

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

EUZEBIO BELI

**ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIANA
EM REATOR ASBR NO TRATAMENTO DA DRENAGEM
ACIDA DE MINAS SINTÉTICA SOB DIFERENTES
CONDIÇÕES OPERACIONAIS**

Poços de Caldas/MG

2014

EUZEBIO BELI

**ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIANA
EM REATOR ASBR NO TRATAMENTO DA DRENAGEM
ACIDA DE MINAS SINTÉTICA SOB DIFERENTES
CONDIÇÕES OPERACIONAIS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia Ambiental pela Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Gunther Brucha

Poços de Caldas/MG

2014

EUZEBIO BELI

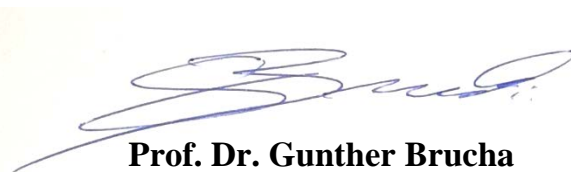
**ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIANA EM REATOR ASBR NO
TRATAMENTO DA DRENAGEM ÁCIDA DE MINAS SINTÉTICA SOB
DIFERENTES CONDIÇÕES OPERACIONAIS**

/

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia Ambiental, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas.

Área de Concentração: Ciência e Engenharia Ambiental.

Aprovada em: 12 de novembro de 2014



Prof. Dr. Gunther Brucha

Instituição: UNIFAL-MG



Profa. Dra. Flávia Talarico Saia

Instituição: UNIFESP



Profa. Dra. Renata Piacentini Rodriguez

Instituição: UNIFAL-MG

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, in memoriam.

Ando devagar porque já tive pressa

E levo esse sorriso porque já chorei demais

Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe

Só levo a certeza de que muito pouco sei

Ou nada sei

Conhecer as manhas e as manhãs

O sabor das massas e das maçãs

É preciso amor pra poder pulsar

É preciso paz pra poder sorrir

É preciso a chuva para florir

Penso que cumprir a vida seja simplesmente

Compreender a marcha e ir tocando em frente

Como um velho boiadeiro levando a boiada

Eu vou tocando os dias pela longa estrada, eu vou

Estrada eu sou

Todo mundo ama um dia, todo mundo chora

Um dia a gente chega e no outro vai embora

Cada um de nós compõe a sua história

Cada ser em si carrega o dom de ser capaz e ser feliz

Cada um de nós compõe a sua história

Cada ser em si

Carrega o dom de ser capaz

E ser feliz

Adaptado de Almir Sater – Tocando em Frente

AGRADECIMENTOS

A Deus, a Quem não me vêem palavras que possam exprimir meu agradecimento, porque sou “dependente de sua graça e de seu amor que é incondicional”.

A minha esposa, mulher e companheira Márcia, a meus filhos João Pedro, Luiz Henrique e Anna Beatriz. Obrigado pelo amor, compreensão, paciência e o apoio incondicional, bem como pela motivação dedicada a mim durante todos esses longos anos de vida acadêmica. Amo vocês, sem vocês não seria possível!

Este agradecimento deve ser destacado. Agradeço a Barbara Franco, colega de turma do mestrado e sua orientadora Profa. Renata, que me forneceram as amostras de lodo do reator que estavam estudando. Bárbara, muito obrigado por guardar amostras desde o início!

A meu orientador Gunther pelas oportunidades, ensinamentos e paciência. Ao pouco mais que aprendi do vasto mundo da Microbiologia Ambiental, devo em grande parte a sua orientação e aulas. Obrigado não só pela orientação, mas pela oportunidade e por ter acreditado em mim desde meu ingresso no Mestrado.

A minha mãe Irene, que me deu a vida para ser vivida e me levou ao caminho do conhecimento da bondade de Deus e ainda financiou meu veículo, utilizado para as viagens até Poços de Caldas, para ajudar nesta meta da minha vida.

Ao meu pai Moacir (*in memorian*), que mesmo nos momentos difíceis me mostrou o caminho da escola, e me levou até lá, muitas vezes com grandes dificuldades.

Aos meus irmãos Rodrigo e Sidnei, a todos meus cunhados e cunhadas que de uma forma ou de outra participaram desta conquista, mesmo que de longe.

Aos antigos colegas e sempre amigos Ronaldo Zucheratto Rosa (Padre) e Célia Regina Gregório, que por muitas vezes “cobriam” meu setor de trabalho para que eu pudesse fazer minhas disciplinas como aluno especial. Também agradeço ao grande amigo e incentivador de minha vida acadêmica, Celso Leite Villela por conseguir e avalizar minhas trocas de horários dentro da Instituição. Ao amigo e professor Gilberto Hussar, por me colocar na vida acadêmica e ter acreditado no meu trabalho. Vocês fazem parte da minha conquista. Sou eternamente grato.

A Profa. Dra. Valéria Maia de Oliveira por ter me recebido de braços abertos no DRM do CPQBA-UNICAMP (*Departamento de Recursos Microbianos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas*), com agradecimentos especiais à Virgínia

Medeiros de Siqueira e Daiane Belgine, que não mediram esforços para ensinar e auxiliar na técnica do DGGE com minhas amostras. Muito obrigado à todas.

As pessoas que estiveram comigo no laboratório de microbiologia e biologia molecular Fabiana e Elize, compartilhando, ensinando e trabalhando junto. À Elize, especialmente na fase final, me auxiliando nos PCRs, preparo para o sequenciamento, no tratamento dos dados e na revisão. Muito obrigado!

A todos os professores que participaram da minha formação desde a alfabetização até aqui, na pós. Agradeço a todos!

A todos os colegas da primeira turma do mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental da Unifal-MG, em especial pelo companheirismo e ajuda durante os estudos e trabalhos da fase dos créditos a cumprir.

A todos os aqui não citados, mas que contribuíram de alguma forma para minha vida científica e acadêmica. Obrigado!

RESUMO

Neste trabalho foi realizada a caracterização microbiana, por meio de técnicas de Biologia Molecular, do lodo granular do processo de precipitação dos metais ferro, zinco e cobre por sulfato gerado a partir de um reator biológico em batelada sequencial (ASBR) para redução de sulfato de drenagem ácida de minas (DAM) sintética em suas diferentes fases operacionais. O reator foi inoculado com lodo granular de reator UASB tratando efluente de abatedouro de aves, operando em relação DQO/sulfato 1,0. O etanol foi utilizado como doador de elétrons e o sulfato de sódio como receptor de elétrons. Para o presente estudo as amostragens de lodo foram realizadas em pH 5,0; pH 4,0; pH 4,0 + Fe²⁺, pH 4,0 + Fe²⁺; Zn²⁺; pH 4,0+Fe²⁺; Zn²⁺; Cu²⁺ sempre quando ocorria redução máxima de sulfato no reator, o inóculo também foi estudado para comparação. Após coleta de todas as amostras, realizou-se a extração do DNA, seguida de purificação e amplificação para o RNAr16S para os Domínios estudados e as sequências foram separadas através de DGGE. A estrutura das comunidades foi analisada em função da composição e riqueza de bandas de DGGE nos consórcios microbianos. A análise do perfil de bandas do DGGE permitiu visualização da dinâmica da população microbiana presente em cada fase do tratamento biológico da DAM. Os resultados revelaram que ocorreu maior variação na diversidade de microrganismos do domínio *Bacteria* do que de *Archaea* nos tratamentos da DAM com os parâmetros operacionais estudados. Dentre essas observações, percebe-se que as sucessivas diminuições de pH foram menos influentes na diversidade do que foi a adição dos metais, principalmente quando houve adição do Fe. O Domínio *Bacteria* apresentou maiores reduções de bandas do que o domínio *Archaea*, que sofreu menores influências às condições operacionais. Comparando-se a diversidade de bactérias e arqueias neste estudo, observa-se que as bactérias foram 56,5% maior que as arqueias em termos de diversidade pelas bandas de DGGE apresentadas. Diminuições no pH e adição sucessiva dos metais Fe, Zn e Cu foram associados a alterações temporais na estrutura da comunidade bacteriana. Nas análises de sequenciamento para domínio *Bacteria*, apesar de baixa qualidade do sequenciamento das bandas recortadas, foi possível fazer uma comparação entre o BLAST e a base de sequências do NCBI. Uma das bandas apresentou similaridade de 88 e 87% com clones não cultivados de *Geobacter* e *Clostridium*, respectivamente. Estes microrganismos são relatados como sendo redutores de sulfato. Outras duas bandas apresentaram 91% de similaridade com clone não cultivado de bactérias. Já para o Domínio *Archaea*, a análise comparativa indicou similaridade de três das cinco bandas com os clones não cultivados de *Methanomicrobiales* archaeon F5OHPNU07IK8FO e duas das bandas com o gênero *Methanosaeta* sp. clone DI CO3, ambas arqueias relatadas como sendo presentes em lodo granular de diversos tratamentos anaeróbios. Conclui-se que a estimativa da diversidade permitiu inferir que as alterações nas composições das comunidades microbianas foram devidas as condições operacionais impostas.

Palavras-chaves: ASBR. Biologia Molecular. DAM. Diversidade microbiana. PCR/DGGE.

ABSTRACT

The microbial characterization of this study was carried out by molecular biology techniques, of granular sludge samples from precipitation of the metals iron, zinc and copper in sulphide generated from a biological sequencing batch reactor (ASBR) to reduce the sulphate of synthetic acid drainage mines in its different operational phases. The reactor was inoculated with granular sludge from UASB reactor treating effluent from poultry slaughterhouse operating in ratio COD/sulphate 1.0. Ethanol was used as electron donor and sodium sulphate as electron acceptor. For this study, samples of sludge were taken on pH 5.0; pH 4.0; pH 4.0 + Fe²⁺, pH 4.0 + Fe²⁺; Zn²⁺; pH 4.0 + Fe²⁺; Zn²⁺; Cu²⁺ whenever maximum reduction of sulphate in the reactor occurred. The inoculums was also studied for comparison. After collecting all samples, the extraction of DNA was carried out, followed by purification and amplification to RNAr16S for the studied Domains and the sequences were separated by DGGE. The structure of the communities was analyzed in view of the composition and richness of DGGE bands in microbial consortia. The DGGE bands' profile analysis allowed visualization of the dynamics of the microbial population present in each phases of the AMD biological treatment. Results showed that a higher variation occurred in diversity of microorganisms of the *Bacteria* domain than that in *Archaea* in treatment with the operating parameters studied. Among these observations, it is perceived that the successive decreases in pH were less influential in diversity than it was the metals additions, mainly when there was addition of Fe. The *Bacteria* domain presented higher reductions bands than the *Archaea* domain, which suffered lower influences from operational conditions. When comparing the diversity of *Bacteria* and *Archaea* in this study, it is observed that the bacteria were 56.5% higher than the *Archaea* in terms of diversity by DGGE bands presented. Diminishing in pH and successive addition of the metals Fe, Zn and Cu were associated with temporal changes in the structure of bacterial community. In sequencing analysis to *Bacteria* domain, although the low quality of the sequence of the cut bands, it was possible to make a comparison between BLAST and the base of sequence of the NCBI. One of the bands presented a similarity of 88% and 87 with uncultivated clones of *Clostridium* and *Geobacter*, respectively. These microorganisms are reported to be sulphate reducers. Two other bands presented 91% similarity with the uncultivated clone of bacteria. For the *Archaea* domain the comparative analysis indicated similarity of three of the five bands with the uncultivated clones of archaeon *Methanomicrobiales* F5OHPNU07IK8FO and two of the bands with the genus *Methanosaeta* sp. clone DI CO3, both of then reported as present in granular sludge of several anaerobic treatments. It is concluded that the estimate of diversity allowed inferring that the alterations in the composition of microbial communities occurred due the imposed operations conditions.

Keywords: AMD. ASBR. Molecular Biology. Microbial Diversity. PCR-DGGE

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema ilustrativo do processo de desnaturação das sequências de DNA no DGGE	27
Figura 2 – Fluxograma experimental representativo das etapas do trabalho	29
Figura 3 – ASBR tratando DAM sintética.	30
Figura 4 – <i>Primers</i> e programas utilizados na amplificação. (a) Domínio <i>Bactéria</i> (b) Domínio <i>Archaea</i>	35
Figura 5 – Eletroforese dos produtos da extração de DNA em gel agarose 1,5%. Corados com brometo de etídio (150µg/200mL).	39
Figura 6 – Imagem negativa do gel agarose 1% contendo os fragmentos de DNA Ribossomal 16S amplificados de 433 pb com <i>primers</i> 968F-GC e 1401R de <i>Bactéria</i> a partir das amostras extraídas. Gel corado com 0,02 µL/mL SYBR Safe 10.000X em DMSO (Invitrogen). PCR realizado em triplicada para cada amostra (Amostra 0 = lodo Dakar; Amostra 1 = pH 5,0; Amostra 2 = pH 4,0; Amostra 3 pH 4,0+Fe; Amostra 4 = pH 4,0 + Fe e Zn; Amostra 5 = pH 4,0 + Fe, Zn e Cu). À esquerda, o padrão 1kb utilizado.	41
Figura 7 – Recorte da imagem negativa de gel de DGGE com gradiente desnaturante de 40-70%, corado com SybrGold contendo fragmentos de DNA ribossomal 16S amplificados com iniciadores 968F-GC e 1401R de bandas de <i>Bacteria</i> . Amostras em triplicata.	42
Figura 8 – Quadro apresentando a matriz de presença e ausência de bandas, obtidos a partir do gel de DGGE para o Domínio <i>Bacteria</i>	42
Figura 9 – Gráfico representativo do número de bandas observadas em cada tratamento do ASBR observadas a partir do DGGE para o domínio <i>Bacteria</i>	43
Figura 10 - Dendograma de similaridade gerado pelo programa Bionumerics para o gel de DGGE do Domínio <i>Bacteria</i> (Versão 7.1; Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Os perfis de bandas foram combinados e analisados em conjunto pelo coeficiente de DICE usando o algoritmo UPGMA.....	45
Figura 11 – Imagem negativa do gel agarose 1% contendo os fragmentos de DNA Ribossomal 16S amplificados de 300 pb com <i>primers</i> 1100F-GC e 1400R de <i>Archaea</i> a partir das amostras extraídas. Gel corado com 0,02 µL/mL SYBR Safe 10.000X em DMSO (Invitrogen). PCR realizado em duplicata para cada amostra (Amostra 0 = lodo Dakar; Amostra 1 = pH 5,0; Amostra 2 = pH 4,0; Amostra 3 pH 4,0+Fe; Amostra 4 = pH 4,0 + Fe e Zn; Amostra 5 = pH 4,0 + Fe, Zn e Cu). À esquerda, o padrão 1kb utilizado.	48
Figura 12 – Recorte da imagem negativa de gel de DGGE com gradiente desnaturante de 50-65%, corado com Sybrgold contendo fragmentos de DNA ribossomal 16S amplificados com iniciadores 1100F-GC e 1400R de bandas de <i>Archaea</i> . Amostras em duplicata.	48

Figura 13 – Quadro apresentando a matriz das bandas presentes nas amostras do gel de DGGE para o domínio <i>Archaea</i>	49
Figura 14 – Dendograma de similaridade gerado pelo programa Bionumerics 7.1 do perfil de PCR-DGGE do DNAr16S das <i>Archaeas</i> obtido a partir das amostras de lodo do ASBR. Método UPGMA, coeficiente de Dice.....	50
Figura 15 - (A) Recorte da imagem negativa de gel de DGGE com gradiente desnaturante de 40-70%, corado com SybrGold contendo fragmentos de DNA ribossomal 16S amplificados com iniciadores 968F+GC e 1401R de bandas de <i>Bacteria</i> . (B) Amostra 5 em evidência. Amostras em duplicata. Retângulos pontilhados vermelhos indicam bandas recortadas para sequenciamento (BAC1 a BAC11).....	51
Figura 16 - (A) Produtos de PCR das bandas recortadas amplificados com par de <i>primers</i> 968F+GC/1401R. (B) Comparação do perfil de bandas de DGGE com gradiente desnaturante de 40-70%, corado com SybrGold contendo fragmentos de DNA ribossomal 16S amplificados com iniciadores 968F+GC e 1401R das bandas recortadas.	52
Figura 17: Quantificação do produtos de PCR com primer 68F/1401R para sequenciamento Domínio <i>Bacteria</i>	53
Figura 18 - (A) Produtos de PCR das bandas recortadas amplificados com par de <i>primers</i> 1100F+GC/1400R corados com brometo de etídio. (B) Comparação do perfil de bandas de DGGE com gradiente desnaturante de 50-65%, corado com SybrGold contendo fragmentos de DNA ribossomal 16S amplificados com iniciadores 1100F+CG/1400R das bandas recortadas.....	57
Figura 19 - Quantificação do produtos de PCR com primer 1100F/1400R para sequenciamento Domínio <i>Archaea</i>	58
Figura 20 – Árvore filogenética contendo sequências do gene DNAr 16S (~ 300pb) construída pelo método <i>Neighbor-Joining</i> e o modelo <i>Maximum Composite Likelihood</i> no programa Mega 6.1.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fases de operação do ASBR e a composição da drenagem ácida sintética.....	31
Tabela 2 – Condições operacionais das amostragens	32
Tabela 3 – Concentração final dos reagentes para execução da PCR para Domínio <i>Bacteria</i>	34
Tabela 4 – Concentração final dos reagentes para execução da PCR para Domínio <i>Archaea</i>	34
Tabela 5 – Concentração final dos reagentes para a preparação das soluções estoque desnaturante 0% e 80%.	36
Tabela 6 – Volumes das soluções desnaturantes (0% e 80%) necessários para a confeção dos gradientes de desnaturação nos géis de DGGE.27	
Tabela 7 – Matriz de distância. Coeficientes de similaridade de Dice, para o Domínio <i>Bacteria</i>	45
Tabela 8 – Matriz de distância. Coeficiente de similaridade de Dice, para o Domínio <i>Archaea</i>	50
Tabela 9 – Classificação das bandas sequenciadas do DGGE para o Domínio <i>Bacteria</i> , mediante análise comparativa entre o BLAST e a base de sequencias do NCBI	55
Tabela 10 – Classificação das bandas sequenciadas do DGGE para o Domínio <i>Archaea</i> , mediante análise comparativa entre o BLAST e a base de sequencias do NCBI	58

LISTA DE ABREVIATURAS

ASBR	Reator Anaeróbio de Batelada Sequencial
BRS	Bacteria Redutora de Sulfato
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e agrícolas
DAM	Drenagem Ácida de Mina
DGGE	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAr 16S	Ácido Desoxirribonucleico da porção 16S ribossomal
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
DRM	Departamento de Recursos Microbianos
g	grama, gramas
mg.L ⁻¹	miligrama por litro
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mM	milimolar
m/v	massa por volume
ng	nanograma, nanogramas
°C	Graus Celsius
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PCR-DGGE	Reação em Cadeia de Polimerase – Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
pH	Potencial hidrogeniônico
qsp	Quantidade suficiente para
RAHFL	Reator anaeróbio de manta de lodo
RNAr16S	Ácido Ribonucleico da porção 16S ribossomal
SO₄²⁻	Sulfato
Taq	<i>Termophilus aquaticus</i> (Taq DNA Polimerase)
TAE	(Tris/Acetate/EDTA) - Tampão de Eletroforese
TEB	(Tris/Borate/EDTA) - Tampão de Eletroforese
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGGE	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante por temperatura

UASB	Reator Anaeróbio de Manta de Lodo
U	Unidades
μL	Microlitro
μM	Micromolar
Unicamp	Universidade de Campinas
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas – Minas Gerais
UPGMA	Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages – Média aritmética não ponderada entre os pares de grupos
UV	Ultravioleta
V	Volts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 Drenagem ácida de minas e a sua microbiologia.....	18
3.2 Tratamento biológico da DAM e sua microbiologia.....	20
3.3 Estudos de Ecologia Microbiana.....	22
3.3.1 A reação em cadeia de polimerase – PCR.....	24
3.3.2 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Delineamento experimental.....	29
4.2 Características do Reator ASBR.....	30
4.3 Coletas e preparo das amostras.....	31
4.4 Extração e purificação de DNA.....	32
4.5 Amplificação do rDNA 16S pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase.....	33
4.6 Estudo da comunidade microbiana obtidos pela técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE.....	35
4.7 Análise dos géis de DGGE – Análises de agrupamento.....	37
4.8 Preparo das amostras para sequenciamento.....	37
4.8.1 Sequenciamento das bandas excisadas.....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 Determinação da diversidade microbiana no ASBR por meio da técnica PCR- DGGE.....	39
5.1.1 Extração e purificação de DNA.....	39
5.2 Análise da diversidade microbiana predominante no reator UASB pela técnica PCR-DGGE.....	40
5.2.1 Caracterização das comunidades do Domínio <i>Bacteria</i>	40
5.2.1.1 Estudo de agrupamentos e similaridade para o Domínio <i>Bacteria</i>	44
5.2.2 Caracterização das comunidades do Domínio <i>Archaea</i>	47
5.2.2.1 Estudo de agrupamento e similaridade para o Domínio <i>Archaea</i>	49
5.3 Sequenciamento e identificação.....	51
5.3.1 Sequenciamento e identificação para o Domínio <i>Bacteria</i>	51
5.3.2 Sequenciamento e identificação para o Domínio <i>Archaea</i>	57
6. CONCLUSÕES.....	61
7. RECOMENDAÇÕES.....	62
8. REFERENCIAS.....	63
ANEXOS.....	70

1 INTRODUÇÃO

Os bens minerais apresentam uma importância significativa para a sociedade, a tal ponto que algumas das fases de evolução da humanidade foram divididas em função dos tipos de minerais utilizados, como a idades da pedra, do bronze, do ferro, entre outras.

