

### III-083 – AMPLIFICAÇÃO DE DNA METANOGÊNICO PRESENTE EM LODO ANAERÓBIO

**Maria Carolina Vieira da Rocha**

Bióloga pela Universidade Positivo. Mestre em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental da Universidade Federal do Paraná (PPGERHA/UFPR). Doutoranda no PPGERHA/UFPR.

**Karin Braun Prado**

Doutora em Genética pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Professora adjunta do Departamento de Patologia da UFPR.

**Maria Cristina Borba Braga<sup>(1)</sup>**

PhD em Tecnologia Ambiental pelo Imperial College of Science, Technology and Medicine, Londres. Professora adjunta do Programa de Pós Graduação em Recursos Hídricos e Ambiental da Universidade Federal do Paraná (PPGERHA/UFPR). Coordenadora do Laboratório de Engenharia Ambiental Prof. Francisco Borsari Netto (LABEAM/UFPR).

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Rua Coronel Francisco Heráclito dos Santos, nº 270 – Bloco 5 – Piso Superior – Setor de Tecnologia – Departamento de Hidráulica e Saneamento (DHS) – Centro Politécnico – Jardim das Américas – Caixa Postal: 19011 – CEP: 81.530-000 – Curitiba – PR – Brasil - Tel: +55 (41) 3361-3045 - e-mail: [crisbraga@ufpr.br](mailto:crisbraga@ufpr.br)

#### RESUMO

O uso de técnicas moleculares na Engenharia Sanitária vem possibilitando novas abordagens às pesquisas conduzidas nesta área do conhecimento. Entretanto, a natureza complexa das amostras ambientais estudadas, como por exemplo, lodos anaeróbios oriundos de sistemas de tratamento de águas residuárias, limita a aplicação destas ferramentas. Em especial, a Reação em Cadeia da Polimerase, ou PCR, pode apresentar problemas na amplificação do DNA extraído diretamente do lodo. A grande diversidade de material genético dos microrganismos presentes nestas amostras parece ser um dos fatores limitantes. Este estudo teve como objetivo avaliar a extração e amplificação de DNA metanogênico, presente em lodo anaeróbio coletado no fundo da lagoa facultativa do Aterro Sanitário de Curitiba, Paraná, Brasil, pela técnica da PCR. Simultaneamente, foram analisadas amostras de lodo coletado de reatores anaeróbios em batelada (ASBR), com e sem bioaumento de microrganismos metanogênicos. Os resultados indicam que o uso de *primers* universais (i.g.16S rRNA) em amostras ambientais pode resultar em ampliações de DNA inespecíficas pela técnica da PCR, comprometendo a análise molecular deste tipo de material.

**PALAVRAS-CHAVE:** DNA metanogênico, Lodo anaeróbio, Reação em Cadeia da Polimerase.

#### INTRODUÇÃO

O uso de técnicas moleculares para avaliar e identificar a microbiota existente em amostras ambientais tornou-se uma prática usual em laboratórios de diferentes áreas de pesquisas. A Engenharia Sanitária não é exceção e vem apresentando resultados promissores, principalmente pelo uso da técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para acompanhamento do consórcio microbiano presente em lodos anaeróbios (ZUMSTEIN *et al.*, 2000; YU *et al.*, 2005).

É importante salientar que o método escolhido para extração do DNA total das amostras deve fornecer purificação adequada aos ácidos nucleicos. Entretanto, a presença de substâncias como ácidos húmicos e polissacarídeos em amostras de DNA pode interferir em várias técnicas de detecção molecular (KINGSLEY e RICHARDS, 2001). A elevada diversidade microbiológica existente em amostras ambientais e a similaridade entre algumas sequências conservadas também parece agir como interferente durante a amplificação genômica de taxons específicos (PROMEGA, 2009).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os resultados obtidos a partir da amplificação do DNA de microrganismos metanogênicos extraídos de amostras de lodo anaeróbio coletado no fundo da lagoa facultativa

