

Adriana Lopes dos Santos

---



Diversidade Molecular Microbiana de lixiviados de aterros.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientador: Alexandre Soares Rosado

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES  
RIO DE JANEIRO  
AGOSTO DE 2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Santos, Adriana Lopes.

Diversidade Molecular Microbiana de lixiviados de aterros/Adriana Lopes dos Santos – Rio de Janeiro, 2010.

98f.

Tese: Doutorado em Ciências (Microbiologia)

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2010.  
Michigan State University/Center for Microbial Ecology, 2010.

Orientador: Alexandre Soares Rosado/James Tiedje.

Referências Bibliográficas: f. 90 - 99

1. Ecologia Microbiana, 2. Aterros Sanitários, 3. Resíduos Sólidos, 4. Lixiviados 5. Pirosequenciamento, 6. Diversidade Microbiana.

I. Soares, Alexandre Rosado.

II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Doutorado em Ciências (Microbiologia).

III. Diversidade Molecular Microbiana de lixiviados da Região metropolitana do Rio de Janeiro.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular no Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação do Prof. Alexandre Soares Rosado em parceria com o Dr. James Tiedje na Michigan State University.

(...) “I never ask advice about growing”, Alice said indignantly.  
“Too proud?” The other enquired.  
Alice felt even more indignant at this suggestion. “I mean”, she  
said, “That one can’t help growing older.”  
“One can’t, perhaps”, said Humpty Dumpty; “But two can, with proper  
assistance.” (...)

(Through the looking-Glass, Lewis Carroll)

Queridos amigos,

Tenho certeza que cometeria injustiças ao tentar enumerar e agradecer separadamente cada um de vocês. Além disso não tenho o dom da escrita, adoraria, pois certamente a confecção dessa tese teria sido muito mais simples...mas o máximo que meu pensamento cartesiano permite dizer é que esse conjunto de “células análogas” provocará a “apoptose” de alguns neurônios em busca de uma mensagem perfeita.

Após esses anos de experimentação seguimos junto tal qual “gag-pol”, sempre protegidos pelo “capsídeo” do carinho e da sinceridade. Mesmo que algum período de latência tenha sido imposto pelas circunstâncias da vida, nossos encontros foram sempre seguidos de um entrosamento perfeito, assim como ocorre quando “env” avista aquela molécula de “CD4”. Quantas e quantas vezes promovemos “crenações” e “turgências”, e assim sacrificamos nossas vidas, rompendo membranas para que pudéssemos atingir uma “isotonia” de opiniões. A todo o momento identifico com facilidade “operons” homólogos em cada um de vocês, o que só se explicaria por uma “transferência lateral” de idéias. Isto proporciona um intercâmbio de pensamentos tão rápido e completo que só pode ser comparado a uma “junção gap”, onde uma união física e química perfeita ocorrem, propiciando a livre difusão de idéias.

Ao longo desse tempo, novos elementos foram acrescentados a essa pequena comunidade, afinal a biodiversidade é imensa e sempre bem vinda. Sem as mudanças, muitas vezes silenciosas, não sobreviveríamos aos eventos de “deriva” que por vezes nos afastou, e não conseguiríamos nos adaptar aos novos ambientes explorados. Hoje seguimos como uma pequena “comunidade microbiana”, onde cada elemento é fundamental para a homeostasia de todos; dominando diferentes habitat e por vezes sendo confundidos como uma única espécie. Contudo basta olhar qualquer “gene marcador”, nuclear ou

não, para perceber que somos diferentes indivíduos que apenas se respeitam e se apóiam.

Neste mar “coloidal” de idéias, sinto que estou perdendo o foco principal dessa mensagem que é agradecer. Obrigada meus queridos amigos, sem o apoio de vocês eu não teria sobrevivido a essa atmosfera, por vezes extremamente oxidante, do meio acadêmico. Obrigada por enumeras vezes me fazer sentir menos densa que o ar, permitindo que eu alcançasse a estratosfera num movimento aparentemente “Browniano”, que culminou no dia de hoje. Obrigada.

Adriana Lopes.



**Para meu querido amigo e orientador, e seu “grilo falante”.  
Obrigada pela confiança.**



Adriana Lopes dos Santos

Diversidade Molecular Microbiana de lixiviados de aterros.

Orientador: Alexandre Soares Rosado

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Nosso entendimento das populações microbianas responsáveis pela degradação da matéria orgânica presente nos aterros sanitários é ainda limitado. Boa parte do conhecimento atual foi obtida indiretamente através de estudos realizados em reatores ou sistemas fechados. Ao contrario dos bioreatores os aterros são muito extensos e muitas vezes heterogêneos. A ausência de informação adequada vem dificultando o avanço na obtenção de tecnologias eficientes para o tratamento de lixiviados. As técnicas moleculares, especialmente aquelas que se baseiam na análise comparativa de seqüências do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal (*rrs*), têm sido amplamente utilizadas e se mostraram eficientes na análise do perfil microbiano em diversos ambientes. Até o momento, poucos estudos moleculares sobre a diversidade microbiana presente em lixiviados foram realizados, especialmente quando se trata de aterros operados em nossas condições climáticas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a estrutura e diversidade da comunidade bacteriana presente nos efluentes de cinco aterros sanitários distintos sendo quatro dentro da Região metropolitana do Rio de Janeiro e um em Recife no Estado de Pernambuco. São eles: Morro do Céu (MC), Nova Iguaçu (NG), Gramacho (GR), Gericinó (GE) e Muribeca (MU). Uma extensa análise da comunidade bacteriana presente nesses efluentes foi realizada através da técnica de pirosequenciamento, que demonstrou que os filós Proteobacteria e Firmicutes eram os mais abundantes para a maioria das amostras, exceto GR onde o filo Tenericutes foi mais abundante que Proteobacteria. A presença de alguns grupos somente foi observada em algumas amostras, sendo inerente ao lixiviado analisado, como Defirribacteres para o lixiviado de MU e Lentisphaerae para NG. A identificação de filós ainda não descritos para esse tipo de resíduo, bem como uma ampla fração das seqüências sem classificação, sugere que as comunidades bacterianas presente nesses lixiviados são complexas e permanecem inexploradas. Acreditamos que nosso trabalho ofereceu uma visão ampla das comunidades bacterianas *in situ* e a informação aqui contida poderá servir como ponto de partida para estudos mais detalhados, que ajudarão a compreender os processos que levam a formação desse efluente nos aterros sanitários em operação.

**Palavras-chave:** Ecologia Microbiana, Aterros Sanitários, Resíduos Sólidos, Lixiviados Pirosequenciamento, Diversidade Microbiana.

Adriana Lopes dos Santos

Molecular Microbial Diversity of leachate from landfills.

Advisor: Alexandre Soares Rosado

Abstract of dissertation submitted to the Graduate Program in Science (Microbiology), Institute of Microbiology Prof. Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro, as part of the requirements for obtaining the title of pHD of Science (Microbiology).

Our understanding of microbial populations responsible for degradation of organic matter in landfills is still limited. Much of the current knowledge was indirectly obtained through studies conducted in reactors or close systems. Unlike the bioreactor, landfills are large and often heterogeneous. The absence of adequate information has been hampering progress in achieving efficient technologies for leachate treatment. Molecular techniques, especially those based on comparative analysis of gene sequences encoding the small subunit 16S ribosomal RNA (*rrs*) have been widely used and proved effective in analyzing the microbial profile in diverse environments. Nowadays, few molecular studies on the microbial diversity present in leachate were made, especially when it comes to landfills operated in our climate. The aim of this study was evaluate the structure and diversity of bacterial community present in effluents from four landfills in the metropolitan region of Rio de Janeiro and one from city of Recife, Pernambuco State. They are: Morro do Céu (MC), Nova Iguaçu(NG), Gramacho (GR), Gericinó (GE) and Muribeca (MU). An extensive analysis of bacterial community present in these effluents was performed by pyrosequencing technique, which demonstrated that the phyla Proteobacteria and Firmicutes were most abundant in the majority samples, except for GR samples where Tenericutes phylum was most abundant than Proteobacteria. Some groups were only observed in a number of samples, being inherent to the leachate analyzed as Defirribacteres and Lentisphaerae for leachates MU and NG respectively. The identification of phylum not yet described for this type of waste, as well as a wide fraction of the sequences without classification, suggests that the bacterial communities present in these leachates are complex and remain unexplored. We believe that our work provided a broad overview of bacterial communities in situ and the information contained herein could provide a starting point for more detailed studies, which help to understand the processes that lead to the formation of the effluent from landfills in operation.

