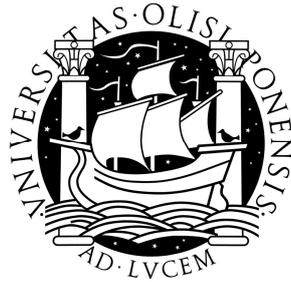


UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Caracterização molecular de populações microbianas em
reactores anaeróbios**

André Manuel Sardinha Grilo

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Lisboa

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Caracterização molecular de populações microbianas em
reactores anaeróbios**

André Manuel Sardinha Grilo

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada por:
Prof. Dr. Jorge Humberto Leitão
Prof.^a Dr.^a Manuela Lemos Carolino

Lisboa

2009

Resumo

A necessidade do reaproveitamento de águas residuais tem vindo a aumentar. Os processos anaeróbios de tratamento de águas residuais apresentam-se actualmente como a melhor solução custo-eficácia para a purificação de poluentes orgânicos provenientes dos desperdícios industriais e domésticos. Um melhor conhecimento sobre as populações microbianas responsáveis pelos processos metabólicos que ocorrem nos reactores anaeróbios é essencial para um melhor controlo e optimização do funcionamento do reactor. Nas últimas décadas, os métodos de biologia molecular para caracterização dos genes que codificam o rRNA 16S, têm sido aplicados com sucesso na caracterização das populações microbianas presentes em reactores anaeróbios, uma vez que essa metodologia não depende do cultivo para identificação dos microrganismos.

Com o presente trabalho, pretendeu-se contribuir para a caracterização das comunidades microbianas presentes em dois reactores anaeróbios a operar de modo diferente, um a operar de modo contínuo e o outro a operar de modo intermitente. Para a caracterização da população microbiana foi utilizada uma estratégia combinando os métodos de extracção de DNA, amplificação por PCR com primers específicos para as sequências que codificam os genes do rRNA 16S, clonagem e sequenciação de clones previamente analisados quanto ao seu polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP). A análise dos RFLPs permitiu a minimização do número de clones sequenciados, o que é especialmente relevante quando se analisa um grande número de clones.

Utilizando esta metodologia, em conjunto com os primers desenhados especificamente para os principais grupos metabólicos de microrganismos presentes nos reactores anaeróbios, foram obtidos um total de 323 clones. A caracterização dos RFLPs destes clones permitiu a identificação de 21 perfis diferentes para o reactor a operar em modo intermitente e 29 perfis diferentes no reactor a operar em modo contínuo, ilustrando a vantagem desta metodologia.

Palavras-chave:

Reactores anaeróbios • Caracterização molecular de populações microbianas • Análise de genes codificantes para rRNA 16S • Análise de clones por RFLP • Desenho de Primers

Abstract

The need to treat and reuse wastewaters is an increasing problem. The anaerobic process for wastewaters treatment is the most cost-effective solution for the treatment of industrial and domestic wastewaters. A better knowledge of the microbial populations responsible for the metabolic processes that occur inside anaerobic reactor is essential for a better control and performance optimization of anaerobic reactors. During the last decades, molecular biology methods for the characterization of 16S rRNA encoding genes have become increasingly popular for the characterization microbial populations inside of the anaerobic wastewater treatment reactors, since they are culture-independent.

The aim of this work was to contribute for the knowledge of the microbial populations present in two anaerobic wastewater reactors operating either in a continuous mode or in an intermittent mode. For the characterization of the microbial populations, we planned a strategy combining DNA extraction, PCR amplification with primers specific for the 16S rRNA encoding genes, cloning, and sequencing of clones previously analyzed for their restriction fragment length polymorphism (RFLP). The RFLPs analysis allowed the minimization of the number of clones sent for sequencing, especially important when analyzing large numbers of clones.

With this methodology, and together with the specific primers designed for the most important metabolic groups of microorganisms found in reactors for anaerobic wastewaters treatment, a total of 323 clones were obtained. The RFLP's characterization allowed the identification of 21 distinct profiles for the reactor operating in intermittently, and 28 distinct profiles for the reactor operating continuously, illustrating the advantage of this methodology.

Keywords:

Anaerobic reactors • Molecular characterization of microbial populations • Analysis of 16S rRNA encoding genes • Analysis of RFLP clones • Primer design

Agradecimentos

Gostaria de agradecer às seguintes pessoas pela sua contribuição directa ou indirecta e ajuda na realização deste trabalho:

- Ao Dr. Christian Ramos Gomes, pelos seus conselhos e constante apoio no desenvolvimento deste projecto, bem como na revisão desta tese de Mestrado, e sem a ajuda da qual nada disto seria possível.
- Ao Professor Jorge Leitão por generosamente me ter recebido no seu grupo de trabalho, pelo apoio dado no desenvolvimento deste trabalho, e pela sua disponibilidade em no esclarecimento de dúvidas e rever esta tese de Mestrado.
- À Professora Manuela Lemos Carolino por toda a disponibilidade e por toda a ajuda prestada para a conclusão desta tese de Mestrado.
- À Professora Isabel Sá-Correia por me ter recebido no Grupo de Investigação de Ciências Biológicas, no Instituto Superior Técnico, onde realizei todo o trabalho experimental.
- Aos meus colegas, professores e funcionárias do Grupo de Investigação de Ciências Biológicas, que tornaram possível a realização deste trabalho.
- À minha família, mãe, pai e irmã, e aos meus amigos, por todo o apoio incondicional dado durante este último ano.
- Ao projecto “Optimização e Controlo de Reactores UASB em Funcionamento e a Dinâmica das Populações Microbianas” (PTDC/AMB/65025/2006), financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), pela bolsa que me foi atribuída.

Índice

Resumo	iii
Abstract.....	iv
Agradecimentos	v
1. Introdução.....	1
1.1 Águas residuais	1
1.2 Processo de tratamento anaeróbio	1
1.2.1 Reactores UASB (<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>)	2
1.2.2 Formação dos agregados de microrganismos.....	4
1.2.3 Processo de tratamento anaeróbio vs. aeróbio.....	5
1.3 Diversidade microbiana em reactores anaeróbios	6
1.3.1 Hidrólise da matéria orgânica	7
1.3.2 Acidogénese	7
1.3.3 Acetogénese	8
1.3.4 Metanogénese.....	8
1.4 Métodos moleculares para a caracterização de populações microbianas	9
1.4.1 Técnica de PCR – clonagem – sequenciação	10
1.4.2 Electroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE).....	11
1.4.3 RFLP (restriction fragment length polymorphism)	11
2. Materiais e Métodos	13
2.1 Condições de operacionalidade dos reactores UASB e recolha das amostras	13
2.2 Identificação dos grupos de microrganismos	14
2.3 Construção dos Primers.....	14
2.4 Extracção e Purificação de DNA	15
2.5 Amplificação dos genes rRNA 16S.....	16

2.6	Construção de uma biblioteca de clones	17
2.7	Análise dos Perfis de restrição	19
2.8	Análise das sequências dos genes de rRNA 16S.....	21
2.9	Análise filogenética dos segmentos de rRNA 16S.....	21
3.	Resultados.....	22
3.1	Desenho de primers específicos para os filos dos domínios <i>Archaea</i> e <i>Bacteria</i>	22
3.2	Amplificação dos genes codificantes para o rRNA 16S	23
3.3	Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP) dos clones obtidos	26
3.4	Árvores filogenéticas.....	28
4.	Discussão dos Resultados	34
4.1	Desenho de primers específicos para os filos dos domínios <i>Archaea</i> e <i>Bacteria</i>	34
4.2	Comunidades microbianas em reactores UASB	35
4.3	Reactor Intermitente vs. Contínuo.....	37
4.4	Perfis de Restrição de Clone em Gel de Poliacrilamida.....	38
	Referências	41

1. Introdução

1.1 Águas residuais

As águas residuais, desperdícios líquidos provenientes de actividades domésticas, comerciais, industriais e agrícolas, podem conter uma grande variedade de potenciais contaminantes, para além de possuírem, muitas vezes, uma grande carga de poluentes orgânicos. O lançamento indiscriminado de águas residuais para rios e afluentes tem representado cada vez mais um problema ambiental ao nível de destruição de habitats selvagens, culturas piscícolas e constituindo, acima de tudo, um problema de saúde pública como fonte de transmissão de doenças, principalmente em países em vias de desenvolvimento. As águas residuais representam uma enorme massa de água, no entanto, para que possa voltar a ser utilizada e rentabilizada, é necessário que os poluentes orgânicos e inorgânicos sejam eliminados. Para o tratamento dos poluentes orgânicos, foram desenvolvidas estações de tratamento biológico, que permitem simular e acelerar o processo de degradação que ocorre naturalmente na natureza. Este processo pode ser realizado por dois métodos principais; na presença de oxigénio (processo aeróbio), ou na ausência de oxigénio (processo anaeróbio) (Lettinga e Hulshoff Pol, 1991).

1.2 Processo de tratamento anaeróbio

O tratamento anaeróbio de águas residuais é considerado a melhor solução em termos de custo/benefício para o tratamento de poluentes orgânicos provenientes das indústrias, tendo vindo a ganhar bastante popularidade nas últimas décadas devido ao aumento dos preços da energia e fase à legislação rigorosa aplicada às indústrias quanto ao tratamento dos seus efluentes (Lettinga *et al.* 1999). O processo de tratamento anaeróbio é conhecido pela capacidade de tratar com uma alta eficácia águas residuais, tornando-as reutilizáveis (McCarty 2001).

O processo de tratamento anaeróbio de águas residuais é um processo biológico de tratamento dos afluentes sem a utilização de ar ou de oxigénio. As várias aplicações são dirigidas à remoção de poluentes orgânicos em águas residuais, lodos e lamas. Os poluentes orgânicos vão ser convertidos, por microrganismos anaeróbios, numa mistura gasosa composta por dióxido de carbono (25-45%) e metano (50-70%), conhecida como

“biogás” (Fig.1.1) (Price, 1985). O “biogás” é uma fonte versátil de energia renovável, que poderá vir a ser o substituto dos combustíveis fósseis na produção de calor e energia, bem como de combustível para veículos a gás.



Fig. 1.1 – Esquema representativo do princípio do processo do tratamento anaeróbico para poluentes orgânicos em águas residuais.

Este método de tratamento em vindo a ser cada vez mais importante na eliminação de poluentes orgânicos em água residuais, com o aparecimento de reactores de digestão anaeróbia, UASB.

1.2.1 Reactores UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket)

O reactor UASB é um reactor especialmente desenvolvido para o tratamento de águas residuais, através de um processo anaeróbico de alta eficiência e para elevadas cargas orgânicas (Franklin, 2001). O processo tecnológico UASB foi desenvolvido por Gatzke Lettinga e os seus colaboradores nos finais dos anos 70. Estes reactores foram primeiramente introduzidos na indústria alimentar e indústrias relacionadas, sendo posteriormente aplicada a digestão anaeróbia no tratamento de efluentes e na indústria do papel (Franklin, 2001).

O reactor UASB (Fig.1.2) opera bombeando o afluente (águas residuais a tratar) do fundo até ao topo do reactor. Durante a sua permanência no reactor, o afluente vai entrar em contacto com a biomassa residente (lamas) que vai remover as substâncias orgânicas e purificar a água. A biomassa é composta por, agregados de microrganismos anaeróbios, formando grânulos compactos (0,5 a 2 mm de diâmetro), que ficam retidos no interior do reactor por auto-imobilização (Field, 2002). A elevada velocidade de sedimentação destes grânulos previne a remoção dos microrganismos pela passagem da água a ser purificada, mesmo a grandes pressões hidráulicas.

Os sólidos orgânicos presentes no afluente vão ser degradados e digeridos através de transformações anaeróbias, que resultam na produção de “biogás”, como

resultado final do processo (Lettinga *et al.* 1980). A movimentação ascendente resultante da libertação das bolhas de gás formadas durante o processo vai causar turbulência hidráulica, resultando em mistura no interior do reactor sem necessidade de recorrer a componentes mecânicos. Na parte superior do reactor, a fase líquida é separada do manto de lamas e do gás por um separador trifásico (também conhecido como separador gás – líquido – sólido). O separador trifásico é normalmente uma campânula para o gás, com uma tina de decantação situada na parte superior. Por baixo da campânula, são utilizados separadores de modo a conduzir o gás para a abertura da campânula (Lin e Yang, 1991). A produção de biogás a partir da digestão anaeróbia tem vindo a ser considerada como a tecnologia que simultaneamente tem melhor relação preço/custo e amiga do ambiente, para a produção de biogás (Fehrenbach *et al.*, 2008).



Fig. 1.2 – Esquema representativo de um reactor UASB, adaptado do modelo BIOPAO® UASB

Os reactores UASB podem funcionar de modo diferente. Uma das suas capacidades operacionais é o tempo de alimentação dos reactores, que pode funcionar de um modo contínuo, ou intermitente.

No reactor a operar de modo contínuo a alimentação é feita ininterruptamente, enquanto num reactor intermitente, a alimentação do reactor, é precedida por um período de interrupção no processo de alimentação. O modo de operacionalidade é um factor determinante para o rendimento do funcionamento do reactor.

1.2.2 Formação dos agregados de microrganismos

A formação de agregados de microrganismos é um fenómeno que pode ocorrer em processos anaeróbios de tratamento de águas residuais industriais (Hulshoff Pol *et al*, 1983). Os agregados de microrganismos, presentes no interior dos reactores anaeróbios, são densos consórcios de microrganismos, que se formam espontaneamente, sem necessidade de uma matriz de suporte. Muitas teorias e modelos tentaram explicar a formação destes grânulos.

Um destes modelos, é o modelo “esparguete” (Fig. 1.3). Segundo este modelo, microrganismos do género *Methanosaeta*, domínio *Archaea*, começam por se entrelaçar entre si, servindo de base para outros microrganismos de poderem fixar, aumentando e desenvolvendo o grânulo (Wiegant e De Man, 1986). A integridade do agrado é mantida por longos filamentos de espécies pertencentes ao género *Methanosaeta*, juntamente com outros factores não conhecidos (Roest, 2007).

