Campus de São Carlos

Avaliação da diversidade microbiana de consórcios anaeróbios enriquecidos a partir de amostras de sedimento lacustre na degradação anaeróbia do tricloroetileno - TCE, empregando-se a técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante - DGGE

Biólogo Gunther Brucha

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ESCOLA DE ENGENHARIA
DE SÃO CARLOS**

**Avaliação da diversidade microbiana de consórcios
anaeróbios enriquecidos a partir de amostras de
sedimento lacustre na degradação anaeróbia do
tricloroetileno - TCE, empregando-se a técnica de
Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante –
DGGE**

Serviço de Pós-Graduação EESC/USP
EXEMPLAR REVISADO
Data de entrada no Serviço: 22/04/02
Ass.: *Filomena*

Gunther Brucha

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte do requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller

São Carlos

-2002-

DEDALUS - Acervo - EESC

31100036933

Class.	TESE
Cut.	0973
Tombo	T0086/02

11 1239024

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

B886a Brucha, Gunther
Avaliação da diversidade microbiana de consórcios anaeróbios enriquecidos a partir de amostras de sedimento lacustre na degradação anaeróbica do tricloroetileno - TCE, empregando-se a técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante - DGGE / Gunther Brucha. -- São Carlos, 2002.

Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de São Carlos-Universidade de São Paulo, 2002.
Área: Ciências de Engenharia Ambiental.
Orientador: Prof. Dra. Rosana Filomena Vazoller.

1. Tricloroetileno (TCE). 2. Biodegradação anaeróbia. 3. Biologia molecular. 4. DNAr 16S. 5. PCR-DGGE. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **GUNTHER BRUCHA**

Dissertação defendida e julgada em 10-12-2001 perante a Comissão Julgadora:

Dra. **ROSANA FILOMENA VAZOLLER (Orientadora)**
(Pesquisadora – Instituto de Ciências Biomédicas/USP)

aprovado

Dra. **MARIA BERNADETE AMANCIO VARESCHE SILVA**
(Pesquisadora - Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

aprovado

Prof. Assoc. **EDUARDO CLETO PIRES**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovado

Prof. Doutor **EVALDO LUIZ GAETA ESPÍNDOLA**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Engenharia Ambiental

JOSÉ CARLOS A. CINTRA
Presidente da Comissão de Pós-Graduação da EESC

"O futuro da Terra depende de uma mudança de consciência. A única esperança para o futuro está nesta mudança de consciência - e ela virá. Mas é deixado aos homens decidirem se eles colaborão para esta mudança ou ela acontecerá, impondo-se sobre eles pelo poder de circunstâncias esmagadoras"

Mira Alfassa

À memória de meu pai Werner Brucha,
pelo pesar de não poder compartilhar a
alegria da tarefa cumprida.

À minha mãe Rose Marie Siciliani Brucha,
que me deu amor de pai e mãe
em minha criação

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Rosana Filomena Vazoller, pela amizade, acolhimento e orientação ao longo dos últimos três anos, e pela imensa contribuição para o meu aperfeiçoamento profissional.

Ao Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada- SHS/ EESC / USP, por ter propiciado a oportunidade da convivência com profissionais de diversas formações relacionados à Engenharia Ambiental.

Ao pessoal da “saúdosa” Fundação André Toselo, em especial ao Gilson, Fernanda, Valéria pela convivência e ensinamento do “universo molecular microbiano”.

Ao professor Dr. Marcelo Zaiat, como chefe do laboratório de Processos Biológicos – SHS - EESC / USP.

Ao Professor Fazal, do Departamento de Hidráulica e Saneamento – SHS – EESC- USP, por ter acreditado na Biologia Molecular como ferramenta para o melhor entendimento dos processos microbianos no saneamento ambiental.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos durante o período de vigência do mestrado.

À Fapesp – Programa Biota, do qual este trabalho é integrante, pelo fornecimento de apoio técnico e financeiro.

À Profª. Dra. Maria Bernadete, pela contribuição para minha formação acadêmica, pela grande amizade, pelas sugestões e críticas que ajudaram a delinear o presente trabalho.

À Profª. Dra. Beth Moraes e Janja, pelos gratificantes momentos compartilhados e pela forte ajuda nas análises cromatográficas

Aos técnicos do CRHEA, Marcelo, Beto e Miro pela convivência e auxílio durante as coletas de sedimento e partidas de futebol.

Aos companheiros de laboratório (em ordem alfabética) Andrés, Betão, Chico, Claudião, Dirk, Douglas, Eduardo, Eloisa, Fernandão, Flavinha (maninha), Giovana, Ivana, Jucélia, Juliana, Luciana, Luiz, Márcio, Mércia, Marilú, Neyson, Rogers, Samanta, Sávia, Selma, Sidnei, Sônia, Terezinha, Valmir Valquiria e tantos outros que fizeram do LPB um ambiente saudável e gostoso de se trabalhar.

Ao Carlos Eduardo (Dedini), Fernanda, Éliton (Vélitrons), Evandro (Vandorf), Rinaldo, Adeílido, Ana Paola, André Luiz, Andréia, Celina, Camila, Dirlane, Isabel, Kênia, Luana, Maurício (mau-mau), Patrícia, Pinzon pelos momentos de descontração.

Aos meus irmãos, velhos companheiros de moradia e convivência, Gui, Cendi, João, Thais, Jairo, Ana, Jairão, Peninha, França, Geli, Gerson, Guinso, Veio e o caçula Sorriso pela forte amizade, conselhos e convivência nos momentos difíceis.

Ao pessoal do extinto “Projeto DBBA”, Ronaldo Barbieri, Cris, Roberta, Léo, Bel, Elaine, Silvana, Alexandre e Guima, pelos momentos de formação profissional e companheirismo que antecederam este mestrado.

À Sioni Maluf Barbieri (*in memoriam*) por ter me iniciado e incentivado no vasto mundo microbiano.

À minha linda e inspiradora afilhada Helena, com todo carinho.

Em especial à Drica pela alegria, pelo apoio e conforto nos momentos de incertezas e por acreditar no nosso futuro.

À minha mãe, Rose Marie Siciliani Brucha, aos meus irmãos Werner Brucha Filho, Érika Siciliani Brucha e cunhados Silvia Brucha e Edmundo Soares Macedo, pela confiança, apoio e paciência que disponibilizaram ao longo da realização deste trabalho e de todos os outros já realizados.

Ao meu sobrinho Pedro Henrique, pela nova vida que trouxe à família.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMO	vii
ABSTACT	viii
1.0 INTRODUÇÃO	1
2.0 OBJETIVOS	5
3.0 REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1 Características gerais do Reservatório de Salto Grande	6
3.2 O tricloroetileno	10
3.3 Biodegradação do TCE - Metabolismo e aplicações	10
3.4 Ecologia Molecular Microbiana	24
3.5 A Técnica de “Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE”	29
4.0 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Coletas das amostras de sedimentos	32
4.2 Composição e preparação de soluções e meios de cultivos para os ensaios de enriquecimento e biodegradação do TCE	33
4.2.1 Meio de cultivo mineral basal e soluções complementares	33
4.2.2 Soluções estoques de TCE, 1,1 DCE e 1,2 DCE em metanol	37
4.2.3 Procedimento para determinação dos sólidos totais voláteis (STV)	38
4.2.3 Procedimento para ativação e enriquecimento do consórcio microbiano anaeróbio metanogênico	39
4.2.5 Procedimentos para o estudo da degradação anaeróbia do TCE	39
4.2.5.1 Condições dos ensaios	40
4.2.5.2 Determinações cromatográficas	41
4.2.5.2.1 Procedimentos para determinação cromatográfica do metano	42

4.2.5.2.2 Procedimentos para a determinação cromatográfica dos ácidos orgânicos voláteis	42
4.2.5.2.3 Procedimentos para a determinação cromatográfica dos compostos clorados.	43
4.2.5.3 Procedimentos para os exames microscópicos	46
4.2.5.4 Análise da diversidade microbiana das amostras de sedimentos por DGGE.	46
4.3.5.4.1 Protocolo de extração de DNA	47
4.3.5.4.2 Purificação do DNA	50
4.3.5.4.3 Reação de Amplificação	52
4.3.5.4.4 Técnica do DGGE	56
4.3.5.4.5 Análise dos Géis do DGGE	56
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 Características físico-químicas dos pontos de coleta do Reservatório de Salto Grande	57
5.2 Ativação metanogênica dos microrganismos presentes nos sedimentos coletados – enriquecimento e sub-cultivos	63
5.3 Exames microscópicos das amostras enriquecidas	66
5.4 Ensaio da Biodegradação Anaeróbia Metanogênica do TCE	69
5.4.1 Acompanhamento da degradação anaeróbia metanogênica do TCE	70
5.4.2 Produção de metano e consumo de ácidos orgânicos durante a degradação anaeróbia metanogênica do TCE	79
5.4.3 Exames microscópicos das amostras dos ensaios de degradação anaeróbia metanogênica do TCE	96
5.5 Diversidade microbiana das amostras de sedimentos do Reservatório de Salto Grande pela técnica DGGE, na ausência e na presença do TCE	99
5.5.1 Avaliação dos métodos de extração do DNA das amostras estudadas	99

5.5.2 Amplificação do DNA	103
5.5.3 Análise dos produtos de PCR pela técnica DGGE	105
6.0 CONCLUSÕES	110
7.0 SUGESTÕES	112
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
9.0 ANEXO	127

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1: Representação esquemática do Reservatório de Salto Grande com os pontos de amostragens. O mapa do Estado de São Paulo indica a localização da cidade de Americana 7
- Figura 3.2: Imagem de satélite de parte da bacia da represa de Salto Grande (INPE, 2000). 9
- Figura 3.3: Esquema da biotransformação do PCE a CO_2 , através da desalogenação redutiva (VOGUEL & McCARTY, 1985). 13
- Figura 3.4: Esquema hipotético da transferência de elétrons para o PCE durante a metanogênese, resultando na formação de TCE.(FATHEPURE and BOYD, 1988) 14
- Figura 3.5: Diagrama dando uma visão geral de diferentes métodos moleculares usados para determinar a diversidade de populações microbianas mistas (MUYZER *et al.*, 1996) 28
- Figura 4.1: Frasco reator 41
- Figura 4.2: Frasco antibiótico 44
- Figura 4.3: Esquema da determinação dos organoclorados (OCs) 1,1 DCE e TCE encontrados na fase gasosa, para um exemplo de um ponto da curva, de 12 mg de TCE /L. 45
- Figura 5.1. Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e epifluorescência, referentes às amostras do inoculo: a) agrupamentos de células em forma de cocos e sarcina; b) Filamentos e cistos fluorescentes relacionados com metanogênicas; c) amostra proveniente do reservatório de Salto Grande; d e e) microrganismos semelhantes a *Methanosarcina*; f) cocos fluorescentes. 68
- Figura 5.2: Representação gráfica dos valores das concentrações de TCE e 1,1DCE nas fases líquida e gasosa no reator Controle T. 70
- Figura 5.3: Representação gráfica dos valores das concentrações de TCE e 1,1DCE nas fases líquida e gasosa no reator Controle V 71
- Figura 5.4: Representação gráfica dos valores das concentrações de TCE e 1,1DCE nas fases líquida e gasosa no frasco-reator 6I 74
- Figura 5.5: Representação gráfica dos valores das concentrações de TCE e 1,1DCE nas fases líquida gasosa no frasco-reator 6II 75
- Figura 5.6: Representação gráfica dos valores das concentrações de TCE e 1,1DCE nas fases líquida e gasosa no frasco-reator 12I 78

- Figura 5.7: Representação gráfica dos valores das concentrações de TCE e 1,1DCE nas fases líquida e gasosa no frasco-reator 12II 79
- Figura 5.8: Representação gráfica dos valores relativos de metano, em porcentagens às áreas cromatográficas totais de biogás encontradas nos reatores 6I e 6II, 12I e 12II e controles sem TCE, CI e CII 80
- Figura 5.9: Representação gráfica das concentrações dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator CV na ausência de inoculo 82
- Figura 5.10: Representação gráfica dos valores das concentrações dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) e porcentagem de metano no biogás do frasco-reator 6I 86
- Figura 5.11: Representação gráfica dos valores das concentrações dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) e porcentagem de metano no biogás do frasco-reator 6II 87
- Figura 5.12: Representação gráfica dos valores das concentrações dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) e porcentagem de metano no biogás do frasco-reator 12I 88
- Figura 5.13: Representação gráfica dos valores das concentrações dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) e porcentagem de metano no biogás do frasco-reator 12II 92
- Figura 5.14: Representação gráfica das concentrações (mg/L) dos ácidos orgânicos voláteis e porcentagem de metano no frasco-reator CI 94
- Figura 5.15: Representação gráfica das concentrações (mg/L) dos ácidos orgânicos voláteis e porcentagem de metano no reator CII 95
- Figura 5.16. Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e epifluorescência, referentes às amostras de 15 dias de incubação: a) morfologia semelhante ao gênero *Methanosaeta*; b) aglomerado de hidrogenotróficas; c) morfologia semelhante a gênero *Methanoespirillum*; d) morfologia semelhante ao gênero *Methanobacterium*; e) Bactérias livres de células procarióticas; f) morfologia semelhante a *Methanosarcina* sp. 97
- Figura 5.17. Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e epifluorescência, referentes às amostras de 56 dias de incubação 98
- Figura 5.18: Fotografia de uma eletroforese em gel de agarose (1%), resultado da extração de DNA, de acordo com o protocolo de TSAI & OLSON (1991) e empregando-se fenol a pH 6,5 101

Figura 5.19: Fotografias da eletroforese em gel de agarose a 1% das amostras armazenadas a 4°C e a (-)20°C, submetidas à extração de DNA pelo protocolo de TSAI & OLSON (1991). 102

Figura 5.20: Fotografias da eletroforese em gel de agarose a 1%, amostras coradas com brometo de etídio. 102

Figura 5.21: Fotografia do gel de agarose a 1,4% com amostras dos produtos de PCR dos primers do Domínio *Bacteria*. 104

Figura 5.22: Fotografia do gel de agarose a 1,4% com amostras dos produtos de PCR dos primers de Domínio *Archaea* 104

Figura 5.23: Fotografia do resultado da análise de DGGE dos fragmentos dos produtos do PCR amplificados com primers do Domínio *Bacteria* das amostras enriquecidas do sedimento e submetidas ao experimento de degradação do TCE. (Imagem negativa da região 50-65%) 105

Figura 5.24: Fotografia da análise do DGGE de fragmentos de produtos do PCR amplificados com primers para o Domínio *Archaea* (Imagem negativa da região 45-65%) 107

Figura 5.25: Fotografia da análise do DGGE de fragmentos de produtos do PCR amplificados com primers para o Domínio *Archaea* (Imagem da região 50-65%) 108

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Tipos de reação de transformação de compostos alifáticos clorados: reações de substituição e redução (FERGUNSON & PIETARI, 2000)	12
Tabela 3.2. Propriedades de enzimas desalogenases redutivas (HOLLIGER <i>et al.</i> , 1999).	17
Tabela 3.3: Doadores de elétrons utilizados por microrganismos na desalogenação redutiva de organoclorados	21
Tabela 4.1: Composição do meio de cultivo Zinder	34
Tabela 4.2: Composição da solução de vitaminas	35
Tabela 4.3: Composição das soluções usadas na ativação do sedimento para volume útil de 500 mL de meio de cultivo	37
Tabela 4.4: Concentração final dos reagentes para a execução do PCR do Domínio <i>Bacteria</i>	53
Tabela 4.5: Concentração final dos reagentes para a execução do PCR do Domínio <i>Archaea</i>	53
Tabela 5.1: Valores das determinações físico-químicas no Ponto 1 (S 22° 42.632', W 47° 15.961') do Reservatório de Salto Grande	61
Tabela 5.2: Valores das determinações físico-químicas no Ponto 2 (S 22° 43.043', W 47° 14.733') do Reservatório de Salto Grande	61
Tabela 5.3: Valores das determinações físico-químicas no Ponto 3 (- S 22°43.662', W 47°14.024') do Reservatório de Salto Grande	62
Tabela 5.4: Valores dos teores de oxigênio dissolvido (mg/L) no hipolímnio que indicam a possibilidade de reservatórios temperados serem utilizados como abastecimento de água potável	58
Tabela 5.5 Valores de metano em % ao longo do primeiro enriquecimento dos microrganismos presentes nos sedimentos	64
Tabela 5.6 Valores de metano na atmosfera dos frascos-reatores 1 e 2, ao longo dos sub-cultivos das amostras enriquecidas	65
Tabela 5.7: Valores das concentrações dos compostos organoclorados TCE e 1,1DCE nas fases líquidas e gasosa no frasco-reator CT	70

Tabela 5.8: Valores das concentrações dos compostos organoclorados TCE e 1,1DCE nas fases líquida e gasosa no frasco-reator CV	71
Tabela 5.9: Valores das concentrações dos compostos organoclorados TCE e 1,1DCE nas fases líquida e gasosa no frasco-reator 6I.	74
Tabela 5.10: Valores das concentrações dos compostos organoclorados TCE e 1,1DCE nas fases líquida e gasosa no frasco-reator 6II	75
Tabela 5.11: Valores das concentrações dos compostos organoclorados TCE e 1,1DCE nas fases líquidas e gasosa no frasco-reator 12I	77
Tabela 5.12: Valores das concentrações dos compostos organoclorados TCE e 1,1DCE nas fases líquidas e gasosa no frasco-reator 12II	78
Tabela 5.13: Concentrações dos ácidos orgânicos voláteis no reator CV sem inóculo	81
Tabela 5.14: Valores das concentrações dos ácidos orgânicos voláteis e porcentagem de metano no frasco- reator 6I, contendo 6,25 mg/L de TCE	85
Tabela 5.15: Valores das concentrações dos ácidos orgânicos voláteis e porcentagem de metano no frasco- reator 6II, contendo 6,25 mg/L de TCE	86
Tabela 5.16: Valores das concentrações (mg/L) dos ácidos orgânicos voláteis e porcentagem de metano no frasco-reator 12I, contendo 12,5 mg/L de TCE	88
Tabela 5.17: Valores das concentrações (mg/L) dos ácidos orgânicos voláteis e porcentagem de metano no frasco-reator 12II, contendo 12,5 mg/L de TCE	92
Tabela 5.18: Valores das concentrações (mg/L) dos ácidos orgânicos voláteis e porcentagem de metano no frasco-reator controle CI	94
Tabela 5.19: Valores das concentrações (mg/L) dos ácidos orgânicos voláteis e porcentagem de metano no reator controle CII	95

ABREVIATURAS

A- adenina

C- citosina

DCE- dicloroetileno.

DGGE- gel de eletroforese com gradiente desnaturante

DMSO- dimetil sulfóxide

DNA- ácido desoxiribonucleico.

G- guanina

GPS- global position system

OCs- organoclorados

OMS- Organização Mundial da Saúde

PCE- percloroetileno.

PCR- reação em cadeia da polimerase.

REP-PCR- Repetitive Extragenic Palindromic elements

RFLP- polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição

RNA- ácido ribonucleico.

SSV- sólidos suspensos voláteis

STV- sólidos totais voláteis

T- timina

TCE- tricloroetileno.

UV- ultravioleta

VC - cloreto de vinila.

RESUMO

BRUCHA, G. Avaliação da diversidade microbiana de consórcios anaeróbios enriquecidos a partir de amostras de sedimento lacustre na degradação anaeróbia do tricloroetileno - TCE, empregando-se a técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE. São Carlos, 2001. Dissertação (mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Sedimento do Reservatório hipereutrófico de Salto Grande, localizado na cidade de Americana, São Paulo, foi cultivado em condições anaeróbias em meio mineral adicionado de compostos orgânicos (ácidos voláteis e álcoois) com a finalidade de favorecer a metanogênese do sistema. Com a produção de 70% de metano o sedimento foi utilizado para o teste de degradação anaeróbia do TCE. Os testes foram realizados sob atmosfera de N_2/CO_2 (70:30%) em frascos reatores a 25°C e agitação constante de 150 rpm. Os frascos reatores foram preparados com meio mineral, acrescido de fontes orgânicas (5mM de ácidos acético, fórmico e butírico, mais 2,5 mM de ácido láctico e 5 mM de etanol e metanol) e inoculado com 5g de STV/L. Foram preparados frascos com 12 e 6 mg TCE/L. Dois tipos de controles foram preparados, um sem TCE e outro sem inóculo. Análise da diversidade microbiana utilizando a metodologia do DGGE- Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante - foram feitas com amostras dos frascos reatores no final do experimento. O DNA da comunidade foi extraído de acordo com o protocolo descrito por TSAI & OLSON (1991) e fragmentos do DNAr 16S foram amplificados com “primers” do Domínio *Archaea* e *Bacteria*. Os resultados dos testes de degradação do TCE demonstraram a remoção biótica de 68% e 66% nos reatores contendo 6 e 12 mg TCE/L, respectivamente, depois de 56 dias de incubação. No final do experimento morfologias similares aos gêneros *Methanosarcina* e *Methanosaeta* estavam presentes. A análise da diversidade microbiana não revelou uma mudança significativa na comunidade após a adição do TCE, demonstrando que a microbiota enriquecida proveniente do Reservatório de Salto Grande foi resistente a concentração do TCE estudada podendo ser responsável pelo processo de degradação sob metanogênese.

Palavras-chaves: Biodegradação; TCE; metanogênicas; DNAr16S; DGGE.

ABSTRACT

BRUCHA, G. Evaluation of microbial diversity by the DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) technique during trichloroethylene (TCE) degradation by organic compound-enriched anaerobic sediment. São Carlos, 2001. Dissertação (mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Sediments from the supereutrophic reservoir of Salto Grande, City of Americana, São Paulo State, Brazil, were cultivated under anaerobic conditions in a mineral medium added of organic compounds (volatile fatty acids and alcohols) in order to produce methane. Under 70% of methane production, sediment samples were used for tests of TCE anaerobic degradation. The tests were carried out under N₂/CO₂ (70:30%) atmosphere in reactor flasks, at 25°C, and constant shaking at 150 rpm. The reactor flasks were prepared with mineral medium, added with organic sources [5mM of acetic, formic and butyric acids, plus 2.5mM of lactic acid and 5mM of ethanol and methanol each], and inoculated with 5g of STV/L of the sediments. Amounts of 6 and 12mg/l of TCE concentrations were evaluated. Two types of control reactors were prepared, without TCE and without sediments. Diversity analyses using the DGGE - Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis - technique were done with samples from the reactor flasks at the end of the experiment. The community DNA was extracted as described by TSAI & OLSON (1991) and fragments of the 16SDNAr were magnified using the PCR methodology, with Bacteria and Archaea domain primers. The results showed degradation of 40% of TCE at concentrations of 6mg/l and 12mg/l after 13 days of incubation time, and complete organic acids removal with 40% of methane in the atmosphere. A second addition of 9mM of the former organic acids indicated and 4.5mM of lactic acid resulted in 90% of TCE removal, with 50% of methane, after 56 days of incubation time. Morphologies similar to the genera *Methanosarcina*, *Methanosaeta* and *Methanospirillum* were verified. The microbial diversity analysis did not reveal significant differences among Bacteria and Archaea domains under TCE additions. It was possible to assume that the enriched microbiota from the Salto Grande reservoir was resistant to the concentrations of TCE studied and can be responsible for the degradation processes under methanogenesis.

Keywords: : Biodegradation; TCE; Methanogenesis; 16S DNAr; DGGE.

1.0 - INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a civilização industrial e o conseqüente aumento das demandas da humanidade vieram interromper o equilíbrio natural, uma vez que, por exemplo, diferentes substâncias orgânicas sintetizadas foram e continuam sendo introduzidas no meio ambiente em grandes quantidades. Compostos sintéticos estão presentes em diversos pesticidas, plásticos, explosivos, detergentes, corantes, gases e outros produtos industriais. Para os microrganismos, esses novos compostos são moléculas estranhas ou xenobióticas que, no entanto, podem apresentar estruturas semelhantes a vários compostos naturais. A semelhança não garante a ocorrência de degradação biológica e, assim, essas moléculas podem ser recalcitrantes, ou seja, de difícil degradação por mecanismos naturais. Sem dúvida, seu acúmulo pode causar sérios transtornos ecológicos (GODSY *et al.*, 1983).

A utilização de microrganismos no saneamento básico e ambiental é prática comum desde os primórdios do desenvolvimento dos processos biológicos de tratamento de águas residuárias e resíduos sólidos. É evidente que a capacidade microbiana em catabolizar diferentes compostos orgânicos, naturais ou sintéticos, e inorgânicos, extraindo destas fontes de nutrição e energia, é o que possibilitou o emprego desses agentes biológicos pela engenharia sanitária, como solução aos problemas gerados pelos rejeitos lançados no meio ambiente (VAZOLLER, 1996). A vantagem do uso de microrganismos para degradar poluentes está no baixo custo e alta eficiência dos sistemas biológicos de tratamento. Além disso, alguns processos biológicos de tratamento de resíduos, como os anaeróbios, podem gerar energia (gás metano), e menores quantidades de lodo biológico durante a estabilização de compostos orgânicos (LARIZZATTI, 1997).

O tricloroetileno (TCE) e outros organoclorados alifáticos são amplamente usados como solventes e desengraxantes de máquinas em diversos processos industriais (NELSON *et al.*, 1986). Esse composto, persistente no meio ambiente e transportado facilmente para águas superficiais, é suspeito de ser carcinogênico (ENVIROMENTAL HEALTH CENTER, 1997). Em 1970, a produção de TCE atingiu o mais alto índice em

quantidade já registrado nos Estados Unidos, aproximadamente 300 mil toneladas (DOHERTY, 2000). A combinação entre um amplo e indiscriminado emprego do TCE com técnicas inadequadas de uso tem resultado na contaminação de águas subterrâneas, trazendo como consequência a classificação desse produto pela USEPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América), como um dos principais contaminantes dessas águas na América do Norte (PHEALS *et al.*, 1990). A emissão global do TCE durante o ano de 1992 foi de 197.000 toneladas (McCULLOCH & MIDGLEY¹ apud FATIBELLO, 2000).

No Brasil, áreas contaminadas com organoclorados alifáticos têm sido recentemente notificadas. É o caso de Santo Antônio da Posse (150 km de São Paulo), onde águas subterrâneas de dois sítios foram contaminadas com solventes orgânicos, entre eles o 1,2 dicloroetano. O índice encontrado desse composto em um dos poços de abastecimento foi de 40,3 µg/L. O valor é 5,7 vezes superior ao limite recomendado pela OMS (Organização Mundial da Saúde), segundo noticiado no Jornal FOLHA de SÃO PAULO (2001), ver Anexo1. Em um recente relatório da CETESB (2001) onde se realizou o levantamento de poluentes na região da Baixada Santista, Estado de São Paulo, detectou-se que o Tricloroetileno está presente nos solos, nas águas subterrâneas e nos efluentes das estações de tratamento de águas subterrâneas em áreas contaminadas por resíduos industriais da indústria farmacêutica Rhodia. Assim, esse poluente foi encontrado, embora em concentrações baixas (de até 2,30 ng/g) nos sedimentos dos rios Branco e Mariana e no próprio estuário de São Vicente, a jusante das áreas contaminadas naquele município. Este composto também está presente no rio Cubatão, a jusante do rio Pilões e do rio Perequê, onde se situam planta industrial da Rhodia (desativada em 1993) e um depósito irregular de organoclorado desta empresa, mais a montante.

O emprego dos organismos anaeróbios com produção de metano, com o fim de sanear o meio ambiente, é amplamente reconhecido (VAZOLLER *et al.*, 1999). No Brasil, os processos biológicos anaeróbios metanogênicos de tratamento de resíduos têm

¹ McCULLOCH, A. & MIDGLEY, P. M. (1996). The production and distribution of emissions of trichloroethene, tetrachloroethene and dichloroethene over the period 1988 – 1992. *Atmospheric Environ.* 30 (4): 601 – 608.

grande importância, tanto para a estabilização da matéria orgânica poluente de origem doméstica, como a de origem industrial (LARIZZATTI, 1997). A degradação microbiana do TCE pode levar a completa mineralização desse composto e redução ou eliminação de sua toxicidade (FLIERMANS *et al.*, 1988).

Para muitos compostos halogenados a desalogenação redutiva é o passo inicial da degradação anaeróbia. Apesar da desalogenação redutiva ter sido reportada para uma variedade de compostos alifáticos e aromáticos (MONH & TIEDJE, 1992), pouco é conhecido sobre os microrganismos envolvidos nesse processo. Portanto, é fundamental o conhecimento sobre a detecção e seleção de microrganismos capazes de metabolizar diferentes compostos sob condições anaeróbias.

As técnicas microbiológicas tradicionais para detecção de uma espécie de microrganismo requerem, em geral, o isolamento e o cultivo em laboratório da mesma. Atualmente, os microbiologistas reconhecem que apenas uma pequena fração das bactérias foi isolada e caracterizada (TORSVIK *et al.*, 1990). Cerca de 90 a 99% das células microbianas presentes em amostras ambientais são consideradas células não cultiváveis (ROSADO *et al.*, 1997). Meios de culturas seletivos não são capazes de simular todas as condições que os microrganismos necessitam para a sua proliferação, como aquelas encontradas em um habitat natural. Portanto, a compreensão da diversidade microbiana na natureza é muito limitada. A aplicação de técnicas em Biologia Molecular oferece novas oportunidades para análise da estrutura e composição de espécies de comunidades microbianas complexas.

A grande maioria dos esforços para os estudos e uso sustentável da biodiversidade tem focado os organismos superiores (mamíferos, aves, peixes e plantas). Estimativas indicam que os microrganismos e invertebrados constituem quase que 90% das espécies da Biosfera, desempenhando um papel fundamental no funcionamento dos ecossistemas. São conhecidas mais de 80% das plantas e mais de 90% dos vertebrados existentes na natureza, enquanto que menos de 1% dos microrganismos procariontes foram até o momento classificados. Porém, esses seres vivos diminutos apresentam uma imensa diversidade genética e funções únicas e cruciais

na manutenção das cadeias alimentares e dos ciclos biogeoquímicos (CANHOS e VAZOLLER, 1999).

Através do emprego de técnicas moleculares, os microbiologistas estão começando a desvendar a enorme diversidade microbiana existente e correlacioná-la com o funcionamento dos ecossistemas. A aplicação de métodos moleculares na caracterização da diversidade microbiana na natureza vem permitindo uma expansão significativa da extensão do conhecimento sobre a diversidade microbiana. Sequências isoladas do meio ambiente são raramente idênticas a sequências de organismos isolados e cultivados, sugerindo que nosso conhecimento da estrutura filogenética da biodiversidade microbiana com base em estudo de isolamento e cultivo é seriamente limitado. (CANHOS *et al.*, 1999)

Portanto, o conhecimento da diversidade microbiana do sedimento do reservatório de Salto Grande, através da técnica de DGGE, e o estudo das condições nutricionais necessárias para estimular os microrganismos presentes no sedimento a degradar o TCE sob condições anaeróbias constituem uma contribuição para o levantamento da diversidade dos microrganismos no Estado de São Paulo e para o entendimento da rota metabólica de degradação desse composto. Para o saneamento ambiental, tais resultados podem contribuir com ações tecnológicas em biotratamento de resíduos tóxicos como o TCE, como o emprego de biodigestores anaeróbios, e com a biorremediação de áreas contaminadas com TCE.

2.0 OBJETIVOS

O presente trabalho de pesquisa teve como objetivos:

- Enriquecer amostras de sedimentos de um reservatório eutrofizado (reservatório de Salto Grande, região de Americana, Estado de São Paulo) em meio de cultivo contendo compostos orgânicos como ácidos voláteis e álcoois, na presença e na ausência de tricloroetileno (TCE), sob condições de anaerobiose estrita favorecendo as metanogênicas;
- Avaliar o metabolismo de degradação do TCE pela ação de consórcios dos microorganismos anaeróbios, empregando-se procedimentos cromatográficos;
- Avaliar a diversidade microbiana dos Domínios *Archaea* (organismos metanogênicos) e *Bacteria* nas amostras enriquecidas dos sedimentos do reservatório, na presença e na ausência do composto TCE, empregando-se a técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante - DGGE.

3.0 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Características gerais do Reservatório de Salto Grande

A bacia hidrográfica do Rio Atibaia localiza-se no centro leste do estado de São Paulo, aproximadamente entre os paralelos 22°41' e 23°18'sul, e os meridianos 46°00' e 47°16' oeste, perfazendo uma área total de 2.724 Km².

O Reservatório de Salto Grande, concluído em 1949, está localizado no município de Americana na região oeste da bacia do Rio Atibaia, numa altitude de 530 metros. A Figura 3.1 apresenta uma representação esquemática do reservatório. Sua construção se deu com a finalidade de geração de energia para a usina hidrelétrica de Americana (USAN), que possui uma capacidade geradora de 30 MW. A barragem represa o Rio Atibaia a 700 metros a montante do ponto onde ocorre a confluência com o Rio Jaguari, local onde se inicia o Rio Piracicaba. A área total do reservatório é de 11,5 km², com perímetro de 64 km e comprimento de 17 km. A barragem apresenta altura de 25 m, volume útil de $38,5 \times 10^6 \text{ m}^3$ e um tempo de residência de 54 dias.