Hoje em dia, o uso dos minerais está diretamente relacionado à qualidade de vida de uma população, uma vez que as necessidades básicas do ser humano como moradia, alimentação, saúde, vestuário e uso de tecnologias são atendidas essencialmente por estes recursos.

A atividade mineral, reconhecida internacionalmente como atividade alavancadora do desenvolvimento, disponibiliza para a sociedade recursos minerais essenciais ao seu desenvolvimento e toda gama de elementos intrínsecos ao desenvolvimento econômico e social de um povo. Segundo o Ministério das Minas e Energia, o PIB do setor mineral atingiu o valor de US\$ 69 bilhões, com participação de 4,2% no PIB nacional (MME, 2011).

Impulsionada pelo aumento no consumo, a indústria mineradora movimenta maiores volumes de minerais, facilitado pela automação dos processos e as novas técnicas capazes de obter maior eficiência na lavra e no processamento, assim, incrementando também a geração de materiais indesejáveis (estéreis e rejeitos) ricos em sulfetos.

Esta geração afeta distintos setores da indústria mineral, incluindo as minerações carboníferas, as minerações de metais sulfetados e minerações de urânio. Por este fato, as práticas mineradoras são também conhecidas por gerarem grandes impactos ambientais, dentre eles a Drenagem Ácida de Mina (DAM) que pode ser uma forma aguda e até mesmo persistente de poluição, inclusive aquática, que leva à liberação de contaminantes potencialmente ecotóxicos em águas superficiais e subterrâneas.

Os contaminantes comuns a DAM incluem metais e metalóides como arsênio (As), cádmio (Cd), cobre (Cu), ferro (Fe), níquel (Ni), manganês (Mn), o chumbo (Pb) e zinco (Zn) que podem ocasionar problemas associados com concentrações elevadas de sulfato e concentração de metais, além da acidificação dos cursos de água superficiais que podem causar redução da produtividade biológica nestes ambientes e ainda em última instância atingir mananciais de abastecimento de água de uma população, podendo ocasionar, em casos extremos, problemas de saúde pública, devido à exposição das populações locais aos metais contaminantes.

Dentre os tratamentos disponíveis para a DAM tem se estudado o tratamento biológico através de biorreatores anaeróbios. Sendo um processo biológico, geralmente, a diversidade microbiana é influenciada pelas condições operacionais usadas, como a natureza do substrato, a relação DQO/SO_4^{2-} , a taxa de carregamento do substrato, tempo de detenção hidráulica (TDH), o pH operacional, temperatura, etc.

A correlação dos dados de operação de um reator biológico com o perfil da comunidade microbiana poderá ajudar a melhor entender o processo que está ocorrendo no reator e a aperfeiçoar as condições do sistema em prol de uma melhor eficiência.

Durante muitos anos, o conhecimento da microbiologia de processos biológicos ambientais e mesmo da digestão anaeróbia, foi e ainda é, considerado como uma “caixa-preta”, principalmente devido às limitações de isolamento e cultivo de microrganismos, que são fastidiosas ou extremamente seletivas, subestimando a diversidade e dificultando a compreensão de processos metabólicos envolvidos no processo.

Atualmente, este problema tem sido grandemente diminuído e o conhecimento da microbiologia ambiental tem se alargado muito com o uso e avanço das técnicas de biologia molecular, que são independentes do isolamento e cultivo de microrganismos e, muitas vezes, permitem o estudo dos mesmos no próprio ambiente.

Alinhando-se conhecimentos sobre o processo de digestão anaeróbia em sistemas de tratamento e o conhecimento das principais técnicas de biologia molecular envolvidas em estudos de ecologia microbiana, este trabalho buscou avaliar a diversidade microbiana presente nas diferentes fases operacionais de um reator anaeróbio de batelada sequencial – ASBR utilizado para tratar drenagem ácida sintética através precipitação de metais pelo sulfeto gerado por via biológica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi de estudar a dinâmica dos microrganismos envolvidos na redução $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ e na precipitação de metais em reator anaeróbio de batelada sequencial (ASBR) de bancada, durante a variação de parâmetros operacionais no tratamento de drenagem ácida de minas sintética.

2.2 Objetivos específicos

Foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- investigar a distribuição dos microrganismos dos domínios *Bacteria* e *Archaea* predominantes no reator pela aplicação da técnica de biologia molecular PCR-DGGE;
- comparar os resultados do PCR-DGGE entre as diferentes fases operacionais e correlacionar a população microbiana entre essas fases; e
- identificar os microrganismos detectados pela técnica PCR-DGGE por meio do sequenciamento de bandas excisadas do DGGE com *amplicons* do gene RNA ribossomal 16S para os Domínios *Bacteria* e *Archaea*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Drenagem ácida de minas e a sua microbiologia

A poluição hídrica causada pelas drenagens ácidas é provavelmente o impacto ambiental negativo mais significativo das operações da mineração, beneficiamento e rebeneficiamento. Além da formação de DAM na cava da mina, a percolação da água da chuva através dos rejeitos gerados nas atividades de lavra podem alcançar os corpos hídricos superficiais e subterrâneos causando constantes desequilíbrios no ecossistema (FARFÁN *et al.*, 2004).

Ainda segundo Farfán *et al.* (2004), os efeitos deletérios dessas drenagens, percebidos pela mortandade de peixes e da vegetação dessas áreas, são consequências da solubilização de metais tais como cobre, zinco, níquel, manganês e alumínio que são tóxicos à biota. Além disso, grandes quantidades de sulfatos de cálcio, magnésio, sódio e ferro (ferroso e férrico) são lançados nos corpos receptores. Os íons férricos formam hidróxidos que reagem com cátions (potássio, prata, sódio ou amônio) formando precipitados de coloração que vão do amarelo ao vermelho tijolo, característicos das DAMs.

O mais importante é que a geração da DAM pode durar milhares de anos, assim, a acidez, a salinidade, a geração de sedimentos, o elevado teor de metais dissolvidos e a toxicidade desses metais justificam a importância ambiental e os custos para a sociedade.

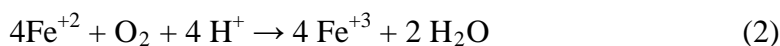
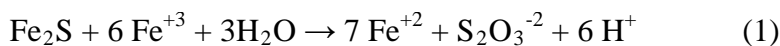
Efluentes que contêm elevadas concentrações de sulfato são produzidos por um grande número de processos industriais, tais como processos de galvanoplastia, lavador de gases industriais, desintoxicação de solos contaminados com metais, etc.. Em termos de volume de efluente, a fonte mais significativa de poluição com águas ricas em sulfato é notadamente das indústrias mineradoras, principalmente as de carvão, urânio e metais pesados. Essas águas são ricas em sulfato, ferro dissolvido e podem ser muito ácidas ($\text{pH} < 4$), sendo frequentemente referidas como Drenagem Ácida de Mina (DAM) (KOLMERT; JOHNSON, 2001).

A DAM pode ter sua formação no interior da cava da mina ou em sistemas de deposição de estéril ou rejeito. Como resultado da própria atividade de mineração, há exposição da pirita (FeS_2) e outros sulfetos à água e à atmosfera, resultando na sua oxidação. Esse processo ocorre espontaneamente, produzindo ácido sulfúrico que aumenta a solubilidade de metais presentes no solo e rochas (NORDWICK *et al.*, 2003).

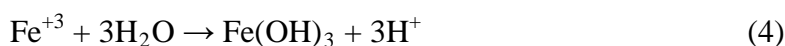
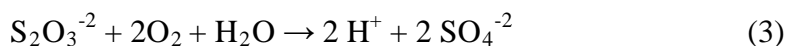
Segundo Amaral-Zettler (2002), os ambientes ácidos podem ocorrer naturalmente em áreas contendo sulfetos, como é o exemplo do Rio Tinto na Espanha, o “Rio de Fogo”. O Rio Tinto com mais de 100 km de extensão é considerado um ecossistema incomum devido a acidez de suas águas (valor de pH entre 1,5 e 3,0), a sua alta concentração de metais em solução (Fe, As, Cu, Zn, Cr e outros) e, ainda ao inesperado nível de diversidade microbiana.

Fernandéz-Remolar *et al.* (2005), observaram pelos registros geológicos conduzidos em seus experimentos que as condições extremas ácidas do Rio Tinto são mais antigas do que as atividades de mineração da área, sugerindo assim, que elas são naturais e não consequências de contaminação industrial. Devido à extensão e facilidade de acesso, o Rio Tinto tem sido considerado um modelo de sistema interessante para o estudo de ambientes ácidos.

Por outro lado, em ambientes antropizados em decorrência da mineração, os fatores que determinam a velocidade de geração de DAM, segundo Akcil e Koldas (2006), são notadamente, o pH, temperatura, exposição ao oxigênio, água, atividade química do Fe^{3+} , área superficial de sulfetos metálicos e atividade microbiana. Na primeira etapa do processo há a oxidação do sulfeto metálico, que pode ocorrer de forma abiótica (Equação 1). Entretanto, na presença de procariotos litotróficos, há o aumento da velocidade de oxidação do mineral por meio da produção de íon férrico (Equação 2).



Ainda segundo Akcil e Koldas (2006), o tiosulfato resultante da oxidação da pirita, bem como outros compostos inorgânicos de enxofre e enxofre elementar podem sofrer oxidação até sulfato por espécies dos grupos *Bactéria* e *Archaea* (Equação 3), disponibilizando íons H^+ em solução. Além disso, em pH entre 2,3 e 3,5, ocorre liberação de íons H^+ resultantes de uma precipitação do íon férrico como $\text{Fe}(\text{OH})_3$ e jarosita, contribuindo para a redução do pH da solução (Equação 4).



A dissolução de sulfetos metálicos por microrganismos ocorre principalmente devido às bactérias acidofílicas extremas (pH ótimo abaixo de 3) que oxidam tanto os compostos inorgânicos de enxofre quanto o íon ferroso (AKCIL e KOLDAS, 2006).

Em função da limitada disponibilidade de substratos nos ambientes de mineração, o meio seria típico para ocorrência de baixa diversidade microbiana. Entretanto, Xie *et al.* (2011) encontraram uma grande variedade de microrganismos procariotos incluindo litoautotróficos, organoheterotróficos, litheterotróficos e os anaeróbios e ainda um subconjunto desses microrganismos que são capazes de fixar carbono e nitrogênio. Estes autores encontraram como o mais clássico representante dessa biota o grupo pertencente ao gênero *Acidithiobacillus*, incluindo *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Também determinaram como presentes em DAM *Leptospirillum* spp., *Ferroplasma* spp., *Sulfobacillus* spp., *Ferromicrobium* spp. e *Acidimicrobium* spp.

González-Toril *et al.* (2003), estudando a microbiota do Rio Tinto, na Espanha, identificaram várias espécies de microrganismos acidófilos, como *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, *L. ferrooxidans*, *Thermoplasma acidophilum*, *Ferroplasma acidiphilum*, *Ferroplasma* spp, dentre outros.

Enquanto há relativamente grande informação sobre *Bacterias*, pouco ainda é conhecido sobre as *Archaeas* em ambientes contendo DAM. As *Archaeas* mais conhecidas são as acidofílicas termófilas (HALBERG, 2010).

3.2 Tratamento biológico da DAM e sua microbiologia

O emprego de processos biológicos de tratamento de águas de mineração por meio da redução de sulfato tem sido estudados, com diversos tipos de tratamento já propostos. Essencialmente são divididos em tratamentos passivos e ativos (KAKSONEN e PUHAKKA, 2007).

Dentre os processos passivos, incluem-se a bioestimulação do meio pela adição de fonte externa de carbono e a inserção de barreiras reativas permeáveis, para aquíferos subterrâneos, e infiltração, lagoas anóxicas e alagados construídos, para drenagens de ocorrência superficial (KAKSONEN e PUHAKKA, 2007). Ainda segundo estes autores, embora sejam de baixo custo e fácil manutenção, há grande requisito de área, além da dificuldade de recuperação de metais e variações sazonais. Entre os tratamentos ativos

usualmente empregados, encontram-se os métodos químicos de neutralização por aditivos químicos (cal), seguidos da incorporação de oxigênio (por meio de aeração), clarificadores e barragens de decantação. Nestes métodos, a elevação do pH causa a hidrólise e precipitação de metais dissolvidos que podem ser posteriormente recuperados.

Uma das alternativas ao tratamento ativo e mais promissora é o emprego de métodos biológicos por meio de biorreatores. Esses sistemas são projetados para permitir a existência de biomassa em elevada concentração e elevada atividade, reduzindo os requisitos de área. Logo, o maior controle do processo permite que as desvantagens dos tratamentos passivos sejam contornadas. A redução biológica de sulfato no tratamento de DAM tem sido estudada em diferentes configurações de reatores, a saber: batelada (NECULITA e ZAGURY, 2008), reatores de mistura com agitação contínua e filtros anaeróbios (MAREE e STRYDOM, 1985), reatores de leito fluidizado (SOMLEV; BANOV, 1998) e reator UASB (RODRIGUEZ *et al.*, 2012) além de outros.

Segundo Sanches-Andrea *et al.* (2014), embora vários fatores devam ser levados em consideração para um desempenho ideal de um biorreator, o processo é dirigido essencialmente por microrganismos, por isso, a sobrevivência das comunidades microbianas, a sua atividade e o seu crescimento são cruciais.

Ainda, segundo os mesmos autores, o pH, o tipo de inóculo e o substrato têm o maior efeito sobre a composição microbiana no tratamento da DAM em reatores. O pH afeta diretamente a atividade de diferentes microrganismos, dependendo do tipo de inóculo, pode predominar certas comunidades acidotolerantes ou acidofílicas. Já o tipo de substrato pode influenciar a complexidade das comunidades. Alguns pesquisadores compararam a influência de diferentes aspectos sobre o tratamento biológico da DAM em biorreatores, como diferentes inóculos (PRUDEN *et al.*, 2007), o tipo de substratos orgânicos utilizados e também as características da DAM afluente (HIIBEL *et al.*, 2011; LINDSAY *et al.*, 2011).

A combinação de técnicas baseadas em cultura e abordagens moleculares biológicas independentes de cultivo nas últimas décadas tem aumentado muito a compreensão do funcionamento de comunidades microbianas em geral e dos processos de biorremediação em particular. Apesar disso, as comunidades microbianas utilizadas para o tratamento da DAM não tem sido extensivamente analisadas como em outros ambientes (SANCHEZ-ANDREA *et al.*, 2014).

Os mesmos autores, pesquisando a filogenia de microrganismos detectados em diferentes processos de tratamento da DAM através de genes do RNA 16S sequenciados,

tanto em dados presentes em banco de dados (NCBI ou EMBL) como em publicações de trabalhos científicos de outros autores, encontraram sequências pertencentes aos Domínios *Bacteria* e *Archaea* em diferentes tratamentos da DAM em biorreatores. Quando o metano estava presente durante a operação do reator o Domínio *Archaea* analisado resultou na detecção de metanogênicos pertencentes ao filo Euryarchaeota. Para o Domínio *Bacteria*, treze diferentes filos foram identificados incluindo *Chloroflexi*, *Chlorobi*, *Proteobacteria* (classes Alpha-, Beta-, Gamma- Delta- e Epsilon-*Proteobacteria*), *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Spirochaetes*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Gemmatimonadetes*, *Synergistetes* e *Caldiserica*.

De maneira geral, é assumido que em ambientes ácidos há baixa biodiversidade de bactérias, arqueias, vírus e eucariotos. Contudo, uma alta diversidade tem sido observada em biorreatores tratando DAM, onde dependendo do substrato adicionado, a comunidade microbiana pode ser muito diversa com microrganismos variando de fermentadores celulolíticos, bactéria redutora de sulfato - BRS, acetogênicos e metanogênicos (HIIBEL *et al.*, 2011; PEREYRA *et al.*, 2012).

Em seus estudos de desempenho de reatores sulfetogênicos, Hiibel *et al.* (2011) encontraram que a diversidade microbiana em biorreatores tratando DAM com substrato ligno-celulósico foi maior do que aquele utilizando como substrato o etanol. O sequenciamento do gene RNAr 16S dos clones revelaram que a proporção de bactérias redutoras de sulfato no reator operado com substrato sendo o etanol foi de quase 70%, enquanto que para o ligno-celulósico foi de apenas 3% da população sequenciada.

3.3. Estudos de Ecologia Microbiana

O principal objetivo do diagnóstico microbiológico é uma rápida identificação de microrganismos em ambientes naturais ou como patógenos do homem, dos animais e das plantas. Por vários anos, investigações e estudos microbiológicos em diversos ambientes, inclusive para a DAM (HAM; KIN 2009), eram realizados unicamente por microscopia e técnicas de cultivo em meios de cultura enriquecidos com substratos de interesse a fim de se selecionar espécies específicas, desta forma contribuindo para o entendimento do metabolismo microbiano nas condições impostas (BATISTA, 2008).

Contudo, essas técnicas convencionais oferecem limitações em relação à análise da diversidade microbiana de um ecossistema, porque não são capazes de simular as condições

ambientais que os microrganismos exigem para proliferação. Além disso, muitos microrganismos não são detectáveis por microscopia convencional por permanecerem ligados às partículas de sedimentos e muitos não são cultiváveis por exigirem condições ambientais difíceis de serem mantidas em laboratórios (MUYZER *et al.*, 1996).

Amann *et al.* (1995) estimaram que aproximadamente de 90 a 99% dos microrganismos não podem ser isolados de seus habitat naturais em culturas puras. Corroborando com este fato, microrganismos presentes em ambientes extremos como os acidófilos quimiolitotróficos estritos, em geral, não crescem facilmente, especialmente em meios sólidos (JOHNSON, 1995).

Nas últimas décadas a biotecnologia tem se desenvolvido muito. Um marco relevante nesse desenvolvimento foi a descoberta, em 1953, da estrutura e das propriedades do DNA por Watson e Crick. A partir de então, a Genética e a Biologia Molecular passaram a se desenvolver em ritmo acelerado, contribuindo para a incorporação de técnicas de manipulação do DNA *in vivo* à biotecnologia (MADIGAN, 2004).

Desde meados de 1980, tem sido possível o estudo da diversidade e ecologia microbiana em ambientes naturais por meio de técnicas de biologia molecular, (MUYZER *et al.*, 1993), alcançando-se, assim, novas oportunidades para a análise da estrutura e da composição de espécies de comunidades microbianas nos mais diversos ambientes (HEAD *et al.*, 1998). Essas técnicas, mais rápidas e que muitas vezes permitem identificação mais precisa que os métodos de cultivo, buscam analisar a estrutura da comunidade microbiana ou a detecção de organismos específicos em amostras mais complexas (AMANN *et al.*, 2001), como a dos biorreatores.

Um divisor de águas para a evolução dos métodos de análise das comunidades microbianas foi a descoberta de uma subunidade do RNA ribossomal, o RNAr 16S, que contém regiões de sequências de bases de nucleotídeos, que se mostram altamente conservadas dentro do domínio bacteriano, e que são intercaladas por regiões altamente variáveis. A partir deste conhecimento foram desenvolvidos métodos moleculares para estudo da microbiota, nos quais os microrganismos constituintes de dada amostra são identificados a partir de seu material genético independente de serem ou não cultiváveis (PACE *et al.*, 1986).

A variação genética do RNAr 16S tem sido bem explorada para inferir relações filogenéticas entre os microrganismos e para “desenhar” sondas nucleotídicas específicas para a detecção de grupos microbianos individuais em habitats naturais. Estas técnicas são

aplicáveis também para se determinar a diversidade genética de comunidades microbianas e identificar mesmo os microrganismos não-cultiváveis (MUYZER *et al.*, 1993).

