

Caracterização da comunidade bacteriana adaptada ao Ascarel

M. R. L. Silva*, Sakamoto, I. K., R. C. Correa e M. B. A. Varesche**

* Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento da EESC/Universidade de São Paulo, Brasil

(E-mail: *mrubia_usp@yahoo.com.br*)

** Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/ Universidade de São Paulo, Brasil

(E-mail: *varesche@sc.usp.br*)

Resumo

O Ascarel, uma mistura de 50 a 70% de PCBs (bifenila policlorada) e de 30 a 50% de TCB (triclorobenzenos) caracteriza-se por ser uma molécula orgânica estável e que foi muito utilizada em transformadores e capacitores. O presente trabalho investigou a microbiota presente no óleo composto de PCB por meio da técnica do PCR-DGGE, clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S. A comunidade bacteriana do inóculo e da biomassa imobilizada no suporte em relação àquela do biofilme aderido a parede do reator sofreu alteração de 23%. Os clones obtidos do biofilme foram relacionados aos seguintes filos: Thermogae (29,5%), Proteobacteria, Classe Beta e Delta, (15,4%), especificamente similar a *Brachymonas petroleovorans* (99%); Firmicutes (7,7%), representado por *Sporomusa* (95%); Synergistetes (5,1%), Spirochaetes e Aminanaerobia, (ambos com 3,85%) e Chloroflexi, Chlorobi e Deferribacteres cada um com 1,3%. Alguns gêneros foram relacionados à bactérias de ambiente com óleo e compostos clorados.

Palavras-chave

PCB; PCR-DGGE; análise filogenética; *Brachymonas*

INTRODUÇÃO

A biodegradação anaeróbia de compostos xenobióticos foi o foco de extensivas pesquisas nas últimas décadas. Muitos biorreatores anaeróbios e sistemas de biorremediação foram desenvolvidos eficientemente para a descontaminação de água e solo (Zhang e Bennett, 2005). No grupo dos compostos xenobióticos encontram-se as bifenilas policloradas (PCB), que se refere a um grupo de 209 possíveis congêneres. Na prática, em instalações industriais e comerciais antigas são encontrados compostos com misturas de 60 a 90 destes congêneres, com os seguintes nomes comerciais: Aroclor, Fenoclor, Kanechlo, Phenclor e Ascarel, entre outros (Field e Sierra-Alvez, 2007).

A degradação do PCB (bifenila policlorada) em sistemas de tratamento aeróbio vem sendo bastante estudada. Todavia, estudos sobre a degradação do PCB em condição anaeróbia são ainda recentes. Mesmo que a descloração reductiva de PCBs tenha sido observada em muitos sedimentos e aquíferos por ampla diversidade de microrganismos (Quensen *et al.*, 1988), apenas em 2002 culturas puras foram caracterizadas por Wu *et al.* (2002a,b). Chen *et al.* (1988) utilizaram sedimentos do rio Hudson (EUA) para biodegradação anaeróbia de Aroclor 1221 (mistura de bifenilas policloradas). Bactérias degradadoras de PCB foram isoladas do sedimento do rio Hudson e enriquecidas em meio contendo 20mg/L de Aroclor 1221. Os autores verificaram que os congêneres de PCBs podem ser degradados anaerobiamente.

Informações a respeito das comunidades microbianas presentes em reatores anaeróbios capazes de se desenvolver e degradar PCB ainda são escassos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar os microrganismos do biofilme do reator anaeróbio horizontal de leito fixo, na presença

de Ascarel por meio de técnicas de biologia molecular. A análise da comunidade microbiana foi realizada pela técnica da eletroforese em gel com gradiente desnaturante e a aproximação da identidade filogenética pelo sequenciamento do fragmento do DNAr 16S.

MÉTODOS

Amostra

A amostra da biomassa adaptada ao ascarel [1 mL/L] por aproximadamente 180 dias utilizada no presente trabalho foi coletada do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF), do projeto de doutorado (Correa, 2008) realizado no Laboratório de Processos Biológicos – EESC/USP. Na comparação da comunidade bacteriana utilizaram-se as seguintes amostras: 1) lodo granulado de UASB utilizado como inóculo do RAHLF (Correa, 2008); 2) biomassa imobilizada em espuma de poliuretano do RAHLF; 3) biofilme aderido na parede do RAHLF. A amostra do biofilme aderido na parede do RAHLF foi utilizada para aproximação da identidade filogenética.

