobic selenate-respiring bacterium isolated from estuarine sediment. *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 29, 182 – 188.
- Nascimento, N. R. (1999). *Poluição de solos podzóicos por hexaclorobenzeno e pentaclorofenol no litoral do Estado de São Paulo – Brasil*. Instituto de Geociências e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista (UNES), Rio Claro.
- Nastasi, F. R. (2005). *Caracterização da diversidade de consórcios degradadores de compostos xenobióticos (hidrocarbonetos e PCB's) em sedimento marinho do Brasil e Antártica*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. (2000). *Principles of Biochemistry*. Third edition. Worth Publishers. New York.

- Nielsen, T. A.; Liu, W. T., Filipe, C.; Grady, L.; Molin, S.; Stahl, D. A. (1999). Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, 1251 – 1258.
- O'Donnell, A. G.; Göres, H. E. (1999). 16S rDNA methods in soil microbiology. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 10, 225 – 229.
- Odum, E. P. (1998). *Ecologia*. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro.
- Ogata, S. O. (2005). *Alinhamento de seqüências biológicas com o uso de algoritmos genéticos*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade de Federal de São Carlos, São Carlos.
- Old, R. W.; Primrose, S. B. (1991). *Principles of gene manipulation: an introduction to genetic engineering*. Fourth Edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England.
- Ollivier, B.; Fardeau, M. L.; Cayol, J. L.; Magot, M., Patel, B. K. C.; Prensier, G.; Garcia, J. L. (1998). *Methanocalculus halotolerans* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil-producing well. *International Journal Systematic Bacteriology*, vol. 48, 821 - 828.
- Orphan, V. J.; Hinrichs, K. U.; Ussler, W.; Paul, c. K.; Taylor, L. T.; Sylva, S. P.; Hayes, J. M.; DeLong, E. F. (2001). Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, 1922 – 1934.
- Oubina, A.; Puig, D.; Gascón, J.; Barceló, D. (1997). Determination of pentachlorophenol in certified waste waters, soil samples and industrial effluents using ELISA and liquid solid extraction followed by liquid chromatography. *Analytical Chemical Acta*, vol. 36, 49 –59.
- Pagliosa, P. R. (2004). *Variação espacial nas características das águas, dos sedimentos e da macrofauna bêntica em áreas urbanas e em unidades de conservação na baía da Ilha de Santa Catarina*. Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Park, S. K.; Bielefeldt, A. R. (2003). Aqueous chemistry and interactive effects on non-ionic surfactant and pentachlorofenol sorption to soil. *Water Research*, vol. 37, 4663 – 4672.
- Pera-Titus, M.; Molina, G. V.; Banos, M. A.; Giménez, J. Esplugas, S. (2004). Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: a general review. *Applied Catayisis*, vol. 47, 219 – 256.

- Piza, F. F. (2004). *Ecologia molecular microbiana associada a sedimentos do estuário de Santos-São Vicente (SP, Brasil)*. Tese de Doutorado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Promega (2005). Technical Manual: pGEM[®]T and pGEM[®]T easy vectors systems. Revised Edition. United States.
- Quinones, E. M. (2000). *Relações água-solo no sistema ambiental do estuário de Itanhaém (SP)*. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Ranjard, L.; Poly, F.; Nazaret, S. (2000). Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology*, vol. 51, 167 – 177.
- Ritchie, N.; Schutter, M.; Dick, R.; Myrold, D. (2000). Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, 1668 – 1675.
- Rodrigues, D. F. (2002). *Caracterização polifásica da biodiversidade de isolados degradadores de poluentes xenobióticos na Baixada Santista*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Rosseló-Mora, R.; Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Review*, vol. 25, 39-67.
- Rouviere, P.; Mandelco, L.; Winks, S.; Woese, C. R. (1992). A detailed phylogeny for the Methanomicrobiales. *Systematic Applied Microbiology*, vol. 15, 363 – 371.
- Saia, F. T. (2005). *Contribuição à exploração tecnológica dos estudos microbianos realizados no programa Biota FAPESP: Avaliação do potencial da degradação anaeróbia do pentaclorofenol (PCP) em reator horizontal de leito fixo (RAHLF)*. Tese de Doutorado. Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Saia, F. T.; Damianovic, M. H. R. Z.; Cattony, E. B. M.; Brucha, G.; Foresti, E.; Vazoller, R. F. (2007). Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol in a fixed-film reactor inoculated with polluted sediment from Santos-São Vicente estuary, Brazil. *Applied Microbiology Biotechnology*, vol. 75, 665 – 672.

