Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Caracterização da comunidade bacteriana em água subterrânea contaminada
com tetracloroetano**

Rafael Dutra de Armas

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Armas, Rafael Dutra de

Caracterização da comunidade bacteriana em água subterrânea contaminada com
Tetracloreto / Rafael Dutra de Armas. - - Piracicaba, 2007.
87 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Águas subterrâneas – Remediação 2. Poluição da água I. Título

CDD 628.16

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Rafael Dutra de Armas

Biólogo

**Caracterização da comunidade bacteriana em água subterrânea contaminada com
tetracloroeteno**

Orientador:

Prof. Dr. **MARCIO RODRIGUES LAMBAIS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba

2007

Dedico este trabalho a minha família, base inabalável que nos sustenta em todos os momentos de nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e pelos ensinamentos.

À meus pais, Edes e Neiva, pela força, conselhos e base de minha educação.

À meu irmão, Eduardo, pelo acompanhamento, ensinamentos e amizade.

À minha namorada, Paula, pela compreensão nos momentos de ausência e pela companhia nessa caminhada.

À minha avó, Ruth, pelas palavras, preces e carinho.

À família Gameiro pelo carinho e colaboração.

À minha cunhada, Denise, pela amizade.

À Prof. Dr. Gladis Aver Ribeiro pela amizade e exemplo de amor pelo que faz.

Ao Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais pela orientação.

Ao Prof. Dr. Marcelo Zaiat pela colaboração nos ensaios com o reator.

À FAPESP pela bolsa concedida.

À Coordenação do PPG-Microbiologia Agrícola e à ESALQ, pela oportunidade.

Aos técnicos, Wladimir, Denise, Fernando e Fátima pelo auxílio.

Aos colegas, Adriano, Ana, Bruna, Christie, Carol, Gisele, Giselle, Lucas, Marcela, Márcio, Nelson, Robinson, Soraya e Winston, pelo convívio.

“Poderás até esperar ou desesperar, rir ou chorar, lutar ou desistir, mas para te tornares alguém terás inúmeros sentimentos e não podes nunca ter medo de os sentir”

(Catia).

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
Referências	15
2 VARIAÇÕES DA ESTRUTURA DA COMUNIDADE DE <i>BACTERIA</i> EM ÁGUA SUBTERRÂNEA CONTAMINADA COM TETRACLOETENO	19
Resumo	19
Abstract	20
2.1 Introdução	21
2.2 Desenvolvimento	23
2.2.1 Material e métodos	23
2.2.1.1 Área de estudo e amostragem	23
2.2.1.2 Extração do DNA metagenômico	24
2.2.1.3 Detecção de <i>Dehalococcoides</i> por PCR	24
2.2.1.4 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante	25
2.2.1.5 Análise dos amplicons da DGGE	26
2.2.1.6 Clonagem e sequenciamento do gene rRNA 16S	26
2.2.1.7 Análise das seqüências do gene rRNA 16S	27
2.2.2 Resultados	28
2.2.2.1 Compostos orgânicos voláteis	28
2.2.2.2 Parâmetros físico-químicos	30
2.2.2.3 Detecção de populações de <i>Dehalococcoides</i>	33
2.2.2.4 Estrutura da comunidade de <i>Bacteria</i> avaliada por PCR-DGGE	34
2.2.2.5 Análise conjunta de DGGE, parâmetros físico-químicos e concentração de COVs	34
2.2.2.6 Sequenciamento de clones do gene rRNA 16S de <i>Bacteria</i> de amostras de água subterrânea contaminadas e não-contaminadas por PCE	37
2.2.3 Discussão	44
2.3 Conclusões	48
Referências	49

3 DEGRADAÇÃO DO TETRACLOROETENO EM REATOR HORIZONTAL DE LEITO FIXO.....	53
Resumo	53
Abstract.....	54
3.1 Introdução.....	55
3.2 Desenvolvimento	58
3.2.1 Material e métodos	58
3.2.1.1 Coleta de sedimento para enriquecimento.....	58
3.2.1.2 Funcionamento do RAHLF	58
3.2.1.3 Cultivo de enriquecimento	59
3.2.1.4 Estrutura da comunidade bacteriana no RHLF.....	59
3.2.1.5 Extração do DNA metagenômico.....	60
3.2.1.6 Detecção de <i>Dehalococcoides</i> por PCR.....	60
3.2.1.7 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante.....	61
3.2.1.8 Análise dos amplicons da DGGE	62
3.2.1.9 Isolamento de bactérias presentes no RHLF	62
3.2.1.10 Seqüenciamento direto do gene rRNA 16S.....	63
3.2.1.11 Análise das seqüências de DNA dos isolados bacterianos	64
3.2.1.12 Caracterização da comunidade bacteriana selecionada no RHLF.....	64
3.2.1.13 Clonagem e seqüenciamento de clones do gene rRNA 16S.....	65
3.2.1.14 Análise das seqüências de clones do gene rRNA 16S.....	66
3.2.1.15 Ensaio de degradação do PCE em RAHLF	66
3.2.2 Resultados.....	68
3.2.2.1 Detecção de populações de <i>Dehalococcoides</i> no RAHLF	68
3.2.2.2 Estrutura da comunidade de <i>Bacteria</i> no RAHLF avaliada por PCR-DGGE.....	68
3.2.2.3 Seqüenciamento parcial do gene rRNA 16S de bactéria do RHLF, após cultivo de enriquecimento com PCE	71
3.2.2.4 Identificação de bactérias cultiváveis presentes no RHLF	75
3.2.2.5 Degradação do PCE no RHLF	75
3.2.3 Discussão	77
3.2.3.1 Cultivo de enriquecimento no RHLF	77
3.2.3.1.1 Detecção das populações de <i>Dehalococcoides</i>	78

3.2.3.1.2 Estrutura da comunidade bacteriana no RHLF	78
3.2.3.1.3 Diversidade bacteriana do RHLF	79
3.2.3.1.4 Identificação de bactérias cultiváveis presentes no RHLF	80
3.2.3.2 Ensaio de degradação no RHLF	80
3.3 Conclusões.....	82
Referências	82

RESUMO

Caracterização da comunidade bacteriana em água subterrânea contaminada com tetracloroeteno

Dentre os contaminantes de água subterrânea de maior importância está o tetracloroeteno (PCE), o qual é altamente tóxico e potencialmente carcinógeno. As comunidades bacterianas de águas subterrâneas contaminadas com PCE e a diversidade de bactérias capazes de degradar esses organoclorados são pouco conhecidas. O objetivo deste trabalho é comparar a estrutura das comunidades de bactérias de amostras de água subterrânea em uma área contaminada com PCE e selecionar um consórcio microbiano capaz de degradar eficientemente o PCE em reator horizontal de leito fixo (RHLF). Amostras de água subterrânea de oito poços de monitoramento, instalados em uma área contaminada com PCE foram coletadas e analisadas para determinação de oxigênio dissolvido, potencial redox, condutividade elétrica, pH e concentração de tetracloroeteno, tricloroeteno, cis-dicloroeteno e cloreto de vinila (COVs). As amostras foram analisadas também para a determinação da estrutura das comunidades de bactéria por PCR-DGGE e seqüenciamento de clones do gene rRNA 16S. Os parâmetros físico-químicos oscilaram consideravelmente ao longo do tempo em todos os poços de monitoramento (PM). Tetracloroeteno e tricloroeteno foram detectados apenas no PM6. As estruturas das comunidades bacterianas dos PMs analisados mostraram tanto variação temporal quanto espacial. As análises das comunidades bacterianas nos PM6 e PM8, contaminado e não-contaminado com PCE, revelaram resultados semelhantes aos obtidos por DGGE. Uma maior riqueza estimada de espécies bacterianas foi observada nas amostras do PM8, pelo menos em duas épocas de amostragem, sugerindo que a contaminação com PCE está associada com a redução da diversidade bacteriana em água subterrânea. Cultivos de enriquecimento e ensaios de degradação do PCE foram realizados utilizando-se um RHLF, o qual foi preenchido com sedimento do PM6 imobilizado em espuma de poliuretano e enriquecido com meio mineral básico suplementado com PCE. A análise das alterações nas comunidades de bactérias nos reatores foi feita por PCR-DGGE e seqüenciamento parcial do gene rRNA 16S. No ensaio de degradação do PCE no RHLF foi utilizado meio com PCE suplementado ou não com lactato e acetato. Tanto pelo DGGE quanto pelo seqüenciamento, foi observada a seleção de bactérias específicas no reator. A partir das análises de seqüenciamento, essas bactérias foram identificadas como *Alphaproteobacteria* e *Sphingobacteria*. No ensaio de degradação do PCE, os parâmetros físico-químicos do meio não mostraram variações ao longo do comprimento dos reatores. As análises de COVs mostraram uma grande eficiência na degradação do PCE (98%), com um tempo de retenção de 12 horas, não havendo diferença significativa na percentagem de degradação em meio com lactato ou acetato, com relação ao controle sem fonte de carbono. No processo de degradação nenhum dos produtos da via de degradação do PCE foi detectado, o que sugere uma via alternativa de degradação do PCE, a qual ocorre em aerobiose.

Palavras-chave: DGGE, Ecologia microbiana, Percloroeteno, Água subterrânea, rRNA 16S.

ABSTRACT

Characterization of the bacterial community in groundwater contaminated with tetrachloroethene

Tetrachloroethene (PCE) is one of the most important contaminants of groundwater, since it is highly toxic and potentially carcinogenic. The bacterial communities of PCE contaminated groundwater and the diversity of bacteria capable of degrading this contaminant are barely known. The objective of this work is to compare the structure of bacterial communities from groundwater samples from a PCE contaminated site and select a microbial consortium capable to degrading efficiently PCE in a horizontal fixed bed reactor (HFBR). Groundwater samples from eight monitoring wells, installed in a PCE contaminated site were collected and analyzed for determination of dissolved oxygen, redox potential, electrical conductivity, pH, and concentrations of tetrachloroethene, trichloroethene (TCE), cis- and trans-dichloroethene, vinyl chloride (VOCs). The structure of the bacterial communities was determined by PCR-DGGE and 16S rRNA gene clone sequencing. The physical-chemical parameters oscillated considerably throughout time in all the monitoring wells (MW). PCE and TCE were detected only in MW6. The bacterial community structures in the groundwater from the MWs analyzed showed temporal and spatial variation. The analysis of the bacterial communities in MW6 and MW8, contaminated and non-contaminated with PCE, respectively, based on sequencing of 16S rRNA gene clones revealed results to the ones observed by DGGE. Estimated richness of bacterial species was higher in samples from MW8, at least in two sampling times, suggesting that the contamination with PCE is associated with reduction of bacterial diversity in groundwater. Enrichment cultures and PCE biodegradation assays were performed in a HFBR, which was filled with sediment from MW6 immobilized onto polyurethane foam and enriched with basic mineral medium supplemented with PCE. Shifts in bacterial community structure were analyzed using PCR-DGGE and partial sequencing of 16S rRNA gene clones. In the PCE biodegradation assays in the HFBR, were performed in medium containing lactate or acetate. DGGE and 16S rRNA gene clone sequencing data suggest selection of specific bacteria in the reactor. Sequencing data showed that these bacteria belong to *Alphaproteobacteria* and *Sphingobacteria*. In the PCE biodegradation assays, media physical-chemical parameters did not show variation along the reactor length. VOC analyses showed a great efficiency in the degradation of PCE (98%) with a residence time of 12 hours in the reactor, and no significant differences were observed in the presence of lactate or acetate, as compared to the medium without a carbon source. During the biodegradation process, none of the products from the anaerobic pathway of PCE reductive dechlorination was detected, suggesting that an alternative PCE biodegradation pathway is occurring in aerobiosis.

Keywords: DGGE, Microbial ecology, Perchloroethene, Groundwater, 16S rRNA.

1 INTRODUÇÃO

A água é fundamental para a vida, sendo, porém, um recurso limitado e de valor econômico alto. Cerca de 97,2% da água da terra é salgada e da água doce 20% está em lençóis freáticos. Sua escassez pode ocorrer, tanto por condições climáticas/hidrológicas e hidrogeológicas, como por demanda excessiva (REBOUÇAS, 2002). O rápido crescimento urbano tem afetado a qualidade das águas devido à exploração indevida destas áreas (JAMEEL; SIRAJUDEEN, 2006). A importância da água não se restringe apenas à sobrevivência humana, sendo a mesma indispensável para todas as atividades produtivas, tais como, agricultura, pecuária, geração de energia elétrica, produção industrial, transporte fluvial, bem como na manutenção das condições ecológicas (FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO (FIESP), 2005).

Na gestão dos recursos hídricos pouco se discute a respeito da importância das águas subterrâneas. Com um volume armazenado estimado em 112.000 km³ em seu subsolo, o Brasil é considerado um país rico nesse recurso natural (REBOUÇAS, 2002). Ainda que na gestão dos recursos hídricos seja dada maior ênfase as fontes de água superficiais, não se pode desconsiderar a relação entre águas superficiais e subterrâneas (BRASIL, 2001; REBOUÇAS, 2002).

É estimado que no país existam cerca de 400.000 poços para exploração de águas subterrâneas (ZOBY; MATOS, 2002) e que 15,6 % dos domicílios utilizam exclusivamente água subterrânea para abastecimento (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), 2002). No Estado de São Paulo, dos 645 municípios, 71,6% são abastecidos total ou parcialmente com águas subterrâneas e 47,7% são abastecidos exclusivamente por esta fonte hídrica. No Estado, cerca de 5.500.000 das pessoas são abastecidas diariamente por águas subterrâneas. No Maranhão, mais de 70 % das cidades usam água de poços, e no Estado do Piauí este percentual supera 80% (SILVA et al., 1998).

A água é considerada um dos insumos de maior importância dentro dos segmentos industriais. Tendo em vista os custos crescentes cobrados pelas concessionárias públicas, bem como do tratamento das águas superficiais, associados à sua escassez nas grandes metrópoles, os mananciais subterrâneos estão ganhando importância estratégica para o abastecimento destes estabelecimentos (FIESP, 2005).

A qualidade de águas subterrâneas em um local é influenciada diretamente por processos naturais e antropogênicos de ordem urbana, industrial ou agrícola (LIAO et al., 2006). Sendo as águas subterrâneas altamente vulneráveis a contaminação, o uso de técnicas de proteção contra contaminações é a maneira mais adequada para a preservação desses mananciais hídricos (ANGLE; ZISS; CORBIN, 2003).

As taxas de fluxo de águas subterrâneas nos aquíferos geralmente variam em poucos centímetros há poucos metros por dia. Um corpo de água subterrânea contaminado pode conter acumulação de décadas de descarga, podendo levar vários anos para os contaminantes serem detectados numa fonte de água potável próxima (JAMEEL; SIRAJUDEEN, 2006).

Uma área contaminada pode ser definida como um local ou terreno onde há, comprovadamente, poluição ou contaminação causada pela introdução de quaisquer substâncias ou resíduos que nela tenham sido depositados, acumulados, armazenados, enterrados ou infiltrados de forma planejada, acidental ou até mesmo natural. Nessa área, os contaminantes podem concentrar-se nas zonas não-saturadas e saturadas, além de poder concentrar-se nas paredes, pisos e estruturas de construções (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB), 2007).

As principais fontes de contaminação de águas superficiais são os resíduos industriais, petróleo, substâncias radioativas e sedimentos provenientes da erosão do próprio solo. Já para as águas subterrâneas as principais fontes de contaminação são: depósitos de resíduos industriais e esgoto, aterros e lixões, fossas sépticas, despejo de lodo de esgoto no solo, fertilizantes e pesticidas agrícolas, tubulações e tanques de armazenamento subterrâneos e derramamentos acidentais (DUA et al., 2002).

Dentre os contaminantes de maior importância para águas subterrâneas estão os organoclorados, os quais são os xenobiontes mais persistentes já fabricados, sendo normalmente utilizados na agricultura e em indústrias. São importantes contaminantes ambientais e potenciais causas de problemas de saúde para o homem, tendo sido proibidos ou controlados na maioria dos países. A genotoxicidade está entre os mais sérios dos possíveis danos causados por esses compostos e merece atenção especial, devido à natureza irreversível do processo. Outro ponto a ser considerado é o aumento na incidência de alterações no desenvolvimento do sistema reprodutivo e na fertilidade masculina observada nas últimas décadas (NUNES; TAJARA, 1998).

Os compostos halogenados orgânicos são utilizados na indústria para a fabricação de inseticidas, herbicidas, fungicidas, plásticos, solventes, desengraxantes e preservantes de madeira. Além disso, podem ser formados como subprodutos nos processos de desinfecção de água que utilizam cloro ou hipoclorito de sódio, bem como durante o branqueamento de polpa de celulose (FLORA et al., 1994; PARKER; HALL; FARQUHAR, 1993; BASU; OLESZKIEWICZ; SPARLING, 1996).

As restrições à utilização de halogenados orgânicos estão na sua persistência no ambiente e possível ação carcinógena. Uma vez que as vias de absorção são variadas e eficazes, torna-se difícil estabelecer relações entre causa e efeito, pois sinais e sintomas clínicos podem surgir após longo período, representando assim perigo à saúde humana (NUNES; TAJARA, 1998; MADSEN; AAMAND, 1990).

Segundo CETESB (2007), até novembro de 2006 existiam 1822 áreas contaminadas no estado de São Paulo, sendo a atividade industrial responsável por 15% dos casos. Os solventes organoclorados foram encontrados em 118 áreas, totalizando 3,2% dos casos.

Solventes organoclorados são obtidos pela hidrocloração e cloração de compostos orgânicos. A família dos solventes organoclorados é composta por seis produtos principais: cloreto de metileno, tricloroeteno (tricloroetileno, TCE), clorofórmio, tetracloroeto de carbono, cloreto de metila e tetracloroeteno (tetracloroetileno, percloroetileno, PCE). O PCE é um líquido transparente e incolor, com odor característico, semelhante ao éter. É um poluente comum de águas subterrâneas, sendo altamente tóxico e potencialmente carcinógeno (SHAH; SINGH, 1988; BHATT et al., 2007).

O primeiro relato de produção do PCE data de 1821, a partir da decomposição térmica do hexacloroeteno (AGENCIA PARA SUSTANCIAS TÓXICAS Y EL REGISTRO DE ENFERMEDADES (ATSDR), 1996). Já no século XX sua utilização atingiu o auge, juntamente com TCE, produto de descloração do PCE, devido à extensa utilização destes compostos nas indústrias, em centros militares e em residências, como solvente não inflamável. Outro local de utilização deste composto é na indústria de lavagem à seco, onde, devido as suas características de não inflamabilidade, não explosividade, alto poder de solvência e alta densidade, assumiu papel de destaque. Além de possuir baixa viscosidade e tensão superficial como características, sua fácil penetração em tecidos, dissolvendo a maioria das substâncias encontradas no mesmo,

sem deixar odor algum, além de possuir característica antimicrobiana, lhe garantiram ampla utilização (BRUIN et al., 1992).

Sua indiscriminada aplicação, bem como seu armazenamento de forma inadequada, culminou com abundante poluição de águas subterrâneas em várias partes do mundo. A contaminação do ambiente, geralmente águas subterrâneas, por PCE ocorre pelo fato deste composto não se aderir a partículas do solo, percolando no mesmo até atingir o lençol freático. Sua degradação é lenta, tendo meia vida de cerca de 13 meses em águas superficiais, onde a maior parte é perdida por volatilização. Em águas subterrâneas a meia vida é mais elevada, pelo fato da volatilização ser menor (WEISSFLOG et al., 2004).