Eletroforese em gel com gradiente desnaturante

A avaliação da comunidade microbiana presente no inóculo e no reator anaeróbio horizontal de leito fixo foi realizada usando a técnica de PCR/DGGE. A extração de DNA das amostras foi feita segundo protocolo de Griffiths *et al.* (2000) modificado. A amplificação da polimerase em cadeia (PCR) foi realizada com *set primer* 968FGC - 1392R para Domínio Bacteria (Nielsen *et al.*, 1999). O programa para a PCR (termociclador Eppendorf AG - 22331 Hamburg) foi de pré desnaturação a 94°C por 5 minutos com 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos; anelamento a 55°C por 45 segundos; extensão a 72°C por 1 minuto e 45 segundos; extensão final a 72°C por 7 minutos; resfriamento a 4°C. O produto amplificado foi analisado em gel de agarose 1,4 % para uso subsequente na eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) segundo Muyzer *et al.* (1993).

No presente trabalho foi usado gradiente desnaturante de 45% e 65%. a 75V e 60°C por 16 horas. A solução fluorescente foi brometo de etídeo (diluída 10.000 vezes). O aparelho utilizado para leitura dos padrões de bandas obtidas no DGGE foi o Eagle Eye TM III (Stratagene) sob exposição a 254 nm UV, acoplada ao computador e software Eagle Sight. A complexidade dos padrões de bandas obtidos do DGGE foi tomada como medida da diversidade da comunidade da amostra. O perfil das bandas do DGGE foi usado na construção das matrizes no programa Bionumerics, para servir como base para o cálculo da similaridade. No coeficiente de similaridade foi utilizado correlação de Pearson, em seguida, agrupadas com o UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) para construção do dendograma.

Clonagem e sequenciamento

O *set de primers* utilizado para o Domínio Bacteria foi 27F e 1100R (Lane, 1991). A clonagem em células competentes de *E. coli* foi realizada utilizando os produtos de PCR purificados com o vetor plasmidial *pGEM Easy Vector System I*. O DNA de interesse inserido na biblioteca de clones foi amplificado por PCR utilizando *set primers* M13F e M13R. A purificação do produto da PCR foi feita com o Kit Illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification (GE Healthcare).

O aparelho usado para a determinação das seqüências dos nucleotídeos foi o sequenciador ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). O consenso das seqüências parciais do gene RNAr 16S obtidas foram verificadas no programa Seqman do pacote Lasergene DNASTar. Em seguida essas seqüências foram comparadas no Banco de Dados NCBI-database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para aproximação da identidade filogenética. A construção da árvore filogenética de consenso a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987) utilizando o programa MEGA versão 4.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio da análise de similaridade observou-se que as comunidades bacterianas do inóculo e da biomassa do material suporte (biomassa imobilizada em espuma de poliuretano) apresentaram semelhança de 88% (Figura 1). Todavia, verificou-se alteração de 23% na comparação da comunidade bacteriana do inóculo e da biomassa imobilizada no suporte em relação ao biofilme

aderido a parede do reator. Observou-se 77% de similaridade em relação às amostras do inóculo e biofilme do material suporte. Portanto, as comunidades bacterianas foram compostas por populações diferentes daquelas encontradas nas outras duas amostras. Observou-se maior número de bandas no biofilme aderido a parede do reator, sugerindo que a comunidade foi mais diversificada, explicando, assim a escolha dessa amostra para a realização da clonagem e do sequenciamento.

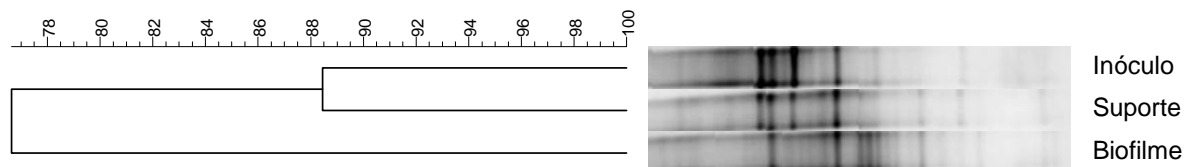


Figura 1. Dendrograma baseado no UPGMA e coeficiente de similaridade usando a correlação de Pearson, a partir dos padrões de bandas do DGGE com *set primer* para o Domínio Bacteria: 1) biomassa utilizada como inóculo do reator RAHLF; 2) biomassa imobilizada em espuma de poliuretano do RAHLF; 3) biofilme que se desenvolveu na parede do RAHLF.

