

DIVERSIDADE MICROBIANA DE REATORES BIOLÓGICOS UTILIZADOS PARA A REMOÇÃO DE NUTRIENTES

¹Leonardo Devilles Santos; ²Maria de Lourdes Florencio dos Santos

¹Estudante do Curso de Química Industrial- CTG – UFPE; E-mail: leo_devilles@hotmail.com,

²Docente/pesquisador do Deptode Engenharia Civil. – CTG – UFPE E-mail: flor@ufpe.br.

Sumário: O presente trabalho foi realizado dentro do projeto de Rede Nacional de Remoção de Nutrientes de Esgotos (RENUTRES – Finep Edital 06/2010) focado no estudo da diversidade microbiana responsável pela remoção de nitrogênio e fósforo simultaneamente, presente em reatores biológico do tipo EBPR (Enhanced Biological Phosphorus Removal) para o tratamento de esgotos sanitários.

Palavras-chave: dendograma; DGGE; EBPR; PCR;

INTRODUÇÃO

A eutrofização consiste na sobrecarga de nutrientes nos corpos hídricos. Esse processo ocorre de forma natural ao longo dos anos. Com o lançamento de esgoto sem tratamento esse processo é acelerado. Há o excesso de nitratos e fosfatos que acabam gerando um crescimento fora do normal das algas. Por sua vez, as algas acabam crescendo na superfície e bloqueiam a passagem da luz solar e conseqüentemente reduz a fotossíntese das camadas mais profundas, reduz a quantidade de oxigênio dissolvido (OD) e assim causa a morte dos organismos aeróbios. Com a morte desses organismos aeróbios, há o aumento da carga orgânica e crescimento dos organismos decompositores que são bactérias anaeróbias facultativas e se encarregam de remover esse excesso de carga orgânica. Como em seus processos de degradação da matéria orgânica os decompositores liberam toxinas, pioram ainda mais a poluição dos corpos hídricos comprometendo, assim, o meio ambiente em vários níveis (AMABIS, J.M; MARTHO, G.R., 2003).

Uma alternativa de remover simultaneamente matéria orgânica e nutrientes do esgoto sanitário é a utilização de processos de lodos ativados com a utilização de processos sequenciais anaeróbios, aeróbio e anóxico. Os lodos ativados são originados dos processos de tratamento de esgotos com o objetivo de degradar os compostos orgânicos biodegradáveis presentes nos corpos hídricos. O processo ocorre pela ação das bactérias que podem fazer por via aeróbica, anaeróbica ou anóxica. Entretanto, não são todos os microrganismos que podem realizar esse trabalho. Como se deseja combater o problema da eutrofização, os grupos de microrganismos responsáveis por remover nutrientes do esgoto sanitário são as bactérias heterotróficas oxidadoras de amônio, oxidadoras de nitrato, organismos acumuladores de fosfato, desnitrificantes acumuladores de fosfato e as bactérias da digestão anaeróbia (VON SPERLING, M., 1997).

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de esgoto são coletadas na Estação de Tratamento de Esgoto da Mangueira (ETE Mangueira) localizada no bairro da Mangueira no município do Recife, Estado de Pernambuco.

Foram utilizados dois reatores sequenciais em batelada com dimensões de 1,90 metros de altura e 40 centímetros de diâmetro, feitos de PVC reforçado com volume útil de 140 L e alimentados por gravidade através de um tanque de 1000 L que por sua vez era alimentado com o efluente vindo da caixa de areia da ETE Mangueira por bombeamento. Todo o

sistema de descarte, aeração e agitação é automatizado. Os reatores operaram com Tempo de Detenção Hidráulica (TDH) de 8 horas. Apenas no momento do cultivo do lodo é que esse tempo foi diferente sendo de 6 horas para a remoção simultânea de nitrogênio e fósforo e sem tempo específico no ajuste de procedimentos operacionais. Quando o ciclo de 8h foi utilizado, foi adicionado uma fonte externa de carbono (propionato de sódio e acetato de sódio alternadamente), a fim de verificar o seu efeito nos processos de desnitrificação e remoção de fósforo assim como na diversidade microbiana.

As análises foram feitas no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Para se fazer as análises de diversidade microbiana, utilizaram-se técnicas de biologia molecular. Aplicaram-se as técnicas de biologia molecular com base no gene codificante para a subunidade ribossômica 16S rRNA utilizado nas técnicas de PCR (Polymerase Chain Reaction) e DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

De início se fez a extração do DNA seguindo o procedimento de extração de acordo com o Power Soil Isolation Kit™. Logo em seguida, fez-se uma quantificação de DNA através do espectrofotômetro (NanoDrop® 2000cUV-Vis) determinando assim a sua pureza.