- Sakamoto, I. K. (2001). *Comparação da estrutura de comunidades microbianas complexas presentes em sistemas de lodos ativados modificados para remoção biológica de fósforo em excesso, utilizando a técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)*. Tese de Doutorado. Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Sambrook, F.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning – A laboratory manual*. Second Edition, Cold Spring Harbor Press, New York.
- Sanford, R. A.; Cole, J. R.; Löffler, F. E.; Tiedje, J. M. (1996). Characterization of *Desulfitobacterium chlororespirans* sp. nov., which grows by coupling the oxidation of lactate to the reductive dechlorination of 3-chloro-4-hydroxybenzoate. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, 3800 – 3808.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy Science*, vol. 74, 5463 – 5467.
- Sanz, J. L. (2002). Métodos analíticos de biología molecular en digestión anaerobia. *In: VII Taller Sobre Digestión Anaerobia*, Mérida, México.
- Sanz, J. L.; Köchling, T. (2007). Molecular biology techniques used in wastewater treatment: an overview. *Process Biochemistry*, vol. 42, 119 – 133.
- Scullacio, S. A. (2002). *Clonagem e caracterização molecular da fosforribosil pirofosfato sintase de cana-de-açúcar*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade de Federal de São Carlos, São Carlos.
- Silva, S. P. (2004). *Isolamento e caracterização de bactéria redutora de sulfato: ênfase na remoção de benzoato*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Smidt, H. (2000). *Molecular characterization of anaerobic dehalogenation by Desulfitobacterium dehalogenans*. Phd Thesis. Wageningen University, The Netherlands.
- So, M. C.; Young, L. Y. (1999). Isolation and characterization of a sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, 2969 – 2976.
- Sousa, D. Z.; Pereira, A. A.; Smidt, H.; Stams, M. Alves, M. (2007). Molecular assessment of complex microbial communities degrading long chain fatty acids in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 60, 252 – 265.

- Sponza, D. T.; Ulukoy, A. (2005). Treatment of 2,4-dichlorophenol (DCP) in a sequential anaerobic (upflow anaerobic sludge blanket) aerobic (completely stirred tank) reactor system. *Process Biochemistry*, vol. 40, 3419 – 3428.
- Sterky, F.; Lundeberg, J. (2000). Sequence analysis of genes and genomes. *Journal of Biotechnology*, vol. 76, 1 – 31.
- Stryer, L. (1992). *Bioquímica*. Terceira Edição. Editora Guanabara Koogan S. A, Rio de Janeiro.
- Su, X.; Zeng, G.; Huang, G.; Li, J.; Liang, J.; Wang, L.; Du, C. (2007). Modeling research on the sorption kinetics of pentachlorophenol (PCP) to sediments based on neural networks and neuro-fuzzy systems. *Engineering Applications of Artificial Intelligence*, vol. 20, 239 – 247.
- Sugimoto, N.; Nakano, S.; Yoneyama, M.; Honda, K. (1996). Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes. *Nucleic Acids Research*, vol. 24, 4501 – 4505.
- Susarla, S.; Yonezawa, Y.; Masunaga, S. (1998). Reductive transformations of halogenated aromatic in anaerobic estuarine sediment: kinetics, products and pathways. *Water Research*, vol. 32, 639 – 648.
- Takeuchi, R.; Suwa, Y.; Yamagishi, T.; Yonezawa, Y. (2000). Anaerobic transformation of chlorophenols in metanogenic sludge unexposed to chlorophenols. *Chemosphere*, vol. 41, 1457 – 1462.
- Taniguchi, S. (2001). *Avaliação da contaminação por hidrocarbonetos e organoclorados em diferentes compartimentos do ambiente marinho do Estado do Rio de Janeiro*. Tese de Doutorado. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Tartakovsky, B.; Manuel, M. F.; Beaumier, D.; Greer, C. W.; Guiot, S. R. (2000). Enhanced selection of an anaerobic pentachlorophenol-degrading consortium. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 73, 476 – 483.
- Thao, V. D.; Masahide, K.; Ryo, T. (1993). Persistent organochlorine residues in soils from tropical and sub-tropical Asian countries. *Environmental Pollution*, vol. 81, 61-71.
- Teske, A. Sigalevich, P.; Cohen, Y.; Muysen, G. (1996). Molecular identification of bacteria from a coculture by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments as a tool for isolation in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, 4210 – 4215.
- Tiedje, J. M.; Assuming-Brempong, S.; Nüsslein, K.; Marsh, T. L.; Flynn, S. J. (1999). Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*, vol. 13, 109 – 122.