Por meio das análises de clonagem e sequenciamento de fragmentos do gene RNAr 16S do consórcio microbiano do biofilme foram obtidos 78 clones. Os fragmentos sequenciados tiveram tamanho médio de 406 pares de base (pb). As porcentagens dos filos de bactérias identificados estão representadas na Figura 2.

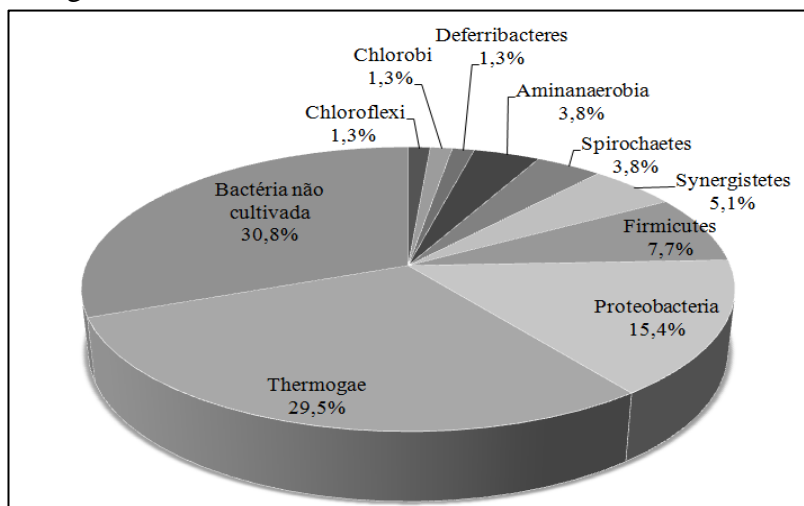


Figura 2. Proporção dos grupos filogenéticos analisados na biblioteca de clones da amostra do biofilme aderido na parede do RAHLF.

Os clones obtidos da amostra do biofilme foram relacionados aos seguintes filos: Thermogae (29,5%), Proteobacteria, Classe Beta e Delta, (15,4%), Firmicutes (7,7%), Synergistetes (5,1%), Spirochaetes e Aminanaerobia, (ambos com 3,9%) e Chloroflexi, Chlorobi e Deferribacteres cada um com 1,3% (Figura 2). Na Figura 3 encontra-se a árvore filogenética construída a partir dos clones da amostra do biofilme. Rossetti *et al.* (2003) investigaram em uma comunidade microbiana anaeróbia, a remoção reductiva de cloro do tetracloroeteno a cloreto de vinila, por meio da clonagem e sequenciamento. Os autores obtiveram clones relacionados a Spirochaetes (56,6%), Firmicutes (18,5%), Chloroflexi (15,4%), Bacteroidetes (6,3%), Synergistetes (1,1%) e bactérias não cultivadas (1,1%).