Por questões de manipulação laboratorial, trabalha-se mais frequentemente com a sequência do DNA que codifica a região 16S do RNAr (DNAr 16S). Isto porque o DNA é uma molécula mais estável e mais fácil de manipulação do que o RNA. A amplificação e análise do gene DNAr, portanto, têm sido utilizadas comumente para investigar a biodiversidade e a estrutura da comunidade microbiana de diversos ambientes, inclusive de reatores anaeróbios tratando os mais variados tipos de efluentes como a DAM (BATISTA, 2008).

Dentre as várias técnicas utilizadas nos estudos de ecologia microbiana, destacam-se a técnica de PCR-DGGE -sequenciamento, descrita em detalhes à frente. O uso combinado das técnicas de biologia molecular PCR-DGGE tem sido bastante aplicado para avaliar a diversidade microbiana em vários ambientes (MUYZER, 1999). Estas técnicas oferecem um caminho rápido, pois independe do cultivo dos microrganismos e possibilitam a avaliação da diversidade relativa da microbiota e a identificação de populações predominantes no ambiente (CASAMAYOR *et al.*, 2000; DEMERGASSO *et al.*, 2005), inclusive na análise de microrganismos presentes na DAM (BATISTA, 2008; MOHAPATRA *et al.*, 2011). Sua aplicação aliada a outros métodos moleculares, revolucionaram todos os campos da microbiologia, possibilitando a caracterização cada vez melhor da diversidade de ecossistemas complexos (HAN e KIM, 2009).

3.3.1 A reação em cadeia de polimerase – PCR

Os métodos moleculares receberam grande impulso com o desenvolvimento da técnica conhecida como PCR. Essa técnica foi desenvolvida por Saiki e colaboradores em 1985. É um método de análise que tem como base a amplificação exponencial seletiva de uma quantidade reduzida de DNA de uma única célula. Esta metodologia tem como finalidade produzir uma quantidade apreciável de um segmento específico de DNA, a partir de uma quantidade mínima. O DNA molde sofre uma amplificação controlada por enzimas (polimerases), obtendo-se milhões de cópias do fragmento de DNA de interesse. Como a reação de PCR é específica, pode-se obter a amplificação de sequências-alvo mesmo em uma amostra com grande diversidade de sequências, permitindo a detecção de organismos específicos em misturas heterogêneas.

Cada ciclo de PCR consiste em três fases: desnaturação do DNA molde, à 94-96°C; ligação dos *primers* (anelamento), a 50-65° C; e a polimerização do DNA, à 72° C. A primeira fase faz a separação das cadeias de dupla hélice de DNA, através do calor. Esta é relevante para a segunda fase, na qual dois *primers* de oligonucleotídeos (sequências iniciadoras complementares à de interesse - *forward* e *reverse* com as sequências complementares ao fragmento alvo se ligam às sequências dos pares de bases complementares da cadeia molde).

Estes *primers* são desenhados e sintetizados de modo a ligarem-se às extremidades opostas de cada uma das cadeias de DNA molde que se objetiva amplificar. Assim sendo, os *primers* possuem a função de ponto de partida para a replicação de DNA. Na terceira e última fase, denominada de polimerização, ocorre a sua extensão. A enzima responsável por esta polimerização é a DNA polimerase. Para execução de um ciclo, utiliza-se um Termociclador, equipamento que faz variar de forma vigorosa o tempo e a temperatura ao longo do ciclo. Ao final de cada ciclo completo de PCR, duas novas cadeias são sintetizadas, a partir da cadeia molde. Assim, ocorre um crescimento exponencial de cópias de DNA, havendo 2ⁿ cópias, ao final de n ciclos. São necessários, de um modo geral, 30 ciclos, realizados em apenas algumas horas (MADIGAN, 2004; BLOOM, 2014).

Ainda, segundo Bloom (2014), o sucesso da PCR reside na capacidade que a reação tem de amplificar uma sequência precisa de DNA aliada à sua simplicidade, seu rigor, elevada sensibilidade e especificidade. Mesmo que se encontre misturado com DNA de outras espécies, não é necessário isolar o DNA que se pretende amplificar, uma vez que a especificidade da PCR é dada pelos *primers*. É uma técnica rápida, barata e segura.

No entanto, segundo apresentam Carrapa *et al.* (2005), a PCR também tem limitações, como a:

- necessidade de conhecer a sequência de DNA a amplificar, para que possam ser sintetizados *primers* específicos;
- relativa facilidade de ocorrer contaminação da amostra por DNA estranho (uma vez que se trata de uma técnica muito sensível);
- limitada extensão da sequência que é possível amplificar; e
- a possibilidade de incorporação errônea de bases durante a replicação.

3.3.2 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

DGGE é um método de impressão digital molecular (*fingerprint*) que separa os produtos de DNA gerados da PCR, uma vez que a PCR pode gerar modelos de mesmo tamanho, mas diferentes sequências de DNA, que representam muitos dos organismos dominantes da comunidade microbiana (RONDON *et al.*, 2000).

O método foi desenvolvido por Fischer e Lerman (1983) e a partir de então sofreu muitas mudanças no sentido de melhorias e adaptações para seu uso em diferentes campos de pesquisa. Para o estudo de ecologia microbiana, a DGGE oferece um caminho rápido, pois independe do cultivo dos microrganismos e possibilita a identificação de populações predominantes no ambiente (DEMERGASSO *et al.*, 2005).

A técnica do DGGE consiste na realização de uma eletroforese em gel de gradiente desnaturante, que permite a separação de moléculas de DNA de mesmo tamanho, mas de distinta sequência de nucleotídeos ao longo de um gradiente de desnaturação química. A separação está baseada na decrescente mobilidade eletroforética de moléculas de DNA fita dupla, parcialmente desnaturadas em géis de poliacrilamida, contendo um gradiente linear de agentes desnaturantes (solução de ureia e formamida) de DNA. O nível em que ocorre a desnaturação nesse gradiente depende principalmente do conteúdo das bases nitrogenadas guanina (G) e citosina (C) de cada sequência do DNA (MUYZER *et al.*, 1993).

Esses agentes desnaturantes favorecem o rompimento das ligações (pontes de hidrogênio) entre os nucleotídeos, provocando a abertura das fitas. Variações nas sequências nucleotídicas levam a uma diferença nas condições de desnaturação e as moléculas com diferentes sequências vão cessar sua migração em posições diferenciadas no gel (TAKETANI, 2010). À medida que as fitas de DNA vão se abrindo, sua mobilidade no gel vai diminuindo até o momento em que esta cessa. Regiões com maiores concentrações de timina (T) e adenina (A) possuem ligações mais fracas (duas pontes de hidrogênio) em contraste com ligações entre citosina (C) e guanina (G) (três pontes de hidrogênio). Portanto, pode-se dizer que quanto mais rica em GC for a sequência, mais abaixo em um gel de DGGE esta banda se apresentará. Tais características da técnica de DGGE são apresentadas na Figura 1.

O DGGE, resumidamente, é uma técnica usada para separar fragmentos de DNA de mesmo comprimento, mas de diferentes sequências de pares de bases. Pelos fragmentos de

RNAr 16S amplificados, diferentes perfis de banda podem ser visualizados representando a diversidade filogenética de uma comunidade (TUOVINEN *et al.*, 2006).

Segundo o mesmo autor, a migração diferenciada dos produtos de PCR amplificados gera um perfil de bandas, geralmente cada banda separada pode ser interpretada como sendo de um organismo presente no ambiente estudado. Por ter caráter qualitativo e semiquantitativo, esta técnica é particularmente útil para examinar séries temporais e dinâmicas populacionais, comparando partida e evolução de sistemas de tratamento.

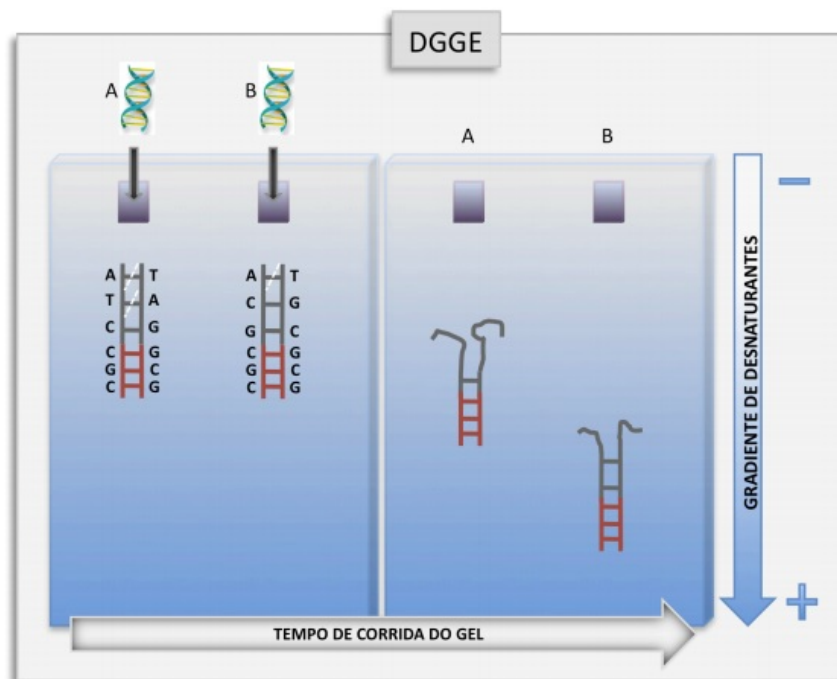


Figura 1 – Esquema ilustrativo do processo de desnaturação das sequências de DNA no DGGE. Esta ocorre em suas regiões ricas em timina e adenina por possuírem ligações mais fracas (apenas duas pontes de hidrogênio), com relação às ligações entre citosina e guanina (que são três). Em vermelho pode-se observar o grampo GC usado para impedir a desnaturação total das fitas.

Fonte: TAKETANI (2010). Modificado.

Segundo Brucha (2007) pode ocorrer mais de uma banda presente no gel sendo relacionada a um mesmo microrganismo, o que pode ocorrer pela coincidência nos domínios de dissociação de fragmentos diferentes de DNA com o mesmo número de nucleotídeos A-T e C-G.

Além disso, a técnica de DGGE possui vantagens e desvantagens (CORTEZ, 2009; BRUCHA, 2007):

- Vantagens:
 - taxa e sensibilidade de detecção elevadas;
 - metodologia simples e uso de método de detecção não radioativo;

- permite estudar de maneira rápida e simples a variabilidade espaço-temporal das populações, pois adota padrões de banda; e
 - os fragmentos de PCR podem ser isolados a partir do gel e empregado em reações de sequenciamento.
- Desvantagens:
 - exige a análise por computador bem como experiências prévias;
 - requer a compra de equipamento específico;
 - os *primers* são caros e *primers* adicionais podem ser úteis na sequenciação; e
 - o método envolve o uso de formamida e acrilamida (produtos químicos tóxicos, pode causar irritação ao trato gastrointestinal, cefaleia, inconsciência, e afetar o sistema nervoso central).

Apesar das desvantagens mencionadas acima, essa técnica de biologia molecular tem sido muito bem aplicada para estudo da diversidade microbiana em amostras naturais e em biorreatores (HAM; KIN, 2009).

Segundo Mohopatra *et al.* (2011), a técnica de DGGE tem sido extensivamente utilizada para o estudo da diversidade genética de procariotos em ambientes impactados pela DAM, através do uso do gene RNAr 16S. Também, Kinnunen e Puhakka (2004) já usaram a técnica de DGGE para caracterizar a população de procariotos dos domínios *Archaea* e *Bacteria* existente no lodo do tratamento de efluente da mina de Pyhasalmi através de reator de leito fluidizado.

Lu *et al.* (2011), utilizaram a técnica de DGGE para análise da comunidade microbiana em tratamento de DAM em reatores sulfetogênicos com pH 3,0 tendo palha de arroz como fonte de carbono. Através de sequenciamento de bandas do gel de DGGE obtiveram dados de microrganismos pertencentes aos gêneros *Eubacterium* e *Pseudobutyrvibrio* e a família *Clostridiaceae*.

PCR - DGGE é uma combinação de técnicas moleculares amplamente utilizadas para a descrição da estrutura e da diversidade em comunidades microbianas baseadas no DNA extraído, como é o caso deste estudo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

O fluxograma abaixo (Figura 2) apresenta uma síntese de todas as etapas da metodologia, as quais serão descritas a seguir.

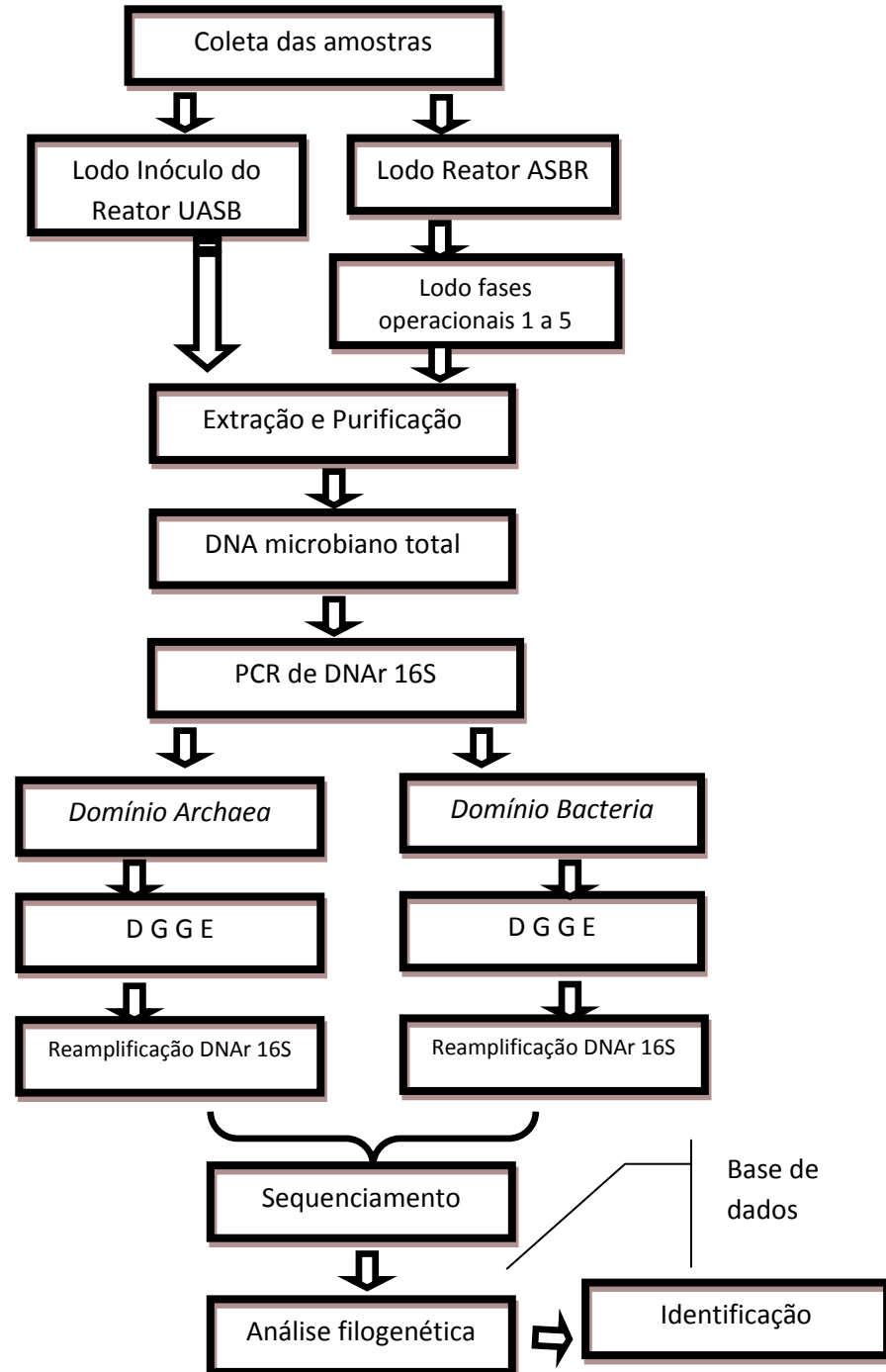


Figura 2 – Fluxograma experimental representativo das etapas do trabalho.
Fonte: Do autor.

4.2 Características do Reator ASBR

As amostras analisadas no presente trabalho foram coletadas de um Reator Anaeróbio de Batelada Sequencial (ASBR), localizado no Laboratório de Biotecnologia Anaeróbia – Biotech, da UNIFAL-MG, campus Poços de Caldas (Figura 3). O ASBR foi operado em escala de bancada por FRANCO (2014) que avaliou a precipitação de metais provenientes de drenagem ácida de minas sintética pelo sulfeto gerado por via biológica, sob diferentes faixas de pH (6,0, 5,0 e 4,0) e pH 4,0 com incremento sequencial dos metais ferro (Fe^{2+}) na forma $\text{FeCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, zinco (Zn^{2+}) na forma ZnCl_2 e cobre (Cu^{2+}) na forma CuCl_2 com relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ igual a 1, conforme apresentado na Tabela 4.1. O doador de elétrons utilizado foi etanol e sulfato de sódio utilizado como receptor de elétrons.

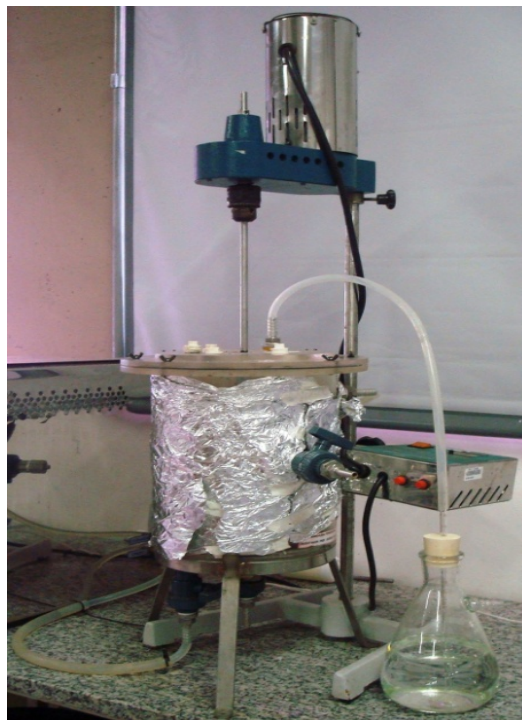


Figura 3 – ASBR tratando DAM sintética.
Fonte: FRANCO (2014).

O reator, com volume útil de 6 litros foi inoculado com lodo biológico (volume de 1L), proveniente de Reator Anaeróbio de Manta de Lodo (UASB) da estação de tratamento de águas residuárias do abatedouro de aves da Avícola Dacar S.A., localizada em Tietê-SP. Este lodo já foi caracterizado por Hirasawa (2007) como sendo de rica diversidade microbiana.

Este lodo foi identificado, neste estudo, como “Amostra zero (0)” e submetido ao mesmo protocolo dos demais para caracterização da diversidade microbiana, servindo como padrão para comparação da diversidade microbiana ao longo das fases operacionais estudadas (Tabela 1).

Tabela 1 – Fases de operação do ASBR e a composição da drenagem ácida sintética.

Fases	Tempo operação (dias)	pH	Composição da DAM sintética (mg.L ⁻¹)						
			Na ₂ SO ₄	MgSO ₄ . 7H ₂ O	NaH ₂ PO ₄	NH ₄ Cl	FeSO ₄ . 7H ₂ O	ZnCl ₂	CuCl ₂
I	78	6,0	590	88	68	115	17	15	-
II	25	5,0	590	88	68	115	17	15	-
III	34	4,0	590	88	68	115	17	15	-
IV	37	4,0	356	110	68	115	450	15	-
V	8	4,0	356	110	68	115	450	46	-
VI	8	4,0	356	110	68	115	450	46	13

Fonte: Do autor.

Durante as três primeiras fases (I, II e III) o reator foi operado apenas contendo biomassa, água ácida sintética, etanol e sulfato. Nas fases IV, V e VI, foram adicionados Fe²⁺ na concentração de 100 mg·L⁻¹, o Zn²⁺ nas fases V e VI na concentração de 20 mg·L⁻¹ e o Cu²⁺ na fase VI na concentração de 5 mg·L⁻¹.

As operações duraram oito meses, durante os quais o tempo de cada fase variou, sendo a primeira fase mais longa, visando à aclimação dos microrganismos e o tempo necessário para o estabelecimento da sulfetogênese (FRANCO, 2014).

4.3 Coleta e preparo das amostras

Ao final das fases operacionais de II a VI, que foi estabelecida quando a redução de sulfato se estabilizasse no reator, duas amostras aproximadas de 2 mL cada de lodo granular foi obtida e congelada a -20°C até o momento da extração do DNA. Dessa forma, criou-se um grupo de seis amostras, conforme Quadro 1.

