

SANDRA REGINA NISHIO

**Avaliação da comunidade microbiana procarionte
através de técnicas moleculares – FISH, PCR/DGGE e
sequenciamento em sistemas artificiais de redução de
cargas: ênfase ao estudo de lagoa de estabilização
facultativa**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari

São Paulo
2010

RESUMO

NISHIO, S. R. **Avaliação da comunidade microbiana procarionte através de técnicas moleculares – FISH, PCR/DGGE e sequenciamento em sistemas artificiais de redução de cargas:** ênfase ao estudo de lagoa de estabilização facultativa. 2010. 102 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Lagoas de estabilização são sistemas de tratamento de esgoto que apresentam diversas vantagens como custo baixo que as tornam muito utilizadas em países em desenvolvimento. Os microorganismos estão entre os maiores responsáveis pela transformação dos compostos orgânicos do esgoto e são a chave do sucesso deste tratamento. Porém, o estudo de lagoas de estabilização ainda é muito básico, limitando-se ao estudo da dinâmica e eficiência, sendo necessário um estudo específico sobre a comunidade microbiana. Muitos organismos não podem ser facilmente cultivados em meios seletivos, o que pode subestimar a diversidade, então a alternativa é a utilização de técnicas de biologia molecular em conjunto para obter resultados mais confiáveis. A combinação de duas ou mais técnicas de biologia molecular para esse tipo de estudo, permite obter resultados mais verdadeiros acerca de uma comunidade microbiana. A estrutura da comunidade microbiana na lagoa de estabilização facultativa da estação de tratamento de esgoto doméstico do Município de Cajati foi descrita baseada nos padrões dos fragmentos do gene RNAr 16S na reação em cadeia da polimerase e eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE), hibridização *in situ* com fluorescência (FISH e CARD-FISH), biblioteca de clones de gene RNAr 16S e sequenciamento. Os padrões obtidos com o DGGE foram correlacionados com as variáveis ambientais coletadas por análise de redundância (RDA). As amostras foram coletadas em três períodos para o estudo da variação temporal, coletou-se em três profundidades (superfície, 0,7 m e 1,5 m) para o estudo espacial vertical e em nove pontos a 0,7 m de profundidade para o estudo espacial horizontal da comunidade. A utilização das técnicas em conjunto para caracterizar a comunidade microbiana da lagoa mostrou que a comunidade da lagoa variou temporalmente e na sua distribuição horizontal, formando duas comunidades distintas, uma no início da lagoa, onde o esgoto bruto entra e outra na região final da lagoa, onde o efluente tratado é despejado no Rio Jacupiranguinha. A técnica de CARD-FISH revelou que a lagoa é dominada pelo filo *Cyanobacteria* enquanto as técnicas de ARDRA, biblioteca de clones do gene RNAr 16S e sequenciamento concomitantemente, revelaram que o filo *Chloroflexi* é o mais representativo. As técnicas de biologia molecular utilizadas simultaneamente revelaram ser eficientes para avaliar a comunidade microbiana da lagoa de estabilização facultativa do município de Cajati.

Palavras-chave: Lagoa de estabilização. Comunidade microbiana. DGGE. FISH. Sequenciamento.

ABSTRACT

NISHIO, S. R. **Prokariotic microbial community assessment by molecular techniques – FISH, PCR/DGGE and sequencing in load reduction artificial systems:** emphasis on the study of facultative stabilization pond. 2010. 102 p. Thesis (Doctorate on Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Stabilization ponds are sewage treatment systems that present several advantages such as low cost make their applicability very high in underdeveloped countries. Microorganisms are among the most responsible for the conversion of sewage organic compounds and they are the key of the treatment success. However, stabilization pond study is still very superficial, narrowing to efficiency and dynamic studies, lacking a specific investigation on microbial community. Many organisms cannot be easily identified if cultivated in selective mediums which might underestimate its diversity. Therefore, another option is the usage of molecular biology techniques combined to each other to obtain reliable results. The combination of two or more molecular techniques in this kind of assessment allows getting more accurate results concerning a microbial community. The facultative stabilization pond microbial community structure of domestic sewage treatment from Cajati city was characterized based on 16S RNAr gene fragments patterns from a polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE), fluorescent in situ hybridization, 16S RNAr gene clone library and sequencing. The patterns obtained by DGGE were co-related to environmental variables by redundancy analysis (RDA). The samples were collected in three intervals to study the seasonal variation, it was collected in three depth (surface, 0,7 m and 1,5 m) to the vertical assessment and in nine spots at 0,7 m depth for the horizontal assessment of the microbial community. The combination of the techniques to characterize the microbial community pond showed that pond community shifted seasonally and horizontally arranging two distinct communities, one at the beginning of the pond on the inflow and another at the end of pond, where the sewage treated outflows to Jacupiranguinha River. CARD-FISH technique showed that *Cyanobacteria* is the dominant phylum whereas ARDRA, 16S RNAr gene clone library and sequencing altogether revealed *Chloroflexi* phylum to be the most representative. It has been efficient to evaluate the facultative stabilization pond microbial community from Cajati city.

Keywords: Stabilization pond. Microbial community. DGGE. FISH. Sequencing.

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A água é imprescindível para a manutenção da vida. Nos últimos anos, com o constante crescimento populacional, a explosão industrial e a falta de preocupação da utilização sustentável dos recursos naturais acarretaram danos nas reservas de água doce. Além disso, a falta de investimentos para sanar problemas de sérias dimensões como este agrava ainda mais a situação atual da escassez de água doce (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB, 2004).

Aproximadamente 75 % da superfície terrestre são ocupadas por água e, deste valor, 3% é água doce. Ainda, desta parcela, os rios e lagos correspondem a apenas 0,001% (CETESB, 2004). A partir da metade do século passado o consumo de água mundial triplicou e, para cada 1.000 litros de água consumida, o ser humano produz 10.000 litros de água poluída (Organização das Nações Unidas – ONU¹, 1993 apud CETESB, 2004). Calcula-se um gasto de 160 bilhões de metros cúbicos de água dos aquíferos por ano (CETESB, 2004).

No Brasil, é muito comum o despejo de esgoto diretamente em corpos naturais de água (CALIJURI et al., 2003). Mais de 90% dos esgotos domésticos e aproximadamente 70% dos efluentes industriais do Brasil são lançados diretamente em corpos de água sem tratamento prévio contaminando-os com poluentes e patógenos e transformando-os em vetores de transmissão de diversas doenças que os tornam inadequados para o consumo (CETESB, 2004; VAZOLLER, 1989; MENDONÇA, 2000). A maioria dos ecossistemas aquáticos brasileiros recebe resíduos produzidos pela atividade humana, com poucas exceções (VAZOLLER, 1996).

Apesar dos receptores naturais de água serem sistemas redutoras de cargas poluidoras devido a sua grande capacidade de autodepuração, a prática excessiva de despejo de esgotos proporcionou um problema ambiental preocupante, uma vez que a quantidade lançada superou a capacidade de suporte de depuração do ambiente natural (CALIJURI et al., 2003).

É imprescindível que soluções para o tratamento das águas residuárias devam ser urgentemente adotadas, pois os sistemas naturais já não conseguem assimilar e depurar o excesso de resíduos humanos lançados na natureza. Com o tratamento dos esgotos sanitários, a matéria orgânica é convertida em produtos oxidados e estáveis que podem ser despejados com segurança em reservatórios naturais sem causar danos ecológicos ou à saúde pública (GRAY, 1989). O esgoto tratado despejado nos sistemas naturais minimiza e, pode até neutralizar a poluição, preservando os corpos d'água receptores e reduzindo a disseminação

¹ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. 1993. Conforme fonte consultada.

de doenças e impactos sócio-econômico (UEHARA; VIDAL, 1989; GRAY, 1989; World Health Organization - WHO, 1989).

Existem diferentes processos biológicos para o tratamento dos esgotos sanitários, tais como lagoas facultativas, lodos ativados, filtros biológicos e reatores anaeróbios (VON SPERLING, 1995).

Sistemas de tratamento biológico são muito utilizados para melhorar a qualidade do efluente a ser lançado no ambiente a fim de atenuar o impacto causado a natureza. O desempenho deste sistema pode estar associado à composição e à atividade microbiana da população presente (AKARSUBASI et al., 2005). Os microrganismos decompõem a matéria orgânica do esgoto em inorgânica permitindo que esta esteja disponível para a produção primária novamente e as bactérias são organismos que dominam em número e biomassa (AMMAN; LEMMER; WAGNER, 1998).

A lagoa de estabilização é uma lagoa artificial utilizada como um reator biológico para reduzir o material orgânico, sólidos e patógenos presentes no esgoto bruto antes deste ser despejado em um corpo d'água. Apresenta como características a alta eficiência e custos de operação e construção muito baixos, necessitando apenas de uma área extensa para a sua construção, além de altas temperaturas que aumentam a eficiência da redução (CAIRNCROS; FEACHEM, 1993; YU; TAY; WILSON, 1997; AGUNWAMBA, 2001). Assim, o sistema torna-se muito adequado para países como o Brasil, em desenvolvimento, de área extensa e de clima tropical.

O tratamento se baseia na autodepuração do esgoto pela própria comunidade de microrganismos presentes, como bactérias, algas e protozoários (MASSERET; AMBLARD; BOURDIER, 1998). O processo sofre influência da sedimentação, radiação solar, pH, níveis de CO₂, concentração do O₂ dissolvido, quantidade de algas e tempo de retenção (CAMPOS; GUERRERO; CÁRDENAS, 2002).

Em todos os sistemas de tratamento de esgoto existentes, os microrganismos procariontes são os mais abundantes e os principais responsáveis pela transformação de compostos orgânicos complexos no sistema (AMMAN; LEMMER; WAGNER, 1998; WAGNER et al., 2002; MOURA et al, 2009). Assim, caracterizar a estrutura, dinâmica e composição de uma comunidade microbiana é fundamental para se compreender a ecologia desta comunidade (DAIMS; STOECKER; WAGNER, 2005; SIYAMBALAPITIYA; BLACKALL, 2005).

A compreensão sobre a estrutura da comunidade microbiana de qualquer processo de tratamento de esgoto pode permitir o melhor funcionamento e a desempenho do sistema. A caracterização da comunidade também possibilitará o conhecimento dos processos específicos à microbiota envolvidos na autodepuração da água residuária (BOON et al., 2002), uma vez que mudanças na diversidade de tais comunidades podem comprometer o processo (FOSTER et al., 2003).