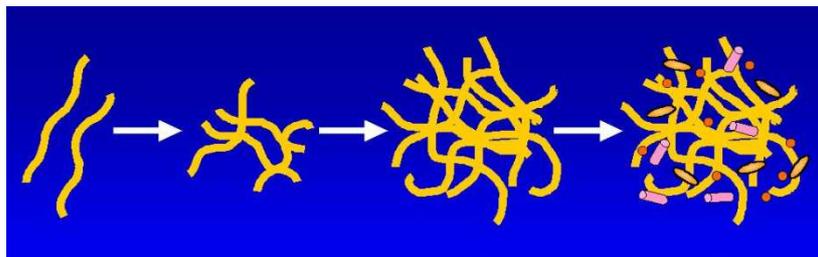


Fig. 1.3 – Processo de formação de grânulos segundo o modelo “esparguete” (adaptado de Field, 2002).

Estes agregados ocupam o interior dos reactores e são constituídos por uma enorme variedade de microrganismos. Apesar de algumas espécies microbianas terem sido isoladas e descritas, um grande número de organismos que estão presentes na constituição destes grânulos permanecem desconhecidos.

Mesmo para os microrganismos identificados, a sua função no interior do reactor não está completamente clarificada. De modo a melhorar o processo de digestão anaeróbia, será necessário um maior conhecimento sobre a composição e o funcionamento destas comunidades microbianas (El-Mamouni *et al.*, 1997).

1.2.3 Processo de tratamento anaeróbio vs. aeróbio

Presentemente, mais de 70% dos reactores anaeróbios a nível mundial são do tipo UASB ou EGSB. Os sistemas de tratamento anaeróbio de águas residuais podem funcionar a diferentes temperaturas e tratar águas residuais de várias origens. Uma das grandes vantagens dos reactores anaeróbios é a produção de pequenas quantidades de lamas e a produção de biogás. Outra vantagem operacional entre os dois sistemas, é que o sistema anaeróbio suporta maiores cargas orgânicas ($5-20 \text{ kg COD.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$) do que os sistemas aeróbios comuns ($0,5-3 \text{ kg COD.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$) (Lema e Omil, 2001). O COD (Chemical Oxygen Demand) é definido pela quantidade de oxidante específico que reage com a amostra sob condições controladas, e é expresso em mg/L O_2 . A eficácia do processo de tratamento é assim medida como a percentagem de matéria orgânica removida durante o tratamento. O COD funciona como um rápido indicador da quantidade de poluentes orgânicos na água e que dá uma indicação da eficácia do processo de tratamento.

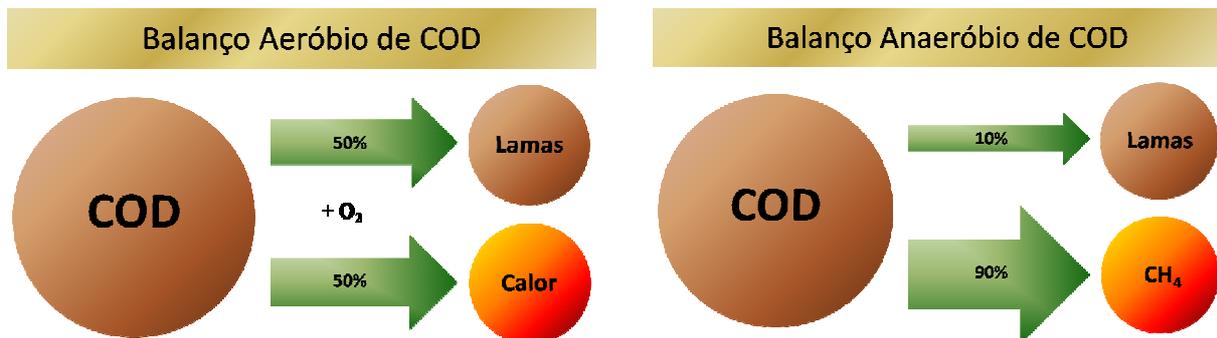


Fig. 1.4 – Esquema comparativo do balanço de COD entre condições anaeróbias e aeróbias (adaptado de Field, 2002).

Os reactores anaeróbios apresentam relativamente aos reactores anaeróbios, um custo 5 a 10 vezes inferior na produção das lamas utilizadas nestes processos. Não consomem energia eléctrica e dispensam o uso de bombas, sistemas de arejamento, válvulas solenóides, painéis eléctricos. Necessitam de pouco espaço e um baixo custo para serem implementados, e produzem metano, “biogás”, como produto final do processo, que pode ser reaproveitado como fonte de energia alternativa. Os reactores anaeróbios têm ainda a capacidade de preservação da sua biomassa, sem necessidade de alimentação do reactor por vários meses ou anos. Contrariamente, a comunidade microbiana no processo aeróbio depende do oxigénio. A falta de energia eléctrica, a

falha do motor, ou outro problema associado ao processo, pode colocar todo o sistema em colapso, uma vez que qualquer falha no fornecimento de oxigénio ao sistema pode resultar na perda de toda a comunidade microbiana (Kleerebezem e Macarie, 2003). Os reactores anaeróbios serão ideais para implementar, por exemplo, em países em vias de desenvolvimento, contribuindo para o restabelecimento das redes públicas de águas potável evitando os graves problemas actuais de saúde pública.

1.3 Diversidade microbiana em reactores anaeróbios

Para se avaliar a diversidade microbiana presente num reactor anaeróbio, uma possível abordagem, é averiguar quais os processos metabólicos que ocorrem no interior do reactor de digestão anaeróbio. As principais vias metabólicas (Fig.1.5), sendo as vias mais interessantes do ponto de vista económico, começam com a hidrólise da matéria orgânica complexa presente nas águas residuais, que irá ser transformada, na sua maioria, em metano e dióxido de carbono (Lyberatos, 1999).

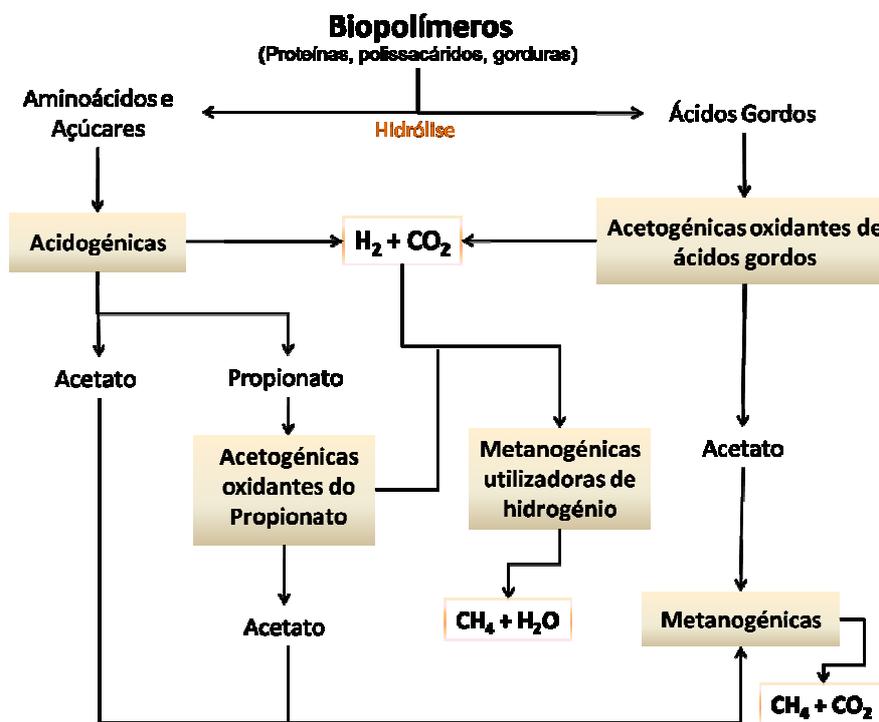


Fig. 1.5 – Principais processos metabólicos que ocorrem no interior de um reactor anaeróbio, adaptado de Siegrist *et al.*, 1993.

A formação de metano é um processo complexo. Para os diferentes passos de degradação da matéria orgânica até à formação de metano, é necessário um consórcio de microrganismos e requer uma coordenação de actividades metabólicas de populações microbianas fisiologicamente diferentes (Angelidaki *et al.*, 1993). Apesar dos processos anaeróbios estarem bem conhecidos, pouco se sabe sobre a comunidade de microrganismos responsáveis por estas conversões (Head *et al.*, 1998). Estas limitações são, em muito, devido aos métodos disponíveis para isolamento, identificação e caracterização fisiológica dos microrganismos envolvidos.

1.3.1 Hidrólise da matéria orgânica

A maioria da matéria orgânica que chega ao reactor encontra-se na forma de polímeros orgânicos complexos, que necessitam de ser degradados em oligo- e monómeros (açúcares, péptidos, ácidos gordos e aminoácidos), permitindo que estas moléculas mais pequenas consigam atravessar as paredes celulares dos microrganismos que vão metabolizar estes compostos (Chynoweth e Isaacson, 1987). Esta conversão, corresponde a uma hidrólise, é conseguida através da acção de enzimas extracelulares (amilases, lipases, celulasas) excretadas por bactérias presentes no interior do reactor (Purohit *et al.*, 2008).

1.3.2 Acidogénese

A acidogénese é a segunda fase do processo anaeróbio de degradação da matéria orgânica, em que os produtos resultantes da hidrólise vão ser metabolizados pelas bactérias fermentativas, tendo como produtos finais os ácidos gordos voláteis, ácidos gordos de cadeia curta (acetato, butirato, proprionato), ácidos orgânicos, álcoois bem como pequenas quantidades de hidrogénio (Fig. 1.5).

Uma complexa comunidade de microrganismos participa no processo da hidrólise e na fermentação da matéria orgânica. A sua maioria são bactérias anaeróbias obrigatórias pertencentes ao género *Clostridium*, ao grupo *Bacteroidetes* e ao grupo *Bifidobacteria*. Para além destes grupos filogenéticos, algumas bactérias anaeróbias facultativas como *Streptococci* spp. e espécies da família das *Enterobacteriaceae* podem fazer parte do processo (Lettinga *et al.*, 1999).

1.3.3 Acetogénese

Os ácidos gordos voláteis vão ser convertidos em acetato e hidrogénio por bactérias acetogénicas obrigatórias produtoras de hidrogénio. As bactérias acetogénicas fazem parte de um grupo metabólico intermediário responsável pela grande fracção de acetato produzido durante todo o processo. As bactérias acetogénicas vão oxidar anaerobicamente os ácidos gordos voláteis em acetato, CO₂, H₂ e formato (Gujer e Zehnder, 1983). A oxidação dos ácidos gordos voláteis é a chave para o processo de formação do metano. Quando ocorre a oxidação do butirato e do propionato a acetato, H₂ e/ou formato por parte das bactérias acetogénicas, é que estão criadas as condições necessárias para o consórcio sintrófico entre as bactérias acetogénicas e as bactérias metanogénicas. As interacções sintróficas são relações simbióticas entre duas partes que dependem totalmente uma da outra para conservarem energia e para o seu crescimento (Stams, 1994, Schink, 1997).

Dependendo se o acetato é o único produto da reacção ou não, este metabolismo pode se classificar como homoacetogénico ou heteroacetogénico, respectivamente. Também podem ser classificados com oxidantes de H₂ ou produtores de H₂. Os acetogénicos que são autotróficos utilizam CO₂ como fonte de carbono e utilizam o hidrogénio como fonte de electrões. Os acetogénicos que conseguem utilizar outras substâncias como os ácidos gordos voláteis produzem acetato e hidrogénio. Dependendo do substrato disponível, temperatura, pH e a pressão parcial de H₂, alguns acetogénicos podem utilizar várias vias metabólicas dentro da acetogénese. Na acetogénese apenas estão envolvidos microrganismos do domínio *Bacteria*, pertencentes apenas a alguns filos, sendo a sua diversidade bastante mais restrita do que na acidogénese (Drake *et al.*, 2002). Tipicamente as bactérias homoacetogénicas presentes na digestão anaeróbia são o *Acetobacterium woodii* e *Clostridium acetivum*.

1.3.4 Metanogénese

O final da cadeia metabólica termina com a metanogénese, onde a presença de um grupo de microrganismos do domínio *Archaea* conhecidos como metanogénicos, produz metano a partir do acetato ou hidrogénio e CO₂ (Schink, 1997). Estes microrganismos apenas conseguem crescer com substratos simples, como por exemplo H₂ e CO₂, formato, metanol e acetato, e por este motivo dependem de outros

microrganismos que degradam compostos orgânicos mais complexos para lhes fornecer estes substratos (Gujer e Zehnder 1983). Estes microrganismos são anaeróbios obrigatórios e requerem um potencial redox baixo para o seu crescimento (Sam-Soon *et al.*, 1990; Gerardi, 2003).

O processo de produção de metano é assim um processo de interações sintróficas existentes com base em relações simbióticas entre os diversos microrganismos envolvidos no processo onde cada microrganismo depende inteiramente dos outros para conservar energia e para o seu crescimento (Schink, 1997).

1.4 Métodos moleculares para a caracterização de populações microbianas

O conhecimento da estrutura e da funcionalidade das comunidades de microrganismos presentes num reactor anaeróbio são extremamente importantes para o aumento do conhecimento e da previsão dos processos de tratamento de águas residuais, permitindo aumentar assim o seu desempenho. Este conhecimento permite conhecer as relações sintróficas e as interações cooperativas entre os diversos grupos de microrganismos responsáveis pelas distintas partes do processo de tratamento anaeróbio, e é a sua cooperação e a sua co-existência que permitem que todo o processo ocorra. As propriedades fisiológicas e bioquímicas dos microrganismos podem ser utilizadas para a sua identificação, bem como para o entendimento das suas interações com o meio em que está inserido. Os detalhes destes estudos estiveram limitados, até ao aparecimento dos métodos moleculares, à possibilidade de cultivar os microrganismos.

Apesar de muitos dos microrganismos envolvidos nos processos anaeróbios atrás descritos poderem ser cultiváveis, as condições para o seu crescimento em cultura ainda permanecem desconhecidas, não só por limitações metodológicas, mas também por falta de conhecimento das respectivas necessidades metabólicas e nutricionais (Kirk *et al.* 2004). O reconhecimento da incapacidade de isolar a maior parte dos microrganismos resultou no desenvolvimento de uma nova área de pesquisa chamada “Ecologia Molecular Microbiana” (‘Molecular Microbial Ecology’) (Akkermans *et al.* 1996). A área de acção da ecologia molecular microbiana é definida pela aplicação de metodologias moleculares, tipicamente baseada na análise comparativa de sequências de nucleótidos, para identificar microrganismos específicos num ambiente particular.