Quanto aos aspectos geológicos da região em que se insere o reservatório, a descrição feita por COELHO (1993) indicou que a bacia hidrográfica do Rio Atibaia tem seu início nas rochas cristalinas do Planalto Atlântico e em seu baixo curso atravessa rochas sedimentares paleozóicas da Bacia do Rio Paraná, além de alguns corpos de rochas intrusivas básicas, de idade juro-cretácica. Além disso, o Rio Atibaia em seu trecho final até o reservatório de Salto Grande, percorre a borda leste da Bacia do Rio Paraná, local em que afloram rochas paleozóicas da Formação Itararé, rochas extrusivas básicas e sedimentos cenozóicos indiferenciados. Os sedimentos paleozóicos são atravessados em três locais distintos por diques de rochas intrusivas básicas, que cortam o vale transversalmente, formando saltos no antigo leito do Rio Atibaia, submersos pelo enchimento do reservatório. Capeando o interflúvio da margem esquerda, ocorrem ainda depósitos cenozóicos argilo arenoso de cor avermelhada.

Na Figura 3.1 observa-se a representação esquemática do reservatório em que os pontos de coleta estão indicados: - ponto 1 - S 22° 42.632', W 47° 15.961' está localizado no compartimento mais próximo a repesa; - ponto 2 - S 22° 43.043', W 47° 14.733' está localizada no canal que liga os dois compartimentos mais largos; - ponto 3 - S 22° 43.662', W 47° 14.024' localiza-se no segundo compartimento, na altura da praia dos namorados.

Figura 3.1: Representação esquemática do Reservatório de Salto Grande com os pontos de amostragem. O mapa do Estado de São Paulo indica a localização da cidade de Americana.

A cobertura vegetal da bacia hidrográfica do rio Atibaia, originalmente constituída de matas tropicais, cedeu lugar a agricultura cafeeira, posteriormente substituída pelas pastagens. A tênue vegetação dos pastos pouco contribui para reter a água no solo, o que conduz a superposição na bacia dos regimes fluvial e pluviométrico (COELHO, 1993).

A bacia do Rio Atibaia é um exemplo no estado de São Paulo de como o crescimento da produção agro-industrial e a elevada urbanização podem alterar os

ecossistemas aquáticos. As águas provenientes da bacia de drenagem atingem o reservatório de Salto Grande antes de o Rio Atibaia desaguar no Rio Piracicaba.

A qualidade das águas em uma bacia hidrográfica reflete nitidamente as características de ocupação e uso do solo. Na bacia do Rio Atibaia, as águas decrescem em qualidade, da montante para a jusante, na medida em que cresce a carga poluidora lançada ao longo das regiões cortadas pelos corpos aquáticos que compõem a bacia.

Na bacia do Atibaia, segundo o Departamento de Água e Energia Elétrica (CETESB, 1999), em 1995, as quantidades demandadas por setores de atividades eram de 2,84 m³/s para uso industrial, 1,45 m³/s para irrigação e 4,55 m³/s para uso urbano. Em relação às cargas orgânicas dos dez municípios que lançam esgotos na bacia, somente dois possuem sistema de tratamento, removendo apenas 1,3% da carga poluidora potencial.

O maior consumidor de água nessa bacia é a Rhodia Indústria Química, empresa do grupo francês Rhône Poulenc, que consome cerca de 3 mil litros por segundo de água, valor equivalente a uma cidade com 900 mil habitantes. Somente a Rhodia utiliza cerca de 23% do total de água da vazão industrial captada na bacia. As usinas de açúcar e de álcool representam 33% do total, o que é equivalente a 4300 litros por segundo (MONTICELI & MARTINS, 1993).

A Figura 3.2 representa imagem de satélite de parte da bacia da represa de Salto Grande, indicando na represa o banco de macrófitas (verde limão), porções da represa com diferente qualidade ótica em virtude de diferenças na concentração de material em suspensão (negro e azul marinho) e na região terrestre circunjacente as áreas urbanas (alaranjado) e áreas desmatadas.

Figura 3.2. Imagem de satélite de parte da bacia da represa de Salto Grande
Fonte: INPE, 2000.

A bacia do Rio Atibaia drena, parcial ou totalmente, os municípios paulistas de Americana, Campinas, Jaguariúna, Nova Odessa, Paulínia, Valinhos, Vinhedo, Itatiba, Jarinu, Morungaba, Atibaia, Bom Jesus dos Perdões, Bragança Paulista, Joanópolis, Nazaré Paulista e Piracaia. Nessa bacia, a densidade industrial aumenta de montante para jusante. Nas cabeceiras, encontra-se a maior atividade agrícola enquanto os grandes centros consumidores concentram-se do ponto médio à foz, chegando ao ápice no município de Paulínia, onde localiza-se um pólo petroquímico (CETESB, 1999). Como o reservatório de Salto Grande fica a poucos quilômetros de Paulínia, recebe uma grande carga de poluentes, pois a capacidade de autodepuração do rio, nesse trecho não é suficiente para estabilizar toda a carga recebida.

Os esgotos domésticos, além do efeito poluidor direto, funcionam como fertilizantes para plantas aquáticas, principalmente devido ao alto teor de nitrogênio e

fósforo que contém, causando a eutrofização artificial do reservatório. Isso provoca sérios problemas para a qualidade das águas dos mesmos, devido a grande proliferação das algas, que ocorre em algumas épocas do ano.

3.2 O Tricloroetileno

O tricloroetileno (TCE), composto estudado no presente trabalho, é um organoclorado alifático que apresenta massa molecular de 131,40, alta solubilidade em água (1,1 g/L) e alta mobilidade no solo, podendo ser encontrado em águas subterrâneas. Devido ao seu uso freqüente e estocagem inadequada, o TCE vem sendo encontrado na maioria dos ambientes poluídos. É um dos contaminantes mais comuns em águas subterrâneas e superficiais, solos e sedimentos (FATHEPURE & BOYD, 1988a; MALACHOWSKY *et al.*, 1994). Como observado anteriormente, é suspeito de ser carcinogênico e recalcitrante (INFANTE & TSONGAS, 1982).

O TCE e outros compostos organoclorados alifáticos são amplamente usados como solventes e desengraxantes de máquinas em processos industriais automotivos e siderúrgicos. Mas, podem ser também encontrados em outros produtos como removedores de tintas, adesivos, limpadores de tapetes, fluidos utilizados em lavagem a seco, entre outros (ENVIROMENTAL HEALTH CENTER, 1997).

3.3 Biodegradação do TCE - Metabolismo e aplicações

A contaminação de água subterrânea com hidrocarbonetos clorados, em particular o TCE é um risco potencial para as fontes de águas potáveis (ENSLEY, 1991). Tem sido demonstrado que a comunidade microbiana nativa desses ambientes é capaz de degradar uma vasta variedade de hidrocarbonetos clorados em laboratório (VOGUEL & McCARTY, 1985; DI STEFANO *et al.*, 1991; MAYMÓ-GATELL *et al.*, 1997).

A aplicação da técnica de biorremediação intrínseca é uma alternativa para tratamento de áreas contaminadas e foi descrita por FLIERMANS *et al.* (1988) para organismos aeróbios. Os microrganismos nativos foram estimulados por enriquecimento

com gás metano, a degradar o TCE e outros compostos alifáticos clorados. BROCKMAN *et al.* (1995) demonstraram em um lençol freático o enriquecimento biológico com esse gás, além de nitrogênio e fósforo, o que estimulou os microrganismos nativos a metabolizarem o TCE, com um potencial de biodegradação da ordem de 81%.

A biodegradação aeróbia de compostos organoclorados pode ocorrer através de co-metabolismo. Numerosos estudos têm demonstrado que microrganismos aeróbios, tais como *Pseudomonas cepacia*, foram capazes de degradar o TCE através do co-metabolismo em conjunto com outros compostos como tolueno, fenol e aminoácidos específicos (NELSON *et al.*, 1986; KRUMME *et al.*, 1993; ARCANGELI *et al.*, 1995). LU *et al.* (1995) relataram a biodegradação aeróbia do TCE na presença dos compostos aromáticos como benzeno, tolueno e catecol. Outros trabalhos foram encontrados na literatura especializada sobre a biodegradação do TCE em condições aeróbias, tais como os de NELSON *et al.* (1986), ENZIEN *et al.* (1994), MALACHOWSKY *et al.* (1994) e McCLAY *et al.* (1995).

As transformações de solventes clorados sob condições anaeróbias ocorrem através de reações de redução ou substituição. A maioria das reações se encaixa dentro de quatro categorias, as duas primeiras são de substituição, e as outras duas são de redução (Tabela 3.1). A primeira reação de substituição é chamada de hidrólise, em que uma molécula de água ou de outro agente nucleofílico substitui um átomo de cloro, desprendendo este na forma de ácido clorídrico. Com a dehidrohalogenação, um hidrogênio e um cloro são removidos simultaneamente, resultando em um composto menos clorado e a formação de uma dupla ligação química entre os átomos de carbono. Na dihaloeliminação, dois átomos de cloro são removidos e reduzidos, e uma dupla ligação é formada. Na desalogenação redutiva, a molécula é reduzida, e assim um átomo de cloro é substituído pelo de hidrogênio. Esta última, tem sido bem reportada em muitos casos que suportam o crescimento microbiano na presença de doadores de elétrons (LEE *et al.*, 1997). A degradação anaeróbia do PCE ocorre via remoção sequencial dos quatro átomos de cloros por desalogenação redutiva. (FERGUNSON & PIETARI, 2000).

Tabela 3.1: Tipos de reação de transformação de compostos alifáticos clorados: reações de substituição e redução

Hidrólise e outras substituições

Dehidrohalogenação

Dicloroeliminação

Desalogenação Redutiva

Fonte: (FERGUNSON & PIETARI, 2000)

Para muitos compostos halogenados, a desalogenação redutiva é o passo inicial para a biodegradação anaeróbia (HOLLIGER & SCHUMACHER, 1994). Estequiometricamente, o potencial de óxi-redução da transformação do percloroetileno (PCE) em tricloroetileno (TCE) é de $E_H = 485\text{mV}$. Segundo DOLFING & JANSSEN (1994), a energia livre de Gibbs faz com que o TCE seja termodinamicamente favorável como um aceptor final de elétrons para o crescimento microbiano.

São várias as culturas microbianas em consórcios, ou mesmo puras, capazes de realizar a desalogenação redutiva de hidrocarbonetos alifáticos clorados. Apesar dos numerosos trabalhos e revisões sobre a desalogenação redutiva por microrganismos, ainda não é totalmente conhecido o metabolismo responsável por essa reação (HOLLIGER & SCHUMACHER, 1994).

Consórcios microbianos anaeróbios têm sido capazes de realizar a desalogenação redutiva de compostos alifáticos e aromáticos. A transformação anaeróbia de cloroetanos ocorre via substituição seqüencial do cloro por hidrogênio. A biotransformação

anaeróbia do percloroetileno (PCE), sob condições metanogênicas, parece ocorrer pela desalogenação redutiva deste organoclorado, produzindo tricloroetileno (TCE) numa primeira etapa, seguindo-se a formação de dicloroetileno (DCE) e, posteriormente, de cloreto de vinila (CV) como se observa na Figura 3.3 (VOGEL & McCARTY, 1985; WU *et al.*, 1995). A transformação de CV em dióxido de carbono parece envolver a adição de água na dupla ligação do CV, formando o 2-cloroetanol, com posterior oxidação completa desse composto a CO_2 e metano.

Figura 3.3: Esquema da biotransformação do PCE a CO_2 , através da desalogenação redutiva (VOGUEL & McCARTY, 1985).

Alguns organismos como os acetogênicos e metanogênicos desalogenam compostos clorados como reação de co-metabolismo (HOLLIGER *et al.*, 1999), em que os elétrons produzidos durante a biossíntese do metano são direcionados para a desalogenação redutiva do PCE. Este composto é um forte aceitor de elétrons

(VOGUEL *et al.*, 1997), cuja redução pode estar relacionada com fatores transportadores de elétrons envolvidos na biossíntese do metano. Um esquema hipotético para ligação da desalogenação redutiva com a metanogênese é mostrado na Figura 3.4. O esquema proposto por FATHEPURE & BOYD (1988c) mostrou que os elétrons transferidos durante a metanogênese são desviados para o PCE por um agente transferidor de elétrons (designado por X) envolvido na transformação do metano. O carreador X pode ser uma molécula transportadora de elétrons comum tanto para a biossíntese do metano, como para a desalogenação redutiva.

Figura 3.4: Esquema hipotético da transferência de elétrons para o PCE durante a metanogênese, resultando na formação de TCE. Os elétrons são transferidos para o PCE via um carreador de elétrons (X) envolvido na biossíntese do metano. (FATHEPURE & BOYD, 1988c).

Várias bactérias aeróbias são capazes de degradar TCE em culturas puras. KOIZUMI & KITAYAMA (1995) demonstraram a capacidade da *Pseudomonas aeruginosa* em degradar TCE numa velocidade de $2\mu\text{g/ml}$. Culturas anaeróbias também são citadas como capazes de desalogenar o TCE (FATHEPURE & BOYD, 1988; VOGUEL & McCARTY, 1995), e a tecnologia sugere a integração das condições aeróbias e anaeróbias (KÄSTNER, 1991).

A diversidade de bactérias desalogenadoras é grande, assim como a diversidade de compostos clorados sintetizados. Entretanto, muitos novos gêneros e espécies destes microrganismos ainda não foram descobertos. Os organismos desalogenadores

pertencem a diferentes grupos filogenéticos, e sua fisiologia compreende os facultativos anaeróbios, redutores de nitrato, ferro, sulfato, fermentativos e metanogênicos (FANTROUSSI *et al.*, 1998).

Algumas culturas anaeróbias puras têm sido descritas como desalogenadoras. A espécie *Desulfomonile tiedjei* foi a primeira bactéria descrita como utilizadora de compostos clorados como aceptor de elétrons no processo de respiração anaeróbia (MOHN & TIEDJE, 1992), posteriormente, isolaram-se as espécies *Dehalobacter restrictus* e *Dehalospirillum multivorans*, em que ambas utilizam o TCE como aceptor final de elétrons (HOLLIGER, 1992; NEUMANN *et al.*, 1994).

A espécie redutora de sulfato *Desulfomonile tiedjei* é um bacilo Gram-negativo pertencente ao subgrupo δ do grupo *Proteobacteria* (SHELTON & TIEDJE, 1984), capaz de crescer no 3-clorobenzoato e hidrogênio, sendo o primeiro o aceptor e o segundo o doador de elétrons. Além disso, a espécie mostrou-se capaz de realizar a desalogenação redutiva do percloroetileno (PCE) até cis-1,2 dicloroetileno (DCE). Evidências demonstraram que o 3-clorobenzoato e o PCE foram convertidos através da ação de uma mesma enzima, a 3-clorobenzoato dehalogenase, que pode ser induzida pelo composto 3-clorobenzoato (TOWNSED & SUFLITA, 1997).

Foi demonstrado que culturas puras de organismos metanogênicos anaeróbios estritos pertencentes ao gênero *Methanosarcina sp.* podem degradar PCE a TCE, durante o metabolismo metanogênico. Os ensaios foram realizados em 50 mL de meio PREM suplementado com 25 mM de metanol, com headspace de N₂ e a concentração inicial do TCE foi de 1 a 3mg/L. Este estudo conclui que a desalogenação redutiva do PCE ocorreu somente durante a formação do metano (FATHEPURE e BOYD, 1988).

Algumas espécies de *Desulfitobacterium* são também capazes de desalogenar uma variedade de compostos clorados. O gênero constitui-se por células Gram-positivas, sendo algumas espécies formadoras de esporos. Alguns organismos possuem metanoquinonas e citocromos c e b. As espécies *D. dehalogenans* (GERRITSE *et al.*, 1996), *D.* linhagem PCE1 (GERRITSE *et al.*, 1996) e *D.* linhagem PCE-S (GRANZOW, 1998) são capazes de transformar fenóis clorados e PCE. As reações são mediadas por diferentes enzimas de acordo com os substratos utilizados.

Os estudos realizados por MACKIEWICZ & WIEGEL (1998) revelaram que o PCE pôde ser convertido a TCE por *D. dehalogenans*, e traços de DCEs foram formados pela linhagem PCE 1 a partir de PCE. De acordo com GERRITSE *et al.* (1999), a enzima PCE desalogenase catalisa a redução de PCE via TCE até DCE como produto final. A Tabela 3.2 relaciona as propriedades das enzimas envolvidas no processo de degradação dos cloroetenos.

A *D. frapei* TCE1, uma linhagem anaeróbia estrita que pode crescer por desalogenação redutiva do percloroetileno (PCE) e do tricloroetileno (TCE), foi isolada de um enriquecimento seletivo de cultura mista capaz de desclorar o PCE (BOUCHARD *et al.*, 1996). Essa linhagem é um organismo Gram-positivo, móvel, cuja célula possui forma de um bacilo curvo com 2 a 4 μm de comprimento por 0,6 a 0,8 μm de diâmetro e tem aproximadamente 6 flagelos laterais. O pH e a temperatura ótima de crescimento da linhagem são de 7,2 e 35°C, respectivamente. De acordo com GERRITSE *et al.* (1999), a *D. frapei* TCE1 foi capaz de crescer a 30°C e pH 7,2 e em meio contendo lactato e PCE, apresentando um μ_{max} de 0,078h⁻¹. Os resultados mostraram que o lactato foi oxidado até acetato, e o TCE foi desalogenado principalmente a cis-DCE. Uma pequena quantidade dos compostos 1,1 DCE e cloreto de vinila foram também detectados. Na presença de hidrogênio (80mM) como doador de elétrons, a linhagem realizou a dehalorespiração. Este trabalho mostrou claramente que a energia livre obtida da redução do PCE até o cis-DCE ($\Delta G = -87 \text{ KJ/ mol de e}^-$) e do TCE até o cis-DCE ($\Delta G = -85,7 \text{ KJ/ mol de e}^-$) é maior que a energia livre obtida durante a redução do fumarato até o succinato ($\Delta G = -44,2 \text{ KJ/ mol de e}^-$). Na presença de 2 mM de sulfato a desalogenação redutiva do PCE foi fortemente inibida, nessa fase o sulfeto foi acumulado, revelando que o sulfato foi reduzido pela linhagem TCE 1. Comparando-se as velocidades de desalogenação observadas em experimentos realizados com diferentes bactérias desalogenadoras, a linhagem TCE-1 parece ser também promissora para usos aplicados em áreas contaminadas com PCE e TCE.

Tabela 3.2. Propriedades de enzimas desalogenases redutivas.

Enzimas	3-Cl-benzoate dehalogenase	PCE dehalogenase	PCE dehalogenase	PCE dehalogenase	PCE dehalogenase	TCE dehalogenase
Organismos	<i>D. tiedjei</i>	<i>D. strain PCE-S</i>	<i>D. restrictus</i>	<i>D. multivorans</i>	<i>D. ethenogenes</i>	<i>D. ethenogenes</i>
Substratos	3-Cl-benzoate	PCE, TCE	PCE, TCE	PCE, TCE	PCE	TCE, DCE, VC
Localização ¹	membrana	membrana	membrana	citoplasma	membrana	membrana

PCE, tetracloroetileno; TCE, tricloroetileno; DCE, dicloroetileno; VC, cloreto de vinila; ¹na célula.

Fonte: HOLLIGER *et al.*(1999).

GERRITSE *et al.*(1999), examinando a influência dos aceptores de elétrons em *D. frapei* TCE, encontraram que em baixas concentrações (2 mM) de nitrato ou fumarato (2mM) não foram observados efeitos negativos na taxa de desalogenação do PCE. Quando as células foram testadas em meio acrescido da mistura de três diferentes doadores de elétrons, nitrato, fumarato e sulfito, nas concentrações de 2 mM cada um, e na presença de 40 mM lactato (condição em excesso) e 10 mM de PCE (condição limitante), ocorreu a desalogenação do PCE. No entanto, essa desalogenação foi completamente bloqueada sob menor concentração de lactato (10 mM) e quando a mistura dos doadores de elétrons foi de 10 mM cada um, empregada na presença de cerca 19 mM de PCE. Portanto, a disponibilidade e as concentrações de doadores e aceptores de elétrons no meio foram um importante aspecto para a ocorrência da atividade microbiana. São poucas as informações sobre a desalogenação microbiana na presença da misturas de outros doadores de elétrons.

Em recente estudo sobre a enzima PCE desalogenase, empregando-se extratos celulares das espécies *Desulfitobacterium* sp. PCE-S e *D. multivorans*, demonstrou-se à inibição da atividade enzimática com a adição de 1 mM de sulfito (MILLER *et al.*,1997). Os mesmos autores (MILLER *et al.*, 1997) propuseram que a inibição da

redução do PCE por sulfito é devido à ligação desse composto ao cobalto do anel corrinóide, um grupo prostético das enzimas envolvidas na desalogenação. Resultados similares foram também descritos por MAGNUSON *et al.* (1998), que observaram a completa inibição da redução dos compostos clorados pelas atividades das enzimas PCE desalogenase e TCE desalogenase, isoladas de *Dehalococcoides ethenogenes* 195, na presença de 2 mM de sulfito. Nenhuma dessas enzimas foi inibida com a adição de sulfato, sulfeto ou selenato, na concentração de 2 mM cada. A ação da desalogenase da linhagem TCE-1 também foi inativada com a adição de 2 mM de sulfito, mas foi restituída após a remoção do sulfito do meio.

A *Dehalobacter restrictus* (HOLLIGER *et al.*, 1993; HOLLIGER *et al.*, 1998) e isolado TEA (WILD *et al.*, 1996) são, baseando-se na análise do DNAr 16S, afiliados ao mesmo grupo das bactérias Gram-positivas, como o gênero *Desulfitobacterium*. O microrganismo *D. restrictus*, assim como o isolado TEA, mostraram-se restritos apenas a utilização do hidrogênio como doador de elétrons e TCE e PCE comoceptor de elétrons. A enzima PCE desalogenase foi purificada da espécie *D. restrictus* (Tabela 3.2) e foi encontrada na redução do PCE a DCE. *D. multivorans* é uma bactéria Gram-negativa pertencente ao subgrupo ϵ do grupo *Proteobacteria*, que contém menaquinonas e citocromos b e c. Este microrganismo é capaz de utilizar tanto o hidrogênio, piruvato e formiato na desalogenação redutiva do PCE. Outros aceptores de elétrons como fumarato, arsenato e selenato podem inibir a redução do PCE, demonstrando a versatilidade deste microrganismo. A enzima PCE desalogenase catalisa a redução do PCE a DCE (Tabela 3.3).

EISENBEIS *et al.* (1997) demonstraram que a espécie *Dehalospirillum multivorans*, isolada de um sistema de lodos ativados foi capaz de desclorar tetracloroetileno (PCE) em uma concentração de 150 $\mu\text{mol/L}$ via tricloroetileno (TCE) a 1,2-dicloroetileno (DCE) em biofilmes de um reator de leito fluidificado, alimentado com formiato (5mM) como doador de elétrons e acetato (1mM) como fonte de carbono. O reator foi operado sob atmosfera de N_2/CO_2 (4:1) em condições não estéreis por três meses, a 20°C. O tempo de retenção do reator foi de 12 horas.

A espécie *Desulfuromonas chloroethenica* é um bacilo redutor de sulfato, Gram-negativo que utiliza piruvato ou acetato como doador de elétrons para a redução do PCE ou TCE a DCE (KRUMHOLTZ, 1997).

Atualmente, a espécie *Dehalococcoides ethenogenes* linhagem 195 é considerada o único organismo, em cultura pura, capaz de desalogenar completamente percloroetileno (PCE) a cloreto de vinila (VC) e eteno (NIJENHUIS & ZINDER, 2001). A *D. ethenogenes* linhagem 195 não possui afiliação estreita com nenhum outro grupo conhecido (MAYMÓ-GATELL *et al.* 1997). Foi isolada sob condições de anaerobiose e é capaz de desclorar PCE, via TCE, DCE e cloreto de vinila (VC) até etileno empregando o hidrogênio como doador de elétrons e indicando a conservação de energia via dehalorespiração. Duas enzimas desalogenases estão envolvidas na redução do PCE a TCE e TCE a etano via DCE e cloreto de vinila (VC). Em outro estudo (MAYMÓ-GATELL *et al.*, 1999), culturas crescidas em PCE da linhagem 195 foram transferidas em meio contendo hidrogênio como doador de elétrons e 0,3 mM de PCE, TCE e 1,1DCE como aceptor de elétrons. Estes foram consumidos em 2,5 dias, sendo convertidos principalmente a cloreto de vinila (VC). Uma segunda dose de 0,5 mM de etenos clorados adicionada ao cultivo foi consumida em 3 a 4 dias. O produto obtido da desalogenação primária do PCE, TCE, cis-DCE e 1,2 DCE foi o cloreto de vinila (VC). A desalogenação do cis-DCE foi mais lenta se comparada com a desalogenação de outros substratos utilizados, aparentemente devido à toxicidade deste composto.

Segundo (MAYMÓ-GATELL *et al.*, 1999), ainda foi possível observar que nem trans-DCE nem VC puderam servir como aceptores de elétrons para o crescimento da linhagem 195 no trabalho anterior, e que a utilização deste composto foi aparentemente co-metabólica. A sequência de aparecimento dos intermediários durante a desalogenação do PCE a eteno foi TCE, cis-DCE e VC e os compostos trans-DCE e 1,1-DCE acumularam somente depois do surgimento do cis-DCE, o que sugeriu que esse composto é o precursor dos outros dois isômeros. Por sua vez, o composto 1,1 DCE desapareceu no mesmo tempo que o PCE, TCE e o cis-DCE. Um recente estudo (NIJENHUIS & ZINDER, 2001) indicou que a linhagem 195 pode não ser capaz de usar

ácidos húmicos como doadores de elétrons, e que a presença desses ácidos pode ser inibitório para a desalogenação redutiva da *D. ethenogenes*.

MANGNUSOS *et al.* (1998) constataram enzimas descloradoras purificadas de culturas enriquecidas com metanol-PCE. Eles concluíram que a enzima PCE desalogenase era responsável pela desalogenação somente do PCE, enquanto que a enzima TCE desalogenase reduzia TCE, cis-DCE, e 1,1 DCE a VC, bem como lentamente trans-DCE a VC e VC a eteno. A TCE desalogenase não catalisou o PCE (Tabela 3.2). Assim, tanto o composto TCE como o cis-DCE competiram pelo mesmo sítio da TCE desalogenase. A desalogenação do PCE ao VC requereu seis elétrons, enquanto que a redução do TCE à VC quatro elétrons e a descloração do DCE à VC dois elétrons. Esse resultado sugeriu que o suprimento de H₂ como doador de elétrons não foi limitante.

A linhagem *Enterobacter* S-1 é um bacilo Gram-negativo pertencente ao subgrupo γ do grupo *Proteobacteria* (SHARMA & MCCARTY, 1996). É um grupo anaeróbico facultativo que desclora o PCE a TCE. Uma variedade de doadores de elétrons foram utilizados para redução do PCE. A Tabela 3.3 mostra algumas características dos microrganismos citados, principalmente no que diz respeito a doadores de elétrons no processo de desalogenação redutiva de organoclorados, referenciando os pesquisadores citados.

CULUBRET *et al.* (2000) relataram o efeito de diferentes co-substratos na degradação de 1,1,1,2-tetraclorometano por um lodo granulado anaeróbico e a rota de sua degradação. Os resultados demonstraram que este composto foi facilmente e rapidamente degradado sob condições metanogênicas na ausência ou na presença de doadores de elétrons (ácidos láctico, acético e fórmico, metanol e sacarose). A maior taxa de degradação observada foi de 280 μ moles/g SSV/d. Os autores demonstraram também que a dicloroeliminação foi a principal rota degradativa do 1,1,1,2-TeCA, sob condições metanogênicas, e o 1,1 DCE foi o produto final obtido no processo. A desalogenação completa somente ocorreu com a introdução do ácido láctico como co-substrato.

Tabela 3.3: Doadores de elétrons utilizados por microrganismos na desalogenação redutiva de organoclorados.

Organismos	Compostos organoclorados	Doadores de Elétrons	Referências
<i>Desulfomonile tiedjei</i>	PCE, TCE, 3-clorobenzoato; pentaclorofenol	H ₂ , Formiato, Piruvato	Holliger <i>et al.</i> , 1999
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	PCE, 2,4,6-triclorofenol, 3-CL-4-OH-fenilacetato	H ₂ , Formiato, Piruvato	Utkin <i>et al.</i> 1994
<i>Desulfitobacterium</i> PCE 1	PCE, 2-clorofenol, 2,4,6-triclorofenol	Formiato e Piruvato	Gerritse <i>et al.</i> 1996
<i>Desulfitobacterium</i> PCE-S	PCE, TCE, Pentaclorofenol	Piruvato	Granzow 1998
<i>Dehalobacter restrictus</i>	PCE, TCE	H ₂	Holliger <i>et al.</i> 1998
TEA isolado	PCE, TCE	H ₂	Wild <i>et al.</i> 1996
<i>Dehalospirillum multivorans</i>	PCE, TCE	H ₂ , Formiato, Piruvato	Holliger <i>et al.</i> 1999
<i>Desulforomonas chloroethenica</i>	PCE, TCE	Piruvato, Acetato	Krumholz <i>et al.</i> 1997
<i>Dehalococoides ethenogenes</i> 195	PCE, TCE, DCE, cloroeteno	H ₂	Maymó-Gatell <i>et al.</i> 1997
<i>Enterobacter</i> MS-1	PCE, TCE	Formiato, piruvato, Acetato	Sharma & McCarty, 1996

PCE, Tetracloroetileno; TCE tricloroetileno; DCE dicloroetileno

Fonte: HOLLIGER *et al.* (1999).

PRAKASH & GUPTA (2000) utilizaram o reator UASB contendo tetracloroetileno (2mg/L) para o desenvolvimento do lodo anaeróbio granulado. O lodo foi formado depois de 82 dias com a predominância de *Methanosaeta* sp (antiga *Methanothrix* sp) e *Methanosarcina* sp. O balanço de massa demonstrou ser similar a outros resultados encontrados, com relação a desalogenação do PCE em TCE, DCE, VC (PARSONS *et al.*, 1984; VOGUEL & MCCARTY, 1987) e eteno (FREEDMAN & GOSSET, 1989). O composto cis-1,2 DCE foi o único isômero encontrado no efluente. Este estudo detectou que 97,5% do PCE (50mg/L) foi convertido em TCE, 90% do TCE foi convertido em cis-1,2 DCE, e 80% do cis-1,2 DCE foi convertido à cloreto de vinila (VC) e aproximadamente 75% do VC foi convertido em eteno.

HUANG & WU (1994) observaram em seus estudos que 62% do DCE foi convertido para VC e 75% do VC para eteno em um reator anaeróbio de leito fluidificado preenchido com carbono ativado como suporte. NAVARRETE *et al.* (1999) verificaram que o lodo de um reator UASB possuiu tolerância e adaptou-se ao TCE, sendo que a adição contínua deste organoclorado afetou a eficiência apenas na concentração de 100mg/L, porém a eficiência de remoção foi em torno de 90%. Depois de 5 a 6 dias ocorreu uma readaptação do sistema a concentrações mais elevadas e o reator estabilizou com 400 mg/L de TCE, mostrando-se adequado para o tratamento anaeróbio do TCE. WU *et al.* (1995) estudaram consórcios microbianos presentes em grânulos de reatores anaeróbios de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), capazes de desclorar o TCE a etano.

Em um estudo realizado por WILSON *et al.* (1986), a degradação de diversos compostos halogenados, entre eles o TCE foi verificada em um microcosmo anaeróbio com amostra de um aquífero contendo material lixiviado de um aterro sanitário localizado na cidade de Norman (Oklahoma, Estados Unidos).

LEE *et al.* (1997) utilizaram um solo anaeróbio enriquecido com culturas na desalogenação de altas concentrações de PCE como 150 mg/L. Aproximadamente 58 mg/L na concentração aquosa foi transformada a cis-1,2 DCE via TCE. A velocidade de desalogenação máxima foi de 0,4 μ moles de PCE/mgSSV/h na presença de citrato como doador de elétrons e fonte de carbono, nesse caso extrato de levedura foi utilizado como

fonte de fatores de crescimento. Alguns substratos como piruvato, succinato, formiato e acetato puderam substituir o citrato, com exceção do propionato.

Estudos sobre a biodegradação do TCE empregando-se sedimentos aquáticos foram conduzidos sob condições metanogênicas (BRADLEY & CHAPELLE, 1999), e a detecção radiométrica de ^{14}C no TCE foi utilizada para a verificação dos produtos de degradação deste organoclorado. Os resultados obtidos demonstraram que eteno, etano, dióxido de carbono e metano foram resultados da degradação do TCE.

Em outro estudo de ELLIS *et al.* (2000) sobre a degradação do TCE (4800 $\mu\text{g/L}$) e cis-DCE (1200 $\mu\text{g/L}$) presentes em um aquífero, verificou-se que após 269 dias 80% do TCE foi transformado em cis-1,2 DCE. Foi necessária a adição de uma cultura mista para que o CV e o eteno começassem a aparecer nas águas subterrâneas. Após 509 dias, os compostos TCE e cis-1,2DCE foram completamente convertidos a eteno.

FATIBELLO (2001) realizou ensaios a 25°C com sedimento de Represa do Lobo (Broa) para avaliar a degradação do TCE (5 mg/g STV) em meio Zinder acrescidos das seguintes fontes de carbono acetato de sódio, butirato de sódio, lactato de sódio, formiato de sódio, metanol e etanol. Depois de 48 dias de incubação constatou-se a redução abiótica e biótica do TCE, de 23 e 79%, respectivamente. Pode-se afirmar que o sedimento mesofílico apresentou habilidade em degradar esse solvente organoclorado.

Técnicas moleculares têm sido utilizadas para detecção de microrganismos desalogenadores de organoclorados. LÖFFLER *et al.* (2000) utilizaram “primers” para amplificações de regiões hipervariáveis do RNAr 16S para detectar espécies descloradoras de PCE *Desulfuromonas* sp. e *Dehalococcoides* sp. em sedimentos contaminados com diferentes cloroetenos do rio Michigan, através da técnica do RFLP. HELTON *et al.* (2001) avaliou a comunidade microbiana de um sedimento do aquífero contaminado por PCE, localizado em Jacksonville, Florida, USA, por amplificação do DNAr 16S e RFLP (Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição). “Primers” específicos detectaram a presença de *Dehalococcoides* sp. no aquífero.