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular e grande utilização na área da ecologia microbiana, permitiu que os problemas associados aos métodos dependentes de cultura que levam a subestimação da verdadeira diversidade fossem superados.

Este trabalho integrou o projeto temático “Estudo dos sistemas redutores de cargas naturais e artificiais para a sustentabilidade dos Recursos Hídricos do Baixo Ribeira de Iguape – SP” e visou o estudo da diversidade da comunidade procariótica presente na lagoa de estabilização facultativa de tratamento de esgotos domésticos do município de Cajati, SP na bacia do Rio do Ribeira de Iguape.

Objetivos

A proposta da presente tese de doutorado foi analisar a estrutura da comunidade bacteriana da lagoa de estabilização facultativa da estação de tratamento de esgoto doméstico do município de Cajati, SP:

- verificar a composição desta comunidade
- sua variação temporal e espacial.
- analisar a aplicabilidade das técnicas de biologia molecular utilizadas isoladas e conjuntamente.

Para a realização do estudo da comunidade foram utilizadas as técnicas de hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH e CARD-FISH), reação em cadeia da polimerase, eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE), biblioteca de clonages do gene RNAr 16S, sequenciamento e análises estatísticas e análises de parâmetros ambientais.

Poucos estudos sobre a estrutura da comunidade de lagoas de estabilização já foram realizados, e nenhum envolvendo as três técnicas moleculares aqui citadas. Uma das finalidades de se utilizar as três técnicas é também de comparar os resultados obtidos entre os três diferentes métodos para observar e testar os pontos fracos e fortes de cada técnica e como

elas afetam o estudo geral da caracterização da estrutura da comunidade da lagoa facultativa de Cajati, SP.

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. As análises de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e *catalysed reported deposition fluorescence in situ Hybridization* (CARD-FISH) foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade de Aarhus, Dinamarca, coordenado pelo Prof. Andreas Schramm. A análise dos parâmetros físico-químicos foi realizada no Laboratório de Engenharia Hidráulica e Sanitária da Escola Politécnica da USP, coordenado pelo Prof. Dr Roque de Passos Bueno e no laboratório do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, USP.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

As lagoas de estabilização são sistemas de tratamento biológico onde são armazenados resíduos líquidos como esgotos domésticos e despejos industriais visando a diminuição de patógenos e resíduos sólidos. O tratamento nas lagoas de estabilização ocorre através de processos naturais, físicos, químicos e biológicos, em sua maioria sem a adoção de máquinas ou gastos com energia elétrica (CAIRNCROSS; FEACHEM, 1993). Do ponto de vista biológico, a cadeia trófica é composta por algas, protozoários flagelados e ciliados, zooplâncton e células procariontes responsáveis pela degradação dos compostos orgânicos (MASSERET; AMBLARD; BOURDIER, 1998; GRAY, 1989).

A lagoa de estabilização facultativa é dividida em três camadas, aeróbia, facultativa e anaeróbia. Na primeira camada as bactérias facultativas e aeróbias degradam a matéria orgânica e liberam nitrogênio e fósforo inorgânicos que são utilizados pelas algas. As algas e cianobactérias produzem oxigênio pela fotossíntese e este é utilizado pelos microrganismos procariontes, que também demandam o oxigênio que entra por difusão na água (UEHARA; VIDAL, 1989; JORDÃO; PESSOA, 1995).

Na camada inferior, ocorre a formação de lodo, a matéria orgânica sólida é hidrolisada pelo metabolismo anaeróbio e os gases metano, nitrogênio, dióxido de carbono e outros produtos degradados são liberados. A degradação anaeróbia depende da temperatura, que deve ser superior a 17 °C para se obter uma boa atividade (UEHARA; VIDAL, 1989). Na zona

facultativa, onde o oxigênio dissolvido não está disponível o tempo todo, é uma zona intermediária entre as duas camadas adjacentes. (UEHARA; VIDAL, 1989).

Os principais decompositores primários na lagoa facultativa são os procariontes facultativos e os aeróbios. Os tipos microbianos dominantes neste sistema são similares àqueles encontrados em outros sistemas de tratamento aeróbios e pertencem, principalmente, aos gêneros *Pseudomonas* sp., *Achromobacter* sp. e *Flavobacterium* sp.; além de grupos como os coliformes, as arqueias metanogênicas, bactérias redutoras de sulfato e as púrpuras do ciclo do enxofre (GRAY, 1989).

Há muito se sabe que apenas uma pequena fração dos microrganismos encontrados no ambiente pode ser isolada em culturas puras (MUYZER, 1999), somente 1% desses organismos podem ser cultivados. Isto é conhecido como “great plate anomaly”, que ocorre devido à inabilidade de reproduzir o ambiente adequado para o crescimento em laboratório dos microrganismos o que tornou os métodos dependentes de cultivo insuficiente para a quantificação e qualificação dos microrganismos nas amostras ambientais (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995; MUYZER; SMALLA, 1998).

Para a caracterização de um sistema de tratamento de esgoto são necessárias análises não apenas biológicas, mas também físicas e químicas para dimensionar e medir a eficiência das estações de tratamento (UEHARA; VIDAL, 1989), e também a relação entre os microrganismos e os processos biogeoquímicos que ocorrem neste sistema. A microbiologia molecular pode ser aplicada para investigar a relação entre a composição dos microrganismos presentes no sistema e os parâmetros dos processos. Em sistemas aquáticos é importante a avaliação das mudanças na estrutura da comunidade microbiana devido a sua base nos ciclos biogeoquímicos (WETZEL², 2001 apud SEKIGUCHI et al., 2001). Sabendo-se a correlação entre os dois fatores, é possível melhorar o controle do sistema microbiano nos sistemas de tratamento de esgoto e também de selecionar estratégias de processo sob medidas para a operação dos sistemas (WILDERER et al., 2002).

Wilderer et al. (2002) ainda afirmaram que, em alguns casos, é necessário saber a composição completa dos organismos em um reator ou em um sistema de tratamento de esgoto e, uma vez que a grande maioria das bactérias não é cultivável, uma alternativa é um banco de dados de genes específicos que possa ser utilizado para identificar as células. Uma

² WETZEL, R. G. The nitrogen cycle. In: WETZEL, R. G (Ed). Limnology. Lake and river ecosystems, 3. Ed. Academic Press: New York. 2001.

biblioteca de clones do gene RNAr 16S ribossômico da população microbiana pode ser sequenciada e o microrganismo identificado. Entretanto, os autores ainda afirmam que o resultado de uma biblioteca de clones ambiental não pode estimar quantitativamente a abundância microbiana.

Revelar a estrutura da comunidade microbiana de um ambiente, sua dinâmica e função são o principal objetivo de muitos estudos ecológicos microbianos (SIYAMBALAPITIYA BLACKALL, 2005; DAIMS; STOECKER; WAGNER, 2005).

1.1.1 Biologia molecular e a ecologia microbiana

A análise do gene RNAr 16S é o método mais utilizado para o estudo filogenético de microrganismos pois este gene é encontrado em todas as células vivas, ocorre em elevado número de cópias e é muito estável (HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998; ZWIRGLMAIER, 2005) além de conter regiões muito conservadas (DAIMS; STOECKER; WAGNER, 2005; NEUFELD; MOHN, 2006; SANZ; KÖCHLING, 2007) que podem ser utilizadas para hibridizar com sondas e iniciadores de PCR (NEUFELD; MOHN, 2006). Podem ainda ser usado para estimar a relação filogenética entre os organismos (ZWIRGLMAIER, 2005). Sequências de RNAr podem ser obtidas de qualquer amostra de origem ambiental ou clínica sem cultivo prévio (AMMAN; KÜHL, 1998). O RNAr 16S permite a comparação entre organismos de diferentes grupos do mesmo domínio (SANZ; KÖCHLING, 2007).

Embora a análise molecular seja considerada um método revolucionário para estudar a comunidade e diversidade microbiana, assim como para complementar e suprir as limitações dos métodos dependentes de cultivo, essa está sujeita a erros que devem ser levados em consideração na análise de dados. O tipo de lise empregado na extração de DNA, os iniciadores escolhidos para amplificação de DNA, amplificação preferencial a certos tipos de sequências e a possibilidade de resultar em formação de quimeras e artefatos na amplificação (REYSENBACH et al., 1992; FARRELLY; RAINEY; STACKERBRANDT, 1995; VON WINTZINGERODE; GÖBEL; STACKERBRANDT, 1997; OSBORNE et al., 2005).

As técnicas de biologia molecular vêm sendo utilizadas em sistemas de tratamento de esgotos, principalmente para o estudo de comunidades ou grupos específicos presentes em EBPR (Enhanced Biological Phosphorus Removal), UASB (digestor anaeróbico de fluxo ascendente em língua inglesa), *wetland*, lodos ativados e reatores anaeróbios em batelada (CROCETTI et al., 2000; AHN et al., 2002; IBEKWE; GIEVE; LYON, 2003; SIN et al., 2006; CALLI et al., 2007; MÜLLER; SCHADE; LEMMER, 2007; WILÉN et al., 2007; AHN

et al., 2007; CARVALHO et al., 2007, MOURA, 2009). Alguns autores utilizaram as técnicas de FISH (hibridização *in situ*), DGGE (eletroforese em gel com gradiente desnaturante), clonagem e seqüenciamento em paralelo para o estudo da estrutura da comunidade pois, apesar das técnicas possuírem suas limitações, cada uma possui vantagens intrínsecas que podem superar as limitações uma das outras (ARAYA et al., 2003; ZIEMBINSKA et al., 2007; MADDEN et al., 2010). Assim, a combinação de três ou mais técnicas moleculares permite o melhor entendimento do funcionamento da estrutura da comunidade e também o estudo mais compreensivo da diversidade, das mudanças sazonais, temporais e espaciais (SANZ; KÖCHLING, 2007).

A aplicação de métodos moleculares como FISH, CARD-FISH, clonagem e DGGE tem levado a maiores entendimentos dos processos microbiológicos que ocorrem em um reator biológico. Os métodos permitem a análise da dinâmica populacional e a identificação das espécies responsáveis pela função degradativa no sistema de tratamento de esgoto (AKARSUBASI et al., 2005).

