

ANÁLISE DA POPULAÇÃO DE ARQUEAS METANOGENICAS NO LODO DE REATOR UASB ALIMENTADO COM DEJETOS DE SUÍNOS UTILIZANDO A ELETROFORESE EM GEL COM GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE)

Rodrigues, L.S.¹; Silva, I.J.²; Marriel, I.E.³; Neves A.O.⁴; Matias, C.F.Q.⁵; Crisóstomo, C.M.⁶

¹Engenheiro Agrícola, UFMG, Av. Antônio Carlos 6627, 30123-970, Belo Horizonte-MG Brasil, lsantosrodrigues@gmail.com

²Professor Associado da UFMG, Av. Antônio Carlos 6627, 30123-970, Belo Horizonte-MG Brasil, israelvp@gmail.com

³Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km 45, 35701-970, Sete Lagoas-MG Brasil, imarriel@cnpms.embrapa.br

⁴Bolsista DTI, Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km 45, 35701-970, Sete Lagoas-MG Brasil, Amandaneves1981@yahoo.com.br

⁵Graduanda da UFMG em Médica Veterinária, Av. Antônio Carlos 6627, 30123-970, Belo Horizonte-MG Brasil, cristyelecrisostomo@yahoo.com.br

⁶Graduanda da UFMG em Médica Veterinária, Av. Antônio Carlos 6627, 30123-970, Belo Horizonte-MG Brasil, christianematias@hotmail.com

Resumo

Foi realizada a caracterização microbiana, por meio de técnicas de biologia molecular, do lodo anaeróbico de um reator UASB de volume 12 m³ alimentado com dejetos de suínos operado em condições mesofílicas com TDH médio de 72 h. Essa caracterização foi realizada no lodo ao longo do compartimento de digestão por meio de sete pontos equidistantes entre si em 0,40 cm (P1 mais próximo ao fundo a P7). A caracterização microbiana foi realizada por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). Posteriormente serão feitos o sequenciamento e análise filogenética com o objetivo de identificar os grupos de microrganismos predominantes nas amostras. Até o momento observou-se a presença de cinco grupos de bandas de Archae em todos os perfis, sendo que o número de bandas totais encontrados nos perfis das amostras decresce à medida que se aumenta o nível na coluna do reator. Também foi constatada uma diversidade relativamente baixa de arqueas nas amostras de lodo, que pode está associada à estabilização do ambiente no reator.

Palavras-chave: resíduos animais, archae, biologia molecular.

Abstract

A microbial characterization of sludge from an upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) supplied with swine wastewater was carried out by Molecular Biology techniques. The reactor, with 12 m³ of volume, was operated with HRT of 72 h under mesophilic conditions. The sludge samples were withdrawn from the digestion compartment in seven points, 0.40 cm equidistant (P1 to P7). The microbial characterization was carried out by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Subsequently, the sequencing and phylogenetic analysis will be made, in order to

identify predominant microorganisms. Up to now, it was observed the presence of five archaea band groups in all profiles. All bands found in the samples profile decrease as the level of the reactor column increases. A low diversity of archaea in sludge samples was found, which can be related to the stabilization of the ambient in the reactor.

Key-words: animal waste, archaea, molecular biology.

Introdução

As técnicas de biologia molecular, tais como reação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH), são utilizadas para identificação específica, quantificação, caracterização da estrutura e da distribuição espacial da comunidade microbiana presente em amostras complexas, inclusive lodos e biofilmes (Amann et al., 1995, Muyzer e Smala, 1998). Estes estudos são de grande relevância para projeto e otimização dos sistemas de tratamento de águas residuárias, pois os microrganismos são, em grande parte, agentes responsáveis por promover os processos de degradação de muitos compostos orgânicos e inorgânicos (Hirasawa, 2007).

Estas técnicas tem sido aplicadas mais rotineiramente para investigar e monitorar comunidades microbianas complexas, contornando problemas associados com métodos tradicionais que dependem de cultivos prévios de microrganismos (Amann et al., 1995).

Essas ferramentas podem ser muito úteis nos reatores anaeróbios, na qual a estabilidade e eficiência são fortemente dependentes das interações das comunidades microbianas, uma vez que podem fornecer subsídios para estabelecer a conexão entre a estrutura microbiana e as características funcionais do sistema (Pereira et al., 2002).

Nesse sentido este trabalho visa caracterizar a população microbiana presente no lodo ao longo da altura do compartimento de digestão de um reator UASB alimentado com dejetos de suínos. Tais resultados visam contribuir no entendimento da dinâmica populacional e nas condições de operacionais do processo.

Materiais e Métodos

Foram avaliadas sete amostras, em duplicatas, coletadas em diferentes alturas (P1 a P7) de um reator alimentado com dejetos de suínos. Após a coleta, as amostras foram conservadas individualmente a 4 °C até o processamento.

As amostras foram centrifugadas e o pellet formado foi utilizado para extração de DNA total. Aproximadamente 0,5g do pellet foi utilizado para extração de DNA, utilizando-se o “Fast Kit DNA for soil” BIO 101, de acordo com as recomendações do fabricante. A detecção de DNA nas amostras foi efetuada em gel de agarose 2%.