No entanto, existe um grande grupo de microrganismos conhecidos apenas pelas suas sequências nucleotídicas extraídas directamente de amostras ambientais, e até esses organismos serem cultivados, a única maneira de compreender o seu papel no meio ambiente onde estão inseridos é através de uma caracterização independente de cultura, associada a uma capacidade de determinação de actividade metabólica *in situ* e previsão das vias metabólicas com base em dados de metagenómica (Gray e Head 2001).

Devido à ubiquidade das moléculas de RNA ribossómico (rRNA) em todas as formas de vida, a análise comparativa das sequências pode ser aplicada universalmente para inferir relações entre organismos. As moléculas de rRNA compreendem sequências altamente conservadas, intercaladas com regiões variáveis. Em geral, domínios essenciais do rRNA estão conservados ao longo de todos os domínios filogenéticos, podendo ser identificados por comparação das suas sequências.

Os métodos moleculares em microbiologia são cada vez mais um suporte para as técnicas tradicionais. Durante os últimos anos, a identificação de microrganismos tem-se apoiado cada vez mais em métodos de biologia molecular, especialmente os métodos que envolvem a análise dos genes que codificam para as sequências do rRNA 16S, utilizados especialmente na caracterização de comunidades microbianas de amostras ambientais (Dahllöf, 2002). A caracterização e identificação de comunidades microbianas presentes em amostras deste género não é uma tarefa linear, e os métodos e técnicas utilizados para a análise destas amostras já estão de alguma forma normalizados. No entanto, devido à própria natureza da amostra, serão necessários sempre, alguns ajustes (Anderson e Cairney, 2004).

1.4.1 Técnica de PCR – clonagem – sequenciação

As primeiras tentativas para analisar a diversidade natural de uma população microbiana baseavam-se na extracção, purificação e sequenciação do rRNA 16S directamente das amostras ambientais. O desenvolvimento de técnicas como o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permitiu uma melhor resolução deste tipo de abordagem, permitindo obter maiores quantidades de ácidos nucleicos para os procedimentos seguintes. Após a extracção de DNA, este vai ser sujeito a amplificação por PCR por primers universais ou específicos para amplificar um grupo particular de microrganismos, seguida da clonagem dos fragmentos amplificados. Uma vez clonados, originam uma biblioteca de genes que codificam para o rRNA 16S, que pode ser

rastreada por vários métodos. A extracção plasmídica e restrição podem ser utilizadas para confirmar a presença dos plasmídios ou mesmo se estes possuem a dimensão certa.

1.4.2 Electroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

A abordagem que é ultimamente mais utilizada para análise neste tipo de amostras ambientes é a Electroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) (Muyzer e Smalla, 1998), para o qual é necessário um conjunto de oligonucleótidos universais, direccionados para as regiões mais conservadas dos genes que codificam para os rRNA 16S do domínio *Bacteria* e *Archaea*. O DGGE é um método electroforético, na teoria, capaz de detectar diferenças entre fragmentos de DNA da mesma dimensão mas com diferentes conteúdos de G+C (%). Estes fragmentos podem ser separados num gel de gradiente desnaturante baseado nas diferentes temperaturas de desnaturação dos diferentes segmentos de DNA, sendo as condições de desnaturação conseguidas pela presença de gradientes de concentração de ureia e formaldeído. A temperatura de fusão (T_m) destes segmentos é específica de cada sequência. Uma vez atingida a temperatura de fusão mais baixa, a sequência de DNA sofre uma quebra criando moléculas parcialmente desnaturadas. Este comportamento vai reduzir mobilidade do fragmento de DNA ao longo do gel de acrilamida (Torsvik *et al.*, 1998). Além disso, sequências com o mesmo comprimento e com o mesmo perfil de desnaturação, não têm de ser necessariamente iguais, uma vez que o conteúdo G+C (%) de uma sequência não indica, por si só, muita informação sobre uma sequência em particular.

1.4.3 RFLP (restriction fragment length polymorphism)

A técnica de polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP), baseia-se na hidrólise do DNA com enzimas de restrição e posterior separação, por electroforese, dos fragmentos gerados, originando assim padrões de restrição específicos. Estes padrões podem ser característicos ao nível das espécies ou mesmo ao nível da estirpe. Uma vez que estirpes distintas apresentam diferenças (ainda que, por vezes, mínimas) ao nível do genoma, o que esta técnica explora é a possibilidade dessas diferenças se encontrarem no interior da sequência de reconhecimento da(s) enzima(s) de restrição utilizada(s). Desta forma, a comparação dos perfis resultantes pode permitir detectar pequenas

alterações que diferenciem as estirpes, desde que essas modificações ocorram nas sequências de reconhecimento das enzimas usadas.

1.5 Objectivos do trabalho

De modo a contribuir para o aumento do conhecimento sobre as populações microbianas presentes em reactores anaeróbios, o presente trabalho tem como objectivos principais.

- Caracterizar as populações microbianas presentes em dois reactores anaeróbios com processos de operacionalidade diferentes, um a operar em modo contínuo e o outro a operar de modo intermitente.
- Elaborar uma estratégia envolvendo a construção de oligonucleótidos iniciadores (primers) específicos para as regiões dos genes que codificam para o rRNA 16S dos principais grupos taxonómicos presentes em reactores anaeróbios, pertencentes aos domínios *Bacteria* e *Archaea*, para clonagem dos fragmentos.
- Avaliar a diversidade microbiana presente nos reactores em estudo pela análise comparativa do polimorfismo dos fragmentos de restrição dos clones obtidos.
- Sequenciação dos diferentes perfis obtidos e construção de árvores filogenéticas para avaliação da comunidade microbiana presente nos dois reactores em estudo.

2. Materiais e Métodos

2.1 Condições de operacionalidade dos reactores UASB e recolha das amostras

As amostras de lamas analisadas neste trabalho foram provenientes de dois reactores UASB que foram otimizados para o tratamento de águas residuais provenientes de uma indústria de lacticínios. Os reactores estão localizados na Universidade de Aveiro, local a partir de onde foram operados sob as seguintes condições: os reactores foram feitos de Perspex, com um volume de 6 litros. A temperatura foi mantida a 35 ± 1 °C, e a produção de biogás foi monitorizada com recurso a um medidor de gás (Schlumberger). Os reactores foram inoculados com lamas flocculentas de uma carga média de um reactor industrial. A lama inoculada tinha uma taxa de actividade metanogénica específica (SMA) de 6,9 ml CH₄/g VSS (Volatile Suspended Solids) / dia, medida com acetato de sódio. Os reactores operaram durante 8 meses.

O reactor intermitente funcionou com uma alimentação de 48h com um tempo de retenção hidráulica de 12 horas, seguido de um período de 48 h sem alimentação, para estabilização da lama. O reactor a operar de modo contínuo, funcionou com um tempo de retenção hidráulico de 12 horas. As condições de funcionamento, resultaram de estudos prévios de optimização. Os reactores operaram com a uma carga diária de 14 g COD/L/dia e durante os períodos de alimentação do reactor a operar de modo intermitente, 28 g COD/L/dia.

Os dois reactores receberam uma alimentação igual de COD em cada período de 96 h. As amostras das lamas provenientes dos reactores de digestão anaeróbia dos reactores em estudo foram recolhidas e transportadas de modo adequado, sendo mantidas a 4°C durante todo o transporte e congeladas a -20°C, não demorando mais do que uma semana até serem processadas. Todo este processo foi da responsabilidade da Universidade de Aveiro.

2.2 Identificação dos grupos de microrganismos

A identificação dos principais grupos de microrganismo presentes nos reatores em estudo baseou-se numa estratégia que envolveu a amplificação e clonagem dos genes que codificam para o rRNA 16S, usando primers especificamente desenvolvidos para o efeito, específicos para os principais grupos metabólicos descritos como estando presentes em reatores UASB.

De modo a definir primers específicos para os microrganismos descritos como existentes nos reatores UASB, consideraram-se os organismos pertencentes aos filos *Euryarcheota*, e *Crenarchaeota*, como os principais grupos do domínio *Archaea*, que incluem os principais grupos de bactérias metanogénicas. Do domínio *Bacteria*, foram considerados os microrganismos pertencentes ao filo dos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Proteobacteria* e *Deferribacteres* como os grupos de microrganismos responsáveis pelos principais processos metabólicos que ocorrem no interior de reatores UASB (Narihiro e Sekiguchi, 2007). Assim sendo, foram retiradas um total de 64 sequências completas dos genes que codificam para o rRNA 16S do filo *Euryarcheota*, 49 sequências do filo *Crenarchaeota*, 134 sequências do filo *Firmicutes*, 56 sequências do filo *Bacteroidetes*, 38 sequências do filo *Chloroflexi* e 144 sequências do filo *Proteobacteria* e *Deferribacteres*.

A recolha das sequências completas dos genes que codificam para o rRNA 16S foi realizada a partir das bases de dados Ribosomal Database Project (RDP, <http://rdp.cme.msu.edu/>), GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>), Integrated Microbial Genomes (<http://www.jgi.doe.gov/genome-projects/>), Green Genes (<http://greengenes.lbl.gov/>) e SILVA rRNA Database Project (<http://www.arb-silva.de/>).

Após a obtenção das diversas sequências, foi realizado um alinhamento global das mesmas, recorrendo ao programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), (Thomson *et al.*, 2004). As regiões conservadas que flanqueiam as regiões variáveis, de cada sequência consensual, serviram como base para a construção de primers específicos para cada filo.

2.3 Construção dos Primers

Os primers foram desenhados com o programa OLIGO Primer Analysis Software (<http://www.oligo.net>) sendo a sua construção baseada no alinhamento feito a

partir das sequências dos genes que codificam para o rRNA 16S. Os primers foram construídos com uma dimensão entre 15 e 21 nucleótidos. O tamanho para os amplificados foi previsto ser no mínimo 600 bp, de modo a assegurar que a região amplificada contenha as regiões variáveis que flanqueiam as regiões conservadas complementares dos primers. As sequências foram desenhadas de modo que os primers não formem estruturas secundárias intramoleculares (*hairpin* ou *loops*) estáveis. *Hairpin* e *loops* com baixa estabilidade não apresentam qualquer tipo de problemática uma vez que vão ser interrompidos com as temperaturas de hibridação.

Na construção dos primers, foi considerado como factor relevante, que os pares de primers não tenham diferenças nas temperaturas de fusão superiores a 10°C. Houve também o cuidado de não haver complementaridade entre as 3 últimas bases finais da extremidade 3', no final dos primers, de modo a impedir a sua dimerização. As temperaturas de fusão para cada primer, foram calculadas pela seguinte fórmula:

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 2^{\circ}\text{C} \times [\text{A} + \text{T}] + 4^{\circ}\text{C} \times [\text{G} + \text{C}]$$

Para se verificar a especificidade dos primers obtidos, recorreu-se aos programas informáticos *Probe Match* (RDP, <http://rdp.cme.msu.edu/>) para Bacteria, e *Probe Locator* (Green Genes, <http://greengenes.lbl.gov/>) para arqueobactérias, de modo a efectuar uma avaliação quantitativa do número de microrganismos que são específicos para estes primers. Deste modo conseguimos assegurar bioinformaticamente, que 80% das espécies utilizadas para a construção dos primers são possíveis de amplificar utilizando os primers específicos.

2.4 Extracção e Purificação de DNA

Para extracção do DNA total das amostras, as amostras foram descongeladas lentamente. Após descongelação, as amostras foram sonicadas através do uso de ultrasons (3 ciclos de 30 s cada, a 40% de potência máxima, mantendo as amostras colocadas em gelo) usando um sonicador Brason, de modo a garantir que os microrganismos presentes nos grânulos das amostras fossem libertados. As amostras foram mantidas em gelo até serem processadas. Foram recolhidos 2 ml de cada amostra que foram purificados através de um filtro Nucleospin (Macherey-Nagel) de modo a remover partículas de maior dimensão. A fracção filtrada foi recolhida e o DNA

genómico foi extraído e purificado usando o sistema High Pure PCR template Kit (Roche), seguindo as instruções do fabricante. A concentração e a pureza do DNA obtido foi estimado por medição da absorvância a 260 nm num espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000 Technologies).

A integridade do DNA genómico purificado foi verificada visualmente após a realização de uma electroforese em gel de agarose (0,8%), em tampão TAE 1x (TAE 50x: 242 g/l Tris Base, 57,1 ml/L ácido acético, 100 ml/L de 0.5 EDTA, pH 8) (Sambrook e Russel, 2001). As amostras a analisar em gel de agarose foram preparadas adicionando 1 µl de corante (1% SDS, 50% de Glicerol e 0,05% de Azul de Bromofenol, 10x concentrado) a cada 5 µl de solução de DNA. A electroforese foi efectuada a 90 volts durante aproximadamente 45 minutos.

2.5 Amplificação dos genes rRNA 16S

A amplificação dos segmentos de DNA que codificam para o rRNA 16S foi realizada utilizando os primers descritos na Tabela 3.1. (ver Resultados). As reacções de PCR foram realizadas num volume total de 50 µl, contendo para cada reacção: 1 µl de cada primer, 6 µl de DNA molde (numa concentração aproximada de 400 ng), 0,1 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de Taqmed DNA polimerase e 5 µl do tampão de reacção respectivo, fornecido pelo fabricante da polimerase (Citomed).

As reacções de amplificação foram realizadas nas seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 95°C durante 5 min, seguida de 30 ciclos de 45 segundos (s) a 95°C para desnaturação, 75s para hibridação dos primers à temperatura correspondente para cada par de primers, e 45s a 72°C para a extensão. No final efectuou-se um passo de extensão durante 7 min a 72°C. As temperaturas de hibridação correspondentes a cada um dos primers, estão descritas na Tabela 3.2 (ver Resultados), assim como o tamanho esperado para os amplificados. Para as reacções de hibridação, foram calculadas as temperaturas de hibridação (Th) a partir das temperaturas de fusão (Tm) dos primers, segundo a fórmula:

$$T_h = \frac{T_m \text{ do Primer Foward} + T_m \text{ do primer Reverse}}{2} (^\circ\text{C}) - 5 \text{ } ^\circ\text{C}$$

As temperaturas de hibridação calculadas por esta fórmula, foram utilizadas como ponto de partida para a optimização das melhores condições de temperatura de hibridação para as reacções de PCR.