O gene RNAr 16S tem sido muito utilizado para a identificação direta e estudo da diversidade microbiana ambiental. A amplificação por PCR desse gene em conjunto com outras técnicas de biologia molecular tais como: DGGE, TGGE, ARDRA, biblioteca de clones, TRFLP, entre outros, têm sido extensamente utilizada para o estudo de comunidades microbianas de sistemas de tratamento de esgotos. Entretanto, as técnicas mais utilizadas no estudo da ecologia microbiana de tratamentos de esgoto, são DGGE, FISH e clonagem (SANZ; KÖCHLING, 2007), que segundo os autores isso ocorre devido às suas vantagens em relação aos outros métodos, são mais confiáveis, por serem técnicas que se complementam e o custo benefício.

1.1.2 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante

A técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) se baseia na mobilidade eletroforética de fragmentos de DNA parcialmente desnaturados de mesmos tamanhos, mas de diferentes seqüências de pares de base amplificados por PCR de uma mesma amostra ambiental em um gel de poliacrilamida que contém gradiente linear desnaturante crescente composto por uréia e formamida (MUYZER; DE WALL; UITTERLINDEN, 1993). Quando seqüências de mesmos pares de bases atingem a temperatura de desnaturação a uma determinada posição no gel, a migração praticamente cessa. Seqüências de pares de bases diferentes irão parar de migrar em diferentes posições

devido à variação de gradiente de desnaturação e, assim, podem ser separados pelo DGGE (LERMAN et. al.,1984). As duas cadeias de DNA se separam em uma temperatura específica, dependendo das pontes de hidrogênio formadas entre as duas fitas (DORIGO; VOLATIER; HUMBERT, 2005).

Uma seqüência de oligonucleotídeo rica em guanidina e citosina (grampo de GC) que varia entre 30 e 40 de base é anexada no final 5' do oligonucleotídeos iniciador forward, modificando o comportamento de desnaturação e praticamente 100% das seqüências possam ser detectadas (MUYZER; SMALLA, 1998; DORIGO; VOLATIER; HUMBERT, 2005). Assim, o fragmento amplificado por PCR inteiro pode ser desnaturado no gel de DGGE e pára de migrar quando alcança a temperatura máxima, permanecendo na sua configuração de dupla fita, impedindo a completa separação de ambas as fitas de DNA (MYERS et al, 1985).

O perfil das bandas de DNA pode ser visualizado corando-se o gel de DGGE com brometo de etídio (MUYZER; DE WALL; UITTERLINDEN, 1993; MUYZER; SMALLA, 1998), SYBRGREEN que apesar de apresentar a vantagem de produzir menos *background* pode deixar de corar bandas de DNA menos dominantes e nitrato de prata que por ser mais sensível que os outros métodos, permite a coloração das bandas menos intensas e também cora fita simples de DNA (MUYZER; SMALLA, 1998). Bandas mais fracas de géis de DGGE de comunidades microbiana são melhores visualizadas quando coradas com nitrato de prata do que com *Sybr Gold*, permitindo um perfil mais representativo (GRIFFITHS et al., 2000).

Griffiths et al. (2000) através de dendrogramas construídos pelo método UPGMA (coeficiente de Dice) observou que havia diferenças entre as réplicas das extrações de uma mesma amostra. O autor concluiu que o estudo dos genes RNAr 16S tem fornecido um grande conhecimento da diversidade bacteriana no ambiente, o que provocou uma revolução na sistemática microbiana.

Sekiguchi et al. (2001) realizaram o DGGE do PCR do gene RNAr 16S de uma amostra de ambiental de um rio. Os amplicons presentes nas bandas foram reamplificados com o mesmo par de iniciadores utilizado anteriormente e foi feito o DGGE dessa reamplificação para verificar se a posição seria a mesma que da banda original e para que as bandas se separassem totalmente. Os autores construíram uma biblioteca de clones de uma única banda *unreadable* e foram sequenciados 13 clones aleatórios da biblioteca. A migração dos insertos dos clones no gel de DGGE foram diferentes e a biblioteca consistiu de diferentes

seqüências filogenéticas, apesar de todos os clones serem oriundos de uma única banda do perfil de DGGE.

Muitos trabalhos utilizaram a região V3 do RNAr 16S para estudar uma comunidade microbiana através da técnica de DGGE (ØVREÅS et al., 1997; AMPE; MIAMBI, 2000; SEKIGUCHI et al.; 2001; WATANABE; KODAMA; HARAYAMA, 2001; PEARCE, 2003; MORGAN et. al., 2002; YU; MORRISON, 2004; MURRAY, HOLLIBAUGH; ORREGO, 1996) e de sistemas de tratamento de esgoto como o lodo ativado (GRIFFITHS et al., 2000; CURTIS; CRAINE, 1998), *wetlands* (NIKOLAUSZ et al., 2005; LAPARA et al., 2002), biorreatores (MIURA, 2007), pois essa é a região que apresenta maior quantidade de bandas no gel e assim produz um perfil mais significativo.

Yu e Morrison (2004) estudando a comunidade microbiana do rúmen de ovelhas mostraram que a amplificação das regiões V1 e V3 produzia mais bandas intensas e que a região V3 foi a que apresentou maior número de bandas no gel. Foi observado também que os iniciadores 968F-1401R (região V6-V8) apresentaram os menores valores de riqueza comparados com V3 a V5 e essas duas regiões foram a que apresentaram o melhor perfil de gel de DGGE. Os autores concluíram que apenas a amplificação da região V3 produziu o perfil de DGGE mais informativo.

O DGGE pode ser utilizado como uma técnica de *fingerprinting* genético para analisar o perfil da diversidade de uma comunidade microbiana quantitativamente e qualitativamente. Estudos com amostras de lodos ativados mostram que o método de PCR-DGGE pode ser muito poderoso para caracterizar a estrutura da comunidade microbiana no nível de gênero e espécie e para monitorar as mudanças da comunidade ao longo do tempo (ONUKEI et al., 2000). Assim, o DGGE é também muito poderoso e adaptado para demonstrar a diversidade de comunidade de água residuária, mas resultados podem ser obtidos utilizando-se em conjunto a outros métodos moleculares, como FISH (WILDERER et al., 2002).

Os métodos DGGE e TGGE (eletroforese em gel com gradiente de temperatura) podem ser utilizados para comparar diferentes protocolos de extração de DNA de solos. Heuer e Smalla (1997, apud MUYZER; SMALLA, 1998) obtiveram perfis de TGGE diferentes de produtos de PCR de duas extrações diferentes de DNA genômico de uma mesma amostra. A extração mais violenta, que utilizou lisozima, SDS e *bead beating*, apresentou mais bandas no gel que aquela que utilizou apenas lisozima e SDS.

O DGGE é uma técnica de *fingerprinting* rápida, pouco onerosa e que possibilita a análise simultânea de amostras múltiplas, permitindo o estudo das mudanças da comunidade

no tempo e por mudanças ambientais (MUYZER, 1999; MUYZER; SMALLA, 1998). Permite também a identificação dos membros da comunidade a partir da recuperação e seqüenciamento dos produtos amplificados (YU; MORRISON, 2004). Técnicas de clonagem, ao contrário, não permitem a análise simultânea de muitas amostras diferentes (MUYZER; SMALLA, 1998), e são técnicas demoradas, de metodologia mais complexa e mais cara (YU; MORRISON, 2004).

Apesar de muitas qualidades, o DGGE apresenta limitações. Uma das maiores limitações do DGGE é que somente fragmentos de até 500bp podem ser separados no gel de acrilamida o que limita a inferência filogenética no posterior sequenciamento (MYERS et al., 1985; CHANG et al., 2000). Também não é sempre possível separar fragmentos de DNA que possuem certa variação de seqüências e a amplificação de diferentes regiões V do gene RNAr 16S ribossômico e diferentes condições de DGGE podem resultar em variações no perfil de um mesmo gel (MUYZER; SMALLA, 1998).

O DGGE apresenta limites de detecção, isto é, apenas espécies predominantes presentes na comunidade podem ser detectadas e muitas bandas não podem ser discriminadas umas das outras (NIKOLAUSZ et al., 2005). A população detectada no gel pode corresponder a menos de 1% dos organismos existentes na amostra (FROMIN et al., 2002).

Nikolauzs et al. (2005) mostraram em um estudo que o rastro formado no gel de poliacrilamida, que teoricamente representa amplicons de baixa abundância e consequentemente, membros da comunidade de menor dominância, foram reamplificados e separados em gel de DGGE sob as mesmas condições anteriores, observando-se padrões de banda similares ao do gel original apesar do rastro inicial encontrar-se entre bandas. Isto é, o rastro no primeiro gel não era uma banda, entretanto, quando após a reamplificação apenas do rastro, numa segunda aplicação em gel, ele se separou em bandas. Os resultados mostraram que diferentes seqüências com comportamento de desnaturação similar migram juntas e amplicons dominantes nem sempre se encontram em apenas uma banda no gel. Além disso, constatou-se que o padrão de bandas no gel de DGGE pode não ser o resultado simples da separação de diferentes amplicons de acordo com o seu comportamento de desnaturação, mas a consequência de interações complexas entre diferentes estruturas de DNA.

A escolha de uma região V utilizada para amplificação pode apresentar grande influência nos perfis do gel de DGGE, e mesmo diferenças mínimas na seqüência de oligonucleotídeos iniciadores, podem resultar em diferentes perfis da diversidade microbiana (YU; MORRISON, 2004).

Combinações particulares de fragmentos de genes alvos e oligonucleotídeos iniciadores podem resultar em perfis de DGGE errôneos. Janse, Bok e Zwart (2004), encontraram perfis nos quais bandas proeminentes estavam acompanhadas muito proximamente por outras bandas. Essa banda dupla foi encontrada na análise de produtos de PCR de RNAr 16S de bactéria e RNAr 18S de eucariontes. De acordo com os autores, não há nenhuma explicação para a formação dessas bandas duplas, uma vez que foram geradas usando iniciadores não-degenerados e após ampliações de DNA de culturas puras. As bandas duplas interferem na interpretação e análise de géis de DGGE, pois superestimam a diversidade das seqüências. Além disso, a sobreposição de bandas pode dificultar o seqüenciamento destas, já que haverá mais de uma seqüência de DNA. Os autores propuseram que o aumento do tempo da extensão final do PCR de alguns minutos para 30 minutos aparentemente seria suficiente para prevenir essas bandas quando se empregam iniciadores universais para Eucariotos. Uma explicação para a formação de bandas dupla está no fato de, durante os ciclos do PCR, algum produto secundário seja formado devido a uma interrupção na elongação, obstruindo a Taq polimerase. Assim, a incubação final de 30 minutos para a elongação a temperaturas altas pode destruir tais estruturas e ao mesmo tempo permite que a enzima complete a elongação.