**Key - words:** Microbial ecology, Landfill, Solid waste, leachate, Pirosequencing, Microbial Diversity.

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	14
<b>1.1. PRODUÇÃO &amp; MANEJO DE RESÍDUOS SÓLIDOS</b>	16
<b>1.2. LIXIVIADO: CARACTERÍSTICAS &amp; TRATAMENTO.</b>	24
<b>1.3. ECOLOGIA MICROBIANA MOLECULAR</b>	31
<b>1.3.1. ELETROFORESE EM GEL COM GRADIENTE                 DESNATURANTE – DGGE</b>	34
<b>1.3.2. PIROSEQUENCIAMENTO.</b>	35
<b>2. JUSTIFICATIVA &amp; OBJETIVO GERAL</b>	41
<b>3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	42
<b>4. MATERIAS &amp; MÉTODOS</b>	44
<b>4.1. DESCRIÇÃO DOS LOCAIS AMOSTRADOS</b>	44
<b>4.2. COLETA DOS LIXIVIADOS</b>	46
<b>4.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS LIXIVIADOS</b>	47
<b>4.4. EXTRAÇÃO DE DNA</b>	48
<b>4.5. PCR E DGGE</b>	48
<b>4.6. PIROSEQUENCIAMENTO</b>	49
<b>4.7. ANÁLISE DOS DADOS</b>	51
<b>4.8. LISTA DE SOLUÇÕES E TAMPÕES</b>	53
<b>5. RESULTADOS</b>	57
<b>5.1. ANÁLISE DO PERFIL DE DGGE</b>	57
<b>5.2. DIVERSIDADE BACTERIANA MOLECULAR</b>	59
<b>5.2.1. ABUNDÂNCIA E RIQUEZA DAS OTUs OBTIDAS</b>	59
<b>5.2.2. ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS GRUPOS BACTERIANOS                 PRESENTES NAS AMOSTRAS.</b>	63
<b>5.3. ESTRUTURA DA COMUNIDADE BACTERIANA PRESENTE NAS                 AMOSTRAS.</b>	67
<b>6. DISCUSSÃO</b>	74
<b>7. CONCLUSÃO</b>	86
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	89

## LISTA DE ABREVIATURAS

16S rDNA – fragmento resultante da amplificação por PCR do gene que codifica a subunidade menor do ribossomo bacteriano.

16S rRNA – gene que codifica o RNA integrante da subunidade menor (16S) do ribossomo bacteriano.

ACE- Abundance-based coverage estimator

APS - ammonium persulfate (Persulfato de amônia)

BSA – Bovine Serum Albumin(Albumina bovina)

CETE-UFRJ – Centro Experimental de Tratamento de Esgotos da Universidade federal do Rio de Janeiro.

COMLURB – Companhia Municipal de Limpeza Urbana

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

ddNTPs - Dideoxirribonucleotídeos trifosfatados

DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Eletroforese em gel com gradiente desnaturante).

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

dNTP – Deoxirribonucleotídeos trifosfatados

DQO – Demanda Química de Oxigênio

FISH - Fluorescence *in situ* Hybridization (Hibridização Fluorescente *in situ*)

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Kb – quilo base (1000pb)

NH<sub>4</sub> – Nitrogênio Amoniacal

NTK – Nitrogênio total de Kjeldahl

ONU – Organização das Nações Unidas

OTU – Operational Taxonomic Unit (Unidade Taxonômica Operacional)

pb – Pares de base

PCA – Principal component analysis (Análise da Componente Principal)

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da Polimerase).

pH – Potencial de Hidrogênio

RNA – Ácido Ribonucléico

RSU – Resíduo Sólido Urbano

SDT – Sólidos Dissolvidos Totais

SST – Sólidos Suspensos Totais

SSV – Sólidos Suspensos Voláteis

TEMED - N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

T-RFLP - Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de Fragmentos Terminais de Restrição)

UNEP - United Nations Environment Programme (Programa de Meio Ambiente das Nações Unidas)

UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

# Introdução

---



## 1. INTRODUÇÃO

Um aspecto marcante da atual sociedade é a crescente pressão sobre os ecossistemas como florestas, oceanos e solos, responsável por desencadear grandes mudanças nos sistemas de suporte à vida da Terra. Segundo o último relatório da UNEP em 2010 (<http://www.unep.org/geo/yearbook>), a temperatura da superfície da Terra aumentou aproximadamente 0.74 ° C desde 1906 e há um forte consenso entre os cientistas de que as atividades humanas, principalmente aquelas relacionadas à queima de combustíveis fósseis, exercidas desde 1750, contribuíram para esse aquecimento. Além disso, desde a década de 70, observa-se uma acentuada redução da biodiversidade, sendo de aproximadamente 30% nas populações animais, 20% nas áreas de manguezais e até 40% nos corais. Esse panorama nos desafia a preservar os recursos naturais e, ao mesmo tempo, possibilitar um desenvolvimento social justo, permitindo que a sociedade humana atinja uma melhor qualidade de vida em todos os aspectos. Em face disto, cresce a necessidade de consolidar novos modelos de desenvolvimento sustentável e a elaboração de alternativas de utilização dos recursos, orientada por uma racionalidade ambiental.

Carl Sagan escreveu em seu livro *Bilhões & Bilhões*, (...) “Se não fomos agraciados com um conhecimento instintivo que nos mostre o que fazer para que nosso mundo regido pela tecnologia seja um ecossistema seguro e equilibrado, devemos descobrir como fazê-lo. Precisamos de mais pesquisa científica e mais controle tecnológico. É provavelmente muito cômodo esperar que um grande zelador do ecossistema venha à Terra e corrija os nossos abusos ambientais. Cabe a nós a tarefa. Não deve ser tão difícil assim. Os pássaros – cuja inteligência tendemos a denegrir – sabem o que fazer para não sujar o ninho. Os camarões, com o cérebro do tamanho de partículas de fiapos, sabem o que fazer. As algas sabem. Os microrganismos unicelulares sabem. Já é hora de sabermos também” (...) (105).

De fato os microrganismos “sabem” o que fazer. Durante a primeira metade da história evolutiva da terra, que tem aproximadamente 4,5 milhões de anos, diversos processos metabólicos executados exclusivamente pelos microrganismos alteraram a superfície do planeta permitindo que a vida se estabelecesse. Hidrogênio (H), Carbono (C), Nitrogênio (N), Oxigênio (O), Enxofre (S) e Fósforo (P) constituem os principais elementos

formadores das macromoléculas biológicas. O fluxo biológico de C, S e P é catalisado por microrganismos em reações REDOX; sendo o provimento destes dependente de eventos geológicos, principalmente vulcanismo e intemperismo (120). Por conseguinte, nosso ambiente hoje reflete os resultados de toda a experimentação microbiana ocorrida naquela época. Esses pequenos seres unicelulares catalisam transformações únicas e indispensáveis nos processos biogeoquímicos da terra, além de representarem uma grande porção de toda a diversidade genética existente (130).

Toda essa experimentação gerou uma grande diversidade metabólica que se reflete no fato de que muitos dos milhares de compostos químicos presentes na Terra podem ser utilizados na obtenção de energia por algum microrganismo, sejam esses compostos naturais ou sintéticos (16, 55, 75).

Por centenas de anos, essa diversidade metabólica vem sendo manipulada a fim de fornecer simples produtos como pão, vinho e cerveja; mas também produtos mais complexos como ácido cítrico, vitaminas e biofarmácios (22). Como definido na “Convenção sobre Diversidade Biológica da ONU”, o uso de conhecimentos sobre os processos biológicos e sobre as propriedades dos seres vivos, com o fim de resolver problemas e criar produtos de utilidade é definido como Biotecnologia (<http://www.cbd.int/convention/convention.shtml>).

A chamada biotecnologia ambiental é um campo em expansão, que faz uso de uma variedade de enzimas e microrganismos para a produção de manufaturados, bem como na aplicação destes nos processos de biorremediação de ambientes ameaçados e no tratamento de resíduos (11, 62, 124).

A aplicação de processos biotecnológicos com o intuito de proteger o ambiente provou ser bastante eficaz, mesmo antes de o termo Biotecnologia ter sido criado, com o tratamento biológico aplicado nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs). Este é um dos mais importantes exemplos de aplicação biotecnológica que previne a poluição dos ecossistemas naturais, bem como a propagação de doenças. Nas ETEs os microrganismos removem uma série de poluentes das águas residuais adequando estas para que possam ser lançadas nos corpos d'água (99).



## 1.1 PRODUÇÃO & MANEJO DE RESÍDUOS SÓLIDOS

Segundo Luís Fernando Veríssimo: “Através do lixo, o particular se torna público. O que sobra da nossa vida privada se integra com a sobra dos outros. O lixo é comunitário. É a nossa parte mais social (123).”

O acúmulo de lixo é um dos graves problemas sociais e ambientais do mundo atual. A produção de resíduos é inerente à condição humana e como um processo inexorável, tornou-se um problema de difícil solução. A geração dos resíduos sólidos é resultado, entre outros fatores, dos padrões de consumo, das atividades econômicas realizadas e do estilo de vida adotado em cada comunidade (39, 82). Segundo a definição da Associação Brasileira de Normas técnicas (ABNT) norma NBR 10.004/2004, resíduos sólidos são:

(...) “resíduos no estado sólido e semi – sólido, que resultam da atividade da comunidade de origem: industrial, doméstica, comercial, agrícola, de serviços e varrição. Ficam incluídos nesta definição os lodos provenientes dos sistemas de tratamento de água, aqueles gerados com equipamentos e instalações de controle de poluição, bem como determinados líquidos cujas particularidades tornem inviável o lançamento na rede pública de esgotos ou corpos de água, ou exijam para isso soluções técnicas e economicamente inviáveis face à melhor tecnologia prática disponível” (2).