SHARMA & McCARTY (1996) isolaram uma bactéria aeróbia facultativa a espécie *Enterobacter agglomerans*, capaz de desalogenar o TCE, e identificaram este microrganismo através de análise do RNAr 16S e do REP-PCR

GERRITSE *et al.* (1999) identificaram uma nova linhagem de *Dessulfotobacterium frappieri*, a *D. frappieri* TCE1 devido à existência de 99,7% de relação com a linhagem *D. frappieri* PCP-1. Sua identificação foi feita com base no sequenciamento do RNAr16S, e a cepa constituiu-se por uma nova espécie.

3.4 Ecologia Molecular Microbiana

O estudo sobre as comunidades microbianas levanta questões sobre a composição, estrutura, estabilidade e relação da atividade e função de seus habitantes. As técnicas microbiológicas tradicionais e os exames microscópicos comuns são meios insuficientes para responder a estas questões. A maioria dos microrganismos em amostras ambientais não pode ser detectada através de exames microscópicos convencionais, pois muitas vezes, as células microbianas podem se encontrar no meio de forma agregada quando, por exemplo, se aderem a partículas do solo, aos sedimentos de um corpo aquático ou mesmo entre si (MUYZER *et al.*, 1996). Além disso, é praticamente impossível a simulação das condições ideais encontradas por estes microrganismos no ambiente, para a sua reprodução, impossibilitando assim, o cultivo e manutenção destes em laboratório.

O uso de corantes fluorescentes como o DAPI e "laranja de acridina" tem produzido bons resultados para a detecção de células não cultiváveis. Entretanto, estes nem sempre podem distinguir células vivas de células mortas e tais procedimentos podem ser pouco úteis quando ocorre autofluorescência celular (ROSADO *et al.*, 1997).

A investigação filogenética de populações naturais é importante para conhecer a diversidade microbiana dos ambientes. O desenvolvimento das técnicas de Biologia Molecular aliado a tecnologia de bioinformática constituem ferramentas de uma nova linha de estudo interdisciplinar intitulada Ecologia Molecular Microbiana, que busca determinar a diversidade genética das comunidades microbianas e suas relações com o ambiente (MUYZER *et al.*, 1996; TESKE *et al.*, 1996; KOWALCHUK *et al.*, 1997; HEUER *et al.*, 1997). Basicamente, a metodologia de extração de DNA fornece

informação sobre a composição genética da comunidade microbiana, enquanto que métodos de extração de RNA são usados para determinar a atividade metabólica dos componentes da comunidade (ROSADO *et al.*, 1997).

Os ácidos desoxirribonucléico (DNA) e ribonucléico (RNA) são extraídos de comunidades microbianas presentes em amostras de solo, água e sedimentos, sendo empregados em diferentes estratégias moleculares, a fim de determinar a complexidade da comunidade e identificar os membros das populações. No entanto, para que tais análises possam ser realizadas, os ácidos nucleicos precisam ser isolados dos outros constituintes celulares e ressuspensos em solução aquosa. Muitas vezes, as suspensões de ácidos nucleicos necessitam, ainda, passar por processo de purificação para que compostos considerados como contaminantes, tais como proteínas e polissacarídeos sejam retirados da solução.

Para se obter ácidos nucleicos para análises, duas diferentes estratégias de extração têm sido desenvolvidas na última década, extração por lise direta e extração por lise indireta. Na primeira, o DNA é extraído da comunidade microbiana diretamente da amostra ambiental (OGRAM *et al.*, 1987) e, na segunda, os microrganismos são primeiramente extraídos do solo ou sedimento, para depois as células serem lisadas e o DNA ser extraído (TORSVIK 1980; HOLBEN *et al.*, 1988; TSAI & OLSON, 1991). Entretanto, as duas metodologias apresentam suas desvantagens, o método de lise indireta é demorado, trabalhoso e normalmente menos eficiente, pois recupera menor quantidade de DNA que o método de lise direta, enquanto que o método de lise direta apresenta como desvantagens à extração de DNA tanto de procariotos como de eucariotos, maior índice de contaminação por compostos húmicos, no caso de extração de sedimentos e solos e maior nível de degradação dos ácidos nucleicos extraídos (TSAI & OLSON, 1991).

Em geral, o processo de extração celular é composto por alguns poucos procedimentos básicos, necessários à desintegração e homogeneização de células, à solubilização dos ácidos nucleicos, à separação dos ácidos nucleicos dos outros constituintes celulares e à precipitação dos ácidos nucleicos. Os protocolos de isolamento de ácidos nucleicos apresentam pequenas variações e podem ser mais ou

menos convenientes a determinados propósitos em função do tempo gasto, da quantidade e pureza dos ácidos nucleicos obtidos, do nível de degradação dos ácidos nucleicos resultantes e da eficiência de lise das células-alvo (PIZA, 2000).

A reação em cadeia da polimerase (PCR), introduzida por SAIKI *et al.* (1985), permitiu amplificar pequenos e específicos segmentos do genoma. É um método pelo qual se obtém, *in vitro*, várias cópias de um determinado segmento do DNA. A aplicação de métodos baseados em PCR tem sido cada vez mais utilizada em vários campos da Biologia Molecular.

Para a sistemática microbiana, o PCR é atualmente o método básico para obter cópias de segmentos de DNA genômico para clonagem e seqüenciamento de genes utilizados na caracterização e identificação de microrganismos. Nos estudos de genética de populações e Ecologia Microbiana, os fragmentos amplificados por PCR geram dados sobre a distribuição natural dos microorganismos no ambiente. As vantagens do PCR incluem a simplicidade, rapidez e sensibilidade do método que necessita de pequenas quantidades de DNA (MULLIS & FALOONA, 1987).

Metodologias baseadas na análise de fragmentos específicos de RNAr 16S ou de genes cromossomais que os codificam, DNAr 16S, têm se revelado de grande valia para o estudo da diversidade de microrganismos em amostras ambientais (AMANN *et al.*, 1995; MUYZER, 1996). Essas seqüências são marcadores filogenéticos importantes devido à sua distribuição universal (ocorrem em todos os organismos), à sua conservação estrutural e funcional, à presença tanto de regiões conservadas como regiões variáveis e hiper-variáveis em diferentes porções da molécula, e tamanho que fornece informação de seqüência de bases suficientes para inferências filogenéticas. Além disso, mais de 10.000 seqüências estão disponíveis em bancos de dados públicos de seqüência de nucleotídeos, como o GenBank (BENSON *et al.*, 1997) e Ribosomal Database Project (RDP - MAIDAK *et al.*, 1997).

Os ácidos nucleicos DNA e RNA extraídos de populações microbianas mistas são usados em diferentes estratégias moleculares para determinar a diversidade da comunidade e identificar membros de populações. Análise direta do DNA usando experimentos de reassociação de DNA (TORSVIK *et al.*, 1990) ou hibridação

DNA/DNA (LEE & FUHRMAN, 1990) revelaram a importante informação do número de diferentes genomas em amostras ambientais. Em adição à análise direta de DNA, uma outra estratégia de análise da diversidade é baseada na eletroforese de RNA de baixo peso molecular (RNAr 5S e RNAt) em gel de policramida de alta resolução (HÖFLE, 1992). No entanto, essas duas metodologias não permitem identificar os membros da comunidade. As duas únicas estratégias que permitem a identificação dos membros da comunidade são a clonagem e o DGGE de marcadores moleculares como o DNAr 16S, ambos seguidos de sequenciamento dos fragmentos amplificados e isolados.

Diferentes estratégias de clonagens têm sido aplicadas para analisar a diversidade genética microbiana: clonagens de fragmentos, de alto peso molecular, gerados por “shotgun” em bacteriófago lambda (SCHMIDT *et al.*, 1991), clonagem de fragmentos de DNAr, que são cópias do DNA obtido por transcrição reversa a partir do RNAr (WARD *et al.*, 1990) e de fragmentos de DNAr 16S, ambos fragmentos obtidos por amplificação por PCR (FUHRMAN *et al.*, 1993; GIOVANNONI *et al.*, 1990). Todas essas estratégias de clonagem resultaram em bibliotecas de recombinantes na qual o fragmento de DNA ligado a vetores plasmidiais e inserido em células hospedeiras pode ser seqüenciado. Usando essas estratégias, microrganismos que nunca tinham sido identificados podem, então, ser classificados (MYZER *et al.*, 1996)

Assim, os ácidos nucléicos extraídos de diferentes comunidades microbianas são usados em diferentes estratégias moleculares para determinar a diversidade genética e identificar membros das comunidades. Depois de análises comparativas de seqüências “ambientais” com seqüências de microrganismo conhecidos, a afiliação filogenética de membros da comunidade pode ser inferida. A Figura 3.5 esquematiza algumas diferentes estratégias para se determinar a diversidade genética da população microbiana.

Outra estratégia para análise da diversidade está baseada na eletroforese de fragmentos de DNAr 16S, em gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear de agentes desnaturantes de DNA (DGGE) (MUYZER *et al.*, 1996). Para isso, fragmentos específicos de DNA têm que ser amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

Figura 3.5: Diagrama dando uma visão geral de diferentes métodos moleculares usados para determinar a diversidade de populações microbianas mistas (MUYZER *et al.*, 1996).

3.3 A Técnica de “Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE”

A técnica de DGGE ou eletroforese em gel com gradiente desnaturante foi originalmente desenvolvida e aplicada na pesquisa médica a fim de detectar, identificar e localizar mutações de ponto, naturais e induzidas (MYERS *et al.*, 1985), sendo uma das técnicas da Biologia Molecular que permite medir a diversidade de uma comunidade microbiana sem que para isso seja necessário cultivar as células. A técnica atinge um nível de resolução que permite separar fragmentos de DNA de mesmo comprimento com seqüências de nucleotídeos diferentes, e está baseada na mobilidade eletroforética de uma molécula de DNA parcialmente desnaturada em géis de poliacrilamida contendo gradiente linear de desnaturante (uréia e formamida). Devido a isso, pode-se detectar até 95% de todas as substituições em uma única base (nucleotídeo) entre as seqüências de até 500 pares de base de comprimento (VALLAEYS *et al.*, 1997).

Dentre as limitações da metodologia do DGGE encontram-se o custo do “primer” com “GC-clamp”, análise com até 500 pares de base, genes excepcionalmente ricos em GC não são facilmente analisados, o método envolve o uso de substâncias tóxicas como formamida e a coincidência nos domínios de dissociação de fragmentos diferentes de DNA com o mesmo número dos nucleotídeos A-T e C-G.

A técnica de DGGE vem sendo recentemente utilizada para estimar a diversidade genética de comunidades microbianas em diferentes ambientes, tais como biorreatores, amostras de sistemas aquáticos e sedimentos de fontes termais e outros ambientes extremos, bem como no estudo de bacterioplankton de água doce (MUYZER *et al.*, 1993; WAWER & MUYZER, 1995; TESKE *et al.*, 1996; KOWALCHUK *et al.*, 1997; HEUER *et al.*, 1997). Os procedimentos do DGGE proporcionam ainda a possibilidade de isolamento e seqüenciamento de bandas distintas, permitindo a análise filogenética dos membros da comunidade (MUYZER *et al.*, 1996).

Em um recente estudo, a distribuição e diversidade do Domínio *Archaea* foi investigada em um lago hipersalino, Lago Sola, na cidade de Sinai no Egito, com o emprego da técnica do DGGE de fragmentos de DNAr 16S amplificados (CYTRYN *et al.*, 2000). O seqüenciamento das bandas provenientes do DGGE demonstrou que a

comunidade de arqueas nesse ambiente foi dominada pelo gênero *Halobacterium* sp. Esses resultados demonstraram também que microrganismos pertencentes ao reino *Crenarchaeota*, que contém as arqueas redutoras de enxofre hipertermófilas, não foram encontrados na coluna d'água.

MAUKONEN & RATTO (2001) utilizaram a técnica do DGGE para monitorar a composição da comunidade microbiana em um reator de leito fluidizado redutor de sulfato, que era usado para tratar efluente contaminado por metais (Zn e Fe^{2+}) e sulfato. Dois reatores foram operados, um com etanol e outro com etileno-glicol, como doadores de elétrons. Os resultados mostraram que havia muitas linhagens bacterianas presentes em ambos os reatores e que a população do reator operando com etanol foi mais estável do que a do operado com etileno-glicol.

No Brasil, estudos (ROSADO *et al.*, 1997) empregaram a técnica do DGGE para avaliar a diversidade do gene *nifH* de linhagens isoladas de *Paenibacillum* spp. e organismos presentes em amostras de solo. Os impactos de diferentes tipos de manejos agrícolas na diversidade de bactérias do solo sob plantio direto foram analisados também com o auxílio da técnica do DGGE, como descrito por PEIXOTO *et al.* (1999).

PRANTERA *et al.* (1999) identificaram uma população capaz de degradar hidrocarbonetos de petróleo, realizando experimentos com a técnica de DGGE para avaliar a diversidade e a dinâmica de comunidades no solo. OLIVEIRA *et al.* (1999) utilizaram a metodologia do DGGE para desvendar a diversidade de linhagens *Rhizobium tropici* e *Rh. leguminosarum* diretamente do meio ambiente. Os resultados obtidos demonstraram que o uso de métodos diretos para extração de DNA, a amplificação da região espaçadora 16-23S do DNAr por PCR e DGGE demonstraram ser um método rápido e sensível para a caracterização e monitoramento da diversidade de *Rh. tropici* e *Rh. leguminosarum* no meio ambiente.

DUARTE *et al.* (2001) utilizaram a metodologia do PCR-DGGE, para verificar o efeito seletivo de hidrocarbonetos contendo enxofre na diversidade bacteriana de um solo. O resultado, obtido pela análise do DGGE, demonstrou uma diminuição no padrão de bandas com o aumento na concentração de óleo.

CATTONY (2001) utilizou a técnica do DGGE para verificar o efeito na queimada de cana de açúcar na diversidade microbiana do solo. Os resultados obtidos não revelaram alterações na estrutura da comunidade bacteriana do solo de canavial depois da queima.

A análise do DGGE de fragmentos do DNAr 16S amplificados por PCR foi utilizada para a investigação da diversidade bacteriana em sedimento contaminado do estuário da baixada santista (Santos-São Paulo). Análises preliminares do DGGE indicaram um alto número de bandas, resultando em uma alta diversidade de microrganismos presentes no sedimento contaminados, tornando difícil a visualização e comparação dos padrões de bandas obtidos no gel (PIZA & MANFIO, 2001).

Na literatura não foram encontrados trabalhos que avaliassem a diversidade de microrganismos degradadores de TCE, presentes em sedimentos de reservatório, utilizando a metodologia do DGGE. Dessa forma, a utilização da metodologia do DGGE para avaliar a diversidade microbiana degradadora de TCE presentes em sedimento de reservatórios é um trabalho pioneiro e apresenta uma ferramenta muito importante a fim de se verificar quantos e quais são os microrganismos que participam da degradação anaeróbia deste composto.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de sedimentos do Reservatório de Salto Grande, Município de Americana, Estado de São Paulo, foram coletadas e testadas em relação ao seu potencial de biodegradação anaeróbia do composto alifático organoclorado tricloroetileno (TCE). Além disso, a avaliação da diversidade microbiana presente nas amostras ao longo do período de incubação dos ensaios, conduzidos com fontes orgânicas específicas e na presença e ausência do TCE, foi realizada empregando-se exames microscópicos e a técnica molecular de eletroforese em gel com gradiente desnaturante – DGGE.

Os capítulos, a seguir, organizam e descrevem os procedimentos utilizados na coleta das amostras e nos experimentos realizados.

4.1 Coletas das amostras de sedimentos

As amostras de sedimentos foram coletadas no reservatório de Salto Grande, Região de Americana - Estado de São Paulo no dia de 6 de abril de 2000, aproximadamente às 15:00 h, empregando-se a draga de *Van veen*. As amostras foram acondicionadas em um recipiente plástico, previamente lavado com detergente Extran (5%) e transportadas ao laboratório para armazenamento sob refrigeração a 4°C.

Empregou-se a draga de *van Veen* nas amostragens pela falta de instrumentação mais apropriada na realização de coletas de sedimentos e estudos com microrganismos anaeróbios. Para isso, deve-se optar pelo uso de coletor tipo “core” que protege adequadamente os sedimentos do oxigênio e da entrada de água ao longo da retirada da amostra do sistema (MACKNIGHT & MUDROCH, 1994).

Os pontos de coleta foram escolhidos pela análise de resultados dos projetos de pesquisa em realização junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental (PG-SEA-CHREA-EESC-USP), que definem as condições eutróficas do reservatório de acordo com sua profundidade (CALIJURI *et al.*, 1999; FALCO, 2000). Assim, as amostras foram coletadas em 3 pontos ao longo do reservatório como anteriormente indicado e observados nas Figuras 3.1 e 3.2.

As variáveis abióticas nos três pontos escolhidos durante a realização da amostragem, tais como temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade, foram determinadas através do equipamento Horiba - modelo U-10. Dessa forma, o perfil das variáveis na coluna d'água foi obtido a cada 50 cm ao longo de 3 metros de profundidade e a cada metro após os primeiros 3 m de profundidade.

4.2 Composição e preparação de soluções e meios de cultivos para os ensaios de enriquecimento e biodegradação do TCE.

4.2.1 Meio de cultivo mineral basal (ZINDER & KOCH, 1984) e soluções complementares.

O meio de cultivo empregado no presente trabalho foi o de Zinder (ZINDER & KOCH, 1984), anteriormente utilizado por VAZOLLER (1995), SAKAMOTO (1996), LARIZZATTI (1997), OLIVEIRA (1998) e FATIBELLO (2001). O meio de cultura foi preparado em erlenmeyer de 2000 mL, e os componentes foram adicionados a 500mL de água Milli-Q previamente fervida, na ordem apresentada na Tabela 4.1 para compor inicialmente um meio mineral simples denominado meio basal. Após a dissolução e homogeneização dos reagentes, o volume do meio basal foi completado a 1000mL. A remoção de oxigênio foi feita pela introdução de fluxo de nitrogênio (100%) durante 30 minutos

As soluções estoque que compuseram o meio basal foram traço de metais e resazurina. A solução traço de metais foi preparada dissolvendo-se inicialmente 4,5g de NTA (ácido nitriloacético) em 200 mL de água Milli-Q. Elevou-se então o pH para 7 com uma solução de KOH 10% m/v e adicionou-se mais 600 mL de água Milli-Q. Em seguida dissolveu-se 0,556g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,086g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,170g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,210g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,190g de H_3BO_3 , 0,020g de NiCl_2 e 0,010g de Na_2MoO_4 . Após, o volume foi completado para 1L em um balão volumétrico, com água Milli-Q. A solução foi distribuída em frascos de 500mL sob fluxo de nitrogênio (100%),

mantidas nos frascos por 20 minutos. Estes foram então fechados sob anaerobiose, autoclavados e armazenados sob refrigeração.

A solução de resazurina 0,1% (m/v), indicadora do potencial de oxidação e redução do meio de cultivo, foi preparada pela dissolução de 0,1g desse corante em 100mL de água Milli-Q. A solução foi mantida sobre refrigeração em frasco âmbar.

Tabela 4.1: Composição do meio de cultivo Zinder

Componentes	
NH ₄ Cl	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
MgCl ₂ . 2 H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,05 g
Solução de resazurina 0,1%	1,0 mL
Solução traços de metais	10,0 mL
H ₂ O Milli-Q	q.s.p. 1000mL

Fonte: ZINDER & KOCH, 1984.

Quando o meio basal era utilizado, alíquotas das soluções estoques, previamente preparadas e estocadas sob anaerobiose, eram adicionadas. Porém, antes das adições, a atmosfera dos frascos com meio basal, de 100% nitrogênio, era obrigatoriamente substituída pela mistura gasosa de N₂/CO₂ (70:30). Para a introdução da mistura dos gases utilizou-se o filtro ACRODISC (0,22 µm) para evitar-se a contaminação do meio de cultivo esterilizado. Para manter a pressão dos reatores em 1 atm, os mesmos sofriam purga com o auxílio de agulhas estéreis.

A manutenção do valor de pH próximo a neutralidade foi feita pela adição de uma alíquota de solução estoque de bicarbonato de sódio 10% (m/v). Essa solução era previamente preparada dissolvendo-se 100 g do reagente em 1000 mL de água Milli-Q fervida por 15 minutos. Após o resfriamento da água à temperatura aproximadamente de 50°C, o bicarbonato de sódio era então acrescido, e a mistura submetida a fluxo de nitrogênio (100%) por 20 minutos, com auxílio de uma pipeta invertida. A solução era

esterilizada a frio em sistema Millipore, e o fluxo de nitrogênio era mantido até o término da distribuição de porções da solução em frascos de antibióticos de 50 mL previamente esterilizados. Os frascos eram armazenados em temperatura ambiente, sob ausência de luz.

A solução de vitaminas, adaptada de TOUZEL e ALBAGNAC apud VAZOLLER (1995), está descrita na Tabela 4.2. Sua preparação para estoque era feita acrescentando-se as vitaminas na ordem dada na Tabela 4.2 em 500 mL de água Milli-Q, previamente fervida durante 15 minutos. A solução era preparada após a temperatura da água atingir 30°C, sob fluxo de nitrogênio (100%), mantido por aproximadamente 20 minutos. O volume era então completado para 1000 mL. A solução era esterilizada em sistema Millipore e membrana de 0,22 µm de porosidade, sob fluxo de nitrogênio. A distribuição era realizada em frascos de soro de 250 mL previamente autoclavados também sob fluxo de nitrogênio. Os frascos eram cobertos com papel de alumínio e armazenados em geladeira.

Tabela 4.2: Composição da solução de vitaminas

Componentes	
Biotina	0,002g
Ácido fólico	0,002g
Tiamina.HCl	0,005g
Riboflavina	0,005g
Ácido nicotínico	0,005g
Pantentionato de cálcio	0,005g
Piridoxina.HCl	0,010g
Vitamina B ₁₂	0,0001g
Água Milli-Q	q.s.p. 1000mL

Fonte: Adaptada de TOUZEL e ALBAGNAC¹ apud VAZOLLER (1995).

¹ TOUZEL, J.P. & ALBAGNAC, G. (1983). Isolation and caractezation of *Methanococcus mazei* strain MC3. FEMS Microbiology Letters, 16: 241-245.

A solução de sulfeto de sódio ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) 5% (m/v), redutora do meio de cultivo, foi preparada pela dissolução de 5,0 g desse sal em 100 mL de água Milli-Q, previamente fervida e resfriada à temperatura de 40°C. O sal foi dissolvido e a solução foi homogeneizada e esterilizada em membrana 0,22 μm da Millipore, sob fluxo de nitrogênio (100%). A solução foi distribuída em pequenas alíquotas, em frascos de antibiótico de 50 mL, sob atmosfera de nitrogênio (100%) e mantida em temperatura ambiente.

As soluções das fontes de carbono acetato de sódio, formiato de sódio, lactato de sódio e etanol foram preparadas sob atmosfera de nitrogênio (100%), homogeneizando-se cada fonte individualmente em água Milli-Q, na concentração estoque de 2,0 moles/L. A solução de butirato de sódio foi preparada na concentração de 1 mol/L. Cada solução preparada era transferida para um erlenmeyer de 500 mL, sob fluxo de nitrogênio (100%) mantido por 20 minutos, e então, sob o mesmo fluxo de gás, era distribuída em frascos de antibiótico de 30mL. Os frascos eram lacrados, esterilizados por autoclavação por 20 minutos, a 120°C e 15 psi de pressão, e estocadas ao abrigo da luz.

As concentrações finais de cada fonte no meio de cultura basal e o volume adicionado estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Composição das soluções usadas na ativação do sedimento para volume útil de 500 mL de meio de cultivo.

Componentes	Volume adicionado	Concentração final
Meio Zinder	342,50 mL	-
Bicarbonato de sódio 10% m/v	5 mL	0,1 % m/v
Solução de vitamina	5 mL	-
Redutora de sulfeto de sódio 5% m/v	5 mL	0,05 m/v
Acetato de sódio 2M	5 mL	1640,6 mg/L
Glicose 1M	5 mL	1801,6 mg/L
Propionato de sódio 2M	5 mL	1920,6 mg/L
Butirato de sódio 1M	10 mL	2200,6 mg/L
Lactato de sódio 2M	5 mL	1120,6 mg/L
Sulfato de sódio 1M	5 mL	1420,4 mg/L
Metanol 2M	5 mL	320,4 mg/L
Extrato de levedura 2% m/v	2,5 mL	0,01% m/v
Inoculo	100 mL	8,2 g STV/L

4.2.2 Soluções estoques de TCE, 1,1 DCE e 1,2 DCE em metanol

As soluções estoques de TCE, 1,1 DCE e trans-1,2DCE utilizadas no ensaio de biodegradação e na confecção das curvas de calibração foram preparadas conforme os procedimentos descritos a seguir.

A solução estoque de TCE (marca Supelco) foi preparada transferindo-se 0,420 mL, correspondente a uma massa de 0,6164g desse organoclorado, para balão volumétrico de 10,0 mL contendo metanol grau HPLC (marca Mallinckrodt), o que resultou em concentração de 61,64g TCE/L. Em seguida, transferiu-se essa solução para frasco de antibiótico de 30 mL revestido com papel alumínio. O frasco foi fechado com batoque de butila revestido com Teflon[®], lacre de alumínio e armazenado a -20°C.

A solução estoque de 1,1DCE (marca Supelco) foi preparada transferindo-se 5,7µL de 1,1 DCE em 10 mL de metanol, correspondendo a massa de 7,0 mg deste composto, para balão volumétrico de 10,0 mL contendo metanol grau HPLC (Mallinckrodt), resultando em concentração de 700 mg de 1,1 DCE /L.

O mesmo procedimento foi utilizado para o preparo da solução estoque de *trans*1,2DCE (Supelco) quando 5,46µL de *trans*1,2 DCE, correspondendo a massa de 7,0 mg deste composto, foi diluído a 10,0 mL de metanol grau HPLC (Mallinckrodt), resultando em uma concentração de 700 mg de *trans*1,2 DCE /L. As soluções de 1,1 DCE e *trans* 1,2 DCE foram lacradas e armazenadas conforme descrito para as soluções de TCE.

A solução intermediária de TCE de concentração de 0,6164 g/L foi utilizada para o preparo das soluções padrões necessárias para as curvas de calibração.

As soluções padrão de TCE, 1,1 DCE e *trans*1,2 DCE utilizadas para a preparação das curvas de calibração foram acrescidas no meio de cultura Zinder completo, ou seja, o meio basal previamente tamponado, reduzido contendo todas as soluções complementares, vitaminas e fontes de carbono. As concentrações usadas de cada organoclorado para a preparação das curvas de calibração estão apresentadas nas representações gráficas colocadas em ANEXO 1.

4.2.3 Procedimento para determinação dos sólidos totais voláteis (STV)

As determinações dos Sólidos Totais Voláteis (STV) foram realizadas em triplicata no início e no final dos testes com TCE, com o intuito de avaliar as quantidades de biomassa das amostras. Os procedimentos foram de acordo com o Standards Methods (1985). O ANEXO 2 apresenta o roteiro utilizado nessas determinações.

4.2.4 Procedimento para ativação e enriquecimento do consórcio microbiano anaeróbio metanogênico

As amostras de sedimento coletadas no reservatório foram mantidas sob refrigeração por cerca 30 dias, após o que os sedimentos foram homogeneizados em conjunto, 50 mL de cada amostra.

A mistura dos sedimentos foi transferida para um béquer sob fluxo de N_2/CO_2 (70:30%), mantido por 20 minutos com o auxílio de uma pipeta de 10 mL invertida. Essa amostra constituiu-se do inoculo dos ensaios de enriquecimento, buscando-se ativar a metanogênese microbiana.

Dois frascos de Duram foram preparados (1 L de volume total) com meio basal acrescido das fontes complementares, como explicado no item 4.2.1. Inoculou-se 100 mL da amostra em 500 mL em meio de cultivo, sob fluxo dos gases N_2/CO_2 (70:30%) e em condições de assepsia. Os frascos reatores foram então fechados com rolha de borracha de butila e tampa de rosca, e incubados sob agitação a 150 rpm a 25°C. As condições para a manutenção da anaerobiose dos frascos foram as descritas no item anterior. A composição do meio de cultivo completo, considerando-se o meio basal acrescido de soluções estoque complementares, está apresentada na Tabela 4.3.

4.2.5 Procedimentos para o estudo da degradação anaeróbia do TCE

As culturas foram cultivadas em meio mineral basal Zinder, como descrito por LARIZZATTI (1997). Foram acrescidas fontes orgânicas como ácidos orgânicos e álcoois, além do TCE. As concentrações estudadas de TCE variaram de 6 a 12 mg/L. As condições de incubação foram realizadas sob anaerobiose estrita, e a atmosfera dos reatores foi composta pela mistura gasosa de nitrogênio e dióxido de carbono (70:30).

A velocidade média de consumo (V_c) foi utilizado para a comparação do consumo dos frascos contendo 6 e 12 mg/L. Para isso, fez-se o cálculo da diferença das concentrações iniciais e finais de TCE dos frascos reatores e dividiu-se esses valores pelo tempo de incubação em dias.

4.2.5.1 Condições dos ensaios.

Os ensaios sobre biodegradação do TCE foram realizados em frascos de vidro borossilicato (marca Duran) de volume igual a 500 mL, fechados com batoque de butila (com revestimento interno de teflon) e rosca de plástico perfurada centralmente, na qual fez-se passar um tubo de ensaio com abertura de frasco de antibiótico, cortado em sua outra extremidade. O tubo de ensaio, vazado em sua base, permitiu o contato com a atmosfera interna do frasco-reator, possibilitando as coletas de amostras como apresentado na Figura 4.1. O fechamento do tubo de ensaio foi feito com batoque de borracha Teflon® da marca Wheaton e lacre de alumínio. O volume total do meio de reação foi de 200 mL. Estão descritas, a seguir, as condições experimentais de cada sistema de reação, realizado em duplicata:

- 2 frascos-reatores com aproximadamente 180 mL de meio mineral basal, acrescidos de soluções de vitaminas, tampão e redutora, fontes orgânicas² [2 mM de cada ácido - acético, fórmico e láctico, 1 mM de ácido butírico, 2 mM de etanol e 2,3 mM de metanol], o TCE foi adicionado em uma concentração final de 12,5 mg/L de meio de reação, sendo o metanol o veículo de dissolução do composto halogenado; o inóculo foi de 5gSTV/L de meio de reação;
- 2 frascos-reatores com aproximadamente 180 mL de meio mineral basal, acrescidos de soluções de vitaminas, tampão e redutora, fontes orgânicas¹ [2 mM de cada ácido - acético, fórmico e láctico, 1 mM de ácido butírico, 2 mM de etanol e ,3 mM de metanol]; o TCE foi adicionado em uma concentração final de 6,25 mg/L de meio de reação, sendo o metanol o veículo de dissolução do composto halogenado, o inóculo foi de 5 gSTV/L de meio de reação;
- 2 frascos-reatores (controles sem inóculo) com aproximadamente 180 mL de meio mineral basal, acrescidos de soluções de vitaminas, tampão e redutora, fontes orgânicas¹ [2 mM de cada ácido - acético, fórmico e láctico, 1 mM de ácido butírico

² Os ácidos orgânicos foram adicionados como sais de sódio. Assim, as concentrações se referem aos sais acetato de sódio, formiato de sódio, butirato de sódio e lactato de sódio.

, 2 mM de etanol e 2,3mM de metanol]; o TCE será adicionado na concentração final de 12,5 mg/L;

- 2 frascos-reactores (controles sem TCE) com aproximadamente 180 mL de meio mineral basal, acrescidos de soluções de vitaminas, tampão e redutora, fontes orgânicas¹ [2 mM de cada ácido - acético, fórmico e láctico, 1 mM de ácido butírico, 2 mM de etanol e 2,3 mM de metanol]; os meios de cultivo foram inoculados com a concentração de 5 gSTV/L de meio de reação.

Os frascos foram acondicionados em sacos de pano escuros, a fim de proteger os meios de reação de possíveis efeitos de degradação fotoquímica dos compostos halogenados. Os frascos-reactores foram incubados sob agitação de 150 rpm e à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Figura 4.1: Frasco reator

4.2.5.2 Determinações cromatográficas

Foram realizadas análises cromatográficas para a detecção de gás metano, dos ácidos voláteis e dos cloroetenos (TCE, 1,1 DCE e 1,2 DCE). Os procedimentos

utilizados nas análises, assim como as condições operacionais dos cromatógrafos estão descritos a seguir.

4.2.5.2.1 Procedimentos para determinação cromatográfica do metano

O monitoramento de gás metano produzido pela atividade microbiana nos frascos reatores foi realizado por cromatografia a gás. O cromatógrafo utilizado foi da marca Gow-Mac, equipado com detector de condutividade térmica e colunas PORAPAK-Q (de análise) e PORAPAK-T (de referência), ambas com 2 metros de comprimento, 1/4" de diâmetro interno e 80 –100 mesh. O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste e o forno operou a 50°C.

Os frascos reatores eram retirados da incubadora com agitação e temperaturas controladas, sendo suas tampas flambadas com álcool etílico antes da amostragem feita com seringa. Amostras da atmosfera dos frascos-reatores eram retiradas em alíquotas de 500 µL, sem despressurização, com o auxílio de seringa Hamilton "gastight", com trava. Para as determinações da concentração do gás metano foram realizadas curvas de calibração (apresentadas no Anexo 3). O anexo 4 mostra exemplos de cromatogramas obtidos durante o experimento.