A confirmação da dimensão e integridade dos amplificados resultantes das reacções de PCR foi realizada após separação dos fragmentos por electroforese em gel de agarose (Amersham Biosciences) a 0,8% em tampão TAE 1x (Sambrook e Russel, 2001). As amostras foram preparadas adicionando 5 µl de corante de aplicação (Fermentas, 6x concentrado) ao volume total da reacção e aplicadas no gel. Para determinar a dimensão das bandas obtidas usou-se o marcador de massa molecular 1 Kb Plus (Fermentas). Os géis foram corados com 1 µg/ml de brometo de etídio em tampão TAE 1x, sendo as bandas visualizadas num transiluminador UV Gel Doc XR (BioRad, Universal Hood II), acoplado a um sistema de captação de imagem. As bandas correspondentes a cada produto de PCR foram extraídas do gel e purificadas utilizando o *kit* comercial EasySpin Gel Extraction *kit* (Citomed) e eluídas em 20 µl de TE (TE - 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA).

2.6 Construção de uma biblioteca de clones

Os amplificados purificados foram clonados no vector pCR2.1, utilizando o sistema de clonagem TA Cloning Kit (Invitrogen). Algumas *taq* polimerases têm uma actividade que adiciona uma adenosina (A) na região terminal 3' dos produtos de PCR. O vector linearizado existente no kit utilizado, apresenta resíduos simples de timina (T) na região terminal 3', o que vai permitir que o produto amplificado na reacção de PCR se ligue eficientemente ao vector (Fig. 2.1).

As reacções de ligação, do produto final ao vector, foram realizadas a 14°C, durante 16 horas, seguindo as especificações do fabricante (Invitrogen). As reacções de ligação foram seguidamente precipitadas do seguinte modo: aos tubos de reacção adicionou-se acetato de sódio a 3M (10% do volume total da reacção) e etanol (2,5x o volume final da reacção), seguido de uma centrifugação de 30 min, 15000 rpm, a 4°C (Sambrook e Russel, 2001). Após centrifugação, as ligações foram lavadas com etanol a 70% e secadas. Adicionou-se águas destilada esterilizada para ressuspender as amostras para em seguida se proceder à transformação de células de *Escherichia coli*. As reacções de ligação a usar na electrotransformação são precipitadas para remover não só

a T4 DNA Ligase, mas também o excesso de sais presente no tampão de ligação, pois estes podem interferir negativamente no processo de electroporação.

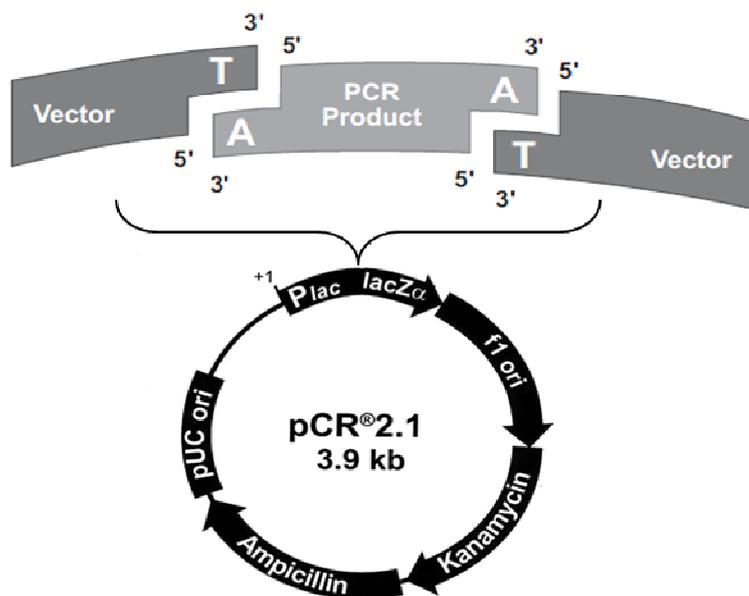


Fig. 2.1 – Princípio do método de clonagem utilizado, adaptado de TA Cloning® Kit, *User Manual*.

As ligações foram transformadas em células electrocompetentes de *Escherichia coli* DH5a, por electroporação, usando a metodologia padrão descrita (Sambrook e Russel, 2001). As células electrocompetentes foram preparadas da seguinte forma: Uma colónia de *Escherichia coli* DH5a foi colocada com o auxílio de uma ansa, num volume de 10 ml de meio LB (Lennox broth, Sigma) líquido, incubando a 37°C durante a noite. A partir da cultura inicial, foi transferido para um novo erlenmeyer contendo 100ml de LB líquido, o inóculo necessário de modo a obter-se uma densidade óptica (DO), a 640 nm, de 0,1. O crescimento das células foi mantido até ser atingida uma DO=0,8. As células foram então recolhidas para tubos de centrifuga de 30 ml. Após a sua recolha, as células foram submetidas a 4 ciclos de centrifugação (15 min, 12.000 rpm, 4°C), seguido de uma lavagem, com água destilada estéril. Após cada centrifugação, o volume de água destilada usada nas lavagens foi de 90, 60 e 30 ml, respectivamente. Na última ressuspensão foram utilizados 2 ml de solução de glicerol a 10%. Aliquotas de 110 µl, da suspensão obtida, foram imediatamente conservadas a -80°C em microtubos, sendo apenas retiradas no momento da electroporação. Todos os reagentes, tubos e suportes foram devidamente esterelizados em autoclave. Todo o processo foi realizado em condições de esterilidade e em gelo.

A electroporação foi realizada consoante as condições descritas para as células de *E. coli*: 2,5 kV de potência, 400 Ohms de resistência, num sistema de electroporação da BioRad. Imediatamente após a electroporação, a suspensão celular foi transferida para um tubo contendo 3 ml de meio LB (Lennox broth, Sigma) líquido, e incubada durante 1 hora a 37°C sob agitação (250 rpm). De seguida, alíquotas de 100 µl de suspensão celular foram espalhadas em placas de LB sólido contendo 50 mgL⁻¹ Canamicina e 40 µl de X-gal (20 mg/ml). As placas foram colocadas a 37°C durante a noite. A adição de antibiótico ao meio de cultura garante que apenas as células que tenham sido transformadas com o vector cresçam no meio de cultura, uma vez que o plasmídeo contém um gene de resistência à ampicilina e à canamicina, que vai garantir o crescimento de *E. coli* transformadas. O uso de canamicina, em detrimento da ampicilina deveu-se principalmente ao facto de garantir o não aparecimento de colónias satélite. Os transformantes foram seleccionados através da selecção usando X-gal. Apenas as células que contêm os plasmídeos recombinantes, em que ocorreu a inserção de DNA, irão originar colónias brancas, pois a inserção de DNA interrompe um gene necessário à utilização da lactose.

Assim, as colónias brancas foram seleccionadas e os plasmídeos, contendo os fragmentos de interesse, foram extraídos utilizando o *kit* comercial Minipreps Easyspin kit (Citomed) seguindo as instruções do fabricante. A concentração e pureza dos plasmídeos obtidos foram estimadas com base na absorvância a 260 nm utilizando um espectrofotómetro (NanoDrop[®], ND-1000 Technologies).

2.7 Análise dos Perfis de restrição

O processo de identificação da comunidade microbiana presente nos reactores UASB realizou-se essencialmente através da sequenciação dos genes que codificam para o rRNA 16S. De modo a minimizar o número de sequenciações, evitando sequenciar clones repetidos, os plasmídeos obtidos foram caracterizados quanto aos seus perfis de restrição obtidos por hidrólise com uma enzima de restrição, seguida da separação dos fragmentos de restrição em gel de poliacrilamida.

Os plasmídeos obtidos foram submetidos a uma reacção de hidrólise, na qual foi utilizada a enzima *HaeIII*. Esta enzima vai reconhecer a sequência GGCC e vai quebrar a ligação fosfodiéster entre o G e o C. Além disso, devido à pequena sequência de reconhecimento, vai originar um elevado número de fragmentos de DNA. Os

plasmídeos foram separados e agrupados segundo o perfil de restrição apresentado, sabendo que sequências iguais representam perfis de restrição iguais.

As reacções de hidrólise foram realizadas num volume total de 20 µl, contendo 1U da enzima restrição *HaeIII*, 2 µl do respectivo tampão de reacção da enzima 10x concentrado (fabricado pelo fabricante da enzima), e aproximadamente 200 ng de DNA plasmídico purificado. Foi adicionada água destilada, de modo a perfazer a 20 µl o volume total da reacção. As reacções de hidrólise ocorreram à temperatura de 37°C durante uma hora. Após a reacção ocorrer, foi adicionado 5 µl de corante de aplicação (Fermentas, 6x concentrado), não apenas para a aplicação das amostras para visualização em gel, mas também para ajudar a interromper a reacção de digestão.

Os produtos das reacções de hidrólise foram separados em gel nativo de poliacrilmáida a 10%. Os géis foram preparados com acrilamida-bis-acrilamida a 10% (p/v), em tampão TBE 10x (TBE 10x: 108 g/L Tris Base, Ácido bórico 55 g/L, 7,44g Na₂EDTA•2H₂O) e dH₂O de modo a perfazer o volume indicado. Para a polimerização do gel foi utilizado persulfato de amónia (APS) (0,05%) e TEMED (0,05%). A solução foi aplicada num sistema vertical Mighty Small (Hoefer) colocando-se, seguidamente, os géis a polimerizar a 4°C durante a noite. Não se utilizou nenhum gel de concentração.

Antes de serem aplicadas as amostras no gel, foi efectuada uma pré-corrída do gel (durante 1 hora a 100 V, à temperatura ambiente), de modo a eliminar o APS do sistema e a melhorar a resolução dos fragmentos. Após o sistema arrefecer cerca de 10 minutos a 4°C, de modo a prevenir a degradação do DNA, aplicou-se 8 µl de cada amostra em cada poço. A separação foi efectuada durante 2 horas à temperatura ambiente, a 100 V. Os géis foram então corados com 1µl/ml de brometo de etídio em tampão TBE 1x, durante 5 minutos, e ficaram a descorar durante 1 hora em água destilada. Os géis foram visualizados num transiluminador UV Gel Doc XR (BioRad, Universal Hood II), recolhendo as imagens com o sistema de fotografia acoplado. As imagens obtidas foram gravadas utilizando o software Quantity One (BioRad).

Para a análise das imagens com os perfis obtidos, foi utilizado o software LabImage (http://www.labimage.com/1d_software/labimage/index.html). A imagem de cada amostra foi analisada em termos de migração das bandas e intensidade relativa das mesmas. As amostras com padrões iguais foram sobrepostas de modo a serem diferenciadas pela intensidade das bandas uma vez que padrões de migração semelhantes podem corresponder a amostras distintas. Plasmídeos com padrões de restrição únicos, obtidos com os primers específicos para cada filo, foram novamente

isolados e purificados usando a metodologia descrita atrás. Os plasmídeos foram sequenciados pela firma Operon MWG Eurofins (Alemanha), usando o primer de sequenciação M13 reverso (5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3').

2.8 Análise das sequências dos genes de rRNA 16S

As sequências de DNA obtidas por sequenciação dos plasmídeos correspondentes aos diferentes clones de rRNA 16S foram analisadas usando o programa VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>), de modo a remover das sequências as regiões pertencentes ao vector de clonagem utilizado, o pCR2.1.

As sequências de rRNA 16S foram comparadas com outras sequências depositadas nas bases de dados RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>, Cole *et al.*, 2009) e GenBank, utilizando a ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências obtidas ainda foram comparadas entre si utilizando o programa BLAST 2 Sequences (residente no NCBI, em www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi) de modo a caracterizar a sua autenticidade. As sequências com uma identidade inferior a 98% foram consideradas novas OTUs como sugerido por Skirmisdottir *et al.* (2000). Todas as sequências novas identificadas neste trabalho, não existentes nas bases de dados, foram depositadas no GenBank.

2.9 Análise filogenética dos segmentos de rRNA 16S

A análise filogenética dos segmentos de rRNA 16S identificados no presente trabalho foi efectuada com base em alinhamentos específicos, usando o programa CLUSAL W (Thompson *et al.*, 1994). As árvores filogenéticas foram geradas com recurso ao programa MEGA 4, utilizando o algoritmo UMPGA, com o mínimo de 500 *bootstraps*. As árvores representam as relações entre as sequências identificadas no presente trabalho e entre as sequências depositadas nas bases de dados, de modo a ser possível uma identificação ao nível taxonómico, para identificação e melhor interpretação das relações filogenéticas entre os microrganismos presentes nas amostras provenientes dos reactores UASB.

3. Resultados

3.1 Desenho de primers específicos para os filios dos domínios *Archaea* e *Bacteria*

Com o objectivo de caracterizar as populações microbianas presentes nos bioreactores UASB a operar de forma contínua e intermitente e estabelecer futuramente correlações entre as flutuações ao nível da composição dessas populações e os parâmetros operacionais dos dois tipos de bioreactores, foi iniciada a caracterização molecular das respectivas comunidades microbianas. Com este pressuposto, foi elaborada uma estratégia baseada na construção de primers específicos para os principais grupos de microrganismos descritas como estando presentes em reactores anaeróbios por outros autores (Narihiro e Sekiguchi, 2007).

Todas as sequências foram alinhadas utilizando o software ClustalW. Utilizando o software Oligo Primer Analysis, foram identificadas as regiões conservadas que foram utilizadas para desenhar os pares de primers. Os primers foram desenhados de modo a que os tamanhos dos fragmentos amplificados resultantes da reacção de PCR, fosse de aproximadamente 600 bp bases, garantindo deste modo a amplificação das regiões variáveis que irão permitir a identificação das espécies microbianas presentes nas amostras em estudo. Uma vez que as sequências obtidas para os filios *Proteobacteria* e *Deferribacteres* foram idênticas, apenas um par de primers foi definido para estes dois filios.

Tabela 3.1 – Sequência e características relevantes dos primers de oligonucleotídios desenhados e utilizados neste trabalho.