Em casos de contaminação com PCE os sintomas clássicos de envenenamento são dores de estômago, náuseas e fadiga, sintomas estes facilmente confundíveis com outras enfermidades, sem, no entanto, existirem exames para detecção de envenenamento por este produto. Não há qualquer prova da ocorrência de lesão permanente ao sistema nervoso central, quando da exposição ao PCE dentro dos limites aceitáveis pela legislação ambiental, não sendo também comprovados efeitos evolutivos e de ordem reprodutiva a partir de ensaios realizados com ratos (HAKE; STEWART, 1977). Quanto ao seu potencial como agente carcinógeno, estudos com ratos demonstraram um aumento de tumores no fígado quando os animais foram expostos ao PCE. Em humanos ainda não foram estabelecidas relações entre exposição ao PCE e carcinogênese, no entanto, sua classificação toxicológica é como substância potencialmente carcinógena para humanos (ATSDR, 1996; CAVALLERI, 1994).

Processos físicos e químicos vêm sendo utilizados na remediação de áreas contaminadas com PCE. No entanto, processos biológicos vêm assumindo papel de destaque, pelo simples fato de degradarem este composto a um composto não-tóxico (etileno), diferentemente dos processos físico-químicos que se caracterizam pela transferência de massa para outras fases e não pela degradação do composto (FREEDMAN; GOSSETT, 1989; SCHMIDT, 2004).

A avaliação da estruturas das comunidades bacterianas, conjuntamente com a avaliação de parâmetros físico-químicos de uma área contaminada com PCE são imprescindíveis para determinar quais grupos de microrganismos estão presentes e suas densidades populacionais, bem como as condições do meio que estão favorecendo a proliferação destes organismos, para desta forma estabelecer a melhor estratégia para remediação da área (ALEXANDER, 1994).

O PCE não é degradado por microrganismos em condições aeróbias, mas alguns trabalhos têm evidenciado a via anaeróbia de degradação (MOHN; TIEDJE, 1992). Esta é caracterizada por uma via sequencial de descloração redutiva, onde ocorre a substituição de átomos de cloro por átomos de hidrogênio. Os elétrons para descloração redutiva são derivados de compostos orgânicos. Como produtos de degradação desta via são formados: tricloroeteno (TCE), cis-dicloroeteno (cis-DCE), cloreto de vinila (VC) e etileno (ETH) (BRUIN, et al., 1992). *Sulfurospirillum multivorans* declorina PCE e TCE para cis-DCE utilizando hidrogênio como doador de elétrons, podendo utilizar também lactato, piruvato, etanol e glicerol como doadores de elétrons, sendo oceptor final de elétrons o PCE (NEUMANN; SCHOLZ-MURAMATSU; DIEKERT, 1994; KRUMHOLZ, 1997). *Desulfuromonas michiganensis* foi isolado do sedimento de um aquífero contaminado com cloroetenos. A descloração acetotrófica do PCE, ocorre pela redução do PCE e oxidação do acetato, declorinando PCE a cis-DCE na presença de acetato, lactato, piruvato, succinato e fumarato como doadores de elétrons (SCHOLZ-MURAMATSU et al., 1995).

Os objetivos desse trabalho são: comparar a estrutura das comunidades de bactérias de amostras de água subterrânea em uma área contaminada por PCE e, através de PCR-DGGE de fragmentos da região V3 do gene rRNA 16S, em diferentes épocas de amostragem, detectar a presença de grupos bacterianos específicos, sabidamente envolvidos na degradação do PCE, na água subterrânea da área contaminada; comparar as comunidades de bactérias pela análise de bibliotecas de fragmentos da região V1-V3 do gene rRNA 16S em amostras de sedimento contaminadas ou não com PCE; associar alterações na estrutura das comunidades bacterianas com a presença de compostos orgânicos voláteis (COVs) e parâmetros físico-químicos; selecionar um consórcio microbiano capaz de degradar eficientemente o PCE em reator horizontal de leito fixo (RHLF).

Referências

AGENCIA PARA SUSTANCIAS TÓXICAS Y EL REGISTRO DE ENFERMEDADES (ATSDR). **Reseña toxicológica del tetracloroeteno y del tricloroeteno**. Atlanta, 1996. 1 p.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. San Diego: Academic press, 1994. 302 p.

ANGLE, M.; ZISS, B.; CORBIN, S. Groundwater pollution potential of carroll county. **Water Resources**, New York, n. 59, 2003.

BASU, S.K.; OLESZKIEWICZ, J.A.; SPARLING, R. Dehalogenation of 2-chlorophenol (2CP) in anaerobic batch water. **Water Research**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 315-322, 1996.

BHATT, P.; KUMAR, M.S.; MUDLIAR, S.; CHAKRABARTI, T. Review: biodegradation of chlorinated compounds. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, London, v. 37, n. 2, p. 165-198, 2007.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Águas subterrâneas**: programa de águas subterrâneas. Brasília, 2001. 21 p.

BRUIN, W.P.D.; KOTTERMAN, M.J. J.; POSTHUMUS, M.A.; SCHRAA, G.; ZEHNDER, A.J. B. Complete biological reductive transformation of tetrachloroethene to ethane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 6, p. 1996-2000, 1992.

CAVALLERI, A. Perchloroethylene exposure can induce color vision loss. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 179, p. 162-166, 1994.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Relação de áreas contaminadas**, 2007. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp. Acesso em: 15 ago. 2007.

DUA, M.; SINGH, A.; SETHUNATHAN, N. JOHRI, A.K. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 59, p. 143-152, 2002.

FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO (FIESP). **Orientações para a utilização de águas subterrâneas no estado de São Paulo**. São Paulo, 2005. 40 p.

FLORA, J.R.V.; SUIDAN, M.T.; WULLNER, A.M.; BOYER, T.K. Anaerobic treatment of a simulated high – strength industrial wastewater containing chlorophenols. **Water Environmental Research**, Alexandria, v. 66, n. 1, p. 21-31, 1994.

FREEDMAN, D. L.; GOSSETT, J.M. Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 9, p. 2144-2151, 1989.

HAKE, C.L.; STEWART, R.D. Human exposure to tetrachloroethylene: inhalation and skin contact. **Environmental Health Perspectives**, Michigan, v. 21, p. 231-238, 1977.

JAMEEL, A.A.; SIRAJUDEEN, J. Risk assessment of physico-chemical contaminants in groundwater of Pettavaithalai area, Tiruchirappalli, Tamilnadu – India. **Environmental Monitoring and Assessment**, Amsterdam, v. 123, p. 299-312, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Nacional de Saneamento básico - 2000**. Rio de Janeiro: IBGE, 2002. CDROM.

KRUMHOLZ, L.R. *Desulfuromonas chloroethenica* sp. nov. uses tetrachloroethylene and trichloroethylene as electron acceptors. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 47, p. 1262-1263, 1997.

LIAO, S.; LAI, W.; CHEN, J.; SHEU, J.; LEE, C. Water quality during development and apportionment of pollution from Rivers in Tapeng lagoon, Taiwan. **Environmental Monitoring and Assessment**, Amsterdam, v. 122, p. 81-100, 2006.

MADSEN, T.; AAMAND, J. Effects of sulfoxide anions on degradation of pentachlorophenol by a methanogenic enrichment culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 9, p. 2453-2458, 1990.

MOHN, W.W.; TIEDJE, J.M. Review: microbial reductive dehalogenation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 56, n. 3, p. 482-507, 1992.

NEUMANN, A.; SCHOLZ-MURAMATSU, H.; DIEKERT, G. Tetrachloroethene metabolism of *Dehalospirillum multivorans*. **Archives of Microbiology**, New York, v. 162, p. 295-301, 1994.

NUNES, V.M.; TAJARA, H.E. Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 32 n. 4, 1998.

PARKER, W.J.; HALL, E.R.; FARQUHAR, G.J. Evaluation of dechlorination mechanism during anaerobic fermentation of bleached kraft mill effluent. **Water Research**, Amsterdam, v. 27, n. 8, p. 1269-1273, 1993.

REBOUÇAS, A.C. A política nacional de recursos hídricos e as águas subterrâneas. **Revista Águas Subterrâneas**, Paraná, n. 16, p. 95-107, 2002.

SCHMIDT, C.A.B. **Aplicação de técnica eletrocinética em laboratório a dois solos argilosos**. 2004. 350 p. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

SCHOLZ-MURAMATSU, H.; NEUMANN, A.; MEßMER, M.; MOORE, E.; DIEKERT, G. Isolation and characterization of *Dehalospirillum multivorans* gen. nov., sp. nov., a tetrachloroethene-utilizing, strictly anaerobic bacterium. **Archives of Microbiology**, New York, v. 163, p. 48-56, 1995.

SHAH, J.J.; SINGH, H.S. Distribution of volatile organic chemicals in outdoor and indoor air – a national COVdata base. **Environmental Science and Technology**, Philadelphia, v. 22, p. 1381-1388, 1988.

SILVA, M.F.B.; NICOLETTI, A.; ROCCA, A.C.C.; CASARINI, D.C.P. Uso e qualidade das águas subterrâneas para abastecimento público no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS, 10., 1998. São Paulo, **Anais...** São Paulo: ABAS, 1998. CD-ROM.

WEISSFLOG, L.; ELANSKY, N.; PUTZ, E. KRUEGER, G.; LANGE, C.A.; LISITZINA, L.; PFENNIGSDORFF, A. Trichloroacetic acid in the vegetation of polluted and remote areas of both hemispheres - Part II: salt lakes as novel sources of natural chlorohydrocarbons. **Atmospheric Environment**, Amsterdam, v. 38, p. 4197-4204, 2004.

ZOBY, J.L.G.; MATOS, B. **Águas subterrâneas no Brasil e sua inserção na política nacional de recursos hídricos**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS, 12., 2002. Florianópolis, **Anais...** Florianópolis: ABAS, 2002. CD-ROM.

2 VARIAÇÕES DA ESTRUTURA DA COMUNIDADE DE *BACTERIA* EM ÁGUA SUBTERRÂNEA CONTAMINADA COM TETRACLOETENO

Resumo

Variações da estrutura da comunidade de *Bacteria* em água subterrânea contaminada com tetracloreteno

O solvente tetracloreteno (PCE) é um poluente comum de águas subterrâneas, sendo altamente tóxico e potencialmente carcinógeno. O objetivo deste trabalho é de monitorar a contaminação da água subterrânea de uma área contaminada com PCE, bem como caracterizar a estrutura da comunidade bacteriana deste local, temporal e espacialmente. Amostras de água subterrânea de oito poços de monitoramento, instalados em uma área contaminada com PCE foram coletadas e analisadas para determinação de oxigênio dissolvido, potencial redox, condutividade elétrica e pH, concentração de tetracloreteno, tricloroeteno, *cis*-dicloroeteno e cloreto de vinila (COVs). As amostras foram analisadas também para a determinação da estrutura das comunidades de bactéria por PCR-DGGE e seqüenciamento de clones do gene rRNA 16S, bem como foi feita a detecção de *Dehalococcoides* por PCR com iniciadores específicos. Os parâmetros físico-químicos oscilaram consideravelmente ao longo do tempo em todos os poços de monitoramento (PM). Tetracloreteno e tricloroeteno foram detectados apenas no PM6. As estruturas das comunidades bacterianas dos PMs analisados mostraram tanto variação temporal quanto espacial. A partir dos resultados da DGGE, análises de parâmetros físico-químicos e de COVs, foi feita a análise de componentes principais, onde pode ser observado que a estrutura da comunidade do PM6 está associada com a presença do PCE e dos produtos da sua via de degradação. As análises das comunidades bacterianas de clones do gene rRNA 16S por seqüenciamento do PM6 e PM8, contaminado e não-contaminado com PCE, revelam resultados semelhantes aos obtidos por DGGE. Uma maior riqueza estimada de espécies bacterianas foi observada nas amostras do PM8, o que mostra que a contaminação com PCE está associada com a redução da diversidade bacteriana em água subterrânea. Dos grupos bacterianos seqüenciados no PM6 predominaram os pertencentes às classes *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* e *Betaproteobacteria*, enquanto que no PM8 predominaram as classes *Gammaproteobacteria* e *Betaproteobacteria*. Contudo os grupos exclusivos do PM6, poço contaminado com PCE, foram os representantes das classes *Bacilli*, *Actinobacteria*, *Flavobacteria* e *Cyanobacteria*. A detecção de *Dehalococcoides*, a partir da PCR com iniciadores específicos, foi positiva nos diferentes PMs, com exceção do PM1. Contudo a partir do seqüenciamento de clones do gene rRNA 16S não foi possível detectar *Dehalococcoides*, o que pode ter ocorrido por este grupo estar presente em baixa quantidade no ambiente.

Palavras-chave: Tetracloreteno, Água subterrânea, Biorremediação.

Abstract

Structure variations of the community *Bacteria* in groundwater contaminated with tetrachloroethene

The solvent tetrachloroethene (PCE) is a common groundwater pollutant, highly toxic and potentially carcinogenic. The objective of this work is to monitor the contamination of the groundwater of a contaminated area with PCE, as well as how characterize the structure of the bacterial community of this location, temporal and spatial. Groundwater samples from eight monitoring wells, installed in a contaminated area with PCE were collected and analyzed for dissolved oxygen determination, redox potential, electrical conductivity and pH, tetrachloroethene concentration, trichloroethene, cis-dichloroethene and vinyl chloride (VOCs). The samples were also analyzed for determination of the structure of the communities of bacteria by PCR-DGGE and clone sequencing of the 16S rRNA gene, as was made the detection of *Dehalococcoides* by PCR with specific primers. The physical-chemical parameters oscillated considered along the time in all the monitoring wells (PM). Tetrachloroethene and trichloroethene were detected only at PM6. The structures of the bacterial communities of the PMs analyzed showed temporal variation as well as spatial. From the DGGE results, analysis of physical-chemical parameters and of VOCs, was made the analysis of the main components, where it can be observed that the structure of the community of PM6 is associated to the presence of PCE and products derived from its degradation. The analysis of the bacterial communities clones of the 16S rRNA gene by sequencing from PM6 and PM8, contaminated and non-contaminated with PCE, reveal similar results obtained by DGGE. A greater richness of estimated bacterial species was observed in samples from PM8, what demonstrates that the contamination with PCE is associated with the reduction of bacterial diversity in groundwater. Of the bacterial groups sequenced from PM6 predominated the ones belonging to the classes of *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria*, while in PM8 predominated the classes *Gammaproteobacteria* and *Betaproteobacteria*. Nonetheless the groups exclusive from PM6, contaminated well with PCE, were representatives of classes *Bacilli*, *Actinobacteria*, *Flavobacteria* and *Cyanobacteria*. The detection of *Dehalococcoides*, from PCR with specific initiators, was positive at the different wells, except in PM1. However from the clone sequencing of the 16S rRNA gene, was not possible to detect *Dehalococcoides*, which can be due to this group be present in low quantity in the environment.

Palavras-chave: Tetrachloroethene, Groundwater, Bioremediation.

2.1 Introdução

Os compostos organoclorados são originados da adição de cloro aos derivados de petróleo e mais recentemente foram incluídos na família dos POPs (poluentes orgânicos persistentes). A degradação da maioria dos solventes organoclorados em água subterrânea acontece por reações de oxidação-redução predominantemente mediadas por bactérias. Alguns solventes organoclorados também podem ser degradados através de reações químicas com metais (ferro, por exemplo) ou água (ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AOS POLUENTES/ASSOCIAÇÃO DE CONSCIÊNCIA À PREVENÇÃO OCUPACIONAL (ACPO), 2006).

Estes compostos encontram-se presentes na maioria dos ambientes e armazenam-se em plantas e tecidos animais. As restrições à sua utilização originam-se de sua persistência no ambiente e sua possível ação carcinógena. Dentre os organoclorados, o tetracloroeteno (PCE) é de ampla utilização industrial e tem sido detectado em inúmeras áreas contaminadas.

As vias de biodegradação anaeróbias são consideradas as mais eficientes para a degradação de alguns compostos organoclorados, como o PCE. Quanto maior é o grau de halogenação de um composto, maior é a eficiência da biodegradação anaeróbia em relação à aeróbia. Processos anaeróbios de desalogenação redutiva, como a descloração redutiva, podem degradar compostos fortemente halogenados, os quais são mais persistentes em condições aeróbias (THOMPSON et al., 2004).

Existem relatos de diferentes grupos de bactérias com capacidade para degradar PCE, entre bactérias dos filos *Proteobacteria* (*Enterobacter* sp., *Desulfuromonas chloethenica*, *Desulfomonile tiedjei* e *Dehalospirillum multivorans*), *Firmicutes* (*Dehalobacter restrictus* e *Desulfitobacterium* sp.) e *Chloroflexi* (*Dehalococcoides ethenogenes*). Cada um destes grupos requer doadores de elétrons distintos. *Dehalospirillum multivorans* utiliza hidrogênio, bem como compostos orgânicos, com exceção do acetato, como doadores de elétrons; *Dehalobacter restrictus* e *Desulfitobacterium* sp. e *Dehalococcoides ethenogenes* utilizam oxidativamente hidrogênio como doador de elétrons, enquanto alguns representantes de *Enterobacter* sp., *Desulfuromonas chloethenica* e *Desulfomonile tiedjei* utilizam tanto o acetato quanto o hidrogênio como doadores de elétrons (HOLLIGER; WOHLFARTH; DIEKERT, 1999; BHATT et al., 2007; VLIEG; JANSSEN, 2001).

A biodegradação do PCE em anaerobiose dá-se pela descloração redutiva, formando: tricloroeteno (TCE), cis-dicloroeteno (cis-DCE), cloreto de vinila (VC) e etileno (ETH) (FREEDMAN; GOSSETT, 1989). Todos estes compostos, com exceção do ETH são poluentes. Desta forma a eficiência de degradação é fundamental para que, ao final do processo, o PCE seja convertido totalmente a ETH (NIELSEN; KEASLING, 1999). Segundo Holliger, Wohlfarth e Diekert (1999), várias bactérias apresentam a capacidade de degradar PCE a cis-DCE, mas somente *Dehalococcoides ethenogenes* possui a capacidade de degradar o PCE a ETH. Outros isolados de *Dehalococcoides* sp. possuem a capacidade de degradar cis-DCE a VC, mas não possuem capacidade para desclorar PCE a TCE (DENNIS, 2003).

Desta forma a caracterização da estrutura da comunidade bacteriana de áreas contaminadas por PCE é importante para a identificação dos grupos bacterianos presentes e definição de uma estratégia de biorremediação adequada.

Várias técnicas de biologia molecular vêm sendo empregadas como alternativas para a caracterização das comunidades bacterianas presentes em amostras de água contaminada, tanto superficial quanto subterrânea. Uma técnica que vem sendo muito utilizada para determinação da estrutura de comunidades de microrganismos em diferentes ambientes é a PCR- Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (PCR-DGGE). Através desta técnica, fragmentos do gene rRNA 16S são amplificados a partir do DNA metagenômico e separados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante, gerando um perfil de bandas que representa a comunidade microbiana específica (AGNELLI et al., 2004). Segundo Lambais et al. (2005), a PCR-DGGE é um método para análise comparativa, se a amostra exibir padrões de bandejamento de amplicons diferentes, significa que as comunidades microbianas apresentam diferenças.

Já o seqüenciamento de clones do gene rRNA 16S é outra técnica utilizada para a caracterização da comunidade microbiana (RONAGHI; UHLÉN; NYRÉN, 1998). Essas técnicas associadas a algoritmos estatísticos específicos permitem a comparação precisa das estruturas das comunidades microbianas e sua relação com variáveis ambientais (LAMBAIS et al., 2005; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2006).