- Toffin, L.; Webster, G.; Weightman, A. J.; Fry, J. C.; Prieur, D. (2004). Molecular monitoring of culturable bacteria from deep-sea sediment of the Nankai Trough, Leg 190 Ocean Drilling Program. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 48 (3), 357 – 367.
- Tordoir, W. F.; Sittert, N. J. (1994). Organochlorines. *Toxicology*, vol. 91, 51 – 57.
- Torsvik, V.; Ovreas, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, vol. 5 (3), 240 – 245.
- Utkin, I.; Dalton, D.; Wiegel, J. (1995). Specificity of reductive dehalogenation of substituted *ortho*-chlorophenols by *Desulfitobacterium dehalogenans* JW/IU-DC1. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, 346 – 351.
- Utkin, I.; Woese, C.; Wiegel, J. (1994). Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds. *International Journal Systematic Bacteriology*, vol. 44, 612 – 619.
- Valleys, T.; Top, E.; Muysers, G.; Macheret, V.; Laguerre, G.; Rigaud, A.; Soulas, G. (1997). Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rRNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 24, 279 – 285.
- Van Doesburg, W.; Van Eekert, M. H. A.; Middel dorp, J. P.; Balk, M.; Schraa, G.; Stams, A. J. M. (2005). Reductive dechlorination of β -hexachlorocyclohexane (β -HCH) by a Dehalobacter species in coculture with a *Sedimentibacter* sp. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 54, 87 – 95.
- Vidal, L. H. (1991). *Otimização da análise de pesticidas clorados na presença de PCBs em sistemas aquáticos*. Dissertação de mestrado. Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Voet, D.; Voet, J. G. (1990). *Biochemistry*. John Wiley & Sons.
- Walter, J.; Tannock, G. W.; Tikala-Timisjarvi, A.; Rodtong, S.; Loach, D. M.; Munro, K.; Alatosava, T. (2000). Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and specie-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, 297 – 303.
- Ward, D. M.; Weller, R.; Bateson, M. M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 345 – 365.