<i>Filos</i>	<i>Forward primer (5'-3')</i>	<i>T_m</i> (°C)	<i>Reverse primer (5'-3')</i>	<i>T_m</i> (°C)	<i>Tamanho Previsto (bp)</i>
<i>Euryarchaeota</i>	AACTTAAAGGAATTGGCGGGGAG	72	GTGTGTGCAAGGAGCAGGACGTAT	74	480
<i>Crenarchaeota</i>	ATAAGCGGGGGCAAGTCTGGTGT	76	ACCTGCCGTGGCCCCCTCCTCCT	82	690
<i>Cloroflexi</i>	ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGAC	80	ACATCTCACGACACGAGCTGACGA	74	550
<i>Bacteroidetes</i>	CAGACTCCTACGGGAAGGCAGCAG	78	TAACCCGACACCTCACGGCAGCAG	74	720
<i>Firmicutes</i>	TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA	76	TGCGGGACTTAACCCAACATCTCA	72	570
<i>Spirochaetes</i>	CCAGACTCCTACGGGAGGCAG	66	CTCGTGCCGTGAGGTGTTGGG	70	720
<i>Proteobacteria e Deferribacteres</i>	AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTC	78	GCTGACGACAGCCATGCAGCACCT	78	720

Na Tabela 3.1 estão representadas as sequências de nucleótidos respectivas aos primers desenhados resultantes da análise bioinformática realizada para a construção dos mesmos, bem como algumas características (temperatura de fusão (T_m) e dimensão do fragmento esperado). As condições de amplificação de PCR usadas para os primers desenhados, foram optimizadas usando amostras de DNA provenientes de microrganismos pertencentes aos filos para os quais os primers foram desenhados. Na tabela 3.2, estão resumidas as condições óptimas de amplificação utilizada nas reacções de PCR.

Tabela 3.2 – Temperaturas de hibridação e concentração de magnésio óptimas, utilizadas nas reacções de amplificação por PCR.

<i>Filos</i>	<i>Temperatura de Hibridação (°C)</i>	<i>Concentração de Mg²⁺</i>
<i>Euryarchaeota</i>	53.6	1,5 mM
<i>Crenarchaeota</i>	61.0	2 mM
<i>Cloroflexi</i>	59.4	1,5 mM
<i>Bacteroidetes</i>	58.0	1,5 mM
<i>Firmicutes</i>	56.2	1,5mM
<i>Spirochaetes</i>	55.8	1,5 mM
<i>Proteobacteria e</i>	58.0	2 mM
<i>Deferribacteres</i>		

3.2 Amplificação dos genes codificantes para o rRNA 16S

As condições de PCR foram optimizadas para cada conjunto de primers, partindo de condições standard para reacções de PCR (Sambrook e Russell, 2001), fazendo variar a temperatura de hibridação e a concentração de cloreto de magnésio presente nas reacções de PCR, de modo a determinar quais as melhores condições de amplificação. Os resultados das amplificações por PCR estão demonstrados na Fig. 3.1, onde se pode verificar que a dimensão dos fragmentos amplificados obtidos corresponde aproximadamente à dimensão esperada prevista pelas análises informáticas efectuadas. Os fragmentos de DNA obtidos através das reacções de PCR foram separados em gel de agarose e posteriormente extraídos do gel. As bandas foram purificadas de modo a serem obtidos apenas os fragmentos amplificados, sendo posteriormente clonados no vector pCR2.1 e transformados em células de *E. coli*. Como resultado da transformação foram obtidas várias colónias, onde os transformantes foram seleccionados, por selecção azul / branca, sendo as colónias brancas as colónias de interesse, contendo à partida o fragmento amplificado de interesse.

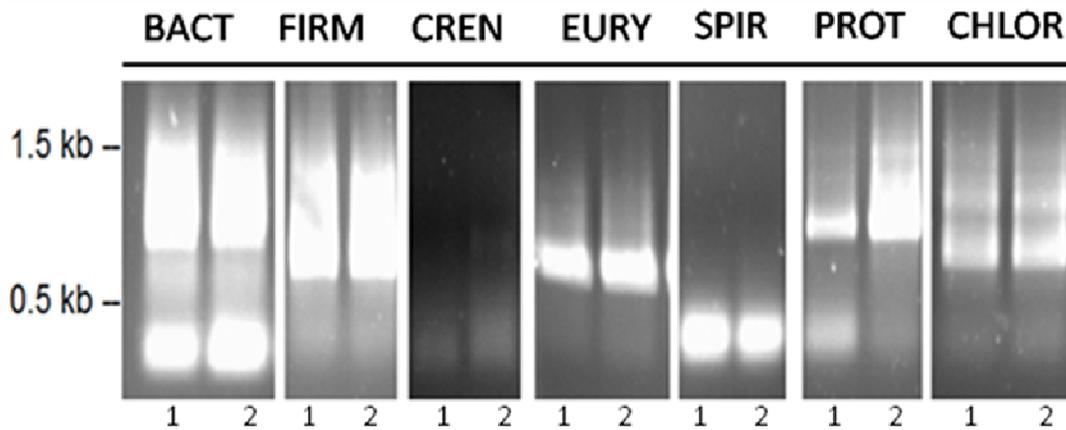


Fig. 3.1 – Amplificação por PCR dos segmentos dos genes que codificam para o rRNA 16S, usando como molde o DNA total das amostras provenientes dos reactores UASB, usando os primers específicos para cada Filo: **EURY**: *Euryarchaeota*, **BACT**: *Bacteroidetes*, **FIRM**: *Firmicutes*, **CREN**: *Crenarchaeota*, **SPIR**: *Spirochaeta*, **PROT**: *Proteobacteria* e *Deferribacter*, **Kb** – kilopares de bases, **1**- Amostra referente ao reactor contínuo, **2** – Amostra referente ao reactor intermitente.

Deste modo, foram obtidos um total de 323 clones, 162 obtidos para as amostras provenientes do reactor intermitente e 161 clones obtidos para as amostras provenientes do reactor a operar de modo contínuo. A Fig. 3.2 representa a distribuição do número total de clones obtidos, usando os primers específicos para cada filo, nas reacções de amplificação por PCR usando as amostras provenientes do reactor a operar de modo intermitente (Fig. 3.2 A), e de modo contínuo (Fig. 3.2 B). Para a amostra obtida do reactor a operar de modo intermitente (Fig. 3.2 A), o maior número de clones foi obtido usando os primers específicos para o filo *Euryarchaeota* (~20%) e para o filo *Chloroflexi* (bactérias verdes não sulfúreas), tendo sido obtidos 32 clones para cada um destes filios.

O terceiro maior número de clones obtidos foi obtido a partir dos primers específicos para *Proteobacterias* e *Deferribacter*, com 26 clones obtidos, cerca de 16% do total de clones obtidos. Para o filo *Firmicutes* foram obtidos 18 clones, 11% da totalidade de clones obtidos. Em relação ao filo *Spirochaetas* apenas foram obtidos 10 clones, cerca de 6% do total de clones obtidos.

Cerca de 34% dos clones obtidos foram amplificados a partir dos primers específicos para o domínio *Archaea* (*Euryarchaeota* e *Crenarchaeota*), onde estão contemplados os principais grupos de bactérias metanogénicas, responsáveis pela produção de metano, com 22 clones obtidos para o filo *Crenarchaeota*, e 32 clones obtidos para o filo das *Euryarchaeota*. Os dois filios em conjunto representam cerca de um terço do total de clones obtidos a partir das amostras provenientes deste reactor.

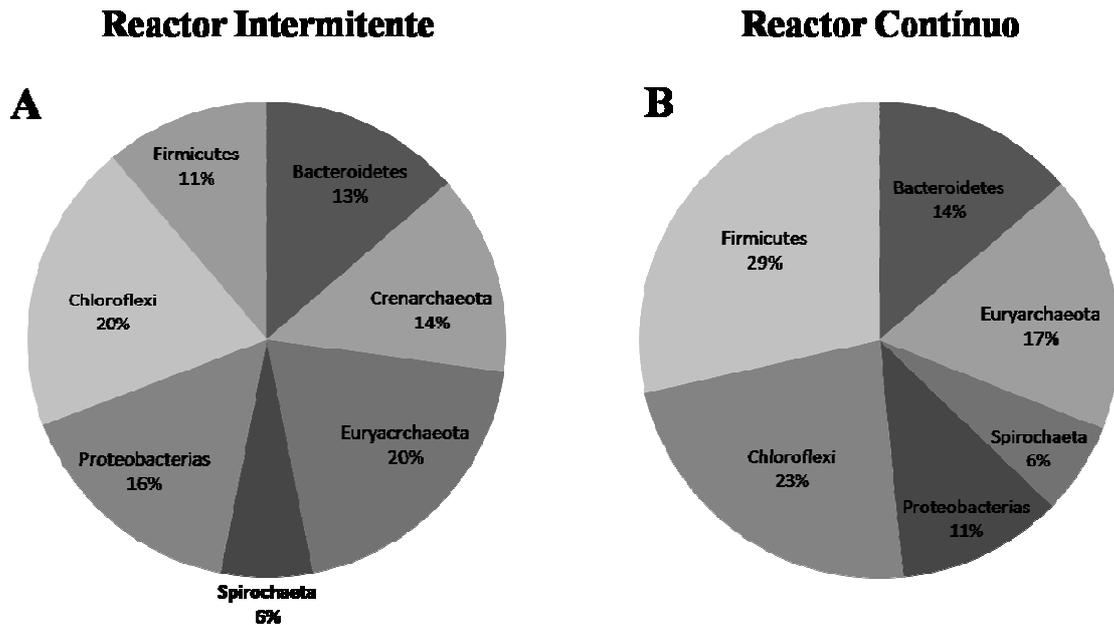


Fig. 3.2 – Representação gráfica do número total de clones obtidos por cada filo para o reactor a operar de modo intermitente (A) e para o reactor a operar de modo contínuo (B).

Para as amostras obtidas a partir do reactor a operar de modo contínuo (Fig. 3.2B) obteve-se um total de 161 clones, 46 dos quais (cerca de 29%) obtidos com os primers específicos para *Firmicutes*. O segundo maior grupo foi o filo *Chloroflexi*, 37 clones (cerca de 23%). Os dois grupos, *Firmicutes* e *Chloroflexi*, representam mais de 50% do número de clones obtidos para este reactor

Para os restantes grupos, o número de clones obtidos foi inferior, sendo o grupo das *Spirochaetas*, à semelhança do observado para o reactor a operar de modo intermitente, o grupo para o qual se obtiveram apenas 10 clones, cerca de 6% da totalidade de clones obtidos.

Para o filo *Euryarchaeota* foram obtidos um total de 28 clones, correspondendo a 17% do total de clones obtidos para as amostras provenientes deste reactor. Para as amostras provenientes deste reactor, e utilizando as mesmas condições utilizadas nas reacções de PCR com os primers específicos para o filo das *Crenarchaeota*, não se obteve nenhum clone. Para as amostras provenientes deste reactor, a percentagem de clones para os filios do domínio *Archaea* (*Euryarchaeota*), é significativamente inferior em comparação com a amostra proveniente do reactor a operar de forma intermitente.

3.3 Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP) dos clones obtidos

De modo a diferenciar os clones obtidos e minimizar as reacções de sequenciação, foi desenvolvida uma metodologia baseada na comparação dos perfis de restrição dos clones obtidos.

Esta técnica foi utilizada com o objectivo de avaliar se os fragmentos clonados apresentavam diferenças entre si, de modo a seleccionar o número mínimo de clones para sequenciação, permitindo assim, economizar tempo e recursos, permitindo a análise dos clones por um processo simples e rápido. Após obter os plamídeos purificados, estes foram sujeitos a uma hidrólise com a enzima de restrição *HaeIII*. Esta enzima reconhece a sequência GGCC e quebra a ligação fosfodiéster entre o G e o C. Além disso, devido à pequena sequência de reconhecimento, esta enzima vai originar um número de fragmentos de DNA relativamente elevado. Através da utilização desta enzima, obtiveram-se vários fragmentos de restrição para cada amostra, o que permitiu agrupar os clones em grupos com o mesmo perfil. A utilização desta estratégia permitiu evitar a sequenciação de clones com a mesma sequência, simplificando todo o processo de análise bioinformática e permitindo uma melhor gestão de recursos.

As Fig. 3.3 e Fig. 3.4, ilustram os diferentes perfis obtidos para o total de clones obtidos dos reactores a operar em modo intermitente e contínuo respectivamente. Os perfis serviram de base para classificar os diversos clones obtidos. Para a avaliação dos perfis, foi utilizado o *software* ImageLab 1D[®], de modo a avaliar pequenas diferenças ao nível das bandas dos perfis. De modo a caracterizar a população microbiana de cada um dos reactores, foi seleccionado um representante de cada um dos perfis para ser sequenciado. Para comprovar que perfis idênticos correspondem a sequências idênticas, foram seleccionados aleatoriamente 3 clones com perfis idênticos que foram enviados para sequenciação. A análise dos perfis das sequenciações obtidos mostrou que de facto eram idênticos (resultados não mostrados).

Utilizando esta estratégia, conseguimos distinguir entre a totalidade dos clones obtidos, 21 OTU's (Operational Taxonomic Unit), correspondentes aos 21 perfis diferentes encontrados para os clones obtidos a partir do DNA extraído do reactor intermitente (Fig. 3.3), e 28 OTU's a partir do reactor a operar de modo contínuo (Fig. 3.4). O total das OTUs é o total dos perfis diferentes encontrados entre todos os clones.