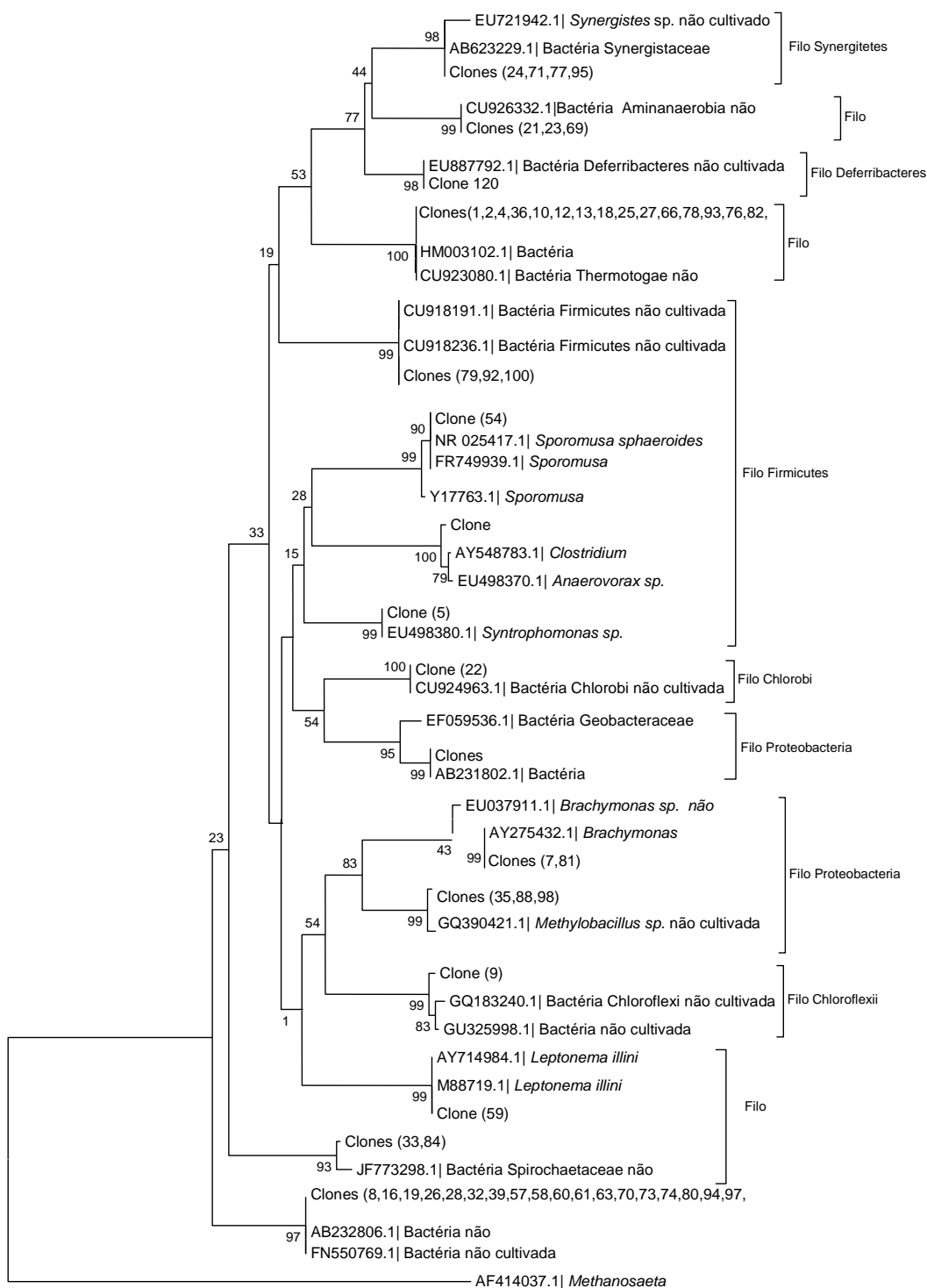


Figura 3. Aproximação da identidade filogenética do consenso baseada nas seqüências da biblioteca de clones. Os valores presentes nos nós da árvore indicam a porcentagem que o ramo se repetiu (1000 reamostragens de bootstraps). A barra de escala 0,1 indica a substituição de nucleotídeos por sítio. Grupo externo foi usado *Methanosaeta concilii* (Acesso - AF414037.1).

Em relação ao Filo Thermogae foram encontrados 23 clones relacionados à Ordem Thermotogales. Referem-se a bactérias termófilas cujas células são envolvidas por uma membrana adicional. As diferentes espécies apresentam distintas tolerâncias à salinidade e ao oxigênio. Jeanthon *et al.* (1995) encontraram *Thermotoga subterranea* SL1 capaz de metabolizar cistina e tiosulfato à sulfeto de hidrogênio, em depósito continental de petróleo a 70°C. A presença de bactérias pertencentes a esse filo sugere tolerância de algumas espécies a temperaturas mesófilas, já que o reator foi mantido a 30 °C e possível adaptação a compostos aromáticos.

Também foram encontrados 12 clones relacionados ao Filo Proteobacteria, divididos nas Classes Beta-Proteobacteria e Delta-Proteobacteria. Na classe Beta-Proteobacteria foram observadas

similaridades com *Methylobacillus* (98%), bactérias comumente encontradas em óleo (Hanson, e Hanson, 1996). Todavia, por serem metilotróficas, também podem ter consumido metano. Nessa classe, também foi verificada similaridade com *Brachymonas*, mais especificamente com a *Brachymonas petroleovorans* (99%), bactéria degradadora de ciclohexano isolada da estação de tratamento de refinaria de petróleo (Pierre e Mario, 2003). Provavelmente, a presença de óleo no reator favoreceu o crescimento dessas células, devido a presença de hidrocarbonetos na composição do óleo Ascarel. Em relação a classe Delta-Proteobacteria foi obtida similaridade de bactérias pertencentes a Família Geobacteraceae, a qual reúne as bactérias ferro-redutoras, que oxidam compostos aromáticos (Garrity *et al.*, 2005). Portanto, podem ter sido favorecidas pelas condições de alimentação do reator; uma vez que, foi usado Fe^{2+} na composição do meio basal Angelidaki e óleo ascarel.