As amostragens 1 e 2 de lodo ocorreram quando reator foi operado sem adição de metais, apenas contendo água ácida sintética, etanol e sulfato em pH 5,0 e 4,0, respectivamente. Nas fases de IV a VI, o reator foi alimentado com os metais Fe²⁺, Zn²⁺ e Cu²⁺, em pH 4,0, conforme descrito anteriormente, onde ocorreram as amostragens 3, 4 e 5, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 – Condições operacionais das amostragens.

Amostras	Condições operacionais
0	Lodo do inóculo – reator UASB – avícola Dacar
1	Lodo ASBR redução máxima SO_4^{2-} ; pH 5,0
2	Lodo ASBR redução máxima SO_4^{2-} ; pH 4,0
3	Lodo ASBR redução máxima SO_4^{2-} ; pH 4,0 + Fe^{2+}
4	Lodo ASBR redução máxima SO_4^{2-} ; pH 4,0 + Fe^{2+} + Zn^{2+}
5	Lodo ASBR redução máxima SO_4^{2-} ; pH 4,0 + Fe^{2+} + Zn^{2+} + Cu^{2+}

Fonte: Do autor.

4.4 Extração e purificação de DNA

Para cada extração, cerca de 1 mL de lodo granular foi adicionado a um frasco de vidro contendo 0,5 g de pérolas de vidro (*glass beads*) estéreis e agitado manualmente por 20 minutos para obter-se uma massa de lodo homogênea. Em seguida, cada amostra foi submetida à extração e purificação de DNA.

Para a extração e purificação de DNA dos microrganismos que estiveram presentes nas amostras do inóculo e nas amostras das diferentes fases operacionais do ASBR foi utilizado o Kit *Wizard DNA Clean Up* e *Wizard Clean Up System* (Promega®), segundo protocolos do fabricante (Anexo 1 e 2, respectivamente).

Para cada amostra de lodo das amostras 0 a 5, as extrações foram feitas em duplicatas (amostras A e B) a fim de se obter uma quantidade suficiente de DNA que fosse representativa da comunidade microbiana presente na amostra.

A extração e purificação foram confirmadas em corrida eletroforética vertical das amostras em géis de agarose 1,5% preparados com TEB 0,5X em cuba eletroforética DIGEL®, por 60 minutos a 100 V.

Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio 150µg/200mL por 20 minutos, lavados em água destilada (10 minutos) e fotodocumentados através de transiluminador UV e do sistema de fotodocumentação L-Pix STi (Loccus®).

4.5 Amplificação do rDNA 16S pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase

O DNA total proveniente das amostras foi utilizado para a amplificação de uma região variável do gene RNAr 16S através do par de *primers* 968f acoplado a um *GC Clamp* (grupo GC) e 1401r, específico para o domínio *Bacteria* segundo Heuer *et al.* (1997). Para reações de amplificação para o domínio *Archaea* foi utilizado o par de *primers* ARC 1100f-*GC Clamp* e ARC 1400r, segundo Kudo *et al.* (1997) (Quadro 1).

DOMÍNIO	Primer	Sequência 5'→3'
DNAr 16S de <i>Bacteria</i>	968F+GC	GC - AAC GCG AAG AAC CTT AC
	968F	AAC GCG AAG AAC CTT AC
	1401R	CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG
DNAR 16S de <i>Archaea</i>	1100F+GC	GC – AAC CGT CGA CAG TCA GGY AAC GAG CGA G
	1100F	AAC CGT CGA CAG TCA GGY AAC GAG CGA G
	1400R	CGG CGA ATT CGT GCA AGG AGC AGG GAC
Sequência do grupo GC:		CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G

Quadro 1 – Descrição dos *primers* dos domínios *Bacteria* e *Archaea* utilizados nas reações de PCR das amostras deste estudo.

Fonte: Do autor.

A sequência rica em G+C (*GC Clamp*) acoplada a extremidade 5' dos *primers* serve para impedir a completa desnaturação do fragmento de DNA durante a separação em gel de DGGE.

Cada reação de amplificação (domínios *Bacteria* e *Archaea*) continha, na concentração final de 50µL, tampão de PCR 1X (Promega®), 0,8 µM de dNTP Mix (Promega®), 0,2 µM de cada *primer* (Invitrogen®), 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Promega®), e 10 µL da amostra de DNA (~ 50 ng). (Tabelas 3 e 4). Para cada par de *primers* se ajustou a concentração de MgCl₂ (Promega®) bem como as temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão nos programas do termociclador MaxyGene Gradient (Axygen®).

Tabela 3 – Concentração final dos reagentes para execução da PCR para Domínio *Bacteria*.

Reagentes	Estoque	Concentração final na reação	Volume para reação de 50 µL
Solução tampão da Taq	10X	1X	5 µL
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	1,5 µL
Primer 968F	20 µM	0,2 µM	0,5 µL
Primer 1401R	20 µM	0,2 µM	0,5 µL
Taq polimerase	5 U/ µL	0,5 U	0,4 µL
dNTPs	100 mM	0,8 mM	0,4 µL
DNA	--	50-100ng	--
Água destilada	--	--	q.s.p. para 50 µL

Fonte: Do autor.

Tabela 4 – Concentração final dos reagentes para execução da PCR para Domínio *Archaea*.

Reagentes	Estoque	Concentração final na reação	Volume para reação de 50 µL
Solução tampão da Taq	10X	1X	5 µL
MgCl ₂	50 mM	3,5 mM	3,5 µL
Primer 968F	20 µM	0,2 µM	0,5 µL
Primer 1401R	20 µM	0,2 µM	0,5 µL
Taq polimerase	5 U/ µL	0,5 U	0,4 µL
dNTPs	100 mM	0,8 mM	0,4 µL
DNA	--	50-100ng	--
Água destilada	--	--	q.s.p. para 50 µL

Fonte: Do autor.

À mistura de água e tampão foram acrescentados, o MgCl₂, os dNTPs, seguido dos *Primers*, e, por último a Taq-polimerase. Como foram realizadas várias ampliações, preparou-se uma mistura (*mix*) contendo as enzimas, que foi distribuída em alíquotas nos tubos de PCR contendo as amostras de DNA (1µL). Para esta manipulação foi utilizado ponteiros livres de Rnase/Dnase (Axygen®). As preparações foram realizadas em câmara asséptica previamente preparada e mantidas sob refrigeração constante em gelo.

Cada programa consistiu de um passo inicial de desnaturação do DNA a 94°C, seguido de um número de ciclos de amplificação adaptado para cada par de *primers* e extensão final a 72°C. Para o Domínio *Archaea* foi utilizado uma rampa de -0,5°C nos 10 primeiros ciclos de anelamento (Figuras 4a e b).

A amplificação foi confirmada em corrida de eletroforese em géis de agarose 1%, corados com 0,02 µL/mL SYBR Safe 10.000X em DMSO (Invitrogen) no laboratório de Recursos Microbianos do CPQBA-Unicamp antes de se proceder o DGGE.

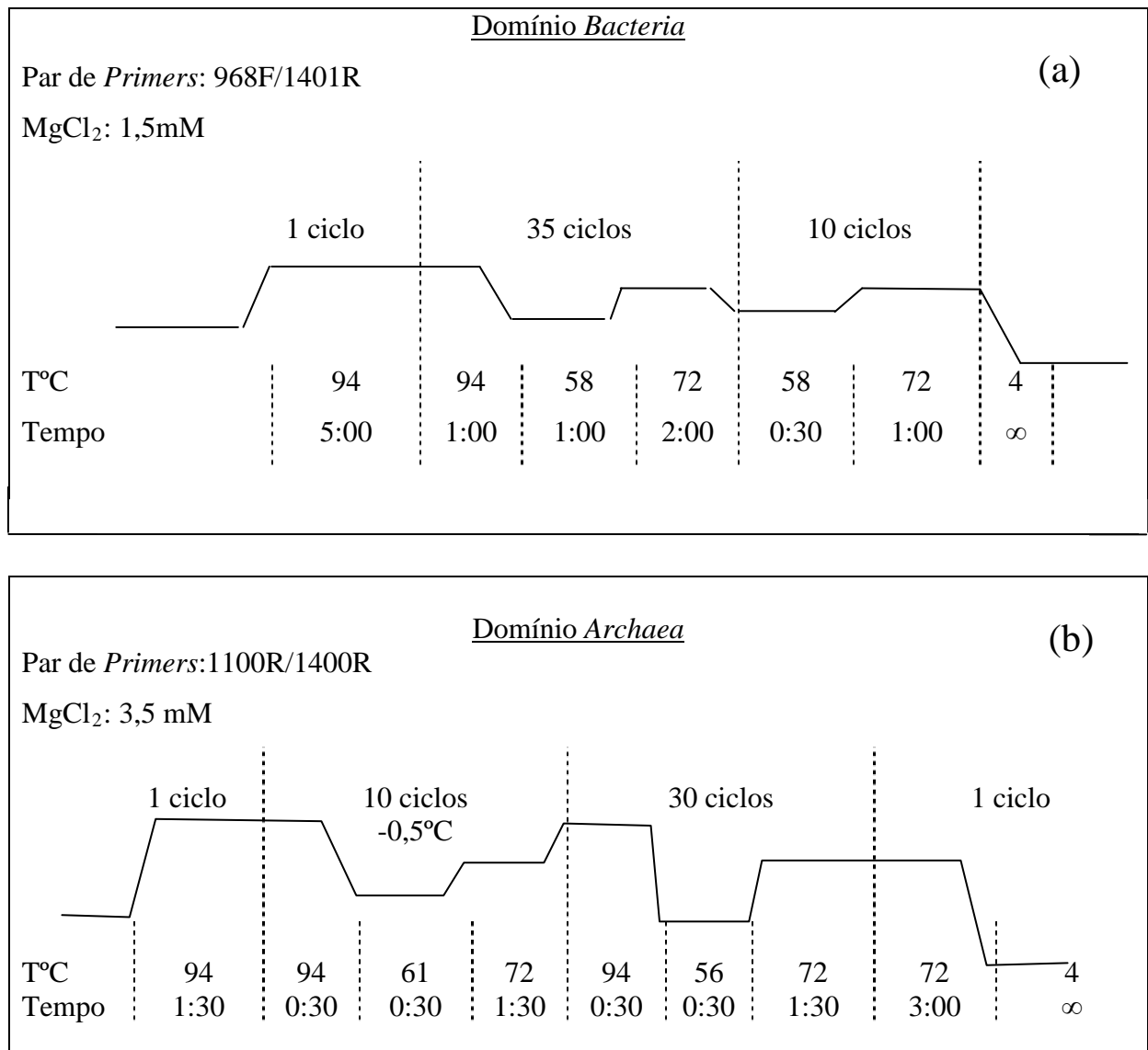


Figura 4 – *Primers* e programas utilizados na amplificação. (a) Domínio *Bactéria* (b) Domínio *Archaea*.

Fonte: Do autor.

4.6 Estudo da comunidade microbiana obtidos pela técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE

Os produtos da PCR amplificados no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciência e Tecnologia da Unifal-MG, campus Poços de Caldas-MG, foram transportados sob congelamento até o Departamento de Recursos Microbianos do Centro de Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade de Campinas (CPQBA-UNICAMP) para realização da técnica de DGGE.

Para separar diferentes sequências dos segmentos de DNAr 16S utilizou-se o sistema de DGGE INGENY PhorU (Ingeny[®], Holanda) segundo o manual do Departamento de Recursos Microbianos/CPQB-UNICAMP (Anexo 3). A partir das soluções estoques desnaturante 0 e 80%, como apresentado na Tabela 5, confeccionou-se os géis com gradiente desnaturante estabelecido em 40 e 70% para o domínio *Bacteria* e gradiente 50 e 65% para o domínio *Archaea*. Os volumes necessários para cada gradiente são apresentados na Tabela 6.

A cada um desses volumes foram adicionados 150 μ L de persulfato de amônio 10% (m/v) e 12 μ L de TEMED para acelerar polimerização dos géis de poliacrilamida.

Tabela 5 – Concentração final dos reagentes para a preparação das soluções estoque desnaturante 0% e 80%.

Reagentes	Solução Desnaturante 0%	Solução Desnaturante 80%
Poliacrilamida 30%	100 mL	100 mL
Tampão TAE 20X	12,5 mL	12,5 mL
Formamida (32%)	-	160 mL
Uréia	-	167,7 g
Água MiliQ (q.s.p.)	500 mL	500 mL

Fonte: Do autor.

Tabela 6 – Volumes das soluções desnaturantes (0% e 80%) necessários para a confecção dos gradientes de desnaturação nos géis de DGGE.

Concentração de desnaturante	Solução 0% (mL)	Solução 80% (mL)	Volume Final (mL)
40 %	12,5	12,5	25
50 %	9,4	15,6	25
65%	4,7	20,3	25
70%	3,1	21,9	25

Fonte: Do autor.

Empregou-se 18 μ L dos produtos de PCR do DNAr 16S com mais 5 μ L de corante tampão de corrida (Promega) para eletroforese dos DNAs no gel de poliacrilamida em tampão TAE 0,5X, contendo os gradientes lineares de desnaturantes estabelecidos. A eletroforese foi realizada por 16 horas a 100 V/60°C. Os géis foram corados com SYBR Safe 10.000X in DMSO (Invitrogen) e depois visualizado em transiluminador UV e fotodocumentado utilizando o equipamento *ImageQuant* (GE Healthcare).

4.7 Análise dos géis de DGGE – Análises de agrupamento

A análise de agrupamento separa as amostras em grupos que mantêm e compartilham características comuns (perfis de conjuntos de bandas) a partir de uma matriz de similaridade que foi gerada na da matriz de presença e ausência obtida dos dados dos géis de DGGE. O gráfico gerado por esta técnica denomina-se dendograma, que em forma de uma árvore relaciona o nível de similaridade na vertical e as amostras na ordem de agrupamento que ocorreram na horizontal (ALVES *et al.*, 2007).

Para a avaliação do perfil de diversidade das amostras e o cálculo do coeficiente de similaridade (Coeficiente de Dice, tolerância de 1%, método UPGMA) foi utilizado o programa *Bionumerics* (Bionumerics 7.1 Applied Maths, Bélgica). O coeficiente de similaridade entre duas amostras considera o número total de bandas presentes no DGGE e o número de bandas comuns, presentes nessas duas amostras. A equação $Cs = [(2 \times J)/(a + b) \times 100]$ foi utilizada para o cálculo do coeficiente de similaridade entre duas amostras. Onde *a* é o número de bandas de uma amostra, *b* é o número de bandas de uma segunda amostra e *J* é o número de bandas comuns entre duas amostras. Para dois perfis idênticos de DGGE o valor do coeficiente de similaridade é de 100% e perfis completamente diferentes tem valores iguais a 0% (BRUCHA, 2007).

4.8 Preparo das amostras para sequenciamento

As bandas de interesse foram excisadas do gel de poliacrilamida do DGGE e introduzidas em *ependorfs* contendo 50 µL de água ultra pura esterilizada e incubadas a 4°C *overnight*, Após esse período de incubação esses tubos foram armazenados a -20°C.

Após, testes preliminares de PCR foram realizados com alíquotas diluídas dos fragmentos excisados do gel de DGGE, em várias diluições, no intuito de se obter uma amplificação intensa, mas sem rastros de bandas inespecíficas para sequenciamento.

As bandas dos géis de DGGE foram reamplificadas com o mesmo par de *primers* citado anteriormente, porém sem o grampo G+C. Os programas de ciclos de PCR adotados foram alterados aumentando-se a temperatura de desnaturação para 96°C. Os novos produtos

de PCR de cada banda extraída foram purificados utilizando-se o kit *Gel Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega®), protocolo em anexo (Anexo 4).

Para quantificação dos produtos de PCR, alíquotas de 2 µL foram aplicadas em gel de agarose 2%, juntamente com *low mass ladder* (Invitrogen®), a fim de se estimar a concentração de DNA em cada produto. Esse *ladder* consiste de uma mistura de fragmentos de DNA de 100 a 2000pb com concentração conhecida. A eletroforese de 2,0 µL deste *ladder* resulta em seis bandas contendo 100, 60, 40, 20, 10 e 5 ng de DNA, respectivamente, que são utilizadas como um padrão comparativo para estimar a quantidade e a concentração de DNA de uma amostra extraída ou de um produto de PCR.

4.8.1 Sequenciamento das bandas excisadas

Os produtos de PCR das bandas, uma vez purificados e quantificados, foram enviados ao Setor de Sequenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano (USP) para o sequenciamento. As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com protocolo para o ABI 3730 DNA Analyser, um sistema de análise de DNA de 48 capilares com a tecnologia Life Technologies – Applied Biosystems. As reações de sequenciamento são feitas utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (código 4337456). As sequências foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando o Base Caller KB.

Depois de sequenciadas, as sequências brutas obtidas foram avaliadas quanto à qualidade do sequenciamento através do programa Electropherogram Quality Analysis (Togawa; Brigido, 2003), pelo link <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>>. As sequências com o melhor índice Phred (EWING *et al.*, 1998) foram selecionadas para comparação com a base de dados do GenBank utilizando o programa BLAST para identificar as sequências mais similares. Em seguida, eles foram alinhados pelo programa BioEdit e árvores filogenéticas foram construídas utilizando o método de Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987), através do programa Mega 6.06.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da diversidade microbiana no ASBR por meio da técnica PCR-DGGE

5.1.1 Extração e purificação de DNA genômico

As extrações de DNA que representam o DNA genômico dos microrganismos presentes nas amostras de lodo coletadas no final de cada fase operacional do reator ASBR, foram eficientemente realizadas. O processo de extração e purificação de DNA da microbiota que estava presente na amostra do reator foi confirmado com eletroforese em gel de agarose 1,5% utilizado marcador padrão da Promega 100pb. Conforme Figura 5, observa-se a presença de DNA para todas as amostras com extrações realizadas em duplicata.

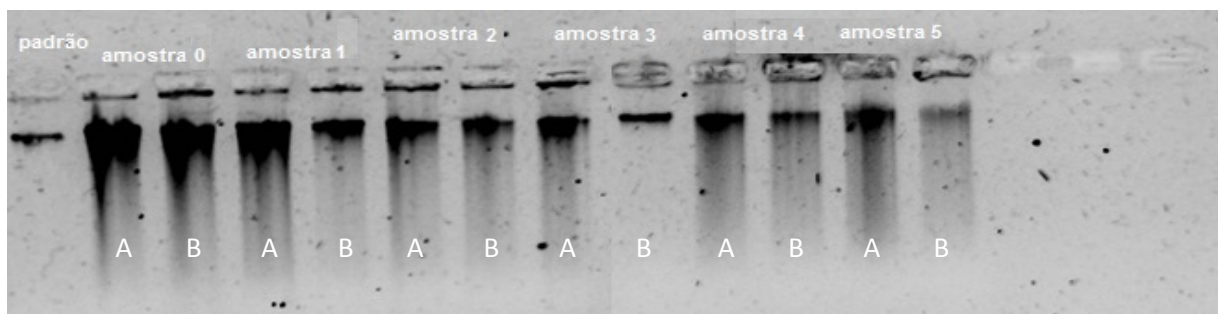


Figura 5 - Eletroforese dos produtos da extração de DNA em gel agarose 1,5%. Corados com brometo de etídio (150 μ g/200mL). Imagem negativa.

Fonte: Do autor.

Uma elevada concentração de DNA (entendida pela intensidade da cor preta nas canaletas) foi recuperada na maioria das amostras, como pode ser visto na Figura 5. Entretanto, na amostra 5B, a concentração foi bem mais fraca. Como o volume total de amostra analisada, para todos os pontos, foi o mesmo (2 mL), é provável que perdas de DNA tenham ocorrido durante o processo de extração e purificação das amostras, como, por exemplo, retenção de DNA nas colunas do kit de purificação, o que explicaria tal fato.

Segundo Head *et al.* (1998), uma das principais dificuldades e limitações de qualquer técnica de extração é assegurar uma eficiente recuperação de DNA de amostras ambientais por não se saber a priori a quantidade total de DNA microbiano ou, talvez, por não se conseguir uma lise eficaz de todas as células presentes nas amostra, mesmo com kits comerciais.

5.2 Análise da diversidade microbiana predominante no reator UASB pela técnica PCR-DGGE

A partir da extração e purificação do DNA das amostras passou-se a amplificação das amostras para o DGGE. Sequências do gene RNAr16S foram amplificadas por PCR com o par de *primers* específicos para o Domínio *Bacteria* e *Archaea*. A integridade do DNA genômico e o tamanho correto dos produtos de PCR obtidos foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1%, corados com SybrSafe usando o marcador de peso molecular de 1 Kb.