4.2.5.2.2 Procedimentos para a determinação cromatográfica dos ácidos orgânicos voláteis

As análises dos ácidos orgânicos foram feitas em cromatógrafo líquido de alta resolução da marca SHIMADZU, equipado com controlador SCL 10A, três bombas LC 10AD, um forno CTO 10A e um detector DIODE ARRAY DETECTOR em comprimento de onda de 210nm. Como fase estacionária, foi usada coluna Aminex HPX-87H BIO-RAD de exclusão iônica, com 300 x 7,8mm. O eluente utilizado na fase móvel foi a solução de H₂SO₄ 0,4mM, com fluxo de 0,600mL.min⁻¹. O volume de injeção foi de 20µL.

Sob condições de assepsia, foram coletadas duplicatas com 1,5 mL de cada amostra, acondicionadas em tubos de microcentrifugas a -20°C . Antes da extração, as amostras foram congeladas e centrifugadas a 2000 rpm por minuto. As etapas foram:

- filtrou-se a amostra em filtro Millipore de 13 mm de diâmetro e $0,45\ \mu\text{m}$;
- diluiu-se o filtrado para um volume igual da solução de H_2SO_4 0,5 mM;
- injetou-se a amostra usando-se pré-filtros de $0,45\ \mu\text{m}$ acoplados na seringa de injeção.

Os valores das concentrações dos ácidos apresentados em mg/L foram calculados por padronização externa, através de uma curva de calibração (apresenta no anexo 4). O anexo 5 mostra exemplos de cromatogramas obtidos durante o experimento.

4.2.5.2.3 Procedimentos para a determinação cromatográfica dos compostos clorados.

As quantidades de TCE, 1,1 DCE e 1,2 DCE nos frascos reatores foram determinadas na fase aquosa por cromatografia gasosa e na atmosfera livre dos frascos reatores, denominada “headspace”. A metodologia empregada foi àquela adotada no setor de cromatografia do Laboratório de Processos Biológicos (LPB) do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso HP5890 equipado com detector de captura de elétrons e coluna INNOWax (30 m de comprimento x $0,25\ \text{mm}$ de diâmetro interno x $0,25\ \mu\text{m}$ de espessura do filme), e foi operado sob as seguintes condições: - temperatura do injetor igual a 160°C ; - temperatura do detector igual a 260°C ; - temperatura inicial do forno igual a 40°C , por 4 minutos com de $25^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ até 200°C , mantida por 1 minuto. Como gás de arraste utilizou-se o hidrogênio (pressão na entrada da coluna igual a 15 psi) e como gás auxiliar, nitrogênio com fluxo igual a $60\ \text{mL}/\text{min}$.

A quantificação dos compostos organoclorados foi realizada através da técnica de amostragem do “headspace”, tanto para a fase líquida quanto para a de vapor (IOFFE & VITENBERG, 1984).

Para determinação das concentrações dos organoclorados na fase líquida [(a) – ver Figura 4.3] transferiu-se para frascos de antibiótico (com volumes internos iguais com pérolas de vidro, $d = 2,43 \text{ g/mL}$) alíquotas de 1,00 mL das amostras ou padrões fechando-os com tampas de butila revestidas com teflon e lacre de alumínio (Figura 4.2). Foi definido como padrão interno ideal uma solução de 50 μL diclorometano (solução estoque de 700 mg/L em metanol), depois de testes realizados com bromodiclorometano e dibromoclorometano.

Os frascos de antibiótico foram mantidos em banho-maria (55°C) por 30 minutos (tempo e temperatura definidos em testes previamente realizados para verificação do tempo para que os organoclorados atingissem o equilíbrio entre as fases líquida e gasosa, a 10 min, 20 min, 30min e 40 minutos e em temperaturas de 55°C e 100°C). Volumes de 500 μL do “headspace” dos frascos dos padrões e das amostras foram injetados no cromatógrafo, através de uma seringa Hamilton do tipo “gastight” com trava de 1000 μL .

Figura 4.2: Frasco antibiótico

Para a determinação das concentrações de TCE, 1,1 DCE e 1,2 DCE na fase gasosa [(b) – ver Figura 4.3], injetou-se um volume de 500 μL coletados do “headspace” dos frascos reatores.

As quantificações das concentrações de TCE e 1,1 DCE no “headspace” dos frascos reatores foram realizadas por método indireto. Em frascos de volumes idênticos aos dos reatores, contendo volumes idênticos de meio Zinder e de “headspace”, injetou-

se soluções de TCE e 1,1 DCE obtendo-se concentrações de 12,0, 8,0, 4,0, 2,0 e 1,0 mg/L. Os frascos fechados com batoques de butila revestidos com Teflon e lacrados com alumínio foram mantidos nas condições de temperatura do experimento (25°C), durante 2 horas (tempo determinado experimentalmente para estabilização das concentrações de equilíbrio entre as fases líquida e gasosa).

Então, amostras das fases líquida e gasosa de cada frasco foram analisadas, conforme (a) e (b), para quantificação dos organoclorados no “headspace”. As concentrações do “headspace” foram determinadas pelas diferenças entre as concentrações iniciais inoculadas do TCE e as concentrações encontradas na fase líquida. Por exemplo, colocou-se 12 mg de TCE/L em um frasco reator idêntico ao utilizado no experimento e esperou-se o tempo necessário para estabilização do composto nas mesmas condições do experimento de degradação. Após este tempo, alíquotas de 1,0 mL da fase líquida e de 500 µL da fase gasosa foram retiradas para a determinação das concentrações dos organoclorados neste meio, conforme (a) e (b). Os valores encontrados na fase aquosa foram subtraídos do total adicionado e o resultado foi associado à área cromatográfica referente à amostra na fase gasosa, quantificando, assim, o TCE que estava no “headspace” (c). A ilustração da Figura 4.5 esquematiza este exemplo.

$$(c) \text{ mg de Ocs (organoclorados, 1,1 DCE e TCE) no "headspace"} = x - y;$$

Figura 4.3: Esquema da determinação dos organoclorados (OCs) 1,1 DCE e TCE encontrados na fase gasosa, para um exemplo de um ponto da curva, de 12 mg de TCE /L.

As quantidades de TCE e 1,1 DCE encontradas no “headspace” dos frascos, que refletem as diferenças entre as concentrações iniciais e aquelas encontradas no líquido depois de atingir o equilíbrio líquido-vapor dos organoclorados, foram associadas às áreas cromatográficas dos (OCs) organoclorados (z) encontrados no “headspace”. Foram construídas curvas de calibração com diferentes concentrações de soluções (Anexo 8).

4.2.5.3 Procedimentos para os exames microscópicos

As observações sob microscopia foram realizadas para evidenciar a morfologia das células microbianas predominantes nas amostras após coleta e durante os experimentos. Os exames foram realizados com auxílio de um microscópio da marca Olympus, modelo BHT2, acoplado a um sistema de câmara Olympus, modelo U-PMTVC, nº 8C14730 e sistema analisador de imagem Optronix-CCD vídeo câmara system.

As amostras examinadas ao microscópio foram as do sedimento utilizado como inóculo e amostras do reator ao final do experimento de degradação do TCE. As amostras foram examinadas sob luz comum, contraste de fase e fluorescência. Para reduzir o movimento das células nas amostras, alíquotas foram dispostas em lâminas com ágar a 2% solidificado. As lâminas eram preparadas rapidamente, colocando uma alíquota das amostras sob o ágar solidificado e recoberto por uma lamínula (DSM, 1991).

4.2.5.4 Análise da diversidade microbiana das amostras de sedimentos por DGGE.

Para análise da diversidade microbiana das amostras do sedimento ativado para metanogênese, antes do contato com o TCE e dos frascos reatores depois do experimento de degradação do TCE, os procedimentos utilizados foram os seguintes:

- 1) Extraíu-se o DNA da comunidade bacteriana do sedimento ativado e dos frascos reatores após o término do experimento de degradação do TCE.
- 2) Procedeu-se ao PCR para amplificação de fragmentos do DNAr 16S usando “primers” para os Domínios *Bacteria* e *Archaea*;
- 3) O produto do PCR foi analisado através da técnica do DGGE;
- 4) A complexidade dos padrões de bandas obtida no DGGE foi observada com o auxílio de um transiluminador UV, e as bandas foram tomadas como uma medida da diversidade das comunidades.

4.2.5.4.1 Protocolo de extração de DNA

Foram testados dois diferentes protocolos para a extração do DNA a fim de verificar qual deles possuía a melhor eficiência de extração. Os protocolos testados foram os de MELVIN & HOBSON (1994) e de TSAI & OLSON (1991).

Para a extração de DNA das amostras, segundo o protocolo de MELVIN & HOBSON (1994), procedeu-se da seguinte forma:

1. Centrifugou-se 3,0 mL da amostra do sedimento ativado, lavou-se o *pellet* com tampão PBS (NaCl 8 g, KCl 0,2 g, KH_2PO_4 0,24 g, Na_2HPO_4 1,44 g, água q.s.p. 1000 mL, pH 7,4). Centrifugou-se o *pellet* por 2 min a 13.000 rpm e ressuspendeu-se o precipitado em 1,0 mL de tampão TESC pH 8,3 (Tris 10 mM; EDTA 1mM; NaCl 0,1 mM).
2. Congelou-se a amostra a (-70°C) por 2 horas (ou *overnight* a -20°C). Descongelou-se a amostra, centrifugou-se a mesma por 2 min, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 300 μL de tampão TESC. Adicionaram-se 5 μL de DMSO a esse volume. Manteve-se a amostra por 1 min à temperatura ambiente.
3. Homogeneizou-se a amostra usando vórtex por 3 a 5 min. Adicionaram-se 500 μL de guanidina tiocianato a 5 M e, em seguida, 500 μL de clorofórmio: álcool

iso-amílico (24:1, v/v). Agitou-se a mistura no vórtex e centrifugou-se a 13.000 rpm por 5 min.

4. Recuperou-se a fase aquosa e adicionaram-se 30 µL de acetato de sódio 3 M pH 5,0-6,0. Misturou-se e dividiu-se o volume em dois tubos. O DNA foi precipitado adicionando-se 2,5 volumes de etanol absoluto e agitando-se levemente.
5. Centrifugou-se a amostra por 10 min a 7.000 rpm.
6. Lavou-se o DNA com 300 µL de etanol 70% invertendo-se o tubo várias vezes. Centrifugou-se rapidamente e descartou-se o sobrenadante.
7. A amostra de DNA foi deixada secar na estufa à 37° C por 15 min.
8. Ressuspendeu-se o *pellet* em 50-100 µL de tampão TE pH 8,3 (10 mM Tris, 1mM EDTA) ou em água Milli-Q esterilizada
9. Procedeu-se à purificação do DNA utilizando-se o sistema Wizard DNA *Clean-Up* (Promega).

Para extração de DNA das amostras foi testado o protocolo de TSAI & OLSON (1991), como descrito a seguir:

- 1 Misturou-se 1,0 g de sedimento com 2,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,12M (pH 8,0), em tubo de centrifuga de 15,0 mL; agitou-se à 120-150 rpm por 15 minutos;
- 2 Centrifugou-se a mistura formada a 4020 Xg por 10 minutos; removeu-se o sobrenadante e descartou; lavar o pellet (sedimento) com 2mL de tampão fosfato de sódio 0,12M e agitou-se brevemente; centrifugou-se a 4020 Xg por 10 minutos; removeu -se o sobrenadante, que foi descartado.
- 3 Ressuspendeu-se o “pellet” em 2,0 mL de solução de lisozima [15,0 mg de lisozima/mL de uma solução de NaCl 0,15M + NaEDTA 0,1M à pH 8,0]; incubou-se em banho-maria à 37°C por 3h, agitou-se a mistura a intervalos de 20ª 30 minutos; colocou-se no gelo ao final do procedimento anterior;

- 4 Adicionou-se 2,0 mL de solução tampão lise [NaCl 0,1M + Tris HCl 0,5M à pH 8,0, e 10% de Dodecil Sulfato de Sódio]; misturou-se bem;
- 5 Submeteu-se a amostra a três ciclos de congelamento à -80°C (até congelar, aproximadamente 5 a 10 minutos), e de descongelamento em banho-maria à 65°C (10 minutos), intercalados; colocou-se no gelo ao final dos três ciclos;
- 6 Após os ciclos de congelamento e descongelamento, adicionou-se 2,0 mL de Tris-HCl 0,1M (pH 8,0) saturado com fenol e misturou-se brevemente no “vórtex” para se obter uma emulsão; centrifugou-se a mistura a 4020 Xg por 10 minutos;
- 7 Coletaram-se aproximadamente 3,0 mL do sobrenadante em novo tubo de 15 mL e adicionou-se 1,5 mL de Fenol e 1,5 mL da solução clorofórmio - álcool isoamílico (24:1); agitou-se brevemente e centrifugou-se a 4020 Xg por 10 minutos;
- 8 Transferiu-se 2,5 mL do sobrenadante para um novo tubo de 15 mL; adicionou-se 2,5 mL da solução clorofórmio – álcool isoamílico (24:1); agitou-se e centrifugou-se a 4020 Xg por 10 minuto;
- 9 Transferiu-se 2 mL da camada superior do sobrenadante para um novo tubo 15 mL;
- 10 Finalmente, precipitou-se o DNA extraído na fase aquosa (aproximadamente 2,0 mL) com 2,0 mL de isopropanol gelado (-20°C), agitou-se e incubou-se a -20°C por “overnight”;
- 11 Tomou-se uma alíquota de 1 mL da solução de DNA em “eppendorf”;
- 12 O “pellet” de DNA foi obtido por centrifugação da solução a 10.000 Xg, à 4°C por 10 minutos;
- 13 Ressuspendeu-se o “pellet” em 0,5 ml de etanol 75%;
- 14 Centrifugou-se a solução a 10.000 Xg por 10 minutos a 4°C ; removeu-se e descartou-se o sobrenadante;
- 15 Secou-se o “pellet” no ar seco por 15min;
- 16 Ressuspendeu-se o “pellet” em 100 μL de tampão TE e agitou-se no “vórtex”; guardou-se o DNA à -20°C .

Uma vez testados os diferentes protocolos, amostras do sedimento reativado antes da adição do TCE, denominada de inoculo (I) e dos frascos reatores no final do experimento contendo 6,25 (6I e 6II), 12,5 mg de TCE/L (12I e 12II) e controles sem TCE (CI e CII) foram coletadas e preservadas congeladas (-20°C) para a extração do DNA. Outras amostras dos frascos reatores foram estocadas no próprio frasco, sob refrigeração, após o fim do experimento. Essas amostras foram também usadas para a extração do DNA, empregando-se o protocolo de melhor extração.

4.2.5.4.2 Purificação do DNA

A amostras que apresentaram muitas impurezas necessitaram passar por um processo de purificação para não ocorrer interferência na amplificação do DNA. Os processos de purificação foram realizados como a seguir:

Etapa 1 - Precipitação com CsCl e Kac

- 1- Adicionou-se 0,1g de CsCl a 100 µL do extrato bruto;
- 2- Incubou-se a amostra de 1 a 3 h à temperatura ambiente;
- 3- Centrifugou-se a amostra por 20 min à velocidade máxima em microcentrífuga e à temperatura ambiente;
- 4- Recuperou-se o sobrenadante (~100µL) em um tubo de microcentrífuga;
- 5- Adicionou-se 400 µL de água Milli-Q e 300 µL de isopropanol ao sobrenadante;
- 6- Homogeneizou-se a solução, que foi incubada por pelo menos 5 min à temperatura ambiente;
- 7- Centrifugou-se a solução por 10 min à velocidade máxima em microcentrífuga à temperatura ambiente;
- 8- Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 100 µL de TE;
- 9- Adicionou-se 20 µL de uma solução de acetato de potássio 8 M à mistura;

- 10- Homogeneizou-se a mistura (gentilmente) e incubou-se por 15min à temperatura ambiente;
- 11- Centrifugou-se a nova amostra por 15 min à velocidade máxima e temperatura ambiente;
- 12- Recuperou-se o sobrenadante e adicionou-se 0,6 volume (75 µL) de isopropanol, homogeneizou-se e incubou-se por pelo menos 5 min à temperatura ambiente;
- 13- Centrifugou-se a amostra por 15 min à velocidade máxima e a temperatura ambiente;
- 14- Lavou-se o *pellet* uma vez com etanol 70% gelado.

Etapa 2 - Wizard DNA Clean-Up System

- 1- Removeu-se e colocou-se de lado o êmbolo de uma seringa descartável de 3 mL; e em seguida acoplou-se a extremidade da microcoluna à seringa
- 2- Misturou-se vigorosamente a resina Wizard DNA Clean-Up para dissolver quaisquer cristais;
- 3- Adicionou-se 1 mL da resina à um tubo de eppendorf; adicionou-se a amostra (100 µl) a resina e homogeneizou-se a mistura invertendo-se o tubo gentilmente várias vezes; pipetou-se a resina Wizard DNA Clean-Up contendo o DNA ligado para dentro da seringa; inseriu-se o embolo lentamente e empurrou-se gentilmente a mistura para dentro da mini-coluna com o embolo da seringa;
- 4- Desacoplou-se a seringa da minicoluna e removeu-se o embolo da seringa; acoplou-se a seringa novamente à mini-coluna;
- 5- Para lavar a coluna, adicionou-se a seringa 2 mL de isopropanol a 80%; inseriu-se o êmbolo e empurrou-se gentilmente a solução através da mini-coluna;
- 6- Removeu-se a seringa e transferiu-se a mini-coluna para um tubo de eppendorf; centrifugou-se a mini-coluna por 20 seg à velocidade máxima, em microcentrífuga, a fim de secar a resina;
- 7- Deixou-se a mini-coluna a temperatura ambiente por 5 a 15 min para evaporação do isopropanol;

- 8- Transferiu-se a mini-coluna para um outro tubo de eppendorf; adicionou-se 50 μ L de água ou tampão TE pré-aquecido (60°-70°C) à mini-coluna; esperou-se 5 min;
- 9- Centrifugou-se a mini-coluna por 20 seg, a 12000 xg para eluir o DNA ligado;
- 10- Repetiu-se apenas uma vez os passos 8 e 9;
- 11- Removeu-se e descartou-se a mini-coluna; o DNA purificado foi estocado a (-20°C).

O resultado do processo de extração foi verificado em gel de agarose 1% preparado com tampão TEB IX e corado com brometo de etídio. A quantificação do DNA extraído foi realizada em gel de agarose 1% por comparação com padrão de λ DNA em diferentes diluições.

4.2.5.4.3 Reação de Amplificação

As amostras de DNA purificadas foram amplificadas usando “primers” para o DNAr 16S dos Domínios *Bacteria* e *Archaea* de acordo com o seguinte procedimento:

Foi preparada uma mistura para reação com as concentrações finais de reagentes no sistema de acordo com as Tabelas 4.4 e 4.5, para os Domínios *Bacteria* e *Archaea*, respectivamente. (Métodos Moleculares para Caracterização da Diversidade Microbiano, curso FAT, 2000)

Tabela 4.4: Concentração final dos reagentes para a execução do PCR do Domínio *Bacteria*

Reagentes	Estoque	Concentração final por reação	Volume para reação de 50µL
Solução tampão da Taq *	10 X	1 X	5 µL
“Primer” 968f	20 µM	0,2 µM	0,5 µL
“Primer” 1401 r	20 µM	0,2 µM	0,5 µL
DNTP's	25 mM	200 µM	0,4 µL
Taq-polimerase	5 U/µL	2 U	0,4µL
DNA	--	50 a 100ng	--
H ₂ O	--	--	Qsp. 50 µL

Obs.:* Solução tampão da Taq 10X (100mM Tris-HCl (pH 8,6), 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 1% triton X-100).

Fonte: (Métodos Moleculares para Caracterização da Diversidade Microbiano, curso FAT, 2000).

Tabela 4.5: Concentração final dos reagentes para a execução do PCR do Domínio *Archaea*

Reagentes	Estoque	Concentração final por reação	Volume para reação de 50µL
Solução tampão da Taq *	10 X	1X	5µL
“Primer” 1100f	20µM	0,2µM	0,5µL
“Primer” 1400 r	20µM	0,2µM	0,5µL
DNTP's	25mM	200 µM	0,4µL
Taq-polimerase	5 U/µL	2U	0,4µL
DNA	--	50-100ng	--
H ₂ O	--	--	Qsp. 50µL

Obs.:* Solução tampão da Taq 10X (100mM Tris-HCl (pH 8,6), 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 1% triton X-100).

Fonte: (Métodos Moleculares para Caracterização da Diversidade Microbiano, curso FAT, 2000).

Foi preparada uma mistura de água e tampão. Após, acrescentou-se o dNTPs e em seguida os “primers”. Por último, acrescentou-se a enzima *Taq* polimerase e o DNA a ser amplificado. Como foram realizadas várias amplificações, foi preparada uma mistura contendo a enzima, que foi distribuída em alíquotas nos tubos de PCR contendo as amostras de DNA. Para manipulação das soluções estoque de “primers” foi necessário o uso de ponteiros com proteção de aerossóis, e as preparações foram feitas sob fluxo laminar.

Foram utilizados controles positivos e negativos para a reação de amplificação. Utilizou-se os espécies *Escherichia coli*, *Agrobacterium rhizobium*, *Pseudomonas fluorescence* e *Lactobacillus plantarva* como controles positivos para a amplificação de fragmentos do RNAr 16S para o domínio *Bacteria* e como controles negativos para as reações de amplificação do domínio *Archaea*. Estas cepas foram escolhidas por pertencerem a diferentes grupos do domínio *Bactéria*. As espécies *Methanosaeta* sp. e *Methanosarcina* sp. serviram como controles positivos para as reações de amplificação do Domínio *Archaea* e como negativo para o Domínio *Bacteria*.

- “Primers” do Domínio *Archaea* usados no PCR :

Os “primers” do Domínio *Archaea* foram específicos para amplificar a região do DNA entre as posições 1100 e 1400 do RNAr 16S. Esses primers foram desenhados segundo KUDO *et al.* (1997) e produzidos pela GIBCO/2000. Os autores se basearam nas seqüências do RNAr 16S de bactérias metanogênicas (existentes na base de dados do DNA – “DNA data base”). Assim:

Domínio *Archaea*:

Primer 1100 F (c/ GC clamp) : 5'gc.- AAC CGT CGA CAG TCA GGY AAC GAG CGAG 3'

Primer 1400R : 5' CGG CGA ATT CGT GCA AGG AGC AGG GAC 3'

Seqüência do GC clamp: 5' CGC CCG CCG CGC GCGGCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G

- Programa usado no PCR com os “primers” do Domínio *Archaea*:

-1 ciclo à temperatura de 94° C por 90 segundos seguido de 10 ciclos à: 94° C por 30 segundos., 61° C por 30 segundos (-0,5°C/ciclo) e 72° C por 90 segundos; 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 90 segundos. O último ciclo é seguido por 72° C por 180 segundos. Finalizando a 4°C. (Métodos Moleculares para caracterização da Diversidade Microbiana, curso FAT, 2000).

- “Primers” do Domínio *Bacteria* usados no PCR :

Os “primers” do Domínio *Bacteria* foram específicos para amplificar a região do DNA entre as posições 984 e 1378 do RNAr 16S. Esses primers foram desenhados segundo HEUER *et al.* (1997) e produzidos pela GIBCO/2000. Assim:

F984 GC (posições 968-984) e R1378 (posições 1378-1401)

984F com GC clamp: 5'gc. AAC GCG AAG AAC CTT AC

1378 R: 5' CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG

A sequência rica em G+C acoplada a extremidade 5' do primer serviu para impedir a completa desnaturação do fragmento de DNA durante a separação em gel de DGGE.

- Programa usado no PCR com os “primers” do Domínio *Bacteria*:

-1 ciclos à 94° C por 5 minutos; 10 ciclos à 94° C por 1 minuto (temperatura de anelamento) e 66° C por 30 segundos(-0,5°C/ ciclo) e 72°C por 2 min; depois 25 ciclos de 1 minuto à 94° C e 30 segundos à 60° C, e 2 minutos por 72°C; 1 ciclo de 72°C por 2 minutos e resfriamento a 4° C. (Métodos Moleculares para caracterização da Diversidade Microbiana, curso FAT, 2000)

As amplificações realizadas foram feitas com o uso de um termociclador “Gene Amp PCR System 2400” (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.). Foi confirmada a qualidade dos produtos do PCR em gel de agarose 1,4%, antes de proceder ao DGGE.

4.2.5.4.4 Técnica do DGGE

O resultado da amplificação do DNA das amostras do inóculo *in natura* e da amostra com TCE para os Domínios *Bacteria* e *Archaea* foram analisadas pela técnica do DGGE. Para isso confeccionou-se um “sanduíche” de gel gradiente desnaturante paralelo de desnaturação de 50 à 65%, no qual o gradiente é paralelo à direção do campo elétrico aplicado. Após a polimerização do gel foi realizada a montagem da cuba do tampão superior no tanque de eletroforese contendo tampão TE a 60°C. As amostras provenientes do PCR foram aplicadas nas canaletas com auxílio de ponteiros de seqüenciamento, e a eletroforese foi de 50V por 14 horas. Em seguida, foi feita a remoção do gel e coloração com SYBR Green I.

O procedimento detalhado de todos os passos do DGGE e a operacionalização do aparelho está nos Anexos 9.

4.2.5.4.5 Análise dos Géis do DGGE

Os géis foram fotografados com uma câmara Polaroid. As fotos foram registradas através de um “scanner” e gravadas em computador. A complexidade dos padrões de bandas obtidos no DGGE foi tomada como uma medida da diversidade da comunidade. Através dos diferentes padrões de migração das bandas, comparando-se a amostra do inóculo *in natura* com as bandas das amostras em TCE foi analisada a variação da diversidade dos Domínios *Archaea* e *Bacteria* ao longo da degradação do TCE.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características físico-químicas dos pontos de coleta do Reservatório de Salto Grande

A coleta dos sedimentos do reservatório de Salto Grande foi realizada com o auxílio da draga de *van Veen* nos 3 pontos previamente determinados, cujos critérios de escolha foram baseados nas condições eutróficas do sistema, segundo os trabalhos de CALIJURI *et al.* (1999) e FALCO (2000). Assim, as amostras foram obtidas em pontos cujas profundidades do reservatório eram de 6, 10 e 11 m com provável atividade anaeróbia. Observando-se novamente a Figura 3.1, as localizações por GPS dos pontos amostrados foram: - P1- S 22° 42.632', W 47° 15.961'; - P2 - S 22° 43.043', W 47° 14.733'; - P3 - S 22°43.662', W 47°14.024'.

Os resultados das determinações de oxigênio dissolvido na interface sedimento-água e na coluna d'água, assim como os valores de pH, condutividade, turbidez e temperatura dos pontos amostrados estão apresentados nas Tabelas 5.1, 5.2, 5.3. Os teores de oxigênio dissolvido, os valores de temperatura, pH e da condutividade térmica foram variáveis físico-químicas consideradas para a avaliação do metabolismo e estratificação do reservatório.

Nos pontos 1, 2 e 3, com profundidades de 11, 6 e 10 metros, respectivamente, os teores de oxigênio dissolvido na interface sedimento-líquido estiveram em torno de 0,98, 1,77 e 1,98 mgO₂/L. De acordo com DILLON & RIGLER (1975), deve-se considerar que a concentração de oxigênio no hipolímnio é um bom indicador das condições de oxigenação de um reservatório, e para sistemas de regiões temperadas os valores críticos para o fornecimento de água potável, por exemplo, são os estipulados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4: Valores dos teores de oxigênio dissolvido (mg/L) no hipolímnio que indicam a possibilidade de reservatórios temperados serem utilizados como abastecimento de água potável.

Concentração de O ₂ (mg/L)	Aptidão do reservatório
> 5	Excelente
< 5	Adequado
< 2	Impróprio

Fonte: DILLON & RIGLER (1975).

Um aumento nos níveis de oxigênio nas águas é fruto dos processos fotossintéticos do fitoplâncton, e sua redução é consequência do processo de decomposição da matéria orgânica dissolvida ou particulada, originária das vazões afluentes, liberadas pelo solo ou pela vegetação submersa. A falta de oxigênio (anoxia) perto do fundo é uma condição que afeta a qualidade das águas de um reservatório. (STRASKRABA & TUNDISI, 2000).

Embora os indicadores fornecidos na Tabela 5.4 sobre os teores de oxigênio dissolvido (mg/L) no hipolímnio para o abastecimento de água potável em reservatórios temperados também sejam válidos para sistemas tropicais é comum avaliar a potabilidade das águas mesmo sob condições pobres de oxigênio no hipolímnio, pois o desenvolvimento de condições de pouco oxigênio e/ou anoxia em um reservatório é muito mais freqüente em reservatórios tropicais que nos temperados. (STRASKRABA & TUNDISI, 2000).

Os valores de oxigênio dissolvido no hipolímnio no reservatório de Salto Grande não superaram 2 mg/L nos três pontos de coleta, portanto, as condições do sistema eram anóxicas. É comum o oxigênio tornar-se limitante nas camadas mais profundas próximas aos sedimentos em sistemas aquáticos, não somente pelo seu gradiente de difusão ao longo da coluna d'água em diferentes temperaturas, mas também devido a sua captura e utilização pelos organismos presentes no sistema. Além disso, uma maior disponibilidade de matéria orgânica depositada no fundo de um reservatório aumenta a demanda bioquímica de oxigênio pelos organismos (STRASKRABA & TUNDISI, 2000).

As estratificações constatadas na distribuição vertical do oxigênio dissolvido do reservatório foram acentuadas, principalmente nos pontos 1 e 3 com maiores profundidades, Tabelas 5.1 e 5.3. Os menores valores de oxigênio dissolvido foram resultantes de atividades bióticas e abióticas conseqüentes dos lançamentos de efluentes de origem doméstica e industrial nos recursos hídricos que alimentam o sistema, e que fazem parte da Bacia Hidrográfica do Piracicaba, Capivari e Atibaia – UGRHI 5 (SME, 1997).

As condições anóxicas desenvolvidas no sistema em estudo podem favorecer o crescimento de microrganismos anaeróbios, cuja intensa ação libera rapidamente metabólitos no meio contendo elementos como fósforo, ferro e manganês, além de gases como o sulfídrico e o metano, produzidos por bactérias redutoras de sulfato e arqueas metanogênicas, respectivamente (CARMOUZE, 1994). O que significa que este ambiente anóxico é um lugar propício para a presença de arqueas metanogênicas, um dos objetos de estudo do presente trabalho.

Os valores de pH na coluna d'água nos pontos de coleta são apresentados nas tabelas 5.1 a 5.3. Na superfície dos pontos de coletas 1, 2 e 3, os valores encontrados foram, respectivamente, 6,72, 6,64 e 6,8. O valor do pH no hipolímnio é geralmente mais baixo, e está relacionado com a profundidade. Os resultados obtidos demonstraram a existência de uma pequena estratificação nos pontos mais profundos (1 e 3) e nenhuma estratificação no ponto 2 (6 metros de profundidade). Em nenhum dos pontos amostrados, os valores de pH foram inferiores a 6,0, seja na coluna d'água ou no hipolímnio, o que indicou a inexistência de processos de acidificação do meio.

A condutividade da água no Ponto 3 foi em média de 188 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para os 3 primeiros metros da coluna d'água, atingindo 185 $\mu\text{S}/\text{cm}$ no hipolímnio (Tabela 5.3). No Ponto 2, a condutividade foi em média de 176 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ao longo da coluna d'água (Tabela 5.2). No Ponto 1, constatou-se um valor médio de condutividade em torno de 171 $\mu\text{S}/\text{cm}$ nos três primeiros metros e 182 $\mu\text{S}/\text{cm}$ na interface sedimento – água (Tabela 5.1). Segundo BARRETO (1999), a condutividade elétrica pode ser utilizada para detectar indícios de poluição, embora não discrimine a natureza dos elementos geradores dos valores indicadores. Em geral, no Reservatório de Salto Grande, como

observado nas Tabelas 5.1 a 5.3, os valores de condutividade tenderam a diminuir em direção à barragem (Ponto 1), o que pode ser devido aos processos de auto-depuração da represa. ARANTES JUNIOR, (2000) detectou uma diminuição dos valores da condutividade das águas em direção a barragem, na represa de Salto Grande no mesmo período no ano de 1997 e associou este fato com o processo de auto-depuração da represa.

Os valores das temperaturas da coluna d'água durante a coleta dos sedimentos estão mostrados nas Tabelas 5.1, 5.2, e 5.3. As estratificações térmicas foram menos acentuadas que as de oxigênio, sendo mais comum o decréscimo gradual da temperatura em direção ao fundo. As temperaturas encontradas na interface sedimento-água nos pontos 1, 2 e 3 foram, respectivamente, 23,8, 24,5 e 24,6°C. Esses valores nortearam a temperatura de incubação escolhida durante a realização dos experimentos de degradação do TCE, 25°C.

A turbidez, diminuição da transparência d'água em razão da matéria orgânica, no ponto 1 apresentou um valor constante nos primeiros 3 metros em torno de 5 NTU e chegando a 15 NTU na interface sedimento - água. No ponto 2, os valores encontrados foram homogêneos no eixo vertical, em torno de 5 NTU. O ponto 3 apresentou uma variação de 0 a 5,0 NTU. Tendo em vista a redução da fotossíntese das algas pela turbidez, é provável que este seja o parâmetro mais importante dentro da hierarquia de fatores que limitam a produção e o crescimento do fitoplâncton, afetando consequentemente, toda a comunidade biológica aquática (CARMOUZE, 1994).