Seis clones foram similares ao Filo Firmicutes. Microrganismos pertencentes a este filo são comumente encontrados em digestores anaeróbios (Riviere, et al., 2009). Estes microrganismos podem utilizar ácidos orgânicos voláteis com produção de H_2 . Portanto, estabelecendo relação sintrófica com arqueias metanogênicas hidrogenotróficas. Foram verificadas similaridades com bactérias pertencentes a duas Ordens desse filo: Clostridiales e Selenomonadales. Membros da Ordem Clostridiales foram encontrados em reator anaeróbio contendo substrato sintético na presença de traços de metais (Pobeheim *et al.*, 2010). Em relação a Ordem Selenomonadales foram obtidos clones pertencentes a Gênero *Sporomusa*, mais precisamente com duas espécies, *Sporomusa sphaeroides* (98%) e *Sporomusa paucivorans* (99%). Esta família é composta por bactérias homoacetogênicas, gram-negativas e formadoras de endósporo degradadoras de compostos aromáticos (Breznak *et al.*, 1988), sua presença se baseia no fato do óleo de Ascarel, contenha PCB.

Quatro clones foram similares ao Filo Synestetes. Referem-se a bactérias estritamente anaeróbias, encontradas em ampla gama de habitats, tais como, em sistemas de tratamento de água residuária, solos e poços de petróleo (Jumas-Bilak *et al.*, 2009), fornecem ácidos graxos de cadeia curta e sulfato para bactérias de degradação terminal, tais como arqueias metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato (Vartoukian *et al.*, 2007). A provável presença destas células no reator pode estar relacionada à existência de óleo constituído de ascarel na alimentação do reator.

Três clones foram relacionados ao Filo Spirochaetes, composto por bactérias comumente encontradas em reator anaeróbio. Este filo foi encontrado por Rossetti *et al.* (2003) em cultura enriquecida com tetracloreto, o qual foi metabolizado em cloreto de vinila. A presença destas bactérias sugere a utilização de PCBs presente no óleo ascarel.

Três clones seqüenciados foram relacionados ao Filo Aminanaerobia. Informações a respeito de organismos pertencentes a esse filo são escassas na literatura. Todavia, alguns representantes foram encontrados em reator anaeróbio (Rivière *et al.*, 2009).

Um clone foi similar ao Filo Chlorobi. Nesse filo estão incluídas bactérias verdes sulfurosas que oxidam Fe^{2+} (Bryant e Frigaard, 2006). Provavelmente, a presença de tais bactérias tenha sido favorecida devido a composição do meio Angelidaki (Correa, 2008) utilizado na alimentação do RAHLF. Essas bactérias também foram observadas em reator anaeróbio (Rivière *et al.*, 2009).

Um clone foi similar ao Filo Chloroflexi. Referem-se a bactérias encontradas em meio contendo compostos oleoginosos e realizam fotossíntese anoxigênica (Bryant *et al.*, 2006). A presença desta bactéria poderia explicar a coloração verde na parede do reator, já que estas possuem carotenóides e bacterioclorofila.

Por meio das análises filogenéticas foi possível constatar bactérias que utilizam compostos aromáticos, semelhantes aqueles presentes no óleo ascarel. Alguns clones foram relacionados com bactérias utilizadoras de compostos aromáticos e outros com compostos clorados.

CONCLUSÃO

As comunidades bacterianas do inóculo e da biomassa imobilizada no material suporte (espuma de poliuretano) apresentaram semelhança de 88%. A comunidade bacteriana do inóculo e da biomassa imobilizada no suporte em relação à comunidade bacteriana do biofilme aderido a parede do reator apresentou menor similaridade (23%).