Para a amplificação das amostras de DNA foram utilizados os *primers* genéricos para bactérias 968F (acrescido de uma seqüência de CG denominada

“clamp”) juntamente com o 1401R. Em seguida efetuou-se um segundo PCR, (“nested” PCR), com os primers para arqueas metanogênicas, Ar4F e 1492R. A análise da diversidade destes microrganismos foi avaliada em uma unidade de eletroforese DGGE da Biorad (Richmond, USA), sendo os produtos de PCR aplicados em gel contendo 6% de poliacrilamida. O gradiente de desnaturantes (uréia e formamida deionizada) foi de 35% a 65%. Os gradientes foram formados a partir de soluções estoque de poliacrilamida (6%) contendo 0% e 100% de desnaturantes. As condições da eletroforese foram de 16h a 60°C e 100V. Após a eletroforese os géis foram corados por Brometo de Etídio e fotografados em fotodocumentador Stratagene modelo Eagle Eye II. A comparação dos perfis das comunidades após o DGGE foi realizada com a obtenção dos padrões de amplicons obtidos através do software Statistica versão 5.0 (1995), utilizando-se UPGMA (“unweighted pair-group average”) e o coeficiente de Dice.

Os produtos da PCR foram purificados utilizando os kits comerciais e estão conservados para o sequenciamento e afiliação filogenética dos microrganismos predominantes das amostras.

Resultados e Discussão

Em todas as amostras analisadas foi possível detectar presença de DNA e os produtos da amplificação pela PCR para bactérias e arqueas (Figura 1 e 2).

No perfil eletroforético de bandas no DGGE a partir dos produtos de PCR com os primers para arqueas nota-se a presença de cinco grupos de bandas (posição 1, 2,3,4 e 5) de Archae em todos os perfis. As bandas na posição 1, 3 e 5 estão presentes nos perfis de todas as amostras. Já as bandas nas posições 2 perdem a intensidade a partir do perfil do tratamento P2R2. As bandas presentes na posição 4 perdem a intensidade a partir do tratamento P4R2. O número de bandas totais encontrados nos perfis das amostras decresce à medida que ocorre o aumento no nível do reator.

A diversidade relativamente baixa (numero de bandas no gel) observada nas amostras pode estar associada à estabilização do ambiente no reator. A identificação dos grupos predominantes será realizada através da análise de sequenciamento que se encontra em andamento. Também será obtido o perfil eletroforético de bandas no DGGE através da amplificação do DNA total extraído de amostras de dejetos de suínos com os primers universais da região 16S: 968F CG e 1401R para bactérias.

Conclusões

Até o momento podemos concluir que ocorreu predominância das arqueas em relação a outros microrganismos no reator UASB, evidenciando a fase metanogênica.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de doutorado concedida, e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pelo apoio técnico.

Literatura Citada

MUYERS, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel eletrophoresis (DGGE) and temperature gradiente gel eletrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, **Delft**, v. 73, p. 127-141. 1998.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Philogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, n. 59, p. 143-169. 1995.

PEREIRA, M.A.; ROEST, K.; STAMS, A.J.M.; ALVES, M.; AKKERMANS, A.D.L. Molecular monitoring of microbial diversity in expanded granular sludge bed (EGSB) reactors treating oleic acid. **FEMS Microbiology Ecology**, n. 41, p. 95-103. 2002.

HIRASAWA, J.S. **Avaliação da metanogênese e sulfetogênese na presença de oxigênio, sob diferentes relações etanol/sulfato, utilizando técnicas de Biologia molecular**. 2007. 134 f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Paulo.

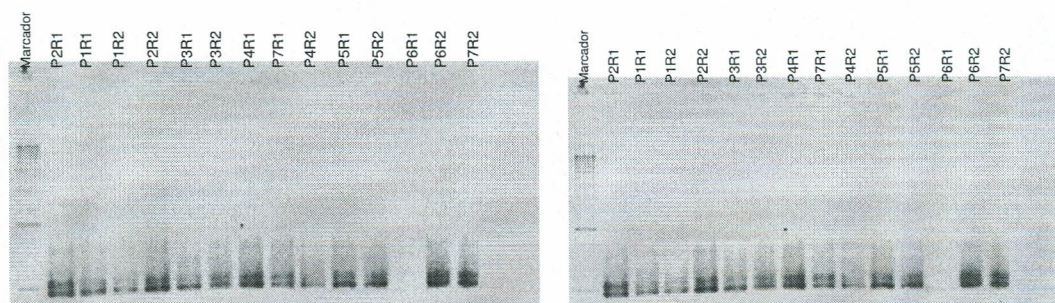


Figura 1. Produtos de amplificação de DNA de amostras de dejetos de suínos, com da região 16S com os primers universais para bactérias; 968F CG x 1401R (29/01/08; UFMG).

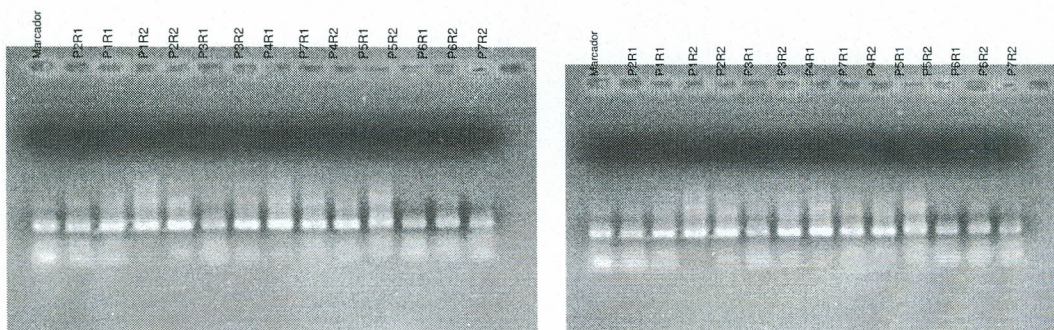


Figura 2. Gel de confirmação de amplificação realizada em 28/03/08 da região 16S com os primers específicos AR4F CG x UN1492R (archae) em amostras de dejetos de suínos (UFMG).