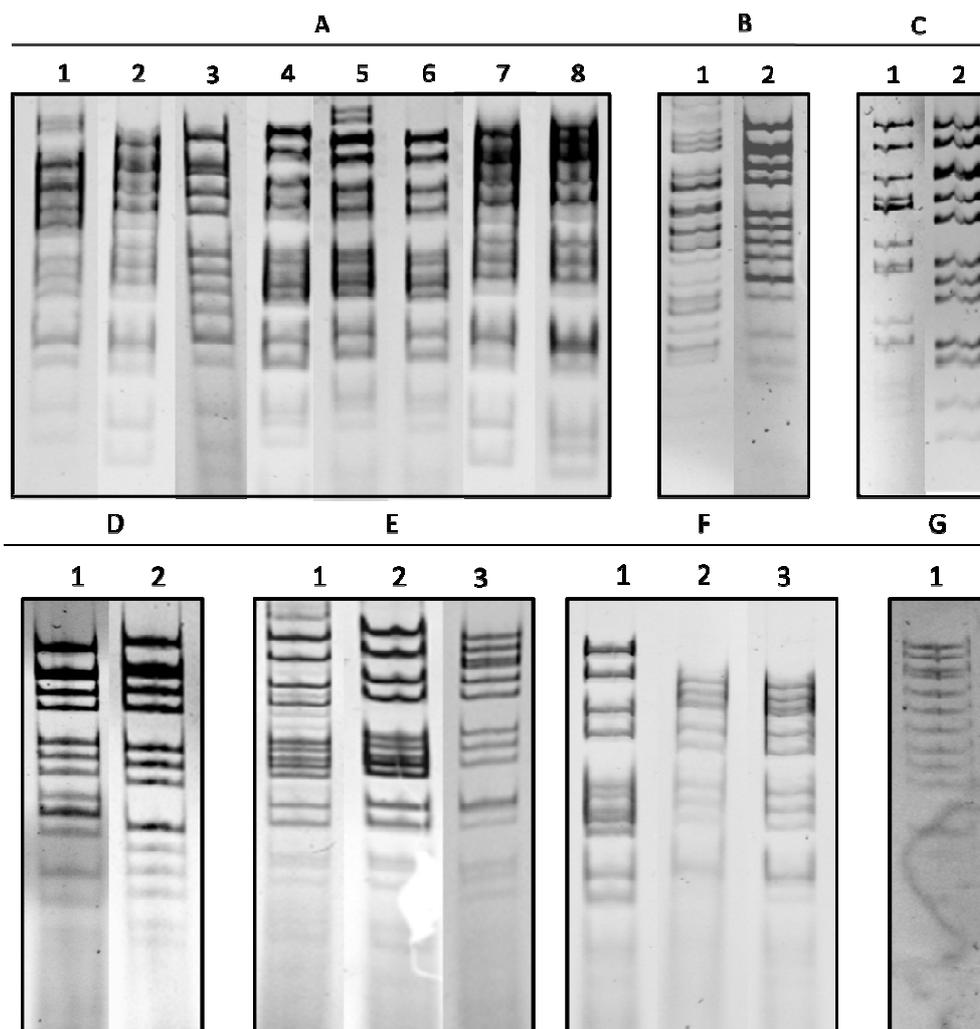


Fig. 3.3 – Perfis de restrição dos clones, após restrição com *HaeIII* e separação por electroforese em gel de poliacrilamida. Os clones foram obtidos a partir das amostras provenientes do reactor a operar em modo intermitente: **A**, *Chloroflexi*; **B**, *Firmicutes*; **C**, *Bacteroidetes*; **D**, *Spirochaetes*; **E**, *Proteobacteria e Deferribacteres*; **F**, *Euryarchaeota*, **G**, *Crenarchaeota*.

Para o reactor a operar de modo intermitente (Fig. 3.3) obtivemos 21 perfis diferentes, correspondente a 21 OTUs, identificadas a partir dos 162 clones obtidos. A maior diversidade de perfis pertence ao filo *Chloroflexi* (bactérias verdes não sulfúreas) (8 OTUs), sendo também o grupo com maior número de clones (32 clones).

Para as amostras provenientes do reactor a operar de modo contínuo (Fig. 3.4), observou-se que o grupo com maior representação de indivíduos é o filo *Firmicutes* (bactérias gram-positivas com baixo teor G+C), tanto em termos de diversidade de perfis, com 18 perfis diferentes (18 OTUs) como em número de clones (46 clones). Para o filo *Chloroflexi* (bactérias verdes não sulfúreas), que representa o segundo maior grupo, com 36 clones obtidos, apenas se identificaram 3 perfis diferentes (3 OTUs).

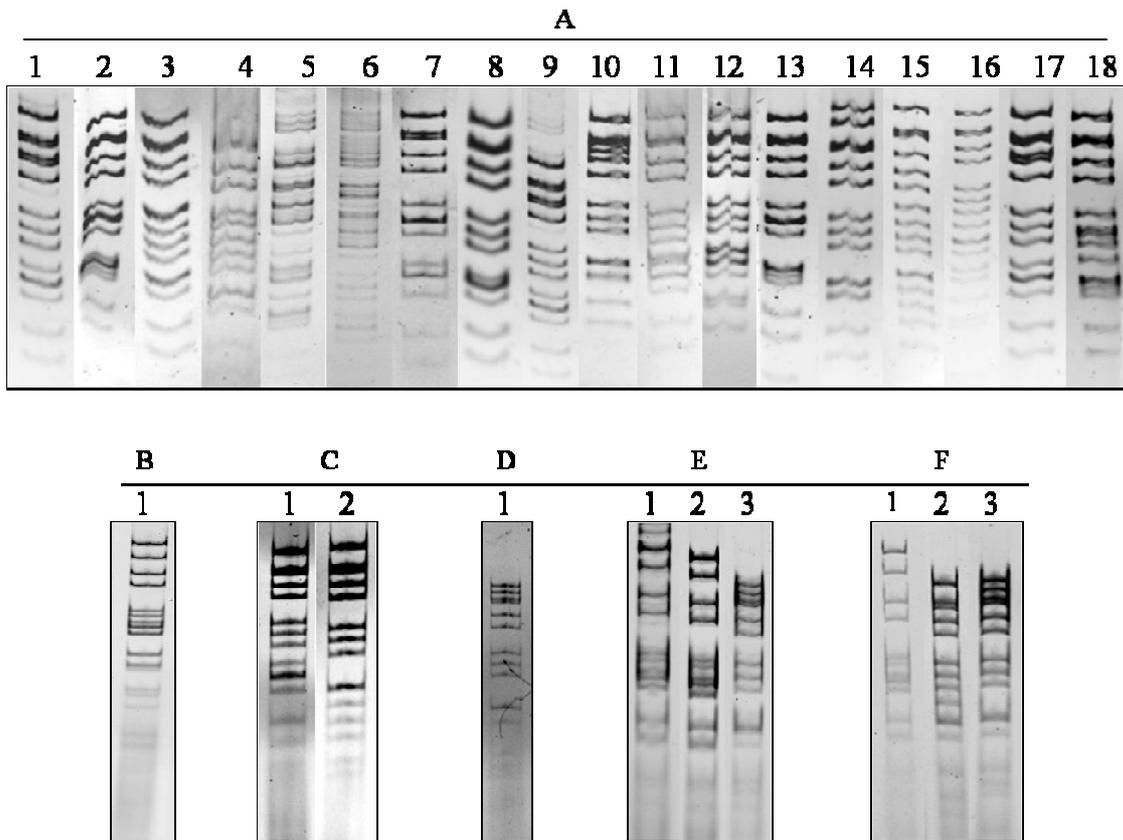


Fig. 3.4 – Perfis de restrição dos clones após restrição com *HaeIII* e separação por electroforese em gel de poliacrilamida. Os clones foram obtidos a partir das amostras provenientes do reactor a operar em modo contínuo: **A**, *Firmicutes*; **B**, *Bacteroidetes*; **C**, *Spirochaetes*; **D**, *Proteobacteria e Deferribacteres*; **E**, *Euryarchaeota*; **F**, *Chloroflexi*.

A introdução do passo de caracterização dos perfis de restrição dos clones antes das sequenciações destes permitiu a distinção dos vários perfis, evitando assim, sequenciar e analisar muitas sequências repetidas, obtendo-se assim uma melhor gestão de tempo e custos. Nas tabelas 3.3 e 3.4, encontram-se listados os resultados obtidos da análise das sequências nucleotídicas obtidas para os clones resultantes das amostras provenientes do reactor intermitente e contínuo.

3.4 Árvores filogenéticas

Tal como se mostrou nas Figs 3.3 e 3.4, um clone de cada um dos diferentes perfis foi sequenciado e as suas sequências analisadas por comparação em bases de dados específicas para sequências dos genes que codificam para o rRNA 16S. Para cada

sequência identificou-se o organismo cuja sequência do rRNA 16S é mais próximo no GenBank. Para atribuição de novas OTU's, foi considerado um limite máximo de 98% de identidade com sequência já existentes no GenBank (Skirnisdottir *et al*, 2000).

A partir das sequências obtidas, foram construídas árvores filogenéticas de modo a determinar quais as relações entre os principais grupos de microrganismos presentes nos dois tipos de reactores UASB. As Figs 3.5 e 3.6 representam as afiliações filogenéticas das OTU's obtidas a partir da sequenciação dos clones obtidos no presente trabalho.

Tabela 3.3 – Nome do clone, semelhante mais próximo, percentagem de semelhança, género mais próximo, número de clones e abundância relativa das 21 OTUs identificadas para o reactor anaeróbio a operar de modo intermitente.

Clone	Semelhante mais próximo do GenBank (nº de acesso)	Semelhança (%)	Genéro mais próximo	Nº de Clones	Abundancia relativa (%)
UASB_B1	Uncultured bacterium clone B9 (EU234163.1)	100	<i>Clostridium sp.</i>	12	7,4
UASB_B2	Uncultured bacterium clone S3-3 (FJ424348.1)	94	<i>Anaerofilum sp.</i>	10	6,2
UASB_C1	Uncultured bacterium clone: MBF4_36 (AB330862.1)	92	<i>Syntrophothermus sp.</i>	2	1,2
UASB_C2	Uncultured bacterium (AY340829.1,EF515193.1)	99	<i>Desulfovibrio sp.</i>	5	3,1
UASB_C3	Uncultured Chloroflexi (CU926801.1)	99	<i>Levilinea sp.</i>	7	4,3
UASB_C4	Uncultured bacterium clone SWADLP1-27 (FJ535512.1)	98	<i>Syntrophus sp.</i>	2	1,2
UASB_C5	Uncultured bacterium clone UTFS-R119-79 (GQ455715.1)	99	<i>Veillonella sp.</i>	2	1,2
UASB_C6	Syntrophomonas wolfei subsp. Saponavida (DQ666176.1)	99	<i>Syntrophomonas sp.</i>	2	1,2
UASB_C7	Uncultured bacterium clone SR_FBR_E70	99	<i>Desulfovibrio sp.</i>	7	4,3
UASB_C8	Uncultured Synergistetes bacterium (CU925553.1)	98	<i>Synergistes sp.</i>	5	3,1
UASB_CA1	Uncultured archaeon clone D242_ARC_0302_2_071 (AB447864.1)	99	<i>Methanosaeta sp.</i>	22	13,6
UASB_E1	Uncultured bacterium clone 16.8h_Day0_BacA_45 (AB447631.1)	99	<i>Propionibacterium sp.</i>	5	3,1
UASB_E2	Uncultured archaeon clone T1_9 (EU828446.1)	99	<i>Methanobacterium sp.</i>	5	3,1
UASB_E3	Uncultured archaeon clone T1_9 (EU828446.1)	100	<i>Methanobacterium sp.</i>	22	13,6
UASB_F1	Uncultured bacterium clone BHB03 (AB248632.1)	99	<i>Syntrophomonas sp.</i>	10	6,2
UASB_F2	Veillonellaceae bacterium WK011 (AB298743.2)	99	<i>Acidaminococcaceae</i>	8	4,9
UASB_P1	Uncultured bacterium clone BoI_b6c (EU996470.1)	100	<i>Enterobacteriaceae</i>	14	8,6
UASB_P2	Uncultured bacterium clone Saki_g05 (EU475800.1)	98	<i>Streptococcus sp.</i>	2	1,2
UASB_P3	Uncultured bacterium clone nbw1200g03c1 (GQ082142.1)	99	<i>Streptococcus sp.</i>	10	6,2
UASB_S1	Uncultured bacterium clone Turk_h4 (EU985338.1)	100	<i>Treponema sp.</i>	6	3,7
UASB_S2	Uncultured Treponema sp. (AB465691.1)	100	<i>Treponema sp.</i>	4	2,5

Tabela 3.4 – Nome do clone, semelhante mais próximo, percentagem de semelhança, género mais próximo, número de clones e abundância relativa das 28 OTUs identificadas para o reactor anaeróbio a operar de modo contínuo.

Clone	Sequência mais próxima (nº de acesso)	Genéro mais próximo	Semelhança (%)	Nº Clones	Abundancia relativa (%)
UASB_F1	Uncultured bacterium clone 1426 (AB286539.1.)	<i>Veillonella sp.</i>	99	8	5,0
UASB_F2	Uncultured bacterium clone: D242_27F_BAC4_058 (AB447756.1)	<i>Anaeromusa sp.</i>	100	2	1,2
UASB_F3	Uncultured bacterium BB1_d02_3 16S (EU772602.1)	<i>Streptococcus sp.</i>	95	6	3,7
UASB_F4	Uncultured bacterium clone UTFS-R119-26 (GQ455667.1)	<i>Lactococcus sp.</i>	99	1	0,6
UASB_F5	Uncultured Aminanaerobia bacterium (CU926925.1)	<i>Aminomonas sp.</i>	99	7	4,4
UASB_F6	Uncultured bacterium clone UTFS-R119-26 (GQ455667.1)	<i>Lactococcus sp.</i>	100	1	0,6
UASB_F7	Veillonellaceae bacterium (AB298743.2)	<i>Veillonella sp.</i>	99	6	3,7
UASB_F8	Uncultured bacterium clone aab17g12 (DQ816420.1)	<i>Enterobacter sp.</i>	99	1	0,6
UASB_F9	Unidentified bacterium 16.8h_Day0_BacA_45 (AB447631.1)	<i>Propionibacterium sp.</i>	100	1	0,6
UASB_F10	Lactococcus lactis strain KLDS4.0602 (GQ337894.1)	<i>Lactococcus sp.</i>	98	2	1,2
UASB_F11	Enterobacter sp. DIV158 (FN547808.1)	<i>Enterobacter sp.</i>	99	2	1,2
UASB_F12	Uncultured bacterium clone D242_27F_BAC2_012 (AB447718.1)	<i>Anaeromusa sp.</i>	99	1	0,6
UASB_F13	Uncultured bacterium D242_27F_BAC_010 (AB447693.1)	<i>Anaeromusa sp.</i>	100	2	1,2
UASB_F14	Uncultured Aminanaerobia bacterium (CU920846.1)	<i>Aminomonas sp.</i>	99	1	0,6
UASB_F15	Uncultured Aminanaerobia bacterium (CU920846.1)	<i>Aminomonas sp.</i>	99	2	1,2
UASB_F16	Uncultured bacterium clone 1337 (AB286503.1)	<i>Veillonella sp.</i>	99	1	0,6
UASB_F17	Uncultured bacterium (GQ264458.1)	<i>Enterobacter sp.</i>	99	1	0,6
UASB_F18	Uncultured Enterobacter sp. clone F5aug.9 (GQ416172.1)	<i>Enterobacter sp.</i>	99	1	0,6
UASB_B1	Uncultured bacterium clone B9 (EU234163.1)	<i>Clostridium sp.</i>	99	22	13,7
UASB_S1	Uncultured bacterium clone Turk_h4 (EU985338.1)	<i>Treponema sp.</i>	100	6	3,7
UASB_S2	Uncultured Treponema sp. (AB465691.1)	<i>Treponema sp.</i>	100	4	2,5
UASB_P1	Uncultured bacterium (EU993492.1)	<i>Klebsiella sp.</i>	100	18	11,2
UASB_E1	Uncultured archaeon clone T1_9 (EU828446.1)	<i>Methanobacterium sp.</i>	99	16	2,5
UASB_E2	Uncultured archaeon clone D242_ARC_0302_2_071 (AB447864.1)	<i>Methanosaeta sp.</i>	98	8	9,9
UASB_E3	Uncultured bacterium clone Bol_b6c (EU996470.1)	<i>Enterobacteriaceae</i>	100	4	5,0
UASB_C1	Uncultured bacterium clone Saki_g05 (EU475800.1)	<i>Streptococcus sp.</i>	98	12	7,5
UASB_C2	Uncultured bacterium clone: MBF4_36 (AB330862.1)	<i>Desulfosporosinus sp.</i>	92	18	11,2
UASB_C3	Uncultured bacterium clone SWADLP1-27 (FJ535512.1)	<i>Syntrophus sp.</i>	98	7	4,4