A análise por DGGE requer uma quantidade significativa do fragmento a ser analisado e por isso, há necessidade de uma amplificação por PCR antes desta técnica. Diversos testes foram realizados até a obtenção de melhores resultados de amplificação dos genes presentes na amostra.

Apesar da purificação dos extratos, bandas inespecíficas foram observadas em diversos testes. As causas para o aparecimento destas bandas são variadas, uma vez que diversos fatores podem ocorrer, como a baixa concentração de cloreto de magnésio ou a contaminação do DNA com proteínas, por exemplo. A fim de minimizar essas bandas, testes empíricos foram feitos com alíquotas das amostras diluídas. Os resultados apontaram para a impossibilidade de se adotar a mesma diluição para as diferentes amostras. Dessa forma, para as reações de PCR deste estudo foi necessário testar qual a melhor quantidade de DNA a ser aplicada e a necessidade de diluição. Na maioria das amostras, a diluição empregada foi de 100 vezes, o que resultou em boa amplificação. A melhor qualidade dos produtos de PCR foi alcançada nas condições descritas na metodologia.

5.2.1 Caracterização das comunidades do Domínio *Bacteria*

A integridade do DNA genômico total extraído e o tamanho correto dos produtos de PCR obtidos a partir dos *primers* 968F-GC/1401R para o Domínio *Bacteria* foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1%, corados com Sybrsafe, usando o marcador de peso molecular de 1Kb, conforme Figura 6. Observa-se, à esquerda, que o tamanho esperado de 433 pb obtido através dos *primers* 968F/1401R foi alcançado.

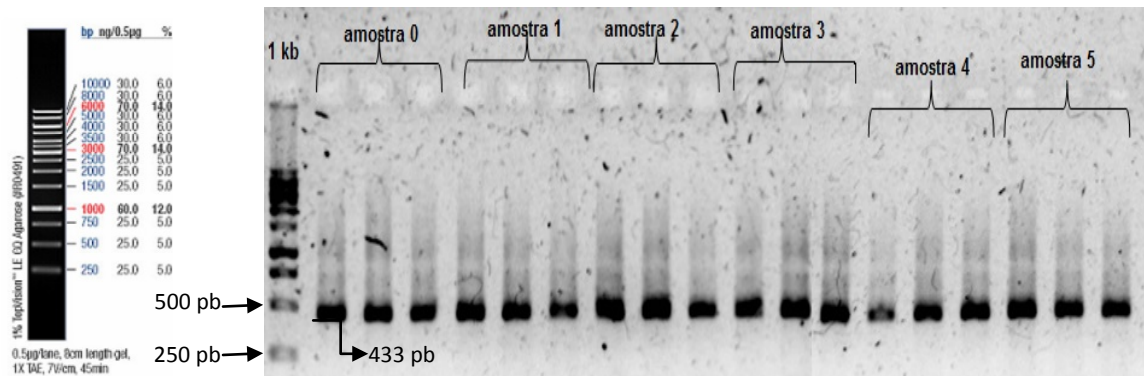


Figura 6 - Imagem negativa do gel agarose 1% contendo os fragmentos de DNA Ribossomal 16S amplificados de 433 pb com *primers* 968F-GC e 1401R de *Bactéria* a partir das amostras extraídas. Gel corado com 0,02 $\mu\text{L}/\text{mL}$ SYBR Safe 10.000X em DMSO (Invitrogen). PCR realizado em triplicada para cada amostra (Amostra 0 = lodo Dakar; Amostra 1 = pH 5,0; Amostra 2 = pH 4,0; Amostra 3 pH 4,0+Fe; Amostra 4 = pH 4,0 + Fe e Zn; Amostra 5 = pH 4,0 + Fe, Zn e Cu). À esquerda, o padrão 1kb utilizado.

Fonte: Do autor.

O DNA das amostras, amplificado por PCR, foi submetido à análise por DGGE com gradientes desnaturantes de ureia-formamida de 40-70%. Foram analisados os fragmentos do gene RNA ribossomal 16S amplificados por PCR com pares iniciadores para o Domínio *Bacteria*.

A Figura 7 apresenta o perfil de bandas da comunidade de bactérias obtidas, após a amplificação do DNA para o Domínio *Bacteria* por PCR, das amostras de inóculo (lodo granular) e das amostras do reator ASBR nas diferentes etapas de operação.

Pelo comportamento das bandas pode-se inferir o comportamento da comunidade bacteriana nas diferentes fases operacionais deste reator. Considerando o perfil das bandas obtidas nas amostras estudadas pode-se observar que estes eram constituídos por um total de 23 diferentes bandas distribuídas entre o inóculo e as fases operacionais estudadas (Amostras 0, 1, 2, 3, 4, 5) conforme Figuras 7.

De forma a facilitar a visualização, criou-se o quadro abaixo (Figura 8), representativo das bandas observadas em cada canaleta.

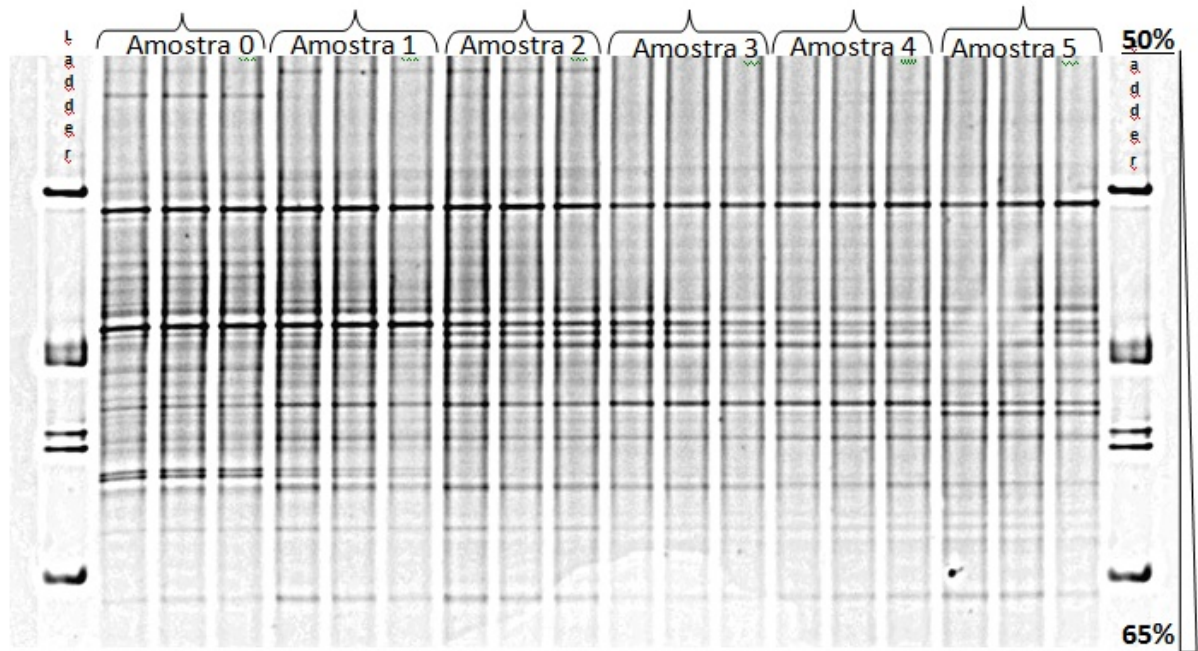


Figura 7 – Recorte da imagem negativa de gel de DGGE com gradiente desnaturante de 40-70%, corado com SybrGold contendo fragmentos de DNA ribossomal 16S amplificados com iniciadores 968F-GC e 1401R de bandas de *Bacteria*. Amostras em triplicata.

Fonte: Do autor.

BANDAS	AMOSTRAS					
	0	1	2	3	4	5
A						
B						
C						
D						
E						
F						
G						
H						
I						
J						
K						
L						
M						
N						
O						
P						
Q						
R						
S						
T						
U						
V						
W						
TOTAL (23)	19	20	17	13	10	11
	Presença de bandas					
	Ausência de bandas					

Figura 8 – Quadro apresentando a matriz de presença e ausência de bandas, obtidos a partir do gel de DGGE para o Domínio *Bacteria*.

Fonte: Do autor.

Dentre essas 23 bandas totais, observa-se que sete (7) das bandas detectadas (30,4%) pelo método do DGGE no inóculo, se mantiveram na mesma posição no gel ao longo do tratamento da DAM sob as diferentes condições operacionais estudadas, conforme mostram as linhas C, J, K, L, O, U e W. (Figura 8). Esta microbiota foi capaz de se manter em condições anaeróbias sulfetogênicas com redução de pH e adição de metais nas concentrações especificadas, sugerindo a dominância de microrganismos que podem estar desempenhando uma função essencial ao processo, podendo ser bactérias autotróficas ou heterotróficas mesofílicas facultativas ou então, que se mantiveram pela utilização da matéria orgânica devido à morte celular no reator.

Por esses resultados obtidos pode-se inferir que as adversidades ocorridas no reator ASBR durante as fases experimentais impostas exerceram certa pressão seletiva sobre a comunidade bacteriana.

Observou-se que a operação do reator em pH 5,0 e 4,0, respectivamente, não afetou de forma tão significativa a diversidade de bactérias (Amostras 1 e 2), em relação ao inóculo (Amostra 0). Nesta comparação observa-se, em relação ao inóculo o surgimento de uma nova banda em pH 5,0 e a perda de 3 bandas em pH 4,0, mas manutenção da que havia surgido.

Por outro lado, comparando-se o inóculo (Amostra 0) com a operação do reator em pH 4,0 com adição dos metais ferro, zinco e cobre, evidencia-se que ocorreu uma maior diminuição do número de bandas (de 19 bandas do inóculo para 13, 11 e 10 bandas nas amostras 3, 4 e 5, respectivamente), inclusive com maior queda após a adição do ferro e do cobre (Amostra 3 e 4) (Figura 9).

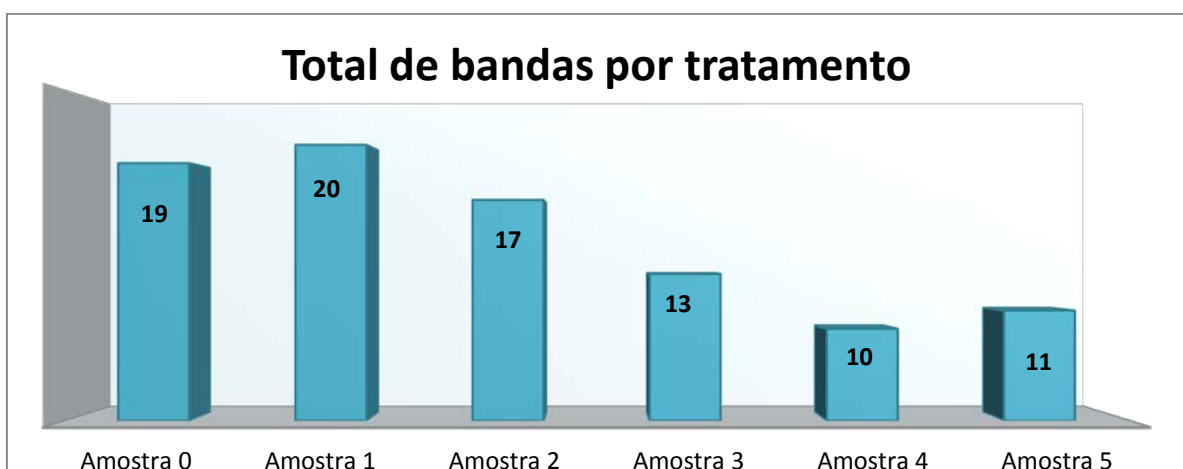


Figura 9 – Gráfico representativo do número de bandas observadas em cada tratamento do ASBR observadas a partir do DGGE para o domínio *Bacteria*.

Fonte: Do autor.

Algumas bandas podem ter surgido em função do tratamento empregado. No caso da operação do reator em pH 5,0, observa-se o incremento de duas bandas (bandas “M” e “Q”) que permanecem presentes em todos os tratamentos subsequentes (Figura 8).

Martins *et al.* (2011), estudando a comunidade bacteriana no tratamento de DAM oriunda de duas minas abandonadas em Portugal, através de reator anaeróbio de leito fixo, encontraram também surgimento de novas bandas no gel de eletroforese em gel de gradiente desnaturante por temperatura (TGGE) durante o decorrer do tempo operacional em um de seus dois reatores estudados. Em seus estudos, correlacionaram esse surgimento de bandas com a composição diferenciada da DAM com que o reator foi alimentado.

Também, no tratamento em pH 4,0 com adição subsequente de zinco (Amostra 4) e no tratamento em pH 4,0 com adição subsequente de cobre (Amostra5), observa-se o surgimento das bandas “N” e “P” com intensidade forte, respectivamente. Silva (2011), estudando a diversidade microbiana pela técnica PCR-DGGE em reatores UASB tratando azocorantes também evidenciou o surgimento de novas bandas em diferentes fases operacionais, inclusive nas fases operacionais com a melhor eficiência do reator.

Considerando a eficiência do reator ASBR deste estudo, os dados corroboram com o apresentado acima (Silva, 2011), pois, segundo Franco (2014), (dados não publicados), a redução do pH inicial esteve relacionada diretamente às melhores taxas de remoção de sulfato. A remoção de sulfato também melhorou conforme se aumentou a concentração de metais, ou seja, melhorou conforme as condições da DAM sintética se aproximava das reais.

5.2.1.1 Estudo de agrupamentos e similaridade para o Domínio *Bacteria*

Para o estudo de agrupamentos e similaridade, essas mesmas bandas do DGGE foram detectadas e analisadas através do programa *Bionumerics*[®]. O uso do programa possibilitou a análise combinada de todas as bandas do perfil eletroforético, construindo assim um dendograma de similaridade que permitiu a avaliação das relações genéticas entre todos os tratamentos (Figura 10, Tabela 7).

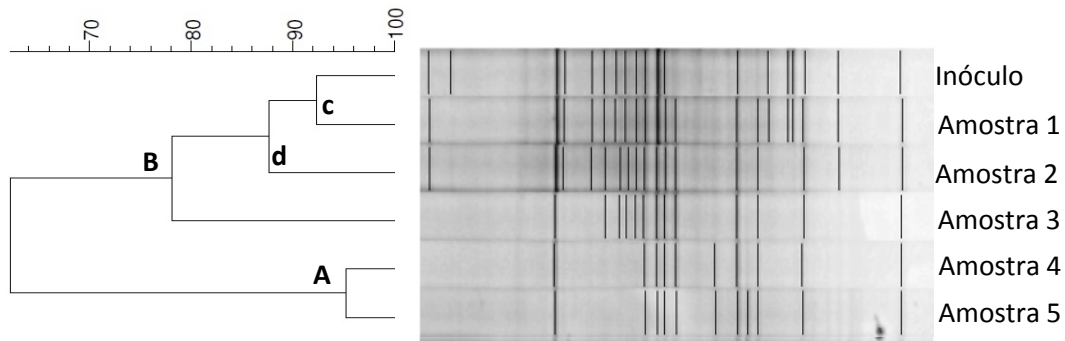


Figura 10 – Dendrograma de similaridade gerado pelo programa *Bionumerics* Versão 7.1 Applied Maths, Kortrijk, Belgium para o gel de DGGE do Domínio *Bacteria*. Os perfis de bandas foram combinados e analisados em conjunto pelo coeficiente de DICE usando o algoritmo UPGMA.

Fonte: Do autor.

Tabela 7 – Matriz de distância. Coeficientes de similaridade de Dice, para o Domínio *Bacteria*

	Inóculo	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
Inóculo	100	92.3	83.3	68.8	48.3	46.7
Amostra 1	92.3	100	91.9	78.8	60.0	59.1
Amostra 2	83.3	91.9	100	86,7	68.7	64.3
Amostra 3	68.8	78.8	86.7	100	78.3	75.0
Amostra 4	48.3	60.0	66.7	78.3	100	95.2
Amostra 5	46.7	58.1	64.3	75.0	95.2	100

Fonte: Do autor.

O dendrograma apresentou um cluster principal onde se observa um coeficiente de similaridade entre as amostras de 62%. Diante disso pode-se observar que a comunidade microbiana preexistente no inóculo sofreu, de modo geral, alteração durante as fases operacionais impostas. Mestrinelli (2010) utilizando o mesmo inóculo deste estudo em reatores operados em condições de desnitrificação utilizando sulfeto como doador de elétrons observou, através do mesmo coeficiente de similaridade, que as comunidades dos reatores em eficiência máxima apresentaram em torno de 50% de similaridade com o inóculo, enquanto que os reatores operados nas condições de redução de nitrato e nitrito apresentaram aproximadamente 90% de similaridade entre si.

Ainda, Pruden *et al.* (2007) estudando o tratamento de águas ácidas com metais pesados em colunas de redução de sulfato inoculadas com lodo contendo BRS observaram que a comunidade microbiana afetou significativamente a eficiência na remediação da DAM. Através de índice de diversidade utilizado (índice de Shanon) observaram que houve também uma redução do início ao final do tratamento de 1,26 para 1.08. Isso equivale a uma redução na comunidade bacteriana de 16,7%.

Através da Figura 10, pode-se observar que deste grande cluster com 62% de similaridade, formam-se dois agrupamentos distintos (A e B), unindo em um agrupamento as amostras inóculo, 1, 2 e 3 (grupo B), com coeficiente de similaridade de 78% entre si. No outro agrupamento (Amostras 4 e 5, grupo A), ocorre um coeficiente de similaridade de 95,2% entre as amostras, sendo diferenciado em 4,8% porque ocorre o surgimento de uma nova banda na amostra 5.

O grupo B, composto pelo inóculo e pelas amostras 1, 2 e 3 apresentam dois subgrupos “c” e “d”. O subgrupo “c” apresenta entre si um coeficiente de similaridade na ordem de 92% entre si. Essa diferença surgiu em função do surgimento de uma banda a mais e, ainda, a perda de uma banda, em posições diferentes, no tratamento referente à amostra 1 (operação em pH 5,0). O subgrupo “d” ocorreu com um coeficiente de similaridade entre as amostras 0, 1 para a amostra 2 de aproximadamente 87%, apresentando em comparação ao inóculo em referência à amostra de número 2 um coeficiente de 83,3% (Tabela 7). Nesta condição observa-se a perda de três bandas da amostra 2 em relação ao inóculo, devido, certamente a influência do pH reduzido para 4,0.

Analisando os coeficientes de similaridade para cada amostra em relação ao inóculo, podemos observar uma redução sequencial da similaridade ao passo que são impostas novas condições operacionais. Contudo a maior redução ocorre com a amostra 4, com 48,3% de similaridade com o inóculo. Já a amostra 5, praticamente mantém muito próxima à similaridade da amostra 4 com 46,7% ao inóculo.

Considerando, em relação ao inóculo, a primeira amostragem (Amostra 1), que ocorreu após 103 dias de operação do ASBR em pH 5,0 passando anteriormente por seu período de aclimatação em pH 6,0 (não estudado), observa-se o coeficiente de similaridade de 92,3% entre as amostras, onde a população bacteriana mostrou pouca variação, inclusive apresenta em pH 5,0 o surgimento de duas nova bandas que se mantém até ao final do período de operação do reator, como já descrito anteriormente.

Ao se fazer uma comparação entre o inóculo (Amostra 0) e entre a fase com pH = 4,0 (Amostra 2), observa-se um coeficiente de similaridade na ordem de 83,3 %, perdendo 2 bandas nesta condição, inferindo que a redução de pH para 4,0 em relação às condições do inóculo (pH não aferido) não impactaram negativamente a comunidade microbiana. Contudo, ao analisarmos a relação do inóculo com a amostra 3 (pH 4,0 e adição de ferro) observamos um índice de similaridade de 68,8%, onde 9 bandas permanecem comuns entre essas amostras e 5 delas, apesar de tolerarem a redução do pH para 4,0 (Amostra 2) não toleraram a adição de 100mg.L⁻¹ de Fe nas condições operacionais impostas até a redução de sulfato se estabilizar.

Ghosh *et al.* (2012) observaram em seus estudos de remediação de DAM, que mudanças no pH e na concentração ferro estão associados a alterações temporais na estrutura da comunidade bacteriana, corroborando com os dados aqui apresentados.

As condições operacionais impostas nas amostragens 4 e 5, em relação ao inóculo mostraram-se bem próximas em termos de similaridade, apresentando 48,3 e 46,7% de similaridade, respectivamente em relação ao inóculo. Nestas condições, dados os índices de similaridade em relação ao inóculo, observa-se a grande influência do metal Zn na diminuição dessas bandas, sendo maior do que a possível toxicidade observada ao ferro em pH 4,0.