- Watson, J. D.; Gilman, M.; Witkowski, J.; Zoller, M. (1997). O DNA recombinante. Segunda Edição. Ed. UFOP, Ouro Preto, MG.
- Wiegel, J.; ZHANG, X. M.; WU, Q. Z. (1999). Anaerobic dehalogenation of hydroxylated polychlorinated biphenyls by of *Desulfitobacterium dehalogenans*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, 2217 – 2221.
- Wild, S. R.; Harrad, S. J.; Jones, K. C. (1993). Chlorophenols in digest U.K. sewage sludges. *Water Researchs*, vol. 27, 1527 – 1534.
- Whitman, W. B.; Coleman, D. C.; Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, vol. 95, 6578 – 6583.
- World Health Organization – WHO (1989). Pentachlorophenol. *Environmental Health Criteria*, vol. 71, 236.
- Wright, A. D. G.; Pimm, C. (2003). Improved strategy for presumptive identification of methanogens using 16S riboprinting. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 55, 337 – 349.
- Yang, Y.; Pesaro, M.; Sigler, W.; Zeyer, J. (2005). Identification of microorganisms involved in reductive dehalogenation of chlorinated ethenes in an anaerobic microbial community. *Water Research*, vol.39, 3954 – 3966.
- Yan, H.; Jianming, X.; Wang, H.; Wu, Y. (2006). Generalized models for prediction or pentachlorophenol dissipation dynamics in soils. *Environmental Pollution*, vol. 147, 343 – 349.
- Yoshida, N.; Yoshida, Y.; Handa, Y.; Kim, H.; Ichihara, S.; Katayama, A. (2007). Polyphasic characterization of a PCP-to-phenol dechlorinating microbial community enriched from paddy soil. *Science of the Total Environment*, vol. 381, 233 – 242.
- Young, L. Y.; Cerniglia, C. E. (1995). Chemical contamination of the environment: sources, types, and fate of syntetic organic chemicals. In: *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. Wiley-Liss.
- Yu, J.; Nestricks, T. J.; Savage, P. E. (2006). Microcontaminants in pentachlorophenol synthesis: effects of catalyst identity, concentration, and addition strategy. *Industrial and Engeneering Chemistry Research*, vol. 45, 5205 – 5210.
- Zagatto, P. A.; Bertoletti, E. (2006). Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. Editora RiMa. São Carlos, São Paulo.

Zhang, X.; Mandelco, L.; Wiegel, J. (1994). *Clostridium hydroxybenzoicum* sp. nov., an amino acid utilizing, hydroxybenzoate-decarboxylating bacterium isolated from methanogenic freshwater pond sediment. *International Journal Systematic Bacteriology*, vol. 44, 214 – 222.

9. ANEXOS

PARTE 1: soluções utilizadas na preservação das amostras e na realização das técnicas moleculares.

- **Solução de Acrilamida/Bis 40%**

Dissolver os solutos em água ultra-pura (Tabela 1), filtrar a solução em membrana de 0,45 μ m e armazenar a mesma em frasco âmbar a 4°C.

Tabela 1. Componentes utilizados no preparo do meio líquido LB.

Componentes	Quantidade
Acrilamida	194,6 g
Bis-acrilamida	5,3 g
Água ultra pura (q.s.p)	500,0 mL

- **Formamida deionizada**

Dissolver 25g de resina AGS em 500mL de formamida (100%), com auxílio de agitador magnético, em temperatura ambiente. Filtrar a solução para remover a resina e armazenar a 4°C, sob o abrigo da luz.

- **Solução de persulfato de amônia (APS 10%)**

Dissolver 1g de persulfato de amônia em 10mL de água ultra-pura. Armazenar a solução por

até 4 semanas sob refrigeração (4°C).

▪ **Meio líquido de cultivo Luria Bertane (LB), pH 7,5**

Pesar todos os componentes (Tabela 2) e dissolvê-los em 700-800mL de água ultra pura. Aquecer a solução em microondas até a completa dissolução dos solutos. Completar o volume de 1000mL com água ultra pura. Ajustar o pH para 7,5 com hidróxido de sódio. Autoclavar a solução a 121°C, por 15 minutos, e resfriá-la até atingir 50°C em um recipiente contendo água fria. Para fazer o meio LB sólido, adicionar 15g/L de ágar na solução antes de autoclavar.

Tabela 2. Componentes utilizados no preparo do meio líquido LB.