Desta forma este trabalho tem por objetivo comparar a estrutura das comunidades de bactérias em amostras de água subterrânea de uma área contaminada com PCE, através de PCR-DGGE da região V3 do gene rRNA 16S, em diferentes épocas de amostragem, bem como, associar alterações na estrutura dessas comunidades bacterianas com a concentração de

compostos orgânicos voláteis (COVs) e parâmetros físico-químicos, além de detectar a presença de *Dehalococcoides* por PCR com iniciadores específicos, já que estes organismos estão diretamente relacionados com a degradação anaeróbia do PCE.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e métodos

2.2.1.1 Área de estudo e amostragem

Foram coletadas amostras de água subterrânea de oito poços de monitoramento (PM1, PM2, PM3, PM4, PM5, PM6, PM7 e PM8) instalados em uma área contaminada com PCE em São Paulo (SP) (figura 2.1), nos meses de março, maio, julho e setembro de 2005 para análises microbiológicas e mensalmente entre fevereiro e setembro de 2005 para análise de parâmetros físico-químicos e concentração de PCE, TCE, cis-DCE e VC (COVs) nas águas dos PMs.

As amostras foram coletadas com o auxílio de uma bomba peristáltica do fundo dos poços de monitoramento (aproximadamente 4 metros de profundidade) com lençol freático a aproximadamente 3 metros da superfície do solo, a uma vazão inferior a 50 mL min^{-1} . O material sedimentado foi removido e acondicionado a -80°C até o processamento das amostras para extração de DNA metagenômico. Para análise de COVs e avaliação dos parâmetros físico-químicos da água subterrânea, após a purga de 3 volumes dos PMs e conseqüente recuperação dos mesmos, a água foi coletada com bomba peristáltica a baixa vazão (50 mL min^{-1}) e disposta em frascos com septo para análise de COVs e frascos de vidro com tampa rosqueável para análise dos parâmetros físico-químicos.

Figura 2.1 - Distribuição dos oito poços de monitoramento na área de estudo

As amostras foram mantidas a 4°C até o processamento. A análise de COVs foi feita pela empresa BIOAGRI (Piracicaba, SP), por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (GC/MS), de acordo com o método USEPA SW 846-8260B. A determinação da concentração de oxigênio dissolvido (OD), potencial redox (Eh), condutividade elétrica (CE) e potencial hidrogeniônico (pH) foi efetuada *in situ*.

2.2.1.2 Extração do DNA metagenômico

O DNA metagenômico foi extraído utilizando-se o “Fast DNA kit” (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose 0,5X TBE-0,8%, depois de corado com “Sybr Green” (Amersham Biociences, São Paulo, Brasil). A concentração do DNA foi determinada por densitometria, utilizando o “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen, São Paulo, Brasil) como padrão e o programa “Fragment Analyses” (GE Healthcare, São Paulo, Brasil).

2.2.1.3 Detecção de *Dehalococcoides* por PCR

Primeiramente foi feita a amplificação por PCR utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os iniciadores BAC8f (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e BAC1541r (5'

AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3') (DUHAMEL et al., 2002). A amplificação do DNA 16S foi com tampão para DNA polimerase Taq Platinum contendo 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 1 U Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 5 pmol dos primers e 10 ng do DNA metagenômico. As condições de amplificação do PCR foram 3 min a 94°C; 30 ciclos de 45 seg a 94°C, 30 seg a 55°C e 90 seg a 72°C, e extensão final por 7 min a 72°C. A concentração dos produtos de PCR (amplicons) foi determinada por densitometria, após eletroforese em gel de agarose 0,5X TBE-0.8% e coloração com "SybrGreen" (GE Healthcare, São Paulo, Brasil), utilizando "Low DNA Mass Ladder" (Invitrogen, São Paulo, Brasil) como padrão. A aquisição da imagem dos géis foi feita com o densitômetro laser "FluorImager" (GE Healthcare, São Paulo, Brasil) e o programa "Fragment Analyses" (GE Healthcare, São Paulo, Brasil). A partir do material amplificado foi feito um "nested" PCR com a utilização de iniciadores específicos para *Dehalococcoides*: DHA728f (5' AAG GCG GTT TTC TAG GTT GTC AC 3') e DHA1115r (5' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3') (DUHAMEL et al., 2002). Em ambas reações a reamplificação do DNA 16S foi com tampão para DNA polimerase Taq Platinum contendo 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 1 U Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 5 pmol dos primers e 10 ng do DNA metagenômico. As condições de amplificação do PCR foram 3 min a 94°C; 30 ciclos de 45 seg a 94°C, 30 seg a 58°C e 1,5 min a 72°C, e extensão final por 7 min a 72°C. A concentração dos produtos de PCR (amplicons) foi determinada por densitometria, após eletroforese em gel de agarose 0,5X TBE-0.8% e coloração com "Sybr Green" (GE Healthcare, São Paulo, Brasil), utilizando "Low DNA Mass Ladder" (Invitrogen, São Paulo, Brasil) como padrão. A aquisição da imagem dos géis foi feita com o densitômetro laser "FluorImager" (GE Healthcare, São Paulo, Brasil) e o programa "Fragment Analyses" (GE Healthcare, São Paulo, Brasil).

2.2.1.4 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante

A região V3 do gene rRNA 16S foi amplificada por PCR utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os iniciadores BA338fGC (5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG 3') e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (ØVREÅS et al., 1997). A amplificação do DNA 16S foi com tampão para DNA polimerase Taq Platinum contendo 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 1 U

Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 5 pmol dos primers e 10 ng do DNA metagenômico. As condições de amplificação do PCR foram 5 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C, e extensão final por 10 min a 72°C. A concentração dos produtos de PCR (amplicons) foi determinada por densitometria, após eletroforese em gel de agarose 0,5X TBE-0.8% e coloração com “Sybr Green” (GE Healthcare, São Paulo, Brasil), utilizando “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen, São Paulo, Brasil) como padrão. A aquisição da imagem dos géis foi feita com o densitômetro laser “FluorImager” (GE Healthcare, São Paulo, Brasil) e o programa “Fragment Analyses” (GE Healthcare, São Paulo, Brasil). Quantidades iguais de amplicons (300 ng) foram analisadas através de eletroforese em gel com 8% (m/v) de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1, m:m), contendo um gradiente de 15 a 55% de formamida e uréia (ØVREÅS et al., 1997). A eletroforese foi realizada à 200V e 60°C constantes, utilizando-se um sistema “DCode” (BioRad, Hercules, CA, USA), e tampão 1X TAE buffer. O DNA foi corado com “Vistra Green” (GE Healthcare, São Paulo, Brasil) e os géis analisados por densitometria, utilizando um densitômetro laser “FluorImager” e o programa “Diversity Database” (BioRad, Hercules, CA, USA).

2.2.1.5 Análise dos amplicons da DGGE

Os perfis de bandas após DGGE foram analisados por agrupamentos hierárquicos utilizando-se o programa Systat 11.0, com base em dados binários (presença ou ausência de bandas), pelo método de concordância simples (“simple matching”), com algoritmo de Ward e distância euclidiana como unidade de medida.

2.2.1.6 Clonagem e seqüenciamento do gene rRNA 16S

A região V1-V3 do gene rRNA 16S de microrganismos do domínio *Bacteria* foram amplificadas por PCR utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os iniciadores PRBA63f (5' GGA TCC CAG GCC TAA CAC ATG CAA GCT 3') e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (LAMBAIS et al., 2005). A amplificação foi feita em tampão para DNA polimerase Taq contendo 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil); 5 pmol dos primers e 10 ng do DNA metagenômico. As condições de amplificação foram

de 5 min a 95°C; 30 ciclos 1 min a 95°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C, e extensão final por 10 min a 72°C. Amplicons foram purificados usando GFX PCR DNA e “Gel Band Purification kit” (Amersham Biosciences, São Paulo, Brasil) e ligados em “pGEM-T Easy Vector” (Promega, Madison, WI, USA) a 4°C durante a noite, de acordo com as instruções do fabricante. O produto de ligação foi transformado em células competentes de *Escherichia coli* DH5 α por choque térmico e as células transformadas foram plaqueadas em ágar LB, contendo ampicilina (100mg mL⁻¹), X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactosídeo). Colônias contendo o plasmídeo recombinante foram selecionadas e cultivadas em meio líquido LB contendo 100mg mL⁻¹ de ampicilina a 37°C durante a noite. Os plasmídeos foram extraídos através de lise alcalina. As soluções de ácidos nucleicos foram incubadas com 15 μ g de RNase por 20 min a 37°C. O DNA foi precipitado com equivalente volume de isopropanol gelado por 5 min na geladeira e centrifugado a 4000 rpm por 40 min a 4°C. O pélete de DNA foi lavado com etanol gelado 70%, seco e ressuspensão em água destilada. A concentração do DNA foi determinada espectrofotometricamente a 260 nm. O seqüenciamento foi executado utilizando 200-500 ng do DNA plasmidial, 10 pmol dos iniciadores M13f (5’ GTA AAA CGA CGG CCA G 3’) ou M13r (5’ CAG GAA ACA GCT ATG AC 3’) (LAMBAIS et al., 2005), 2 μ L de “DYEmanic ET Terminator” (GE Healthcare, São Paulo, Brasil), 2 μ L de tampão de seqüenciamento (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM MgCl₂.6H₂O) e H₂O ultrapura para um volume final de 10 μ L, em 25 ciclos de 20 seg a 95°C, 15 seg a 50°C e 1 min a 60°C. Os produtos de PCR foram precipitados com etanol, lavados e ressuspensos em formamida deionizada. Eletroforese foi feita utilizando-se um seqüenciador automático o ABI 3100, de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare, São Paulo, Brasil).

2.2.1.7 Análise das seqüências do gene rRNA 16S

As seqüências foram processadas com o programa PHRED (EWING; GREEN, 1998) para a remoção de bases com baixa qualidade (parâmetro de qualidade > 20) e seqüências do vetor.

Para a afiliação filogenética das seqüências do gene rRNA 16S utilizou-se o programa RDPquery (COLE et al., 2007) o qual compara as seqüências com as seqüências depositadas no Ribosomal Database Project (COLE et al., 2007) e baseado na distância evolutiva entre as

seqüências que serão classificadas e aquelas de maior similaridade no banco de dados, define possível classificação em diferentes níveis taxonômicos.

Para o agrupamento em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foi utilizado o programa DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005). Para tanto, utilizou-se uma matriz de distância evolutiva calculada com o DNADIST (algoritmo de Jukes-Cantor) do PHYLIP 3.63 (FELSENSTEIN, 2007), a partir do alinhamento feito no ClustalX 1.83 (GARRITY et al., 2001), com definições de parâmetros padrão, exceto “gap-opening penalty” (10.0) e “gap-extension penalty” (0.1).

Os números de UTOs e de seqüências de cada UTO foram computados e utilizados com o programa SPADE para o cálculo dos índices de diversidade de Shannon e a recíproca do índice de Simpson, bem como para a estimativa de riqueza de espécies pelos métodos não-paramétricos ACE e Chao1 (CHAO; CHEN, 2007), além da estimativa da cobertura de amostragem.

A comparação entre as bibliotecas de seqüências do gene rRNA 16S foi feita utilizando-se o programa S-LIBSHUFF (SINGLETON et al., 2001) após o alinhamento das seqüências e cálculo das matrizes de distâncias evolutivas conforme descrito acima.

2.2.2 Resultados

2.2.2.1 Compostos orgânicos voláteis

Nas análises de COVs, o PM6 apresentou concentrações de PCE acima do limite de intervenção da CETESB ($40\mu\text{g L}^{-1}$) em todos os períodos de avaliação. Nos demais PMs as concentrações de PCE foram baixas ($< 5\mu\text{g L}^{-1}$) ou mesmo não foi detectado através de GC/MS (Figura 2.2a).

Já o primeiro produto da via de degradação do PCE, o TCE (Figura 2.2b), foi detectado apenas no PM6, em todos os períodos de avaliação, em concentrações acima do limite de intervenção estabelecido pela CETESB ($70\mu\text{g L}^{-1}$). Nos demais PMs não foi detectado TCE. Outros produtos da via de degradação do PCE, como cis-DCE e VC, foram detectados em todos os PMs, possivelmente pela característica de maior solubilidade destes compostos.

Com base nas análises de COVs realizadas é possível afirmar que ocorre biodegradação do PCE e que microrganismos com capacidade de degradar este produto estão presentes na área.

Desta forma, o PM6 foi considerado contaminado com PCE dentro da área de estudo sendo que nos demais PMs não foi detectada a presença de PCE (PM2, PM5 e PM8) ou este composto foi detectado em concentrações baixas em todos os períodos de amostragem (PM1, PM3, PM4 e PM7).

Figura 2.2 - Análises de COVs dos oito poços de monitoramento da área de estudo no período de fevereiro a setembro de 2005. A) quantificação de PCE; B) quantificação de TCE; C) quantificação de cis-DCE; D) quantificação de VC

A análise de agrupamento hierárquico com base nos PMs, ao longo dos períodos de amostragem, pode ser vista na Figura 2.3.

Figura 2.3 – Agrupamento hierárquico com base nas concentrações de COVs nos PMs em março, maio, julho e setembro de 2005 (A, B, C e D, respectivamente)

Os resultados mostraram que o PM6 se distingue dos demais PMs, principalmente pelas elevadas concentrações de PCE e TCE em relação aos demais PMs.

2.2.2.2 Parâmetros físico-químicos

Com relação aos parâmetros físico-químicos, os mesmos oscilaram ao longo do tempo em todos os poços de coleta, o que pode ser explicado por este ser um ambiente dinâmico, com uma série de reações ocorrendo simultaneamente (Figura 2.4).

Dos parâmetros físico-químicos analisados Eh e OD não apresentaram diferença significativa entre as amostras analisadas e os valores observados nos diferentes PMs, ao longo do período de amostragem, demonstrando ambientes aeróbios.

Já com base nos resultados de CE e pH pode-se observar que o PM6 e PM3 diferiram dos demais PMs. A CE do PM3 apresentou valores que oscilaram entre 4500 e 6500 $\mu\text{S cm}^{-1}$ enquanto que o PM6 apresentou valores próximos a 2700 $\mu\text{S cm}^{-1}$, sendo que nos demais PMs foram registrados valores inferiores a 1800 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Apesar do PM3 e PM6 terem apresentado valores mais elevados que os demais PMs, níveis de CE superiores a 100 $\mu\text{S cm}^{-1}$ indicam ambientes impactados por substâncias ionizáveis.

Os valores de pH nos PMs, não foram diferentes entre si (em média 6,42), com exceção do PM6, o qual apresentou valores de pH mais baixos (em média 3,1). Cabe destacar que o PM6 apresentou contaminação por PCE.

Figura 2.4 – Parâmetros físico-químicos de oito poços monitorados ao longo do tempo. A) potencial redox (Eh); B) oxigênio dissolvido (OD); C) condutividade elétrica (CE); D) potencial hidrogeniônico (pH)

O agrupamento hierárquico, dos PMs com base nas características físico-químicas, usando o método de concordância simples (“simple matching”), com algoritmo de Ward e distância euclidiana como unidade de medida, ao longo do período de amostragem, revelou que PM3 e

PM6 possuem características menos similares aos demais PMs, principalmente devido a CE e pH (Figura 2.5).

Figura 2.5 – Agrupamento hierárquico dos PMs com base nas características físico-químicas da água durante amostragem realizada em março, maio, julho e setembro de 2005 (A, B, C e D, respectivamente)

Pelos resultados dos agrupamentos hierárquicos pode-se observar que PM3 e PM6 apresentaram agrupamento distinto dos demais poços de monitoramento, muito pode ser explicado pelos valores de condutividade elétrica e pH, tendo em vista que Eh e OD não apresentaram diferença entre os poços de monitoramento.

2.2.2.3 Detecção de populações de *Dehalococcoides*

Para determinar se organismos com a capacidade de degradar o PCE pertencentes ao gênero *Dehalococcoides* estavam presentes na água subterrânea da área em estudo, fragmentos do gene rRNA 16S foram amplificados por PCR com iniciadores específicos.

No primeiro período de amostragem (maio) *Dehalococcoides* foram detectados em todos os PMs amostrados, exceto no PM1, independente da concentração de PCE/TCE. Já em maio e julho a presença de *Dehalococcoides* foi detectada em todos os PMs, exceto no PM1 e PM4. Em setembro de 2005, a presença deste gênero bacteriano foi detectada em todos os PMs, exceto PM1, PM4 e PM7 (Figura 2.6).

Contudo, uma análise mais detalhada das populações de *Dehalococcoides* é necessária para determinar o nível de variabilidade genética existente nas mesmas. Adicionalmente, análises de populações de outras bactérias envolvidas na degradação de PCE/TCE são necessárias para melhor entender as interações microbiológicas que podem ocorrer durante esse processo e determinar quais grupos de bactérias poderiam ser utilizados como indicadores da eficiência da biodegradação *in situ*.

Figura 2.6 – Detecção de *Dehalococcoides* nos PMs em amostragens realizadas nos meses de março (A), maio (B), julho (C) e setembro de 2005 (D). Os números se referem aos PMs

2.2.2.4 Estrutura da comunidade de *Bacteria* avaliada por PCR-DGGE

Para a determinação das estruturas das comunidades bacterianas, amostras de DNA total da água subterrânea foram amplificadas através da PCR e os amplicons resultantes foram separados por DGGE.

Muito embora a concentração de PCE/TCE no PM6 seja mais elevada do que nos demais PMs, as estruturas das comunidades bacterianas na água subterrânea amostrada nos diferentes PMs foram distintas entre si nos diferentes períodos de amostragem (Figura 2.7). Da mesma forma que a estrutura da comunidade bacteriana apresentou alta variabilidade espacial, também apresentou variabilidade temporal.

Figura 2.7 - Perfil de amplicons do gene rRNA 16S de *Bacteria* após DGGE e agrupamento hierárquico referente às quatro épocas de amostragem dos oito poços de monitoramento

2.2.2.5 Análise conjunta de DGGE, parâmetros físico-químicos e concentração de COVs

Como forma de associar os resultados obtidos nas análises de COVs, parâmetros físico-químicos e DGGE, foram feitas análises multivariadas buscando determinar quais fatores foram

condicionadores da estrutura da comunidade bacteriana dos diferentes poços de monitoramento ao longo do tempo.

Uma análise de componentes principais (PCA) com este conjunto de dados foi realizada e os resultados indicam que a estrutura da comunidade bacteriana no PM6 está associada com a presença de PCE/TCE (Figura 2.8), principalmente no último período de amostragem (Figura 2.8.D). Contudo, estes resultados não explicam a variação na estrutura da comunidade bacteriana tanto temporal quanto espacialmente, tendo em vista a semelhança da estrutura da comunidade do PM6 com os demais poços de monitoramento, o que sustenta a hipótese de outros fatores estarem condicionando a estrutura da comunidade bacteriana da área de estudo.

Figura 2.8 - Análises de componentes principais, associando a estrutura das comunidades de bactérias determinadas por PCR-DGGE, parâmetros físico-químicos e concentração de compostos orgânicos voláteis, nos quatro períodos de amostragem. A, B, C e D referem-se às amostragens realizadas em março, maio, julho e setembro de 2005, respectivamente

2.2.2.6 Seqüenciamento de clones do gene rRNA 16S de *Bacteria* de amostras de água subterrânea contaminadas e não-contaminadas por PCE

As análises das seqüências dos clones dos genes rRNA 16S possibilitou a identificação dos grupos de bactérias presentes na água subterrânea coletada do PM6 e PM8, caracterizada como contaminada e não-contaminada por PCE, respectivamente. A estrutura das comunidades bacterianas variou tanto espacial quanto temporalmente, sendo estas diferenças melhor visualizadas em nível de classe (Figura 2.9).