Em seguida, utilizou-se a amostra de DNA para amplificá-la através da PCR utilizando-se de condições e *primers* adequados para essa amostra. As condições e *primers* foram:

- 968F-GC/ 1392R (BAC)
- Gradiente de uréia/formamida no gel: 40-70 % UF
- Concentração de acrilamida: 8%
- Tempo de corrida: 4 h @ 250 V
- Temperatura: 60°C

A partir disto utiliza-se a DGGE para fazer a separação e distinção de cada grupo de microrganismo em bandas no gel. Posteriormente essas bandas foram recortadas e sequenciadas para a identificação de cada microrganismo.

Por fim, com os resultados obtidos se monta um dendograma (de acordo com o método de Wand) para comparar as comunidades em ambos os reatores e também no próprio reator nas mudanças que ocorreram.

RESULTADOS

Organizadas as amostras, fez-se a DGGE para os domínios *Bacteria* e *Archaea* se obtendo os seguintes resultados:

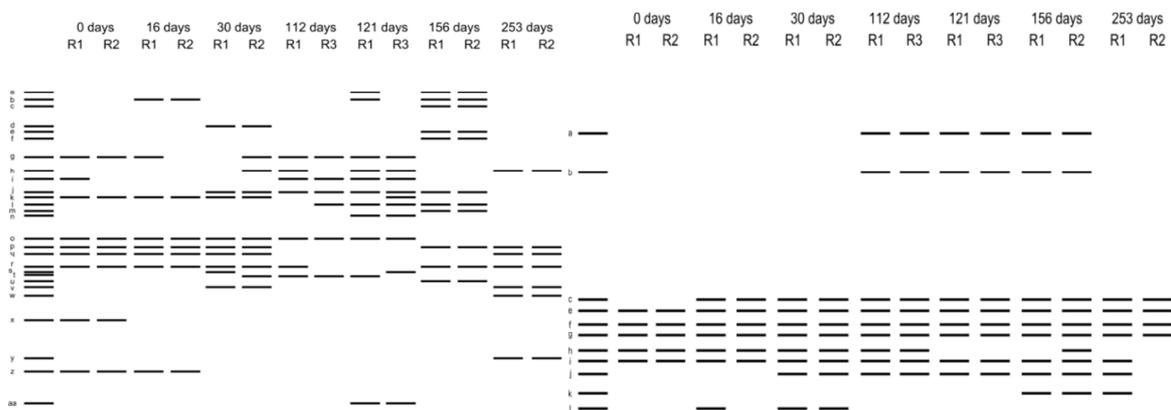


Figura 1: Padrões de bandas de DGGE para o domínio *Bacteria* (esquerda) e *Archaea* (direita).

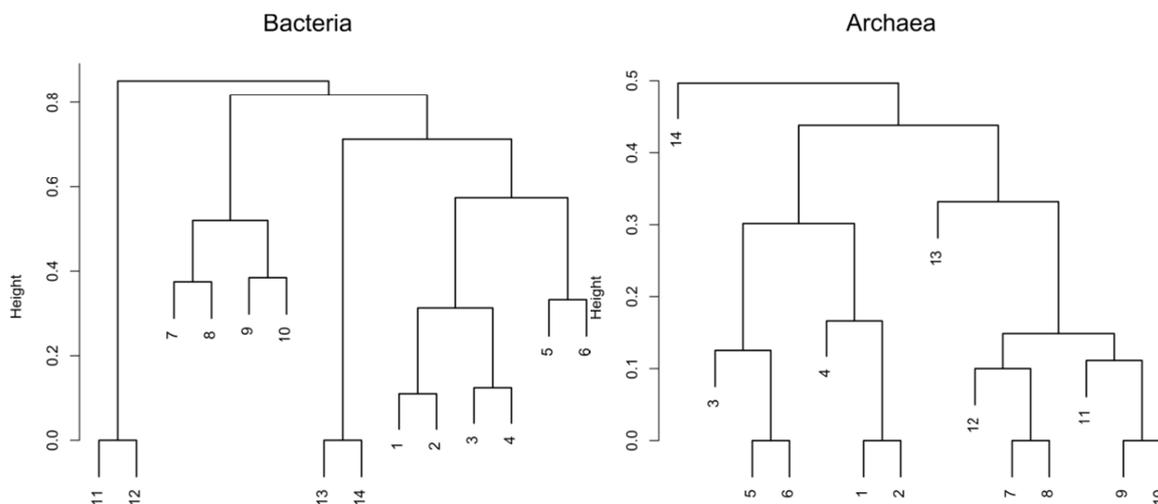


Figura 2: Dendrograma da análise por “clustering” para os domínios *Bacteria* (esquerda) e *Archaea* (direita).