Os resíduos podem ser classificados de várias formas: pela natureza física, se é seco ou molhado; segundo sua composição química, se é composto de matéria orgânica ou inorgânica; de acordo com sua biodegradabilidade, se é facilmente, moderadamente, dificilmente ou não-degradável ou ainda segundo sua origem (39).

Os resíduos sólidos urbanos (RSU) são constituídos basicamente por matéria orgânica; papel/papelão, podas de árvores e gramados, vidros, plásticos, materiais metálicos ferrosos/não ferrosos, ossos e alguns materiais inertes. A composição física dos resíduos sólidos, os tipos de materiais que os constituem, sua heterogeneidade e as proporções de diferentes compostos e elementos químicos, depende basicamente das condições de geração e do modo de coleta. As características dos resíduos podem variar também em função de aspectos sociais, econômicos, culturais, geográficos e climáticos. Na tabela 1 estão resumidos os dados obtidos pela Companhia Municipal de Limpeza Urbana

(COMLURB) sobre a composição gravimétrica dos resíduos coletados em 2008 no Município do Rio de Janeiro ([www.rio.rj.gov.br/web/comlurb](http://www.rio.rj.gov.br/web/comlurb)).

Com uma população de aproximadamente sete milhões de habitantes e uma geração diária de 9000 toneladas de resíduo domiciliar por dia, o município do Rio de Janeiro conta com uma produção média diária de 1.3 quilos de resíduo sólido por pessoa ([www.rio.rj.gov.br/web/comlurb](http://www.rio.rj.gov.br/web/comlurb)).

Tabela 1. Composição gravimétrica dos RSU coletados no município do Rio de Janeiro no ano de 2008 (Fonte: COMLURB).

<b>Composição Gravimétrica dos RSU/RJ</b>	
<b>Componente</b>	<b>%</b>
<b>Papel</b>	16.08
<b>Plástico</b>	20.31
<b>Vidro</b>	2.84
<b>Orgânico</b>	53.63
<b>Metal</b>	1.74
<b>Inerte (pedra, cerâmica, etc)</b>	1.09
<b>Outros (madeira, borracha, couro, ossos, etc)</b>	4.31

No âmbito nacional, a tabela 2 sumariza os dados descritos na Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB) sobre a produção de resíduos sólidos; uma referência nacional e fonte principal de dados sobre a gestão de resíduos sólidos e limpeza urbana no Brasil (54).

Tabela 2. Quantidade de resíduos sólidos urbanos coletados no Brasil no ano de 2000 (FONTE: IBGE).

<b>Região</b>	<b>População Total</b>	<b>Resíduos Sólidos (ton/dia)</b>		
		<b>Domiciliar e comercial</b>	<b>Vias Públicas</b>	<b>Urbano</b>
<b>Norte</b>	12.846.017,00	8.310,86	2.570,96	10.881,82
<b>Nordeste</b>	47.537.445,00	29.581,34	9.039,74	38.621,09
<b>Sudeste</b>	72.412.411,00	53.721,96	15.486,09	69.208,05
<b>Sul</b>	25.051.707,00	15.359,85	4.477,09	19.836,93
<b>Centro - Oeste</b>	11.636.728,00	8.051,09	2.495,32	10.546,41
<b>Total</b>	169.484.308,00	115.025,10	34.069,20	149.094,30

Independente de sua origem, os RSU devem passar por uma série de operações, que incluem coleta, transporte, tratamento e disposição final, a fim de que tenham manejo e destinos corretos. No gerenciamento de resíduos sólidos, a hierarquia apresentada na figura 1 tem sido considerada como elemento chave na política de disposição e tratamento dos resíduos urbanos, principalmente nos países desenvolvidos (39). A hierarquia é baseada nos princípios ambientais e indica que, dependendo da natureza do resíduo, este deve ser gerido por diferentes métodos. O tratamento mais eficaz é o prestado pela própria população quando está empenhada em reduzir a quantidade de lixo, evitando o desperdício, reaproveitando os materiais, separando os recicláveis em casa ou na própria fonte e se desfazendo do lixo que produz de maneira correta (39).

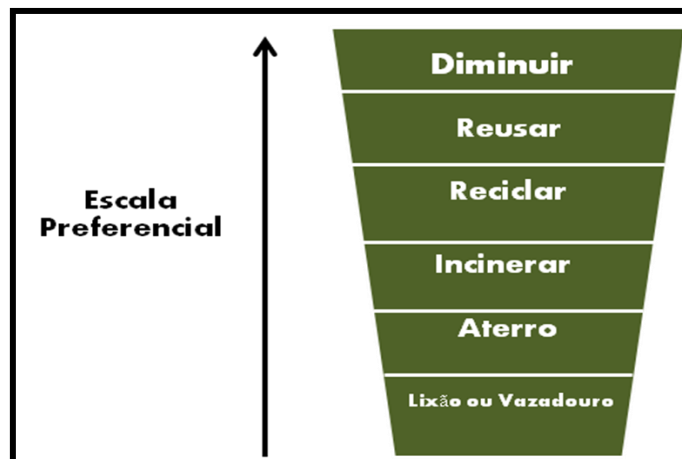


Figura 1. Hierarquia dos resíduos sólidos urbanos. Adaptado de Grover (2000) (39).

Entretanto, em países em desenvolvimento como o Brasil, a realidade não adere a essa seqüência. Uma grande quantidade de resíduo ainda é disposta em vazadouros e/ou geridas de maneira incorreta, como indicou a última PNSB realizada em 2000 onde cerca de 30% do lixo coletado diariamente no Brasil era disposto em lixões (54).

Existem várias formas de disposição e tratamento de resíduos urbanos que são comumente escolhidas em função do custo, da área disponível e da necessidade do município. Define-se tratamento como uma série de procedimentos destinados a reduzir a quantidade ou o potencial poluidor dos resíduos sólidos, seja impedindo descarte de lixo em ambiente ou local inadequado, seja transformando-o em material inerte ou biologicamente

estável (74). As mais comuns e utilizadas no Brasil são: Lixões ou Vazadouros, Compostagem, Incineração, Usinas de triagem e Aterros (89).

A Compostagem é definida como um processo biológico de decomposição da matéria orgânica encontrada em restos animais e vegetais. A compostagem propicia um destino útil para os resíduos orgânicos, evitando sua acumulação em aterros e melhorando a estrutura dos solos. Esse processo permite dar um destino aos resíduos orgânicos domésticos, como restos de comidas e resíduos do jardim. O composto é usado em solo como corretivo orgânico, principalmente em solos argilosos e arenosos, pobres em matéria orgânica. O processo também promove a inativação da maioria dos agentes patogênicos presentes, pois durante o procedimento eles ficam expostos a temperaturas ao redor de 65 a 70<sup>o</sup>C. Não se aconselha o uso do composto em culturas que serão ingeridas cruas por causa da existência de ovos e cistos que resistem a essas temperaturas (39, 74).

As usinas de triagem são centros de separação das frações orgânicas e inorgânicas dos resíduos sólidos urbanos, operacionalizados em maior ou menor escala por equipamentos eletromecânicos. É uma alternativa à coleta seletiva, podendo existir independente de haver ou não sistema de coleta seletiva (89).

Esses dois métodos geram emprego e renda, e podem reduzir a quantidade de resíduos que deverão ser dispostos em aterros sanitários. A transformação do material orgânico do lixo em um composto adequado para nutrir o solo destinado à agricultura juntamente com a economia de energia que seria gasta na transformação da matéria-prima, já contida no reciclado, representam vantagens ambientais e econômicas importantes proporcionadas pelas usinas de reciclagem e compostagem (74).

A incineração emprega decomposição térmica, via oxidação à alta temperatura para destruir a fração orgânica dos resíduos e reduzir o volume. São unidades complexas, com alto grau de automatização e número elevado de dispositivos de controle de processo, que exigem especialização da mão-de-obra. Os incineradores requerem investimento alto e custos de operação mais elevados em relação a outros processos, devido a necessidade de filtros e implementos tecnológicos sofisticados que diminuem ou eliminam a poluição do ar provocada pela queima. No entanto, os resíduos resultantes dessa forma de tratamento,

que devem ser encaminhados para aterros sanitários, têm volumes bastante reduzidos, além de haver a possibilidade de aproveitamento da energia, liberada na queima, para geração de vapor e eletricidade (39, 74).