A estrutura da comunidade bacteriana na água subterrânea do PM6 apresentou grande variação temporal. Apenas as classes pertencentes ao filo *Proteobacteria* foram detectadas em todas as épocas amostradas, com exceção da classe *Deltaproteobacteria*. *Gammaproteobacteria* foi a classe mais abundante no PM6 (freqüência média de 37,8%), seguida por *Alphaproteobacteria* (freqüência média de 25,9%) e *Betaproteobacteria* (freqüência média de 15,9%). As demais classes não foram detectadas em todos os períodos de amostragem. Em média 4,4% das seqüências do PM6 não puderam ser classificadas em nível de filo pelo RDPquery e podem representar novos filos bacterianos.

Da mesma forma, as comunidades bacterianas do PM8 apresentaram grande variação ao longo do período amostrado. O filo *Proteobacteria* também foi o mais abundante no PM8, com exceção das classes *Alphaproteobacteria* e *Epsilonproteobacteria*, as quais não foram detectadas em todas as épocas amostradas. *Gammaproteobacteria* foi a classe mais abundante no PM8 (freqüência média de 22,5%), seguida de *Betaproteobacteria* (freqüência média de 18,7%) e *Deltaproteobacteria* (freqüência média de 13,9%). A classe *Acidobacteria*, pertencente ao filo *Acidobacteria*, também foi detectada em todos os períodos de amostragem (freqüência média 4,5%). As demais classes não foram encontradas em todos os períodos de coleta. Em média 14,1% das seqüências do PM8 não puderam ser classificadas em nível de filo pelo RDPquery.

Quando comparada a estrutura da comunidade dos diferentes poços (PM6 e PM8) pode-se verificar que a comunidade bacteriana do PM8 possui uma maior diversidade de classes do que a do PM6, 14 e 11 classes, respectivamente. Entre as classes de bactérias presentes apenas no PM6 foram identificadas *Bacilli*, *Actinobacteria*, *Flavobacteria* e *Cyanobacteria* (Figura 2.9). A partir das seqüências analisadas, não foram detectados clones classificados no gênero *Dehalococcoides*.

Figura 2.9 - Frequência relativa de seqüências do gene rRNA 16S de *Bacteria*, de diferentes classes em amostras de água subterrânea do PM6 e PM8 nas quatro épocas de amostragem. A e B referem-se as frequências relativo do PM6 e PM8, respectivamente

Os índices de diversidade, estimativas de riqueza de UTOs e estimativa de cobertura de amostragem, considerando distância evolutiva de 0,03 para a definição de UTOs são apresentados na Tabela 2.1.

A riqueza estimada de UTOs na água subterrânea do PM8 em todos os períodos de amostragem, não diferiu estatisticamente daquela observada na água subterrânea do PM6, no

mesmo período de amostragem, exceto nas amostragens realizadas nos meses de julho e setembro. Da mesma forma, a riqueza estimada de UTOs não apresentou diferença significativa ao longo do tempo, dentro de cada poço de monitoramento (intervalo de 95% de confiança) (Tabela 2.1). Estas diferenças podem ser observadas para outras distâncias evolutivas nas Figuras 2.10 e 2.11, onde são apresentados os números de filotipos estimados pelo algoritmo de Chao1. Os valores dos índices de Simpson e Shannon também indicam uma maior diversidade no PM8 nas amostragens realizadas em julho e setembro, havendo uma equivalência de diversidade dentro de cada um dos poços.

Os resultados sugerem que o PM6, contaminado por PCE, selecionou populações bacterianas específicas, as quais não foram detectadas no poço não-contaminado com PCE (PM8).

Tabela 2.1 - Estimativa de riqueza de UTOs, índice de diversidade e cobertura de amostragem calculados a partir da análise de seqüências de clones do gene rRNA 16S de *Bacteria* de amostras de água subterrânea de poços de monitoramento contaminados (PM6) e não-contaminados (PM8) com PCE, em quatro épocas de amostragem

Comunidade	NS ^a	NU ^b	Estimativa de riqueza de UTOs		Índice de Diversidade		ECA ^e
			ACE	Chao1	Shannon ^c	1/D ^d	
D = 0,03							
PM6 (mar2005)	86	36	57,1 (43,9; 92,2)	66,1 (45,5; 131,0)	3,20 (2,99; 3,40)	15,38 (10,00; 32,26)	0,779
PM6 (mai2005)	84	34	54,6 (41,8; 88,7)	50,0 (38,9; 86,1)	3,24 (3,08; 3,40)	20,00 (15,63; 27,03)	0,810
PM6 (jul2005)	78	35	50,0 (40,4; 76,0)	46,3 (38,4; 72,4)	3,34 (3,19; 3,49)	23,26 (18,52; 29,41)	0,808
PM6 (set2005)	74	28	39,9 (31,8; 64,9)	38,3 (30,7; 66,5)	2,95 (2,73; 3,16)	12,35 (8,47; 12,35)	0,838
PM8 (mar2005)	92	44	84,8 (61,6; 138,6)	70,0 (53,8; 113,1)	3,46 (3,28; 3,63)	22,22 (16,13; 34,48)	0,728
PM8 (mai2005)	56	35	132,1 (72,7; 285,4)	156,5 (70,3; 453,8)	3,30 (3,10; 3,50)	20,00 (14,71; 30,30)	0,518
PM8 (jul2005)	78	49	145,8 (88,7; 285,0)	94,4 (67,7; 159,0)	3,66 (3,49; 3,83)	27,03 (18,18; 52,63)	0,577
PM8 (set2005)	86	58	226,5 (130,4; 450,3)	142,0 (94,7; 250,5)	3,84 (3,68; 4,00)	32,26 (21,74; 62,50)	0,500

Para a deficção de UTOs utilizou-se D = 0,03: ^aNúmero de seqüências. ^bNúmero de UTOs determinado pelo DOTUR. ^cEstimador de máxima semelhança. ^dRecíproco do índice de Simpson (estimador de máxima semelhança). ^eEstimativa de cobertura de amostragem. Valores entre parênteses representam o intervalo com 95% de confiança.

Figura 2.10 - Número de filotipos de *Bacteria* estimado para diferentes distâncias evolutivas em diferentes períodos de amostragem utilizando-se o estimador não-paramétrico Chao1. As barras representam o intervalo de confiança (95% de probabilidade). A e B referem-se ao número de filotipos do PM6 e PM8, respectivamente

Figura 2.11 - Número de filotipos de *Bacteria* estimado para diferentes distâncias evolutivas em diferentes períodos de coleta amostragem utilizando-se o estimador não-paramétrico Chao1. As barras representam o intervalo de confiança (95% de probabilidade). A, B, C e D referem-se a comparação do número de filotipos do PM6 e PM8, nas quatro épocas de amostragem, respectivamente

A comparação estatística da biblioteca de clones do gene rRNA 16S, utilizando o S-LIBSHUFF, mostrou que todas as comunidades diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, exceto as comunidades do PM6 amostradas em maio e julho de 2005 ($p > 0,05$) (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 – Valores de p calculado nas comparações múltiplas entre as bibliotecas de clones do gene rRNA 16S das comunidades de *Bacteria* de amostras de água subterrânea de poços de monitoramento contaminados (PM6) e não-contaminados (PM8) com PCE em quatro épocas de amostragem

X	Y							
	PM6 (mar2005)	PM6 (mai2005)	PM6 (jul2005)	PM6 (set2005)	PM8 (mar2005)	PM8 (mai2005)	PM8 (jul2005)	PM8 (set2005)
PM6 (mar2005)	-	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000
PM6 (mai2005)	0,0000	-	0,0098	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
PM6 (jul2005)	0,0000	0,0111	-	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
PM6 (set2005)	0,0000	0,0001	0,0001	-	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
PM8 (mar2005)	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000	-	0,0000	0,0000	0,0000
PM8 (mai2005)	0,0006	0,0001	0,0004	0,0358	0,0000	-	0,0000	0,5062
PM8 (jul2005)	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	-	0,0001
PM8 (set 2005)	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	-

X homólogo na coluna e Y homólogo na linha. Valores mínimos para diferença significativa: 0,0002 e 0,0009 para 1% e 5% de probabilidade, respectivamente.

Quando analisadas as freqüências de UTOs no PM6 e PM8, pode-se observar a maior freqüência no PM8 (58,12%) quando comparado a PM6 (26,67%), sendo poucas UTOs semelhantes entre os poços (15,21%) (Figura 2.12).

As UTOs do PM6 (26,67%), as quais podem estar diretamente relacionadas com a presença do PCE, foram identificadas como sendo pertencentes às classes *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Bacilli*, *Bacteroidetes* e *Acidobacteria*.

Figura 2.12 – Diagrama de Venn baseado na freqüência de UTOs nos poços contaminado (PM6) e não-contaminado (PM8) por PCE

2.2.3 Discussão

A partir dos resultados de concentração de COVs obtidos nos diferentes PMs, ao longo de 8 meses, foi possível observar que o PCE está restrito à área próxima ao PM6 e que esse contaminante tem migração restrita, possivelmente pelas características químicas da molécula, da mesma forma que o TCE. Este fato pode ser considerado favorável, pois a pluma apresenta baixa migração e a presença do PCE/TCE por períodos prolongados no solo saturado pode favorecer a seleção de microrganismos eficientes na sua degradação.

A ocorrência de intermediários da via de degradação do PCE, ou seja, TCE, *cis e trans*-DCE e VC na área sugere ocorrência de degradação anaeróbia no local, muito embora o potencial redox da água subterrânea sugira que o ambiente é óxico.

O monitoramento dos parâmetros físico-químicos da área de estudo mostrou uma oscilação do Eh e OD ao longo do tempo, condição que ocorre com frequência nas águas subterrâneas pela ação de fatores externos bem como pela velocidade de circulação da água, deslocando compostos e conseqüentemente flutuando às condições físico-químicas do ambiente. A oscilação do Eh pode ser explicada pela riqueza de compostos orgânicos presentes na área, bem como pelo dinamismo próprio deste tipo de ambiente, o que condicionada à variação nos processos de oxidação e redução. Segundo Lindberg e Runnels (1984), em análises de águas subterrâneas de diferentes áreas pode-se observar que o potencial redox na maioria dos casos não é constante, ocorrendo variações de até 1000 milivolts. Embora sofra esta variação, o monitoramento do Eh é importante, pois determina os tipos de reações bioquímicas prevaletentes no ambiente (HOUNSLOW, 1995; LOGAN, 1965).

Assim como o Eh, OD também apresentou variação ao longo do tempo, sendo que níveis de oxigênio dissolvido são dependentes da concentração de matéria orgânica na água. A concentração de OD na água está sujeita às variações diárias em função da temperatura, da atividade fotossintética, da turbulência da água e da vazão (BUENO; GALBIATTI; BORGES, 2004; Von SPERLING, 1996). Da mesma forma que para o Eh, a concentração de OD na água subterrânea da área denota um ambiente óxico, o que seria incompatível com a ocorrência de descloração do PCE, a qual só ocorre em anaerobiose (GERRITSE et al., 1997).

Quanto a CE os valores observados podem indicar que o ambiente está impactado, já que valores superiores a 100 $\mu\text{S cm}^{-1}$ indicam ambientes afetados por substâncias ionizáveis

(CETESB, 2006; CUSTÓDIO; LLAMAS, 1983). A CE variou com o local de amostragem, mas não variou com o tempo, sugerindo a existência de fontes localizadas de contaminação.

Em trabalho realizado por Rosseti et al. (2003), pode-se observar que o processo de descloração é realizado por algumas bactérias anaeróbias. A descloração do PCE foi detectada para várias bactérias do gênero *Desulfotobacterium*, *Dehalobacter*, *Clostridium*, *Dehalospirillum*, *Desulfuromonas* e *Dehalococcoides*, sendo este último o único que possui capacidade de degradar PCE a ETH.

Em trabalho realizado por Richardson et al. (2002) uma sub-cultura de consórcio microbiano anaeróbio que foi exposta durante a noite ao oxigênio perdeu a habilidade de descloração do TCE. Contudo, nesta mesma cultura adicionou-se lactato como doador de elétrons e TCE como o aceptor de elétrons, VC foi constantemente acumulado. Porém, outras sub-culturas que não foram expostas a oxigênio foram capazes de desclorar completamente o TCE para ETH, comprovando a viabilidade da utilização de microrganismos anaeróbios no processo de biodegradação do PCE.

Segundo Holliger, Wohlfarth e Diekert (1999), *Dehalococcoides* sp. foram capazes de desclorar redutivamente dicloroetenos e VC, produzindo ETH como parte de seu metabolismo, a partir da análise de 24 locais onde ocorreu descloração de etenos clorados ao longo da América do Norte e Europa. A presença de *Dehalococcoides* foi sempre associada à degradação completa de etenos clorados. Ao contrário, em sítios onde *Dehalococcoides* não foi detectado a descloração era incompleta. Isto sugere que a presença de *Dehalococcoides* é uma condição essencial para degradação completa de etenos clorados.

Assim, a análise de comunidades microbianas em ambiente onde ocorre a descloração do PCE, é essencial para entender os mecanismos de degradação do mesmo.

A técnica da PCR-DGGE de fragmentos do gene rRNA 16S é uma ferramenta potente para o estudo da diversidade de comunidades (CHO; LEE; CHOI, 2003). No entanto, uma série de limitações são intrínsecas da metodologia. Muyzer e Smalla (1998) demonstraram que nem sempre é possível separar fragmentos de DNA que tenham pequenas variações nas seqüências. Um resultado similar foi descrito por Buchholz-Cleven et al. (1997), onde não foi possível separar fragmentos de rRNA 16S com diferenças de dois a três nucleotídeos. Vallaey et al. (1997) mostraram que fragmentos do gene rRNA 16S, obtidos de diferentes bactérias oxidantes de metano, não puderam ser observados após DGGE.

Em trabalho feito por Ishii et al. (2000), utilizando PCR-DGGE para caracterização da estrutura da comunidade de bactéria de água subterrânea de cinco poços de monitoramento em Kamaishi Mine no Japão, foi possível observar que em apenas dois poços a estrutura da comunidade foi semelhante, sendo que os demais poços apresentaram estruturas de comunidade distintas. Já em trabalho desenvolvido na Coréia, amostras de água subterrânea de locais com diferentes atividades (industrial, residencial e agrícola) foram analisadas para comparação da estrutura da comunidade bacteriana por PCR-DGGE e mostrou estruturas de comunidade distintas em todas as amostras (CHO; LEE; CHOI, 2003).

Em ambientes saturados, a movimentação dos microrganismos entre diferentes locais pode ser facilitada. No entanto, a heterogeneidade do meio sólido pode ser fator preponderante na estrutura das comunidades microbianas. A variação tanto espacial quanto temporal das comunidades bacterianas, com base nas análises por PCR-DGGE, indica que o ambiente é complexo e a associação da ocorrência dos microrganismos específicos com atividades bioquímicas é limitada.

A comunidade microbiana em ecossistemas contaminadas tende a ser dominada por organismos capazes de utilizar o contaminante em seus processos metabólicos (ATLAS et al., 1991; MACNAUGHTON et al., 1999). A introdução do poluente em ecossistemas tende a reduzir a diversidade da comunidade bacteriana e promover a seleção de vias metabólicas envolvidas na degradação dos mesmos (SAYLER et al., 1982; ATLAS; BARTHA, 1998; EICHNER et al., 1999; Van der MEER, 2006).

Hohnstock-Ashe et al. (2001) detectaram seqüências similares a *Dehalospirillum*, *Dehalococcoides* e *Syntrophus* em um aquífero contaminado com TCE, sendo estes pertencentes aos filos *Proteobacteria*, *Chloroflexi* e *Proteobacteria*, respectivamente. *Dehalococcoides* foi detectado por PCR usando iniciadores específicos em praticamente todos os PMs analisados. Contudo, seqüências do gene rRNA 16S, similares a *Dehalococcoides*, não foram detectadas nas bibliotecas PM6 e PM8, muito embora representantes do filo *Chloroflexi* tenham sido detectados no PM8. Esses dados sugerem que este gênero não esteja representado no conjunto de clones seqüenciados, provavelmente por estar presente na área em densidades populacionais muito baixas.

Da mesma forma, Rosseti et al. (2003), em trabalho avaliando a cinética de degradação do PCE, também não encontraram representantes do gênero *Dehalococcoides* entre os 616 clones seqüenciados, o que sugere que essas bactérias ocorram em baixas densidades populacionais.

Nas comunidades de bactérias dos PM6 e PM8, predominou *Proteobacteria*. Normalmente este filo é o mais abundante em sítios ambientais e é constituído por bactérias de diferentes características morfológicas e metabólicas (MARGULIS; SCHWARTZ, 1998). Dentre as classes detectadas, *Gammaproteobacteria* foi a mais abundante, sendo esta composta por: bactérias aeróbias, halofílicas, quimiorganotróficas, bactérias de ambientes marinhos, bactérias que utilizam diferentes fontes de enxofre e metanotróficas (FREEBORN et al., 2005).

Já *Alphaproteobacteria*, grupo também presente em abundância nas amostras analisadas, é uma classe composta por organismos que, na sua maioria, habitam ambientes aquáticos, havendo representantes envolvidos na degradação de hidrocarbonetos aromáticos (GARRITY; HOLT, 2001). Quanto a classe *Deltaproteobacteria*, esta é caracterizada por bactérias redutoras de sulfato (GARRITY; HOLT, 2001). A classe *Betaproteobacteria* inclui bactérias quimioautotróficas e quimioheterotróficas. Membros desta classe podem ser encontrados no solo e água, e alguns são patogênicos a humanos (GARRITY; HOLT, 2001).

Richardson et al. (2002) em trabalho feito para caracterizar filogeneticamente as comunidades microbianas envolvidas na degradação do PCE encontraram representantes de *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* e *Deltaproteobacteria*. Da mesma maneira, Freeborn et al. (2005) determinaram os organismos presentes em culturas de enriquecimento para degradação de PCE, utilizando diferentes doadores de elétrons, (lactato, metanol, propionato e butirato) e também observaram representantes de *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* e *Deltaproteobacteria* nas amostras analisadas em áreas contaminadas com PCE.

Já Yoshida, Takahashi e Hiraishi (2005), encontraram, em estudos com microcosmos para degradação de dioxinas policlorinadas, representantes de *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* e *Deltaproteobacteria*.

Das classes bacterianas encontradas apenas no PM6 em todos os períodos de coleta (*Bacilli*, *Actinobacteria*, *Flavobacteria* e *Cyanobacteria*) com exceção de *Cyanobacteria*, todas foram identificadas em trabalhos com microcosmos enriquecidos com PCE, o que indica o envolvimento destes grupos de organismos na degradação do PCE e/ou seus produtos de degradação.

Richardson et al. (2002) e Freeborn et al. (2005) detectaram *Dehalococcoides* e *Flavobacteria* na Alameda Naval Air Station (ANAS) em culturas de enriquecimento com TCE. Já Rosseti et al. (2003), observaram a predominância de *Spirochaetes* com habilidade para degradar PCE a VC, em culturas de enriquecimento, sendo que estas também continham *Flavobacteria*.

Em trabalho de enriquecimento para degradação de TCE em amostras de água subterrânea foram identificados organismos de diferentes classes, dentre as quais, *Bacilli*, *Actinobacteria* e *Flavobacteria* (FUTAMATA et al., 2005).

Com base nos resultados obtidos a partir do seqüenciamento de clones do gene rRNA 16S, é possível que a degradação do PCE na área estudada seja realizada por consórcios anaeróbios/aeróbios, envolvendo um grande número de espécies bacterianas.