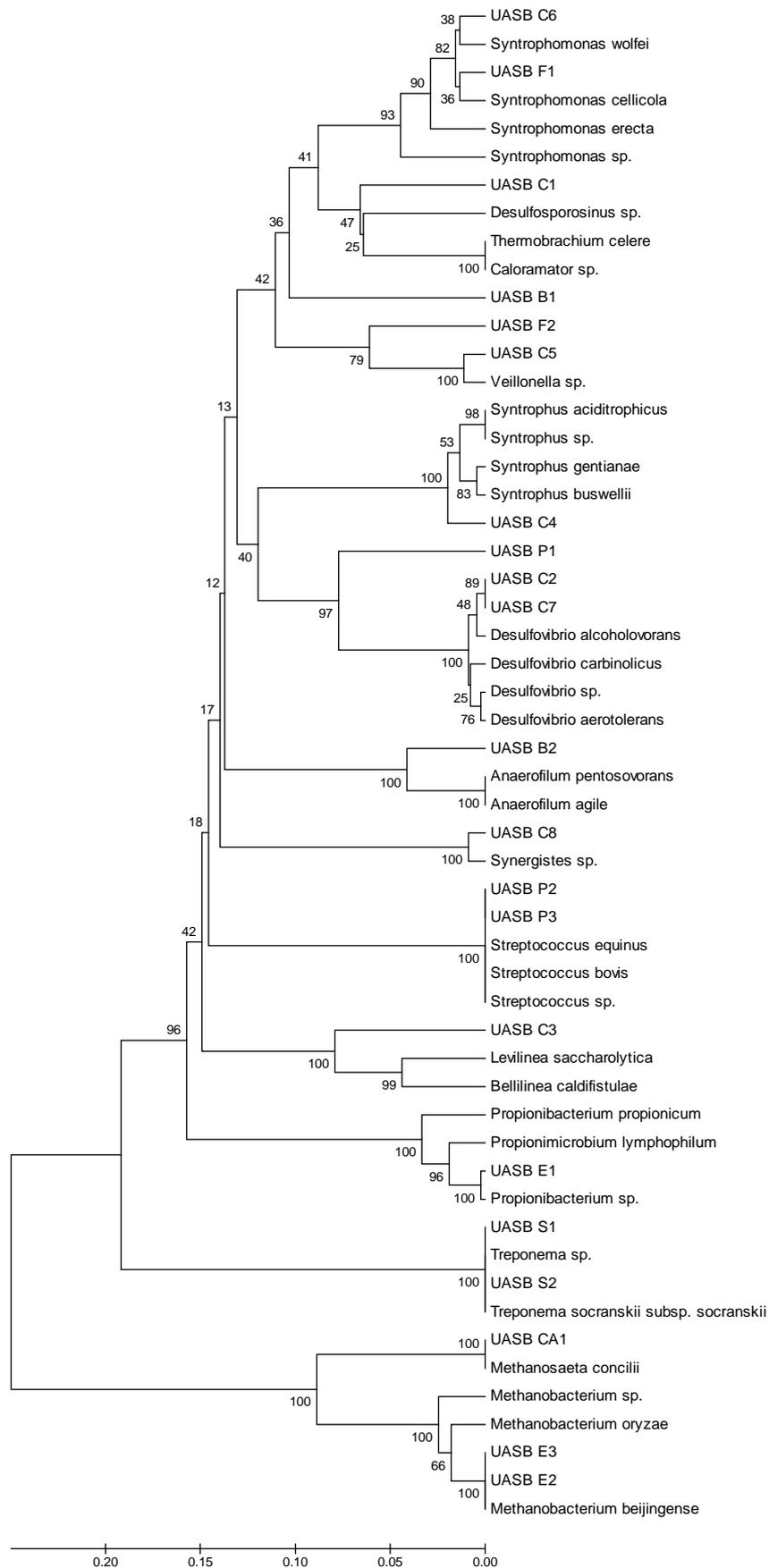


Fig. 3.5 – Árvore filogenética das 21 OTUs identificadas para o reactor anaeróbio a funcionar de modo intermitente, baseada nas proximidades relativas das sequências dos genes que codificam para o rRNA 16S. Os números em cada ramo representam os bootstraps. OTUs: UASB B1 a B2; UASB C1 a C8; UASB CA1; UASB E1 a E3; UASB F1 a F2; UASB P1 a P3 e UASB S1 a S2.

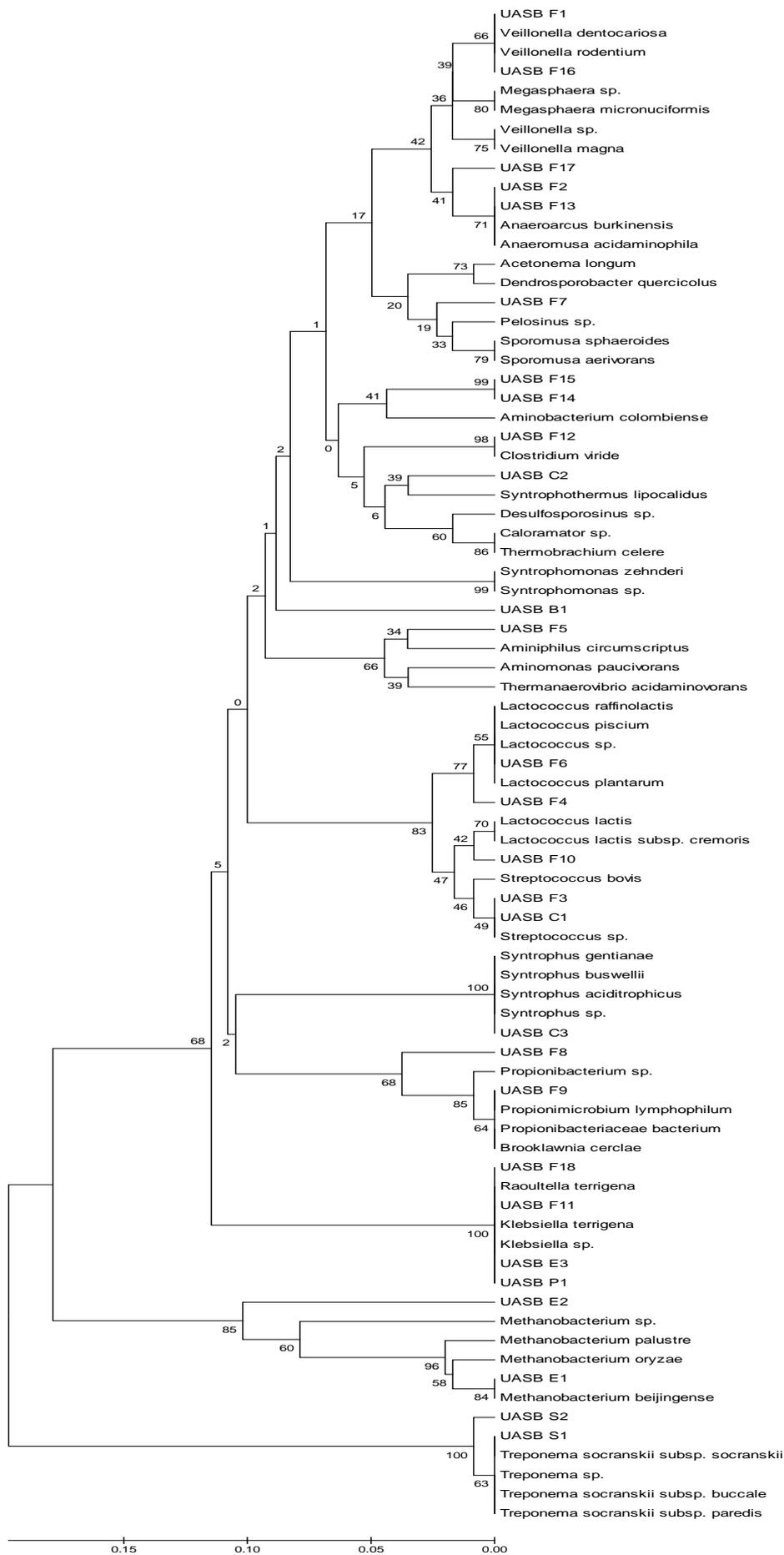


Fig. 3.6 – Árvore filogenética das 28 OTUs identificadas para o reactor anaeróbio a funcionar de modo contínuo, baseada nas proximidades relativas das sequências dos genes que codificam para o rRNA 16S. Os números em cada ramo representam os bootstraps. OTUs: UASB B1; UASB C1 a C3; UASB E1 a E3; UASB F1 a F18; UASB P1 e UASB S1 a S2.

4. Discussão dos Resultados

4.1 Desenho de primers específicos para os filós dos domínios *Archaea* e *Bacteria*

Para a realização deste trabalho foram desenhados primers específicos para cada um dos filós descritos por outros autores como os principais existentes em reactores anaeróbios (Narihiro e Sekiguchi, 2007). Os primers foram desenhados especificamente para as regiões constantes, que flanqueiam as regiões variáveis dos genes que codificam para o rRNA 16S dos organismos pertencentes aos filós *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Proteobacteria*, *Deferribacteres* e *Spirochaeta*, do domínio *Bacteria*, e para os filós *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota* do domínio *Archaea*. Os primers foram desenhados baseados nas sequências do rRNA 16S disponíveis para as espécies de cada um dos filós.

O alinhamento destas sequências permitiu identificar regiões consenso, que foram utilizadas para o desenho dos primers. Apesar da especificidade dos primers, e recorrendo a ferramentas bioinformáticas, foi verificado a possibilidade dos primers poderem amplificar sequências de espécies que não pertençam ao filo específico para esse primer. Este fenómeno foi verificado em algumas situações, mas de modo geral, os primers desenhados amplificaram sequências para as quais foram especificamente desenhados.

A utilização de primers específicos para cada um dos filós considerados, pode limitar a caracterização das populações microbianas presentes nos reactores em análise. De facto, organismos que possuem genes para rRNA 16S que não apresentam homologia com os primers utilizados não são detectados pela metodologia utilizada. Tendo em conta esta limitação, serão efectuados futuramente estudos em que serão utilizados primers considerados universais para organismos do domínio *Bacteria* e para o domínio *Archaea*.

4.2 Comunidades microbianas em reactores UASB

O conhecimento sobre as populações microbianas em reactores UASB é essencial para um melhor controlo e optimização da performance dos processos microbiológicos que decorrem dentro destes reactores. Nos últimos anos, têm vindo a ser alcançados avanços consideráveis sobre a composição e organização destas populações microbianas, usando abordagens moleculares independentes de cultura. O conhecimento das populações microbianas presentes nos dois tipos de reactores, em que um reactor opera de uma forma intermitente, e outro de forma contínua, permitirá perceber as flutuações nas populações microbianas em associação com o modo de funcionamento. Este conhecimento é de extrema importância prática na correcção de anomalias do funcionamento dos reactores devido a causas como por exemplo, variações bruscas na composição das águas residuais a tratar.

No conjunto das duas amostras recolhidas, as bactérias gram-positivas representam o maior grupo filogenético presente dentro dos bioreactores, para o qual se obteve um maior número de espécies e de clones, em particular, no caso do reactor contínuo. Em reactores para tratamento de desperdícios urbanos, foi descrito um grande domínio de microrganismos pertencentes ao filo *Firmicutes* (Cardinali-Rezende *et al.*, 2009). O filo *Firmicutes* compreende um enorme número de microrganismos bastante diverso, tanto no meio natural como em habitats anaeróbios artificiais, sendo capazes de degradar uma vasta gama de substâncias orgânicas complexas, incluído proteínas e carboidratos (Wiegel *et al.*, 2005). A caracterização molecular de populações microbianas em amostras de estações de tratamento de esgotos municipais revelou também uma predominância de microrganismos deste filo (Weiss *et al.*, 2009). A presença de vários géneros contendo microrganismos anaeróbios estritos e facultativos, tem vindo a ser descrita em reactores anaeróbios.

O género *Clostridium*, por exemplo, tem sido frequentemente encontrado em lamas de reactores anaeróbios que usam glucose, propionato, butirato e acetato como substratos (Ariesyady *et al.* 2007).

Outro grupo de interesse é o género *Syntrophomonas*, bem como outros grupos semelhantes, responsáveis pela metabolização de ácidos gordos. Sabe-se que as gorduras e os ácidos gordos presentes nos efluentes de lacticínios exercem acção inibidora dos processos anaeróbios, o que exige uma população microbiológica altamente especializada para a degradação destes compostos. A solução adoptada para

ultrapassar estas dificuldades pode ser a funcionamento intermitente, que consiste em interromper a alimentação, por um certo período de tempo (período de estabilização), permitindo assim a degradação biológica da matéria orgânica acumulada de degradação mais lenta

Neste caso particular, em que os dois reactores em estudo foram otimizados para tratamento de águas residuais provenientes das indústrias de lacticínios, a presença destes grupos de microrganismos é fundamental. As gorduras presentes no efluente podem aderir aos agregados microbianos que fazem parte da biomassa dos reactores, provocando a sua flutuação e a consequente saída destes para fora do sistema, comprometendo de forma irremediável o funcionamento do reactor. O processo de degradação dos ácidos gordos por parte deste grupo de microrganismos, apenas ocorre devido á relação de sintrofismo que estabelecem com o grupo dos microrganismos metanogénicos.