Os Lixões ou vazadouros a céu aberto caracterizam-se pela simples descarga dos resíduos em um determinado terreno; acarretam vários problemas de saúde à população vizinha do local devido à proliferação de vetores de transmissão de doenças. Estes locais exalam maus odores e contaminam solos, águas superficiais e subterrâneas, através dos líquidos percolados (lixiviado ou chorume<sup>1</sup>) gerados no local. Associam-se também aos lixões, o total descontrole quanto ao tipo de resíduos recebidos nestes locais, onde é possível encontrar resíduos de origem industrial e de serviços de saúde (39, 89). Além dos problemas sanitários os lixões constituem um em sério problema social, porque acabam atraindo indivíduos que fazem da catação do lixo um meio de sobrevivência, em sua maioria moradores da área do aterro, em abrigos e casebres, criando famílias e até mesmo formando comunidades (ver documentário “Estamira, dirigido por Marcos Prado e lançado em 2005).

Na PNSB realizada pelo IBGE, o Brasil revela uma tendência de melhora da situação de destinação final do lixo coletado no país nos últimos anos. Em 2000, 47,1% do lixo produzido diariamente no Brasil era destinado a aterros sanitários, 22,3 % a aterros controlados e apenas 30,5 % a lixões. Ou seja, mais de 69 % de todo o lixo coletado no Brasil estaria tendo um destino final adequado, em aterros sanitários e/ou controlados (Figura 2A). Contudo, em número de municípios, o resultado não é tão favorável: 63,6 % dos municípios utilizavam lixões para depósito de seus resíduos e 32,2 % aterros adequados (13,8 % em aterros sanitários e 18,4 % em aterros controlados), sendo que 5% dos municípios investigados não informaram para onde vão seus resíduos (Figura 2B) (54). Em 1989, a PNSB mostrava que o percentual de municípios que vazavam seus resíduos de forma adequada era de apenas 10,7 %, após onze anos esse percentual subiu para 32,2% ressaltando essa tendência de melhora no destino final do lixo coletado no Brasil.

<sup>1</sup>*Chorume ou lixiviado é o líquido oriundo da decomposição dos resíduos e provém de três fontes: 1) da umidade natural dos resíduos, que se agrava nos dias de chuva intensa; 2) da água de constituição de vários materiais que sobra durante a decomposição; 3) de líquidos provenientes da dissolução da matéria orgânica pelas enzimas expelidas pelas bactérias. Este líquido possui cor*

escura, caráter extremamente ácido, odor desagradável e alta carga poluente (20). Mais informações sobre composição e tecnologias de tratamento serão fornecidas na próxima seção.

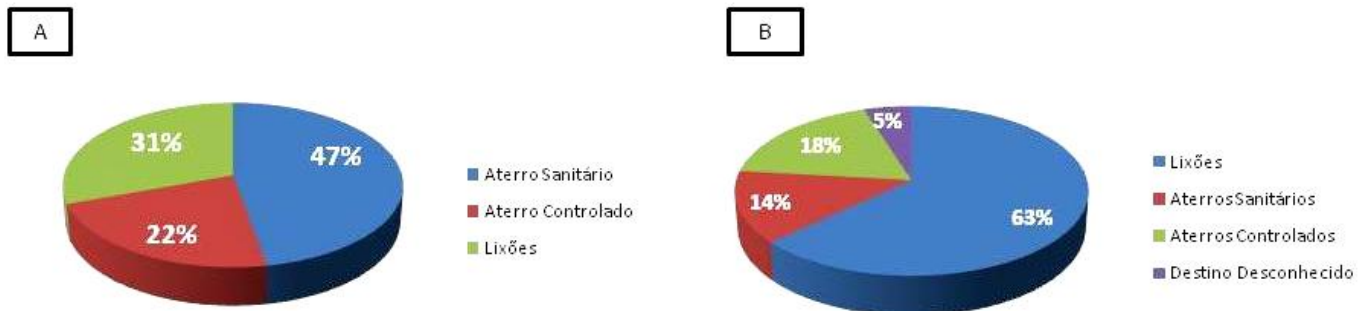


Figura 2. Destino final dos resíduos sólidos urbanos do Brasil. A) Panorama nacional B) Situação nos municípios. Fonte: IBGE (54).

É consenso que a melhor forma de se dar destino final adequado aos resíduos sólidos é através de aterros, sanitários e/ou controlados, com lixo triturado ou com lixo compactado. Todos os demais processos descritos (usinas de triagem, de compostagem e de incineração) são, na realidade, processos de tratamento ou beneficiamento do lixo, e não excluem a utilização de um aterro para a disposição de seus resíduos finais (39).

Os aterros são obras de engenharia destinadas para a disposição final dos resíduos sólidos urbanos, sobre terreno natural, através do seu confinamento em camadas cobertas com material inerte, geralmente solo, segundo normas operacionais específicas, de modo a evitar danos ao meio ambiente, em particular à saúde e à segurança pública (89). Desta forma, de acordo com a norma da ABNT NBR 8419/1984 define-se aterro sanitário como sendo:

“(…) uma técnica de disposição de resíduos sólidos urbanos no solo sem causar danos à saúde pública e à sua segurança, minimizando os impactos ambientais, método este que utiliza princípios de engenharia para confinar os resíduos sólidos à menor área possível e reduzi-los ao menor volume permissível, cobrindo-os com uma camada de terra na conclusão de cada jornada de trabalho, ou a intervalos menores, se for necessário (1)”.

Os aterros chamados de controlados, geralmente são antigos lixões que passaram por um processo de controle da área do aterro, ou seja, isolamento do entorno para minimizar os efeitos do lixiviado gerado, canalização deste efluente para o tratamento adequado, remoção dos gases produzidos em diferentes profundidades do aterro, recobrimento das células expostas na superfície, compactação adequada, e gerenciamento do recebimento de novos resíduos. O gerenciamento de todas essas características permite que o aterro passe a ser controlado (74).

Os aterros influenciam o desenvolvimento urbano, pois apontam o “front” da urbanização. Isto é, estes devem estar na periferia da cidade para causar o mínimo incomodo, mas ao mesmo tempo devem estar próximos o suficiente para evitar gastos elevados com o transporte do material. Por conta desse transporte, estradas de acesso e serviço são criadas levando a urbanização do seu entorno, uma área desvalorizada que atrai a população de baixa renda. Essa população acaba por crescer e ultrapassar o perímetro do aterro, já que este possui uma vida útil de 10 – 20 anos (82).

A escolha de um local para a implantação de um aterro sanitário não é tarefa simples. Do ponto de vista técnico a área deverá favorecer e facilitar as atividades desenvolvidas, como transporte, manuseio e cobertura dos resíduos. O terreno deve possuir características hidrogeológicas favoráveis, como baixa permeabilidade, estabilidade mecânica e lençol freático profundo(72, 74).

Outro fator interessante é que os aterros modificam o relevo, a paisagem e o uso das áreas onde se instalam. Quando a capacidade do aterro se esgota, a área deve ser recuperada do ponto de vista paisagístico e de utilização da sociedade (por exemplo, tornando-a uma área de lazer, como uma praça), respeitando-se as limitações técnicas do terreno (82).

Um aterro sanitário conta necessariamente com as seguintes características, descritas nas normas da ABNT (1):

- Impermeabilização de fundo que pode ser realizada com argila compactada e/ou mantas poliméricas;

- Drenagem e tratamento dos líquidos percolados. Faz-se necessário a implementação de uma estação de tratamento de efluentes no aterro ou o transporte desse material por carro pipa para uma estação próxima, caso não haja no local;
- Drenagem dos gases que se formam durante a decomposição dos resíduos orgânicos. O biogás gerado nos aterros sanitários é composto basicamente de metano ( $\text{CH}_4$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), nitrogênio ( $\text{N}_2$ ), Oxigênio ( $\text{O}_2$ ) e gás sulfídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ). Por conter em sua composição  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$ , gases que contribuem para o efeito estufa, após drenado o biogás deverá ser queimado para mitigação dos efeitos causados pelo seu lançamento na atmosfera. A queima transforma o metano em dióxido de carbono e vapor d'água. Estudos indicam que o 1g de metano contribui 21 vezes mais para o efeito estufa do que 1g de dióxido de carbono. Além da sua simples queima, o biogás pode ser utilizado também em sistemas de calefação ou como combustível veicular (46);
- Drenagem das águas superficiais no intuito de afastar águas pluviais e eventuais cursos d'água que contribuiriam para a formação de percolados além do transporte de poluentes para o exterior do aterro;
- Cobertura para evitar o arraste de poluentes pelo vento, além da proliferação de vetores. Opcional para aterros que recebem resíduos finos ou aqueles que recebem resíduos industriais com odores.

Além dessas características, um aterro possui unidades operacionais e unidades de apoio. As características descritas acima fazem parte das unidades operacionais além das células de lixo (domiciliar e hospitalar), pátio de estocagem e do sistema de monitoramento ambiental (topográfico e geotécnico) (39). São ditas unidades de apoio a cerca e barreira vegetal, as estradas de acesso, a balança, guarita e prédio administrativo. Algumas dessas características estão ilustradas na figura 3.