Componentes	Quantidade
Extrato de levedura	5,0 g
Bacto-triptona	10,0 g
Cloreto de sódio	10,0 g
Água ultra pura (q.s.p)	1000,0 mL

▪ **Solução Tampão Tris-Ácido Acético-EDTA (TAE 50x), pH 8,0**

Misturar as soluções em água ultra pura na ordem apresentada na Tabela 3. Armazenar a solução em frasco âmbar ao abrigo da luz e sob refrigeração (4°C). A solução de EDTA 0,5M e pH 8,0 deve ser preparada pela dissolução de EDTA sódico (18,61g) em 500mL de água ultra pura. Ajustar o pH para 8,0 com NaOH 10N e completar o volume final para 1L com água destilada. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Tabela 3. Componentes utilizados no preparo da solução TAE 50x.

Componentes	Quantidade
Tris-HCl	242,0 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA 0,5 M pH 8,0	100,0 mL
Água ultra pura (q.s.p)	1000,0 mL

▪ **Solução Tampão Tris-Ácido Acético-EDTA (TAE 1x)**

Diluir 30mL de TAE 50x em 1470mL de água ultra pura. Armazenar a solução em temperatura ambiente.

- **Solução Tampão Tris Borato EDTA (TBE 10x)**

Dissolver os solutos em água ultra pura (Tabela 4). Armazenar a solução em temperatura ambiente.

Tabela 4. Componentes utilizados no preparo da solução TBE 10x.

Componentes	Quantidade
Tris-HCl	216,0 g
Ácido bórico	110,0 g
EDTA	16,6 g
Água ultra pura (q.s.p)	2000,0 mL

- **Solução de Glicose-Tris-EDTA (GTE)**

Misturar as soluções descritas na Tabela 5 e armazenar sob refrigeração (4°C).

Tabela 5. Componentes utilizados na preparação da solução GTE.

Componentes	Volume (mL)
Glicose (50M)	1,25
Tris-Cl (25mM), pH 8,0	0,625
EDTA (10mM), pH 8,0	0,5
Total	25,0

- **Solução de lise alcalina hidróxido de sódio/dodecil sulfato de sódio (NaOH/SDS)**

Preparar separadamente as soluções estoque de NaOH (2N) e SDS (10%) e armazená-las a 4°C. A solução de lise alcalina consiste na mistura de volumes iguais de cada solução estoque, as quais devem estar a temperatura ambiente.

- **Solução de acetato de potássio**

Adicionar solução de acetato de potássio (5M) à de ácido acético glacial até obter pH final em valor de 4,8. Completar o volume da solução com água ultra pura. Os volumes utilizados no preparo da solução estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Componentes utilizados na preparação da solução de acetato de potássio.

Componentes	Volume (mL)
Acetato de potássio (5M)	60,0
Ácido acético glacial	11,5
Água ultra pura	28,5
Total	50,0

▪ **Tampão Salino Fosfato (PBS 1x)**

Dissolver todos os componentes em 800mL de água ultra-pura (Tabela 7), ajustar o pH para 7,4 com ácido clorídrico e completar o volume para 1000mL.

Tabela 7. Componentes utilizados na preparação da solução de acetato de potássio.

Componentes	Massa (g)
NaCl	80,0
KCl	2,0
Na ₂ HPO ₄ anidro	14,2
KH ₂ PO ₄	2,4

PARTE 2: Matrizes de dados de presença/ausência das espécies nas comunidades utilizadas na análise da diversidade de arqueias e bactérias.**Tabela 8.** Matriz de dados de presença e ausência de bandas nas amostras pasteurizadas e não pasteurizadas (Domínio *Archaea*)

Amostras	Bandas																																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39			
R1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
P1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P2	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	
NP1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	
NP2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	
NP3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
NP4	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
DCFpir	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	

Tabela 9. Matriz de dados de presença e ausência de bandas nas amostras pasteurizadas e não pasteurizadas (Domínio *Bacteria*)

Amostras	Bandas																																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36			
R1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	
P1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
P2	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
NP1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
NP2	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
NP3	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
NP4	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
DCFpir	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1

Amostras	Bandas												
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
R1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1
P1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
P2	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1
NP1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
NP2	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1
NP3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
NP4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DCFpir	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0