Sekiguchi et al. (2001) realizaram o estudo da diversidade de bactérias de um rio utilizando oligonucleotídeos iniciadores que visavam a região V3 (357F-518R). Os resultados mostraram que uma única banda do DGGE não representou um único tipo de bactéria; a banda na qual migrou para a mesma posição em linhas diferentes pode não ser a mesma bactéria. Assim, sugere-se a análise conjunta com outros métodos moleculares como a clonagem de RNAr 16S e FISH para o estudo da diversidade microbiana. A heterogeneidade das bandas pode ser atribuída à incorporação errada ou à leitura errônea durante o PCR, durante o seqüenciamento ou até mesmo à presença de bandas fracas muito próximas ou sobrepostas à banda seqüenciada. O método de PCR pode produzir alguns problemas como formação de quimeras, heteroduplex e diferença no número de cópias do gene RNAr 16S que podem ser refletidas no gel de DGGE (WATANABE; KODAMA; HARAYAMA, 2001).

Diversos autores que utilizaram a técnica de DGGE para estudar a estrutura da comunidade e sua composição e diversidade em sistemas de tratamento de esgoto, observaram que o DGGE pode não resultar em *fingerprinting* confiável das comunidades estudadas, apresentando bandas inespecíficas, só observadas com a clonagem destas (LAPARA et al., 2002; ROWAN et al., 2003). Uma única banda em um gel, pode conter uma pequena

quantidade de DNA heterogêneo. Isso pode ocorrer por problemas já no PCR, como a incorporação errônea de uma base ou devido à presença de bandas fracas que podem estar localizadas muito proximamente a banda alvo (SEKIGUCHI et al., 2001). Assim, uma única banda pode não representar um único tipo de bactéria e bandas que migram na mesma posição em colunas diferentes podem representar bactérias diferentes. Dessa forma, os autores sugerem que o estudo da estrutura de uma comunidade bacteriana deva ser feito pela análise combinada de várias técnicas como PCR-DGGE, biblioteca de clones de FISH para se obter um resultado mais genuíno da estrutura da comunidade bacteriana estudada

O isolamento do gene RNAr 16S para análise filogenética pode ser menos seletivo e representar uma visão mais representativa da estrutura da comunidade que técnicas clássicas, mas apresenta diversas limitações, como a metodologia de coleta e seleção de DNA durante os passos da clonagem. Os oligonucleotídeos iniciadores universais podem proporcionar a amplificação preferencial de alguns DNA, levando a uma interpretação errônea da estrutura da comunidade (REYSENBACH et al., 1992).

As comunidades microbianas diferem quantitativamente e qualitativamente na composição e cada setor da comunidade está sujeita as mudanças ambientais diferentes. A escala da diversidade microbiana pode ser estimada por hibridização com sondas no DNA microbiano em células vivas, parâmetros físico químicos e pela análise do perfil da diversidade por DGGE do gene RNAr 16S (VON WINTZINGERODE; GOBEL; STACKERBRANDT, 1997) . A lise celular pode influenciar no PCR, a metodologia de extração de DNA escolhida caso seja insuficiente ou preferencial a lise de certas células pode resultar uma análise da diversidade subestimada. Entretanto, condições muito severas, que são necessárias para a lise celular de bactérias gram-positivas, podem gerar ácidos nucléicos altamente fragmentados provindos do DNA das bactérias gram-negativas que podem quimeras que interferirão nas análises de DGGE e clonagens subseqüentes. A amplificação de DNA extraído de amostras ambientais por PCR pode ser inibida por contaminantes co-extraídos, como ácidos húmicos que inibem as enzimas, por amplificação diferencial (alguns iniciadores podem ter menor especificidade com alguns DNAs), pela não amplificação de todos os DNAs presentes em uma amostra ambiental e por formação de quimeras (VON WINTZINGERODE; GOBEL; STACKERBRANDT, 1997). Tal variedade de fragmentos pode representar a diversidade biológica da amostra. Os fragmentos de DNA de seqüência diferentes que nem sempre se separaram durante a eletroforese e diferentes condições de

eletroforeses aplicadas ao gel de DGGE podem resultar em variações no perfil deste (MUYZER; SMALLA, 1998).

A análise de redundância (RDA) analisa os dados dos organismos (variável dependente) e as variáveis ambientais (variáveis independentes), é uma forma de se estabelecer a relação entre a variação temporal e espacial de um ambiente com a estrutura da comunidade obtida em um perfil de gel de DGGE. É uma extensão da análise de componentes principais (PCA). Múltiplas regressões lineares são utilizadas para explicar a variação entre as variáveis dependentes e independentes a fim de encontrar a melhor ordenação das variáveis (RAMETTE, 2007). Assim como o PCA, RDA identifica eixos ortogonais que explicam a variação na composição das espécies, mas ao contrário do PCA, os eixos são constrictos em uma combinação linear de variáveis, sendo assim, uma forma de regressão multivariada (Canoco for Windows 4.5, Biometrics, Wageningen, the Netherlands).

1.1.3 Hibridização fluorescente *in situ*

Hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) é uma técnica que permite a visualização dos microrganismos no seu habitat natural (ZWIRGLMAIER, 2005) sem a dependência de cultivo, ou de extração de DNA ou a amplificação de fragmentos de nucleotídeos, como o PCR. Para tanto, utiliza-se sondas oligonucleotídicas contendo 17 a 34 nucleotídeos (AMAN; KEUMHOLTZ; STAHL, 1990). A técnica também permite determinar a morfologia celular, a abundância dos indivíduos, a distribuição espacial *in situ* e a identificação filogenética (AMAN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995; DAIMS; STOCKER; WAGNER, 2005).

A técnica se baseia na fixação da célula inteira com paraformaldeído mantendo a sua integridade celular, na permeabilização da parede que facilita a entrada das sondas de oligonucleotídeos, hibridização do RNAr com as sondas supracitadas em temperaturas ótimas que pode ser melhorada com concentrações ótimas de formamida e lavagem para a retirada das sondas que não hibridizaram com o RNA (ZWIRGLMAIER, 1995; HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998; AMANN; FUCHS; BEHRENS, 2001).

O RNAr é a molécula ideal para o estudo dos procariotos porque pode ser encontrado em todos os organismos vivos, ocorrem em número de cópias alto e estável (HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998; ZWIRGLMAIER, 2005), contém regiões altamente não conservadas e variáveis (DAIMS; STOCKER; WAGNER, 2005) e pode ser utilizado para inferir a relação filogenética entre microrganismos (ZWIRGLMAIER, 2005). Entretanto, a

concentração mínima de RNAr segundo Amann, Ludwig e Schleifer (1995) em uma célula, deve ser da ordem de milhares para que haja um sinal ótimo de uma sonda oligonucleotídica fluorescente monomarcada. As regiões variáveis apresentam regiões de acessibilidade muito estreitas e de forte ligação, tendo como alvos as regiões mais específicas possíveis da molécula de RNAr 16S, podendo determinar o gênero e até a espécie (FUCHS et al., 1998).

As amostras ambientais geralmente apresentam *background* de fluorescência e contém células com pouco conteúdo de RNAr e a identificação por FISH depende somente da fluorescência do sinal emitido pela hibridização da sonda. Oligonucleotídeos não marcados com fluorocromos, ou *helpers*, em conjunto com sondas marcadas, podem aumentar o sinal de sondas fracas (FUCHS et al., 2000). E se aplicado de uma forma correta, o *helper* pode reduzir o tempo e o esforço gasto na procura de regiões alvo inacessíveis para as sondas marcadas, isso ajuda a melhorar a aplicabilidade do FISH a amostras ambientais.

A técnica de FISH pode identificar uma célula individualmente, entretanto não é comum a visualização de uma única célula em um microscópio, segundo Amann, Ludwig e Schleifer (1995) é muito tediosa a visualização de menos de 10^3 células por cm^2 o que mostra a necessidade de que as células alvo sejam concentradas antes da análise de FISH por meio de filtração ou centrifugação, por exemplo.

Embora uma ótima escolha para a análise de estrutura da comunidade microbiana, a técnica não proporciona nenhuma informação a respeito da ecofisiologia de microrganismo e nem da atividade fisiológica da célula pode ser inferida pelo conteúdo celular de RNAr (WAGNER; HORN; DAIMS, 2003; WAGNER 2005). A escolha do RNAr como molécula alvo limita a técnica por ser um ácido nucléico de taxa de mutação lenta que não apresenta regiões alvo que diferenciam entre cepas de espécies procarióticas (WAGNER; HORN; DAIMS, 2003). Nos últimos anos houve uma melhora significativa na técnica de FISH e uma das alternativas encontrada para superar os problemas e limitações desta técnica é combiná-lo com outras técnicas (WAGNER; HORN; DAIMS, 2003).

Estudos nos quais é necessário quantificar o exato número de células e a localização dos microrganismos em um determinado ambiente, o método de escolha mais recomendado é o FISH (AMAN; FUCHS; BEHRENS, 2001). Segundo Wagner (2005), a abundância de populações em lodos ativados pode ser precisamente quantificada com o uso da técnica de FISH. Wilderer et al. (2002) em um estudo comparativo de métodos científicos na pesquisa de resíduos líquidos, afirmaram que a utilização da técnica de FISH é a melhor escolha para

estimar o número de indivíduos bacterianos, verificar a presença e a atividade celular em lodos ativados e biofilmes.

A análise da comunidade por FISH oferece uma idéia da biodiversidade bacteriana. Ainda, a detecção da célula *in situ* permite vislumbrar a estrutura da comunidade microbiana revelando as funções ambientais dos microrganismos (ZWIRGLMAYER, 2005), além da sua morfologia, abundância e filogenia (DAIMS; STOECKER; WAGNER, 2005).