Tabela 5.1: Valores das determinações físico-químicas no Ponto 1 (S 22° 42.632', W 47° 15.961') do Reservatório de Salto Grande.

Profundidade (m)	pH	Condutividade (μ S/cm)	Turbidez (NTU)	OD ¹ (mg/L)	Temperatura (°C)
0,0	6,72	170	5	3,99	24,90
0,5	6,71	171	5	4,03	25,10
1,0	6,68	171	5	3,47	24,80
1,5	6,66	171	6	3,08	24,50
2,0	6,64	171	6	2,87	24,40
2,5	6,62	171	6	2,79	24,40
3,0	6,62	172	5	2,70	24,40
4,0	6,60	177	9	2,68	24,30
5,0	6,60	178	12	2,74	24,30
6,0	6,54	176	10	2,20	24,10
7,0	6,45	173	9	1,84	24,00
8,0	6,43	174	8	1,43	24,00
9,0	6,41	176	10	1,11	23,90
10,0	6,40	179	11	1,12	23,90
11,0	6,38	182	15	0,98	23,80

¹ OD = Oxigênio dissolvido.

Tabela 5.2: Valores das determinações físico-químicas no Ponto 2 (S 22° 43.043', W 47° 14.733') do Reservatório de Salto Grande.

Profundidade (m)	pH	Condutividade (μ S/cm)	Turbidez (NTU)	OD ¹ (mg/L)	Temperatura (°C)
0,0	6,64	176	5	3,57	25,10
0,5	6,65	176	9	3,54	24,90
1,0	6,66	176	4	3	24,70
1,5	6,65	176	5	3,11	24,60
2,0	6,65	177	3	2,98	24,60
2,5	6,65	175	5	3,01	24,60
3,0	6,67	177	2	2,98	24,60
4,0	6,66	177	3	2,88	24,60
5,0	6,66	176	5	2,77	24,60
6,0	6,60	176	5	1,77	24,50

¹ OD = Oxigênio dissolvido.

Tabela 5.3: Valores das determinações físico-químicas no Ponto 3 (- S 22°43.662', W 47°14.024') do Reservatório de Salto Grande.

Profundidade (m)	pH	Condutividade (μ S/cm)	Turbidez (NTU)	OD ¹ (mg/L)	Temperatura (°C)
0,0	6,82	188	0	6,32	25,30
0,5	6,89	188	3	6,33	25,30
1,0	6,89	188	1	5,95	25,30
1,5	6,84	188	5	4,97	25,10
2,0	6,77	188	0	3,52	25,00
2,5	6,71	188	1	3,42	25,00
3,0	6,71	188	5	3,68	25,00
4,0	6,68	187	0	3,35	24,90
5,0	6,66	187	0	3,45	24,80
6,0	6,68	187	0	2,74	24,70
7,0	6,59	187	0	2,57	24,70
8,0	6,54	187	0	2,21	24,60
9,0	6,51	187	0	2	24,60
10,0	6,49	186	0	2,21	24,60
11,0	6,47	185	0	1,98	24,50

¹OD = Oxigênio dissolvido.

A eutrofização em sistemas aquáticos é um termo que tem sido usado em diferentes contextos, por muitos autores para explicar o enriquecimento das águas. Muitos autores concordam que a produtividade é diretamente proporcional ao aumento nas concentrações de nutrientes. Para alguns, a eutrofização é causada pelo aumento nas concentrações de fósforo e nitrogênio, enquanto que outros a associam a adição de matéria orgânica no lago. Entretanto, é consenso que, o aumento da atividade atrópica na bacia hidrográfica acelera a eutrofização. (CALIJURI, *et. al.*, 1999)

Os valores obtidos no Reservatório de Salto Grande por este trabalho, juntamente com os obtidos por CALIJURI *et. al.*, (1999) e FALCO, (2000) caracterizaram o sistema como hipereutrófico, sendo que, ao considerar a condutividade como uma medida de detecção de fontes poluidoras como mencionado por ESTEVES (1988), o sistema pode ser considerado como impróprio para o abastecimento público, uma vez que os valores obtidos caracterizam uma água imprópria para o tratamento convencional, como estabelecido pela CETESB *apud* MONTICELI & MARTINS (1993).

Os resultados físicos-químicos demonstraram um ambiente propício para o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios, uma vez que o reservatório apresenta

condições anóxicas no hipolímnio devido à presença de alto índice de matéria orgânica diariamente introduzida no sistema. Esse fato, aliado a uma contínua introdução de efluentes industriais, faz desse reservatório um sistema adequado para o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios com possível potencial para a degradação dos compostos, considerados recalcitrantes, tais como organoclorados alifáticos e halogenados.

5.2 Ativação metanogênica dos microrganismos presentes nos sedimentos coletados – enriquecimento e sub-cultivos.

Os ensaios de enriquecimento das culturas metanogênicas foram realizados com o objetivo de avaliar a presença de alguns grupos microbianos no sedimento do reservatório de Salto Grande. Optou-se por estudar em conjunto as amostras de sedimento coletadas nos três diferentes pontos, em relação a ativação metanogênica e degradação do TCE.

O cultivo de 100 mL do sedimento em meio mineral Zinder, (400mL) acrescido de glicose (10mM), lactato de sódio (10mM), sulfato de sódio (10mM), acetato de sódio (20mM), propionato de sódio (20 mM), butirato de sódio (20mM), metanol (10mM) e extrato de levedura 0,01% (m/v) foi monitorado por cerca 75 dias, através da determinação cromatográfica do gás metano na atmosfera do frasco de reação, como pode ser visto na Tabela 5.5. Após 21 dias de tempo de incubação, observou-se um aumento relevante de metano, atingindo 65%. Valores superiores, da ordem de 69%, foram determinados após 75 dias de incubação.

Alíquotas oriundas do primeiro enriquecimento foram sub-cultivadas em dois frascos de reação nas mesmas condições anteriores, e as porcentagens de metano na atmosfera dos frascos- reatores atingiram aproximadamente 50% de metano com 7 dias de incubação, a 25°C e sob agitação constante de 150 rpm. A tabela 5.6 e o anexo 4 mostram os valores das áreas encontradas e exemplos de cromatogramas das determinações gasosas.

FATIBELLO (2001), ao realizar ensaios de enriquecimento sob condições semelhantes às empregadas no presente estudo, porém determinando a atividade metanogênica mesofílica de sedimentos da represa oligotrófica do Lobo (Broa), verificou no primeiro enriquecimento que em 40 dias de incubação a porcentagem de metano atingiu 60% na atmosfera dos frascos.

Foi verificado que os valores das porcentagens relativas de metano, Tabela 5.6, ao longo do enriquecimento nos dois frascos aumentaram em função das alimentações realizadas com as fontes de carbono glicose (3mM), lactato de sódio (3mM), acetato de sódio (6mM), propionato de sódio (6mM), butirato de sódio (6mM), metanol (3mM), além da adição de extrato de levedura e de sulfato de sódio (3mM). As adições de fontes orgânicas e do sal de sulfato foram realizadas para manter e estimular a atividade metanogênica. Na Tabela 5.6 observam-se, em negrito, os valores de metano nos dias posteriores às alimentações. A massa celular enriquecida nesses dois sistemas foi então empregada no estudo de degradação do TCE.

Tabela 5.5 Valores de metano em % ao longo do primeiro enriquecimento dos microrganismos presentes nos sedimentos.

Tempo (d)	CH₄ (%)
4	1,0
6	3,0
7	4,0
11	11
12	15
13	22
18	53
20	61
21	65
22	65
26	67
28	68
33	68
42	67
48	74
62	73
67	71
68	71
75	69

Tabela 5.6 Valores de metano na atmosfera dos frascos-reactores 1 e 2, ao longo dos sub-cultivos das amostras enriquecidas. Os períodos das alimentações durante o enriquecimento estão marcados em negrito.

Frasco 1		Frasco 2	
Tempo (d)	CH ₄ (%)	Tempo (d)	CH ₄ (%)
4	30	4	29
7	51	7	48
8	53	8	52
12	53	12	55
19	52	19	56
21	51	21	56
22	51	22	56
27	52	27	56
40	50	40	52
41	50	41	51
42	50	42	51
46	56	46	54
47	57	47	54
48	58	48	55
54	68	54	65
60	66	60	70
63	62	63	68
67	54	67	67
78	46	78	67
89	42	89	68
103	59	103	65
111	56	111	71
117	57	117	69

Os resultados obtidos, de acordo com a Tabela 5.6, demonstraram que os microrganismos presentes no sedimento do reservatório de Salto Grande converteram a matéria orgânica adicionada ao meio a metano. A natureza da gênese do metano em etapas a partir de compostos orgânicos complexos de ocorrência semelhantes em sistemas naturais de água doce e biodigestores tecnológicos, mostra a importância das interações microbianas que buscam evitar o acúmulo de ácidos orgânicos e álcoois no meio em fermentação (ZINDER, 1993). Os organismos envolvidos na metanogênese apresentam um alto grau de especialização metabólica. A eficiência do processo

anaeróbio depende do sincronismo entre as diversas espécies microbianas. Assim, os intermediários metabólicos de um grupo de microrganismos podem servir como nutrientes para o metabolismo de outras espécies (VAZOLLER, 1996).

A produção relativa de metano em torno de 60% pode ser relacionada ao consórcio microbiano metanogênico metabolicamente ativo nos sedimentos estudados. Essa condição foi o critério para que os ensaios de degradação do TCE iniciassem, ou seja, as células fossem submetidas à adição dos cloroetenos.

5.3 Exames microscópicos das amostras enriquecidas.

Os exames microscópicos do inóculo foram realizados após o ensaio inicial de enriquecimento dos sedimentos. Observaram-se morfologias diversas de metanogênicas do Domínio *Archaea*, sob microscopia de fluorescência. Algumas metanogênicas, notadamente *Methanosarcina* sp., *Methanosaeta* sp. e *Methanospirillum* sp., têm suas morfologias distintas e podem ser identificadas em amostras naturais usando microscopia de contraste de fase (ZINDER, 1993). A microscopia de epifluorescência é um poderoso método no estudo da ecologia das metanogênicas. Muitas metanogênicas contêm altas concentrações do transportador de elétrons F_{420} e quando submetidas à luz violeta, com 420 nm de comprimento de onda, emitem fluorescência verde azulada. Tem-se relatado a existência deste cofator em bactérias, mas não em alta concentração que permitam a auto-fluorescência (GORRIS & VAN DER DRIFT, 1986 ¹apud ZINDER, 1993).

Apesar dos níveis de F_{420} serem altos nas metanogênicas, o gênero *Methanosaeta* sp. normalmente não possui concentrações elevadas e, portanto, não fluorescem (ZINDER et al., 1987). Então, a presença de bacilos formadores de filamentos não fluorescentes nas amostras pode ser relacionada a células metanogênicas. O exame sob microscopia de fluorescência tem sido utilizado para a identificação qualitativa de metanogênicas em amostras ambientais (VOGUEL et al., 1980; ZINDER et al., 1984;

¹ GORRIS, L. G. M.; and VAN DER DRIFT. (1986). Methanogenic cofactors in pure culture of methanogens in relation to substrate utilization. In: Biology of anaerobic bacteria, H. C. Doubourgier et al. (eds), pp. 144-150. Elsevier Science Publisher, Amsterdam.

FATIBELLO, 2001). A interferência de material fluorescente em amostras ambiental, como fibras de celulose, pode causar dificuldades na detecção de células auto-fluorescentes (ZINDER, 1993).

Nas amostras estudadas destacaram-se cocos fluorescentes, bacilos com cerca de 5 μm de comprimento, bacilos delgados pequenos, bacilos relacionados ao gênero *Methanospirillum* sp. e sarcinas ao gênero *Methanosarcina* sp. Sob microscopia óptica comum e de contraste de fase, verificaram-se morfologias semelhantes aos gêneros *Methanosaeta* sp. Também foram observados bacilos não fluorescentes, espessos e retos com aproximadamente 10 μm em comprimento, bacilos não fluorescentes com extremidades arredondadas e bacilos esporulados. As fotomicrografias apresentadas nas Figuras 5.1 mostram as morfologias encontradas.

Figura 5.1. Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e epifluorescência, referentes às amostras do inoculo: a) agrupamentos de células em forma de cocos e sarcina; b) Filamentos e cistos fluorescentes relacionados com metanogênicas; c) amostra proveniente do reservatório de Salto Grande; d e e) microrganismos semelhantes a *Methanosarcina*; f) cocos fluorescentes.

5.4 Ensaios da Biodegradação Anaeróbia Metanogênica do TCE.

5.4.1 Acompanhamento da degradação anaeróbia metanogênica do TCE.

A determinação das concentrações de sólidos totais voláteis (STV) das amostras provenientes do ensaio de ativação da metanogênese foi feita em triplicata no início do estudo de biodegradação do TCE. A finalidade foi calcular a quantidade de TCE a ser adicionada de modo a manter-se uma faixa de relação inicial entre 1 e 2,5 mgTCE/gSTV. A média de STV nos sedimentos ativados foi de 9,0 g/L ($\pm 0,94$). O inóculo dos frascos-reactores constituiu-se de alíquotas de 110 mL em reatores com volumes finais de meio de reação iguais a 200 mL. Assim, a quantidade de sólidos (STV) inoculado aos sistemas para estudo da biodegradação anaeróbia do TCE foi igual a 4,95 gSTV/L. As relações para os reatores com 6,25 mgTCE/L e 12,5 mgTCE/L foram, respectivamente, de 1,25 e 2,5 mgTCE/gSTV.

As Tabelas 5.7 e 5.8 apresentam os valores dos organoclorados (TCE e 1,1 DCE) encontrados nas fases líquida e gasosa dos frascos controles sem inóculo T (CT) e V (CV), ao longo de 56 dias do ensaio de degradação anaeróbia do TCE, sob condições mesofílicas. São indicados valores totais de TCE, que é a somatória deste composto presente na fase líquida e gasosa devido à alta volatilidade apresentada por este composto, como explicado no Anexo 10. A Figura 5.2 e 5.3 representa graficamente os valores da Tabela 5.7 e 5.8, respectivamente.

Apenas, recordando, as duplicatas dos reatores foram denominadas por: - 6I e 6II, para os frascos com 6,25mg de TCE/L; - 12I e 12II, para os frascos com 12,5 mg de TCE/L; CT e CV, para os frascos controles sem inóculo; - CI e CII, para os frascos controles sem TCE.

Tabela 5.7: Valores das concentrações dos compostos organoclorados TCE e 1,1DCE nas fases líquidas e gasosa no frasco-reator CT.

Tempo (d)	TCE líquido (mg/L)	TCE gasosa (mg/L)	TCE total (mg/L)	1,1 DCE líquido (mg/L)	1,1 DCE gasosa (mg/L)	1,1 DCE total (mg/L)
5	3,4	6,4	9,8	0,355	0,0188	0,3738
14	3,1	6,1	9,2	Nd	0,00087	0,00087
27	3,7	5,7	9,4	Nd	0,001546	0,001546
37	2,6	7,2	9,8	Nd	0,00077	0,00077
46	3,0	8,0	11,0	Nd	0,0012	0,0012
56	3,1	7,1	10,2	Nd	0,0007	0,0007

() = valores calculados; Nd = Não detectável.

Figura 5.2: Representação gráfica dos valores das concentrações de TCE e 1,1DCE nas fases líquida e gasosa no reator Controle T.

Figura 5.3: Representação gráfica dos valores das concentrações de TCE e 1,1DCE nas fases líquida e gasosa no reator Controle V.

Tabela 5.8: Valores das concentrações dos compostos organoclorados TCE e 1,1DCE nas fases líquida e gasosa no frasco-reator CV.

Tempo (d)	TCE-líquido (mg/L)	TCE-gasosa (mg/L)	TCE Total (mg/L)	1,1DCE-líquido (mg/L)	1,1DCE-gasosa (mg/L)	1,1 DCE Total (mg/L)
-	5,1	(6,9)	(12)	Nd	Nd	Nd
5	2,5	5,0	7,5	0,724	0,0188	0,7428
14	2,9	4,8	7,7	Nd	Nd	Nd
27	3,2	4,7	7,9	Nd	0,0005	0,0005
37	2,5	7,4	9,9	Nd	0,00085	0,00085
46	2,7	7,1	9,8	Nd	0,0014	0,0014
56	2,1	6,6	8,7	Nd	0,0006	0,0006

() = valores calculados; Nd = Não detectável.

Os frascos CT e CV não foram inoculados com a finalidade de verificar a ocorrência de degradação abiótica do composto TCE. A concentração de TCE inicialmente calculada e adicionada aos sistemas CT e CV foi de 12,5 mg/L, porém de

acordo com as análises cromatográficas, cerca de 4,39 mg/L (36,5%) e 5,14 mg/L (41,1%) estavam presentes na fase aquosa, e 8,11 mg/L (63,4%) e 6,86 mg/L (58,9%) na fase gasosa, respectivamente. A opção para amostragens nas duas fases a fim de determinar os compostos etenos clorados considerou a aplicação da Lei de Henry (GOSSET, 1987), que estima que apenas 39% do TCE adicionado em sistemas de reação fechados estarão presentes na fase líquida. A concentração do TCE encontrada na fase líquida neste trabalho foi em torno de 38,8% do total inicialmente adicionado. Esse resultado não difere da estimativa da Lei de Henry e se aproxima daqueles comentados por WACKETT e GIBSON (1988), que ao estudarem a degradação de TCE, na concentração inicial de 10,5 mg/L, por *Pseudomonas putida* F1 a 30°C, detectaram na fase inicial 30% do composto na fase líquida.

As determinações cromatográficas do TCE nas fases líquida e gasosa tornaram-se obrigatórias para o acompanhamento dos ensaios de degradação. Além disso, mostra a real quantidade inicialmente disponível para as atividades das células microbianas.

Os valores totais medidos de TCE revelaram a existência de degradação abiótica nas condições de ensaio no período considerado. Assim, esses valores variaram entre 9,13 e 10,92 mg/L, em média 9,88 mg/L ($\pm 0,64$), para o frasco CT, revelando uma diferença de 20,92% em relação à concentração teórica inoculada. No frasco CV, os valores variaram de 7,57 a 9,93 mg/L, em média de 8,62 mg/L ($\pm 1,05$) com uma diferença de 31,0% em relação à concentração teórica inoculada. Portanto, o valor da degradação abiótica será considerado como sendo a média dos valores encontrados nos frascos CT (20,9%) e CV (31,0%), ou seja, 26%. Essas diferenças, em ambos os frascos controle, podem estar relacionadas à perda do TCE por volatilização durante a montagem dos experimentos e ao erro experimental devido às análises cromatográficas, em geral, em torno de 10 a 15% (CAUSON, 1997). Apesar do TCE ser adicionado com o sistema de reação fechado e sob anaerobiose, é possível a ocorrência de perda inicial por volatilização. Outro ponto a ser levado em conta é a determinação da presença de 0,355 e 0,724 mg/L de 1,1 DCE nas fases líquidas e de 0,0188 mg/L de 1,1 DCE nas fases gasosas, nos reatores CT e CV, respectivamente, o que confirma a degradação do TCE, sob condições abióticas, nos primeiros dias do experimento. Nos demais dias, as

amostragens revelaram traços de 1,1 DCE nas fases gasosas, como se observa na Tabelas 5.7 e 5.8, o que poderia ser relacionada também a uma atividade abiótica.

A redução do composto TCE em um meio aquoso devida à presença de luz, como citado no INDEX MERCK (1996), é comum. Nos experimentos realizados, os frascos-reatores foram protegidos da luz, pois eram envolvidos em “sacos” escuros. No entanto, as tomadas de amostras e a preparação prévia das mesmas (aquecimento em banho-maria em frascos de antibiótico claros) eram feitas sob luz ambiente.

BRADLEY & CHAPELLE (1999) estudaram a degradação abiótica dos compostos TCE e DCE e verificaram que após 10 dias de incubação, partindo de uma concentração inicial de 20 µg/L, houve 25% de degradação química desse composto. FATIBELLO (2001) realizou estudos sobre a degradação do TCE em condições semelhantes ao do presente estudo, e verificou, após 48 dias de incubação, a existência de 23% de redução abiótica do composto no meio. A porcentagem de degradação química encontrada no presente trabalho, 26%, foi próxima às comentadas por FATIBELLO (2001) e BRADLEY & CHAPELLE (1999).

Analisando-se as curvas de degradação do TCE obtidas para os reatores 6I e 6II, nas concentrações iniciais de 6,25 mg/L (Tabelas 5.9 e 5.10 Figuras 5.4 e 5.5), pode-se constatar que cerca de 94% do TCE foram degradados em ambos os sistemas de reação, durante os 56 dias de ensaio.

Os resultados comparados com os dos reatores controles CT e CV corroboram com a afirmação de existência de atividade microbiana nos reatores. Se a degradação abiótica correspondeu a 26,0%, então, pode-se afirmar que aproximadamente 68% do TCE desapareceu, no mesmo período de tempo, devido à atividade microbiana. As concentrações dos intermediários medidos no 5º e 14º dias de experimento, respectivamente, foram de 0,355 e 0,335 mg 1,1DCE/L para o reator 6I e 0,23 e 0,325 mg 1,1DCE/L para o reator 6II. Não houve formação de 1,2 DCE nas amostras analisadas.

Tabela 5.9: Valores das concentrações dos compostos organoclorados TCE e 1,1DCE nas fases líquida e gasosa no frasco-reator 6I.

Tempo (d)	TCE líquido (mg/L)	TCE gasosa (mg/L)	TCE Total (mg/L)	1,1 DCE líquido (mg/L)	1,1 DCE gasosa (mg/L)	1,1 DCE Total (mg/L)
-	/	/	(6,25)	Nd	Nd	Nd
5	1,3	2,6	3,9	0,355	0,0021	0,3571
14	1,0	1,7	2,7	0,335	0,00589	0,3409
27	0,8	1,0	1,8	0,0013	0,001655	0,00295
37	0,46	0,6	1,06	Nd	0,00175	0,00175
46	0,2	0,4	0,6	Nd	0,0019	0,0019
56	0,1	0,26	0,36	Nd	0,0152	0,0152

/ = amostra não determinada devido ao inadequado tempo de estabilização do composto; () = valores calculados; Nd= Não detectável.

Figura 5.4: Representação gráfica dos valores das concentrações de TCE e 1,1DCE nas fases líquida e gasosa no frasco-reator 6I.

Tabela 5.10: Valores das concentrações dos compostos organoclorados TCE e 1,1DCE nas fases líquida e gasosa no frasco-reator 6II.

Tempo (d)	TCE líquido (mg/L)	TCE gasosa (mg/L)	TCE Total (mg/L)	1,1 DCE líquido (mg/L)	1,1 DCE gasosa (mg/L)	1,1 DCE Total (mg/L)
0	1,46	(4,79)	(6,25)	Nd	Nd	Nd
5	0,99	2,06	3,05	0,23	0,0017	0,2317
14	0,89	1,215	2,105	0,325	0,00186	0,3268
27	0,736	0,618	1,354	0,0169	0,00118	0,0180
37	0,353	0,349	0,702	Nd	0,00096	0,00096
46	0,102	0,235	0,337	Nd	0,0009	0,0009
56	0,084	0,263	0,347	Nd	0,0152	0,0152

() = valores calculados; Nd= Não detectável

Figura 5.5: Representação gráfica dos valores das concentrações de TCE e 1,1DCE nas fases líquida gasosa no frasco-reator 6II.

O cálculo do V_c , ou seja, a velocidade média de consumo do TCE no meio foi igual a 0,105 mgTCE/L/d para ambos os sistemas 6I e 6II, indicando sistemas biológicos em duplicata operados sob condições muito semelhantes.

No reator 12I com concentração inicial de 12,5mg de TCE/L verificou-se no tempo zero que 3,19 mgTCE/L se encontrava na fase líquida do sistema (Tabela 5.11 e

Figura 5.6). Devido a este fato, a determinação do TCE na fase gasosa passou a ser realizada a partir do 5º dia de experimento. Após 56 dias de incubação, a concentração de TCE na fase líquida estava em torno de 0,153 mg/L e na fase gasosa de 0,524 mgTCE/L. Assim, 0,677 mgTCE/L ainda restava no sistema de reação 12I e, portanto, a degradação do composto foi em torno de 95%. Comparando-se esse resultado com os obtidos com os reatores controles é possível afirmar a existência da degradação biótica em torno de 69% no reator 12I.

O aparecimento de 0,401 mg 1,1DCE/L na fase líquida do reator 12I foi verificado no 5º dia de experimento e após 14 dias de incubação a concentração dessa substância estava em torno de 0,343 mg/L. No 27º dia, a concentração do TCE estava em torno 0,018 mg/L, como se observa na Tabela 5.10, não sendo mais detectada até o final do experimento na fase líquida. A concentração de 1,1 DCE na fase gasosa foi em torno de 7,7 µg/L no 5º dia de experimento, aumentando para 14,67 µg/L no 14º dia e decrescendo à concentração de 7,0 e 6,3 µg/L nos 27º e 37º dia, respectivamente. A concentração dessa substância na fase gasosa aumentou durante períodos do experimento, de 28,42 µg/L no 46º dia para 48,14 µg/L no 56º dia de amostragem, sugerindo que esse composto foi um intermediário metabólico na degradação do TCE. O composto 1,2 DCE não foi detectado no sistema de reação 12I.

O reator 12II apresentou uma porcentagem de degradação do TCE em torno de 88%, após 56 dias de incubação (Tabela 5.12 e Figura 5.7). A concentração de TCE na fase líquida decaiu de 3,25 mg/L, no 5º dia de experimento, para 0,350 mg/L ao final do ensaio. A concentração desta substância na fase gasosa apresentou um decréscimo de 4,68 para 1,147 mg/L, do 5º dia de amostragem para o final do ensaio. Comparando-se esse resultado com os obtidos no reator CT, a degradação biótica foi calculada em torno de 62%. O composto 1,1 DCE apareceu na fase líquida do reator na concentração de 0,525 mg/L no 5º dia de experimento, diminuindo para 0,365 mg/L, no 14º dia, e 0,0394 mg/L, no 27º dia de incubação. Nos outros dias de amostragem não se detectou esse composto na fase líquida (Tabela 5.12). Na fase gasosa, o 1,1 DCE apareceu no 5º dia de experimento na concentração de 9,8 µg/L, aumentando para 29,39 e 48,0 µg/L após os

14^o e 56^o dias de incubação, respectivamente. O composto 1,2 DCE não foi detectado no sistema de reação.

O cálculo do Vc indicou valores de velocidade média de consumo do TCE da ordem de 0,211 e 0,196 mgTCE/L/dia, respectivamente para os sistemas 12I e 12II. Esses valores comparados com os obtidos nos sistemas 6I e 6II demonstraram que ao dobrar a concentração de TCE no meio de cultivo, de 6,25 para 12,5 mg/L, a velocidade média do consumo do TCE também dobrou, de 0,105 para 0,196 e 0,211 mg TCE/L/dia.

Os resultados de Vc demonstram que a relação entre TCE/STV foi adequada para as duas concentrações de TCE estudadas. Com o aumento da velocidade de consumo quando uma concentração mais elevada do composto foi utilizada, mantendo-se a mesma quantidade de inóculo em massa (4,95 gSTV/L) e de doadores de elétrons, poder-se-á supor uma disposição ainda superior dos microrganismos presentes no sedimento do reservatório de Salto Grande em degradar maiores concentrações de TCE.

Tabela 5.11: Valores das concentrações dos compostos organoclorados TCE e 1,1DCE nas fases líquidas e gasosa no frasco-reator 12I.

Tempo (d)	TCE líquido (mg/L)	TCE gasosa (mg/L)	TCE Total (mg/L)	1,1 DCE líquido (mg/L)	1,1 DCE gasosa (mg/L)	1,1 DCE Total (mg/L)
-	3,2	(9,3)	(12,5)	Nd	Nd	Nd
5	2,04	4,16	6,2	0,401	0,0077	0,4087
14	1,36	2,82	4,18	0,343	0,01467	0,3576
27	1,22	1,76	2,98	0,018	0,007039	0,0250
37	0,65	1,2	1,85	Nd	0,00633	0,00633
46	0,43	1,27	1,70	Nd	0,0284	0,0284
56	0,15	0,52	0,67	Nd	0,0481	0,0481

() = valores calculados; Nd= Não detectável.

Figura 5.6: Representação gráfica dos valores das concentrações de TCE e 1,1DCE nas fases líquida e gasosa no frasco-reator 12I.

Tabela 5.12: Valores das concentrações dos compostos organoclorados TCE e 1,1DCE nas fases líquidas e gasosa no frasco-reator 12II.

Tempo (d)	TCE líquido (mg/L)	TCE gasosa (mg/L)	TCE Total (mg/L)	1,1 DCE líquido (mg/L)	1,1 DCE gasosa (mg/L)	1,1 DCE Total (mg/L)
-	/	/	(12,5)	/	/	/
5	3,25	4,68	7,93	0,525	0,0098	0,535
14	1,8	4,36	6,16	0,365	0,02939	0,394
27	1,77	3,13	4,9	0,0394	0,023	0,062
37	0,96	2,27	3,23	Nd	0,0209	0,020
46	0,76	1,151	1,911	Nd	0,0229	0,0229
56	0,35	1,147	1,497	Nd	0,048	0,048

/ = amostra não determinada devido ao inadequado tempo de estabilização do composto; () = valores calculados; Nd= Não detectável

Figura 5.7: Representação gráfica dos valores das concentrações de TCE e 1,1DCE nas fases líquida e gasosa no frasco-reator 12II.

5.4.2 Produção de metano e consumo de ácidos orgânicos durante a degradação anaeróbia metanogênica do TCE

A Figura 5.8 apresenta os valores das porcentagens relativas de metano em relação às áreas totais de cada cromatograma presentes no biogás nos reatores 6I e 6II; 12I e 12II; CI e CII ao longo do tempo. No Anexo 10 encontram-se os valores tabelados.

Figura 5.8: Representação gráfica dos valores relativos de metano, em porcentagens às áreas cromatográficas totais de biogás encontradas nos reatores 6I e 6II, 12I e 12II e controles sem TCE, CI e CII.

Os reatores apresentaram o mesmo comportamento com relação à produção de metano até o 38º dia de experimento. A partir dessa data, os reatores 12I e 12II apresentaram teores superiores de metano em relação aos reatores controle CI e CII e aos reatores 6I e 6II. Ao final do experimento, a porcentagem total de metano no biogás nos reatores 12I e 12II foi em torno de 49%, enquanto que nos demais reatores foi ligeiramente inferior, 45 %.

As relações do consumo de ácidos orgânicos voláteis e a produção de metano ao longo da degradação do TCE serão discutidos a seguir, considerando-se os valores de remoção dos compostos organoclorados mostrados no item anterior 5.4.1. Os valores dos ácidos orgânicos medidos nos 5, 14, 27, 37, 46 e 56º dias de incubação foram determinados por análises cromatográficas e os valores iniciais de ácidos, bem como os referentes às realimentações são valores teóricos.

O estudo da velocidade de degradação do TCE é dificilmente interpretado devido às incertezas na determinação da concentração disponível no meio aquoso para as

células microbianas ao longo do experimento (WACKETT & GIBSON, 1988). Frente a essa dificuldade, no presente estudo, as remoções do TCE em porcentagem nas fases aquosa e gasosa foram consideradas para a discussão. Seria comum levar em conta os valores de TCE na fase aquosa em função de que a troca de nutrientes entre as células e o meio se dá em solução, porém os resultados obtidos sugerem que o equilíbrio do TCE entre as duas fases foi rápido o suficiente para permitir a utilização total do composto pelos microrganismos. A atmosfera livre (“headspace”) do frasco reator “serviu” como armazenamento do TCE. Claramente, a oxidação do TCE na fase líquida resultou em um re-equilíbrio entre a fase gasosa e líquida do sistema.

A Tabela 5.13 e a Figura 5.9 apresentam as concentrações dos ácidos orgânicos acético, fórmico, butírico e láctico ao longo do ensaio no reator CV (ausência de inóculo) contendo 12,5 mgTCE/L, durante o período de incubação de 56 dias. Como pode ser observado na Figura 5.9, as concentrações dos ácidos orgânicos permaneceram constantes e, portanto, não houve degradação.

Tabela 5.13: Concentrações dos ácidos orgânicos voláteis no reator CV sem inóculo.

Tempo (d)	Acético (mg/L)	Fórmico (mg/L)	Butírico (mg/L)	Lático (mg/L)
5	122	101	230	118
14	115	100	230	105
27	120	101	230	114
37	119	101	220	101
46	116	99	221	100
56	126	113	229	127

Figura 5.9: Representação gráfica das concentrações dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator CV na ausência de inóculo.