do Aterro Sanitário de Curitiba, Paraná, Brasil (25°37' 15,35'' S; 49°20' 18,82'' O). Amostras de lodo coletado de reatores anaeróbios em batelada (ASBR), com e sem bioaumento de microrganismos metanogênicos, também foram submetidas à extração de DNA e amplificadas utilizando *primers* universais 16S rRNA para ordens metanogênicas, conforme metodologia descrita a seguir.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de lodo anaeróbio da lagoa facultativa, componente do sistema de tratamento de lixiviado do Aterro Sanitário de Curitiba. Este lodo foi utilizado, posteriormente, como inóculo em dois reatores ASBR, alimentados com o lixiviado do aterro. Posteriormente, amostras de lodo foram coletadas nos períodos de 1, 20, 40 e 60 dias de operação dos reatores. Imediatamente após as coletas, as amostras foram acondicionadas em refrigerador, sob temperatura de 4°C ± 2°C.

Os microrganismos presentes no lixiviado do aterro sanitário foram cultivados em meio contendo 20 mL de lixiviado de aterro sanitário bruto e ágar, como agente solidificante. O meio foi autoclavado a 120 °C, por 15 minutos e, a seguir, em câmara anaeróbia, foi semeado 1 mL de lixiviado sobre os meios de cultivo. Após a semeadura, as placas com os meios receberam, cada uma, um disco de 30 µg do antibiótico cloranfenicol. Os meios cultivados foram mantidos em câmara anaeróbia, sob temperatura ambiente, por 20 dias. A condição anaeróbia foi obtida pelo jateamento de uma mistura de gases nitrogênio e carbônico, na proporção 4:1. Os microrganismos cultivados foram adicionados no lodo anaeróbio de um dos reatores ASBR antes do início da operação. Os reatores foram denominados Reator Teste (RT), contendo o inóculo microbiano, e reator Controle (RC), sem inóculo.

A extração do DNA total foi realizada nas seguintes amostras: a) lodo anaeróbio bruto, b) lodo coletado dos reatores e c) cultivo dos microrganismos. Devido à dificuldade relativa à extração do DNA de complexos biológicos com grande quantidade de material extracelular, a metodologia utilizada foi uma adaptação de duas metodologias clássicas de extração: método do fenol-clorofórmio (SAMBROOK e RUSSEL, 2001) e método do *salting-out* (LAHIRI e NUREMBERG, 1991).

A seguir são descritas as etapas da metodologia de extração de DNA estabelecida para este estudo.

Um volume de 100 µL de lodo foi disposto em tubo de 2,5 ml, centrifugado a 3.500 rpm (2.054 x g) por 10 minutos, descartado o sobrenadante e lavado com tampão fosfato (PBS), pH 7,2. Após duas etapas de lavagem, o material foi centrifugado a 1.500 rpm (377 x g), por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o material precipitado (*pellet*) foi macerado com o auxílio de um pistilo. O material resultante foi suspenso em 100 µL de tampão de extração A (10 mM Tris pH 7,4, 10 mM NaCl, 25 mM EDTA, 1% SDS, 50 µg. mL<sup>-1</sup> de Proteinase K) e incubado em banho-maria a 42°C, por 1 hora.

Após o período de incubação, foi adicionado igual volume de 100 µL de solução de fenol tamponado (pH 8,0), seguindo agitação manual cuidadosa, por inversão, por 10 minutos. A seguir, o tubo foi centrifugado a 3.500 rpm (2.954 x g), por 10 minutos. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo de 2,5 ml e foram adicionados 200 µL de clorofórmio, seguindo agitação manual cuidadosa, por inversão, por 10 minutos. Na sequência, o tubo foi centrifugado a 3.500 rpm (2.054 x g), por 10 minutos, sob temperatura de 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo em que foram adicionados 40 µL de solução 3M de acetato de sódio, pH 5,2; e 1 mL de etanol absoluto gelado. Seguiu-se um período de incubação de 15 minutos, em geladeira (4°C). Após este período, foi realizada nova centrifugação a 3.500 rpm (2.054 x g), por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 500 µL de etanol gelado, na concentração de 70%. A seguir, foi realizada nova centrifugação a 3.500 rpm (2.054 x g), por 10 minutos, para a sedimentação do material genético. O material precipitado foi seco em estufa a 30°C, por 10 minutos.