Os clones obtidos da amostra do biofilme foram relacionados aos seguintes filos: Thermogae Proteobacteria, Classe Beta e Delta, Firmicutes, Synergistetes, Spirochaetes, Aminanaerobia, Chloroflexi, Chlorobi e Deferribacteres. Assim, a identificação das bactérias presentes no RAHLF na presença de Ascarel sobre condições metanogênicas pode auxiliar na elucidação de quais microrganismos contribuem na degradação do PCB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Breznak J. A., Switzer, J. M., Seitz, H. -J. (1988). *Sporomusa termitida* sp. nov., an H₂/CO₂-utilizing acetogen isolated from termites ; *Archives of Microbiology*, **150**, 282-288.
- Bryant, D.A. e Frigaard N.-U. (2006). Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated. *Trends Microbiol.* **14**(11), 488.
- Garrrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. R. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume Two: The Proteobacteria, Parts A – C, Ed. Springer – Verlag.
- Chen, M., Hong, C.S., Bush, B., Rhee, G-Y. (1988). Anaerobic Biodegradation of Polychlorinated Biphenyls by Bacteria from Hudson River Sediments; *Ecotoxicology and Environmental safety*, **16**, 95–105.
- Correa R. C. (2008). Caracterização filogenética e nutricional de bactérias anaeróbias envolvidas na degradação de bifenila policlorada em reator de leito fixo. Qualificação de Doutorado. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos/USP.
- Field J., A. e Sierra-Alvez, R. (2007). Review - Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls; *Environmental Pollution*, **155**, 1-12.
- Griffiths R.I., Whiteley A.S., O'Donnell A.G. (2000). Rapid Method for coextration of DNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition; *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 5488-549.
- Hanson R. S. e Hanson T. E. (1996). Methanotrophic bacteria; *Microbiological Reviews*, **60** (2), 439-471.
- Jeanthon, C., Reysenbach, A. L., L'Haridon, S., Gambacorta, A., Pace, N. R., Glenat, P., Prieur D. (1995). *Thermotoga subterranea* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a continental oil reservoir; *Archives of Microbiology*, **164**, 91-97.
- Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing in nucleic acid techniques. In *Bacterial Systematics* ed. Stackenbrandt, E. and Goodfellow, M. pp. 115–148. New York : John Wiley and Sons, Inc.
- Muyzer, G., Waal, E. C., Uitterlinden, G. (1993). Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA; *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 695-700.
- Nielsen, H., Brunak, S. and von Heijne, G. (1999). Machine learning approaches for the prediction of signal peptides and other protein sorting signals; *Protein Engineering*, **12**, 3–9.
- Pierre, E. R., Mario, W. C. (2003). Isolation of *Brachymonas petroleovorans* CHX, a novel cyclohexane-degrading L proteobacterium; *FEMS Microbiol Lett*, **227**, 101–106.
- Pobeheim, H., Munk, B., Müller, H., Berg, G., Guebitz, G.M. (2010). Characterization of an anaerobic population digesting a model substrate for maize in the presence of trace metals. *Chemosphere*, **80** (8), 829-836.
- Quensen III J.F., Tiedje J.M., Boyd S.A., (1988). Reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls by anaerobic microorganisms from sediments; *Science*, **242**, 752–754.
- Rivière, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J., Li, T., Camacho, P., Sghir, A. (2009). Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge; *The ISME Journal*, **3**, 700–714.
- Rossetti, S., Blackall, L. L., Majone, M., Hugenholtz, P., Plumb, J. J., Tandoi, V. (2003). Kinetic and phylogenetic characterization of an anaerobic dechlorinating microbial community; *Microbiology*, **149**, 459-469.
- Saitou, N. e Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees; *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425.
- The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria 3rd ed [Vol 5] - M. Dworkin, et al., (Springer, 2006)
- Zhang C. e Bennett G. N., (2005). Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria, *Appl Microbiol Biotechnol.*, **67**, 600–618.
- Wu Q., Milliken C.E., Meier G.P., Watts J.E., Sowers K.R., May H.D. (2002a). Dechlorination of chlorobenzenes by a culture containing bacterium DF-1, a PCB dechlorinating microorganism. *Environ Sci Technol.*, **36**, 3290–3294.
- Wu Q., Watts J.E., Sowers K.R., May H.D. (2002b). Identification of a bacterium that specifically catalyzes the reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls with doubly flanked chlorines. *Appl Environ Microbiol.*, **68**, 807–812.