2.3 Conclusões

As estruturas das comunidades de bactérias em água subterrânea contaminada com PCE/TCE foram afetadas pela posição do PM e pela época de amostragem, com base nas análises por PCR-DGGE e seqüenciamento de clones do gene rRNA 16S.

A estrutura da comunidade bacteriana no PM6 apresentou associação com a concentração de COVs.

Dehalococcoides foram detectados em amostras de água subterrânea tanto de poços contaminados quanto não-contaminados com PCE.

O seqüenciamento de clones do gene rRNA 16S mostrou que *Dehalococcoides* não foi detectado no PM6 e PM8, em várias épocas de amostragem.

Pela estimativa de riqueza de UTOs, bem como pelos índices de diversidade, PM6 apresentou menor diversidade bacteriana do que PM8, pelo menos em duas épocas de amostragem, sugerindo que a presença do PCE reduz a diversidade bacteriana e seleciona grupos específicos.

Referências

- AGNELLI, A.; ASCHER, J.; CORTI, G.; CECCHERINI, M.T.; NANNIPIERI, P.; PIETRAMELLARA, G. Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, 859–868, 2004.
- ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AOS POLUENTES/ASSOCIAÇÃO DE CONSCIÊNCIA À PREVENÇÃO OCUPACIONAL (ACPO). **Perigo químico**, 1994. Disponível em: http://www.acpo.org.br/perigo_quimico.htm. Acesso em: 3 jul. 2006.
- ATLAS, R.M.; HOROWITZ, A.; KRICHEVSKY, M.I.; BEJ, A.K. Response of microbial population to environmental disturbance. **Microbial Ecology**, New York, v. 22, p. 249-256, 1991.
- BHATT, P.; SURESH KUMAR, M.; MUDLIAR S.; CHAKRABARTI. T. Review: biodegradation of chlorinated compounds. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, New York, v. 37, p. 165–198, 2007.
- BUCHHOLZ-CLEVEN, B.E.E.; RATTUNDE, B.; STRAUB, K.L. Screening for genetic diversity of isolates of anaerobic Fe (II) oxidizing bacteria using DGGE and whole cell hybridization. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 20, p. 301–309, 1997.
- BUENO, L.F.; GALBIATTI, J.A.; BORGES, M.J. Monitoramento de variáveis de qualidade da água do Horto Ouro Verde. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 742-748, 2005.
- CHAO, A.; CHEN, T.C. Disponível em: <<http://chao.stat.nthu.edu.tw>>. Acesso em: 20 ago. 2007.
- CHO, H.B.; LEE, J.K.; CHOI, Y.K. The Genetic Diversity Analysis of the Bacterial Community in Groundwater by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 41, p. 133-791, 2003.
- COLE, J.R.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; BANDELA, A.M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, 169-172, 2007.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Relação de Áreas Contaminadas**, 2007. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp>. Acesso em: 15 ago. 2007.
- CUSTÓDIO, E.; LLAMAS, M.R. **Hidrogeologia subterrânea**. 3ed. Barcelona: Edicione Omega, 1983. 2350 p.

DENNIS, P.C.; SLEEP, B.E.; FULTHORPE, R.R.; LISS, S.N. Phylogenetic analysis of bacterial populations in an anaerobic microbial consortium capable of degrading saturation concentrations of tetrachloroethylene. **Canadian Journal of Microbiology**, Saskatchewan, v. 49, p. 15–27, 2003.

DUHAMEL, M.S.D.; WEHR, L.Y.; HOMA, R.; SEEPERSAD, D.; DWORATZEK, S.; COX, E.E.; EDWARDS, E.A. Comparison of anaerobic dechlorinating enrichment cultures maintained on tetrachloroethene, trichloroethene, cis-dichloroethene and vinyl chloride. **Water Research**, Amsterdam, v. 36, p. 4193-4202, 2002.

EICHNER, C.A.; ERB, R.W.; TIMMIS, K.N.; DOBLER, I.W. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 102-109, 1999.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.

FELSENSTEIN, J. Disponível em: <<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>> Acesso em: 10 Sept. 2007.

FREEBORN, R.A.; WEST, K.A.; BHUPATHIRAJU, V.K.; CHAUHAN, S.; RAHM, B.G.; RICHARDSON, R.E.; ALVAREZ-COHEN, L. Phylogenetic analysis of TCE-dechlorinating consortia enriched on a variety of electron donors. **Environmental Science Technology**, Philadelphia, v. 39, p. 8358–8368, 2005.

FREEDMAN, D. L.; GOSSETT, J.M. Biological Reductive Dechlorination of Tetrachloroethylene and Trichloroethylene to Ethylene under Methanogenic Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 9, p. 2144-2151, 1989.

FUTAMATA, H.; NAGANO, Y.; WATANABE, K.; HIRAISHI, A. Unique Kinetic Properties of Phenol-Degrading *Variovorax* Strains Responsible for Efficient Trichloroethylene Degradation in a Chemostat Enrichment Culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 2, p. 904–911, 2005.

GARRITY, G.M.; HOLT, J.H. A ROAD MAP TO THE MANUAL. IN: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, G.M. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. Berlin: Springer, 2001. 721 p.

GERRITSE, J.; KLOETSTRA, G.; BORGER, A.; DALSTRA, G.; ALPHENAAR, A.; GOTTSCHAL, J.C. Complete degradation of tetrachloroethene in coupled anoxic and oxic chemostats. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 48, p. 553-562, 1997.

HOHNSTOCK-ASHE, A.M.; PLUMMER, S.M.; YAGER, R.M.; BAVEYE, P.; MADSEN, E.L. Further biogeochemical characterization of a trichloroethene-contaminated fractured dolomite aquifer: electron source and microbial communities involved in reductive dechlorination. **Environmental Science Technology**, Philadelphia, v. 35, p. 4449–4456, 2001.

HOLLIGER, C.; WOHLFARTH, G.; DIEKERT, G. Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 22, p. 383–398, 1999.

HOUNSLOW, A.W. **Water quality data: analysis and interpretation**. New York: Lewis Publishers, 1995. 397 p.

ISHII, K.; TAKII, S.; FUKUNAGA, S.; AOKI, K. Characterization by denaturing gradient gel electrophoresis of bacterial communities in deep groundwater at the Kamaishi Mine, Japan. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v.46, p. 85–93, 2000.

LAMBAIS, M.R.; CURY, J.R.; BARETTA, C.R.M.; BÜLL, R.C. **Tópicos em ciência do solo - diversidade microbiana nos solos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. v. 4, p. 43-84.

LINDBERG, R.D.; RUNNELLS, D.D. Ground Water Redox Reactions: An Analysis of Equilibrium State Applied to Eh Measurements and Geochemical Modeling. **Science**, Washington, v. 225, n. 4665, p. 925-927, 1984.

LOGAN, J. **Interpretações de análises químicas de água**. Recife: U.S. Agency for International Development, 1965. 67 p.

MACNAUGHTON, S.J.; STEPHEN, J.R.; VENOSA, A.D.; DAVIS, G.A.; CHANG, Y.; WHITE, D.C. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 3566-3574, 1999.

MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K.V. **Five kingdoms: an illustrated guide to the phyla of life on earth**. 3rd ed. New York: WH Freeman, 1998. 520 p.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Mini review: application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 73, p. 127–141, 1998.

NIELSEN, R.B.; KEASLING, J.D. Reductive Dechlorination of Chlorinated Ethene DNAPLs by a Culture Enriched from Contaminated Groundwater. **Biotechnology and Bioengineering**, New Jersey, v. 62, n. 2, 1999.

ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3367-3373, 1997.

RICHARDSON, R.E.; BHUPATHIRAJU, V.K.; SONG, D.L.; GOULET, T.A.; ALVAREZ-COHEN, L. Phylogenetic characterization of microbial communities that reductively dechlorinate TCE based upon a combination of molecular techniques. **Environmental Science Technology**, Philadelphia, v. 36, p. 2652–2662, 2002.

RONAGHI, M.; UHLÉN, M.; NYRÉN, P. DNA sequencing: A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate. **Science**, Washington, v. 281, n. 5375, p. 363 – 365, 1998.

ROSSETTI, S.; BLACKALL, L.L.; MAJONE, M.; HUGENHOLTZ, P.; PLUMB, J.J.; TANDOI, V. Kinetic and phylogenetic characterization of an anaerobic dechlorinating microbial community. **Microbiology**, New York, v. 149, p. 459–469, 2003.

SAYLER, G.S.; SHERRILL, T.W.; PERKINS, R.E.; MALLORY, L.M.; SHIARIS, M.O.; PETERSEN, D. Impact of coal-coking effluent on sediment microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 44, p. 1118-1129, 1982.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing to DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

_____. Introducing SONS, a Tool for Operational Taxonomic Unit-Based Comparisons of Microbial Community Memberships and Structures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 10, p. 6773–6779, 2006.

SINGLETON, D.R.; FURLONG, M.A.; RATHBUN, S.L.; WHITMAN, W.B. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4374-4376, 2001.

THOMPSON, J.R.; RANDA, M.A.; MARCELINO, L.A.; TOMITA-MITCHELL, A.; LIM E.; POLZI, M.F. Diversity and dynamics of a North Atlantic coastal *Vibrio* community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 4103-4110, 2004.

VALLAEYS, T.; TOPP, E.; MUYZER, G.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G.; SOULAS, G. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rRNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 24, p. 279–285, 1997.

Van der MEER, J. R. Environmental pollution promotes selection of microbial degradation pathways. **Frontiers in Ecology and Environmental**, New York, v. 4, p. 35-42, 2006.

VLIEG, J.E.T.V.H.; JANSSEN, D.B. Formation and detoxification of reactive intermediates in the metabolism of chlorinated ethenes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 85, p. 81–102, 2001.

Von SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. Belo Horizonte: DESA-UFGM, 1996. 243 p.

YOSHIDA, N.; TAKAHASHI, N.; HIRAISHI, A. Phylogenetic Characterization of a Polychlorinated-Dioxin-Dechlorinating Microbial Community by Use of Microcosm Studies. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 8, p. 4325–4334, 2005.

3 DEGRADAÇÃO DO TETRACLOROETENO EM REATOR HORIZONTAL DE LEITO FIXO

Resumo

Degradação do tetracloroeteno em reator horizontal de leito fixo

O tetracloroeteno é um solvente orgânico comumente encontrado como contaminante de águas subterrâneas. Sua degradação se dá a partir de uma via sequencial de descloração redutiva, em condição anaeróbia, formando: tricloroeteno (TCE), cis-dicloroeteno (cis e trans-DCE), cloreto de vinila (VC) e etileno (ETH). Não existem relatos da degradação do PCE por microrganismos em condições aeróbias, contudo TCE, cis e trans-DCE, VC e ETH podem ser degradados em aerobiose. Desta forma este trabalho tem por objetivo selecionar um consórcio microbiano capaz de degradar eficientemente o PCE em reator horizontal de leito fixo (RHLF), a partir da utilização de diferentes doadores de elétrons. Para tanto uma amostra de sedimento de um poço de monitoramento de uma área sabidamente contaminada com PCE foi coletada e imobilizada em suporte de poliuretano, sendo em seguida acondicionada no reator. Os reatores foram então preenchidos com meio mineral básico suplementado com PCE para cultivo de enriquecimento. A estrutura da comunidade bacteriana, durante o cultivo de enriquecimento, foi monitorada a partir da PCR-DGGE, do sequenciamento de clones do gene rRNA 16S e detecção de *Dehalococcoides* a partir da PCE com iniciadores específicos. Após o cultivo de enriquecimento, ensaios de degradação foram avaliados a partir da utilização de meio mineral básico contendo ou não doadores de elétrons (lactato ou acetato). A eficiência de degradação do PCE foi monitorada a partir da análise de oxigênio dissolvido (OD), pH, potencial redox (Eh), condutividade elétrica (CE) e concentração de PCE, TCE, cis-DCE e VC. Os resultados da PCR-DGGE mostram que ocorreu variação na estrutura da comunidade bacteriana ao longo do tempo, com relação à comunidade presente no sedimento amostrado inicialmente, evidenciando a seleção de microrganismos pela presença do PCE. As análises de sequenciamento mostraram resultados semelhantes aos da PCR-DGGE, confirmando a seleção de organismos a partir do cultivo com PCE. A partir das análises de sequenciamento, foram identificados grupos de microrganismos selecionados pelo cultivo de enriquecimento com PCE, dos quais cabe destacar os representantes das classes *Alphaproteobacteria* e *Sphingobacteria*. Foi possível detectar *Dehalococcoides* em todos os períodos de amostragem, o que é um indicativo da presença de microrganismos com capacidade de degradar o PCE. Já no ensaio de degradação do PCE, os parâmetros físico-químicos não mostraram variações nos reatores, cabendo destacar níveis elevados de oxigênio dissolvido, semelhante às condições de campo. As análises de compostos orgânicos voláteis (PCE, TCE, cis e trans-DCE e VC) mostraram uma grande eficiência na degradação do PCE (98%) com a utilização do RHLF, com um tempo de retenção de 12 horas, não havendo diferença significativa na percentagem de degradação do PCE entre o tratamento controle sem doador de elétrons e com lactato ou acetato. Intermediários na via de degradação do PCE não foram formados. Como o Eh e a concentração de OD no meio com PCE indicam que o ambiente é óxido, é possível que o processo de biodegradação do PCE não tenha ocorrido em anaerobiose. Assim, os resultados sugerem a ocorrência de uma via aeróbia de degradação do PCE.

Palavras-chave: Biorremediação, Reator anaeróbio, Tetracloroeteno

Abstract

Degradation of tetrachloroethane in horizontal fixed bed reactor

Tetrachloroethene is an organic solvent commonly found in contaminated groundwater. Its degradation comes from a sequential reductive dechlorination pathway, under anaerobic conditions, forming, respectively, trichloroethene (TCE), *cis*- and *trans*-dichloroethene (*cis*- and *trans*-DCE), vinyl chloride (VC) and ethylene (ETH). There are no reports of the microbiological degradation of PCE under aerobic conditions, however, TCE, *cis* and *trans*-DCE, VC and ETH can be degraded aerobically. Therefore, the purpose of this work is to select a microbial consortium capable to degrade PCE efficiently in a horizontal fixed bed reactor (RHLF), by the use of different electron donors. Hence, a sludge sample from a monitoring well in a known PCE contaminated area was collected, immobilized in polyurethane supporting and followed conditioned in the reactor. The reactors were then filled with basic mineral medium supplemented with PCE for the bacterial culture enrichment. The bacterial community structure, during the enrichment cultivation, was monitored by PCR-DGGE, 16S rRNA gene clones sequencing and detection of *Dehalococcoides* from PCR with specific primers. After the enrichment cultivation, degradation trials were evaluated based in the utilization of the basic mineral medium with or without electron donors (lactate and acetate). The PCE degradation efficiency was monitored by the dissolved oxygen analyses, pH, redox potential, electrical conductivity and concentration of PCE, TCE, *cis*- and *trans*-DCE and VC. The PCR-DGGE results showed the occurrence of variation in the bacterial community structure throughout time in comparison with the initial sludge sampling, suggesting the microorganism selection in the presence of PCE. Similar results as showed by PCR-DGGE were found through sequencing analysis, confirming the ability of PCE to select microorganisms. The sequencing analysis also allowed the identification of the microorganism groups selected under enrichment culture with PCE, being the most representatives from *Alphaproteobacteria* and *Sphingobacteria* classes. The presence of *Dehalococcoides* was observed in all of the sampling periods, which is an indicative to the presence of microorganisms capable to degrade PCE. Results in the degradation trial of PCE did not show variations in the physical-chemical parameters along the reactors, drawing attention to the high levels of dissolved oxygen, similar to field conditions. The analysis of volatile organic compounds (PCE, TCE, *cis*- and *trans*-DCE and VC) showed a high efficiency degradation of PCE (98%) with the utilization of RHLF, within retention time of 12 hours. No significant differences were observed in the percentage of PCE degradation in relation to the presence or absence of electron donors (lactate or acetate), neither the formation of intermediate PCE reductive dechlorination pathway products. How indicated by the Eh value and OD concentration, the PCE medium environment is oxidative, supporting evidences that a no anaerobic PCE degradation might be occurred. In synthesis, the results suggesting the occurrence of a new alternative aerobic pathway able to degrade PCE.

Keywords: Biorremediation, Anaerobic reactor, Tetrachloroethene

3.1 Introdução

Uma significativa quantidade e variedade de substâncias xenobiontes são liberadas no ambiente, seja a partir de suas aplicações, bem como por derramamentos de forma acidental ou disposição de forma inadequada. Alguns destes compostos são considerados tóxicos para humanos, plantas e animais. A persistência dos xenobiontes no solo e na água varia amplamente, podendo ser degradados por microrganismos ou sofrer degradação não-biológica, desaparecendo em semanas, enquanto outros podem persistir por anos (GIBSON; PARALES, 2000; DUA et al., 2002; BLACKBURN; HAFKER, 1993).

Existem vários processos para a remoção de constituintes orgânicos do solo e da água, dentre eles os processos de biorremediação.

A biorremediação é um processo que tem sido utilizado desde o final da década de 70 para degradar produtos derivados de petróleo e hidrocarbonetos, o qual utiliza microrganismos naturais capazes de degradar poluentes tanto no solo quanto na água. A biorremediação pode ser feita *in situ* e *ex situ*. Na remediação *in situ*, o tratamento do solo ou da água subterrânea contaminada é feito no próprio local, sendo mais eficaz em solos permeáveis, como os arenosos. Na biorremediação *ex situ* o solo contaminado é removido ou a água subterrânea é extraída por bombeamento para que o tratamento biológico seja realizado em um reator (BLACK, 2002).

A biodegradação de xenobiontes pode ocorrer sob condições aeróbias ou anaeróbias, sendo que a eficiência da degradação em ambas as condições varia de acordo com a molécula a ser degradada. Na degradação aeróbia o O₂ atua como aceptor de elétrons, enquanto que no processo de degradação anaeróbia o aceptor de elétrons é outra substância que não o O₂. A maioria dos compostos aromáticos clorados, bem como alguns pesticidas, são degradados unicamente em anaerobiose (BHATT et al., 2007).

Existe uma variedade de métodos biológicos que podem ser utilizados para a remediação de solos e águas subterrâneas contaminadas, tais como, fitorremediação, atenuação natural, biopilhas, bioaumento, bioventilação (bioventing) e bioaeração (biosparging) (BRUIN et al., 1992).

Normalmente, os microrganismos utilizados nos processos de biorremediação são endógenos, podendo também ser introduzidos microrganismos de outros locais (exógenos), caso

os nativos não ocorram em quantidade suficientes ou apresentem baixa eficiência de degradação do xenobionte (FREEDMAN; GOSSET, 1989).

Até novembro de 2006 foram registradas 1822 áreas contaminadas no estado de São Paulo, mas apesar do número expressivo de áreas contaminadas, poucas estão com processo de remediação concluído (2%) ou em andamento (36%). Das áreas com processo de remediação concluído ou em andamento, a biorremediação representa apenas 0,98%. Das 1822 áreas registradas 465 delas foram contaminadas com organoclorados (CETESB, 2007).

Compostos orgânicos clorados constituem um grande grupo de contaminantes, o qual está na lista de poluentes prioritários compilados pela “U.S Environmental Protection Agency (U.S. EPA)”. Organoclorados atingem o ambiente em larga escala, como resultado de sua ampla utilização como herbicida, inseticida, fungicida, solvente, fluido hidráulico, fumigante, aditivo de gasolina, desengraxante e intermediários para síntese de vários produtos químicos. A sua toxicidade, capacidade de bioconcentração, persistência no ambiente e distribuição ubíqua na biosfera, gera preocupação sobre sua influência na qualidade de vida (BHATT et al., 2007).