Após esta primeira fase, foi realizada uma nova etapa de extração, para assegurar a purificação adequada do material genético das amostras. O *pellet* seco foi ressuspenso em 10 µL de tampão TE (Tris 1 mM, EDTA 0,1 mM pH 8,0). Foi adicionado 1 mL de tampão de extração B (Tris 2M pH 8,0, NaCl 3M, EDTA 0,4M pH 8,0, proteinase K 100 µL/mL) no tubo da amostra que, a seguir, foi incubado em banho-maria, temperatura de 42°C, por 24 horas. Ao final do processo foram adicionados 100 µL de solução de cloreto de sódio 6 M. As amostras foram resfriadas a 4°C, por 20 minutos, e centrifugadas a 3.000 rpm (1.509 x g), por 25 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foram adicionados 200 µL de etanol absoluto.

O material precipitado foi seco em estufa, a 30°C, por 10 minutos. O DNA precipitado foi ressuspensão em solução tampão TE para preservação e armazenado sob temperatura de -20°C.

Para a detecção das ordens metanogênicas Methanobacteriales, Methanomicrobiales e Methanosarcinales e do domínio Archaea, pela técnica da PCR, foram empregados, respectivamente, os *primers* MBT857F e MBT1196R; MMB282F e MMB832R; MSL812F e MSL1159R; ARC787F e ARC1059R (YU *et al.*, 2005). Para detecção do domínio Bacteria foram empregados os *primers* 9F e 1512R (TEN *et al.*, 2003). A sequência de oligonucleotídeos e o tamanho dos fragmentos de amplificação esperados para cada par de *primers* são apresentados no Quadro 1. Os *primers* escolhidos visam amplificar a região do gene 16S rRNA presente no DNA dos microrganismos de interesse.

**Tabela 1: Sequências dos *primers* utilizados e tamanhos dos fragmentos de amplificação esperados, em pares de base (pb)**

Nome	Primers	Sequência 5'-3'	Tamanho do fragmento amplificado
Domínio Archaea	ARC787F ARC1059R	CGWAGGGGAAGCTGTTAAGT TACCGTCGTCCACTCCTT	273pb
Ordem Methanobacteriales	MBT857F MBT1196R	ATTAGATACCCSBGTAGTCC GCCATGCACCWCCTCT	343pb
Ordem Methanomicrobiales	MMB282F MMB832R	GTAACGATRVTGCTAGGT GGTCCCCACAGWGTACC	506pb
Ordem Methanosarcinales	MSL812F MSL1159R	ATCGRTACGGGGTTGTGGG CACCTAACGCRCATHGTTTAC	354pb
Domínio Bacteria	9F 1512R	GAGTTTGATCCTGGCTCAG ACGGHTACCTTGTTACGACTT	530pb