As Figuras 5.10 e 5.11 apresentam as variações das concentrações dos ácidos orgânicos voláteis nos reatores 6I e 6II, assim como as produções de metano ao longo do experimento (consideradas na Figura 5.8). No 5º dia de experimento detectaram-se as concentrações de 180 e 232 mg/L de ácido acético, verificando-se um aumento na concentração desse ácido no período, da ordem de 61 e 112 mg/L, respectivamente aos mesmos reatores. Constatou-se que os ácidos fórmico (92 mg/L) e butírico (88 mg/L) nessa fase já haviam sido consumidos e menores quantidades de ácido láctico (9 mg/L) estavam presentes em ambos os reatores. A porcentagem do gás metano foi determinada em torno de 16%. No 14º dia de experimento, o ácido acético não foi mais encontrado no meio de reação e o metano atingiu 23% na atmosfera gasosa de ambos os frascos. Entre o 12º e o 27º dias de incubação, a porcentagem do gás metano estabilizou-se em aproximadamente 23%. Concomitantemente, observou-se (Tabelas 5.9 e 5.10 e Figuras

5.4 e 5.5) a redução do TCE nos reatores 6I e 6II. A porcentagem de remoção do TCE do 5º ao 14º dia de incubação foi de 30% e do 14º ao 27º foi de 35% nos dois reatores, quando se constatou a estabilização na produção de metano, e a necessidade de alimentação dos sistemas em ambos os sistemas. A redução dos ácidos orgânicos orientou a realização de uma realimentação dos reatores no 29º dia, em um terço das concentrações iniciais de ácidos orgânicos e álcoois (51 mg/L de ácido acético, 39 mg/L de ácido fórmico, 37 mg/L de ácido butírico, 76 mg/L de ácido láctico, 29,24 mg/L de metanol e 39,25 mg/L de etanol), buscando-se manter as reações favoráveis a metanogênese do sistema e um conseqüente equilíbrio para a redução do TCE nas condições estudadas. A adição dos compostos orgânicos resultou no estímulo à produção do metano (Figura 5.8) e ao consumo do TCE da ordem de 37% e 48%, considerando-se o intervalo entre o 27º e o 37º dias de incubação para os reatores 6I e 6II, respectivamente. Nesse sentido, a carga orgânica inicial, ácidos orgânicos e álcoois, disponível nos dois sistemas (valores das Tabelas 5.14 e 5.15 para os ácidos e 165 mg/L de metanol e etanol) promoveu a remoção do TCE em cerca 70% nos dois sistemas, sob metanogênese, em 27 dias de incubação. Já, a alimentação nos reatores realizada no 29º dia mostra a manutenção da atividade do consórcio metanogênico com remoção do TCE residual (1,77 mg/L) em 10 dias de experimento, em torno de 42%.

A partir desse período, as duas outras alimentações efetuadas (indicadas pelas setas da Figura 5.8) nos 38º e 47º dias de incubação, a primeira com um terço das concentrações iniciais de ácidos orgânicos e álcoois e a segunda com os mesmos valores inicialmente empregados, resultaram em porcentagens de remoções do TCE remanescente da ordem de 44 e 52% para os reatores 6I e 6II em 9 dias de incubação, e de 40% para o reator 6I ao final do experimento (Figuras 5.4 e 5.5), após 10 dias. Os teores de TCE no reator 6II indicam consumo total do composto. O metano foi determinado nas duas adições efetuadas (Figura 5.8), em valores sempre superiores.

As alimentações foram sempre efetuadas em função da verificação da estabilização dos valores de metano na atmosfera dos frascos-reatores e o decréscimo dos ácidos orgânicos.

Na terceira alimentação, notou-se os acréscimos de 255 e 237 mg/L nas concentrações de ácido acético, respectivamente para os reatores 6I e 6II, após dois dias da realimentação. No mesmo período, os ácidos fórmico, butírico e láctico foram quase totalmente consumidos (Figuras 5.10 e 5.11). No 56º dia de incubação, o ácido acético foi totalmente consumido e a produção de metano foi da ordem de 45% nos dois reatores. O valor remanescente de TCE nessa condição foi de 0,369 mgTCE/L para o reator 6I. No reator 6II a adição de orgânicos não levou ao consumo de 0,337 mgTCE/L, como indicado pelo valor final medido (Tabela 5.10).

Estes resultados demonstraram o rápido consumo dos ácidos orgânicos pelos microrganismos, ou seja, após 14 dias da primeira adição os ácidos não estiveram presentes no meio de reação. Apesar das concentrações de TCE utilizadas (6,25 mg/L) serem bem menores do que as outras fontes orgânicas ácidas (884 mg/L) e álcoois (484 mg/L) adicionadas ao longo do ensaio, como substrato primário e co-substrato ao TCE, ocorreu redução do TCE com a formação de intermediários metabólicos (Tabelas 5.9 e 5.10 e Figuras 5.4 e 5.5). A porcentagem de remoção biológica do TCE nesses dois reatores atingiu 75% com formação de intermediários como o 1,1 DCE.

Alguns trabalhos são citados na literatura sobre a degradação do TCE por consórcios microbianos oriundos de sedimentos. FATIBELLO (2001) realizou ensaios com sedimento de Represa do Lobo (Broa) a fim de estudar a degradação a 25°C do TCE na concentração de 2,1 mg/L, mantendo uma relação de 5 mgTCE/gSTV. As amostras foram cultivadas em meio de cultivo mineral Zinder (ZINDER & KOCH, 1984) acrescido das fontes de carbono acetato de sódio, butirato de sódio, lactato de sódio, formiato de sódio, metanol e etanol. Após 48 dias de incubação, verificou-se a ocorrência de 79% de degradação biótica do TCE. Cabe salientar, que a dosagem de TCE não foi feita de modo a considerar a volatilização desse composto para a atmosfera dos frascos de reação, e que os mesmos eram sempre despressurizados, o que certamente afetou a fração dosada apenas no meio aquoso, o que comprometeria as porcentagens relativas totais de remoção do TCE. Interessante, contudo, notar que o sedimento estudado foi oriundo de um sistema considerado oligotrófico em relação ao reservatório

de Salto Grande, mas que apresentou atividade metabólica metanogênica e remoção de TCE.

Em outro estudo sobre a degradação do TCE (4,8 mg/L) e cis-DCE (1,2 mg/L) presentes em um aquífero monitorado durante 568 dias, ELLIS *et al.* (2000) verificaram após 269 dias de incubação, que 80% do TCE foi transformado em cis-1,2 DCE. Para isso, foi necessária a adição de uma cultura mista e intermediários como cloreto de vinila e eteno apareceram nas águas subterrâneas. Após 509 dias de experimento, os compostos TCE e cis-1,2DCE foram completamente degradados.

Estudos realizados por BRADLEY & CHAPELLE (1999) sobre a biodegradação do TCE empregando-se sedimentos aquáticos foram conduzidos sob condições metanogênicas, em que a detecção radiométrica de ^{14}C do TCE foi utilizada para verificação dos produtos de sua degradação. Os resultados obtidos demonstraram que eteno, etano, dióxido de carbono e metano foram resultantes da degradação do TCE.

Tabela 5.14: Valores das concentrações dos ácidos orgânicos voláteis e porcentagem de metano no frasco- reator 6I, contendo 6,25 mg/L de TCE.

Tempo (d)	Acético (mg/L)	Fórmico (mg/L)	Butírico (mg/L)	Lático (mg/L)	Metano (%)
0	120	92	88	180	-
5	180	0	1	9	16
14	1	0	0	19	24
27	3	0	0	0	24
29	51	39	37	76	24
37	4	2	9	0	30
38	52	40	38	77	30
46	2	0	0	0	35
50	131	100	96	197	36
52	386	0	0	1	40
56	3	0	0	0	45

Figura 5.10: Representação gráfica dos valores das concentrações dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) e porcentagem de metano no biogás do frasco-reator 6I.

Tabela 5.15: Valores das concentrações dos ácidos orgânicos voláteis e porcentagem de metano no frasco- reator 6II, contendo 6,25 mg/L de TCE.

Tempo (d)	Acético (mg/L)	Fórmico (mg/L)	Butírico (mg/L)	Lático (mg/L)	Metano (%)
0	120	92	88	180	0
5	232	0	0	15	16
14	1	0	1	2	23
27	4	0	0	0	23
29	51	39	37	76	23
37	0	0	0	1	30
38	52	40	38	77	30
46	2	0	0	0	35
50	131	100	96	197	35
52	369	0	0	1	40
56	3	0	0	0	45

Figura 5.11: Representação gráfica dos valores das concentrações dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) e porcentagem de metano no biogás do frasco-reator 6II.

As Figuras 5.12 e 5.13 apresentam variações das concentrações dos ácidos orgânicos voláteis nos reatores 12I e 12II, assim como a produção de metano ao longo do experimento. No 5º dia de experimento detectaram-se as concentrações de 193 e 224 mg/L de ácido acético, verificando um aumento desse ácido no período, da ordem de 73 e 104 mg/L, respectivamente aos mesmos reatores. Constatou-se que os ácidos fórmico (92 mg/L), butírico (88 mg/L) e láctico (180 mg/L) haviam sido consumidos em ambos os reatores. A porcentagem do gás metano foi determinada em torno de 5%.

Tabela 5.16: Valores das concentrações (mg/L) dos ácidos orgânicos voláteis e porcentagem de metano no frasco-reator 12I, contendo 12,5 mg/L de TCE.

Tempo (d)	Acético (mg/L)	Fórmico (mg/L)	Butírico (mg/L)	Lático (mg/L)	Metano (%)
Inicial	120	92	88	180	0
5	193	0	0	3	5
14	0	0	0	0	24
27	0	0	0	0	24
29	51	39	37	76	25
37	3	0	0	0	33
38	52	40	38	77	33
46	2	0	0	0	39
50	131	100	96	197	39
52	423	0	0	1	44
56	2	0	0	1	49

Figura 5.12: Representação gráfica dos valores das concentrações dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) e porcentagem de metano no biogás do frasco-reator 12I.

No 14º dia de experimento, o ácido acético não foi mais encontrado no meio de reação e o metano atingiu 24% na atmosfera gasosa de ambos os frascos reatores. Entre o 14º e o 27º dias de incubação, a porcentagem do gás metano estabilizou-se em 23%, e

se manteve nesse patamar até o 29º dia. Concomitantemente, observou-se (Tabelas 5.16 e 5.17 e Figuras 5.12 e 5.13) a redução do TCE nos reatores 12I e 12II. A porcentagem de remoção do TCE do 5º ao 14º dia de incubação foi de 32,5 e 22,3% e entre o 14º e o 27º dia foi de 28,5 e 20,4% para os reatores 12I e 12II, respectivamente, quando se contatou a estabilização na produção de metano, e a necessidade de alimentação em ambos os sistemas. A redução dos ácidos orgânicos orientou a realização de uma realimentação dos reatores no 29º dia, em um terço das concentrações iniciais de ácidos orgânicos e álcoois (51 mg/L de ácidos acético, 39 mg/L de ácido fórmico, 37mg/L de ácido butírico, 76 mg/L de ácido láctico, 29 mg/L de metanol e 39 mg/L de etanol), buscando-se manter as reações favoráveis a metanogênese do sistema e conseqüente equilíbrio para a redução do TCE nas condições estudadas. A adição dos compostos orgânicos resultou no estímulo à produção do metano (Figura 5.8) e ao consumo do TCE da ordem de 38 e 34%, considerando-se o intervalo entre o 27º e o 37º dias de incubação para os reatores 12I e 12II, respectivamente. Nesse sentido, a carga orgânica inicial, ácidos orgânicos e álcoois, disponíveis nos dois sistemas (valores da Tabela 5.6 e 5.17 para os ácidos e 165 mg/L de metanol e etanol) promoveram a remoção de cerca de 76 e 60%, nos reatores 12I e 12II, respectivamente, sob metanogênese, em 27 dias de incubação. Já a alimentação nos reatores realizada no 29º dia mostrou a manutenção da atividade do consórcio metanogênico com remoção do TCE residual (2,9 e 4,9 mg/L) em 10 dias de experimento, em torno de 38 e 34 %, para os reatores 12I e 12II, respectivamente.

A partir desse período, as duas outras alimentações efetuadas (indicadas pelas setas da Figura 5.12 e 5.13) nos 38º e 47º dias de incubação, a primeira com um terço das concentrações iniciais de ácidos orgânicos e álcoois e a segunda com os mesmos valores inicialmente empregados, resultando em porcentagens de remoção do TCE remanescente da ordem de 41 e 8% para os reatores 12I e 12II em 9 dias de incubação, e de 21 e 60% párea os mesmos reatores ao final do experimento (Figuras 5.12 e 5.13), após 10 dias. O metano foi determinado nas duas adições efetuadas, em valores sempre superiores.

As alimentações foram sempre efetuadas em função da verificação da estabilização dos valores de metano na atmosfera dos frascos-reatores e o decréscimo dos ácidos-orgânicos.

Na terceira realimentação, notou-se o acréscimo de 292 e 271 mg/L nas concentrações de ácido acético, respectivamente para os reatores 12I e 12II, após dois dias da realimentação. No mesmo período os ácidos fórmico, láctico e butírico foram quase totalmente consumidos (Figuras 5.12 e 5.13). No 56º dia de incubação, o ácido acético foi totalmente consumido e a produção de metano foi da ordem de 49% nos dois reatores. O valor remanescente de TCE nessa condição foi de 0,67 e 1,49 mg/L, para os reatores 12I e 12II, respectivamente.

Estes resultados demonstraram novamente um rápido consumo dos ácidos orgânicos pelos microrganismos, após 14 dias da primeira adição, os ácidos não estiveram significativamente presentes no meio de reação. Apesar das concentrações de TCE utilizadas (12,5 mg/L) serem maiores que as dos experimentos anteriores (com 6,25 mg/L), estas ainda são relativamente menores do que as fontes orgânicas ácidas (884 mg/L) e álcoois (484 mg/L) adicionados ao longo do ensaio, ocorreu redução do TCE com a formação de intermediários metabólicos (Tabelas 5.11 e 5.12 e Figuras 5.6 e 5.7). A porcentagem de remoção biológica do TCE atingiu 75% e 68%, nos reatores 12 I e 12 II, respectivamente, ocorrendo à formação de intermediários como o 1,1 DCE.

Os resultados alcançados demonstram o comportamento parecido da metanogênese e remoção do TCE. Ou seja, quando os ácidos orgânicos foram consumidos, estabilizou-se a produção de metano no sistema e ocorreu redução na remoção do TCE. Alguns estudos (FATHEPURE & BOYD, 1988 a,b) propuseram um esquema hipotético ligando a metanogênese com a desalogenação reductiva do TCE, como mostrado na Figura 2 do capítulo Revisão da Literatura. Os autores (opt. cit.) relataram essa associação metabólica entre a desalogenação do PCE e o consumo de substrato metanogênico pela ação da espécie *Methanosarcina* sp. linhagem DCM. Foi demonstrado que o padrão da formação de metano coincidiu com o padrão da desalogenação do PCE. De fato, a incubação desta linhagem em metanol com 3 mg/L de PCE indicou clara correlação entre a concentração de doadores de elétrons adicionados

como substratos primários e o acúmulo de metano e TCE como metabólitos (FATHEPURE & BOYD, 1988a).

Algumas bactérias catalisam a desalogenação redutiva por um processo cometabólico, enquanto outras desalogenam os organoclorados por um processo respiratório (HOLLIGER, 1992; MONH & TIEDJE 1992). No processo de cometabolismo, a desalogenação não está ligada com a conservação de energia e essa acontece por uma reação secundária por certos sistemas enzimáticos. Já a desalogenação redutiva, realizada por algumas culturas bacterianas que crescem na presença de hidrogênio molecular, formiato e acetato como doadores de elétrons e compostos halogenados como aceptores finais de elétrons, aparentemente está ligada com a conservação de energia. Esses microrganismos realizam a desalogenação por um processo respiratório (HOLLIGER & SCHUMACHER, 1994). Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que as fontes orgânicas favoreceram a estimulação da metanogênese do sistema e a remoção do TCE. As rotas metabólicas possíveis foram de alguma forma contempladas pela adição ao meio das fontes orgânicas, tanto a desalogenação do TCE como um resultado co-metabólico da utilização das fontes orgânicas como co-substratos, como através da respiração do composto clorado por alguns microrganismos devido à presença de doadores específicos, como os ácidos acético e fórmico, e pelo hidrogênio, provavelmente formado pela degradação dos outros ácidos e álcoois. A confirmação da ocorrência da remoção biótica por uma das alternativas seria possível através de estudos radiométricos.

GERRITSE *et al.* (1999) estudaram a cultura pura *Dessulfotobacterium frapei* linhagem PCP capaz de desclorar o TCE. Este microrganismo cresceu a 30°C e a pH 7,2 em meio contendo lactato mais PCE. O $\mu_{\max}$ medido foi de 0,078h⁻¹ nas condições estudadas, com o lactato oxidado até acetato e o TCE desalogenado a cis-DCE. Pequenas quantidades de 1,1 DCE e cloreto de vinila também foram detectadas. Na presença de H₂ (80mM) como doador de elétrons esta linhagem realizou a dehalorespiração.

Tabela 5.17: Valores das concentrações (mg/L) dos ácidos orgânicos voláteis e porcentagem de metano no frasco-reator 12II, contendo 12,5 mg/L de TCE.

Tempo (d)	Acético (mg/L)	Fórmico (mg/L)	Butírico (mg/L)	Lático (mg/16L)	Metano (%)
0	120	92	88	180	-
5	224	12	26	16	5
14	2	0	0	16	23
27	3	0	0	4	24
26	51	39	37	77	23
37	0	0	0	23	33
38	52	40	38	77	33
46	4	0	0	46	39
50	131	100	96	197	39
52	402	0	0	0,6	44
56	3	0	0	0	49

Figura 5.13: Representação gráfica dos valores das concentrações dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) e porcentagem de metano no biogás do frasco-reator 12II.

As Tabelas 5.18 e 5.19 e as figura 5.14 e 5.15 apresentam os teores dos ácidos orgânicos e a porcentagem do gás metano nos reatores controle CI e CII para o mesmo período estudado. Comparando-se as concentrações nos reatores controles com aqueles

atingidos nos reatores com TCE (6I, 6II, 12I e 12II) é possível verificar comportamentos semelhantes em relação ao consumo dos ácidos fórmico, butírico e láctico.

Com relação ao ácido acético nos frascos com TCE, notou-se que dois dias após a realimentação do 50º dia, houve um aumento de 270 e 290 mg/L desse composto respectivamente para os reatores 12I e 12II (Tabela 5.16 e 5.17) e nos reatores controle sem TCE, os respectivos aumentos foram de 161 e 202 mg/L. As produções do gás metano nos reatores sem TCE tiveram o mesmo comportamento que nos reatores com TCE, ou seja, quando os ácidos orgânicos foram consumidos, a porcentagem de metano no biogás estabilizou.

A produção de ácido acético nos reatores CI e CII sem TCE pode estar relacionada à oxidação dos ácidos butírico, láctico e etanol pelas acetogênicas, como observado pela literatura (VAZOLLER, 1995; VAZOLLER, 1996; GERRITSE, 1999). No entanto, notou-se que nos reatores 12I e 12II a produção de ácido acético (270 mg/L e 290mg/L) no 52º dia foi maior do que nos reatores CI e CII (161 mg/L e 202mg/L). A produção de ácido acético nos reatores com TCE pode ser relacionada à oxidação dos ácidos butírico e láctico pelas acetogênicas com concomitante degradação do TCE (Figuras 5.10, 5.11, 5.12, 5.13).

Alguns estudos têm demonstrado que o ácido acético pode ser um metabólito formado na degradação de organohalogenados, como os de EGLI *et al.* (1988), que demonstraram que o CO₂ foi o primeiro intermediário detectado na degradação do tetracloreto de carbono (PCE) por *Acetobacterium woodii*, sendo esse gás convertido a acetato via a rota metabólica da acetil coenzima-A.

Tabela 5.18: Valores das concentrações (mg/L) dos ácidos orgânicos voláteis e porcentagem de metano no frasco-reator controle CI.

Tempo (d)	Acético (mg/L)	Fórmico (mg/L)	Butírico (mg/L)	Lático (mg/L)	Metano (%)
0	120	92	88	180	-
14	2	0	0	18	21
27	0	0	0	0	21
29	51	39	37	76	22
37	0	0	0	0	28
38	52	40	38	77	28
46	2	0	0	0	35
50	131	100	96	197	35
52	292	0	0	1	41
56	5	0	0	0	45

Figura 5.14: Representação gráfica das concentrações (mg/L) dos ácidos orgânicos voláteis e porcentagem de metano no frasco-reator CI.

Tabela 5.19: Valores das concentrações (mg/L) dos ácidos orgânicos voláteis e porcentagem de metano no reator controle CII.

Tempo (d)	Acético (mg/L)	Fórmico (mg/L)	Butírico (mg/L)	Lático (mg/L)	Metano (%)
0	120	92	88	180	0
14	0	0	0	1	23
27	0	0	0	0	23
29	51	39	37	76	23
37	0	0	0	0	28
38	52	40	38	77	28
46	2	0	0	0	33
50	131	100	96	197	33
52	332	0	0	0,4	40
56	4	0	0	0	44

Figura 5.15: Representação gráfica das concentrações (mg/L) dos ácidos orgânicos voláteis e porcentagem de metano no reator CII

5.4.3 Exames microscópicos das amostras dos ensaios de degradação anaeróbia metanogênica do TCE

As morfologias semelhantes aos gêneros *Methanosaeta*, *Methanosarcina* e *Methanospirillum* foram predominantes depois da adição do TCE. As fotomicrografias apresentadas nas Figuras 5.16 e 5.17 mostram as morfologias encontradas no 15 e 56º dias de incubação.

Figura 5.16. Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e epifluorescência, referentes às amostras de 15 dias de incubação: a) morfologia semelhante ao gênero *Methanosaeta*; b) aglomerado de hidrogenotróficas; c) morfologia semelhante a gênero *Methanoespirillum*; d) morfologia semelhante ao gênero *Methanobacterium*; e) Bactérias livres de células procarióticas; f) morfologia semelhante a *Methanosarcina* sp.

Figura 5.17: observação morfológica sob microscopia de contraste de fase e epifluorescência, referentes a amostras de 56 dias de incubação: a) bacilos fluorescentes; b) morfologia semelhante a *Methanosarcina* sp.; c,d,e,f) morfologias semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp.

5.5 Diversidade microbiana das amostras de sedimentos do Reservatório de Salto Grande pela técnica DGGE, na ausência e na presença do TCE.

5.5.1 Avaliação dos métodos de extração do DNA das amostras estudadas

Foram testados dois diferentes protocolos para a extração do DNA das amostras, a fim de verificar o de melhor eficiência. Os protocolos testados foram os de MELVIN & HOBSON (1994) e de TSAI & OLSON (1991).

O protocolo de MELVIN & HOBSON (1994), comumente utilizado para a extração de DNA de lodos e sedimentos, foi padronizado e testado com as amostras de sedimento enriquecido. Os resultados obtidos com o emprego desse protocolo não foram satisfatórios, uma vez que não se obteve DNA extraído das amostras enriquecidas a partir dos sedimentos de Salto Grande. Cabe salientar, que os mesmos procedimentos foram utilizados com bons resultados para lodos anaeróbios oriundos de biorreatores anaeróbios operados no LPB-EESC-USP, como apresentado durante o “Curso Métodos Moleculares para a Caracterização da Diversidade Microbiana” (2000), o que indicou o protocolo como adequado ao presente estudo. A inadequação do protocolo sugeriu que, em alguma etapa da extração, alguns compostos presentes nas amostras de sedimentos enriquecidas interferiram no método para a obtenção do genoma microbiano.

Sendo assim, o protocolo de TSAI & OLSON (1991) foi também testado, sendo o escolhido como ideal para o presente estudo. O protocolo possui etapas rápidas na extração de DNA de sedimentos e solos, no qual os microrganismos sofrem lise celular por ação física e química, através do emprego da enzima lisozima e dos procedimentos de congelamento a -80°C e aquecimento a 65°C das amostras, em ciclos consecutivos.

As amostras foram então submetidas aos tratamentos anteriormente descritos, ou seja, lise celular por estresse físico e químico. Após essa etapa, o DNA foi extraído com solução de Tris-HCl saturada com fenol (pH 8,0) e solução de fenol-clorofórmio, sendo precipitado com isopropanol à -20°C, como descrito em Material e Métodos. Esse protocolo apresentou um bom resultado para a extração de DNA das amostras provenientes enriquecidas dos sedimentos de Salto Grande (Figura 5.19). O protocolo de TSAI &

OLSON (1991) apresentou ainda a vantagem em utilizar apenas 1,0 g de sedimento para a obtenção do DNA.

As amostras dos frascos reatores que estavam congeladas foram utilizadas para a extração do DNA seguindo o protocolo de TSAI & OLSON (1991). As primeiras tentativas de extração não resultaram em extração de DNA, devido ao fato da solução Tris-HCl - saturada com fenol, utilizada no processo de extração, ter reduzido seu pH para 6,5, quando o pH inicial era de 8,0. Figura 5.15 mostra a fotografia de uma eletroforese em gel de agarose (1%), resultado da extração de DNA, de acordo com o protocolo de TSAI & OLSON (1991) e empregando-se fenol a pH 6,5. Os resultados obtidos demonstraram uma possível extração de RNA. Segundo PIZZA (2000), quando a solução de fenol equilibrada com tampão Tris-HCl possui $\text{pH} \geq 8,0$, resulta em o DNA extraído na fase aquosa e o RNA na fase orgânica e quando a solução de fenol está com valores de pH ente 5 e 6, tem-se como resultado o DNA na fase orgânica e o RNA na fase aquosa. Como os seguintes passos da extração, após a adição do fenol, foram realizados com a fase aquosa, obteve-se como resultado uma provável extração de RNA.

As amostras que estavam congeladas e aliquoteadas em um único frasco de polipropileno foram descongeladas e congeladas repedidas vezes para as extrações de DNA até a detecção do problema da solução de fenol.

As extrações subseqüentes foram então realizadas com uma solução padronizada de Tris-HCl saturada com fenol a pH 8,0 da Armeshal-Pharmacia.

As amostras dos frascos reatores que estavam à -20°C , que haviam sido descongeladas e congeladas e as amostras provenientes dos frascos-reatores, armazenados à 4°C foram então processadas. A Figura 5.19 mostra fotografias da eletroforese em gel de agarose a 1% das amostras armazenadas a 4°C e a $(-)-20^{\circ}\text{C}$, submetidas à extração de DNA pelo protocolo de TSAI & OLSON (1991), revelando para as primeiras apresentaram bandas de DNA de boa qualidade e que os procedimentos prévios de congelamento e descongelamento, das amostras que estavam armazenadas a -20°C , alteraram a qualidade da extração revelando bandas de DNA inadequadas (DNA fracionado). O resultado da extração de DNA das amostras que estavam armazenadas a 4°C foram, então, utilizadas para o processo de purificação e amplificação.

As amostras de DNA obtidas da extração através do protocolo de TSAI & OLSON (1991) foram quantificadas nas eletroforeses em géis de agarose a 1% , por comparação com o padrão de λ DNA em diferentes diluições. A Figura 5.20 revela a concentração de DNA obtida na extração por comparação das bandas das amostras padrão de λ DNA na concentração de 533 μ g de DNA/ mL em diferentes diluições com as bandas obtidas do resultado de extração de DNA. Constatou-se que a amostra I (sedimento enriquecido) estava na concentração em torno de 150 ng de DNA/g de inóculo, pois foram injetados no gel de agarose 5 μ L dos 50 μ L obtidos na extração. As amostras 6I, 6II, 12I e 12II apresentaram cerca de 1000 ng de DNA/g de lodo. A amostra controle sem TCE CI e CII apresentaram uma concentração de 500 ng de DNA/g de lodo. Esses resultados indicaram que o protocolo escolhido para a extração de DNA das amostras provenientes do sedimento do reservatório de Salto Grande apresentou boa eficiência de extração.

1 2 3 4 5

Figura 5.18: Fotografia de uma eletroforese em gel de agarose (1%), resultado da extração de DNA, de acordo com o protocolo de TSAI & OLSON (1991) e empregando-se fenol a pH 6,5. 1-5: Amostras proveniente dos reatores 6I, 6II, 12I, 12II e CI.

Figura 5.19: Fotografias da eletroforese em gel de agarose a 1% das amostras armazenadas a 4°C e a (-)20°C, submetidas à extração de DNA pelo protocolo de TSAI & OLSON (1991). As linhas 1, 2, 9-12, 15-18 correspondem as amostras em duplicata dos reatores 6I, 12I, 12II, CI e 6 II armazenadas à 4°C, respectivamente; linhas 3-8, 13, 14, 19, 20 amostras em duplicata do inóculo e dos reatores 6I, 12I, 12II e 6II armazenados à (-)20°C, respectivamente.

Figura 5.20: Fotografias da eletroforese em gel de agarose a 1%, amostras coradas com brometo de etídio. Amostras apresentadas de acordo com as diluições de DNA: 5ng de DNA (1µL da solução λ DNA 1:100); 10ng de DNA (2 µL da solução λ DNA 1:100); 20 ng de DNA (1µL da solução λ DNA 1:20); 50ng de DNA (2 µL da solução λ DNA 1:20); 100ng de DNA (4µL da solução λ DNA 1:20); 200ng de DNA (8µL da solução λ DNA 1:20). Amostras de sedimentos: I (Inóculo); 6 I ; 6II; 12I; 12II; CI (reator controle sem TCE); CII (reator controle 2 sem TCE).

5.5.2 Amplificação do DNA

Após a amplificação do fragmento de DNA por PCR, todos os produtos para ambos os Domínios, *Bacteria* e *Archaea*, foram aplicados em gel de agarose 1,4% a fim de se obter a confirmação das amplificações (Figura 5.21 e 5.22). Os controles positivos e negativos utilizados resultaram na certeza de uma amplificação específica para os domínios estudados.

Os controles positivos utilizados na amplificação de fragmentos do DNAr 16S para o Domínio *Bacteria* foram das espécies pertencentes a esse Domínio *Escherichia coli*, *Agrobacterium rhizobium*, *Pseudomonas fluorescense* e *Lactobacillus plantarva*. Esses controles apresentaram uma boa amplificação, demonstrando que os “primers” escolhidos amplificaram os DNAs dos microrganismos pertencentes ao Domínio *Bacteria*. Nesse caso, os controles negativos foram os gêneros metanogênicos do Domínio *Archaea*, *Methanosaeta sp.* e *Methanosarcina sp.* A não amplificação das amostras relacionadas aos controles negativos e a amostra de água Milli-Q estéril utilizada no experimento de amplificação revelaram uma amplificação específica para o Domínio *Bacteria* e uma não contaminação das amostras.

Os controles positivos utilizados na amplificação de fragmentos do DNAr 16S para o domínio *Archaea* foram os gêneros *Methanosaeta sp.*; *Methanosarcina sp.* Esses controles apresentaram uma boa amplificação, demonstrando que os “primers” escolhidos estavam amplificando DNA de microrganismos pertencentes ao Domínio *Archaea*. Os controles negativos foram *Agrobacterium rhizobium*; *Pseudomonas fluorescense*; *Lactobacillus plantarva*. A não amplificação das amostras relacionadas ao controle negativo e a amostra de água utilizada no experimento de amplificação revelaram uma amplificação específica para o Domínio *Archaea* e uma não contaminação das amostras.

Figura 5.21: Fotografia do gel de agarose a 1,4% com amostras dos produtos de PCR dos primers do Domínio *Bacteria*. Linhas 1, 12 e 22: marcador de DNA 100 pares de base (Pharmacia); linhas 2-11: 12I (1:10-purificado), 12I (1:10); 12I (1:100); 12II (1:100); 12II (1:10); 6I (1:100); 6II (1:100); CI (1:100); CII (1:100); Inóculo (1:10). Linhas 13-21: Inóculo (1:100); H₂O; *E. Coli* (1:100); *Agrobacterium rhizobium*; *Pseudomonas fluorescence*; *Lactobacilus plantarva*; *E. Coli* (1:10); *Methanosaeta sp.*; *Methanosarcina sp.*.

Figura 5.22: Fotografia do gel de agarose a 1,4% com amostras dos produtos de PCR dos primers de Domínio *Archaea*. Linhas 1, 9, 20: marcador de DNA 100pb (Pharmacia); linhas 2-8: H₂O, H₂O, CI (1:10); CII (1:100); CII (1:10); 12a (1:10); Inóculo 1:10. Linha 10-19: 12b (1:100); 6 II (1:10); 6II (1:100); 6I (1:100); 6I (1:10); *Methanosaeta sp.*; *Methanosarcina sp.*; *Agrobacterium rhizobium*; *Pseudomonas fluorescence*; *Lactobacilus plantarva*.

5.5.3 Análise dos produtos de PCR pela técnica DGGE

Com os produtos do PCR realizado com as diferentes amostras foram feitas análises pela técnica “eletroforese em gel com gradiente desnaturante”, DGGE, para verificar a ocorrência de mudanças na comunidade microbiana pertencente aos Domínios *Archaea* e *Bacteria* devido a adição do TCE. Para isso, alíquotas de 20µL foram aplicadas em géis com gradiente desnaturante de 50 - 65% para as amostras de *Bacteria* e de 45 - 65% para as amostras de *Archaea*. A Figura 5.23 mostra os produtos do PCR para o Domínio *Bacteria* analisados em gel vertical do DGGE

Figura 5.23: Fotografia do resultado da análise de DGGE dos fragmentos dos produtos do PCR amplificados com “primers” do Domínio *Bacteria* das amostras enriquecidas do sedimento e submetidas ao experimento de degradação do TCE. (Imagem negativa da região 50-65%). Linhas 1 a 9: Inóculo; CI (1:1000); CI (1:100); 6II (1:1000); 6I (1:100); 6II (1:100); 12I (1:100); 12II (1:100); 12II (1:1000), respectivamente. Linhas 10 e 11: Linhagens referência: *Escherichia coli*; *Lactobacillus plantarva*.

Como observado na Figura 5.23, as amostras provenientes dos reatores controle sem TCE, denominado CI, mostraram um padrão de bandas semelhante aos das amostras dos reatores com TCE 6I, 6II, 12I e 12II. A amostra referente ao inóculo do experimento, que

foi aplicada na primeira canaleta ficou inclinada devido à deformação no gel, dificultando a sua comparação. No entanto, pôde-se constatar pelo menos 12 bandas distintas nas amostras de CI (linha 3) e nas amostras 6I, 6II, 12a, 2b (linhas 5, 6, 7 e 8).