O método tem sido utilizado para descrever a distribuição temporal e espacial de *Bacteria* e *Archaea* de diversos ambientes (ZARDA et al., 1997; LLOBET-BROSSA; ROSSELO-MORA; AMANN, 1998; SCHRAMM et al., 1998), especificar o nicho ecológico das *Bacteria* e *Archaea* nos ciclos biogeoquímicos (HERNDL et al., 2005), na dinâmica das teias alimentares (GINIGE; KELLER; BLACKALL, 2005), na análise de mudanças temporais da estrutura da comunidade bacteriana de lodos ativados (ZIEMBINSKA et al., 2007) e no estudo da abundância de populações específicas em diversas amostras ambientais (WAGNER; HORN; DAIMS, 2003; ESCHENHAGEN; SCHUPPLER; ROSKE, 2003; GIESEKE et al., 2001; RAVENSCHLAG et al., 2000).

A técnica também apresenta algumas limitações, mas, ao contrário do DGGE e da clonagem, essas limitações não são decorrentes do PCR. Assim, o FISH é complementar a essas técnicas dependentes do PCR (PEARCE, 2003).

Uma das limitações do FISH é a não acessibilidade de todas as regiões alvo na molécula de RNAr 16S às sondas oligonucleotídicas (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995; FUCHS et al., 2000). Além disso, algumas sondas falham em emitir uma intensidade suficientemente detectável da fluorescência, o que pode ser resultado tanto de um número insuficiente de moléculas alvo como da baixa acessibilidade desta (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). A hibridização da sonda pode não ocorrer, pois o RNAr sofre influência de interações RNA-RNA ou RNA-proteína e a estrutura espacial do ribossomo é muito estável podendo influenciar na interferência da interação da sonda pois os efeitos configuracionais da fixação do ribossomo não são muito conhecidos (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995; HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998).

Uma das alternativas para aumentar a acessibilidade das sondas à região alvo e a adição de formamida ao tampão de hibridação que diminui a força das pontes de hidrogênio (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). Outros fatores que limitam a sensibilidade da técnica é o fato das sondas oligonucleotídicas serem mono-marcadas com a molécula fluorescente e, em geral, as sondas serem baseadas em seqüências de nucleotídeos da

molécula de RNAr 16S da *Escherichia coli*. Assim, em alguns casos as regiões alvo, que variam muito entre os microrganismos que diferem filogeneticamente, podem não servir para outros organismos (WAGNER; HORN; DAIMS, 2003). Deste modo, aprimoramentos dessa técnica estão sendo realizados, e o CARD-FISH é uma delas.

1.1.4 Catalyzed Reported Deposition-FISH

CARD-FISH (catalyzed reporter deposition-FISH) consiste na amplificação do sinal da fluorescência pela deposição de um elevado número de moléculas de tiramida haptênica (TSA) marcadas peroxidase *horseradish* (HRP) (PERNTHALER; PERNTHALER; AMANN, 2002). A HRP pode catalisar a dimerização da tiramina em grandes concentrações (ZAITSU et al., 1980 apud PERNTHALER; PERNTHALER; AMANN, 2002). Quando as tiraminas marcadas com fluorocromo são utilizadas, uma quantidade grande de moléculas fluorescentes pode ser introduzida a uma mesma região *in situ*, aumentando a sensibilidade do FISH e de sua intensidade de sinal (PERNTHALER; PERNTHALER; AMANN, 2002; SEKAR et al., 2003).

A maior vantagem do CARD-FISH em relação ao FISH é o aumento da intensidade da fluorescência do RNAr hibridizado, necessário no estudo de organismos de baixa atividade metabólica que contêm baixa quantidade de RNAr (ISHII et al., 2004; PERNTHALER; PERNTHALER; AMANN, 2002; WOEBKEN et al., 2007). A intensidade da fluorescência de células hibridizadas por CARD-FISH pode ser até 20 vezes maior do que naquelas hibridizadas por FISH (SCHÖNHUBER et al., 1997).

Essa técnica é muito utilizada para o estudo da atividade metabólica, quantificação, identificação e detecção de picoplâncton marinho, principalmente de ambientes oligotróficos (HERNDL et al., 2005; TEIRA et al., 2004; SEKAR et al., 2003; PERNTHALER; PERNTHALER; AMANN, 2002; PERNTHALER; PERNTHALER, 2007) e também já foi utilizado para a análise da comunidade procariótica de água potável e subterrânea (WILHARTITZ et al., 2007).

1.1.5 Biblioteca de clones do gene RNAr 16S

A técnica de clonagem do gene RNAr 16S consiste em ligar um fragmento de DNA ambiental a um vetor, geralmente um plasmídeo, e introduzi-lo a uma célula hospedeira *E. coli*. Em seguida, a cultura de *E. coli* é plaqueada em meio com ágar e os insertos são isolados e sequenciados. Essas sequências são comparativamente analisadas e a identificação

filogenética pode ser inferida (MUYZER; SMALLA, 1998). A técnica, além da identificação filogenética, permite também determinar a abundância relativa das OTUs (unidade taxonômica operacional) de uma comunidade (SANZ; KÖCHLING, 2007).

A clonagem apresenta como limitação a não possibilidade de ser utilizada para a análise de diferentes comunidades microbianas, ao mesmo tempo a quantificação da abundância e distribuição espacial de uma população e o estudo das mudanças do comportamento de uma comunidade através do tempo (MUYZER; SMALLA, 1998). Além de não ser uma técnica quantitativa, somente qualitativa (SANZ; KÖCHLING, 2007). A frequência de clones não pode, ainda, ser utilizada como um meio confiável de determinar a verdadeira estrutura da comunidade, uma vez que diferentes bactérias podem conter diferentes quantidades de operons RNAr por genoma (SNAIDR et al., 1997)

1.1.6 Metodologias empregadas em conjunto

A combinação das três técnicas moleculares permite o melhor entendimento do funcionamento da estrutura da comunidade e também o estudo mais compreensivo de suas mudanças sazonais, temporais e espaciais.

A técnica de DGGE permite a avaliação da diversidade amostrada e os fragmentos de DNA podem ser subsequentemente sequenciadas, entretanto, o resultado do sequenciamento é inferior àquele obtido a partir de uma biblioteca de clones (ALONSO-SÁEZ et al., 2006) uma vez que um fragmento de DNA sequenciado de uma banda extraída do gel de DGGE não possui mais que 500 pares de bases enquanto que a sequência de um de um clone pode chegar até mais de 1500 pb. A técnica de FISH permite a quantificação de diversos grupos bacterianos e não está sujeito aos erros associados à amplificação por PCR. Entretanto essa técnica está limitada a quantidade de sondas disponíveis, e essas sondas geralmente só podem ser produzidas a partir de linhagens já identificadas ou de clones produzidos (ALONSO-SÁEZ et al., 2006).

A utilização das técnicas de FISH, DGGE, clonagem e sequenciamento para o estudo da estrutura da comunidade em conjunto, é interessante para o estudo de uma comunidade, pois cada uma possui suas limitações e erros, entretanto cada uma possui vantagens intrínsecas que podem superar as limitações das outras técnicas (Tabela. 1).

Tabela 1 – Comparação entre as técnicas de DGGE, FISH e clonagem/sequenciamento, suas vantagens e limitações.

	DGGE	FISH	Clonagem/sequenc
Tempo	Um a dois dias	1 dia	três a cinco
Resultado do sequenciamento	Limitado: fragmento sequenciado <500pb	Não se aplica	Melhor resultado
Bias extração de DNA e PCR	Sim	Não	Sim
Composição da comunidade	não	Sim, mas é necessário saber previamente o q se pode encontrar para selecionar as sondas	sim
Quantitativo	Não	Semi-quantitativo	Não
Qualitativo	Não	Sim	Sim
Análise de várias amostras ao mesmo tempo	Adequado	Adequado	Não adequado
Visualização direta dos organismos não cultivados	Não	Sim	Não
Diferenciação de microrganismos ativos e inativos	Não	Sim	Não
Monitoramento de biorreatores	Sim através de comparação de padrão de bandas	Sim, análise de espécies indicadoras	Não

Burr et al. (2006) defendem a utilização combinada das técnicas de DGGE e clonagem, tirando proveito das vantagens de cada uma das técnicas. Pela primeira técnica foi analisado o perfil da comunidade bacteriana inteira e, com a segunda, foi feito o sequenciamento do DNA. Os autores concluíram que a clonagem é trabalhosa e a menos que seja feita uma análise de *fingerprinting* dos clones, geralmente ocorrem sequenciamentos redundantes. Por sua vez, a técnica de DGGE pode apresentar muitos artefatos além do tamanho dos fragmentos de DNA amplificados serem muito pequenos (>500bp) e, em muitos casos, para recuperar a informação de bandas excisadas é necessária a clonagem já que é muito difícil cortar do gel uma banda única isoladamente sem haver contaminações com outras.

Os autores utilizaram o DGGE pra mostrar o perfil do gene RNAr 16S ribossômico de três ambientes que diferiam em seus níveis esperados da diversidade microbiana, um biofilme de um reator, um lago e um solo de um gramado. A região alvo dos iniciadores utilizados para o PCR-DGGE foi a V6-V8. Dois *pools* de biblioteca de clones contendo 50 clones cada foram separados em gel de poliacrilamida, DGGE das amostras sem clonagem foram comparadas. Diferenças entre os perfis de bandas dos *pools* de clones e do DGGE sem clonagem foram verificadas, havia muito mais bandas no perfil do segundo que no do primeiro, além disso, havia menos de 30 bandas em cada pool, indicando ter ocorrido co-migração, o que não significa que as bandas representem o mesmo genótipo. Entretanto, foram encontradas muitas

bandas equivalentes nos *pools* de clones e no DGGE direto. O perfil do DGGE direto mostrou alta diversidade de bandas e equitabilidade, entretanto a mistura entre bandas intensas e fracas e um *background* forte pode consistir em diversidade ou artefato das técnicas, tornando quase impossível a determinação do número total de bandas. O que não ocorreu no perfil de bandas do DGGE dos *pools* de clones, que ficaram bem separados, com intensidades similares, menos quantidade de bandas e pouco *background*.

Van Der Gutch et al. (2005) caracterizaram as comunidades bacterianas de quatro lagos de água doce utilizando biblioteca de clones e PCR-DGGE combinado com análises estatísticas para estudar as diferenças na comunidade bacteriana entre os quatro lagos e relacionar diferenças na estrutura da comunidade bacteriana às variáveis ambientais. Os clones foram analisados por DGGE para determinar quais eram os clones que possuíam os mesmos insertos. Os autores sugeriram que, para obtenção de dados mais confiáveis para a quantificação é necessária a complementação do estudo com a utilização de outros métodos como hibridização *in situ* com sondas específicas.