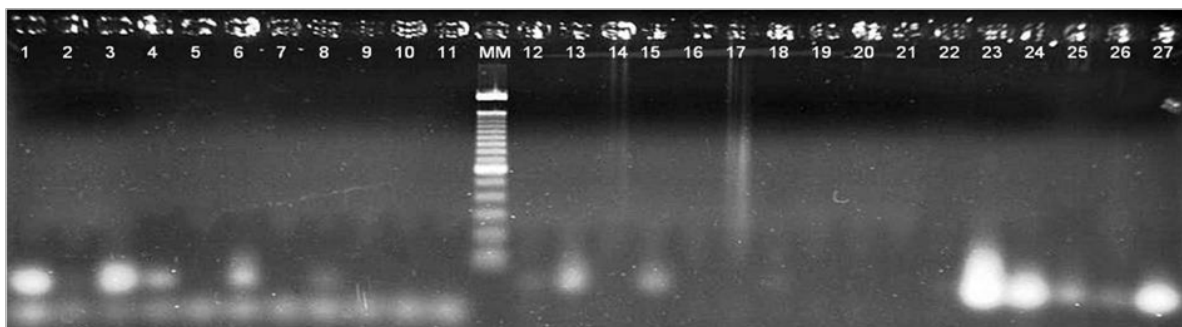
O DNA extraído em etapa anterior e os *primers* descritos acima foram utilizados para amplificação pela técnica da PCR. As PCRs, para os domínios Archaea e ordem Methanosarcinales, foram realizadas utilizando-se a seguinte condição de ciclo da PCR: 30 ciclos de 94°C/1 min, 55°C/1 min e 72°C/1 min (HWANG *et al.*, 2008). Para amplificação das sequências das ordens Methanobacteriales e Methanomicrobiales as condições da ciclagem foram as seguintes: 30 ciclos de 94°C/1 min, 62°C/1 min e 72°C/1 min (HWANG *et al.*, 2008). Finalmente, para amplificar as sequências do domínio Bacteria, a condição de ciclo utilizada foi: 25 ciclos de 95°C/2 min, 42°C/30 seg e 72°C/4 min (WEISBURG, 1991).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador, marca Eppendorf, modelo Mastercycler gradient. Para detectar possíveis contaminações por DNA não metanogênico, em cada PCR foi inserido um controle negativo (água ultrapura, com ausência de DNA). Para separação dos produtos de PCR, após as reações de PCR, as sequências obtidas foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose a 1,5%, por 1h a 100 v. Os fragmentos esperados para cada domínio são os seguintes: 273 pb para Domínio Archaea, 343 pb para ordem Methanobacteriales, 506 pb para ordem Methanomicrobiales, 354 pb para ordem Methanosarcinales e 530 pb para Domínio Bactéria, tendo sido visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídeo.

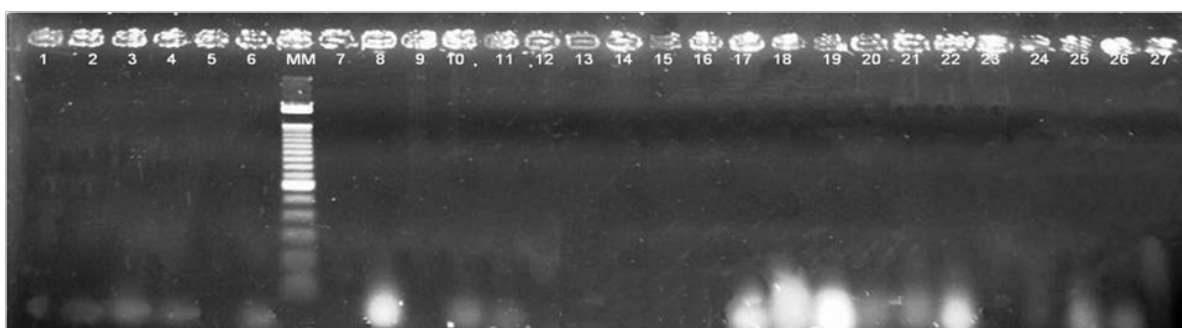
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as reações de amplificação realizadas, contendo amostras de DNA do cultivo ou do lodo, apresentaram fragmentos amplificados menores do que aqueles esperados como produtos.

Nas Figuras 1 e 2 são apresentados os resultados das corridas eletroforéticas.