Quando ocorreu a adição de cobre à solução (Amostra 5) observou-se o incremento de mais uma banda (banda "P"). Nesta condição, o coeficiente de similaridade entre as Amostras 4 e 5 foi de 95%. Nenhuma banda foi suprimida, indicando que os microrganismos que toleraram as concentrações impostas de Fe e Zn também toleraram as concentrações impostas de Fe, Zn e Cu, inclusive favorecendo o surgimento de uma banda específica já detalhada.

A análise do perfil de bandas do DGGE permitiu a visualização da dinâmica da população microbiana presente em cada fase do tratamento biológico da DAM. Os resultados revelam que ocorreu variação na diversidade de microrganismos do domínio *Bacteria* nos tratamentos da DAM com os parâmetros operacionais estudados. Dentre essas observações percebe-se que as sucessivas diminuições de pH foram menos influentes na diversidade do que foi a adição dos metais, principalmente quando houve adição do Fe.

5.2.1 Caracterização das comunidades do Domínio *Archaea*

A integridade do DNA genômico total extraído e o tamanho correto dos produtos de PCR obtidos através dos *primers* 1100F+GC/1400R para Domínio *Archaea* foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1%, corados com Sybrsafe. Observa-se, a esquerda, que o tamanho esperado de 300 pb obtido foi alcançado (Figura 11).

O DNA das amostras amplificado por PCR do gene RNAr16S para o Domínio *Archaea* foi submetido à análise por DGGE com gradientes desnaturantes de ureia-formamida de 50-65%. Por meio do perfil de bandas visualizados no gel após a corrida eletroforética (Figura 12) foi possível apontar o número de bandas presentes fazer uma análise do comportamento adaptativo das comunidades microbianas deste Domínio após o tratamento biológico da DAM nas diferentes condições operacionais estabelecidas.

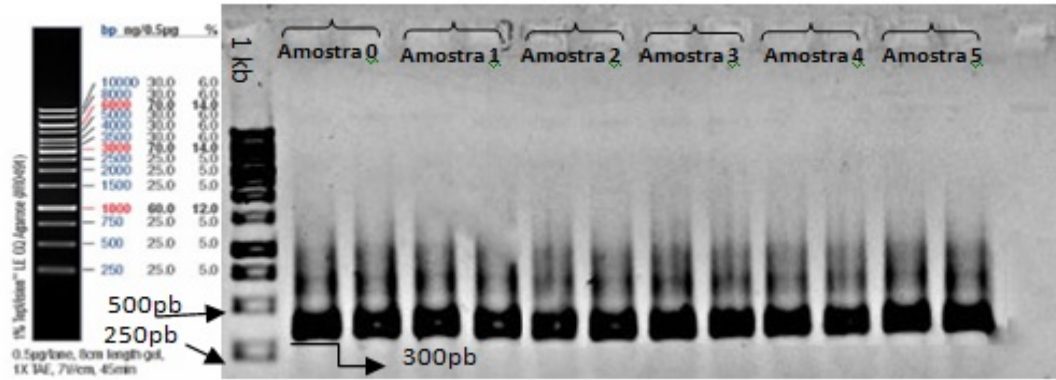


Figura 11 – Imagem negativa do gel agarose 1% contendo os fragmentos de DNA Ribossomal 16S amplificados de 300 pb com *primers* 1100F-GC e 1400R de *Archaea* a partir das amostras extraídas. Gel corado com 0,02 μ L/mL SYBR Safe 10.000X em DMSO (Invitrogen). PCR realizado em duplicata para cada amostra (Amostra 0 = lodo Dakar; Amostra 1 = pH 5,0; Amostra 2 = pH 4,0; Amostra 3 pH 4,0+Fe; Amostra 4 = pH 4,0 + Fe e Zn; Amostra 5 = pH 4,0 + Fe, Zn e Cu). À esquerda, o padrão 1kb utilizado.

Fonte: Do autor.

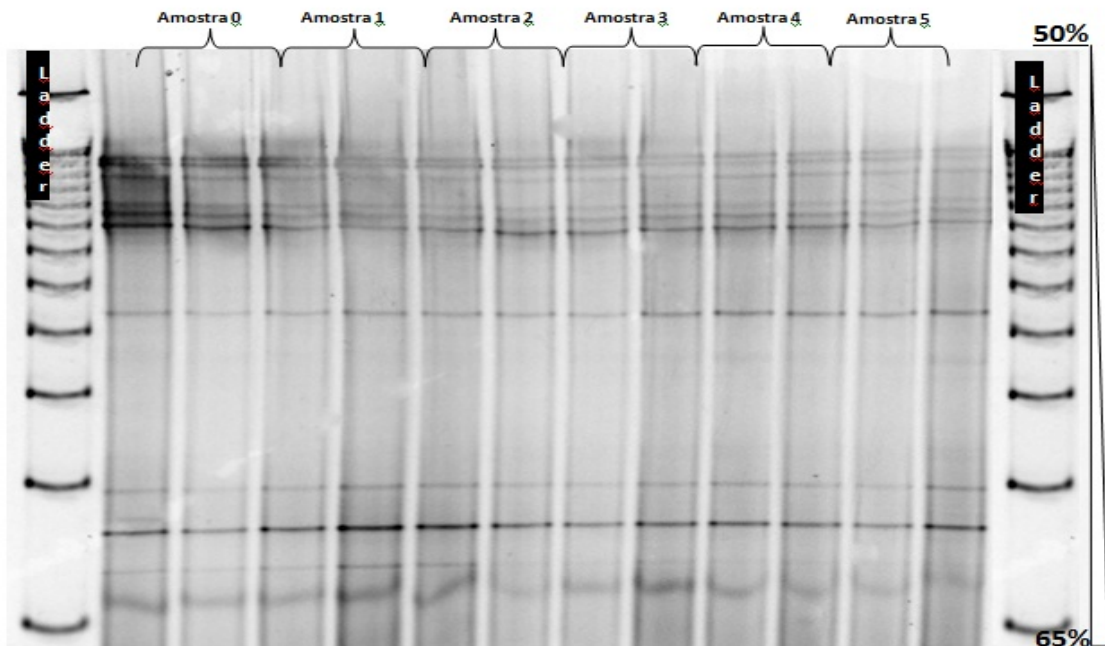




Figura 12 – Recorte da imagem negativa de gel de DGGE com gradiente desnaturante de 50-65%, corado com Sybrgold contendo fragmentos de DNA ribossomal 16S amplificados com iniciadores 1100F-GC e 1400R de bandas de *Archaea*. Amostras em duplicata.

Fonte: Do autor.

De forma a facilitar a visualização, criou-se o quadro abaixo (Figura 13), representativo das bandas observadas em cada canaleta.

BANDAS	AMOSTRAS					
	0	1	2	3	4	5
A						Arc1
B						
C						
D						
E						Arc2
F						
G						
H						Arc3
I						Arc4
J			Arc5			
TOTAL (10)	10	10	10	9	9	9

 Presença de bandas

 Ausência de bandas

Arc 1 a Arc 4, bandas recortadas da amostra 5 e Arc 5, banda recortada da amostra 2, para nova amplificação e sequenciamento.

“x” – bandas sequenciadas

Figura 13 – Quadro apresentando a matriz das bandas presentes nas amostras do gel de DGGE para o domínio *Archaea*.

Fonte: Do autor.

Considerando o perfil das bandas obtidas nas amostras estudadas pode-se observar que estes eram constituídos de vários microrganismos representados por 10 bandas distribuídas entre as amostras (amostras 0, 1, 2, 3, 4, 5) conforme Figura 13.

Dentre essas 10 bandas detectadas, observa-se que nove (9) das bandas detectadas se mantiveram na mesma posição no gel ao longo do tratamento da DAM sob as diferentes condições operacionais estudadas. Apenas uma banda, deixou de se apresentar a partir da condição operacional de pH 4,0 com adição de Fe (Amostras 3, 4 e 5) na solução a ser tratada.

5.2.2.1 Estudo de agrupamentos e similaridade para o Domínio *Archaea*

As bandas do DGGE foram detectadas e analisadas através do programa *Bionumerics*. Após normalização dos géis somente as bandas com pico de intensidade que excederam 1% da banda mais forte em cada canaleta foram incluídas na análise. O uso do programa *Bionumerics* possibilitou a análise combinada de todas as bandas do perfil eletroforético, construindo assim um dendograma de similaridade que permitiu a avaliação das relações genéticas de todos os tratamentos para o Domínio *Archaea* (Figura 14, Tabela 8).

Como se pode observar através da Figura 14, o dendograma apresentou um cluster principal em que se observa um coeficiente de similaridade entre as amostras de aproximadamente 95%. Diante disso pode-se observar que comunidade microbiana preexistente no inóculo sofreu, de modo geral, pouca redução durante as fases operacionais

impostas (redução de pH e adição dos metais Fe, Zn e Cu). Pode-se observar que deste grande cluster formam-se dois agrupamentos distintos: agrupamento A (amostras 0, 1 e 2) e agrupamento B (amostras 3,4 e 5) cada qual com coeficiente de similaridade de 100% entre si.



Figura 14 – Dendrograma de similaridade gerado pelo programa Bionumerics 7.1 do perfil de PCR-DGGE do DNAr16S das *Archaeas* obtido a partir das amostras de lodo do ASBR. Método UPGMA, coeficiente de Dice.

Fonte: Do autor.

O fator que criou esses dois grupos, distintos entre si em aproximadamente 5%, foi a adição de 100mg.L^{-1} de Fe em pH 4,0. Assim poderia-se induzir que este grupo de arqueias não tolerou essa concentração de Fe nas condições impostas ao reator, ou ainda, é possível que as variações no perfil de bandas sejam decorrentes da quantidade dos produtos de PCR e não, necessariamente, da diversidade de arqueias presentes em cada ponto amostrado dos reatores. Como se pode inferir pelo sequenciamento apresentado neste trabalho, esta banda que deixa de existir no momento da adição do ferro é a mesma, filogeneticamente, que algumas bandas específicas que toleraram a adição dos metais em pH 4,0.

Tabela 8 – Matriz de distância. Coeficiente de similaridade de Dice, para o Domínio *Archaea*

	Inóculo	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
Inóculo	100	100	100	94,7	94,7	94,7
Amostra 1	100	100	100	94,7	94,7	94,7
Amostra 2	100	100	100	94,7	94,7	94,7
Amostra 3	94,7	94,7	94,7	100	100	100
Amostra 4	94,7	94,7	94,7	100	100	100
Amostra 5	94,7	94,7	94,7	100	100	100

Fonte: Do autor.

Comparando-se a diversidade de bactérias e arqueias neste estudo, observa-se que as bactérias foram 56,5% maior que as arqueias em termos de diversidade. Sanches-Andrea *et al.*

(2014), estudando processos de tratamento anaeróbio da DAM encontraram também que as bactérias superam as arqueias em diversidade.

Apesar da baixa diversidade em relação às bactérias neste estudo, as arqueias foram menos influenciadas pelas condições experimentais do presente estudo do que as bactérias. As arqueias são conhecidas por apresentarem uma ampla diversidade metabólica, atributos bioquímicos e estruturais únicos, os quais as adaptaram a viver em habitat considerados inóspitos a maioria dos eucariotos e mesmo à maioria das bactérias (CARDOSO *et al.*, 2003).

5.3 Sequenciamento e identificação

5.3.1 Sequenciamento e identificação para o Domínio *Bacteria*

Para o estudo de sequenciamento e identificação presentes no material isolado por extração do DNA e amplificação do DNAr 16S de 433 pb do Domínio *Bacteria* estudados foram submetidos a nova DGGE, mantendo-se os gradientes lineares de desnaturação em 40-70% para fazer o estudo sobre a filogenia das bandas presentes na última condição operacional do reator ASBR (pH 4,0 com adição dos metais Fe, Zn e Cu) da amostra 5.

A Figura 15 apresenta os resultados para esta nova DGGE, onde podemos observar que as bandas da “Amostra 5” também foram em número de 11 bandas visualizadas, a exemplo da primeira DGGE.

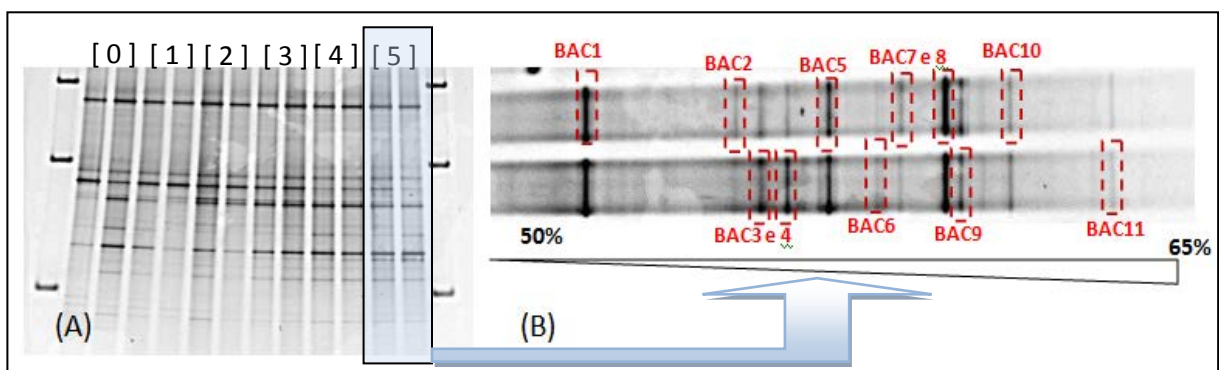


Figura 15 – (A) Recorte da imagem negativa de gel de DGGE com gradiente desnaturante de 40-70%, corado com SybrGold contendo fragmentos de DNA ribossomal 16S amplificados com iniciadores 968F+GC e 1401R de bandas de *Bacteria*. (B) Amostra 5 em evidência. Amostras em duplicata. Retângulos pontilhados vermelhos indicam bandas recortadas para sequenciamento (BAC1 a BAC11).

Fonte: Do autor.

Das bandas presentes no gel, conforme Figura 15B, as 11 bandas presentes no último tratamento (BAC1 a BAC11), foram recortadas e introduzidas em *ependorfs* contendo 50 µL de água ultra pura esterilizada e incubadas a 4°C *overnight*, após esse período de incubação esses tubos foram armazenados a -20°C até o momento de nova amplificação.

Esse material foi novamente amplificado com o par de *primers* 968F+GC/1400R e nova DGGE foi realizada para verificar a pureza das bandas (Figura 16A e B).



Figura 16 – (A) Produtos de PCR das bandas recortadas amplificados com par de *primers* 968F+GC/1401R. (B) Comparação do perfil de bandas de DGGE com gradiente desnaturante de 40-70%, corado com SybrGold contendo fragmentos de DNA ribossomal 16S amplificados com iniciadores 968F+GC e 1401R das bandas recortadas.

Fonte: Do autor.

Observa-se pela Figura 16 (A) que a amplificação das bandas recortadas apresentou muitos rastros e em (B) que as bandas recortadas não apresentaram a pureza necessária, pois apresentaram nesta DGGE, em sua maioria, mais de uma banda por caneleta. Quando apresentaram uma única banda, observa-se que são bandas com pouca intensidade, como é o caso da BAC10 e BAC11. Tais problemas são relatados à limitações da técnica de DGGE, onde fragmentos de mesmo comprimento com mesmo número de ligações AT CG param na mesma zona de desnaturação em gel de poliacrilamida (TAKETANI, 2010; BRUCHA, 2007).

Uma vez que não houve tempo hábil para isolar as bandas, novos produtos de PCR foram gerados a partir do uso do par de *primers* 968F/1401R sem a cauda GC para análise de sequenciamento, conforme descrito por Brucha (2007). Foram feitas várias reações de PCR com cada banda, cujos respectivos produtos foram submetidos à purificação de DNA para remoção de reagentes residuais (enzima, nucleotídeos, tampão, etc.) através do kit *Gel Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* conforme descrito na metodologia.

Devido a fatores ambíguos encontrados na re-amplificação das bandas recortadas para este Domínio, como a possível baixa concentração de DNA molde nas bandas recortadas e

ressuspensas; o possível dano à estrutura do DNA por exposição à luz ultravioleta no momento de recortar; à presença de bandas inespecíficas apontadas pela DGGE (Figura 16B); além dos sucessivos descongelamentos e congelamentos, observou que não era mais possível se obter um bom produto de PCR, mostrando que fatores externos, como a própria preservação ou o manejo frequente das amostras, podem provocar perdas de DNA, obteve-se, apenas seis amostras a serem enviadas para sequenciamento em quantidades mínimas necessárias, sendo as bandas BAC2, BAC4, BAC5, BAC6, BAC8 e BAC10.

Alíquotas de 2 μ L dos produtos purificados de cada uma das 6 bandas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (2%), juntamente com 2 μ L de *low mass ladder* para estimar a quantidade de DNA presente nos produtos de PCR de cada banda extraída (Figura 17).

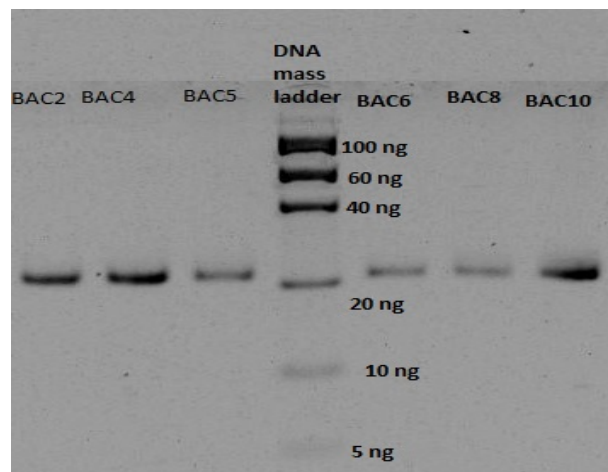


Figura 17 – Quantificação do produtos de PCR com *primer* 968F/1401R para sequenciamento Domínio *Bacteria*.

Fonte: Do autor.

A partir da imagem (Figura 17) foi possível estimar a quantidade de DNA para cada amostra, onde as amostras BAC2, BAC4 e BAC10 foram estimadas contendo 20 ng/2 μ L de DNA. Já as bandas BAC5, BAC6 e BAC8 foram estimadas em 10 ng/2 μ L de DNA. Essas bandas foram preparadas para serem sequenciadas com o *primer* 968F.

As bandas purificadas foram encaminhadas ao Setor de Sequenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano (USP). Depois de sequenciadas, as sequências brutas obtidas foram avaliadas quanto à qualidade do sequenciamento segundo Togawa; Brigido (2003) conforme descrito na metodologia.

Os resultados do sequenciamento, porém, não foram satisfatórios quando analisadas segundo Togawa; Brigido (2003), apresentando valor Phred muito próximos de 10⁽¹⁾, indicando incertezas na composição de nucleotídeos nas fitas de DNA.

Isto indica que, possivelmente, cada banda de DGGE não continha apenas sequências de um único tipo, mas talvez fosse formada por diferentes sequências. Muitos estudos que envolveram PCR–DGGE no estudo da DAM incluíram etapas experimentais posteriores de clonagem das bandas excisadas e, somente após esta etapa, foi que se processou o sequenciamento (LU *et al.*, 2011; PRUDEN *et al.*, 2007; DÍAZ *et al.*, 2001).

Segundo Díaz *et al.* (2001), a etapa de clonagem permite um melhor isolamento das diferentes sequências que podem, eventualmente, estar constituídas em uma única banda. Porém esta etapa experimental não pode ser realizada neste trabalho em função da disponibilidade de tempo e de materiais. Sekiguchi *et al.* (2001), encontraram em seus estudos de clonagem de bandas de DGGE que apesar de recortarem e purificarem uma única banda de DGGE, esta nem sempre representava um único gênero de microrganismo.

Apesar das sequências não apresentarem boa qualidade, foram selecionadas os melhores trechos possíveis analisados para comparação com a base de dados do GenBank utilizando o programa BLAST para identificar as sequências mais similares. A Tabela 9 foi construída levando-se em conta os melhores índices de cobertura e depois as melhores similaridades encontrados para cada banda sequenciada do Domínio *Bacteria*.

As bandas BAC2 e BAC4 apresentaram 91% de similaridade com o Clone BXHA30, a banda BAC6 também com 91% de similaridade, mas com o clone UMAf3, todos de bactérias não cultivadas (Tabela 9). Estes dois clones estão relacionado à bactéria de amostras ambientais, sem, no entanto ter-se obtido na base de dados do NCBI mais detalhes quanto a filo, classe, ordem ou ainda a família.