Watanabe, Kodama e Harayama (2001) estudaram a sucessão temporal e geográfica da estrutura da comunidade bacteriana ao longo de um rio na China através de das técnicas de DGGE e análise de biblioteca de clones do gene RNAr 16S ribossômico. As bandas foram excisadas e seqüenciadas. Quando o sequenciamento das bandas falhava devido à presença de picos ambíguos, o DNA amplificado era clonado, e assim era montada uma biblioteca de clones, e os clones eram seqüenciados aleatoriamente. Foram selecionadas 14 bandas para o sequenciamento, destas, apenas duas tiveram o sequenciamento realizado. As outras 12 bandas tiveram o sequenciamento após a clonagem devido à co-migração de DNA provenientes de diferentes linhagens de bactérias. Os autores utilizaram a técnica de DGGE para comparar a estrutura da comunidade bacteriana e o método de biblioteca de clones para analisar a composição da comunidade bacteriana em cada estação de coleta.

A aplicação de métodos moleculares qualitativos como FISH, CARD-FISH e clonagem e quantitativos como DGGE tem levado a maiores entendimentos dos processos microbiológicos que ocorrem em um reator biológico. Os métodos permitem a análise da dinâmica populacional e a identificação das espécies responsáveis pela função degradativa no sistema de tratamento de esgoto (AKARUBASI, et al., 2005).

4 CONCLUSÃO

Nesse trabalho foram utilizadas técnicas de biologia molecular dentre as mais usadas para o estudo de comunidades microbianas ambientais, FISH, CARD-FISH, DGGE, ARDRA, RDA, biblioteca de clones do gene RNAr 16S e seqüenciamento.

As técnicas moleculares utilizadas neste trabalho, PCR-DGGE, FISH, CARD-FISH, clonagem e seqüenciamento, permitiram compreender melhor a estrutura da comunidade presente na lagoa de estabilização facultativa de Cajati, SP. Pôde-se separar a lagoa em duas comunidades diferentes, a da região inicial e central da lagoa e a da região final.

A pesar dos resultados da técnica de CARD-FISH se mostrar negativa, as técnicas de RDA e DGGE demonstraram haver variação temporal nas comunidades. Já quanto a mostrar se há variação das comunidades em relação à variação espacial vertical, as técnicas constataram não haver. Indicando que a comunidade da lagoa modifica conforme o tempo, isto é, que ela não é estável. Apesar da lagoa de estabilização facultativa de Cajati ser um sistema fechado, ela recebe efluentes variáveis da população do município, sendo propícia a alteração da comunidade bacteriana e a matéria orgânica no efluente ao longo do tempo e, conseqüentemente, na lagoa.

Quanto à variação espacial horizontal, as técnicas de DGGE e ARDRA concordaram novamente que há na lagoa de estabilização facultativa de Cajati nas épocas estudadas. Entretanto o CARD-FISH mostrou ser negativa.

Os táxons obtidos nas técnicas de CARD-FISH e sequenciamento foram coerentes mas houve algumas diferenças. O CARD-FISH mostrou que as cianobactérias dominaram as amostras coletadas e são mais abundantes no início da lagoa. Pela técnica de seqüenciamento, *Chloroflexi* dominou os clones obtidos. Enquanto verificou-se pouca representatividade de high GC pela técnica de CARD-FISH, no sequenciamento, este grupo foi a segunda maior representatividade entre os clones.

O CARD-FISH mostrou ser mais eficiente para o tipo de amostra coletada na lagoa de estabilização facultativa em relação ao FISH e mostrou ser adequado para caracterizar qualitativamente a comunidade estudada junto com a biblioteca de clones do RNAr 16S. O DGGE mostrou ser adequado para caracterizar quantitativamente a lagoa estudada.

As técnicas de biologia molecular utilizadas simultaneamente revelaram ser eficientes para avaliar a comunidade microbiana da lagoa de estabilização facultativa do município de Cajati. Enquanto a utilização individual de cada uma delas para tal trouxe resultados insatisfatórios e precários.

REFERÊNCIAS*

AHN, J.; DAIDOU, T.; TSUNEDA, S.; HIRATA, A. Characterization of denitrifying phosphate-accumulating organisms cultivated under different electron acceptor conditions using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis assay. **Water Research**, v. 36, n. 2, p. 403-412, 2002.

AHN, J.; SCHROEDER, S.; BEER, M.; MCILROY, S.; BAYLY, R. C.; MAY, J. W.; VASILADIS, G.; SEVIOUR, R.J. Ecology of the Microbial Community Removing Phosphate from Wastewater under Continuously Aerobic Conditions in a Sequencing Batch Reactor. *Applied Environmental Microbiology*, v.73, p. 2257-2270, 2007.

AGUNWAMBA, J. C. Effect of tapering on the performance of waste stabilization pond. **Water Research**, v. 35, n. 5, p. 1191-1200, 2001.

AKARSUBASI, A. T.; INCE, O.; KIRDAR, B.; OZ, N. A.; ORHON, D.; CURTIS, T. P.; HEAD, I. M.; INCE, B. K. Effect of wastewater composition on archaeal population diversity. **Water Research**, v. 39, p. 1576-1584, 2005.

ALONSO-SÁEZ, L.; BALGUÉ, V.; SÁ, E. L.; SÁNCHEZ, O.; GONZÁLEZ, J. M.; PINHASSI, J.; MASSANA, R.; PERNTHALER, J.; PEDRÓS-ALIÓ, C.; GASOL, J. M. Seasonality in bacterial diversity in North-west Mediterranean coastal Waters: assessment through clones libraries, fingerprinting and FISH. **Microbiology Ecology**, v. 60, n. 1, p. 98-112, 2007.

AMANN, R.; FUCHS, B. M.; BEHRENS, S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 231-236, 2001.

AMANN, R.; KÜHL, M. In situ methods for assessment of microorganisms and their activities. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 352-358, 1998.

AMANN, R.; LEMMER, H.; WAGNER, M. Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 25, p. 205-215, 1998.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.

AMANN, R. I.; ZARDA, B.; STAHL, D. A.; SCHLEIFER, K.-H. Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58; n.9, p. 3007-3011, 1992.

AMMAN, R. I.; KRUMHOLTZ, L.; STAHL, D. A. Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative, Phylogenetic, and environmental studies in microbiology. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 762-770, 1990.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AMPE, F.; MIAMBI, E. Cluster analysis, richness and biodiversity indexes derived from denaturing gradient gel electrophoresis fingerprints of bacterial communities demonstrate that traditional maize fermentations are driven by the transformation process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 91-97, 2000.

AMPE, F.; OMAR, N. B.; MOIZAN, C.; WACHER, C.; GUYOT, J.-P. Polyphasic Study of the Spatial Distribution of Microorganisms in Mexican Pozol, a Fermented Maize Dough, demonstrates the Need for Cultivation-Independent Methods To Investigate Traditional Fermentations. **Applied environmental microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5464-5473, 1999.

ARAYA, R.; TANI, K.; TAKAGI, T.; YAMAGUCHI, N.; NASU, M. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 43, p. 111-119, 2003.

BJÖRNSSON, L.; HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W.; BLACKALL, L. L. Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. **Microbiology**, v. 148, p. 2309-2318, 2002.

BOON, N.; de WINDT, W.; VERSTRAETE, W.; TOP, E. M. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 39, p. 101-112, 2002.

BOUSSAID, A.; OUZZANI, N.; BOUARAB, L.; BOUHOUM, K.; LYAKHLOUFI, S. An integrated approach to waste stabilization pond design in Marrakech. **Water Science and Technology**, v. 42, n. 10-11, p. 1-8, 2000.

BURR, M. D.; CLARK S. J.; SPEAR, C. R.; CAMPER, A. K. Denaturing gradient gel electrophoresis can rapidly display the bacterial diversity contained in 16S rDNA clone libraries. **Microbial Ecology**, v.51, p. 479-486, 2006.

CAIRNCROSS, S.; FEACHEM, R. G. **Environmental Health Engineering in Tropics: an introductory text**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1993. 306 p.

CALIJURI, M. C.; VARESCHE, M. B. A.; MENDIONDO, E. M.; PELLIZARI, V. H.; VAZOLLER, R. F.; CALIJURI, M. L.; DOMINGOS, M. D.; DOS SANTOS, A. C. **Estudo dos sistemas naturais e artificiais redutores de cargas poluidoras para a sustentabilidade dos recursos hídricos do baixo Ribeira de Iguape, SP**. Projeto Temático. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. FAPESP, 2003. 133 p.

CALLI, B.; MERTOGLU, B.; ROEST, K.; INANC, B. Ecology of the microbial community removing phosphate from wastewater under continuously aerobic conditions in a sequencing batch reactor. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, n. 7, p. 2257-70, 2007.

CAMPOS, C.; GUERRERO, A.; CÁRDENAS, M. Removal of bacterial and viral faecal indicator organisms in a waste stabilization pond system in Choconta, Cundinamarca (Colombia). **Water Science Technology**, v. 45, n. 1, p. 61-66, 2002.

CARVALHO, G.; LEMOS, P. C.; OEHMEN, A.; REIS, M. A. Denitrifying phosphorus removal: linking the process performance with the microbial community structure. **Water Research**, v. 41, n.19, p. 4383-4396, 2007.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 2004. CETESB. **RIOS E RESERVATÓRIOS**. 2004. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/aguas/rios/curiosidades>>. Acesso em 19 ago. 2004.

CHANG, Y-J.; STEPHEN, J. R.; RICHER, A. P.; VENOSA, A. D.; BRÜGGERMANN, J.; MACNAUGHTON, S. J.; KOWALCHUK, G. A.; HAINES, J. R.; KLINE, E.; WHITE, D. C. Phylogenetic analysis of aerobic freshwater and marine enrichment cultures efficient in hydrocarbon degradation: effect of profiling method. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, p. 19-31, 2000.

CROCETTI, G. R.; HUGENHOLTZ, P.; BOND, P. L.; SCHULER, A.; KELLER, J.; JENKINS, D.; BLACKALL, L. L. Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1175-82, 2000.