**Figura 1: Eletroforese em gel de agarose. Pistas 1 A 11- Domínio Bacteria, com: 1) lodo bruto, 2) cultivo, 3) RC 1º dia, 4) RT 1º dia, 5) RC 20º dia, 6) RT 20º dia, 7) RC 40º dia, 8) RT 40º dia, 9) RC 60º dia, 10) RT 60º dia, 11) água. MM- marcador molecular 100 PB. Pistas 12 A 22- Domínio Archaea, com: 12) lodo bruto, 13) cultivo, 14) RC 1º dia, 15) RT 1º dia, 16) RC 20º dia, 17) RT 20º dia, 18) RC 40º dia, 19) RT 40º dia, 20) RC 60º dia, 21) RT 60º dia, 22) água. Pistas 23 A 27: Methanobacteriales, com: 23) lodo bruto, 24) cultivo, 25) RC 1º dia, 26) RT 1º dia, 27) RC 20º dia**



**Figura 2: Eletroforese em gel de agarose. Pistas 1 a 6- Methanobacteriales, com : 1) RT 20º dia, 2) RC 40º dia, 3) RT 40º dia, 4) RC 60º dia, 5) ÁGUA, 6) RT 60º dia. MM- marcador molecular 100PB. Pistas 7 A 17- Methanomicrobiales, com: 7) água, 8) lodo bruto, 9) cultivo, 10) RC 1º dia, 11) RT 1º dia, 12) RC 20º dia, 13) RT 20º dia, 14) RC 40º dia, 15) RT 40º dia, 16) RC 60º dia, 17) RT 60º dia. 22) água. Pistas 18 A 27: Methanosarcinales, com: 18) lodo bruto, 19) cultivo, 20) RC 1º dia, 21) RT 1º dia, 22) RC 20º dia, 23) RT 20º dia, 24) RC 40º dia, 25) RT 40º dia, 26) RC 60º dia, 27) RT 60º dia**

As bandas visualizadas no gel de agarose assemelharam-se ao perfil de amplificação normalmente obtido pela técnica do RAPD, ou Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso. Esta similaridade sugere que os *primers* utilizados para a PCR das amostras de DNA do cultivo e dos lodos podem ter amplificado outras sequências de DNA competitivas presentes na amostra, além das sequências alvo, produzindo os padrões de bandas observados.

De acordo com o *Protocols and Applications: Guide for Nucleic Acid Amplification* (PROMEGA, 2009), a amplificação não específica é um dos principais problemas enfrentados por pesquisadores durante a realização de ensaios da PCR. O problema é agravado quando são utilizados *primers* universais, como o 16S rRNA. Nestes casos, são aumentadas as chances de se encontrar sítios alternativos de reconhecimento que podem competir pelo anelamento dos *primers* e produzir amplicons de tamanhos diferentes.

No método de microscopia eletrônica de varredura acoplado a micro-análise química (MEV-EDS) foi observado que o lodo promove a tendência dos conglomerados se reunirem entre si. Por outro lado, a MEV para a cinza indicou a presença de uma grande diversidade entre as partículas, o que revela uma alta porosidade do material por não haver ligação química entre os componentes, caracterizando um material disforme. Para o RPC, pela MEV pode-se observar que a superfície é bastante lisa, uniforme, sem elevações, com uma considerável rede de poros irregulares. A maioria das partículas tem as formas redondas, como nuvens, típicos de substâncias amorfas.

Analisando as sequências dos *primers* universais para o domínio Archaea no algoritmo BLAST® (ALTSCHUL *et al.*, 1990) foram encontrados valores variados de similaridade no próprio domínio e, também, com grupos

filogeneticamente mais distantes, como algumas espécies de protozoários. Esta similaridade entre sequências pode ter permitido a amplificação randômica das amostras, havendo, portanto, vários DNAs alvo para anelamento dos *primers*. Nestas condições, o material adicionado para a replicação do DNA seria esgotado rapidamente e reduziria grandemente a probabilidade de amplificação exponencial de um único fragmento.

Apesar da possível amplificação inespecífica, os resultados permitiram comparar o desenvolvimento geral do biofilme nos reatores Controle e Teste e identificar os grupos metanogênicos mais abundantes em amostra de cultivo anaeróbico e do lodo anaeróbico da lagoa facultativa do Aterro Sanitário de Curitiba.