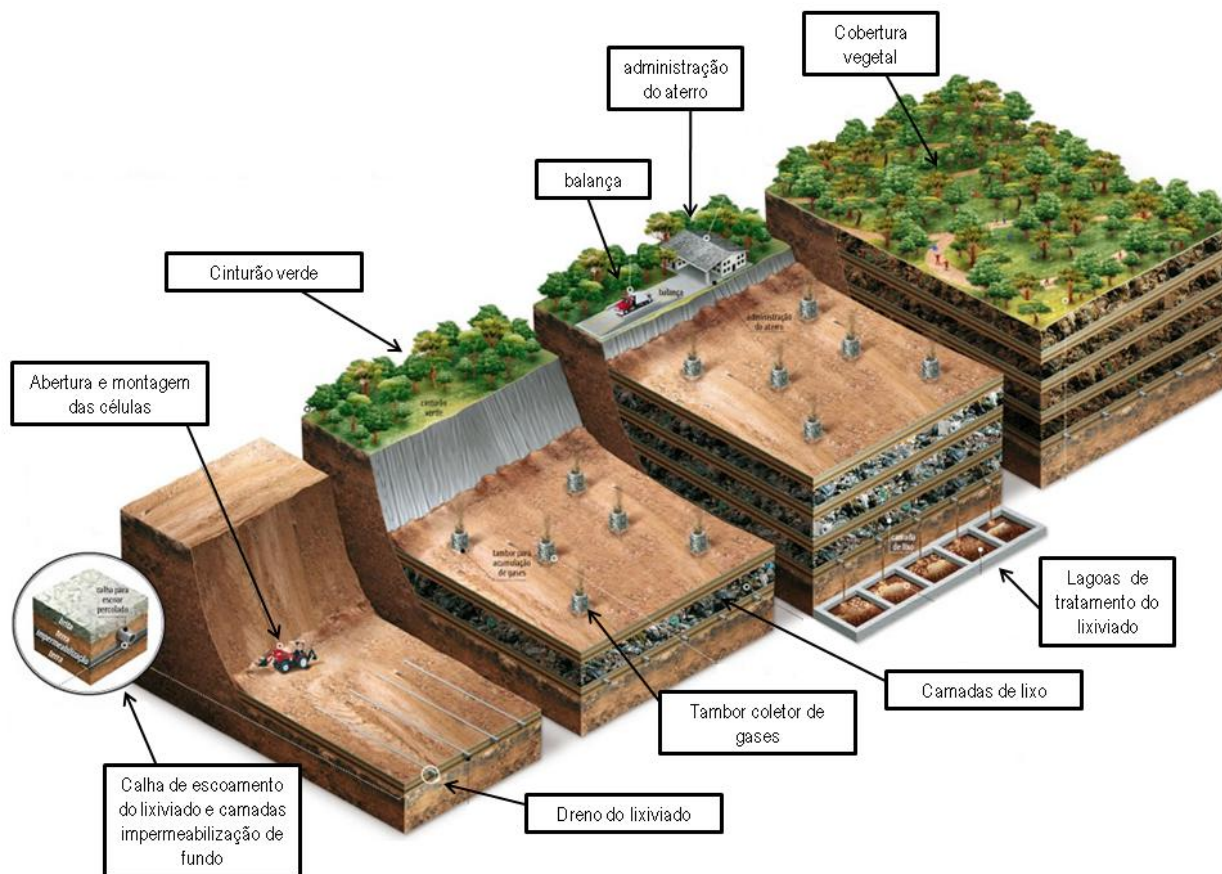


Figura 3. Ilustração de um aterro sanitário para disposição dos RSU com algumas de suas unidades. Adaptado do site: <http://ideiasincomuns.blogspot.com/2009/11/aterros-sanitarios.html>

Todas essas características permitem minimizar os efeitos das duas principais fontes de poluição provenientes da disposição de resíduos sólidos, o biogás e o lixiviado produzido nos aterros. O gás do aterro como descrito anteriormente é direcionado para queima ou eventual aproveitamento energético. A impermeabilização de fundo evitou o problema da contaminação de corpos d'água por parte do lixiviado, mas uma vez recolhido pelo sistema de drenagem, este efluente não pode ser lançado diretamente num corpo receptor devido suas características toxicológicas tornando-se, portanto um problema mais complexo.

### 1.2. LIXIVIADO: CARACTERÍSTICAS & TRATAMENTO.

O uso dos aterros como alternativa econômica e ambientalmente viável para disposição dos resíduos voltou à atenção dos engenheiros e pesquisadores para formas de

tratamento do lixiviado produzido. Várias são as dificuldades encontradas uma vez que os lixividos apresentam características variáveis e sua produção é intensa nos aterros (32).

O significado original da palavra lixiviado vem da agropecuária. Trata-se do líquido resultante da lavagem de estábulos. É reconhecido pelos agropecuaristas como fonte alternativa de adubo nitrogenado (110). O lixiviado compõe a fase líquida do aterro sanitário. Este percolado é formado pela umidade inicial contida nos resíduos e por fontes externas de água, tais como precipitação, águas subterrâneas, recirculação do próprio percolado, adição de lodos provenientes de estações de tratamento de águas residuárias e etc (20).

Esse efluente possui grandes quantidades de matéria orgânica (biodegradável e recalcitrante), onde ácidos húmicos constituem um importante grupo, assim como metais pesados (arsênico, cádmio, cromo, cobalto, cobre, mercúrio, níquel e zinco) e sais inorgânicos que contribuem com vários íons (cálcio, magnésio, sódio, potássio, amônio, ferro, manganês, sulfatos e bicarbonatos), além dos compostos clorados (126). É caracterizado por pH ácido, alta Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e alto valor de Demanda Química de Oxigênio (DQO)(96). O nitrogênio amoniacal, resultante da decomposição da matéria orgânica, demonstrou ser o maior contaminante presente nos lixividos e quando liberado em corpos d'água, contribui para o processo de eutrofização, aumento do pH e salinização (117). Análises toxicológicas realizadas com diferentes organismos indicadores (*Vibrio fisheri*, *Daphnia similes*, *Hordeum vulgare*, *Artemia salin* e *Brachydanio rerio*) já confirmaram o potencial tóxico desse material, apontando para a necessidade do mesmo ser tratado antes de ser liberado em corpos d'água (71, 106, 117).

A natureza e compactação dos resíduos, temperatura, pH, nível de oxigenação, atividade microbiológica, regime de chuvas local, percolação de águas pluviais, equilíbrio químico e solubilidade, variações Hidrogeológicas, idade do aterro e topografia do terreno são variáveis que afetam a composição e a quantidade do lixiviado produzido (59).

Após o resíduo ser enterrado, uma série eventos químicos e biológicos dá início ao processo de transferência de massa do resíduo para a água percolante, de onde o lixiviado se origina. De acordo com Farquhar (1973) a estabilização do resíduo ocorre em fases seqüenciais e distintas (25). A quantidade e a composição do lixiviado gerado variam ao

longo das fases e refletem que processo microbiológico esta acontecendo no aterro (25). De uma maneira simplória os processos de biodegradação podem ser divididos em duas fases: Aeróbia e anaeróbia (59).

Assim que o resíduo é enterrado, um período de aclimação (muitas vezes chamado de fase Lag) é observado, e corresponde à fase em que ocorre um acúmulo suficiente de umidade e oxigênio que suportam a atividade microbiana. Durante esse primeiro estágio de decomposição, o oxigênio presente nos espaços entre os resíduos recém enterrados é rapidamente consumido por microrganismos aeróbios, resultando na produção de dióxido de carbono, água e no aumento da temperatura. Essa fase é breve, pois o oxigênio não é repostado uma vez que o resíduo está coberto (72). O lixiviado produzido nessa fase é caracterizado pela dissolução dos sais inorgânicos altamente solúveis inicialmente presentes no aterro e pequenas quantidades de matéria orgânica oriunda da degradação aeróbica (20).

A chamada fase de transição é quando o oxigênio se esgota e o resíduo torna-se anóxico. A tendência é o intercâmbio das condições oxidantes estabelecidas para redutoras em conformidade com mudança de receptores de elétrons, do oxigênio para os nitratos e sulfatos. Ao final desta fase, DQO (480 – 18000 mg/L) e ácidos orgânicos voláteis podem ser detectados no lixiviado (39).

A fase anaeróbia é subdividida em quatro estágios: hidrólise; acidogênica; acetogênica e, por último, a metanogênica. Essa divisão do processo de digestão anaeróbia em fases facilita bastante o entendimento dos fenômenos de estabilização biológica dos resíduos sólidos urbanos, seus impactos sobre a composição dos percolados e das emissões gasosas. Na prática, durante a vida de um aterro, essas fases não são tão bem distintas, à medida que sempre há o aterramento de resíduos sólidos novos, causando grande variabilidade na idade do material disposto, não sendo difícil encontrar as três fases ocorrendo simultaneamente em um único aterro (6, 59).