CURTIS, T. P.; CRAINE, N. G. The comparison of the diversity of activated sludge plants. **Water Science and Technology**, v. 37, n. 4-5, p. 71-78, 1998.

DAIMS, H.; STOECKER, K.; WAGNER, M. Fluorescence in situ hybridization for the detection of prokaryotes. In: OSBORN, A. M.; SMITH, C. J., Ed). **Molecular Microbial Ecology**. Garland: Routledge Publisher. pp 213-239. 2005.

DAIMS, H.; BRÜL, A.; AMANN, R.; SCHLEIFER, K. H.; WAGNER, M. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 434-444, 1993.

DORIGO, U.; VOLATIER, L.; HUMBERT, J-F. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. **Water Research**, v. 39, p. 2207-2218, 2005.

ESCHENHAGEN, M.; SCHUPPLER, M.; ROSKE, I. Molecular characterization of the microbial community structure in two activated sludge systems for the advanced treatment of domestic effluents. **Water Research**, v. 37, p. 3224-3232, 2003.

FARRELLY, V.; RAINEY, F. A.; STACKEBRANDT, E. Effect of Genome Size and rrn Gene Copy Number on PCR Amplification of 16S rRNA Genes from a Mixture of Bacterial Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 7, p. 2798-2801, 1995.

FOSTER, S.; LAPPIN-SCOTT, H.; SNAPE, J.; PORTER, J. Rains, drains and active strains: towards online assessment of wastewater bacterial communities. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, p. 859-864, 2003.

FROMIN, N.; HAMELIN, J.; TARNAWSKI, S.; ROESTI, D.; JOURDAIN-MISEREZ, K.; FORESTIER, N.; TEYSSIER-CUVELLE, S.; GILLET, F.; ARAGNO, M.; ROSSI, P. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. **Environmental Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 634-643, 2002.

FUCHS, B. M.; GLÖCKNER, F. O.; WULF, J. AMANN, R. Unlabeled helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3603-3607, 2000.

FUCHS, B. M.; WALLNER, G.; BEISKER, W.; SCHWIPPL, I. LUDWIG, W.; AMANN, R. Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of Escherichia coli 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4973-4982, 1998.

FURTADO, A. L. F. F. **Isolamento, morfologia, análises moleculares e testes toxicológicos de cianobactérias em lagoa facultativa de sistema de estabilização (Cajati, SP)**. 2007. 152f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GICH, F.; GARCIA-GIL, J.; OVERMANN, J. Previously unknown and phylogenetically diverse members of the green nonsulfur bacteria are indigenous to freshwater lakes. **Archives of Microbiology**, v. 177, p. 1-10, 2001.

GIESEKE, A.; PURKHOLD, U.; WAGNER, M.; AMANN, R.; SCHRAMM, A. Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 1351-1362, 2001.

GINIGE, M. P.; KELLER, J.; BLACKALL, L. L. Investigation of an acetate-fed denitrifying microbial community by stable isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescent in situ hybridization-microautoradiography. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8683-8691, 2005.

GRAY, N. F. **Biology of Wastewater Treatment**. New York: Oxford University Press, 1989.

GRIFFITHS, R. I.; WHITELEY, A. S.; O'DONNELL, A. G.; BAILEY, M. J. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5488-5491, 2000.

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

HERNDL, G. J.; REINTHALER, T.; TEIRA, E.; VAN AKEN H.; VETH, C.; PERNTHALER, A.; PERNTHALER, J. Contribution of Archaea to total prokaryotic production in the deep Atlantic ocean. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2303-2309, 2005.

HERRERA L.; CASTILLO, G. Dynamics of a waste stabilization pond in Chile. **Water Science and Technology**, v. 42, n. 10-11, p. 83-90, 2000.

HEUER, H.; HARTUNG, K.; WIELAND, G.; KRAMER, I.; SMALLA, K. Polynucleotide Probes That Target a Hypervariable Region of 16S rRNA Genes To Identify Bacterial Isolates Corresponding to Bands of Community Fingerprints. **Applied and Environmental microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1045-1049, 1999.

HONMA, H.; ASANO, R.; OBARA, M.; OTAWA, K.; SUYAMA, Y.; NAKAI, Y. Bacterial populations in epilithic biofilms along two oligotrophic Rivers in the Tohoku region in Japan. **Journal of Genetic Applied Microbiology**, v. 55, p. 359-371, 2009.

IBEKWE, A. M.; GRIEVE, C. M.; LYON, S. R. Characterization of Microbial Communities and Composition in Constructed Dairy Wetland Wastewater Effluent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5060-5069, 2003.

ICGEN, B.; MOOSA, S.; HARRISON, S. T. A study of the relative dominance of selected anaerobic sulfate-reducing bacteria in a continuous bioreactor by fluorescence in situ hybridization. **Microbial Ecology**, v. 53, n. 1, p. 43-52, 2007.

ISHII, K.; MUBMANN, M.; MaCGREGOR, B. J.; AMANN, R. An improved fluorescence in situ hybridization protocol for the identification of bacteria and archaea in marine sediments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 50, n. 3, p. 203-213, 2004.

JANSE, I.; BOK, J.; ZWART, G. A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**; v. 57, p. 279-281, 2004.

JORDÃO, E. P.; PESSOA, C. A. **Tratamento de Esgotos Domésticos**. 3. ed. Rio de Janeiro: ABES, 1995. 720 p.

KINDAICHI, T.; ITO, T.; OKABE, S. Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-fluorescence in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1641-1650, 2004.

KONG, Y.; XIA, Y.; NIELSEN, J.L.; NIELSEN, P. H. Structure and function of the microbial community in a full-scale enhanced biological phosphorus removal plant. **Microbiology**, v. 153, p. 4061-4073, 2007.

KRAGELUND, C.; LEVANTESI, C; BORGER, A.; THELEN, K; EIKELBOOM, D.; TANDOI, V; KONG, Y.; WAARDE J. V. D.; KROONEMAN, J.; ROSSETTI, S.; THOMSENT, R.; NIELSEN, P. H. Identity, abundance and ecophysiology of filamentous Chloroflexi species present in activated sludge treatment plants. **FEMS Microbiological Ecology**, v. 59, p. 671-682, 2007.

LANE, D. J. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**. , England: John Wiley & Sons, Chichester, 1991. 115-174 pp.

LAPARA, T. M; NAKATSU, C. H.; PANTEA, L.; ALLEMAN, J. E. Stability of the bacterial communities supported by a seven-stage biological process treating pharmaceutical wastewater as revealed by PCR-DGGE. **Water Research**, v. 36, p. 638-646, 2002.

LERMAN, L. S.; FISCHER, S. G.; HURLEY, I.; SILVERSTEIN, K.; LUMELSKY, N. Sequence-determined DNA separations. **Annual Review of Biophysics and Bioengineering**, v. 13, p. 399-423, 1984.

LIN, B.; MONREAL, C. M.; TAMBORG, J. T.; MIGUEZ, C. B.; CARRASCO-MEDINA, L. Phylogenetic analysis of methanotrophic communities in cover soils of a landfill in Ontario. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 9, p.1103-1112, 2009.

LLOBET-BROSSA, E.; ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. Microbial Community Composition of Wadden Sea Sediments as Revealed by Fluorescence In Situ Hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 7, p. 2691-2696, 1998.

LOY, A.; MAIXNER, F.; WAGNER, M.; HORN, M. probeBase – an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. 800-804, 2007.

LYDMARK, P.; ALMSTRAND, R.; SAMUELSSON, K.; MATTSSON, A.; LIDGREN, P. E. Effects of environmental conditions on the nitrifying population dynamics in a pilot wastewater treatment plant. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 2220-2233, 2007.

MADDEN, P.; CHINALIA, F. A.; ENRIGHT, A-M.; COLLINS, G.; O'FLAHERTY, V. Perturbation-independent community development in low-temperature anaerobic biological wastewater treatment bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 105, n. 1, p. 79-87, 2010.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. **Brock Biology of Microorganisms**. 11. ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2006. 992 p.

MANZ, W.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; VANCANNEYT, M.; SCHLEIFER, K.-H. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. **Microbiology**, v. 142, p. 1097-1106, 1996.

MANZ, W.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; WAGNER, M.; SCHLEIFER, K.-H. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 15, p. 593-600, 1992.

MASSERET, E.; AMBLARD, C.; BOURDIER, G. Changes in the structure and metabolic activities of periphytic communities in a stream receiving treated sewage from waste stabilization pond. **Water Research**, v. 32, n. 8, p. 2299-2314, 1998.

MEIER, H.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H. Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G+C content. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 22, p. 186-196, 1999.

MENDONÇA, S. R. **Sistemas de Lagunas de Estabilização: cómo utilizar águas residuales tratadas em sistemas de regadío**. Bogotá: McGraw-Hill Interamericana, 2000. 370 p.

MILLER, J. H. **A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.

MIURA, Y.; HIRAIWA, M. N.; ITO, T.; ITONAGA, T.; WATANABA, Y.; OKABE, S. Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: relationship between community stability and reactor performance. **Water Research**, v. 41, p. 627-637, 2007.

- MORGAN, C. A.; HUDSON, A.; KONOPLA, A.; NAKATSU, C. H. Analyses of microbial activity in biomass-recycle reactors using denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA and 16S rRNA PCR products. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 333-341, 2002.
- MOURA, A.; TACÃO, M.; HENRIQUES, I.; DIAS, J.; FERREIRA, P.; CORREIA, A. Characterization of bacterial diversity in two aerated lagoons of a wastewater treatment plant using PCR-DGGE analysis. **Microbiological Research**, v. 164, p. 560-569, 2009
- MÜLLER, E.; SCHADE, M.; LEMMER, H. Filamentous scum bacteria in activated sludge plants: detection and identification quality by conventional activated sludge microscopy versus fluorescence in situ hybridization. **Water Environmental Research**, v. 79., n. 11, p. 2274-86, 2007.
- MURRAY, A. E.; HOLLIBAUGH, J. T.; ORREGO, C. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 7, p. 2676-2680, 1996.
- MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying gens from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 317-322, 1999.
- MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 127-141, 1998.
- MUYZER, G.; DE WALL, E.C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 695-700, 1993.
- MYERS, R. M.; FISCHER, S. G.; LERMAN, L. S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v. 13, n. 9, p. 3131-3145, 1985.
- NEEF, A.; AMANN, R.; SCHLESNER, H.; SCHLEIFER, K-H. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. **Microbiology**, v. 144, p. 3257-3266, 1998.
- NEEF, A. **Anwendung der in situ Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen**. Doctoral thesis (Technische Universität München), 1997.
- NELSON, K. L.; JIMÉNEZ, B. C. Sludge accumulation, properties and degradation in a waste stabilization pond in Mexico. **Water Science and Technology**, v. 42, n. 10-11, p231-236, 2000.
- NEUFELD, J. D.; MOHN, W.W. Assessment of microbial phylogenetic diversity based on environmental nucleic acids. In: STACKERBRANDT, E. (Ed.). **Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. p. 220-259.