De uma forma geral, considera-se que cada banda visualizada no gel de DGGE corresponda a uma espécie bacteriana. Porém, sabe-se que muitas bactérias possuem mais de uma cópia do RNAr 16S, as quais, quando amplificadas e analisadas por DGGE podem apresentar diferentes mobilidades, resultando em múltiplas bandas que pertencem a uma mesma espécie bacteriana (BOON *et al.*, 2000; NUBEL *et al.*, 1996). Além disso, apesar de teoricamente ser capaz de distinguir fragmentos de DNA que diferem em apenas um par de bases, Jackson *et al.* (2000) mostraram, em seu estudo com *Escherichia coli*, que esta técnica não foi capaz de identificar diferenças entre mutantes que continham dois pares de bases

¹ Para exemplificar, um phred de 10 para uma base significa que ela terá 10% de chance de estar incorreta; um valor de 20 dará a ela uma chance em 100 de estar incorreta e um valor igual a 30 estará associado a uma chance em 1.000 daquela base ter sido incorretamente nomeada (PROSDOCIMI, 2006).

distintos no fragmento de DNAr 16S. Isso significa que uma banda detectada no gel pode representar mais de uma espécie bacteriana, com diferentes sequências, mas mesmo conteúdo de G+C.

Tabela 9 – Classificação das bandas sequenciadas do DGGE para o Domínio *Bacteria*, mediante análise comparativa entre o BLAST e a base de sequências do NCBI.

Bandas	Microrganismo	Nº de acesso	Similaridade (%)	Cobertura (%)	Referência
BAC2 e BAC4	Clone BXHA30 de bactéria não cultivado	GQ479985.1	91	99	Não publicado
BAC5	<i>Clostridium</i> sp. CYP8 16S gene RNA ribossomal	DQ479418.1	80	68	Não publicado
	<i>Geobacter</i> sp. clone MFCUaja3-29 não cultivado	JF818063.1	79	68	Yates <i>et al.</i> (2012)
BAC6	Clone UMA_f3 de bactéria não cultivada	JQ815858.1	91	71	Não publicado
BAC8	Nenhuma similaridade significativa encontrada				
BAC10	Clone <i>Staphylococcus</i> sp. de cultura enriquecida TTGE_FP_156	KF646746.1	79	39	Não publicado

Fonte: Do autor.

Neste estudo, a banda “BAC5” apresentou 80% de similaridade com *Clostridium* sp. e 79% de similaridade com o clone não cultivado de *Geobacter* sp. MFCUaja3-29, ambos considerados microrganismos anaeróbios desempenhando papel na redução de sulfato (YATES *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2011; RODRIGUEZ, 2010)

Com relação ao *Clostridium* este foi relatado no NCBI a um trabalho não publicado relacionado à oxidação de enxofre em solos metalíferos. De acordo Garrity *et al.* (2001) este clone está classificado ao filo *Firmicutes* na classe *Clostridia* sendo bactérias Gram-positivas com baixo conteúdo de G+C, bacilos anaeróbios estritos esporulantes.

Rodriguez (2010), estudando a redução de sulfato de DAM através de reatores RAHFL, utilizando o mesmo inóculo deste trabalho, encontrou em dois de três reatores mais de 94% de prevalência dos clones para o filo *Firmicutes* sendo todos da classe *Clostridia* e ordem *Clostridiales*. Martins *et al.* (2011), reamplificando e sequenciado bandas de TGGE em tratamento biológico de DAM, também encontraram bactérias afiliadas ao gênero *Clostridium* em uma banda. Church *et al.* (2007) e Kaksonen *et al.* (2006) também relataram a presença do gênero *Clostridium* em reatores sulfetogênicos tratando DAM na presença de metais e sulfetos. Desta forma, de maneira análoga, pode-se inferir que neste presente

trabalho tenha ocorrido a presença deste grupo microbiano nas condições operacionais do reator ASBR tratando DAM sintética.

Com mesmo índice de cobertura, conquanto com 79% de similaridade, esta banda BAC5 também foi relatada ao clone não cultivado de *Geobacter* sp. MFUaja3-29. Este, possivelmente desempenhando a redução de sulfato no reator ASBR nas condições estudadas. Vale salientar que esta banda surgiu em pH 5,0 e se manteve em todos os tratamentos estudados aqui. Yates *et al.* (2012), obtiveram em seus estudos de comunidades microbianas envolvidas na geração de combustível via biológica a sequência completa do genoma de *Geobacter* sp. Este estudo utilizou reatores inoculados com lodo oriundo de plantas de tratamento de águas residuárias. Naquele estudo, para uma banda de DGGE excisada obtiveram o genoma de *Geobacter sulfurreducens*, uma proteobacteria redutora de sulfato, obrigatoriamente anaeróbia.

Segundo Lovley (2006), a maioria das espécies de *Geobacter* são também microrganismos redutores de Fe^{3+} que metabolizam produtos de fermentação e os compostos orgânicos que microrganismos fermentativos não metabolizam prontamente, oxidando-os a dióxido de carbono, com óxidos de Fe^{3+} servindo como receptores de elétrons. Possivelmente, a adição de Fe^{2+} deste estudo tenha favorecido sua permanência nas várias fases estudadas, inclusive diminuindo o tempo de operação do reator após inserção deste elemento nos tratamentos subsequentes.

A banda BAC 8 não apresentou nenhuma similaridade com microrganismos ou clones depositados no GenBank. Vale salientar que não houve um bom resultado para a análise do sequenciamento, indicando que poderia ter ocorrido a duplicação de DNA.

A banda BAC10 apresentou similaridade de 79% com *Staphylococcus* sp., mas com uma cobertura muito pequena de 39%, não sendo portanto este dado confiável para uma discussão, apesar de que *Staphylococcus* sp podem ser anaeróbios facultativos crescendo por meio da fermentação, contudo não fora observado em nenhuma das referências consultadas para este trabalho.

Dadas à baixa qualidade do sequenciamento obtido para as bandas e também as baixas similaridades não foi possível criar a árvore filogenética utilizando o método de Neighbor-Joining através do programa Mega 6.06 para este Domínio, conforme estabelecido pela metodologia.

5.3.2 Sequenciamento e identificação para o Domínio *Archaea*

Das 10 bandas presentes no gel, conforme Figura 13, 04 bandas presentes no último tratamento, chamado de Amostra 5 (pH 4,0 + Fe, Cu, Zn) foram recortadas (ARC1, ARC2, ARC3 e ARC4). Uma banda (ARC5), do tratamento relacionado à Amostra 2, também foi excisada para sequenciamento.

Observa-se pela Figura 18 (A) que a amplificação das bandas recortadas, diferente do que ocorreu para o Domínio *Bacteria*, apresentaram-se bem limpas, sem rastros na eletroforese. Contudo em (B) observa que as bandas recortadas apresentaram, também no gel da DGGE, mais de uma banda por caneleta, não provendo a pureza necessária em nenhuma das bandas.

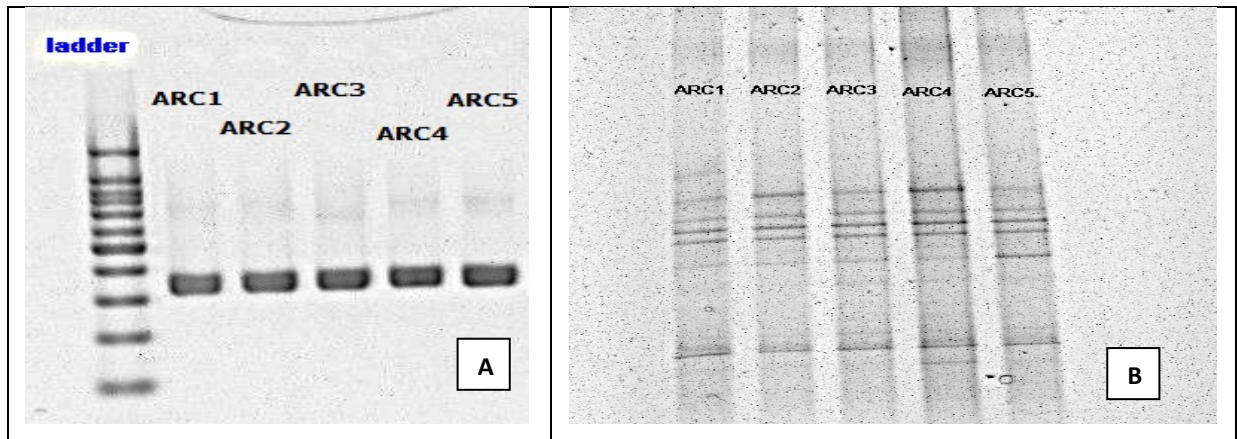


Figura 18 – (A) Produtos de PCR das bandas recortadas amplificados com par de *primers* 1100F+GC/1400R corados com brometo de etídio. (B) Comparação do perfil de bandas de DGGE com gradiente desnaturante de 50-65%, corado com SybrGold contendo fragmentos de DNA ribossomal 16S amplificados com iniciadores 1100F+CG/1400R das bandas recortadas.

Fonte: Do autor.

Uma vez que não houve tempo hábil para isolar as bandas por clonagem/sequenciamento, novos produtos de PCR foram gerados a partir do uso do par de *primers* 1100F/1400R sem a cauda GC para análise de sequenciamento. Após a amplificação os novos produtos foram submetidos à purificação de DNA para remoção de reagentes residuais (enzima, nucleotídeos, tampão, etc.) através do kit *Gel Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* conforme descrito na metodologia. Essas bandas foram preparadas para serem sequenciadas com o *primer* 1100F (Figura 19).

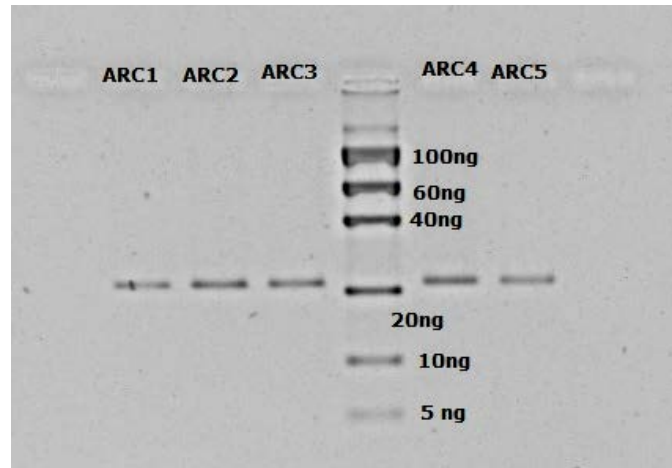


Figura 19 – Quantificação do produtos de PCR com *primer* 1100F/1400R para sequenciamento Domínio *Archaea*.

Fonte: Do autor.

A partir da imagem (Figura 19) foi possível estimar a quantidade de DNA para cada amostra, onde as bandas foram estimadas contendo 20 ng/2uL de DNA. Essas bandas foram preparadas para serem sequenciadas com o *primer* 1100R.

As bandas purificadas foram encaminhadas ao Setor de Sequenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano (USP). Depois de sequenciadas, as sequências brutas obtidas foram avaliadas quanto à qualidade do sequenciamento segundo Togawa; Brigido (2003) conforme descrito na metodologia. Estas apresentaram boa qualidade (valor Phred acima de 30) e foram todas selecionadas para comparação com a base de dados do GenBank utilizando o programa BLAST para identificar as sequências mais similares. A tabela 10 abaixo apresenta as similaridades encontradas para cada banda do Domínio *Archaea*.

Tabela 10 – Classificação das bandas sequenciadas do DGGE para o Domínio *Archaea*, mediante análise comparativa entre o BLAST e a base de sequencias do NCBI.

Bandas	Microrganismo	Nº de acesso	Similaridade (%)	Cobertura (%)	Referência
ARC1, ARC3 e ARC5	<i>Methanomicrobiales</i> archaeon clone F5OHPNU07IK8FO não cultivado	HQ063663.1	96	100	Ramos-Padrón <i>et al.</i> (2011)
ARC2eARC4	<i>Methanosaeta</i> sp. clone D_E05 não cultivado	AY454756.1	96 e 97 respectivamente	100	Não publicado

Fonte: Do autor.

A árvore filogenética construída (Figura 20) mostrou como os indivíduos sequenciados se posicionaram considerando seus parentes filogenéticos, as arqueias pertencentes à ordem *Methanomicrobiales* e *Methanosarcinales* (esta última, gênero *Methanosaeta* sp). As sequências mostraram um percentual de 96% de similaridade com as sequências de pares de bases contidas no GenBank.

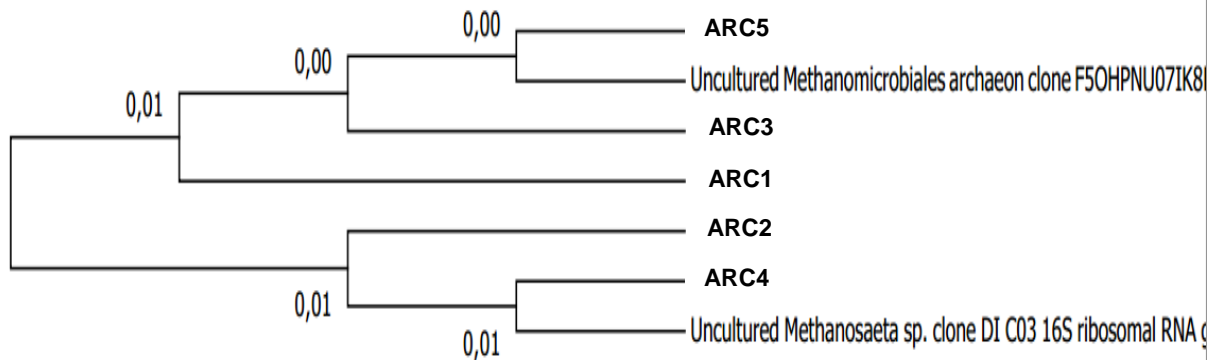


Figura 20 – Árvore filogenética contendo sequências do gene DNAr 16S (~ 300pb) construída pelo método *Neighbor-Joining* e o modelo *Maximum Composite Likelihood* no programa *Mega 6.06*.

Fonte: Do autor.

Assim ARC1, ARC3 e ARC5 mostraram similaridade de 96% com as arqueias do gênero *Methanomicrobiales*. Ramos-Padrón *et al.* (2011), através de pirosequenciamento encontraram em tratamento de bacia de rejeito da indústria do petróleo um grupo de metanogênicas, incluindo representantes da ordem *Methanomicrobiales* junto com o grupo das BRS, segundo os autores, desempenhando o papel de metanogênicas no processo. Estes autores estudavam o ciclo do carbono e do enxofre, realizados pela microbiota nesta bacia de rejeito.

Espécies da ordem *Methanomicrobiales* possuem como substrato preferencial o hidrogênio e o dióxido de carbono para a metanogênese, contudo a maioria das espécies também podem utilizar alguns alcoóis (GARCIA *et al.* 2006). Considerando que o reator deste estudo foi alimentado com etanol e considerando o apresentado pelos autores acima, acredita-se que estas espécies tenham-se mantido em função da presença do etanol fornecido como substrato.

Já ARC2 e ARC4 apresentaram 96% e 97% respectivamente, de similaridades com o clone não cultivado *Methanosaeta* sp. Segundo Silva (2011), membros de *Methanosaeta* são muito detectados por meio de PCR-DGGE com lodo granular obtido de reatores UASB

tratando diversos tipos de efluente. Rodriguez (2010) estudando a comunidade microbiana em no tratamento da DAM em reatores anaeróbios (RAHFL), com o mesmo inóculo aqui estudado, também encontraram clones pertencentes à ordem *Methanomicrobiales* e ao gênero *Methanosaeta*.

Os representantes da ordem *Methanossarcinales* podem catalisar a oxidação final da matéria orgânica em ambientes anóxicos quando luz e receptores de elétrons diferentes de dióxido de carbono forem limitantes. Possuem uma grande variedade de substratos e podem crescer reduzindo dióxido de carbono na presença de hidrogênio, pela dimetilação de compostos com o grupo metil ou utilizando o acetato. Todos os membros do gênero *Methanosaeta* podem crescer em acetato e são encontrados normalmente em digestores anaeróbios e sedimentos (KENDALL; BOONE, 2006).

Apesar do ASBR deste estudo ser um reator operado em condições sulfetogênicas (baixo pH – pH4,0) e concomitante adição de metais este grupo de arqueias aqui encontrados pertencentes ao filo *Euryarcheota* se mantiveram no reator, por conta da possível presença de hidrogênio e acetato provindo de algum processo fermentativo no meio, que possa ter ocorrido concomitantemente com a sulfetogênese.

6. CONCLUSÕES

Por meio das técnicas de biologia molecular PCR-DGGE aplicadas ao estudo da comunidade microbiana do ASBR pode-se constatar que:

- a comunidade microbiana representada pelas bandas do Domínio *Bacteria* presentes nos tratamentos foram distintas, com similaridade de 62% entre si, podendo-se inferir que o pH e a adição de metais Fe^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} , podem ter proporcionado a seleção das populações;
- para o Domínio *Archaea* verificou-se maior similaridade na estrutura microbiana durante as fases estudadas, criando dois grandes grupos muito similares entre si (95%), contudo com diversidade menor do que para as bactérias entre as fases estudadas;
- que a adição dos metais Fe^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} proporcionou maior redução no número de bandas do que a redução do pH para este estudo;
- as *Archaeas* foram mais resistentes às condições operacionais impostas; e,
- pelo sequenciamento das bandas recortadas dos géis de DGGE e análises filogenéticas não foi possível obter as espécies microbianas presentes na última fase operacional.

7 RECOMENDAÇÕES

Diante das dificuldades encontradas para o sequenciamento das bandas excisadas diretamente do gel de DGGE, recomenda-se realizar a clonagem e sequenciamento, contudo, somente para o caso de se estudar uma ou outra banda muito específica que tenha surgido em géis de DGGE.

Para identificação do grupo microbiano presente em uma amostra (ambiente complexo), recomenda-se o uso de outras técnicas moleculares, como o pirosequenciamento, onde não é necessária a eletroforese em gel e nem a clonagem do fragmento a ser sequenciado.

8 REFERÊNCIAS

- AKCIL, A.; KOLDAS, S. Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies. **Journal of Cleaner Production**, v.14, n. 12–13, p. 1139-1145, 2006.
- ALVES, L. B.; BELDERRAIN, M. C. N.; SCARPEL, R. A. Tratamento multivariado de dados por análise de correspondência e análise de agrupamentos. **Anais**. 13º Encontro de Iniciação Científica e Pós-Graduação do Instituto Tecnológico da Aeronáutica – XIII ENCITA. 2007. Disponível em: < <http://www.bibl.ita.br/xiiiencita/MEC17.pdf>>. Acesso em 23 jan. 2014.
- AMANN, R. I.; FUCHS, B. R.; BEHRENS, S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. **Current Opinion on Biotechnology**. v.12, n.3, p.321-326, 2001.
- AMANN, R. I.; LUDWING, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification an in situ detection of individual cells without cultivation. **Microbial Reviews**, v. 59, n.1, p.143-169,1995.
- AMARAL-ZETTLER, L. A., GÓMEZ, F., ZETTLER, E., KEENAN, B. G., AMILS, R.; SOGIN, M. L. Eucaryotic diversity in Spains River of Fire. **Nature**, v. 417, n. 6885, p. 137, 2002. Disponível em: < <http://connection.ebscohost.com/c/articles/6946692/eukaryotic-diversity-spains-river-fire>>. Acesso em 23 maio 2014.
- BATISTA, L. A. **Análise das comunidades microbianas presentes em depósito minerais sulfetados com ocorrência de drenagem ácida de minas em sistema de biolixiviação**. 2008. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto – MG. 2008.
- BLOOM, M. V. **Polymerase Chain Reaction**. DNA Learning Center, Cold Spring Harbor Laboratory, Carolina Biological Supply Company. New York. 2014. Disponível em: <http://www.accessexcellence.org/RC/CT/polymerase_chain_reaction.php>. Acesso em: 14 de jan. de 2014.
- BOON, N.; MARLÉ, C.; TOP, E. M.; VERSTRAETE, W. Comparison of the spatial homogeneity of physico-chemical parameters and bacterial 16S rRNA genes in sediment samples from a dumping site for dredging sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 53, p. 742-747, 2000.
- BRUCHA, G. **Influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo na degradação anaeróbia do pentaclorofenol e na diversidade microbiana dos sedimentos enriquecidos do Estuário de Santos – São Vicente, Estado de São Paulo**. 2007. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- CARRAPA, A; ZÃO, A.; COLEHO, J.; SANTOS, J. PEDROSA, S.. **Técnicas de Análise de DNA Aplicadas a Diagnóstico**. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Porto, 2005. Disponível em: <<http://medicina.med.up.pt/bcm/trabalhos/2005/tecnicasdeanalisede%20dna.doc>>. Acesso em: 21 de março. 2013.

CARDOSO, A. M.; CLEMENTINO, M. B. M.; MARTINS, O. B.; VIEIRA, R. P.; ALMEIDA, R. V.; ALQUERES, S. M. C.; ALMEIDA, W. I. Archaea: potencial biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.30, p. 70-77, 2003.