Após o 1º dia de operação, as amostras do lodo anaeróbico e do reator Controle apresentaram as maiores quantidades de bactérias entre as amostras (Figura 1, pistas 1 e 3). Entretanto, as condições de PCR para os *primers* deste domínio utilizaram baixa temperatura de anelamento (42°C) por um curto período de tempo (30 segundos), o que refletiu em anelamento inadequado dos *primers* nas amostras. Os *primers* não anelados podem ser observados como bandas no final das pistas 1 a 11.

Para o domínio Archaea, as amostras que apresentaram maior amplificação foram aquelas do meio MB-cloranfenicol e do reator Teste após o 1º dia de operação (Figura 1, pistas 13 e 15). Estes resultados permitem afirmar que as condições utilizadas durante o cultivo dos microrganismos do lixiviado de aterro sanitário foram eficientes para magnificar a população metanogênica antes da sua adição no reator Teste. Este, por sua vez, também apresentou quantidade significativa de arqueas no período inicial de operação dos reatores devido ao bioaumentação realizado.

A ordem Methanobacteriales apresentou bandas com intensa amplificação para as amostras de lodo anaeróbico, meio MB-cloranfenicol e Reator Controle após 20 dias de operação (Figura 1, pistas 23, 24 e 27). Mesmo em menor quantidade, todas as amostras amplificaram na forma de bandas para esta ordem metanogênica (Figura 1, pistas 25 e 26; Figura 2, pistas 1,2,3,4 e 6). Este resultado comprovou a importância desta ordem na microbiota anaeróbica do lixiviado de aterro sanitário.

Para a ordem Methanomicrobales, as amostras de DNA com maior amplificação foram as do lodo anaeróbico e do reator Teste após 60 dias de operação (Figura 2, pistas 8 e 17).

A ordem Methanosarcinales foi identificada e amplificada em todas as amostras de DNA, com destaque para o lodo e o cultivo com cloranfenicol (Figura 2, pistas 18 e 19). O gênero Methanosarcina, pertencente a esta ordem, é bastante versátil na utilização de substratos e, provavelmente, deve ser encontrado em vários períodos de operação dos reatores.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos não possibilitaram visualizar uma única banda (fragmento amplificado do tamanho esperado) e sim uma série de bandas, algumas fracamente amplificadas e outras, menores, com intensa amplificação.

Devido ao grande potencial destas amostras ambientais em fornecerem sequências-alvo competitivas, o uso de *primers* 16S rRNA não se mostrou adequado para a amplificação das amostras de DNA extraídas de amostras ambientais.

A aplicação de técnicas como a *Nested-PCR* ou o uso de *primers* para anelamento com regiões codificadoras que coordenem funções metabólicas comuns apenas ao grupo de metanogênicos pode ser a solução para a obtenção de ampliações de DNA mais específicas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERSW, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment/search tool. **Journal of molecular Biology**. v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
2. HWANG, K; SEUNG, G. S.; JAAI, I.; SEOKHWAN, H. Methanogenic profiles by denaturing gradient gel electrophoresis using order-specific primers in anaerobic sludge digestion. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 269–276, 2008.
3. KINGSLEY, D. H.; RICHARDS, G. P. Rapid and efficient extraction method for reverse transcription-PCR detection of hepatitis A and Norwalk-like viruses in shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4152-4157, 2001.
4. LAHIRI, D. K.; NUREMBERG Jr, J. I. A rapid non enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**. v. 19, p. 5444, 1991.
5. PROMEGA. **Protocols and application guide: nucleic acid amplification**. rev. 12/ 2009.
6. SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. Molecular cloning: a laboratory manual. v. 1-3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
7. TEN, L. N.; IM, W-T; KIM, M-K; KANG, M-S; LEE, S-T. Development of a plate technique for screening of polysaccharide-degrating microorganisms by using a mixture of insoluble chromogenic substrates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 357-382, 2004.
8. WEISBURG, W. G., BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.