A fase de hidrólise é o início do processo de decomposição anaeróbia. Celulose e Hemicelulose correspondem a 45 – 60% do peso seco do resíduo doméstico sendo, portanto, o maior constituinte biodegradável dos resíduos domésticos (6). Com a

diminuição da quantidade de oxigênio, começam a predominar microrganismos anaeróbios facultativos, ou seja, aqueles que preferencialmente não usam oxigênio na decomposição da matéria orgânica. Essas bactérias convertem o material orgânico particulado, como a celulose e outros, em compostos dissolvidos. A presença de água é importante para o primeiro passo da degradação anaeróbia (hidrólise), promovendo a diluição de agentes inibidores e facilitando a distribuição de microrganismos e nutrientes na massa de RSU (20).

A hidrólise contínua, resultante da atividade microbiana, leva a produção de ácidos orgânicos voláteis, amônia, hidrogênio e dióxido de carbono. A decomposição ocorre através da hidrólise dos polímeros e fermentação dos monossacarídeos resultantes a ácidos carboxílicos e alcoóis, caracterizando assim o início da fase acidogênica. Essa segunda fase se caracteriza, portanto, por ser um processo bioquímico pelo quais as bactérias obtêm energia pela transformação da matéria orgânica hidrolisada, sem ocorrer nenhuma estabilização da matéria orgânica. Durante essa fase, que pode durar alguns anos, são produzidas quantidades consideráveis de compostos orgânicos simples e de alta solubilidade, principalmente ácidos graxos voláteis (6, 20, 59).

A conversão desses ácidos e alcoóis a acetato, hidrogênio e dióxido de carbono marca o início da fase acetogênica. Essa fase é executada por uma população microbiana anaeróbia, sendo algumas anaeróbias facultativas responsáveis por reduzir o potencial redox do ambiente permitindo assim o crescimento das metanogênicas (67). Frequentemente uma redução do pH é observada acompanhada pela mobilização dos metais, tornando o lixiviado nessa fase quimicamente agressivo. Também é característica dessa fase uma elevação na concentração de DBO (1000 – 57700mg/L) e DQO (1500 – 7100 mg/L)(72).

A transição da fase de formação ácida para a etapa de fermentação metanogênica ocorre aproximadamente após 4 - 6 anos colocados os resíduos e pode continuar por um período de vários anos (72). Os subprodutos da etapa anterior agora são consumidos por um consórcio de arqueas metanogênicas e convertidos a gás metano e dióxido de carbono. As condições redutoras dessa fase irão influenciar na solubilidade dos sais inorgânicos, resultando na precipitação ou dissolução desses compostos. Por exemplo, sulfato e nitrato são reduzidos a sulfetos e amônia, respectivamente. Observa-se um declínio da DBO e DQO,

e uma fração do resíduo permanece inalterada, visto que é composta de polímeros aromáticos, por exemplo, alguns tipos de ligninas (59). O nível do pH eleva-se e é controlado pelo sistema tampão bicarbonato, permitindo o crescimento das metanogênicas; que continuam o trabalho de forma relativamente lenta, mas eficaz durante muitos anos.

Durante a etapa final de estabilização do aterro, nutrientes e substratos tornam-se limitantes levando a comunidade microbiana presente ao estado de dormência. A produção de gás cai drasticamente, no entanto, a degradação das frações orgânicas resistentes continua lentamente gerando substâncias húmicas (6). Cada estágio é dinâmico e depende da criação de um ambiente químico favorável pelo estágio antecedente, que estabelecerá as condições necessárias para que a microbiota presente execute o processo de degradação. Todas essas fases foram descritas e pontuadas através de dados obtidos no campo e no laboratório (129).

Como mencionado anteriormente, a composição química do lixiviado apresenta grande variabilidade. Além de depender da natureza dos resíduos depositados, da forma de disposição, manejo e da idade do aterro, essa composição é extremamente influenciada por fatores climáticos. De maneira geral, o lixiviado pode ser considerado como um efluente de extrema complexidade, composto por: matéria orgânica dissolvida (formada principalmente por metano, ácidos graxos voláteis, compostos húmicos e fúlvicos), compostos orgânicos xenobióticos (representados por hidrocarbonetos aromáticos, compostos de natureza fenólica e compostos organoclorados alifáticos), macro componentes inorgânicos (dentre os quais se destacam Ca, Mg, Na, K,  $\text{NH}_4^+$ , Fe, Mn, Cl,  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{HCO}_3^-$ ) e metais potencialmente tóxicos (Cd, Cr, Cu, Pb, Ni e Zn). A composição química do percolado variará enquanto a massa de resíduos atravessa as diversas fases de decomposição. Toda esta heterogeneidade torna complexa a caracterização do efluente gerado pelos aterros de RSU (20, 67).

A caracterização do lixiviado é baseada, principalmente, nos mesmos parâmetros físico – químicos adotados para análise de águas residuárias. São utilizados os parâmetros globais tais como, DBO, DQO, sólidos dissolvidos totais (SDT), pH e nitrogênio total (NTK); e parâmetros específicos como nitrato, amônia, ácidos carboxílicos e metais (20).

Segundo Fernandez – Viña (2000) a relação DBO/DQO denota a biodegradabilidade do percolado. A idade do aterro também varia a relação DBO/DQO, propiciando uma idéia

sobre o estado de degradação dos percolados. Na tabela 3, estão correlacionadas a razão DBO/DQO e a biodegradabilidade do lixiviado (29).

Tabela 3. Taxa de biodegradabilidade DBO/DQO (29).

<b>Relação DBO/DQO</b>	
<b>0,5 a 0,6</b>	Lixiviado Biodegradável Aterro Jovem
<b>≈ 0,1</b>	Percolado pouco biodegradável Aterro estabilizado

Embora a composição do lixiviado seja variável durante todo o processo de decomposição, três tipos podem ser definidos de acordo com a idade do aterro, como descrito na tabela 4.

Tabela 4. Classificação e composição dos lixiviados segundo a idade do aterro. Adaptada de Chian e DeWalle (1976) (19).

<b>Classificação do Lixiviado pela idade do aterro</b>				
<b>Idade (anos)</b>	0 - 5	5 - 10	10 - 15	>20
<b>pH</b>	3 - 6	6 - 7	7 - 7,5	≥7,5
<b>DQO (mg/L)</b>	15000 - 40000	10000 - 20000	1000 - 5000	<1000
<b>DBO (mg/L)</b>	10000 - 25000	1000 - 4000	50 - 1000	<50
<b>Nitrogênio total (mg/L)</b>	1000 - 3000	400 - 600	75 - 300	<50
<b>Amônia (mg/L)</b>	500 - 1500	300 - 500	50 - 200	<30
<b>Sólidos dissolvidos totais (mg/L)</b>	10000 - 25000	5000 - 10000	2000 - 5000	<1000

A correlação entre idade do aterro e decomposição da matéria orgânica pode ser utilizada como um critério para escolha do tratamento mais adequado, uma vez que este é o fator que afeta significativamente a seqüência e o sucesso do(s) tratamento(s) adotado (19). Lixiviados oriundos de aterros novos (primeiros anos de operação) são ricos em matéria orgânica biodegradável, sendo então suscetíveis ao tratamento biológico, visto que o tratamento físico – químico não irá remover essa matéria orgânica com a mesma eficiência. Nestes casos, o tratamento biológico elimina os compostos com baixo peso molecular encontrados nesses lixiviado, contudo a concentração de vários compostos pode

inibir a atividade microbiana durante o tratamento, requerendo assim um pré-tratamento físico – químico do lixiviado (63).

Os métodos convencionais de tratamento do lixiviado podem ser divididos em 3 grupos; são eles (96):

- a. Transferência do lixiviado que compreende a reciclagem e o co-tratamento com esgoto doméstico;
- b. Biodegradação através de processos aeróbios e anaeróbios;
- c. Métodos físicos e químicos que incluem: oxidação química, adsorção, precipitação química, coagulação e floculação, sedimentação e “air stripping” ou arraste.

O entendimento da composição do lixiviado é uma etapa crítica nas previsões do impacto que esse resíduo irá causar no ambiente, e assim determinante na escolha do tipo de tratamento que o mesmo receberá. Mesmo após as encerradas as operações de um aterro e a cobertura final ter sido colocada a decomposição continua produzindo um volume menor de lixiviado. Segundo a regulamentação Americana encerradas as operações em um aterro, o mesmo deverá ser monitorado por um período de 30 anos. Presume-se que após esse tempo o aterro estará estabilizado (39).

Ao contrário das características químicas que são amplamente documentadas, dados sobre a composição microbiológica do lixiviado são escassos. Os estudos sobre a composição do lixiviado datam do início da década de 70. Essa história recente talvez se deva ao fato de que até 1965 não se conhecia o potencial poluidor de um aterro sanitário construído e operado inadequadamente (13). Em comparação ao tratamento de água e esgoto, problemas cientificamente estudados desde o século 19, o tratamento do lixiviado é de fato uma questão atual, o que se reflete no pouco conhecimento a cerca da diversidade microbiana desse resíduo.