CASAMAYOR, E. O.; SHÄFER, H.; BAÑERAS, L.; PEDRÓS-ALIÓ, C; MUYZER, G. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 499-508, 2000.

CHURCH, D. C.; WILKIN, R. T.; ALPERS, C. N.; RYE, O. R.; McCLESKEY, R. B. Microbial sulphate reduction and metal attenuation in pH 4 acid mine water. **Geochemical Transactions**. v.8, n.10, p. 1-14, 2007

CORTEZ, M.T.S.C. Abordagem Molecular na Resolução de Problemas com Biocorrosão. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia, Universidade de Aveiros, Portugal, 129 p. 2009.

DEMERGASSO, C. S.; GALLEGUILLOS P, P. A.; ESCUDERO G, L. V.; ZEPEDA A,V. J.; CASTILLO, D.; CASAMAYOR, E. O. Molecular characterization of microbial populations in a low-grade copper ore bioleaching test heap. **Hydrometallurgy**, v.80, 4, p. 241- 253, 2005.

DÍAZ, B.; PEDRÓS-ALIÓ, C; MARCH, T. L.; MASSANA, R. Application of denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukariotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.2942-2951, 2001.

EWING, B.; HILLIER, L.D.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-Calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**. v.8, p. 175-185, 1998.

FARFÁN, J. R. J. Z.; BARBOSA FILHO, O.; SOUZA, V. P. **Avaliação do Potencial de drenagem ácida de rejeitos da indústria mineral**. Série Tecnologia Mineral. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2004.

FERNANDEZ-REMOLAR, D. C.; MORRIS, R. GRUENER, J. E.; AMILS, R.; KNOLL, A. H. The Rio Tinto Basin, Spain, mineralogy, sedimentary geobiology and implications for interpretation of outcrop rocks at Meridiani Planum Mars. **Earth and Planetary Science Letters** v. 240, n.1, p.149-167, 2005.

FISCHER, S. G.; LERMAN, L. S. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradients gels: correspondencing with melting theory. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v. 80, n. 6, p. 1579-1583, 1983

FRANCO, B. **Precipitação de metais provenientes de drenagem ácida de minas por sulfeto gerado por via biológica**. 2014. 91 f. Dissertação. (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) – Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas-MG, Poços de Caldas, 2014. (Não publicado).

GARCIA, J. L.; OLLIVIER, B. WHITMAN, W. B. **The prokaryotes: a handbook on the biology of Bacteria.** v.3, p. 208-230, 2006.

GARRITY, G; BOONE, D.; CASTENHOLZ, R. **Berguey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume one. The Archaea and Deeply Branching and Phototrophic Bacteria,** 2001, 721 p.

GHOSH, S.; MOITRA, M.; WOOLVERTON, C. J.; LEFF, L. G. Effects of remediation on the bacterial community of an acid mine drainage impacted stream. **Canadian Journal of Microbiology.** v.58, p. 1316-1326, 2012.

GONZÁLEZ TORIL, E., LLOBET BROSSA, E., CASAMAYOR, E. O., AMAN, R.; AMILS, R. Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 69, n. 8, p. 4853-4865, 2003.

HALBERG, K. B. New perspectives in acid mine drainage microbiology. **Hidrometallurgy.** v.104, p. 448-453, 2010.

HAM, J. S.; KIM, C. G. Microbiological monitoring of acid mine drainage treatment systems and aquatic surroundings using real-time PCR. **Water Science Technology,** v. 59, n.11, p. 2083-2091, 2009.

HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology,** v. 35, p. 1-21, 1998.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation. **Appl. Environ. Microbiol.** v.63, p.3233-3241, 1997.

HIIBEL, S.R.; PEREYRA, L. P.; BREAZEAL, M.V.R.; REISMAN, D.J.; REARDON, K.F.; PRUDEN, A. Effect of organic substrate on the microbial community structure in pilot-scale sulfate-reducing biochemical reactors treating mine drainage. **Environmental Engineering Science.** v.28, n.8, p. 563-572, 2011.

HIRASAWA, J. S. **Avaliação da metanogênese e sulfetogênese na presença de oxigênio , sob diferentes relações etanol/sulfato, utilizando técnicas de biologia molecular.** Tese. 2007. 133p. (Doutorado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de Sao Carlos. USP. 2007

JACKSON, C. R.; RODEN, E. E.; CHURCHILL, P. F. Denaturing gradient gel electrophoresis can fail to separate 16S rDNA fragments with multiple base differences. **Molecular Biology Today.** v. 1, p. 49-51, 2000.

JOHNSON, D. B. Selective solid media for isolation and enumerating acidophilic bacteria. **Journal of Microbiological Methods,** 23, 205-218, 1995.

KAKSONEN, A.H.; PUHAKKA, J.A. Sulfate reduction based process for the treatment of acid mine drainage and the recovery of metals. **Engineering in Life Science,** v. 7, n. 6, p. 541-564, 2007.

KAKSONEN, A. H.; PLUMB, J. J.; ROBERTSON, W. J.; RIEKKOLA-VANHANEN, M.; FRANZMANN, P. D.; PUHAKKA, J. A. The performance, kinetics and microbiology of sulfidogenic fluidized-bed treatment of acidic metal- and sulfate-containing wastewater. **Hydrometallurgy**. v.83, p. 204-213, 2006.

KENDALL, M. M.; BOONE, D. R. **The prokaryotes: A handbook on the biology of Bacteria** v.3, p. 244-256, 2006.

KINNUNEN, P. H-M.; PUHAKKA, J.A. High-rate ferric sulfate generation by a *Leptospirillum ferriphilum*-dominated biofilm and the role of jarosite in biomass retainment in a fluidized-bed reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.85, n. 7. p. 697–705, 2004.

KOLMERT, A.; JOHNSON, D. B. Remediation of acidic waste water using immobilized, acidophilic sulfate-reducing bacteria. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. v.76, p. 836-843, 2001.

KUDO, Y.; NAKAJIMA, T.; MIYAKI, T.; OYAIZU, H. Methanogen flora of paddy soils in Japan. **FEMS Microbiol. Ecology**, v. 22, p. 39-48, 1997.

LINDSAY, M.B.; WAKEMAN, K.D.; ROWE, O.F.; GRAIL, B.M.; PTACEK, C.J.; BLOWES, D.W.; JOHNSON, D.B. Microbiology and geochemistry of mine tailings amended with organic carbon for passive treatment of pore water. **Geomicrobiology Journal**. v. 28, p. 229-241, 2011.

LOVLEY, D. R. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. **Nature Reviews Microbiology**. v.4, n.7, p.497-508, 2006.

LU, J.; CHEN, T. WU, J.; WILSON, P. C.; HAO, X.; QIAN, J. Acid tolerance of an acid mine drainage bioremediation system based on biological sulphate reduction. **Bioresource Technology**. v.102, p. 10401-10406, 2011.

MAREE, J.P.; STRYDOM, W.F. Biological sulphate removal in an upflow packed bed reactor. **Water Research**, v. 19, p. 1101-1106, 1985.

MARTINS, M.; SANTOS, E. S.; FALEIRO, M. L.; CHAVES, S.; TERNEIRO, R.; BARROS, R. J.; BARREIROS, A.; COSTA, M. C. Performance and bacterial community shifts during bioremediation of acid mine drainage from two Portuguese mines. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v.65, p. 972-981, 2011.

MESTRINELLI, F. **Isolamento e caracterização de microrganismo envolvido na desnitrificação autotrófica pela oxidação de sulfeto em reator vertical de leito fixo**. 2010. 98p. Dissertação. (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

MME – Ministério das Minas e Energia. **Plano Nacional de Mineração 2030**. 2011. Disponível em: < http://www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/noticias/2011/PNM_2030.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2012.

MOHAPATRA, B. R.; GOULD, W.D; DINARDO, O.; KOREN, D. W. Tracking the prokaryotic diversity in acid mine drainage-contaminated environments: a review of molecular methods. **Minerals Engineering**, v. 24, p. 709-718, 2011.

MYUZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current opinion on Microbiology**.v.2, n.3, p. 317-322, 1999.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. **Applied an Environmental Microbiology**, v. 59, p. 695-700, 1993.

MUYZER, G.; HOTTENTRAGER, S.; TESKE, A.; WAWER, CATHRIN. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA – A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. **Molecular Microbial Ecology Manual**, v. 3.44, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1996.

NECULITA, C.M.; ZAGURY, G. Biological treatment of highly contaminated acid mine drainage in batch reactors: Long-term and reactive mixture characterization. **Journal of Hazardous Materials**, v. 157, p. 358-366, 2008.

NORDWICK, S.; ZALUSKI, M.; BLESS, D.; TRUDNOWSKI, J. Development of SRB treatment systems for acid mine drainage. In: Proceedings of Hydrometallurgy 2003 – Fifth International Conference in Honor of Professor Ian Ritchie – v.2: **Electrometallurgy and Environmental Hydrometallurgy**, Edited by Young, A.M. *et al.* Vancouver, Canadá. 2003.

NUBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKA, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n.19, p. 5636-5643, 1996.

PACE, N. R.; STAHL, D. A.; LANE, D. J.; OLSEN, G. J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology**, v.9, p.1-55, 1986.

PEREYRA, L. O. P.; HIIBEL, E. M.; REARDON, K. F.; PRUDEN, A. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 82, n.1, p. 135-147, 2012.

PROSDOCIMI, R. **Racionalizando a utilização do algoritmo PHRED para a análise de seqüências de DNA**. Tese. 2006. p. 121. (Programa de pós-graduação em bioinformática). Instituto de Ciências Biológicas . Universidade Federal de Minas Gerais. 2006.

PRUDEN, A.; MESSNER, N.; PEREYRA, L.; HANSON, R.; HIIBEL, S.; REARDON, K. The effect of inoculums on the performance of sulfate-reducing columns treating heavy metal contaminated water, **Water Research**. v.41, p. 904-914, 2007.

RAMOS-PÁDRON; E.; BORDENAVE, S.; LIN, S.; BHASKAR, I. M.; DONG, X.; SENSEN, C. W.; FOURNIER, J.; VOORDOUW, G.; GIEG, L. M. Carbon and sulphur cycling by microbial communities in a gypsum treated oil sands tailings pond. **Environmental Science and Technology**. v.45, p. 439-446, 2011.

RODRIGUEZ, R. P. **Aplicação de reatores anaeróbios para remoção de sulfato de águas de drenagem ácida de minas**. 2010, 298 p. Tese. Programa de Engenharia Hidráulica e Saneamento da EESC– USP. São Carlos-SP. 2010.

RODRIGUEZ, R. P.; OLIVEIRA, G. H. D.; RAIMUNDI, I. M.; ZAIAT, M. Assessment of a UASB reactor for the removal of sulfate from acid mine water. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 74, p. 48-53, 2012.

RONDON, M. R.; AUGUST, P. R.; BETTERMANN, A. D.; BRADY, S. F.; GROSSMAN, T. H.; LILES, M. R.; LOIACONO, K. A.; LYNCH, B. K.; MACNEIL, I. A.; MINOR, C.; TIONG, C. L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M. S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R. J. Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.6, p. 2541-2547, 2000.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SAITOU N; NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**. v.4, n.4, p. 406-425. 1987.

SILVA, D. C. **Estudo da diversidade microbiana em reator UASB aplicado à degradação de azocorantes**. 2011. 104 p. Dissertação. (Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental) Universidade Federal de Ouro Preto-MG. 2011.

SANCHEZ-ANDREA, I.; SANZ, J. L.; BIJMANS, M. F. M.; STAMS, A. M. J. Sulphate reduction at low pH to remediate acid mine drainage. **Journal of Hazardous Materials**. v.269, p. 98-109, 2014.

SEKIGUCHI, H.; TOMIOKA, N; NAKAHARA, T.; UCHIYAMA, H. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. **Biotechnology letters**. v.23, p.1205-1208, 2001.

SOMLEV, V.; BANOV, M. Three stage process for complex biotechnological treatment of industrial wastewater from uranium mining. **Biotechnology Techniques**, v. 12, p. 637-639. 1998.

TAKETANI, N. F. **Influência do níquel na biorremediação de solo tropical multicontaminado com hidrocarbonetos de petróleo e na estrutura da comunidade microbiana**. 2010. 77p. Dissertação. (mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. Rio de Janeiro. 2010.

TUOVINEN, H. O.; NICOMRATA, D.; DICKB, W. A.; Microbial populations identified by fluorescence in situ hybridization in a constructed wetland treating acid coal mine drainage. **Journal of Environmental Quality**, v.35, p. 1329-1337, 2006.

TOGAWA, R. C.; BRIGIDO, M. M. PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. **First International Conference on Bioinformatics and Computational Biology-IcoBiCoBi**. 14th to 16th May 2003. Ribeirão Preto. Disponível em: <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/php/reference.html>>. Acesso em 23 ago 2014.

XIE, Jianping; HE Zhili; LIU, Xinxing; LIU Xueduan, VAN NOSTRAND, Joy D; DENG, Ye; WU, Liyou; ZHOU, Jizhong; QIU, Guanzhou. GeoChip-Based Analysis of the Functional Gene Diversity and Metabolic Potential of Microbial Communities in Acid Mine Drainage. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 77, n.3, p. 991-999, 2011.

YATES, M. D.; KIELY, P. D.; CALL, DOUGLAS, F.; RISMANI-YAZDI, H.; BIBBY, K.; PECCIA, J.; REGAN, J. R.; LOGAN, B. Convergent development of anodic bacterial communities in microbial fuel cells. **ISME Journal**. v.6, n.11, p.2002-2013, 2012.

Anexo 1 - Protocolo de Extração – Kit Promega Wizard DNA Clean Up

1. Adicionar 1 mL de cultura *overnight* para um tubo de microcentrifuga *ependorf* de 1,5 μ L.
2. Centrifugue a 13.000-16.000 \times g por 2 minutos para separar as células. Remover o supernadante.
3. Adicionar 600 μ L de *Nuclei Lysis Solution*, pipetando gentilmente até que as células sejam resuspendidas.
4. Incubar a 80°C por 5 minutos para lisar as células, resfriar em temperatura ambiente.
5. Adicionar 3 μ L de RNase solution para o lisado. Inverter o tubo 2-5 vezes para misturar.
6. Incubar a 37°C por 15-60 minutos. Resfrie a amostra em temperatura ambiente.
7. Adicione 200 μ L de *Protein Precipitation Solution* para o tubo contendo o lisado. Coloque no vórtex a alta velocidade por 20 segundos para misturar a solução de *Protein Precipitation Solution* com o lisado.
8. Incubar em gelo por 5 minutos
9. Centrifugar a 13.000-16.000 \times g por 3 minutos
10. Transferir o supernadante contendo o DNA para um tubo *ependorf* limpo contendo 600 μ L de isopropanol.
11. Misturar gentilmente por inversão até que se forme uma massa visível de filamentos filiformes de DNA.
12. Centrifugar a 13.000-16.000 \times g por 2 minutos.
13. Cuidadosamente descartar o supernadante e drene o tubo em papel absorvente. Adicionar 600 μ L de etanol 70% e gentilmente inverter o tubo várias vezes para lavar o DNA.
14. Centrifugar 13.000-16.000 \times g por 2 minutos. Cuidadosamente aspirar o etanol.
15. Drenar o tubo em papel absorvente limpo e permitir que seque ao ar por 10-15 minutos.
19. Adicionar 100 μ L de *DNA Rehydration Solution* e reidratar o DNA incubando a 65°C por uma hora. Periodicamente misture a solução por leves toques no tubo. De forma alternativa, reidratar o DNA pela incubação da solução *overnight* a temperatura ambiente ou a 4°C.

Anexo 2 – Protocolo de Purificação - *Kit Wizard Clean Up System* sem Coletor de Vácuo

1. Usar uma *Wizard Minicolumn* para cada amostra.
2. Adicionar 1 mL de *Wizard DNA Clean-Up Resin* em um tubo de microcentrífuga *ependorf* e 1,5mL. Adicionar a amostra (50-500 μ L) e agitar gentilmente invertendo o tubo várias vezes.
3. Pipetar a resina contendo o DNA no tambor da seringa sem o êmbolo. Inserir o êmbolo vagarosamente e gentilmente empurrar o volume total para a *Wizard Minicolumn*.
4. Desatarrachar a seringa da *Wizard Minicolumn* e remover o êmbolo da seringa. Reatarrachar o tambor da seringa na *Wizard Minicolumn*. Para lavar a coluna, pipetar 2 mL de isopropanol 80% na seringa. Inserir o êmbolo na seringa e gentilmente empurrar a solução para a *Wizard Minicolun*.
5. Remover a seringa e transferir a *Wizard Minicolumn* para um tubo de microcentrífuga *ependorf*. Centrifugue o aparato montado à velocidade máxima (10.000 \times g) por 2 minutos para secar a resina.
6. Transferir a *Wizard Minicolun* para um novo tubo *ependorf* de 1,5mL. Aplicar μ L de água ou tampão TE (10mM HCl [pH 7.6], 1mM EDTA) pré-aquecido (65-75°C) para a *Wizard Minicolun* e aguardar 1 minuto. (O DNA permanecerá intacto na *Wizard Minicolumn* por até 30 minutos). Centrifugue por 20 segundos a velocidade máxima (10.000 \times g) para eluir o fragmento de DNA.
7. Remover e descartar a *Wizard Minicolumn*. O DNA purificado deverá ser armazenado a 4°C ou -20°C.

**Anexo 3 – Procedimento para preparo do gel de poliacrilamida – Manual DRM
– CPQBA/UNICAMP**

1. Montar as placas de vidros juntamente com o espaçador e o pente. Apertar os parafusos do cassete.
2. Conectar a mangueira da bomba peristáltica (ponta com agulha) ao sistema de placas de vidro.
3. Preparar 2 mL de cada solução gradiente de acordo com a tabela de misturas das soluções A e B para formação do gradiente.
4. Adicionar 150 μ L APS 10% em cada 25 mL das soluções.
5. Adicionar 12 μ L TEMED em cada 25 mL das soluções. Agite e seja rápido nos próximos passos
6. Carregar o misturador com as respectivas soluções (A e B). Colocar o misturador sobre o agitador magnético com imã no tubo A. Abrir o misturador e ligar a bomba peristáltica para permitir a mistura das soluções.
7. Depois de passar toda solução apertar o pente e esperar solidificar por 60 minutos.
8. Carregar a cuba com 16 L de TAE 0,5X. Ligar o aparelho para aquecimento a 60°C.
9. Colocar o cassete no aparato com o tampão já aquecido. Empurrar o espaçador do gel para baixo. Retirar as bolhas de ar que se formarem na parte inferior do cassete
10. Conectar a mangueira de fluxo do tampão no cassete
11. Conectar os plugs elétricos.
12. Abrir a mangueirinha para lavar os pocinhos do gel e preenchê-los com tampão.
13. Antes de carregar as amostras, desligar o fluxo de tampão.
14. Carregar as amostras.
15. Ligar a fonte e programar a voltagem e o tempo. Deixar a corrida seguir por 5 minutos.
16. Ligar a mangueira do fluxo de tampão. Checar a amperagem
17. Finalizada a corrida, desligar a cuba e a fonte. Retirar o cassete da cuba. Soltar os parafusos e retirar as placas do cassete.
18. Remover o gel, corar.

Anexo 4 – Protocolo de purificação - Wizard SV Gel and PCR Clean UP System Purificação utilizando centrifugação

Processando produtos de PCR

1. Adicionar igual volume de *Membrane Binding Solution* para o produto de PCR.

Ligação do DNA

1. Insira a minicoluna no *Collection Tube*
2. Transfira a mistura de DNA e *Membrane Binding* para a minicoluna. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto
3. Centrifugar a 16.000×g por 1 minuto. Descarte o volume do *Collection Tube*, insira a minicoluna no *Collection Tube* novamente.

Lavagem

4. Adicionar 700 µL de *Membrane Wash Solution* (já preparado com etanol). Centrifugue por 16.000×g por 1 minuto. Descarte o volume e reinsira a minicoluna no *Collection tube*
5. Repita o passo 4 com 500 µL de *Membrane Wash Solution*. Centrifugue a 16.000×g por 5 minutos.
6. Esvazie o *Collection Tube* e centrifugue novamente o aparato por 1 minuto com a tampa da centrífuga aberta para permitir evaporação de qualquer etanol residual.

Eluição

7. Cuidadosamente transfira a minicoluna para um ependorf de 1,5 µL.
8. Adicione 50 µL de *Nuclease-Free Water* para a minicoluna. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugue a 16.000×g por 1 minuto.
9. Descarte a minicoluna e armazene o DNA a 4°C ou -20°C.]