O segundo filo com maior representatividade no conjunto das duas amostras foi o filo *Chloroflexi* (bactérias verdes não-sulfúreas). Bactérias pertencentes a este filo, também têm sido detectadas em bioreactores anaeróbios (Sekiguchi et al., 1998, 2001; Roest et al. 2005; Díaz et al. 2006). Os microrganismos pertencentes a este filo apresentam um papel muito importante na degradação de matéria orgânica uma vez que são constantemente encontrados nos grânulos das lamas no interior de bioreactores anaeróbios. Às bactérias verdes não sulfúreas filamentosas, isoladas a partir de reactores termofílicos tem sido atribuído um papel importante na fermentação dos carboidratos e o seu envolvimento, directo ou indirecto, na degradação do butirato (Roest et al. 2005).

No entanto, vários autores encontraram números representativos de OTUs (Operational Taxonomic Unit) relacionados com *Proteobacteria* e *Bacteroidetes*. No presente estudo, foi obtido para estes 2 filios, um número reduzido de perfis, sugerindo uma reduzida diversidade microbiana relativamente a estes dois filios.

Um número significativo de clones relacionados com o filo *Euryarchaeota* foi obtido no presente trabalho, em concordância com a capacidade metanogénica da biomassa presente nos reactores. No entanto, a análise de restrição revelou apenas 3 perfis diferentes, 2 deles relacionados com a espécie *Methanobacterium beijingense* e com uma espécie não identificada pertencente ao género *Methanosaeta*. A análise da sequência nucleotídica do terceiro perfil revelou 100% de identidade com a sequência de um microrganismo não cultivado obtida a partir da cavidade oral humana identificada no decurso de um estudo de metanogenómica (Nasidze et al, 2009).

Dentro dos grupos de maior interesse, no reactor a operar de modo intermitente, confirmamos a presença do género *Methanobacterium*, grupo de bactérias responsável pela produção de metano. Um dos grandes grupos metabólicos identificados nesta amostra, são pertencentes ao género *Syntrophomonas* e *Syntrophus*, que contempla bactérias responsáveis pela degradação dos ácidos gordos. Utilizando os primers especificamente desenhados para o filo *Crenarchaeota*, não foi possível obter amplificados usando as amostras do reactor UASB a operar de modo contínuo, o que sugere que organismos do filo *Crenarchaeota* não estão presente neste reactor.

4.3 Reactor Intermitente vs. Contínuo

A população microbiana presente num reactor anaeróbio é responsável pelos processos metabólicos que ocorrerem no seu interior. Esta população é influenciada próprias condições operacionais do reactor, bem como pela natureza e composição da matéria orgânica que entra no reactor. Neste trabalho, foram analisadas amostras provenientes de dois reactores que foram otimizados para o tratamento de águas residuais provenientes da indústria dos lacticínios, com diferentes características de operacionalidade.

As condições de em que os reactores de degradação anaeróbia de matéria orgânica operam, bem como a origem da água residual, representam os factores fundamentais que determinam as características da população de microrganismos que se estabelece no interior destes reactores.

Resultados anteriores tinham verificado que a taxa de metanização para o reactor intermitente era superior à observada para o reactor contínuo; o objectivo deste trabalho foi de comparar as populações microbianas nos dois tipos de reactor de forma a poder relacioná-las com aquele dado.

Consistentemente, a percentagem de clones obtidos usando os primers específicos para *Archaea* foi superior quando se usou o DNA extraído das amostras provenientes do reactor intermitente. Acresce o facto de que apenas se obtiveram clones contendo DNA de *Euryarchaeota* quando se usaram amostras do reactor contínuo. De referir que, embora consistente com o desempenho dos reactores, estas observações padecem do facto de o número de clones não poder ser directamente relacionado com a abundância relativa das espécies. Para tal, a técnica quantitativa utilizada é o FISH

(*Fluorescence In Situ Hybridization*), que permite quantificar a abundância relativa de um grupo de microrganismos (para os quais a sonda fluorescente a usar é específica) numa dada população. A construção destas sondas para a futura quantificação da abundância relativa dos diversos grupos de microrganismos das amostras provenientes dos dois tipos de reactores está em curso.

Outro desempenho no qual os reactores foram testados foi na capacidade de degradação dos ácidos gordos. No reactor a operar de modo intermitente foi possível verificar um melhor desempenho neste processo. Sendo o grupo dos microrganismos pertencente ao género *Syntrophomonas* e *Syntrophus*, que contempla bactérias responsáveis pela degradação dos ácidos gordos, foi possível detectar a presença de espécies pertencentes a estes dois géneros em maior quantidade no reactor a operar de modo intermitente. Será portanto, a diferença da comunidade microbiana ao nível destes grupos de microrganismos, influenciado pelo modo de operação do reactor, que dará um maior rendimento ao reactor a operar de modo intermitente, uma vez que uma pausa durante o processo, vai fazer com que estes grupos de microrganismos se consigam estabelecer ao longo de todo o processo. O processo de degradação dos ácidos gordos, por parte destes microrganismos, apenas ocorre na presença de bactérias metanogénicas, uma vez que estes dois grupos de organismos agem em sintrofia, o que vem confirmar os resultados obtidos para o reactor a operar em modo intermitente. A existência de um maior número de bactérias metanogénicas vai permitir o crescimento e o processo de degradação dos ácidos gordos, por parte do grupo de microrganismos responsáveis por este processo metabólico.

4.4 Perfis de Restrição de Clone em Gel de Poliacrilamida

No presente trabalho, a abordagem utilizada para a caracterização molecular da população microbiana presente em reactores anaeróbios, teve como base a utilização de uma metodologia que combina técnicas clássicas de biologia molecular (extração de DNA, clonagem e sequenciação) com a análise dos perfis de restrição dos clones, obtidos após hidrólise com *HaeIII* e separados em gel de poliacrilamida de modo a minimizar o número de sequenciações.

A metodologia utilizada neste estudo apresenta algumas limitações, podendo resultar na introdução de erros principalmente durante a amostragem e durante as

reações de PCR. Na metodologia utilizada foi introduzido um passo de homogeneização das amostras, utilizando os ultra-sons, com o objectivo de libertar os microrganismos presos no interior dos grânulos, de modo a minimizar os erros causados pela amostragem. No entanto, os erros introduzidos pelas reações de PCR são mais difíceis de superar. Estes erros resultam principalmente devido ao número de cópias dos genes que codificam para o rRNA 16S, que diferem de espécie para espécie, e devido à especificidade dos primers utilizados, os quais formam naturalmente heteroduplexes com diferente alvos de DNA com diferentes especificidades, como foi verificado por outros autores (Dahllöf, 2002; von Wintzingerode *et al.*, 1997).

Para a análise dos RFLPs, utilizou-se a enzima *HaeIII* que reconhece uma sequência de 4 nucleótidos. A metodologia utilizada neste trabalho pode ser adoptada para caracterizar outras populações microbianas. Neste caso, a escolha de enzimas que originam múltiplos cortes devem ser consideradas. A utilização de uma única enzima de restrição mostrou ser eficiente. Mais do que uma enzima poderá ser utilizada, muito provavelmente aumentando a discriminação dos clones.

A técnica PCR-DGGE poderia ter sido utilizada na realização deste trabalho, sendo a mais utilizada em biologia molecular para caracterizar populações microbianas. No entanto, algumas limitações tem vindo a ser apontadas a esta técnica, nomeadamente a introdução de erros na amostragem, nos métodos de extracção de DNA e na amplificação por PCR, limitações equivalentes às limitações da metodologia utilizada no presente trabalho. No entanto, limitações adicionais como por exemplo, dificuldades técnicas na preparação dos géis de gradiente desnaturante os quais requerem pessoal qualificado, a limitação a fragmentos não superiores a 500 bp, a formação de heteroduplexes e a co-migração de fragmentos de DNA diferentes têm de ser considerados no caso do PCR-DGGE (Ercolini, 2004).

Em conclusão, neste trabalho utilizamos uma metodologia combinando o desenho de primers, amplificação por PCR, e sequenciação de clones previamente seleccionados a partir da análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição das sequências clonadas, de modo a determinar a diversidade microbiana residente em reactores USB. A metodologia aqui descrita, apesar de baseada em métodos convencionais, tem a vantagem de não requerer pessoal particularmente qualificado, permite minimizar o número de sequenciações e pode ser facilmente adaptada a outros estudos para determinar a diversidade microbiana em amostras de diferentes origens.

Utilizando esta metodologia, em conjunto com os primers desenhados especificamente para os principais grupos metabólicos de microrganismos presentes nos reactores anaeróbios, conseguimos um total de 323 clones. A caracterização pelos perfis de restrição permitiu a identificação de 21 perfis diferentes para o reactor a operar em modo intermitente e 28 perfis diferentes no reactor a operar em modo contínuo, ilustrando assim a vantagem de caracterização dos perfis, de restrição dos clones, antes das reacções de sequenciação.

Referências

- Akkermans, A. D., Van Elsas, J. D. e De Bruijn, F. J.** (1996) *Molecular Microbial Ecology Manual*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. e Lipman, D. J.** (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol Biol.* **215**:403-410
- Anderson, I. e Cairney, J.** (2004) Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ Microbiol* **6**:796-779
- Angelidaki, I., Ellegard, L. e Ahring, B. K.** (1999) A comprehensive model of anaerobic bioconversion of complex substrates to biogas. *Biotechnol. Bioeng.* **63**: 363-372.
- Chynoweth, D. P. e Isaacson, H. R.** (1987), *Anaerobic Digestion of Biomass*, Elsevier, New York, Applied Science Publishers Ltd. 1987
- Dahllöf, I.** (2002) Molecular community analysis of microbial diversity. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**: 213-217
- Drake, H., Küsel, K. e Matthies, C.** (2002) Ecological consequences of the phylogenetic and physiological diversities of acetogens. *Antonie van Leeuwenhoek*, **81**:203-213
- El-Mamouni, R., Leduc, R., e Guiot, S. R.** (1997) Influence of the strating microbial nucleous type pm the anaerobic granulation Dynamics. *Appl. Microb. Biotech.* **47**:189-194
- Erconi, D.** (2004) PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Methods* **56**: 297-314
- Fehrenbach, H., Giegrish, J., Reinhardt, G., Sayer, U., Gretz, M., Lanje K. Schmitz J.** (2008) Kriterien einer nachhaltigen Bioenergienutzung im globalen Maßstab. UBA-Forschungsbericht **206**: 41-112
- Field, J.** (2002) Anaerobic Sludge Bed Technology Pages. Reatrived 16 May 2008, from www.uasb.org/dicover/dicorver.htm
- Franklin, R. J.** (2001) Full-scale experiences with anaerobic treatment of industrial wastewaters. *Wat. Sci. Tech.* **44**: 1-6.
- Gerardi, M. H.** (2003) *The Microbiology of Anaerobic Bioreactors*. P. 3. *New Jersey: John Wiley and Sons Inc.*
- Gunjer, W. e Zehnder, A. J. B.** (1983) Conversion processes in anaerobic granular sludge. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Head, I. M., Saunders J. R., Pickup, R. W.** (1998) Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbiol. Ecol.* **35**: 1-21
- Kato, M., Field, J. A., Versteeg, P. e Lettinga, G.** (1994) Feasibility of the expanded granular sludge bed (EGSB) reactors for the anaerobic treatment of low strength soluble wastewaters. *Biotech. Bioeng.* **44**:469-479
- Kirk, J., Beaudette, L., Hart, M., Moutoglis, P.** (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol Methods* **58**:169-188
- Kleerebezem, R. e Macarie, H.** (2003) Treating industrial wastewater: anaerobic digestion comes of ages. *Chem. Eng.* April, 56-64

- Lema, J. M. e Omil, F.** (2001) Anaerobic Treatment: a key technology for a sustainable management of wastes in Europe. *Wat. Sci. Tech.* **44**: 133-140
- Lettinga G.** (1995) Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. *Antonie van Leeuwenhoek*, **67**: 3-28
- Lettinga, G. e Hulshoff Pol, L.W.** (1991) UASB process design for various types of wastewaters. *Water. Sci. Technol.* **24**:87-107
- Lettinga, G., Rebc, S., Parshina, S., Nozhevnikova, A., Van Lier, J. B., e Stams AJM** (1999) High-rate anaerobic treatment of wastewaters at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1696-1702
- Lettinga, G., van Velsen, A. F. M., Hobma, S. W., De Zeeuw, W. and Klapwijk, A.** (1980) Use of upflow sludge blanket reactor concept for biological waste water treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotech. Bioeng.* **22**: 699-734
- Lin, K. e Yang, Z.** (1991) Technical review on the UASB process. *Int. J. Environ. Stud.* **39**: 203-222
- Lyberatos, G. e Skiadas, I.V.** (1999) Modelling of anaerobic digestion – a review. *Global Nest: the Int. J- VOL 1*, No 2, 63-76.
- McCarty, P. L.** (2001) The Development of Anaerobic Treatment and its Future. *Anaerobic Digestion for sustainable development* **1**:163-170
- Narihiro, T. e Sekiguchi, Y.** (2007) Microbial communities in anaerobic digestion processes for waste and wastewater treatment. A microbiological update. *Curr. Opin. Microbiol.* **18**: 273-278
- Price, E. C.** (1985) The Microbiology of anaerobic digestion. *In: Biotechnological Applications In Research*. Pp. 52-59. Network: New Jersey Institute of Technology
- Sambrook, I. e Russel, D. W.** (2001). *Molecular cloning: a laboratorial Manuel*. Third Edition, Gold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Vol. 1, 2 and 3
- Sam-Soon, P., Loewenthal, R. E., Wentzel, M. C. e Marais, G. R.** (1990) Growth of biopellets on glucose in upflow anaerobic sludge bed (UASB) systems. *Wat. SA*, **16**:151-163
- Schink, B.** (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:262-280
- Siegrist, H., Renggli, D. e Gujer, W.** (1993) Mathematical modeling of anaerobic mesophilic sewage sludge treatment. *Wat. Sci Technol.* **27**:25-36
- Stams, A. J. M.** (1994) Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie van Leeuwenhoek* **66**:271-294
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. e Gibson, T. J.** (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680
- Torsvik, V., Daae, F.L., Sandaa, R.-A. e Ovreas, L.** (1998) Review article: novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotechnol.* **64**: 53-62
- von Wintzingerode, F., Goebel, U. B., Stackebrandt, E.** (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 213-229.
- Wiegant, W. M. e De Man, A.W.** (1986) Granulation of biomass in thermophilic anaerobic sludge blanket reactors. *Biotech. Bioeng.* **28**: 718-727.