O resultado obtido revelou que a adição de TCE não provocou mudanças na diversidade dos microrganismos do Domínio *Bacteria* presentes no sedimento inicialmente enriquecido e ativado para ocorrência de metanogênese. Assim, a comunidade bacteriana enriquecida do sedimento do reservatório de Salto Grande, sob as condições deste estudo, foi apta a degradar o composto halogenado e/ou a resistir à sua toxicidade nas concentrações de até 12mg/L.

A Figura 5.24 mostra os produtos do PCR para o Domínio *Archaea* analisados em gel vertical do DGGE. Nessa figura, constatou-se o aparecimento de 10 bandas distintas, sendo que não se notou diferença significativa nos padrões de bandas das amostras provenientes dos reatores com TCE e sem TCE, ou seja, 6I e 12I, CI e CII. A banda de número 10 não apareceu no inóculo, mas esteve presente nas amostras do controle sem TCE e com TCE, sugerindo que a mesma pode ser relacionada com alguma espécie que não se desenvolveu nas fontes orgânicas [acetato, propionato, butirato (20 mM), lactato (10 mM), sulfato (10 mM), metanol (10 mM), glicose (10 mM) e extrato de levedura (0,01% m/v)] e condições de enriquecimento empregadas, e se desenvolveu nas condições do experimento de degradação do TCE [acetato, formiato, lactato (2 mM), butirato (1 mM), etanol (2 mM) e metanol (2,3 mM)].

Figura 5.24: Fotografia da análise do DGGE de fragmentos de produtos do PCR amplificados com “primers” para o Domínio *Archaea* (Imagem negativa da região 45-65%). Linhas 1 a 6: Inóculo; 6I (1:100); 12I (1:100); CI (1:100); CII (1:100); *Methanosarcina sp.*

Notou-se o aparecimento de uma banda nas amostras com TCE (indicada pela seta vermelha) nos reatores 6I e 12I com, respectivamente, 6,0 e 12,0 mg de TCE/L. A mesma não esteve presente nas amostras do inóculo e no controle sem TCE. Essa banda pôde ser relacionada à presença de um organismo degradador de TCE. As demais bandas que apareceram no controle sem TCE, também estavam presentes nas amostras com TCE.

Figura 5.25: Fotografia da análise do DGGE de fragmentos de produtos do PCR amplificados com primers para o Domínio *Archaea* (Imagem da região 50-65%). Linhas 1 a 16: Inóculo (1:100); Inóculo (1:25); CII (1:100); CII (1:10); CI (1:100); CI (1:10); 6II (1:100); 6II (1:10); 6I (1:100); 6I (1:10); 12II (1:100); 12II (1:10); 12I (1:100); *Methanosarcina* sp.; *Methanosaeta* sp.; *Methanosaeta* sp.

Um novo gel de DGGE foi preparado com gradiente de 50 a 60% de concentração de desnaturante (Figura 5.25), em que os produtos do PCR do inóculo e das amostras do experimento de degradação de TCE foram analisados para o Domínio *Archaea*, juntamente com um padrão da linhagem *Methanosaeta* sp. O resultado obtido demonstrou que as bandas relacionadas ao gênero *Methanosaeta* sp., apesar de apresentarem-se inclinadas devido, provavelmente, a secagem do gel em lugar desnivelado, estão alinhadas a uma banda presente em todas as amostras. Esses resultados aliados ao obtidos nos exames microscópicos, em que se constatou a presença de morfologia semelhante ao gênero *Methanosaeta* sp. em todos os reatores, nos diferentes dias dos ensaios de degradação do TCE, sugeriu de que esta espécie pode estar relacionada ao consórcio responsável pela remoção do TCE no meio.

Os ensaios de degradação do TCE demonstraram que os microrganismos presentes no sedimento enriquecido do reservatório de Salto Grande, pertencentes aos Domínios *Bacteria* e *Archaea*, nas condições deste estudo, removeram o TCE do meio, com produção de intermediários metabólicos. Ainda, parecem possuir um maior potencial para remover

concentrações superiores desse composto às utilizadas nos experimentos realizados no presente trabalho, uma vez que a mesma biomassa microbiana utilizada para os ensaios realizados com 12,5 mg de TCE/L apresentaram uma velocidade média de consumo do TCE duas vezes maior do que a submetida a 6,25 mg de TCE/L.

Os resultados obtidos do estudo da diversidade das amostras submetidas ao TCE (6I, 6II, 12I e 12II) e as amostras controles (CI e CII) pelos métodos moleculares do DGGE corroboram com a afirmação acima, pois os padrões de bandas, tanto para o Domínio *Bacteria* como para *Archaea*, das amostras de sedimento ativadas e submetidas ao TCE nas concentrações de 6,25 e 12,5 mg/L, apresentaram similaridade aos padrões de bandas do inóculo e das amostras dos reatores controle sem TCE. Portanto, não houve alterações significativas na comunidade microbiana enriquecida com a adição do TCE.

6.0 CONCLUSÕES

- As amostras de sedimento coletadas no reservatório hiper-eutrófico de Salto Grande localizado no município de Americana Estado de São Paulo, quando enriquecidas sob a atmosfera N_2/CO_2 (70:30) nas fontes de carbono acetato de sódio, butirato de sódio, lactato de sódio, propionato de sódio, metanol e glicose, bem como na presença da fonte inorgânica sulfato de sódio e de fatores de crescimento do extrato de levedura, favoreceram o aparecimento de uma comunidade metanogênica, como constatado pelo metano formado e às células fluorescentes observadas.
- No estudo da degradação do TCE nos reatores contendo 6,25 mg TCE/L obteve-se uma redução média do composto de 68% relacionada à degradação biótica em 56 dias de experimento. A velocidade média de consumo foi de 0,105 mg TCE/L/dia. Nas condições de estudo observou-se o aparecimento do gás metano e intermediário 1,1 DCE. Detectou-se predomínio de tipos morfológicos de microrganismos pertencentes ao gênero *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp.
- No estudo da degradação do TCE nos reatores contendo 12,5 mg TCE/L obteve-se uma redução média do composto de 66%, relacionada à degradação biótica em 56 dias de experimento. A velocidade média de consumo foi de 0,203 mg TCE/L/dia. Nas condições de estudo observou-se o aparecimento do gás metano e intermediário 1,1 DCE. Detectou-se predomínio de tipos morfológicos de microrganismos pertencentes ao gênero *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp.
- Os resultados de V_c demonstram que a relação entre TCE/STV foi adequada para as duas concentrações de TCE estudadas. Com o aumento da velocidade de consumo quando uma concentração mais elevada do composto foi utilizada, mantendo-se a mesma quantidade de inóculo em massa (4,95 gSTV/L) e de doadores de elétrons,

poder-se-á concluir que os microrganismos presentes no sedimento do reservatório de Salto Grande apresentam uma disposição em degradar maiores concentrações de TCE.

- Os ácidos orgânicos utilizados no experimento de degradação do TCE (acético, fórmico, láctico e butírico) foram rapidamente consumidos pelos microrganismos oriundos do sedimento do reservatório de Salto Grande, notando-se uma clara relação entre a metanogênese do sistema e a utilização destes ácidos, pois quando os ácidos tinham sido consumidos houve uma estabilização na produção do metano. Foram necessárias alimentações com os mesmos para que o sistema voltasse a produzir metano.
- O protocolo de TSAY & OLSON (1991) mostrou-se adequado para a extração de DNA das amostras provenientes do sedimento do reservatório de Salto Grande.
- A técnica do DGGE mostrou-se uma boa ferramenta para a avaliação da diversidade microbiana de amostras provenientes do sedimento do reservatório de Salto Grande.
- A diversidade da comunidade microbiana dos Domínios *Bacteria* e *Archaea*, quando enriquecida sob a atmosfera N_2/CO_2 (70:30) nas fontes de carbono acetato de sódio, butirato de sódio, lactato de sódio, propionato de sódio, metanol e glicose, bem como na presença da fonte inorgânica sulfato de sódio e de fatores de crescimento do extrato de levedura, não sofreu alteração significativa depois da adição do TCE.
- É possível afirmar que microrganismos pertencentes aos Domínios *Bacteria* e *Archaea* enriquecidos dos sedimentos do reservatório de Salto Grande, sob as condições de estudo, foram aptos a degradar o composto TCE e/ou a resistir à sua toxicidade nas concentrações de até 12mg/L.

7.0 SUGESTÕES

Sugestões para trabalhos futuros:

- Durante as tomadas de amostras para os experimentos de DNA, aliquotá-las em tubos separados para o congelamento.
- Realizar estudos radiométricos, com carbono marcado para a detecção da via metabólica (desalogenação redutiva e co-metabolismo) envolvida no processo de desalogenação.
- Utilizar técnicas de biologia molecular (RNA, RT-PCR, DNA, DGGE) que permitam saber quais os microrganismos metabolicamente ativos na comunidade microbiana, durante a degradação do TCE.
- Realizar continuas alimentações com TCE logo após sua completa degradação, com a finalidade de selecionar os grupos microbianos degradadores de TCE.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AMANN, R.L.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. (1995) Phylogenetic Identification and In Situ detection of Individual Microbial Cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, Mar, p. 143-169.
- ARANTES JUNIOR, J.D. (2000). *Estudo da ecologia do protozooplâncton no reservatório de Salto Grande*. Monografia apresentada à Universidade Federal de São Carlos, 63p.
- ARCANGELI, J.P.; ARVIN, E.; JENSEN, H.M. (1995). Cometabolic biodegradation of trichloroethylene in a biofilm reactor. *Bioremediation of Chlorinated Solvents*. Battelle Press.p.203-211
- BARRETO, A.S. (1999) *Estudo da distribuição de metais em ambiente lótico, com ênfase na assimilação pelas comunidades biológicas e sua quantificação no sedimento e água*. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Carlos. 274p.
- BOUCHARD,B.; BEAUDET, R.; VILLEMUR, R.; SWEEN, G.; LÉPINE, F.; BISAILLON, J. (1996). Isolation and characterization of *Dessulfitobacterium frappieri* sp. Nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol. *Int. J. Syst. Bacteriology*, 46, p. 1010-1015.
- BRADLEY, P.M.; CHAPELLE, F.H. (1999). Methane As a product of chloroethene biodegradation under methanogenic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 33(4). P. 653-656.
- BROCKMAN, F.J.; PAYNE, W.; WORKMAN, D.; SOONG, A.; MANLEY, S.; SUN, W.; OGRAM, A. (1995). Molecular and cultural-base monitoring of bioremediation at a TCE-contaminated site. *Bioremediation of Chlorinated Solvents*. Battelle Press.p 99-110.
- CALIJURI, M.C.; DEBERDT, G.L.B; MINOTI, R.T. (1999). A produtividade primária pelo fitoplâncton na represa de Salto Grande (Americana, S.P.) In: Henry, R. (ed)- *Ecologia de Reservatórios: Estrutura, função e aspectos Sociais*. Botucatu. FUNDIBIO. FAPESP: 109-48.

- CANHOS, V.P.; VAZOLLER, R.F. (1999). Apresentação do volume 1: *Biodiversidade do Estado de São Paulo Microrganismos & Vírus*. São Paulo: FAPESP.
- CANHOS, V.P.; MANFIO, G.P.; VAZOLLER, R.F.; PELLIZARI, V.H. (1999). Diversidade do Domínio Bactéria. *Biodiversidade do Estado de São Paulo Microrganismos & Vírus*. São Paulo: FAPESP. p. 3-23.
- CARMOUZE, J.P. (1994). *O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: Fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas*. Editora Edgard Blücher: FAPESP. p.253.
- CATTONY, E.B.M. (2001). *Avaliação da diversidade microbiana das características físico-químicas de solo submetido ao cultivo de cana-de-açúcar*. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, São Carlos.
- CAUSON, R. (1997). Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. *Journal of Chromatography B*, v.689, p. 175-180.
- CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (1991) Bacias dos rios Piracicaba e Capivari. Níveis de qualidade de Água
- CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (1999)- Bacia do Rio Atibaia. Watershed Management 2000- *Aprimoramento da gestão ambiental dos recursos hídricos do Estado de São Paulo*. Relatório técnico preliminar. Julho de 1999.
- CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (2001). Sistema Estuarino de Santos e São Vicente. Relatório Técnico. Agosto. 178p.
- COELHO, M.P. (1993) Análise do processo de assoreamento do reservatório de Salto Grande (Americana/SP). Rio Claro. 133p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista/ Instituto de geociências e Ciências exatas, Campus de Rio Claro.
- CULUBRET, E.N.; LUZ, M.; AMILS, R.; SANZ, J.L. (2000). *Biodegradation of 1,1,1,2 Tetrachloroethane under methanogenic conditions*. Abstract do VI oficina e seminário Latino-americano de digestão anaeróbia. Recife, Brasil, novembro.

- CYNTRYN, E.; MINZ, D.; OREMLAND, R.S.; COHEN, Y. (2000) Distribution and diversity of Archaea corresponding to the limnological cycle of a hypersaline stratified lake (Solar Lake, Sinai, Egypt). *Appl. Environ. Microbiol.*, v 66 (8), p. 3269-3276
- DILLON, P.J.; RIGLER, F.H. (1975). A simple methods for predicting the capacity of a lake for development based on lake trophic status. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 32, p. 1519-1531.
- DISTEFANO, T.D.; GOSSET, J.M.; ZINDER, S.H. (1991). Reductive dechlorination of high concentration of tetrachloroethene by an anaerobic enrichment culture in the absence methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(8), p. 2287-2292.
- DOHERTY, R. E. (2000) A history of the production and use of carbon tetrachloride, tetrachloroethylene, trichloroethylene and 1,1,1 trichloroethane in the United States: Part 2- trichloroethylene and 1,1,1 trichloroethane. *Journal of Environmental Forensics* 1, p.83-93.
- DOLFING, J; JANSSEN D.B. (1994) Estimates of Gibbs free energies of formation of chlorinated aliphatic compounds. *Biodegradation* 5:21-28
- DSM- DEUTSCHE SAMMUNG von MIKROORGANISM UND ZELKULTUREN GMBH-DSM. (1991). Curso: scientific services of culture collections- the DSM experience- "Fundação André Toselo". Campinas, SP.
- DUARTE, G.F.; ROSADO, A.S.; SELDIN, L.; ARAUJO, W.; van ELSAS, J.D. (2001). Analysis of Bacterial Community Structure in Sulfurous-Oil-Containing Soils and Detection of Species Carrying Dibenzothiophene Desulfurization (dsz) Genes. *Applied Environ. Microbiology*. March, p. 1052-1062.
- EISENBEIS, M.; KREISEL, P.B.; MURAMATSU, H.S. (1997). Studies on the Dechlorination of Tetrachloroethene to cis-1,2-Dichloroethene by *Dehalospirillum Multivorans* in Biofilms. *Water Scienc. Technology*. Vol 36. n 1, p.191-198.
- ELLIS, D.E.; LUTZ, E.J.; ODOM, J.M.; BUCHANAN, R.J.; BARTLETT, C.L.; LEE, M.D.; HARKNESS, M.R.; DEWEERD, K.A. (2000). Bioaugmentation for accelerated *in situ* anaerobic remediation. *Environ. Sci. Technol.* 34, p. 2254-2260.

- ENSLEY, B.D. (1991). Biochemical diversity of trichloroethylene metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* 45, p.283-299.
- ENVIRONMENTAL HEALTH CENTER. (1997). Environmental writer. Trichloroethylene (C₂HCl₃) chemical backgrounder. <http://www.nsc.org/ehc/ew/chems/trichlor.htm>
- ENZIEN, M.E.; PICARDAL, F.; HAZEM, T.C.; ARNOLD, R.G.; FLIERSMANS, C.B (1994). Reductive Dechlorination of Trichloroethylene and tetrachloroethylene under aerobic conditions in a sediment column. *Appl. Environ. Microbiol.* , 60 (6), p. 2200-2204
- ESTEVES, F.A. (1998) *Fundamentos de limnologia*. Rio de Janeiro, Interciências, FINEP.
- FALCO, P.B. (2002). *Distribuição espacial e temporal da comunidade fitoplactônica e das variáveis ecológicas no reservatório de Salto Grande (Americana, SP.), em duas épocas do ano*. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo – São Carlos, 107p.
- FAT, (2000). Métodos moleculares para caracterização da diversidade microbiana. *Apostila Curso: Fundação André Toselo*, Campinas, São Paulo.
- FANTROUSSI, S.E.; NAVEAU, H.; AGATHOS, N. (1998). Anaerobic Dechlorinating Bacteria. *Biotechnology Prog*, 14, p. 167-188.
- FATHEPURE, B.Z.; BOYD, S.A. (1988a) Dependence of tetrachloroethylene dechlorination on methanogenic substrate consumption by *Methanosarcina* sp. Strain DCM. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2976-2980.
- FATHEPURE, B.Z.; BOYD, S.A. (1988b) Reductive dechlorination of perchloroethylene and the role of methanogens. *FEMS Microbiol lett.*, 49, p.149-156.
- FATHEPURE, B.Z.; BOYD, S.A. (1988). Dependence of tetrachloroethylene dechlorination on methanogenic substrate consumption by *Methanosarcina* sp strain DCM. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, p. 2976-2980.

- FATIBELLO, S.H.S.A. (2001) *Avaliação da atividade microbiana anaeróbia de sedimento lacustre e de lodos de um biodigestor anaeróbio termofílico na degradação de tricloroetileno (TCE)*. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Carlos.
- FERGUSON, J.F.; PIETARI, J.M.H. (2000). Anaerobic transformations and bioremediation of chlorinated solvents. *Environmental Pollution* 107, p. 209-215.
- FLIERMANS, C.B.; PHELPS, T.J.; RINGELBERG, D.; MIKEL, A.T.; WHITE, D.C. (1988). Mineralization of trichloroethylene by heterotrophic enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, p. 1709-1714
- FRANTOUSSI, S.; NAVEAU, H.; AGATHOS, S.N. (1998). Anaerobic Dechlorinating Bacteria. *Biotechnology Prog.* v.14, p.167-188.
- FREEDMAN, D.L.; GOSSET, J.M., (1989). Biological reductive dechlorination of tetrachloro-ethylene and Trichloroethylene to ethylene under metanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, p. 2144-2151.
- FURHMAN J.A.; McCALLUM K.; DAVIS, A.A. (1993). Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* , 59, p.1294-1302.
- GERRITSE, J.; RENARD, V.; PEDRO GOMES, T.M.,; LAWSON, P.; COLLINS, M.D.; GOTTSCHAL, J.C. (1996) *Dessulfotobacterium* sp. Strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or *ortho*-chlorinated phenols. *Arch. Microbiol.* 165, p. 132-140.
- GERRITSE, J.; DRZYZGA, O.; KLOESTRA, G.; KEIJMEL, M.; WIERSUM, L.P.; HUTSON, R.; COLLINS, M.D.; GOTTSCHAL, J.C. (1999). Influence of Different Electron Donors and Acceptors on dehalorespiration of Tetrachloroethene by *Dessulfotobacterium frappieri*TCE1. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, p. 5212-5221.
- GIOVANNONI S.J.; BRISCHGI T.B.; MOYER C.L.; FIELD K.G. (1990). Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345, p. 60-63.

- GODSY, E.M.; GOERLITZ, D.F.; EHRLICH, G.G. (1983). Methanogenesis of phenolic compounds by a bacterial consortium from a contaminated aquifer in St. Louis Park, Minnesota. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* v.30, p.261-286.
- GOSSETT, J.M (1987). Measurement of Henry's Law Constants for C₁ and C₂ Chlorinated Hydrocarbons. *Environmental Science Technology*, Vol. 21, Nº 2. p. 202-208.
- GRANZOW, S. (1998) *Isolierung und Characterisierung eines neuen Tetrachlorethen dechlorierenden strict anaeroben Bakteriums, Desulfotobacterium frappieri Stamm PCE-S*. Ph.D. Thesis Universitat Stuttgart, Stuttgart, Germany.
- HELTON, R.R.; LOFFLER, F.E.; DOLLHOPE, J.M.; TIEDJE, J.M.(2001) Examination of the microbial community structure associated with two tetrachloroethene (PCE)-contaminated aquifers. *Abstract of 9th International Symposium on Microbial Ecology*. p 359.
- HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.E.H. (1997). Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel - Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, p 3233-3241.
- HÖFLE, M. (1992). Bacterioplankton community structure and dynamics after large-scale release of nonindigenous bacteria as revealed by low-molecularweight-RNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, p 3387-3394.
- HOLBEN, W.E.; JANSSON, J.K.; CHELM, B.K.; TIDJE, J.M. (1988). DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 54. p. 703-711.
- HOLLIGUER, C. (1992). *Reductive dehalogenation by anaerobic bacteria* PhD thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands
- HOLLIGUER, C.; SCHUMACHER, W. (1994). Reductive dehalogenation as a respiratory process. *Antonie van Leeuwenhoek* (66), p. 239-246.

- HOLLIGUER, C.; HAHN, D.; HARMSSEN, H.; LUDWIG, W.; SCHUMACHER, W.; TINDALL F.; VAZQUEZ, WEISS, N.; ZENDHER, A.J.B. (1998). *Dehalobacter restrictus* gen. nov and sp. nov., a strictly aaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene in an anaerobic repiration. *Arch. Microbiol.* 169, p. 313-321.
- HOLLIGER, C.; WOHLFARTH, G.; DIEKERT, G. (1999). Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 22, p. 383-398.
- INDEX MERCH (1996). An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 20^o Edition. Published by Merch Research Laboratories Division of MERCH & CO.,Inc. Whitehouse Station, NJ.
- INFANTE, P.F; TSONGAS, T.A. (1982). .Mutagenic and oncogenic effects of chloromethanes, and halogenated analogs of vinyl chloride. *Environ. Sci. Res.*25: 301-327.
- IOFFE, B.V.; VITENBERG A.G. (1984). *Head-space anlysis and related methods in gas chromatography*. John Wiley & Sons, New York.
- KÄSTNER, M. (1991). Reductive Dechlorination of Tri- and Tetrachloroethylenes depends on transition from aerobic to anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* , 57 (7), p.2039-2046.
- KOIZUMI, J. KITAYAMA, A. (1995). TCE degradation by Toluene/Benzene Monooxygenase of *Pseudomonas aeruginosa* J1104 and *Escherichia coli* Recombinant. *Bioremediation of Chlorinated Solvents*. Battelle Press.p 197-202.
- KOWALCHUK, G.A.; STEPHEN, J.R.; BOER, W.; PROSSER, J.I.; EMBLEY, T.M.; WOLDENDORP, J.W. (1997). Analysis of Ammonia- Oxidizing Bacteria of the β Subdivision of the class Proteobacteria in Coastal Sand Dunes by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Sequencing of PCR-Amplified 16S Ribossomal DNA Fragments. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 63, p1489-1497

- KRUMHOLZ, L. R. (1997) *Dessulforomonas chloroethenica* sp. nov. uses tetrachloroethylene and trichloroethylene as electron acceptors. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, p. 1262-1263.
- KRUMME, M.L.; TIMMIS, K.M.; DWYER, D.F. (1993). Degradation trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4 and the constitutive mutant strain G4 5223 PR1 in aquifer microcosms. *Appl. and Environ. Microbiol.* 59 (8), p.2746-2749.
- KUDO, Y.; NAKAJIMA, T.; MIYAKI, T.; OYAIZU, H. (1997). Methanogen flora of paddy soils in japan. *FEMS Microbiology Ecology* 22 39-48.
- LARIZZATTI, S.F. (1997). Avaliação da degradação anaeróbia de Pentaclorofenol pôr consórcio Metanogênicos Enriquecidos. São Carlos. SP, *Dissertação de mestrado do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP*, p.136.
- LEE, S.; FURHMAN J.A. (1990). DNA hibridization to compare species compositions of natural bacterioplankton assemblages. *Appl. Environ. Microbiol* 56: p.739-746.
- LEE, T.H.; YOSHIMI, M.; IKE, M.; FUJITA, M. Characterization of an anaerobic soil enrichment capable of dechlorinating high concentrations of tetrachloroethylene. *Water Science Technology*, vol, 36, n 6-7, p117-124.
- LÖFFLER, F.E.; SUN, Q.; LI, J.; TIEDJE, J.M. (2000). 16S rRNA Gene-Based Detection of tetrachloroethene-dechlorinating *Desulforomonas* and *Dehalococoides* species. *Applied and Environmental Microbiology*, April. p. 1369-1374.
- LU, C.J.; CHANG, C.Y.; LEE, C.M. (1995). Aerobic degradation of trichloroethylene by Microorganisms that degrade aromatic compounds. *Bioremediation of Chlorinated Solvents*. Battelle Press.p.1-8.
- MAGNUSON, J.K.; STERN, R.V.; GOSSETT, J.M., ZINDER, S.H.; BURRIS, D.R. (1998). Reductive dechlorination of tetrachloroethene to ethene by a two-component enzyme pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, p. 1270-1275.
- MALACHOWSKY, K.J.; PHELPS, J.T.; TEBOLI, A.B.; MINNIKIN, D.E.; WHITE, D.C. (1994). Aerobic mineralization of trichloroethylene, vinyl chloride, and aromatic compounds by rhodococcus species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (2), p.542 - 548.

- MAUKONEN, J.; RATTO, M (2001). Characterization of Microbial Communities from Sulfate-Reducing Fluidized Bed Reactors Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Fluorescent in Situ Hybridization (FISH) *Abstract of 9th International Symposium on Microbial Ecology*. p 383.
- MAYMÓ-GATELL, X.; CHIEN, Y.T.; GOSSETT, J.M.; ZINDER, S.H.(1997). Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethane. *Science* 276: 1568-1571.
- MAYMÓ-GATELL, X.; ANGUISH, T.; ZINDER, S.H. (1999). Reductive Dechlorination of Chlorinated ethenes and 1,2- Dichloroethane by “Dehalococcoides ethenogenes” 195. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol.65, No.7, July, p. 3108-3113.
- McCLAY, K.; STREGER, S.H.; STEFFAN, R.J. (1995). Introduction of Toluene oxidation Activity in *Pseudomonas mendocina* KR1 and *Pseudomonas* sp. strain ENVPC5 by Chlorinated Solvents and Alkenes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (9), p. 3479-3481.
- MELVIN, A.N.W.T.; HOBSON, P.N.(1994). Identification of anaerobic digester bacteria using polymerase chain reaction method. *Bioresource Technology* 47, p. 73-80
- MILLER, E.; WOHFARTH, G.; DIEKERT, G. (1997). Studies on tetrachloroethene and trichloroethene dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans*. *Arch. Microbiol.* 166, 379-387.
- MOHN, W.W.; TIEDJE, J.M. (1992). Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol. Rev.* 56: 482-507
- MONTICELI, J.J.; MARTINS, J.P.S. (1993). A luta pela água: nas bacias do rios Piracicaba e Capivari, editora EME.
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polimerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- MUYZER, G.; WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. (1993). Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA *Appl. and Environ. Microbiol.*, 59, p695-700.

- MUYZER, G.; HOTTENTRÄGER, S., TESKE; WAWER, C. (1996). Denaturing gradient gel eletrophoresis of PCR- amplified 16S rDNA - A new molecular apptoach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. *Molecular Methods Ecology Manual* -Cap 3.4.4, p 1-23.
- MYERS, R.M.; FISCHER, S.G.; LERMAN, L.S.; MANIATIS, T. (1985). Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel eletroforesis. *Nucleic Acids Res.* 13: 3131-3145.
- NAVARRETE, M.; RODRIGUES, N.; AMILS, R.; SANZ, J.L. (1999). Effect of 1,1,2,2 tetrachloroethane on the performance of upflow a anaerobic sludge bed (UASB) reactors. *Water Scien. Technol.*, 40 (8), p. 153-159.
- NELSON, M.J.K.; MONTGOMERY, S.O.; O'NEILL, E.J.; PRITCHARD, P.H. (1986). Aerobic metabolism of trichloroethylene by a bacteria isoate. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (2), p. 383-384.
- NELSON, M.J.K.; MONTGOMERY, S.O.; MAHAFFEY, W.R.; PRITCHARD, P.H. (1987). Trichloroethylene metabolism by microorganism that degrade aromatic compounds *Appl. Environ. Microbiol.* , 53 (5), p. 949-954.
- NEUMANN, A.; MURAMTSU, H.S.; DIERKERT, G. (1994). Tetrachloroethene dechlorination to cis-1,2 dichloroethene in cell suspensions and cell extracts of *Dehalospirillum multivorans* spec. Abstr. P405, Frühjahrstagung der VAAM, March. Hannover, Germany. *Bioengineering* 2/94: 82.
- NG, A; MELVIN, W.T; HOBSON, P.N. (1994). Identification of anaerobic digester bacteria using a polymerase chain reaction method. *Bioresource Technology*, 47:p. 73-80.
- NIJENHUIS, I.; ZINDER, S.H. (2001) Reductive dechlorination by *Dehalococoides ethenogenes* strain 195. *Abstract of 9th International Symposium on Microbial Ecology*. p 366.
- OGRAM, A.; SAYLER, G.S.; BARKAY, T. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediment. *J. Microbiol. Methods* 7: 57 – 66.
- OLIVEIRA, V.M.; COUTINHO, H.L.C.; SOBRAL, B.W.S.; GUIMARÃES, C.T.; VAN ELSAS, J.D.; MANFIO, G.P. (1999). Discrimination of *Rhizobium tropici* and R.

- leguminosarum strains by PCR-specific amplification of 16S-23S rDNA spacer region fragments and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Letters in Applied Microbiology*, 28, p.137 – 141.
- PARSON, F.; WOOD, P.R.; MARCO, J. (1984). Transformation of tetrachloroethylene in microcosm and groundwater. *J. Am. Water Works Assoc.* 76, p. 56-59.
- PEIXOTO, R.S.; COUTINHO, H.L.C.; FERNANDES, R.B.; RUMJANEK, N.G.; ROSADO, A.S. (1999). Utilização do DGGE para avaliação da diversidade de bactérias em solo de cerrado sob plantio direto. *Anais do XX Congresso Brasileiro de Microbiologia*.
- PHELPS, T.J.; NIEDZIELSKI, J.J.; SCHARAM, S.M.; HERBES, S.E; WHITE, D.C. (1990). Biodegradation of trichloroethylene in continous-recycle expanded-bed bioreactors. *Appl. Environ. Microbiol*, 56 (6): 1702-1709.
- PIZA, F. F. (2000). Princípios de isolamento e purificação de ácidos nucleicos. IN: *Métodos moleculares para a avaliação a diversidade microbiana – Curso Fundação André Toselo*- p. 1-11.
- PIZA, F.F.; MANFIO, G.P.(2001). Diversity of Bacteria in contaminated estuarine sediment from Baixada Santista, Brazil, analysed by 16S rDNA sequencing and DGGE. *Abstract of 9th International Symposium on Microbial Ecology*. p218.
- PRAKASH, S.M.; GUPTA, S.K. (2000). Biodegradation of tetrachloroethylene in upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Bioresource Technology* 72. p. 47-54.
- PRANTERA, M.; TEIXEIRA, R.L.F.; DROZDOWICZ, A. (1999). Perfil genético de espécies bacterianas com potencial para biorremediação de solos impactados com derivados de petróleo. *Anais do XX Congresso Brasileiro de Microbiologia*.
- ROSADO, A.S.; DUARTE G.F.; SELDIN, L.; van ELSAS, J.D. (1998). Genetic diversity of *nifH* genes sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analysed by denaturing gradient gel electroforesis of PCR-amplified gene fragments. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 64, p 572-577.
- ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; van ELSAS, J D. (1997). Molecular microbial ecology: a minireview. *Revista de Microbiologia*, 28, p.135-147.

- SAIKI, R.K.; BUGAWAN, T.L.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N.A. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- SAKAMOTO, I.K. (1996). *Comportamento do consórcio microbiano existente em um lodo anaeróbio granulado metanogênico, submetido a adições crescentes de sulfato*. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Carlos.
- SCHMIDT T. M.; DELONG E.F.; PACE, N. R. Analysis of a marin picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. Bacteriol* 173: 4371-4378.
- SHARMA, P.K.; McCARTY, P.L. (1996). Isolation and Characterization of a Facultatively Aerobic Bacterium that Reductively Dehalogenates Tetrachloroethene to cis-1,2- Dichloroethene . , 62 (3), p.761-765.
- SHELTON , D.R.; TIEDJE, J.M. (1984). Isolation and partial characterization of bacteria in a anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, p. 840-848.
- SME – SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE (1997). *Gestão das águas: 6 anos de percurso* / Secretaria do Meio Ambiente, Secretaria dos Recursos Hídricos, Saneamento e Obras- São Paulo, 128p.
- STRASKRABA, M.; TUNDISI, J.G. (2000). Amostragem, Monitoramento e avaliação da qualidade de água, In: *Diretrizes para o gerenciamento de lagos, Volume 9: Gerenciamento e qualidade de água de represa*. Ed STRASKRABA, M.; TUNDISI, J. G, 258p.
- TESKE, A.; SIGALEVICH, P.; COHEN, Y.; MUYZER, G. (1996). Molecular Identification of Bacteria from Coculture by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of 16S Ribosomal DNA Fragments as a Tool for Isolation in Pure Cultures. *Appl. and Environ. Microbiol.* 62, p 4210-4215.
- TORSVIK, V. (1980). Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil Biol. Biochem.* 12: 15-21
- TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, p 782-787.