Os resíduos sólidos urbanos contêm uma diversa comunidade bacteriana, que por conta da disposição de fezes e carcaças de animais, fraldas e refugo das estações de tratamento de esgoto, pode apresentar microrganismos patogênicos (6). O conteúdo bacteriano, particularmente o número total de coliformes fecais e estreptococos fecais, varia drasticamente com a idade do aterro, bem como com as propriedades químicas do lixiviado. Em 1980, Ware compilou diversos estudos que abordavam o efeito bactericida

dos lixiviados e observou que a taxa de mortalidade era inversamente proporcional a idade do aterro, contudo durante a fase aeróbia de decomposição ocorre uma diminuição do crescimento devido uma redução do pH e às altas temperaturas atingidas durante o processo (nesta fase a temperatura na célula pode chegar a 60°C) (127).

Em 2005, Huang e colaboradores analisaram a diversidade bacteriana presente no lixiviado efluente do aterro municipal de Gouzikeng na República da China utilizando-se de uma biblioteca de clones do gene 16S rRNA. Os autores observaram que as seqüências recuperadas apresentavam um baixo grau de similaridade quando comparadas as seqüências depositadas nos bancos de dados, indicando que a comunidade microbiana associada aos lixiviados é mais complexa do que se espera e ainda pouco explorada (49).

Para que se possa tratar um efluente de forma satisfatória, é necessário conhecê-lo. A ausência de conhecimento sobre a diversidade e, conseqüentemente, sobre os processos de biodegradação dos resíduos sólidos urbanos, são obstáculos para a otimização dos processos de tratamento biológico de lixiviados.

### **1.3. ECOLOGIA MICROBIANA MOLECULAR**

A fim de gerir os complexos sistemas microbianos, o cientista necessita de conceitos e informações bem documentados sobre a comunidade *in foco*. As comunidades microbianas são complexas e estão em constante alteração (21), abrangendo uma grande diversidade de microrganismos, cada um com o seu próprio conjunto gênico, componentes celulares e reações metabólicas, que interagem entre si e com o ambiente de diferentes maneiras (37). Desta forma, a Ecologia microbiana provém os fundamentos científicos para os processos utilizados pela biotecnologia, e os processos biotecnológicos fornecem interessantes modelos microbianos para os microbiologistas estudarem, e avançar os seus conceitos e métodos, tornando essas duas áreas do conhecimento, Ecologia microbiana e a biotecnologia, intrinsecamente ligadas (99).

De fato, uma das bases da biotecnologia ambiental é a ecologia microbiana, uma ciência que tem como objetivo compreender como as comunidades microbianas interagem entre si e com o ambiente. A ecologia microbiana aborda três questões fundamentais: (i) os



microrganismos presentes na comunidade (a estrutura da comunidade), (ii) a capacidade funcional dos microrganismos, isto é, a presença de genes funcionais na comunidade, (iii) as relações entre os membros da comunidade e o meio ambiente (4).

A primeira questão abordada, os microrganismos presentes em uma dada comunidade, é o ponto crítico na ecologia microbiana se considerarmos que um grama de solo contém bilhões de microrganismos (85). Segundo uma estimativa realizada em 1998 por Whitman e colaboradores, o número total de procariotos na terra é de aproximadamente  $4 - 6 \times 10^{30}$  células, sendo a maioria presente nos oceanos e solo. Uma estimativa precisa desse número permanece desconhecida (64, 112), contudo esses dados apontam para uma enorme diversidade.

Apenas poucos microrganismos são conhecidos, aproximadamente de 0.1 a 10% dos microrganismos são cultiváveis (50, 121) e, é provável que essa estimativa se altere em função do método utilizado, entretanto permanece baixa tendo em vista que os atuais métodos moleculares apontam um número na ordem de milhares de espécies bacterianas em um grama de solo (100). Mas por que conhecemos tão pouco sobre a vida microbiana, sendo os microrganismos tão numerosos e fundamentais para a manutenção da vida no planeta?

A razão talvez resida no fato de que apenas após o século 19 as técnicas de cultivo foram desenvolvidas permitindo que alguns microrganismos pudessem ser estudados individualmente (85). Essa abordagem clássica envolve o cultivo dos microrganismos em meios sólidos ou líquidos, contendo uma fonte de carbono apropriada para o seu crescimento, bem como adequadas fontes aceptoras de elétrons, além de uma série de condições que propiciam o crescimento microbiano. Entretanto, as condições de cultivo impõem uma pressão seletiva evitando assim o crescimento de muitos microrganismos.

Ecologia e diversidade microbiana, e evolução estão sempre interligadas. Carl Woese e colaboradores (1977) exploraram essa questão muito bem quando através da análise comparativa das seqüências de genes ribossomais, mostraram que toda vida celular pertencia a três domínios; Bactéria, Archeia e Eucaria (131). Através dessa análise os autores também conseguiram definir filós e classes. Esse trabalho não apenas forneceu a

base filogenética, até então carente na ecologia microbiana, mas também permitiu o desenvolvimento de ferramentas que possibilitaram o acesso a fração de microrganismos de difícil cultivo (45). Em 1986, Pace e seu grupo mostraram o poder do casamento da biologia molecular com os dados de filogenia obtidos por Woese, apontando para a possibilidade de se analisar populações microbianas em seu habitat natural, sem a necessidade do isolamento (84, 86). Começava então o que conhecemos hoje como Ecologia microbiana molecular.

Os métodos moleculares tornaram-se indispensáveis não apenas para a ecologia microbiana, mas em diversas áreas do conhecimento da microbiologia, pois é sabido que o entendimento das características individuais de cada espécie só é completo quando analisado no contexto da comunidade a qual a espécie pertence (118, 132).

Com exceção dos métodos que utilizam hibridização de DNA (por exemplo, FISH – Fluorescent in situ hybridization), os métodos que independem de cultivo, chamados de métodos moleculares, em geral utilizam como etapa inicial a amplificação por PCR (Polymarese Chain Reaction) de genes marcadores. Após a extração do DNA total de uma dada amostra (o método utilizado deverá ser compatível com o tipo de amostra), o material extraído serve como molde para a PCR. A região a ser amplificada deverá conter seqüências conservadas que irão permitir o anelamento dos iniciadores, e regiões variáveis que serão utilizadas pela filogenia.

Após os trabalhos de Woese (1977) e Pace (1986), a análise comparativa das seqüências dos genes ribossomais tornou-se predominante nos métodos moleculares. Isto por que as moléculas de RNA ribossomal (subunidade menor 16S e 18s; e subunidade maior 23s e 28s; sendo 18s e 28s referentes ao domínio Eucaria) estão presentes em todas as formas celulares de vida, permitindo assim uma análise universal, com inferências a cerca da relação filogenética entre os organismos. Além disso, essas moléculas apresentam regiões altamente conservadas ao longo dos domínios, permeadas por regiões hiper variáveis que aumentam a resolução filogenética; permitindo a separação desde filos (Proteobacteria, Firmicutes e etc), passando pelas divisões, gêneros e algumas vezes chegando-se ao nível de espécie (5, 42).

Os ditos genes funcionais são utilizados no estudo de subpopulações com determinadas capacidades metabólicas. A exemplo de genes funcionais muito utilizados, podemos citar o gene que codifica a subunidade A da amônia monoxigenase (amoA) (47, 93), o gene que codifica subunidade  $\beta$  da RNA polimerase bacteriana (rpoB) (88, 97), o gene que codifica a enzima metano monoxigenase (pmoA) (3, 35), os genes que codificam as enzimas nitrogenase e nitrito redutase, nifH (12) e nirS/nirK (14) respectivamente.

As técnicas moleculares mais utilizadas atualmente na ecologia molecular microbiana são: DGGE (Denaturant Gradient gel Electrophoresis), FISH (Fluorescent *in situ* hybridization), T-RFLP (Terminal Restriction fragment length Polymorphism) e biblioteca de clones. As mesmas técnicas são aplicadas no estudo de sistemas de tratamento de resíduos (108).

Para o desenvolvimento desse trabalho duas técnicas moleculares foram empregadas, o DGGE e o Pirosequenciamento, e por isto serão discutidas em maiores detalhes.

### **1.3.1. ELETROFORESE EM GEL COM GRADIENTE DESNATURANTE – DGGE**

Originalmente a técnica de DGGE foi desenvolvida para detectar mutações específicas no genoma humano (31). Muyzer e colaboradores em 1993 adaptaram a técnica para a análise da comunidade microbiana (76). A exemplo de Muyzer, outros adaptaram a técnica para o estudo da estrutura genética de grupos funcionais (38), distribuição espacial de uma comunidade bacteriana (28) e impacto ambiental sobre a comunidade microbiana do solo (24).

O princípio da técnica é a separação de fragmentos de DNA, oriundos da PCR, em função de sua composição nucleotídica, visto que todos possuem aproximadamente o mesmo tamanho. Isto é, os fragmentos que possuem o mesmo tamanho e seqüências nucleotídicas diferentes podem ser separados pela diferença na mobilidade das moléculas após desnaturação química de seus domínios, assumindo perfis eletroforéticos distintos. O resultado é um perfil eletroforético característico de cada amostra analisada (30).