O potencial dos microrganismos para degradar compostos organoclorados *in situ* é a maior vantagem das técnicas de remediação biológica em comparação com técnicas físico-químicas utilizadas para a recuperação de solo e água subterrânea contaminados (BRUIN et al., 1992). Dentre os organoclorados, o tetracloroetano (PCE) é largamente empregado em indústrias, como um excelente solvente, sendo considerado um dos maiores poluentes de águas subterrâneas (PARSONS; WOOD; DEMARCO, 1984). A exposição ao PCE pode gerar consequências negativas a saúde pública, como problemas no sistema nervoso central, problemas renais e hepáticos, além de sua possível ação carcinógena (VARTIAINEN, 1993). A degradação do PCE se dá a partir de uma via sequencial de descloração redutiva, caracterizada pela substituição de um átomo de cloro por um átomo de hidrogênio em anaerobiose. Os elétrons para descloração redutiva são derivados da oxidação de compostos orgânicos. Tricloroetano (TCE), cis-dicloroetano (cis-DCE), cloreto de vinila (VC) e etileno (ETH), são frequentemente formados como intermediários ou produto final nesta via de degradação, sendo que dos produtos da via de degradação do PCE apenas ETH não é considerado tóxico (SCHOLZ-MURAMATSU et al., 1990, VOGEL; MCCARTY, 1985).

A reação de descloração redutiva é catalizada pela transição com metais, cofatores bacterianos, ou enzimas, requerendo doadores de elétrons. A fonte de elétrons deve estar presente

para que a reação ocorra. Doadores de elétrons para a descloração são usualmente substratos reduzidos, que estimulam o crescimento microbiano. Vários estudos vêm sendo conduzidos com diferentes substratos orgânicos, avaliando a habilidade dos mesmos no enriquecimento de sedimentos anaeróbios para degradação de PCE/TCE. Os substratos mais utilizados são: acetato, metanol, acetona, lactato e glicose, sendo a escolha do mesmo condicionada pelo tipo de metabolismo microbiano presente no sedimento (NIES; VOGEL, 1990).

Desulfuromonas chloroethenica e *Desulfuromonas michiganensis*, requerem acetato ou piruvato para declorar PCE a cis-DCE (KRUMHOLZ, 1997; SUNG et al., 2003). Já *Dehalococcoides ethenogenes* utiliza tanto hidrogênio quanto metanol como doadores de elétrons para descloração do PCE a ETH (MAYMÓ-GATELL; NIJENHUIS; ZINDER, 2001; ADRIAN et al., 2000; BUNGE, et al., 2003; HE et al., 2003).

Apesar dos avanços tecnológicos, a remediação de águas subterrâneas contaminadas com PCE *in situ* apresenta vários fatores limitantes. Por ser um ambiente dinâmico, que sofre aporte hídrico variado, a sua constituição química sofre modificações frequentes, dificultando o controle do metabolismo de populações microbianas de interesse. Por outro lado, a alteração das características químicas do meio e manutenção das condições favoráveis à atividade microbiana de interesse também apresenta uma série de limitações, em função da complexidade e heterogeneidade química e física do solo saturado ou não-saturado (ALLEN-KING et al., 2006).

Como alternativa a biorremediação *in situ* de águas subterrâneas contaminadas com PCE, microrganismos imobilizados em reatores podem ser utilizados com alta eficiência.

Foresti et al. (1995) desenvolveu um Reator Horizontal de Leito Fixo (RHLF) para a remediação do lodo de estações de tratamento de esgoto, o qual é constituído de um compartimento tubular contendo suporte para imobilização de biomassa. Sua configuração proporciona o aumento do volume útil reacional do reator, em consequência da redução do volume destinado à separação do gás, o qual poderia ser utilizado para a biorremediação de água subterrânea contaminada.

Desta forma este trabalho tem por objetivo avaliar a eficiência do cultivo de enriquecimento na seleção e ativação de organismos capazes de degradar o PCE em um RHLF, bem como avaliar a eficiência de degradação do PCE na presença de lactato ou acetato.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e métodos

3.2.1.1 Coleta de sedimento para enriquecimento

Com o intuito de realizar o cultivo de enriquecimento para seleção de microrganismos com capacidade de degradar o PCE, foi coletado sedimento de um poço de monitoramento de água subterrânea em área industrial contaminada com PCE. Para coleta do sedimento utilizou-se uma bomba peristáltica. A profundidade do poço era próxima a 4 metros de profundidade, com lençol freático a aproximadamente 3 metros da superfície do solo. Uma alíquota do sedimento foi removida e armazenada a -80°C , para posteriores análises microbiológicas.

O sedimento foi misturado a cubos de espumas de poliuretano (1 cm de aresta), os quais serviram como suporte para a imobilização dos microrganismos. O suporte com sedimento foi mantido por 16 horas e depois acondicionado no RHLF.

3.2.1.2 Funcionamento do RAHLF

O Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RHLF), em escala de bancada, foi confeccionado em acrílico com 100,0 cm de comprimento e 5,00 cm de diâmetro, com portas superiores para a captação de gases e amostragem do suporte, e portas laterais para a coleta de água (Figura 3.1).

O reator possui capacidade total de 1995 ml, sendo 700 ml de volume útil. A circulação da solução pelo reator foi realizada com o auxílio de uma bomba peristáltica. A retroalimentação do reator foi realizada por uma tubulação conectada a um frasco alimentador (Figura 3.1).

Figura 3.1 - Imagem do RAHLF com sistema de batelada para circulação do meio de enriquecimento seletivo

3.2.1.3 Cultivo de enriquecimento

Como alternativa para o cultivo de enriquecimento, o RAHLF foi mantido como um sistema fechado (batelada), ocorrendo à recirculação contínua do meio armazenado no frasco alimentador.

No enriquecimento foi utilizado meio mineral básico contendo 5 mg L⁻¹ de PCE (MMB+PCE), nitrato de potássio (0,3 mg L⁻¹), fosfato de potássio (0,15 mg L⁻¹), sulfito de sódio (5 mg L⁻¹) e lactato de sódio (2,5 mM L⁻¹) (MAYMÓ-GATELL et al., 1997). Este meio foi substituído periodicamente, a cada 20 dias, durante 9 meses, visando selecionar microrganismos capazes de utilizar o PCE como fonte de carbono.

3.2.1.4 Estrutura da comunidade bacteriana no RHLF

Como forma de monitorar as alterações nas estruturas das comunidades de bactérias no RHLF ao longo do tempo, amostras do biofilme imobilizado foram coletadas do reator e usadas para extração do DNA total. Para tanto o biofilme imobilizado foi acondicionado em béqueres autoclavados (50 mL) contendo solução tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0) e submetido à sonicação por 5 minutos a 12 kHz em um disruptor de células ultrassônico (Misonix Microson XL2000, Cole-Parmer Instrument Company, Illinois, USA), para liberação dos microrganismos do suporte. A solução tampão contendo a suspensão de células resultante foi centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. O pélete resultante foi ressuspenso em 1,0 mL de solução tampão e

as amostras foram armazenadas a -80°C para posterior extração do DNA metagenômico. Foram coletadas também amostras do frasco alimentador para determinar a estrutura das comunidades de bactérias em suspensão. As amostras do frasco alimentador foram coletadas em tubos de polipropileno de fundo cônico (50 mL) esterilizados e centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. O pélete resultante foi ressuspenso em 1,0 mL de solução tampão e as amostras foram armazenadas a -80°C para posterior extração do DNA metagenômico.

Primeiramente, a partir do início da operação do reator com meio enriquecido com PCE, foram coletadas amostras após 5 e 10 dias de enriquecimento com o PCE. As demais amostras foram coletadas na substituição dos meios do reator. Sendo assim, resumidamente, os períodos de coleta compreenderam:

- 5 dias (R5) e 10 dias (R10) após a instalação do reator com meio enriquecido com PCE, com coleta de espumas de diferentes pontos do mesmo, formando amostras compostas;
- 20 dias após a circulação do MMB+PCE, sendo coletadas amostras do suporte da entrada (E1) e saída (S1) do reator, como também a água do frasco alimentador (F1);
- 40 dias após a circulação do MMB+PCE, sendo coletadas amostras do suporte da entrada (E2) e saída do reator (S2), bem como da água do frasco alimentador (F2).

3.2.1.5 Extração do DNA metagenômico

O DNA metagenômico foi extraído utilizando-se o “Fast DNA kit” (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose 0,5X TBE-0,8%, depois de corado com “Sybr Green” (Amersham Biociences, São Paulo, Brasil). A concentração do DNA foi determinada por densitometria, utilizando o “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen, São Paulo, Brasil) como padrão e o programa “Fragment Analyses” (GE Healthcare, São Paulo, Brasil).

3.2.1.6 Detecção de *Dehalococcoides* por PCR

Primeiramente foi feita a amplificação por PCR utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os iniciadores BAC8f (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e BAC1541r (5' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3') (DUHAMEL et al., 2002). A amplificação do DNA

16S foi com tampão para DNA polimerase Taq Platinum contendo 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 1 U Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 5 pmol dos primers e 10 ng do DNA metagenômico. As condições de amplificação do PCR foram 3 min a 94°C; 30 ciclos de 45 seg a 94°C, 30 seg a 55°C e 90 seg a 72°C, e extensão final por 7 min a 72°C. A concentração dos produtos de PCR (amplicons) foi determinada por densitometria, após eletroforese em gel de agarose 0,5X TBE-0.8% e coloração com “SybrGreen” (GE Healthcare, São Paulo, Brasil), utilizando “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen, São Paulo, Brasil) como padrão. A aquisição da imagem dos géis foi feita com o densitômetro laser “FluorImager” (GE Healthcare, São Paulo, Brasil) e o programa “Fragment Analyses” (GE Healthcare, São Paulo, Brasil). A partir do material amplificado foi feito um “nested” PCR com a utilização de iniciadores específicos para *Dehalococcoides*: DHA728f (5’ AAG GCG GTT TTC TAG GTT GTC AC 3’) e DHA1115r (5’ AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3’) (DUHAMEL et al., 2002). Em ambas reações a reamplificação do DNA 16S foi com tampão para DNA polimerase Taq Platinum contendo 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 1 U Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 5 pmol dos primers e 10 ng do DNA metagenômico. As condições de amplificação do PCR foram 3 min a 94°C; 30 ciclos de 45 seg a 94°C, 30 seg a 58°C e 1,5 min a 72°C, e extensão final por 7 min a 72°C. A concentração dos produtos de PCR (amplicons) foi determinada por densitometria, após eletroforese em gel de agarose 0,5X TBE-0.8% e coloração com “Sybr Green” (GE Healthcare, São Paulo, Brasil), utilizando “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen, São Paulo, Brasil) como padrão. A aquisição da imagem dos géis foi feita com o densitômetro laser “FluorImager” (GE Healthcare, São Paulo, Brasil) e o programa “Fragment Analyses” (GE Healthcare, São Paulo, Brasil).

3.2.1.7 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante

A região V3 do gene rRNA 16S foi amplificada por PCR utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os iniciadores BA338fGC (5’ CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG 3’) e UN518r (5’ ATT ACC GCG GCT GCT GG 3’) (ØVREÅS et al., 1997). A amplificação do DNA 16S foi com tampão para DNA polimerase Taq Platinum contendo 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 1 U Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 5 pmol dos primers e 10 ng do

DNA metagenômico. As condições de amplificação do PCR foram 5 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C, e extensão final por 10 min a 72°C. A concentração dos produtos de PCR (amplicons) foi determinada por densitometria, após eletroforese em gel de agarose 0,5X TBE-0.8% e coloração com “Sybr Green” (GE Healthcare, São Paulo, Brasil), utilizando “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen, São Paulo, Brasil) como padrão. A aquisição da imagem dos géis foi feita com o densitômetro laser “FluorImager” (GE Healthcare, São Paulo, Brasil) e o programa “Fragment Analyses” (GE Healthcare, São Paulo, Brasil). Quantidades iguais de amplicons (300 ng) foram analisadas através de eletroforese em gel com 8% (m/v) de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1, m:m), contendo um gradiente de 15 a 55% de formamida e uréia (ØVREÅS et al., 1997). A eletroforese foi realizada à 200V e 60°C constantes, utilizando-se um sistema “DCode” (BioRad, Hercules, CA, USA), e tampão 1X TAE buffer. O DNA foi corado com “Vistra Green” (GE Healthcare, São Paulo, Brasil) e os géis analisados por densitometria, utilizando um densitômetro laser “FluorImager” e o programa “Diversity Database” (BioRad, Hercules, CA, USA).

3.2.1.8 Análise dos amplicons da DGGE

Os perfis de bandas após DGGE foram analisados por agrupamentos hierárquicos utilizando-se o programa Systat 11.0, com base em dados binários (presença ou ausência de bandas), pelo método de concordância simples (“simple matching”), com algoritmo de Ward e distância euclidiana como unidade de medida.

3.2.1.9 Isolamento de bactérias presentes no RHLF

Durante o período de cultivo e seleção de microrganismos no RHLF, bactérias cultiváveis presentes no reator foram isoladas por plaqueamento para posterior identificação por sequenciamento do gene rRNA 16S. Sendo assim, dois meios de cultura foram utilizados neste processo: ágar mineral básico suplementado com PCE (nitrato de potássio, 0,3 mg L⁻¹; fosfato de potássio, 0,15 mg L⁻¹; sulfito de sódio, 5 mg L⁻¹; lactato de sódio, 2,5 mM L⁻¹; PCE, 5 mg L⁻¹); ágar, 15 g L⁻¹) e ágar nutriente (triptona, 10 g L⁻¹; extrato de levedura, 5 g L⁻¹; NaCl, 10 g L⁻¹; ágar, 15 g L⁻¹).

Amostras do biofilme imobilizado foram acondicionadas em béqueres autoclavados (50 mL) contendo solução tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0) e sonicadas por 5 minutos a 12 kHz em um disruptor de células ultrassônico (Misonix Microson XL2000, Cole-Parmer Instrument Company, Illinois, USA), para liberação dos microrganismos aderidos no suporte. A solução tampão contendo a suspensão de células resultante foi centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. O pélete resultante foi ressuspenso em 1,0 mL de solução tampão. Uma alíquota de 500 µL da suspensão foi incubada em meio agarizado em duplicata, sendo incubadas em aerobiose ou anaerobiose (jarra de anaerobiose, PROBAC do Brasil) a 28°C por 48 horas, para o cultivo aeróbio e 28°C por 7 dias para cultivo anaeróbio. As colônias obtidas nas placas de meio mineral básico suplementado com PCE agarizado, tanto em aerobiose quanto anaerobiose, foram repicadas para obtenção de culturas puras. Após o isolamento as colônias foram transferidas para tubos de 1,5 mL contendo ágar nutriente a 28°C e incubadas por 48 horas, após esse período foram adicionados 500 µL de glicerol 50% as suspensões bacterianas e armazenadas a -20°C. As placas de ágar nutriente, após crescimento bacteriano e conseqüente obtenção de culturas puras, foram repicadas para ágar mineral básico suplementado com PCE para confirmação do crescimento no meio seletivo. Colônias que cresceram neste meio foram repicadas para tubos de 1,5 mL contendo ágar nutriente a 28°C e incubadas por 48 horas. Após esse período foram adicionados 500 µL de glicerol 50% e armazenadas a -20°C. Das colônias obtidas foi extraído DNA total, utilizando a mesma metodologia citada anteriormente e realizado o seqüenciamento direto do DNA das células.

3.2.1.10 Seqüenciamento direto do gene rRNA 16S

As regiões V1-V3 do gene rRNA 16S de microrganismos do domínio *Bacteria* foram amplificadas por PCR utilizando os iniciadores PRBA63f (5' GGA TCC CAG GCC TAA CAC ATG CAA GCT 3') e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (LAMBAIS et al., 2005). A amplificação foi feita em tampão para DNA polimerase Taq contendo 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil); 5 pmol dos primers e 10 ng do DNA metagenômico. As condições de amplificação foram de 5 min a 95°C; 30 ciclos 1 min a 95°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C, e extensão final por 10 min a 72°C. Amplicons foram purificados usando GFX PCR DNA e "Gel Band Purification kit" (Amersham Biosciences, São

Paulo, Brasil). O seqüenciamento foi executado utilizando 200-500 ng dos amplicons purificados, 10 pmol dos primers PRBA63f e UN518r, 2 µL de “DYEmanic ET Terminator” (GE Healthcare, São Paulo, Brasil), 2 µL de tampão de seqüenciamento (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM MgCl₂.6H₂O) e H₂O ultrapura para um volume final de 10 µL, em 25 ciclos de 20 seg a 95°C, 15 seg a 50°C e 1 min a 60°C. Os produtos de PCR foram precipitados com etanol, lavados e ressuspensos em formamida deionizada. Eletroforese foi feita utilizando-se um seqüenciador automático o ABI 3100, de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare, São Paulo, Brasil).

3.2.1.11 Análise das seqüências de DNA dos isolados bacterianos

As seqüências de DNA obtidas foram processadas com o programa PHRED (EWING; GREEN, 1998) para a remoção de bases com baixa qualidade (parâmetro de qualidade > 20, menos de um erro em 100 nucleotídeos).

As seqüências foram agrupadas com a utilização do programa Bioedit (HALL, 1999). Para a afiliação filogenética das seqüências utilizou-se o programa RDPquery (COLE et al., 2007), o qual compara cada seqüência do gene rRNA 16S com as seqüências depositadas no Ribosomal Database Project (COLE et al., 2007) e baseado na distância evolutiva calculada entre a seqüência em análise e aquela de maior similaridade no banco de dados, define a possível classificação em diferentes níveis taxonômicos.

3.2.1.12 Caracterização da comunidade bacteriana selecionada no RHLF

Após seis meses de cultivo de enriquecimento no RHLF, sendo ministrado periodicamente meio mineral básico suplementado com PCE, uma nova amostragem do biofilme imobilizado foi feita ao longo do comprimento do reator. Essas amostras foram homogeneizadas formando uma amostra composta, da qual foi extraído o DNA metagenômico, conforme descrito anteriormente.

3.2.1.13 Clonagem e seqüenciamento de clones do gene rRNA 16S

A região V1-V3 do gene rRNA 16S de microrganismos do domínio *Bacteria* foram amplificadas por PCR utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os iniciadores PRBA63f (5' GGA TCC CAG GCC TAA CAC ATG CAA GCT 3') e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (LAMBAIS et al., 2005). A amplificação foi feita em tampão para DNA polimerase Taq contendo 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil); 5 pmol dos primers e 10 ng do DNA metagenômico. As condições de amplificação foram de 5 min a 95°C; 30 ciclos 1 min a 95°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C, e extensão final por 10 min a 72°C. Amplicons foram purificados usando GFX PCR DNA e "Gel Band Purification kit" (Amersham Biosciences, São Paulo, Brasil) e ligados em "pGEM-T Easy Vector" (Promega, Madison, WI, USA) a 4°C durante a noite, de acordo com as instruções do fabricante. O produto de ligação foi transformado em células competentes de *Escherichia coli* DH5α por choque térmico e as células transformadas foram plaqueadas em ágar LB, contendo ampicilina (100mg mL⁻¹), X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactosídeo). Colônias contendo o plasmídeo recombinante foram selecionadas e cultivadas em meio líquido LB contendo 100mg mL⁻¹ de ampicilina a 37°C durante a noite. Os plasmídeos foram extraídos através de lise alcalina. As soluções de ácidos nucléicos foram incubadas com 15μg de RNase por 20 min a 37°C. O DNA foi precipitado com equivalente volume de isopropanol gelado por 5 min na geladeira e centrifugado a 4000 rpm por 40 min a 4°C. O pélete de DNA foi lavado com etanol gelado 70%, seco e ressuspensão em água destilada. A concentração do DNA foi determinada espectrofotometricamente a 260 nm. O seqüenciamento foi executado utilizando 200-500 ng do DNA plasmidial, 10 pmol dos iniciadores M13f (5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3') ou M13r (5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3') (LAMBAIS et al., 2005), 2 μL de "DYEmanic ET Terminator" (GE Healthcare, São Paulo, Brasil), 2 μL de tampão de seqüenciamento (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM MgCl₂.6H₂O) e H₂O ultrapura para um volume final de 10 μL, em 25 ciclos de 20 seg a 95°C, 15 seg a 50°C e 1 min a 60°C. Os produtos de PCR foram precipitados com etanol, lavados e ressuspensos em formamida deionizada. Eletroforese foi feita utilizando-se um seqüenciador automático o ABI 3100, de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare, São Paulo, Brasil).