- TOWNSEND, G.T.; SULFITA, J.M. (1997). Influence of sulfur oxyanions on reductive dehalogenation activities in *Desulfonile tiedjei*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 63 p. 3594-3599
- TSAI, Y. L.; OLSON, B.H. (1991). Rapid Method for Direct Extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. and Environ. Microbiol.*, April p. 1070-1074.
- UTKIN, I.; WOESE, C.; WIEGEL, J. (1994). Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. Nov., sp. Nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 612 – 619.
- VALLAEYS, T.; TOPP, E.; MUYZER, G.; MACHERET, V.; LSGUERRE, G.; RIGAUD, A.; SOULAS, G. (1997). Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiol. Ecology* 24: 279-285.
- VAZOLLER, R.F. (1995). *Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas*. Tese. (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. p. 245.
- VAZOLLER, R.F. (1996). Microbiologia e saneamento ambiental- Diversidade Microbiana e Desenvolvimento Sustentável. In: PADCT-FTPT “André Toselo” : Biodiversidade: Perspectiva e Oportunidades Tecnológicas”. www.bdt.br/bdt/paper/padctbio.
- VAZOLLER, R.F.; MANFIO, G.P.; CANHOS, V.P. (1999). Diversidade do domínio Archaea: *Biodiversidade do Estado de São Paulo Microrganismos & Vírus*. São Paulo: FAPESP, p. 17-24.
- VOGUEL, G.D.; HOPPE, W.F.; STUMM, C.K. (1980). Association of methanogenic bacteria with rumen ciliates. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 608- 612.
- VOGEL, T.M; McCARTY, P.L (1995). Biotransformation of Tetrachloroethylene to trichloroethylene, Dichloroethylene, Vinyl Chloride, and Carbon Dioxide under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* , 49 (5), p.1080-1083

- VOGEL, T.M.; CRIDDLEL, C.S. McCARTY P.L.(1997). Transformations of halogenated aliphatic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 21: 722-736.
- WACKETT, L.P.; GIBSON, D.T. (1998). Degradation of Trichloroethylene by Toluene dioxygenase in Whole-Cell Studies with *Pseudomonas putida* F1. *Applied and Environmental Microbiology*, July 1988, p. 1703-1708.
- WARD, D.M.; WELLER, R.; BATESON, M.M. 16S rRNA (1990). sequences reveal numerous uncultivated microorganisms in a natural environment. *Nature* 345:p. 63 – 65.
- WAWER, C.; MUYZER, G. (1995). Genetic Diversity of *Desulfovibrio* spp. In Environmental Samples Analyzed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of (NiFe) Hydrogenase Gene Fragments *Appl. and Environ. Microbiol.*, 61, p2203-2210.
- WILD, A.; HERMANN, R.; LEISINGER, T. (1996). Isolation of an anaerobic bacterium wich reductively dechlorinates tetrachloroethene and trichloroethene. *Biodegradation* 7, 507 – 511.
- WILSON, B.H.; SMITH, G.B.; RESS, J.F. (1986). Biotransformations of selected Alkilbenzenes and Halogenated Aliphatic Hydrocarbons in Methanogenic Aquifer Material: A Kicrocosm Study. *Environ. Sci. Technol.*, 20, p.997-1002.
- WU, W.M.; NYE, J.; HICKEY, R.F.; JAIN, M.K.; ZEIKUS, J.G. (1995). Dechlorination of PCE and TCE to Ethene Using Anaerobic Microbial Consortium. *Bioremediation of Chlorinated Solvents*. Battelle Press. p 45-52.
- ZINDER, S.H. (1993). Physiological Ecology of Methanogens. In: FERRY, J. G. Methanogenesis. *Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics*. Chapman & Hall, London, UK. p.128-206.
- ZINDER, S.H.; KOCH, M. (1984). No acetoclastic methanogenesis rom acetate: oxidation by a thermophilic coculture. *Archives. Microbiology*, 138, p. 264-272
- ZINDER, S.H.; ANGUISH, T.; CARDWELL, S.C. (1984) Selective inhibition by 2-bromoethanesulfonate of methanogenesis from acetate in a thermofilic anaerobic digester. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 1343-1345.
- ZINDER, S.H; ANGUISH, T.; LOBO, A.L. (1987). Isolation and characterizaton of a termophilic acetotrophic strain of *Methanotrix*. *Arch. Microbiol.* 146:p. 315-322.

AMBIENTE *Substância cancerígena de aterro atinge água subterrânea na região de Campinas; Cetesb exige de empresas plano de recuperação*

Vazamento tóxico contamina área em SP

ANA PAULA MARGARIDO
DA FOLHA CAMPINAS

A contaminação por solventes em uma chácara da zona rural de Santo Antônio de Posse (150 km de São Paulo), na região de Campinas, levou o Ministério Público Estadual a exigir que 56 empresas se reúnam e façam um plano conjunto de remediação ao ambiente.

Entre as empresas envolvidas estão a Embraer, Bosch, Mercedes-Benz e Texas Instruments (veja lista completa com as 56 empresas nesta página). Elas são corresponsáveis pela contaminação do lençol freático nos limites dos

sítios Pirapitingui e Santa Adélia.

Na semana passada, foi feita uma reunião entre o Ministério Público, Cetesb (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) e representantes das empresas envolvidas para discutir a formação de dois grupos.

Um deles vai fazer a avaliação dos danos ambientais e uma proposta de recuperação. O outro vai levantar os custos da recuperação e como isso será pago.

A água subterrânea dos dois sítios está contaminada por solventes orgânicos, entre eles o 1,2-dicloroetano —substância tóxica, potencialmente cancerígena.

O sítio Pirapitingui abrigava o antigo Aterro Industrial Mantovani, desativado em 1987 por não apresentar condições de segurança para receber o material tóxico.

A desativação foi uma determinação da Cetesb. A contaminação foi constatada pela Cetesb em abril deste ano, durante monitoramento no local.

A Cetesb instalou 13 pontos de monitoramento em 13 poços na área. Dos 13, 5 poços são utilizados para abastecimento.

A agência ambiental informou, por meio de sua assessoria de imprensa, que, dos cinco poços de abastecimento, apenas a cacimba

localizada no sítio Santa Adélia apresentou contaminação.

O índice encontrado na cacimba do Santa Adélia foi de 40,3 microgramas por litro. O valor é 5,7 vezes superior ao limite recomendado pela OMS (Organização Mundial da Saúde).

A contaminação levou a Cetesb a alertar o proprietário para não utilizar a água subterrânea até a conclusão dos estudos complementares no local.

A indicação de que a substância tóxica teria saído da área do aterro foi constatada em monitoramento realizado em outubro do ano passado, quando a concentração

de 1,2-dicloroetano detectada na água foi de 14,4 microgramas por litro. Em uma segunda avaliação, realizada em fevereiro deste ano, a Cetesb encontrou um pouco menos da metade da concentração anterior —7,85.

Há um mês, a agência ambiental coletou novas amostras de água na chácara, na montante e na afluente do rio Pirapitingui e do córrego que margeia o rio.

Ainda não há prazo, segundo a Cetesb, para a conclusão das análises. A investigação vai permitir a identificação de outras substâncias tóxicas no lençol freático.

O vazamento de 1,2-dicloroetano

no lençol freático é resultado da falta de manutenção no aterro.

Segundo a Cetesb, desde 1987, o Mantovani recebeu três advertências e cinco multas. A agência ambiental, por seu escritório de Campinas, determinou que os responsáveis pelo aterro adotem uma série de medidas de curto, médio e longo prazo.

As de curto prazo determinam, entre outras coisas, que se faça a cobertura dos resíduos que se encontram a céu aberto, que se apresentem estudos de estabilidade dos diques que constituem as valas do aterro e selagem das perfurações efetuadas na área.

Solvente pode levar à morte

DA FOLHA CAMPINAS

A exposição a altas concentrações de 1,2-dicloroetano pode causar câncer e levar à morte.

O dicloroetano é uma espécie de solvente, tóxico, usado para limpar máquinas ou diluir produtos químicos. A contaminação pode ser feita por meio do ar e da água.

Os estudos científicos feitos nos animais de laboratório demonstraram um aumento significativo do número de tumores.

Grande parte do 1,2-dicloroetano liberada no ambiente vai para a atmosfera e acaba se dissipando. A substância pode persistir por longo tempo na água subterrânea, onde a volatilização é limitada.

Segundo o presidente da Sociedade Brasileira de Toxicologia, Igor Vassiliev, a inalação de dicloroetano causa sonolência, alterações hepáticas, dores de cabeça e distúrbios neurológicos.

Lagoa com produtos tóxicos em chácara de Santo Antônio de Posse

Empresa diz que aterro não foi usado

DA FOLHA CAMPINAS

A Basf, de Guaratinguetá, informou ontem que solicitou à Cetesb, no dia 28 de maio, a anulação do auto de infração porque não depositou os resíduos no aterro que está sendo investigado.

Ela disse que destinou resíduos que não são prejudiciais a uma vala licenciada pela Cetesb.

A Embraer, de São José dos Campos, informou que não encontrou em seus registros contábeis e administrativos, desde 91, dados sobre envio de resíduos para o aterro Mantovani.

A direção da CBTI (Companhia Brasileira de Tecnologia Industrial), de Valinhos, informou que não utilizou o aterro. A empresa afirmou que a Cetesb deve ter cometido algum engano, já que companhia não despeja poluentes em rios ou lagos.

O gerente de programas da Te-

xas Instruments Brasil, Daniel Storch, achou estranho a empresa ser citada como suposta poluidora do aterro porque produz equipamentos eletrônicos.

A Buckman do Brasil informou que não utilizou o aterro de Santo Antônio de Posse.

A direção da Robert Bosch disse ontem que deverá se manifestar sobre o assunto hoje.

A DaimlerChrysler afirmou que utilizou o aterro por um período curto e que depositou uma pequena parcela de lixo.

A assessoria de imprensa da Johnson & Johnson disse que não poderia comentar as acusações.

O proprietário do aterro, Waldemar Mantovani, foi procurado, mas não atendeu a reportagem.

Na Indústria Campineira de Sabão e Glicerina, na Monte D'Oeste Indústria e Comércio de Materiais Elétricos e na Itoil, todas de Campinas, os responsáveis não

foram localizados.

A Folha também procurou, no final da tarde de ontem, a direção das empresas DuPont e Texaco, de Paulínia, Vitoria Química, de Valinhos, Cagico e Moinhos Cruzeiro do Sul, de Jaguariúna, CIM Citros, de Limeira, Filtros Mann, de Indaiatuba, e Indústria Elétrica Marangoni, de Mogi Mirim, mas não conseguiu contato.

A reportagem não conseguiu entrar em contato com a Sospo Indústria e Comércio Ltda., de Jacareí, com a Ciquine Companhia Petroquímica, de Taubaté, e com a New Part Investimentos e Empreendimentos, de São José.

A Folha tentou contatar cerca de 20 empresas envolvidas, entre elas São Paulo Alpargatas, Cariquímica, Brazão, Prosint Produtos Sintéticos e Hydrosol. Porém, devido ao fato de as empresas encerrarem expediente às 17h, não foi possível obter resposta.

ANEXO 2

Curvas de calibração feitas no dia da tomada de amostras para a detecção do TCE por cromatografia.

Curva de calibração TCE(05/01)

Curva de calibração 1,1 DCE (05/01)

Curva de calibração 1,2 DCE (05/01)

Curva de calibração 1,2 DCE (05/12/2000)

Curva de calibração TCE (05/12/2000)

Curva de calibração 1,1 DCE (05/12/2000)

Tabelas de médias e Desvio Padrão das Curvas de Calibração

[TCE] 05/12 (mg/L)	Média	Desvio Padrão
0,5	0,32865	0,00455
2,0	1,9626	0,0126
4,0	4,4542	0,1094
8,0	10,5878	0,2171

[1,1DCE] 05/12 (mg/L)	Média	Desvio Padrão
0,5	0,038668	0,000212
2,0	0,151249	0,001483
4,0	0,317176	0,010212
8,0	0,702642	0,006782

[1,2DCE] 05/12 mg/L	Média	Desvio Padrão
2,0	0,01671	9,795E-05
4,0	0,033466	0,000946
8,0	0,0693	0,0005548

[TCE] 17/12 mg/L	Média	Desvio Padrão
0,5	0,45155	0,00905
1,0	0,913284	0,010683
2,0	1,463607	0,010489
4,0	4,077008	0,083936
8,0	8,817407	0,191529

[TCE] 17/12 mg/L	Média	Desvio Padrão
0,5	0,023733	0,002723
1,0	0,070844	0,001961
2,0	0,140336	0,002198
4,0	0,286022	0,000799
8,0	0,507211	0,009619

[1,2DCE] 17/12 mg/L	Média	Desvio Padrão
1,0	0,007879	5,1E-05
2,0	0,017262	0,000371
4,0	0,035783	0,000465
8,0	0,062	0,000833

1,1 [DCE] 24/11 mg/L	Média	Desvio Padrão
0,5	0,044857	0,001407
2	0,184985	0,007785
4	0,31874	0,00636
12	0,739	0,0131
16	0,9729	0,0079

[TCE] 24/11 mg/L	Média	Desvio Padrão
0,5	0,625937	0,040063
2	2,383019	0,020581
4	4,34819	0,05971
8	8,420825	0,114175
12	14,2099	0,5341

[TCE] 27/12 mg/L	Média	Desvio Padrão
0,25	0,222106	0,015158
0,5	0,312542	0,006409
1	0,757362	0,03251
4	4,300319	0,181821

[1,1DCE] 27/12 mg/L	Média	Desvio Padrão
0,25	0,022554	0,001444
1	0,060404	0,001654
2	0,118196	0,00057
4	0,257365	0,009831

[1,2DCE] 27/12 mg/L	Média	Desvio Padrão
1	0,00747	0,000268
2	0,014509	0,000262
4	0,030217	0,000108

[TCE] 05/01 mg/L	Média	Desvio Padrão
0,1	0,107185	0,001639
0,25	0,238501	0,001332
0,5	0,546677	0,008028
1	0,880929	0,027815
2	1,840533	0,067539
4	4,029022	0,021192

[1,1DCE] 05/01 mg/L	Média	Desvio Padrão
0,25	0,028698	1,4E-05
0,5	0,047653	0,001847
1	0,059037	0,001561
2	0,121098	0,00028
4	0,216155	0,001417

[1,2DCE] 05/01 mg/L	Média	Desvio padrão
0,5	0,00431	4,1E-05
1	0,006917	0,000194
2	0,013959	5,97E-05
4	0,028494	1,88E-05

[TCE] 16/01 mg/L	Média	Desvio Padrão
0,05	0,069621	0,001108
0,25	0,177266	0,010278
1	1,05498	0,016397
4	4,588759	0,176809

[1,1DCE] 16/01 mg/L	Média	Desvio Padrão
0,05	0,011925	0,000766
0,25	0,024962	0,002173
1	0,071952	0,000226
4	0,275362	0,0068

ANEXO 3

Procedimento para determinação de sólidos totais voláteis

Cápsulas de porcelana foram lavadas com Extram 5% (m/v) e enxaguada em água corrente e água destilada, após secagem a temperatura ambiente as cápsulas foram marcadas e então colocadas em uma mufla para serem calcinadas à 550°C até peso constante. Desligou-se a mufla e esperou-se a temperatura da mesma atingir 150°C. Em seguida, transferiu-se as cápsulas para uma estufa e depois para um dessecador de vidro até atingir a temperatura ambiente, sendo então pesadas, obtendo-se o valor de P_0 .

Após homogeneização do lodo, alíquotas de 20 mL foram transferidas quantitativamente para cápsulas de porcelanas com o auxílio de uma proveta. Essas cápsulas eram novamente levadas à estufa à temperatura de 103 – 105°C, por 24 horas, e então pesadas para a obtenção do valor de P_1 . Em seguida, foram transferidas para uma mufla e calcinadas à temperatura de 550°C até peso constante, sendo então pesadas para obtenção de P_2 .

O valor dos sólidos totais voláteis foram calculados empregando-se a Equação:

$$\text{mg de sólidos totais/L} = (P_1 - P_2) \times 1000 / \text{vol da amostra em L}$$

ANEXO 4

Curva de calibração do metano

ANEXO 5

Exemplo de cromatograma obtido durante o experimento.

* RUN # 2646 OCT 30, 2000 19109122
START

Closing signal file M:SIGNAL .BNC
Storing processed peaks to M?Q1971663.PRO
DIRECTORY FULL

RUN# 2646 OCT 30, 2000 19109122

SIGNAL FILE: M:SIGNAL.BNC
PEAK FILE 1 M?Q1971663.PRO
AREA%

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA%
.416	71473	FB	.032	13.91698
.616	293886	BB	.062	57.22446
1.210	146286	FB	.106	28.65855

TOTAL AREA= 513567
NUL FACTOR=1.0000E+00

Anexo 6

Curvas de calibração dos ácidos orgânicos

Curva de calibração do Ácido láctico

Curva de calibração do Ácido fórmico

Curva de calibração do Ácido acético

Curva de calibração do Ácido butírico

Anexo 7

Exemplo de cromatogramas das análises de ácidos

LABORATÓRIO DE PROCESSOS BIOLÓGICOS

Cromatografia

Data: 01/06/01 17:35:45

Nome da Amostra: CV 16-1 1-1

Nome do Arquivo de Dados: C:\Gunther\CV 16-1 1-1

Nome do Arquivo do Método: C:\CLASS-VP\METHODS\Gunther.met

Data da análise: 30/05/01 16:31:52

1: 210 nm, 4 nm

Pk #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Units
1	ác. láctico	12,960	912278	126,42662	mg/L
2	ac. fórmico	14,332	1203442	113,07607	mg/L
3	ac. acético	15,626	859905	129,01065	mg/L
4	ac. butírico	22,977	1392177	229,76701	mg/L
5		28,843	15299	0,00000	

Totals			4383101	598,28035	
--------	--	--	---------	-----------	--

ANEXO 8

Curva de calibração do Headspace

Anexo 9

Segundo o Manual prático do curso “Métodos moleculares para caracterização da diversidade microbiana” (Manual da BioRad, The Dcode Universal Mutation Detection System)

Preparação dos Reagentes:

A concentração de desnaturante a ser usada varia de acordo com a amostra a ser analisada. Inicialmente, um gradiente amplo de 20 a 70% de desnaturante é empregado. Devem ser feitas soluções estoques de 0 a 100% de desnaturante. Uma solução 100% de desnaturante consiste de uma mistura de uréia 7M e formamida deionizada 40%. A concentração de acrilamida também pode variar, dependendo do tamanho do fragmento analisado. As Tabelas 5 e 6, abaixo, fornece a porcentagem de acrilamida/bis acrilamida necessária para uma faixa particular de tamanho de fragmento:

Tabela 5: Solução Desnaturante 0% (estoque)

	6%	8%	10%
Acrilamida/Bis 40%	15mL	20mL	25mL
Tampão TAE 50X	2mL	2mL	2mL
Água Destilada	83mL	78mL	73mL
Volume Total	100mL	100mL	100mL

Tabela 6: Solução Desnaturante 100% (estoque)

	6%	8%	10%
Acrilamida/Bis 40%	15mL	20mL	25mL
Tampão TAE 50X	2mL	2mL	2mL
Formamida	40mL	40mL	40mL
Uréia	42g	42g	42g

Volume Total	qsp.100mL	qsp.100mL	qsp.100mL
--------------	-----------	-----------	-----------

Nota: Deixar as soluções desnaturantes em repouso por 10 a 15 min, para desgaseificação. Filtrá-las utilizando membrana do tipo Millipore de 0,45µm. Estocar a 4°C, em garrafa escura, por no máximo 1 mês. A solução desnaturante 100% requer a redissolução após estocagem, utilizando-se banho-maria e agitação magnética para se obter melhores resultados.

Volume do Gel:

Para espaçadores de 1,00 mm e gel do tamanho 16 x 16 cm, o volume de seringa recomendado é de 16 mL e o volume de ajuste é de 14,5. O volume por seringa é a quantidade requerida para cada uma das seringas, de baixa e alta densidade, e o ajuste do volume, indicado no sistema de gradiente, ajusta o sistema para dispensar a quantidade apropriada das soluções. O volume por seringa requer um volume maior de reagente do que o volume de ajuste indicado, uma vez que o excesso de volume na seringa é necessário para empurrar a quantidade correta de solução para preencher o espaço entre as placas do sanduíche. A Tabela 7 fornece os volumes de soluções desnaturantes (0 e 100%) necessários para a preparação do gradiente de desnaturação no gel de DGGE:

Tabela 7: Volumes das soluções desnaturantes para confecção do gel

Concentração de desnaturante	Solução de 0%	Solução de 100%
25%	12,0mL	4,0mL
30%	11,2mL	4,8mL
35%	10,4mL	5,6mL
40%	9,6mL	6,4mL
45%	8,8mL	7,2mL
50%	8,0mL	8,0mL
60%	5,6mL	10,4mL
70%	4,8mL	11,2mL
75%	4,0mL	12,0mL

Nota: Cálculo feitos sobre o volume de 16mL/seringa (gel de 16 x 16 cm com 1mm de espessura).

Preparação das amostras:

1. Os produtos de PCR deverão ser avaliados quanto a sua pureza e qualidade em gel de agarose antes de se proceder à eletroforese em gel de acrilamida desnaturante;
2. Aplicar de 180 a 300 ng de DNA amplificado por canaleta;
3. Adicionar à amostra um volume igual de tampão de amostra 2X.

Pré-aquecimento do Tampão de Corrida:

1. Encher o tanque de eletroforese com 7L de TAE 1X (tampão de corrida);
2. Colocar o módulo de controle de temperatura sobre o tanque de eletroforese; ligar a bomba e o aquecedor; a tampa deve estar no módulo de controle de temperatura durante o pré-aquecimento;
3. Ajustar o controlador de temperatura para a temperatura de 60°C, a taxa de acréscimo para 200°C/h de maneira que o tampão atinja a temperatura desejada o mais rápido possível;
4. O pré aquecimento do tampão pode levar de 1 h a 1,5 h.

Montagem do Sanduíche de Gel Gradiente Paralelo

1. Montar o sanduíche de gel numa superfície limpa; colocar sobre esta superfície a placa grande, em seguida colocar os espaçadores de igual espessura ao longo das margens menores da placa retangular; os espaçadores devem ser colocados de maneira que a abertura dos sulcos fique face aos grampos do sanduíche, próximos à porção superior das placas;
2. Colocar a placa menor sobre os espaçadores de maneira que ela fique alinhada com a margem inferior da placa maior;

3. Afrouxar o parafuso único de cada um dos dois grampos e colocá-los, cada um, em uma das margens menores do sanduíche de placas, com as flechas apontadas para cima e em direção às placas de vidro;
4. Segurar o sanduíche de gel firmemente, apoiá-lo sobre a superfície da bancada e encaixar corretamente o sanduíche de placas nos sulcos dos grampos direito e esquerdo; apertar os parafusos o suficiente para manter as placas no lugar.
5. Colocar o sanduíche de gel na canaleta de alinhamento do suporte branco, com a placa de vidro menor para a frente; afrouxar os parafusos dos grampos do sanduíche e inserir o cartão de alinhamento a fim de alinhar os espaçadores;
6. Alinhar as placas e os espaçadores empurrando simultaneamente os dois grampos para dentro e para baixo, seguindo as setas indicadoras nos grampos; apertar os parafusos o suficiente para manter o sanduíche no lugar;
7. Remover o cartão de alinhamento e, em seguida, remover o sanduíche de placas do suporte branco; confirmar se as placas e espaçadores estão alinhados na parte inferior;
8. Apertar os parafusos dos grampos ao máximo com o auxílio das mãos.

Confecção do Gel Gradiente Paralelo:

1. Colocar a esponja cinza na canaleta frontal (com as presilhas) do suporte branco; colocar o sanduíche de placa sobre a esponja, com a placa menor para frente; pressionar o sanduíche para baixo e girar as presilhas para baixo de maneira a travar o sistema de placas no lugar;
2. Cortar o tubo Tygon fornecido em dois pedaços de 15,5 cm e um pedaço de 9 cm; ligar uma extremidade do tubo de 9 cm à conexão em “Y” e uma conexão de seringa na outra extremidade, na qual uma ponteira de plástico de ponta fina ou uma agulha poderá ser acoplada a fim de despejar o gel entre as placas sem haver vazamentos; acoplar conexões de seringa aos dois pedaços longos de tubo, e, em seguida acoplar estas conexões a seringa de 30 mL; . Não ligar o tubo Tygon longo à conexão de “Y” ;
3. Marcar umas das seringas com LO (para solução de baixa densidade) e outra com HI (para solução de alta densidade); acoplar uma capa de metal a “cabeça” do êmbolo da seringa, e apertar o suficiente para manter o êmbolo no lugar; escorregar cada seringa

- dentro de uma capa de metal apropriada; mover a capa para o meio da seringa, mantendo a graduação de volume visível;
4. Girar a roda do sistema no sentido anti-horário para a posição vertical ou inicial; para ajustar o volume desejado a ser despejado, afrouxar o parafuso de ajuste de volume; colocar o indicador de volume localizado no suporte das seringas no volume desejado; apertar o parafuso de ajuste de volume;
 5. Pipetar as quantidades desejadas das soluções de gel de alta e baixa densidade a partir das soluções estoques; Alicotar??? estes volumes em dois tubos “Falcon”, um marcado com LO (solução de baixa densidade) e outro marcado com HI (solução de alta densidade).

Nota: Os passos abaixo devem ser executados com rapidez (7 a 10 min)

6. Adicionar 150 μ L de persulfato de amônio e 14 μ L de TEMED (para uma concentração final de 0,09%); fechar os tubos e misturar invertendo-os várias vezes; com a seringa conectada ao tubo, aspirar toda a solução de alta densidade para dentro da seringa HI; fazer o mesmo para a solução de baixa densidade para dentro da seringa LO;
7. Remover cuidadosamente as bolhas de ar da seringa LO; empurrar a solução de gel até o final do tubo Tygon; não empurrar a solução para fora do tubo, uma vez que a perda da solução poderá comprometer o volume requerido para a montagem do gel desejado;
8. Colocar a seringa LO no suporte da seringa do sistema de fazer gradiente (lado de densidade LO) segurando a seringa pelo êmbolo e inserindo o parafuso de conexão no sulco de barra de metal do sistema; a montagem de um gel paralelo é considerado como “ top filling method”, portanto colocar a seringa LO no lado correto do sistema de gradiente;
9. Remover cuidadosamente as bolhas de ar da seringa HI; empurrar a solução de gel até o final do tubo Tygon; não empurrar a solução para fora do tubo, uma vez que a perda da solução poderá comprometer o volume requerido para a montagem do gel desejado;
10. Colocar a seringa HI no suporte da seringa do sistema de fazer gradiente (lado de densidade HI) segurando a seringa pelo êmbolo e inserindo o parafuso de conexão no sulco de barra de metal do sistema;

11. Acoplar o tubo Tygon da seringa de baixa densidade e uma das extremidades da conexão em “Y”. Fazer o mesmo para a seringa de alta densidade;
12. Acoplar uma agulha de 19 gauge à extremidade do tubo Tygon menor, e posicionar a agulha entre as placas, no centro superior; a agulha pode ser presa à placa utilizando fita adesiva; despejar as soluções de gel usando o sistema de gradiente;
13. Girar a roda vagarosamente e em velocidade constante a fim de despejar as soluções de gel;
14. Depois de finalizar a confecção do gel, inserir o pente até a profundidade da canaleta desejada; deixar o gel polimerizar por cerca de 60 min;
15. Colocar o tubo Tygon e a agulha em um becker com água e inverter o sentido de rotação da roda do sistema de gradiente, afim de lavar o sistema e se livrar de qualquer solução de gel residual; é importante que a lavagem seja feita logo após a confecção do gel para evitar a polimerização prematura do gel;
16. Após a polimerização, remover o pente puxando-o para cima devagar e gentilmente.

Eletroforese

Montagem da cuba de tampão superior

1. Deitar o suporte interno (“core”) dos sanduíches de placas sobre a bancada. Verificar se a borracha branca em forma de “U” está adequadamente posicionada e livre de partículas que possam causar vazamentos;
 2. Após a polimerização do gel, soltar o sanduíche de gel do suporte branco girando as presilhas 180°C para cima e puxando-as para fora;
 3. Com as placas de vidro menor voltada para o “core”, posicionar o sanduíche de gel de forma que os pinos localizados lateralmente no “core” se encaixem nos sulcos das faces externas dos grampos dos sanduíche;
- Nota: A fim de segurar uma boa vedação do tampão, lubrificar toda frente das borrachas com tampão de corrida antes de acoplar o sanduíche de gel ao “core”;
4. Com os dedos segurando o “core” e os polegares apoiados na parte inferior dos grampos dos sanduíche, empurrar o sanduíche de gel para baixo em direção ao “core” com um simples movimento; um “click” deve ser ouvido;

5. Virar o “core” do outro lado e repetir os passos 1 a 4 para acoplar o segundo sanduíche de gel;
6. Ainda que apenas um gel seja submetido à eletroforese, montar um conjunto de placas de vidro sem os espaçadores, como já descrito anteriormente; isto irá segurar que a cuba superior de eletroforese seja formada;
7. Despejar 350mL de tampão de corrida na cuba de tampão superior. Neste ponto, checar a vedação da cuba superior. Se o tampão estiver vazando, despejar o tampão e um becker, remover os sanduíches de gel, relubrificar as borrachas, e repetir os passos de 1 a 4.

Tanque de eletroforese

1. Quando o tampão de corrida atingir a temperatura desejada, desligar o sistema; desconectar os fios da fonte de poder;
2. Remover e colocar o módulo controlador de temperatura no suporte preto de metal Dcode. Colocar o "core" com os sanduíches de gel acoplados dentro do tanque de eletroforese posicionando o botão vermelho do lado direito e o botão preto do lado esquerdo do sistema; colocar o módulo controlador de temperatura sobre o tanque de eletroforese;
3. Conectar o fio de força e ligar o aparelho, a bomba e o aquecimento; remover a tampa transparente localizada centralmente na parte superior do módulo de temperatura; lavar as canaletas com tampão de corrida para remover qualquer material de gel não polimerizado; se necessário, adicionar mais tampão até a linha "max" no tanque de eletroforese; colocar a tampa transparente de volta ao módulo controlador de temperatura;
4. Deixar o sistema alcançar a temperatura ajustada inicialmente antes de aplicar as amostras.

Aplicação das amostras

1. Remover a tampa transparente; aplicar as amostras usando uma micropipeta e ponteiros de sequenciamento (com pontas bem finas e alongadas).
2. Colocar a tampa transparente novamente na parte superior do módulo controlador de temperatura.

Condições de eletroforese

1. Conectar o equipamento a uma fonte de poder Power Pac 3000 (Bio-Rad), utilizando os conectores localizados nas extremidade dos fios preto e vermelho que saem do módulo controlador de temperatura.
2. Para o DGGE, aplicar uma voltagem de 50 V por 14 h.

Remoção do gel

1. Após a eletroforese, desligar a fonte de poder e o sistema (aquecimento, bomba e força); deixar a haste de aquecimento esfriar por cerca de 1 minuto no tampão.
2. Remover o módulo de controlador de temperatura e colocá-lo sobre o suporte de metal preto Dcode;
3. Deitar o "core" e o sanduíches de gel sobre toalhas de papel para secar o excesso de tampão; remover o sanduíche de gel com os dedos indicadores empurrando a parte inferior dos grampos para cima e com os polegares pressionando as alças pretas do "core" para baixo, até desencaixa-lo. Puxar o sanduíche de placas gentilmente para cima;
4. Afrouxar o parafuso único de cada grampo e remover os grampos do sanduíche; descolar cuidadosamente a placa de vidro menor;
5. Remover os espaçadores; colocar uma placa de acrílico (que não seja à prova de luz UV) sobre o gel, fazendo um sanduíche; virar o sanduíche de maneira que a placa de acrílico fique por baixo. Remover cuidadosamente a placa de vidro que está sobre o gel, de modo que o gel fique sobre a placa de acrílico;
6. Lavar cuidadosamente por cima e por baixo do gel usando água destilada; escorrer o excesso de água, segurando gentilmente o gel com a mão no meio da placa.

Coloração do gel

1. Preparar cerca de 10 ml de solução de coloração: TAE 1X contendo 2,5µl de SYBER Green I;
2. Espalhar a solução de coloração sobre o gel e deixar por cerca de 1 hora no escuro;
3. Escorrer cuidadosamente o excesso da solução de coloração, usando papel toalha para absorver o líquido. Lavar o gel cuidadosamente com água destilada; visualizar o gel em um transiluminador UV e documentar os resultados em um filme Polaroid.

ANEXO 10

Valores de metano em % ao longo do ensaio de enriquecimento dos microrganismos presentes nos sedimentos.

Tempo (d)	Área cromatográfica	CH₄ (%)
4	7582	1,0
6	12384	3,0
7	14562	4,0
11	54875	11
12	78874	15
13	108427	22
18	254885	53
20	268387	61
21	345552	65
22	338026	65
26	260309	67
28	347371	68
33	328031	68
42	375966	67
48	325865	74
62	387595	73
67	308762	71
68	314929	71
75	338949	69

Valores de metano na atmosfera dos frascos-reactores 1 e 2, ao longo dos subcultivos das amostras enriquecidas. As alimentações realizadas durante o período estão marcadas em negrito.

Frasco 1

Tempo (d)	Área cromatográfica	CH ₄ (%)
4	156773	30
7	200870	51
8	222639	53
12	215170	53
19	210684	52
21	224571	51
22	215866	51
27	227717	52
40	260941	50
41	225721	50
42	257701	50
46	270255	56
47	259401	57
48	251339	58
54	326468	68
60	273923	66
63	271679	62
67	256842	54
78	245057	46
89	201934	42
103	321933	59
111	277535	56
117	276332	57

Tempo (d)	Área cromatográfica	CH ₄ (%)
4	162373	29
7	179321	48
8	184218	52
12	218829	55
19	220375	56
21	267625	56
22	236780	56
27	248211	56
40	264310	52
41	226191	51
42	252239	51
46	263726	54
47	241289	54
48	229000	55
54	307677	65
60	288723	70
63	289186	68
67	301504	67
78	356918	67
89	314653	68
103	364226	65
111	348217	71
117	362405	69