NIKOLAUSZ, M.; SIPOS, R.; RÉVESZ, S.; SZÉKELY, A.; MÁRIALIGETI, K. Observation of bias associated with re-amplification of DNA isolated from denaturing gradient gels. **FEMS Microbiology Letters**, v. 244, p. 385-390, 2005.

ONUKEI, M.; SATOH, H.; MINO, T.; MATSUO, T. Application of molecular methods to microbial community analysis of activated sludge. **Water Science and Technology**, v.42, n. 3-4, p. 17-22, 2000.

OSBORNE, C. A.; GALIC, M.; SANGWAN, P.; JANSSEN, P. H. PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific primers. **FEMS Microbiology Letters**, v. 248, p. 183-187, 2005.

ØVREÅS, L.; FORNEY, L. DAAE, F. L.; TORSVIK, T. Distribution of Bacterioplankton in Meromictic Lake Sælenvannet, as Determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragments Coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3367-3373, 1997.

PEARCE, D. A. Bacterioplankton community structure in a maritime antarctic oligotrophic lake during a period of holomixis, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and fluorescence in situ hybridization (FISH). **Microbial Ecology**, v. 46, p. 92-105, 2003.

PERNTHALER, A.; PERNTHALER, J. Fluorescence in situ hybridization the identification of environmental microbes. **Methods in Molecular Biology and Protocols**, v. 353, p.153-164, 2007.

PERNTHALER, A.; PERNTHALER, J.; AMANN, R. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 3094-3101, 2002.

PIVELI, R. P; KATO, M. T. **Qualidade da água e poluição: aspectos físico-químicos**. São Paulo: ABES, 2006. 285 p.

PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, v. 8, p. 151-156, 1989.

RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. **FEMS Microbiological Ecology**, v. 62, p. 142-160, 2007.

RAVENSCHLAG, K.; SAHM, K.; KNOBLAUCH, C.; JORGENSEN, B. B.; AMANN, R. Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine arctic sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3592-3602, 2000.

REYSENBACH, A. L.; GIVER, L. J.; WICKHAM, G. S.; PACE, N. R. Differential Amplification of rRNA Genes by Polymerase Chain Reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 10, p 3417-3418, 1992.

ROBARTS, R. D.; ZOHARY, T. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 21, p. 391-399, 1987.

ROESELERS, G.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; MUYZER, G. Phototropic biofilms and their potential applications. **Journal of Applied Phycology**, v.20, p. 227-235, 2008.

ROLLER, C.; WAGNER, M.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H. In situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA- targeted oligonucleotides. **Microbiology**, v. 140, p. 2849-2858, 1994.

ROWAN A. K.; SNAPE, J.R.; FEARNSTIDE, D.; BARER, M. R.; CURTIS, T. P.; HEAD, I. M. Composition and diversity of ammonia-oxidising bacterial communities in wastewater treatment reactors of different design treating identical wastewater. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 43, p. 195-206, 2003.

SAKAMOTO, I. K. **Comparação da Estrutura de Comunidades Microbianas Presente em Sistemas de Lodos ativados modificados para remoção biológica do fósforo em excesso, utilizando a técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)**. 2001. 162f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. G. Rapid Silver Staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v. 17, n. 5, p. 914-920, 1994.

SANZ, J. L.; KÖCHLING, T. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 119-133, 2007.

SCHÖNHUBER, W. FUCHS, B.; JURETSCHKO, F.; AMANN, R. Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3268-3273, 1997.

SCHRAMM, A.; DE BEER, D.; WAGNER, M.; AMANN, R. Identification and activities in situ of Nitrosospira and Nitrospira spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3480-3485, 1998.

SEKAR, R.; PERNTHALER, A.; PERNTHALER, J.; WARNECKE, F.; POSCH, T.; AMANN, R. An improved protocol for quantification of freshwater Actinobacteria by fluorescence in situ hybridization. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, n. 5, p. 2928-2935, 2003.

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

SIN, R.; GOVOREANU, R.; BOON, N.; SCHELSTRRAETE, G.; VANROLLEGHE, M. Evaluation of the impacts of model-based operation of SBRs on activated sludge microbial community. **Water Science & Technology**, v. 54, n. 1, p. 157-166, 2006.

SIYAMBALAPITIYA, N.; BLACKALL, L.L. Discrepancies in the widely applied GAM42a fluorescence in situ hybridisation probe for Gammaproteobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 242, p. 367-373, 2005.

SNAIDR J., AMANN R., HUBER I., LUDWIG W., SCHLEIFER K. H. Phylogenetic Analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2884-2896, 1997.

STAHL, D. A.; AMANN, R. **Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematic**, p. 205-248. In E.Stackerbrandt and M. Goodfellow (ed.), Nucleic acid techniques in bacterial systematic. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, England. 1991.

TEIRA, E.; REINTHALER, T.; PERNTHALER, A.; PERNTHALER, J.; HERNDL, G. J. Combining catalyzed reporter deposition-fluorescence in situ hybridization and microautoradiography to detect substrate utilization by bacteria and archaea in the deep ocean. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 4411-4414, 2004.

THE DCODE. **Universal Mutation Detection System Manual**. Bio-Rad Laboratories; 1996. 79p.

UEHARA, M. Y. ; VIDAL, W. L. **Operação e Manutenção de Lagoas Facultativas**. Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, CETESB. 1989. 91p

VAN DER GUTCH, K.; VANDEKERCKHOVE, T.; VLOEMANS, N.; COUSIN, S.; MUYLAERT, K.; SABBE, K.; GILLIS, M.; DECLERK, S.; MEESTER, L. DE; VYVERMAN, W. Characterization of bacterial communities in four freshwater lakes differing in nutrient load and food web structure. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, p. 205-220, 2005.

VAZOLLER, R. F. **Estudo sobre isolamento, caracterização e crescimento de culturas puras de bactérias metanogênicas provenientes de biodigestores de lodo de esgoto**. 1989. 145f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

VAZZOLER **Microbiologia e oportunidades tecnológicas**. 1996. Disponível em: <<http://www.bdt.fat.org.br>>. Acesso em: 17 ago. 2004.

VÉLEZ, O.R.; FASCIOLO, G.E.; BERTRANOU, A.V. Domestic wastewater treatment in waste stabilization ponds for irrigation in Mendoza, Argentina: policies and challenges. **Water Science and Technology**. V. 45, n. 1, p. 127-132, 2002.

VON SPERLING. M. **Princípios de tratamento biológico de águas residuárias – Lagoas de estabilização**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, 1996. Vol 3. 139p.

VON WINTZINGERODE, F. V.; GÖBEL, U. B.; STACKEBRANDT, E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, p. 213-229, 1997.

WAGNER, M. Microbial ecology of activated sludge. **Microbiology Today**, p. 28-31, 2005.

WAGNER, M.; HORN, M.; DAIMS, H. Fluorescence in situ hybridization for the identification and characterization of prokaryotes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 302-309, 2003.

WAGNER, M.; LOY, A.; NOGUEIRA, R.; PURKHOLD, U.; LEE, N.; DAIMS, H. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 665-680, 2002.

WATANABE, K.; KODAMA, Y.; HARAYAMA, S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 253-262, 2001.

WILDERER, P. A.; BUNGARTZ, H. J.; LEMMER, H.; WAGNER, M.; KELLER, J.; WUERTZ, S. Modern scientific methods and their potential in wastewater science and technology. **Water Research**, v. 36, p. 370-393, 2002.

WILÉN, B. M.; ONUKI, M.; HERMANSSON, M.; LUMLEY, D.; MINO, T. Microbial community structure in activated sludge floc analysed by fluorescence in situ hybridization and its relation to floc stability. **Water Research**, v. 42, p. 2187-2193, 2007.

WILHARTITZ, I.; MACH, R. L.; TEIRA, E.; REINTHALER, T.; HERNDL, G. J.; FARNLEITNER, A. H. Prokaryotic community analysis with CARD-FISH in comparison with FISH in ultra-oligotrophic ground – and drinking water. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 871-881, 2007.

WOEBKEN, D.; FUCHS, B. M.; KUYPERS, M. M.; AMANN, R. Potential interactions of particle-associated anammox bacteria with bacterial and archaeal partners in the Namibian upwelling system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 14, p. 4648-57, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Health guidelines for the use of Wastewater in agriculture and aquaculture**. Geneva: WHO Technical Report Series, 778, WHO 1989.

YU, Z.; MORRISON, M. Comparisons of Different Hypervariable Regions of rrs Genes for Use in Fingerprinting of Microbial Communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4800-4806, 2004.

YU, H.; TAY, J-H.; WILSON, F. A sustainable municipal wastewater treatment process for tropical and subtropical regions in developing countries. **Water Science and Technology**, v. 35, n. 9, p. 191-198, 1997.

ZARDA, B.; HAHN, D.; CHATZINOTAS, A.; SCHÖNHUBER W.; NEEF, A.; AMANN, R.; ZEYER, J. Analysis of bacterial community structure in bulk soil by in situ hybridization. **Archives of Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 185-192, 1997.

ZHANG, H.; BRUNS, M. A.; LOGAN, B. Perchlorate reduction by a novel chemolithoautotrophic, hydrogen-oxidizing bacterium. **Environmental Microbiology**, v. 4, p. 570-576, 2002.

ZIEMBINSKA, A.; RASZKA, A.; TRUU, J.; GÓRSKA, J. S.; MIKSCH, K. Molecular Analysis of Temporal Changes of a Bacterial Community Structure in Activated Sludge Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Fluorescent in situ Hybridization (FISH). **Polish Journal of Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 119-127, 2007.

ZWIRGLMAIER, K. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) – the next generation. **FEMS Microbiology letters**, v. 246, p. 151-158, 2005.