3.2.1.14 Análise das seqüências de clones do gene rRNA 16S

As seqüências foram processadas com o programa PHRED (EWING; GREEN, 1998) para a remoção de bases com baixa qualidade (parâmetro de qualidade > 20) e seqüências do vetor.

Para a afiliação filogenética das seqüências do gene rRNA 16S utilizou-se o programa RDPquery (COLE et al., 2007) o qual compara as seqüências com as seqüências depositadas no Ribosomal Database Project (COLE et al., 2007) e baseado na distância evolutiva entre as seqüências que serão classificadas e aquelas de maior similaridade no banco de dados, define possível classificação em diferentes níveis taxonômicos.

Para o agrupamento em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foi utilizado o programa DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005). Para tanto, utilizou-se uma matriz de distância evolutiva calculada com o DNADIST (algoritmo de Jukes-Cantor) do PHYLIP 3.63 (FELSENSTEIN, 2007), a partir do alinhamento feito no ClustalX 1.83 (GARRITY et al., 2001), com definições de parâmetros padrão, exceto “gap-opening penalty” (10.0) e “gap-extension penalty” (0.1).

Os números de UTOs e de seqüências de cada UTO foram computados e utilizados com o programa SPADE para o cálculo dos índices de diversidade de Shannon e a recíproca do índice de Simpson, bem como para a estimativa de riqueza de espécies pelos métodos não-paramétricos ACE e Chao1 (CHAO; CHEN, 2007), além da estimativa da cobertura de amostragem.

A comparação entre as bibliotecas de seqüências do gene rRNA 16S foi feita utilizando-se o programa S-LIBSHUFF (SINGLETON et al., 2001) após o alinhamento das seqüências e cálculo das matrizes de distâncias evolutivas conforme descrito acima.

3.2.1.15 Ensaio de degradação do PCE em RAHLF

Após 9 meses de cultivo de enriquecimento o biofilme imobilizado do reator foi acondicionado em frasco com volume de 5 L, contendo suporte de poliuretano esterilizado, bem como meio mineral básico suplementado com PCE, visando a multiplicação do inóculo. Durante o período de incubação à temperatura ambiente o frasco foi agitado diariamente, visando

homogeneizar a mistura. A cultura foi incubada por 14 dias, com substituição total do meio a cada 3 dias.

A partir da multiplicação do inóculo, o mesmo foi acondicionado em três reatores do tipo RHLF. Em cada reator foram avaliados diferentes meios para degradação do PCE. Em um dos reatores foi utilizado meio mineral básico suplementado com PCE (nitrato de potássio, 0,3 mg L⁻¹; fosfato de potássio, 0,15 mg L⁻¹; sulfito de sódio, 5 mg L⁻¹; PCE, 5 mg L⁻¹). Nos outros dois reatores utilizou-se o mesmo meio, com a adição de lactato de sódio (2,5 mM L⁻¹) e ou acetato de sódio (0,4 mg L⁻¹).

Antecedendo os ensaios de degradação do PCE, os reatores foram incubados por 3 dias. Após o período de incubação iniciou-se a circulação do meio nos reatores, a uma vazão de 1 mL hr⁻¹, mantendo um volume de meio de 700 mL no interior dos reatores (tempo de retenção de 700 minutos). O reator foi alimentado com o respectivo meio de cultura continuamente e o efluente coletado em frascos erlenmeyer fechados. Para equalizar a pressão no reator e coletar os gases produzidos, balões foram conectados aos frascos coletores e balões com N₂ no frasco alimentador. As amostras de meio foram coletadas 24 horas após o início do experimento, com uma circulação de 1440 mL de meio pelo reator neste período. Este mesmo procedimento foi realizado em três dias consecutivos, caracterizando as três repetições do experimento.

Para análise de compostos orgânicos voláteis (COVs) e avaliação dos parâmetros físico-químicos no meio do RHLF, o líquido foi coletado em 5 portas ao longo do comprimento do reator, com relação comprimento/diâmetro (L/D) de 2, 6, 10, 14 e 18, respectivamente, bem como da entrada (L/D = 0) e saída dos reatores (L/D = 20). As amostras foram acondicionadas em frascos com septo para análise de COVs e tubos de polipropileno de fundo cônico (50 mL) para análise dos parâmetros físico-químicos.

As amostras para análise de COVs foram mantidas a 4°C até o processamento. A análise de COVs foi feita pela empresa BIOAGRI, por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (GC/MS), de acordo com o método USEPA SW 846-8260B, sendo determinadas as concentrações de PCE, TCE, cis-DCE e VC nas amostras. As amostras para monitoramento dos parâmetros físico-químicos foram mantidas a 4°C até o processamento. Os parâmetros analisados foram: oxigênio dissolvido (OD), potencial redox (Eh), condutividade elétrica (CE) e potencial hidrogeniônico (pH).

3.2.2 Resultados

3.2.2.1 Detecção de populações de *Dehalococcoides* no RAHLF

Durante o cultivo de enriquecimento com PCE, a detecção de microrganismos com capacidade de degradar este solvente é indicativa de eficiência do processo. Desta forma, foi feita a detecção de populações de *Dehalococcoides*, durante o processo de enriquecimento para microrganismos capazes de degradar PCE.

Dehalococcoides foi detectado em todos os períodos de amostragem durante o enriquecimento, bem como na amostra de sedimento do poço de monitoramento, o que mostra que o cultivo de enriquecimento foi eficiente, ao menos na preservação deste gênero bacteriano, sabidamente envolvido na degradação do PCE (Figura 3.2).

Contudo, a avaliação da seleção de outros organismos também é importante, pois permite verificar quais grupos foram selecionados com o processo de cultivo, caracterizando desta forma as bactérias que possam estar envolvidas na degradação do PCE.

Figura 3.2 – Detecção de *Dehalococcoides* através de iniciadores específicos. Poço) sedimento do poço de monitoramento; R5) reator após 5 dias de circulação do MMB+PCE; R10) reator após 10 dias de circulação do MMB+PCE; E1) biofilme imobilizado da entrada do reator após 20 dias de circulação do MMB+PCE; S1) biofilme imobilizado da saída do reator após 20 dias de circulação do MMB+PCE; F1) frasco alimentador após 20 dias de circulação do MMB+PCE; E2) biofilme imobilizado da entrada do reator após 40 dias de circulação do MMB+PCE; S2) biofilme imobilizado da saída do reator após 40 dias de circulação do MMB+PCE; F2) frasco alimentador após 40 dias de circulação do MMB+PCE

3.2.2.2 Estrutura da comunidade de *Bacteria* no RAHLF avaliada por PCR-DGGE

Para avaliar a evolução do processo de seleção de bactérias durante o cultivo de enriquecimento com PCE, foi utilizada a PCR-DGGE da região V3 do gene rRNA 16S.

Os resultados mostraram que durante o processo de enriquecimento a estrutura da comunidade de bactérias foi alterada consideravelmente em relação à estrutura da comunidade de bactérias do poço de monitoramento. A amostra do poço apresentou um maior número de bandas em relação às amostras do reator, nos diferentes períodos de amostragem (Figura 3.3).

Assim, pode-se evidenciar que com o passar do tempo de enriquecimento houve a seleção de bactérias capazes de crescer na presença de PCE, já que a estrutura da comunidade bacteriana no RHLF, nos primeiros dias de experimento (R5 e R10), foi diferente daquela observada após 40 dias de cultivo.

Os resultados da DGGE também mostraram que as estruturas das comunidades bacterianas nos biofilmes imobilizados foi mais similar entre si (E1/S1; E2/S2) e menos similar as estruturas das comunidades bacterianas coletadas dos frascos (F1; F2). Esses dados sugerem que houve o desenvolvimento de um biofilme homogêneo ao longo do comprimento do reator, o qual se diferenciou da comunidade bacteriana em suspensão

No entanto, a identificação dessas bactérias é essencial para entender os processos bioquímicos predominantes.

Figura 3.3 – Estruturas das comunidades de bactéria em amostras de biofilme imobilizado e meios de cultura com PCE em um RHLF avaliadas por PCR-DGGE. M) marcador; Poço) sedimento do poço de monitoramento; R5) reator após 5 dias de circulação do MMB+PCE; R10) reator após 10 dias de circulação do MMB+PCE; E1) biofilme imobilizado da entrada do reator após 20 dias de circulação do MMB+PCE; S1) biofilme imobilizado da saída do reator após 20 dias de circulação do MMB+PCE; F1) frasco alimentador após 20 dias de circulação do MMB+PCE; E2) biofilme imobilizado da entrada do reator após 40 dias de circulação do MMB+PCE; S2) biofilme imobilizado da saída do reator após 40 dias de circulação do MMB+PCE; F2) frasco alimentador após 40 dias de circulação do MMB+PCE

3.2.2.3 Seqüenciamento parcial do gene rRNA 16S de bactéria do RHLF, após cultivo de enriquecimento com PCE

Os resultados obtidos por seqüenciamento foram semelhantes aqueles observados por DGGE, ou seja, ocorreu uma seleção de organismos após o cultivo em meio enriquecido com PCE, quando comparado com a amostra de sedimento enriquecido do poço de monitoramento (Figura 3.4).

Pelos dados de afiliação filogenética obtidos pelo RDPquery, na comunidade bacteriana do biofilme do reator prevaleceram bactérias das classes *Alphaproteobacteria* (73%). As demais classes foram encontradas com frequências inferiores a 5%. Apenas 1,8% das seqüências representativas das bactérias do biofilme do reator não puderam ser classificadas em nível de filo pelo RDPQuery.

Na comunidade bacteriana do sedimento do poço de monitoramento prevaleceram bactérias das classes *Gammaproteobacteria* (29,49%), *Alphaproteobacteria* (17,95%) e *Betaproteobacteria* (11,54%). Outra classe que se destacou foi *Acidobacteria* (5,13%). As demais classes foram detectadas com frequências inferiores a 5%. Cerca de 15,38% das seqüências do poço não puderam ser classificadas em nível de filo pelo RDPquery. Uma maior diversidade de classes bacterianas no sedimento do poço de monitoramento (10), em relação aos biofilmes do reator (7), foi observada. A única classe exclusiva do reator foi *Sphingobacteria*. Os resultados indicam que houve a seleção de espécies bacterianas pertencentes à *Alphaproteobacteria* durante o cultivo de enriquecimento.

Figura 3.4 - Ocorrência relativa de seqüências do gene rRNA 16S de *Bacteria*, classificadas com o RDPQuery, das diferentes classes em amostras de água subterrânea do poço e do reator

Os índices de diversidade, estimativas de riqueza de UTOs e estimativas de cobertura de amostragem, considerando distância evolutiva de 0,03 para a definição de UTOs, estão apresentados na Tabela 3.1.

A riqueza de UTOs no sedimento do poço de monitoramento não diferiu estatisticamente do biofilme imobilizado do reator, considerando um intervalo de confiança de 95% probabilidade (Tabela 3.1). Porém diferenças significativas foram observadas para distâncias evolutivas maiores (Figura 3.5), com base no número de filotipos estimado pelo algoritmo de Chao1.

Os índices de Shannon e recíproca de Simpson diferiram significativamente entre as amostras do poço de monitoramento e biofilme do reator.

Estes resultados mostram que o cultivo de enriquecimento foi eficiente na seleção de bactérias, havendo a influência do PCE na estrutura da comunidade bacteriana.

As comparações das bibliotecas de clones do gene rRNA 16S, utilizando o S-LIBSHUFF, mostrou que a comunidade bacteriana do sedimento do poço de monitoramento é estatisticamente diferente da comunidade bacteriana do reator ($P \leq 0,05$). Estes resultados mostram que em termos de diversidade bacteriana as amostras se equivalem, porém às estruturas das comunidades são distintas após o cultivo de enriquecimento no RAHLF com o PCE.

Tabela 3.1 - Estimativa de riqueza de UTOs, índice de diversidade e cobertura de amostragem calculados a partir de bibliotecas de clones do gene rRNA 16S de *Bacteria* de amostras de sedimento de um poço contaminado com PCE

Comunidade	NS ^a	NU ^b	Estimativa de riqueza de UTOs		Índice de Diversidade		ECA ^e
			ACE	Chao1	Shannon ^c	1/D ^d	
D = 0,03							
Poço	78	41	90,1 (60,7; 163,3)	83,3 (56,4; 156,7)	3,39 (3,19; 3,59)	20,00 (13,70; 35,71)	0,667
Reator	93	27	75,2 (43,7; 166,0)	51,1 (34,3; 106,0)	2,11 (1,77; 2,44)	3,41 (2,36; 6,06)	0,817

Para a definição de UTOs foi utilizado D = 0,03: ^aNúmero de seqüências. ^bNúmero de UTOs foi determinado pelo DOTUR. ^cEstimador de máxima semelhança. ^dRecíproco do índice de Simpson (estimador de máxima semelhança). ^eEstimativa de cobertura de amostragem. Valores entre parênteses representam o intervalo com 95% de confiança.

Figura 3.5 - Número de filotipos de *Bacteria* estimado para diferentes distâncias evolutivas do poço e reator utilizando-se o estimador não-paramétrico Chao1. As barras representam o intervalo com 95% de confiança

Foi detectada uma maior frequência de UTOs no sedimento do poço (58,21%) do que no biofilme do reator (38,81%). Somente 2,98% das UTOS foram comuns aos dois ambientes. (Figura 3.6). As UTOs específicas do biofilme do reator, as quais podem estar diretamente relacionadas com a biodegradação do PCE, foram identificadas como sendo pertencentes às classes *Alphaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*.

Figura 3.6 – Diagrama de Venn baseado na frequência de UTOs do sedimento do poço de monitoramento e do biofilme do reator

3.2.2.4 Identificação de bactérias cultiváveis presentes no RHLF

Durante o período de cultivo de enriquecimento do RHLF com PCE, amostras foram coletadas para o cultivo de bactérias presentes no reator, em aerobiose e anaerobiose. Quatro gêneros foram identificados no biofilme bacteriano, a partir do seqüenciamento do gene rRNA 16S, sendo dois no cultivo aeróbio (*Bacillus* e *Stenotrophomonas*), um no cultivo anaeróbio (*Novosphingobium*) e um nas duas condições (*Burkholderia*).

3.2.2.5 Degradação do PCE no RHLF

Nos ensaios de degradação do PCE, parâmetros físico-químicos, bem como a identificação e quantificação do PCE, TCE, cis-DCE e VC foram feitos. Pelos resultados obtidos no monitoramento dos parâmetros físico-químicos (Figura 3.7), não foi possível relacionar os valores obtidos com a degradação do PCE. De uma maneira geral, o meio apresentou elevadas concentrações de oxigênio ao longo do reator e alto potencial redox, caracterizando um ambiente óxico, condição *a priori* não adequada para a degradação do PCE, já que as vias de degradação do PCE são, predominantemente, anaeróbias.

Figura 3.7 – Características físico-químicas do meio de cultura ao longo do comprimento do RHLF. A) OD; B) CE; C) Eh; D) pH

As concentrações de PCE, TCE, cis-DCE e VC ao longo do comprimento dos reatores (Figura 3.8) mostraram resultados promissores, tendo em vista a eficiência de degradação do PCE (98%) nos três reatores analisados. Contudo não houve diferença significativa na percentagem de degradação nos reatores com diferentes doadores de elétrons. Os produtos da via de degradação anaeróbia do PCE não foram detectados ao longo do reator, sugerindo a ocorrência de uma via alternativa de degradação do PCE, a qual ocorre em meio óxido.

Figura 3.8 – Degradação do PCE em RAHLF com diferentes doadores de elétrons

3.2.3 Discussão

3.2.3.1 Cultivo de enriquecimento no RHLF

Para o enriquecimento de culturas com compostos halogenados como aceptores de elétrons, precauções devem ser tomadas para assegurar um processo bem sucedido, pois o composto pode ser adicionado em quantidades tóxicas para os microrganismos. Este problema pode ser contornado pela substituição periódica do meio de enriquecimento, mantendo-se níveis baixos do composto durante o cultivo (HOLLIGER et al., 1999). Outro ponto a ser observado diz respeito às necessidades nutricionais específicas dos microrganismos, sendo que a preparação de meios onde apenas o composto halogenado seja adicionado pode inibir a multiplicação de alguns grupos de microrganismos importantes (HOLLIGER; SCHUMACHER, 1994). *Desulfomonile tiedjei* necessita de meio suplementado com fluido ruminal para sua multiplicação em meio com PCE comoceptor de elétrons (SHELTON; TIEDJE, 1984). *Dehalobacter restrictus* depende da presença de vitaminas, extrato de levedura e peptona para que realize a descloração do PCE

(HOLLIGER et al., 1999). Assim, foi adotado nesse experimento o cultivo de enriquecimento utilizando a substituição periódica do meio enriquecido com PCE, bem como a utilização de um meio mineral básico, que sustenta o crescimento de vários microrganismos. A partir da cultura de enriquecimento e identificação dos microrganismos presentes no biofilme, meios mais específicos para a multiplicação dos grupos de interesse podem ser utilizados.

3.2.3.1.1 Detecção das populações de *Dehalococcoides*

A utilização de meios de enriquecimento com PCE têm possibilitado a seleção de bactérias envolvidas na degradação do PCE, em condições anaeróbias (SUNG et al., 2003; LORAH e VOYTEK, 2004). Sung et al. (2003) isolaram *Desulfuromonas chloroethenica*, *Dehalococcoides ethenogenes*, *Desulfuromonas acetoxidans*, *Desulfuromonas succinoxidans*, *Desulfuromonas thiophila* e *Geobacter metallireducens*, em culturas de enriquecimento a partir de amostras de água contaminada com PCE. Lorah e Voytek (2004) após um ano de cultivo em microcosmos enriquecidos com PCE, utilizando iniciadores específicos para *Dehalococcoides* e *Desulfuromonas*, obtiveram resultados positivos quanto à presença destes grupos bacterianos. Yang e Zeyer (2003) também trabalhando com culturas de enriquecimento obtiveram resultados positivos na detecção de representantes do gênero *Dehalococcoides* nos seus experimentos.

Desta forma, a presença de *Dehalococcoides* após 9 meses de enriquecimento com PCE, pode indicar que o cultivo de enriquecimento selecionou microrganismos com capacidade de degradar o PCE no biofilme do reator.

3.2.3.1.2 Estrutura da comunidade bacteriana no RHLF

Processos de enriquecimento com PCE tendem a selecionar organismos com capacidade de degradar o referido solvente, contudo períodos de enriquecimento longos são necessários para o estímulo dos microrganismos selecionados no meio (DOLFING, 2000).