Ao serem recortadas as bandas dominantes verificou-se que houveram dois grupos principais de amostras, sendo eles de 1 à 6 e de 7 à 14. Observa-se através do dendrograma que para o domínio *Bacteria* os reatores 1 e 2 têm similaridade entre si e ao longo do tempo mantêm, ainda que a comunidade de ambos venha se modificando, a similaridade das comunidades microbianas e também sua eficiência na remoção de carbono, fósforo e nitrogênio. Já para o domínio *Archaea*, apesar da semelhança entre os reatores 1 e 2, foi observado, nas últimas fases de coleta um maior distanciamento entre os reatores.

DISCUSSÃO

Essas análises são feitas para se comparar as comunidades microbianas em cada um dos reatores no mesmo dia, verificando, assim, se as mudanças operacionais trazem mudanças significativas nas células e também do rendimento do processo. Além disso também pode-se comparar a evolução ao longo do tempo de operação, observando dessa maneira se as células vêm se desenvolvendo como esperado de acordo com a literatura.

As bandas de DGGE representam, de acordo com o seu peso molecular, um microrganismo. Após o arraste do DNA no gel de agarose, o DNA do microrganismo irá formar uma banda em determinada altura que, ao ser comparada com uma referência, irá assim se determinar o peso molecular e o possível microrganismo correlacionado. Ambos os géis de DGGE foram desenhados para mostrar quais bandas se mostraram mais expressivas nos géis como mostra a figura 1 e assim contar a quantidade de bandas presentes.

Observa-se também que através da caracterização dos microrganismos de cada banda recortada de DGGE há uma variedade muito grande de microrganismos. Porém, os gêneros aos quais pertencem precisam ter 80% de confirmação filogenética para se atestarem como espécie realmente presente e assim teralguma conclusão mais precisa das comunidades microbianas presentes e quais especificamente são responsáveis pela remoção de nutrientes. A partir disto a análise passa a ser a nível de Família que já tolera valores de confirmação menores que 80%, mas que diminui a precisão na determinação das espécies que se deseja encontrar.

CONCLUSÕES

Através dos resultados da PCR-DGGE obtidos e da análise do dendrograma, percebe-se que mesmo com a adição extra de fonte de carbono a um dos reatores, mudanças físico-químicas e mudanças operacionais, não houveram mudanças significativas na composição

das espécies microbianas presentes em ambos os reatores e conseqüentemente na eficiência da remoção dos nutrientes.

Com isso percebe-se que depois de 112 dias de operação a comunidade microbiana se desenvolveu e se diversificou. A partir disso, necessitou-se saber se a comunidade já apresentava as PAO's e DPAO's como espécies dominantes.

Após a análise filogenética para os domínios *Bacteria* e *Archaea*, verifica-se que no domínio *Bacteria* nenhuma apresentou confirmação maior ou igual a 80% para os Gêneros encontrados. Como analisar pelas Famílias diminui a precisão da determinação das espécies envolvidas, não pode-se concluir com precisão quais organismos estavam realmente presentes e eram responsáveis pela remoção dos nutrientes e se PAO's e DPAO's eram os microrganismos dominantes.

Observou-se também que a resolução das bandas de DGGE foram insuficientes, ou seja, bandas de diferentes amostras na mesma altura corresponderam a microrganismos diferentes. Logo, os resultados obtidos da DGGE não puderam ser considerados 100% confiáveis e necessitaria de outros métodos para se obter maior precisão quanto a identificação dos microrganismos.

Através desses resultados, estudar-se-ão novas estratégias para a fase de operação e assim se obter resultados significativos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo, ao CNPq e à Universidade Federal de Pernambuco pela oportunidade de crescimento profissional, a minha orientadora Maria de Lourdes Florêncio e ao mestrando Antônio Gustavo pelas orientações. Meus mais profundos agradecimentos aos familiares e minha namorada que sempre me deram apoio em todos os momentos.

REFERÊNCIAS

VON SPERLING, M. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias - Lodos ativados**. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – DESA. Universidade Federal de Minas Gerais. Vol. 4. 1997.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

BERG, Jeremy M.; TYMOCZKO, John L.; STRYER, Lubert. **Biochemistry**. 7.ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2012. 1054 p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5th ed. W. H. Freeman: New York, 2008. 1158p.

Ferreira, A. L. T. S. 2014. **Remoção Biológica Simultânea de N e P de Esgoto Sanitário**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Kang D. W.; Noguera D. R. 2014. **Candidatus Accumulibacter phosphatis: Elusive Bacterium Responsible for Enhanced Biological Phosphorus Removal**. Journal of Environmental Engineering JOURNAL OF ENVIRONMENTAL ENGINEERING v. 140 p. 2-10.

AMABIS, J.M; MARTHO, G.R. **Fundamentos da Biologia Moderna**. 3ª ed. São Paulo. Editora Moderna, v. único, 2003.