Em trabalho desenvolvido por Yang et al. (2005), a estrutura das comunidades bacterianas em amostras de sub-cultura enriquecidas com PCE foram avaliadas por PCR-DGGE. Comparando com a amostra inicial de uma área com água subterrânea contaminada com PCE, observaram modificações consideráveis na estrutura das comunidades, havendo também

diferença entre as sub-culturas com diferentes doadores de elétrons. Resultados semelhantes foram obtidos por Grostern e Edwards (2006), onde foram avaliadas três subculturas distintas, as quais diferenciavam-se pelos compostos utilizados no enriquecimento seletivo, PCE, TCE ou cis-DCE. Por PCR-DGGE pode-se observar estruturas de comunidade bacterianas distintas entre as sub-culturas, evidenciando o estímulo de grupos específicos em cada etapa do processo de degradação do PCE.

Desta maneira, pelos resultados que obtivemos, a modificação na estrutura da comunidade bacteriana ao longo do tempo no RHLF sugere que houve seleção de bactérias específicas com habilidade para degradar o PCE.

3.2.3.1.3 Diversidade bacteriana do RHLF

Na degradação do PCE a partir da utilização de microcosmos, grupos específicos de bactérias são selecionados. Bactérias pertencentes às classes *Alphaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* foram detectadas no biofilme do RHLF a partir do cultivo de enriquecimento do sedimento de um poço de monitoramento de água subterrânea de uma área contaminada com TCE. Este resultados são semelhantes aos obtidos Futamata et al. (2005) os quais também encontraram essas classes com predominância em culturas de enriquecimento. Estudos feitos por Dennis et al. (2005) mostraram a prevalência dos mesmos grupos citados anteriormente em culturas de enriquecimento obtidas a partir da utilização do PCE, TCE e VC como fontes de carbono, mostrando que o mesmo grupo de microrganismos está envolvido na degradação do PCE.

Nielson e Keasling (1999) demonstraram previamente que um consórcio não caracterizado de microrganismos foi capaz de desclorar PCE em concentrações elevadas. Contudo, quando feito o cultivo de enriquecimento e posterior sequenciamento de clones do rRNA 16S, foram identificados membros pertencentes à classe *Alphaproteobacteria* como os mais abundantes.

3.2.3.1.4 Identificação de bactérias cultiváveis presentes no RHLF

O estabelecimento de um consórcio microbiano, o qual apresente alta eficiência na degradação do PCE, é o objetivo principal de um trabalho de seleção de microrganismos capazes de degradar um xenobionte.

Em trabalho desenvolvido por Munakata-Marr et al. (1996), foi isolado *Burkholderia cepacia*, após o cultivo de enriquecimento com TCE em condições anaeróbias, o qual apresentou alta eficiência na degradação do TCE. Mars et al. (1996), em pesquisa semelhante, também isolaram *Burkholderia cepacia* a partir do cultivo de enriquecimento com TCE, o qual era eficiente na degradação do TCE a ETH em anaerobiose.

Futamata et al., (2005), isolaram *Bacillus*, *Burkholderia* e *Stenotrophomonas* a partir de um microcosmo suplementado com TCE. Em ensaio de biodegradação anaeróbia essas bactérias se mostraram muito eficientes na degradação do solvente.

Outro organismo frequentemente isolado de áreas contaminadas, principalmente com substâncias aromáticas como benzoato, *p*-cresol, tolueno, bifenis, dibenzotiofeno, naftaleno, salicilato, e todos os isômeros de xileno é *Novosphingobium* sp., uma bactéria aeróbia obrigatória (GALPERIN, 2006).

Em nosso trabalho *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Novosphingobium* e *Burkholderia* foram identificados por sequenciamento do gene rRNA 16S de culturas puras e estas, possivelmente, estejam envolvidas na degradação do PCE. A partir destes isolados novos testes podem ser feitos visando identificar em qual etapa do processo de degradação do PCE estas bactérias estão envolvidas.

3.2.3.2 Ensaio de degradação no RHLF

Vários estudos têm sido desenvolvidos utilizando o RHLF na degradação dos mais variados compostos. Dentre os trabalhos com RHLF podem ser citados os de Damianovic (1997) e Baraldi (2001) e os de Montenegro et al. (2002) e Montenegro (2001) que usaram um reator anaeróbio híbrido com eficiência para a biodegradação anaeróbia do pentaclorofenol (PCP) sob condições metanogênicas. Excelentes desempenhos microbianos na degradação de fenol e

benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno (BTEX), foram obtidos por Bolaños (2001), Nardi et al. (2005) e Cattony et al. (2005) tanto sob condições metanogênicas como sulfidogênicas.

O uso do RHLF para degradação do PCE não é comum, no entanto diversos ensaios em microcosmos foram realizados para avaliar a degradação do PCE. Maymo-Gatell et al. (1995) usando um cultivo de enriquecimento anaeróbio e H_2 como doador de elétrons, avaliaram a eficiência de degradação do PCE a partir do enriquecimento das culturas com acetato. Os dados mostraram que na presença do acetato a eficiência de descloração redutiva, formando VC e ETH foi maior do que quando utilizou-se H_2 , com um tempo de incubação de 35 dias.

Aulenta et al. (2002), também desenvolvendo trabalho com microcosmos a partir de enriquecimento anaeróbio, avaliou a utilização de metanol e H_2 durante a descloração redutiva do PCE, não observando diferença significativa na eficiência de degradação a partir dos diferentes doadores de elétrons. Contudo obteve uma boa eficiência de degradação do PCE, permanecendo cerca de 10% da concentração inicial após 75 horas na presença do doador de elétrons, enquanto que na ausência de doadores de elétrons o tempo necessário para atingir os mesmos índices foi de cerca de 150 horas. Em ambos os casos houve a formação de VC e ETH. Bagley e Gossett (1990), avaliando a eficiência de degradação do PCE com culturas enriquecidas redutoras de sulfato, obteve 81% de eficiência de remoção em 22 dias, com a formação de TCE, cis-DCE, VC e ETH.

Trabalhos com a utilização de biofilme enriquecido em meio com PCE imobilizado também foram realizados. BRUIN et al. (1992), avaliaram a degradação do PCE nestas condições, utilizando lactato como doador de elétrons e observaram a descloração de 90% de PCE em 14 dias, com a conversão completa de PCE para ETH.

Já Tonga et al. (1997) avaliaram a degradação do PCE a partir da imobilização do inóculo obtido de uma área contaminada com PCE, criando um sistema misto anaeróbio/aeróbio, visando degradar PCE a TCE por descloração redutiva e TCE a ETH por oxidação cometabólica do TCE, obtendo uma eficiência de 90% e 80% na degradação do PCE e TCE, respectivamente, não sendo detectados cis-DCE ou VC durante o processo de degradação.

Neste trabalho, durante a biodegradação do PCE, em condições aeróbias, não foram detectados TCE, cis-DCE ou VC. Esses dados sugerem a ocorrência de uma nova via de degradação do PCE, possivelmente aeróbia.

3.3 Conclusões

Dehalococcoides foram detectados durante todo o cultivo de enriquecimento.

A estrutura da comunidade bacteriana do RAHLF variou ao longo do processo de enriquecimento.

Foram identificados quatro gêneros de bactérias (*Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Novosphingobium* e *Burkholderia*) importantes no processo de degradação aeróbia do PCE no biofilme do reator.

A degradação do PCE no reator foi altamente eficiente, chegando a 98% de remoção do PCE em 12 horas de retenção.

É possível que uma via alternativa de degradação do PCE em aerobiose esteja ocorrendo no RHLF.

Referências

ADRIAN, L.; SZEWZYK, U.; WECKE, J.; GÖRISCH, H. Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes. **Nature**, London, v. 408, p. 580-583, 2000.

ALLEN-KING, R.M.; DIVINE, D.P.; ROBIN, M.J.L.; ALLDREDGE, J.R.; GAYLORD, D.R. Spatial distributions of perchloroethylene reactive transport parameters in the Borden Aquifer. **Water Resources Research**, Woodbury, v. 42, p. 1-13, 2006.

AULENTA, F.; MAJONE, M.; VERBO, P.; TANDOI, V. Complete dechlorination of tetrachloroethene to ethene in presence of methanogenesis and acetogenesis by an anaerobic sediment microcosm. **Biodegradation**, Netherlands, v. 13, p. 411-424, 2002.

BAGLEY, D.M.; GOSSETT, J.M. Tetrachloroethene Transformation to Trichloroethene and cis-1,2-Dichloroethene by Sulfate-Reducing Enrichment Cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 8, p. 2511-2516, 1990.

BARALDI, B. **Avaliação da comunidade e atividade microbianas em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) operado com pentaclorofenol (PCP) através de cromatográficos, exames microscópicos e técnicas moleculares como PCR, ARDRA e SLOT-BLOT**. 2001. 149 p. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

BHATT, P.; SURESH, K.M.; MUDLIAR, S.; CHAKRABARTI, T. A Review: biodegradation of chlorinated compounds. **Environmental Science and Technology**, Philadelphia, v. 37, p. 165-198, 2007.

BLACK, G.J. **Microbiologia fundamentos e perspectivas**. 4. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2002, 856 p.

BLACKBURN, J.W.; HAFKER, W.R. The impact of biochemistry, bioavailability and bioactivity on the selection of bioremediation techniques. **Trends in Biotechnology**, London, v. 11, p. 328-333, 1993.

BOLAÑOS, M.L. **Tratamento de fenol em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) sob condições mesofílicas**. 2001. 135 p. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

BRUIN, W.P.; KOTTERMAN, M.J.J.; POSTHUMUS, M.A.; SCHRAA, G.; ZEHNDER, A.J. B. Complete Biological Reductive Transformation of Tetrachloroethene to Ethane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 6, p. 1996-2000, 1992.

BUNGE, M.; ADRIAN, L.; KRAUS, A.; OPEL, M.; LORENZ, W.G.; ANDREESSEN, J.R.; GÖRISCH, H.; LECHNER, U. Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium. **Nature**, London, v. 421, p. 357-360, 2003.

CATTONY, E. B. M. ; RIBEIRO, R. ; CHINALIA, F. A. ; ZAIAT, M. ; FORESTI, E. ; VARESCHE, M. B. A. Ethanol and Toluene Removal in a Horizontal-Flow Anaerobic Immobilized Biomass Reactor in the Presence of Sulfate. **Biotechnology and Bioengineering**, New Jersey, v. 91, n. 2, p. 244-253, 2005.

CHAO, A.; CHEN, T.C. Disponível em: <<http://chao.stat.nthu.edu.tw>>. Acesso em: 20 ago. 2007.

COLE, J.R.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; BANDELA, A.M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, 169-172, 2007.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Relação de Áreas Contaminadas**, 2007. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp>. Acesso em: 15 ago. 2007.

DAMIANOVIC, M.H.R.Z. **Degradação de pentaclorofenol (PCP) em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF)**. 1997. 176 p. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

DENNIS, P.C.; SLEEP, B.E.; FULTHORPE, R.R.; LISS, S. Phylogenetic analysis of bacterial populations in an anaerobic microbial consortium capable of degrading saturation concentrations of tetrachloroethylene. **Canadian Journal of Microbiology**, Montreal, v. 49, p. 15-27, 2003.

DOLFING, J. Energetics of anaerobic degradation pathways of chlorinated aliphatic compounds. **Microbial Ecology**, New York, v. 40, p. 2-7, 2000.

DUA, M.; SINGH, A.; SETHUNATHAN, N.; JOHRI, A.K. Mini-Review: biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 59, p. 143-152, 2002.

DUHAMEL, M.S.D.; WEHR, L.Y.; HOMA, R.; SEEPERSAD, D.; DWORATZEK, S.; COX, E.E.; EDWARDS, E.A. Comparison of anaerobic dechlorinating enrichment cultures maintained on tetrachloroethene, trichloroethene, cis-dichloroethene and vinyl chloride. **Water Research**, Amsterdam, v. 36, p. 4193-4202, 2002.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.

FELSENSTEIN, J. Disponível em: <<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>> Acesso em: 10 sept. 2007.

FORESTI, E.; ZAIAT, M. ; CABRAL, A. K. A. ; NERY, V. Horizontal-Flow Anaerobic Immobilized Sludge (HAIS) Reactor for Paper Industry Wastewater Treatment. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 12, p. 157-163, 1995.

FREEDMAN, D. L.; GOSSETT, J.M. Biological Reductive Dechlorination of Tetrachloroethylene and Trichloroethylene to Ethylene under Methanogenic Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 9, p. 2144-2151, 1989.

FUTAMATA, H.; NAGANO, Y.; WATANABE, K.; HIRAISHI, A. Unique Kinetic Properties of Phenol-Degrading *Variovorax* Strains Responsible for Efficient Trichloroethylene Degradation in a Chemostat Enrichment Culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 2, p. 904-911, 2005.

GALPERIN, M.Y. Genomes to aid in bioremediation of dry cleaning solvents, mothballs and more. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 6, p. 949-955, 2006.

GARRITY, G.M.; HOLT, J.H. A ROAD MAP TO THE MANUAL. IN: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, G.M. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. Berlin: Springer, 2001. 721 p.

GIBSON, D.T.; PARALES, R.E. Aromatic hydrocarbons dioxygenases in environmental biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, Oxford, v. 11, p. 236-243, 2000.

GROSTERN, A.; EDWARDS, E.A. Growth of *Dehalobacter* and *Dehalococcoides* spp. during Degradation of Chlorinated Ethanes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 1, p. 428-436, 2006.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, p. 95-98, 1999.

HE, J.; RITALAHTI, K.M.; YANG, K.L.; KOENIGSBERG, S.S.; LÖFFLER, F.E. Detoxification of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium. **Nature**, London, v. 424, p. 62-65, 2003.

HOLLIGER, C.; SCHUMACHER, W. Reductive dehalogenation as a respiratory process. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 66, p. 239-246, 1994.

HOLLIGER, C.; WOHLFARTH, G.; DIEKERT, G. Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 22, p. 383-398, 1999.

KRUMHOLZ, L.R. *Desulfuromonas chloroethenica* sp. nov. uses tetrachloroethylene and trichloroethylene as electron acceptors. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 47, p. 1262-1263, 1997.

LAMBAIS, M.R.; CURY, J.R.; BARETTA, C.R.M.; BÜLL, R.C. **Tópicos em ciência do solo - diversidade microbiana nos solos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. v. 4, p. 43-84.

LORAH, M.M.; VOYTEK, M.A. Degradation of 1,1,2,2-tetrachloroethane and accumulation of vinyl chloride in wetland sediment microcosms and in situ porewater: biogeochemical controls and associations with microbial communities. **Journal of Contaminant Hydrology**, Netherlands, v. 70, p. 117- 145, 2004.

MARS, A.E.; HOUWING, J.; DOLFING, J.; JANSSEN, D.B. Degradation of Toluene and Trichloroethylene by *Burkholderia cepacia* G4 in Growth-Limited Fed-Batch Culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 3, p. 886-891, 1996.

MAYMÓ-GATELL, X.; TANDOI, V.; GOSSETT, J.M.; ZINDER, S.H. Characterization of an H₂-Utilizing Enrichment Culture That Reductively Dechlorinates Tetrachloroethene to Vinyl Chloride and Ethene in the Absence of Methanogenesis and Acetogenesis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 3928-3933, 1995.

MAYMÓ-GATELL, X.; CHIEN, Y.; GOSSETT, J.M.; ZINDER, S.H. Isolation of a Bacterium That Reductively Dechlorinates Tetrachloroethene to Ethene. **Science**, Washington, v. 276, n. 6, p. 1568-1571, 1997.

MAYMÓ-GATELL, X.; NIJENHUIS, I.; ZINDER, S.H. Reductive dechlorination of *cis*-dichloroethene and vinyl chloride by *Dehalococcoides ethenogenes*. **Environmental Science and Technology**, Philadelphia, v. 35, p. 516-521, 2001.

MONTENEGRO, M.A.P. **Avaliação da performance de um reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) e da atividade das populações de microrganismos anaeróbios na ausência e na presença de pentaclorofenol (PCP)**. 2001. 222 p. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

MONTENEGRO, M.A.P.; ARAUJO, J.C.; VAZOLLER, R.F. Microbial community evaluation of anaerobic granular sludge from hybrid reactor treating pentachlorophenol by using fluorescence *in situ* hybridization. **Water Science and Technology**, London, v. 48, n. 6, p.65-73, 2003.

MUNAKATA-MARR, J.; MCCARTY, P.L.; SHIELDS, M.S.; REAGIN, M.; FRANCESCONI, S.C. Enhancement of Trichloroethylene Degradation in Aquifer Microcosms Bioaugmented with Wild Type and Genetically Altered *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* G4 and PR1. **Environmental Science Technology**, Philadelphia, v. 30, p. 2045-2052, 1996.

NARDI, I.R.; RIBEIRO, R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Anaerobic packed-bed reactor for bioremediation of gasoline-contaminated aquifers. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 587-592, 2005.

NIELSON, R.B.; KEASLING, J.D. Reductive dechlorination of chlorinated ethene DNAPLs by a culture enriched from contaminated groundwater. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 62, p. 160-165, 1999.

NIES, L.; VOGEL, T.M. Effects of organic substrates on dechlorination of aroclor 1242 in anaerobic sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 2612-2617, 1990.

ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3367-3373, 1997.

PARSONS, F.; WOOD, P.R.; DEMARCO, J. Transformations of tetrachloroethene and trichloroethene in microcosms and groundwater. **Journal of the American Water Works Associated**, New York, v. 76, p. 56-59, 1984.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing to DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

SCHOLZ-MURAMATSU, H.; SZEWZYK, R.; SZEWZYK, U.; GAISER, S. Tetrachloroethylene as electron acceptor for the anaerobic degradation of benzoate. **FEMS Microbiology Letter**, Birmingham, v. 66, p. 81-86, 1990.

SHELTON, D.R.; TIEDJE, J.M. Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, p. 840-848, 1984.

SINGLETON, D.R.; FURLONG, M.A.; RATHBUN, S.L.; WHITMAN, W.B. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4374-4376, 2001.

SUNG, Y.; RITALAHTI, K.M.; SANFORD, R.A.; URBANCE, J.W.; FLYNN, S.J.; TIEDJE, J.M.; LÖFFLER, E. Characterization of two tetrachloroethene (PCE)-reducing, acetate-oxidizing anaerobic bacteria, and their description as *Desulfuromonas michiganensis* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 2964-2974, 2003.

TONGA, A.P.; DISTEFANO, T.; ARKINS, M.; DUDIAK, K.; STEFFAN, R.J. **Characterization and optimization of dual anaerobic/aerobic biofil process**. New Jersey: Lawrenceville, 1997, 61 p.

VARTIAINEN, T. Population exposure to tri- and tetrachloroethene and cancer risk: two cases of drinking water pollution. **Chemosphere**, Oxford, v. 27, p. 1171–1181, 1993.

VOGEL, T.M.; MCCARTY, P.L. Biotransformation of tetrachloroethylene to trichloroethylene, dichloroethylene, vinylchloride, and carbon dioxide under methanogenic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 49, p. 1080-1083, 1985.

YANG, Y.; ZEYER, J. Specific Detection of *Dehalococcoides* Species by Fluorescence In Situ Hybridization with 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 5, p. 2879-2883, 2003.

YANG, Y.; PESARO, M.; SIGLER, W.; ZEYER, J. Identification of microorganisms involved in reductive dehalogenation of chlorinated ethenes in an anaerobic microbial community. **Water Research**, Amsterdam, v. 39, p. 3954–3966, 2005.