Após a amplificação do material, espera-se que todos os fragmentos possuam uma região rica em GC, chamada de grampo GC, presente em um dos iniciadores. Os fragmentos obtidos são então separados de acordo com a sua composição nucleotídica, através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo gradiente desnaturante (uréia e formamida), que tem por função romper as pontes de hidrogênio entre os nucleotídeos. A seqüência nucleotídica do fragmento determina o momento em que o DNA irá desnaturar assumindo uma estrutura de fita simples ou parcialmente desnaturada. Nesta condição, a velocidade de migração no gel é extremamente reduzida, ocorrendo então a separação dos fragmentos. A adição do grampo GC, contendo de 30 a 50 nucleotídeos, impede a dissociação completa das fitas de DNA, aumentando para até 100% a detecção das variações existentes (78, 114). Segundo Myers (1985) através do DGGE é possível detectar 50% das variações em seqüências de fragmentos com até 500 pb (78).

A vantagem dessa técnica é que uma vez separados os fragmentos, estes podem ser retirados do gel e seqüenciados. Contudo, como qualquer técnica, o DGGE também possui limitações metodológicas, desde a eficiência de extração do DNA, que pode ser mais eficiente para um dado grupo bacteriano (27), amplificação preferencial de algumas seqüências, co-migração de bandas no gel, além de uma super estimativa no número de bandas quando são analisados genes que naturalmente estão presentes em várias cópias nos organismos (77).

### **1.3.2 PIROSEQUENCIAMENTO.**

Em ecologia microbiana molecular, quando desejamos conhecer a estrutura de uma comunidade em um dado momento, ou fazer uma análise comparativa da estrutura de diferentes comunidades, estejam elas no mesmo ambiente sob pressões seletivas diferentes ou em ambientes distintos, optamos por usar técnicas de "Fingerprinting", como por exemplo, o DGGE. Contudo, se além da estrutura desejamos identificar as espécies ou os táxons presentes na comunidade lançamos mão de técnicas de identificação, como a Biblioteca de clones, sejam eles clones do gene 16S rRNA ou de genes funcionais. Tradicionalmente, nas bibliotecas de clones os genes de interesse são amplificados por PCR a partir do DNA total extraído e os fragmentos obtidos são inseridos em um vetor de

clonagem. Em seguida uma parcela dos clones é caracterizada via seqüenciamento de DNA, fornecendo então uma visão a cerca da diversidade e da riqueza da comunidade amostrada.

Todos aqueles que trabalham coletando comunidades naturais possuem uma grande preocupação com a questão de o quão bem a amostragem realizada reflete a diversidade do local amostrado. Como discutido, as técnicas moleculares revelaram uma extensa diversidade microbiana, previamente não detectada com os métodos tradicionais de cultivo. Em qualquer comunidade, o número de espécies observadas aumenta conforme o tamanho amostral aumenta, e esta relação fornece a informação a cerca da diversidade local (51).

Em face disto, sempre houve uma demanda de aumentar o rendimento da metodologia de seqüenciamento de DNA implementada por Sanger (107), fazendo com que o início dos anos 90 fosse marcado pelo lançamento dos seqüenciadores de DNA automatizados (52). Cada ciclo do seqüenciamento estabelecido por Sanger inclui as mesmas etapas da PCR, isto é, desnaturação, anelamento do iniciador e polimerização. Cada etapa de polimerização é aleatoriamente terminada com a incorporação de dideoxynucleotídeos (ddNTPs) marcados com fluorescência. Os dideoxynucleotídeos são análogos aos dNTPs normais e diferem apenas pelo fato de não possuírem um grupamento hidroxila no carbono 3' impedindo assim que qualquer ddNTP ou dNTP incorporado à cadeia de DNA crescente participe da ligação fosfodiéster com o nucleotídeo previamente incorporado. A terminação da cadeia ocorre de forma aleatória em qualquer base e em qualquer fita de DNA crescente, resultando em uma mistura de fragmentos de diferentes tamanhos marcados pela fluorescência do ddNTPs incorporado. A seqüência é determinada após a separação desses fragmentos em uma eletroforese de alta resolução executada em gel contido em um capilar. Na saída do capilar os fragmentos marcados são excitados por um laser e o espectro emitido, correspondente ao ddNTP incorporado, é detectado (Figura 4).

Após de três décadas, o seqüenciamento de Sanger é capaz de ler até 1000pb, com uma precisão de 99,9% e um custo de US\$ 0,50 por Kb. Apesar desses avanços, dois gargalos precisavam ser superados para tornar o sistema mais eficiente e mais rápido; preparação da biblioteca de clones e o trabalho braçal de seqüenciar os fragmentos clonados (115).

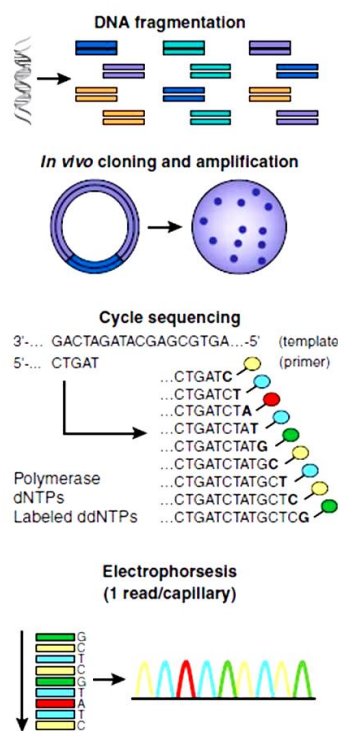


Figura 4. Esquema das etapas de seqüenciamento de DNA segundo método Sanger, adaptada de (115).

Neste cenário, em 2005 chegava ao mercado à plataforma 454 GS20/Roche de Piroseqüenciamento (454 Machine Life Sciences®), dando início a nova era de seqüenciadores de DNA (70). Após o trabalho de Margulies e colaboradores outras tecnologias surgiram no mercado, sendo as mais utilizadas, além do sistema 454 FLX, a plataforma Illumina's Genome Analyzer (Hayward, CA, USA), desenvolvido pela Solexa (UK); e o sistema SOLiD disponível pela Applied Biosystems (USA), baseado no trabalho de Shendure (2005) (116). Como a tecnologia utilizada para o desenvolvimento desse trabalho foi à plataforma 454 FLX, nos deteremos na descrição da mesma.

A diferença dessa nova geração de seqüenciadores para o sistema clássico de Sanger é o conceito de "sequencing by synthesis" apresentado pela primeira vez por Nyren e colaboradores (1993), isto é, a seqüência de DNA da cadeia crescente é detectada no momento em que está sendo sintetizada, dispensando a separação por eletroforese (81). A abordagem adotada na plataforma 454 é o piroseqüenciamento, isto é, o pirofosfato liberado quando um nucleotídeo é incorporado na cadeia crescente pela atividade da polimerase inicia uma cascata enzimática que culmina na emissão de luz pela ação da enzima Luciferase. A quantidade de luz produzida é proporcional ao número de nucleotídeos incorporado (Figura 5).

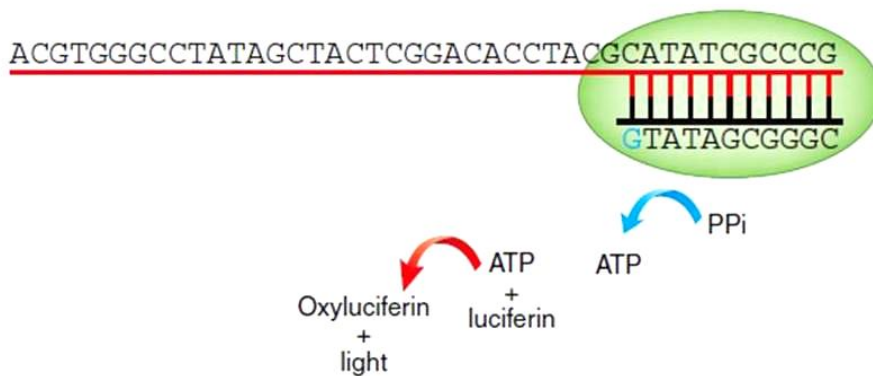


Figura 5. Representação das reações do pirosequenciamento. A fita molde está representada em vermelho, os iniciadores em preto e a DNA polimerase em verde. A incorporação do nucleotídeo complementar, guanina em azul, libera uma molécula de pirofosfato (PPi), que é convertida em ATP pela enzima sulfurilase (seta em azul). A Luciferase utiliza então esse ATP para transformar a Luciferina em Oxiluciferina produzindo luz (104).

A técnica de pirosequenciamento está disponível para a comunidade científica desde 1996 com o trabalho de Ronaghi e colaboradores, mas na época não foi considerado um método robusto o suficiente para se estabelecer como procedimento de seqüenciamento, devido ao curto comprimento dos fragmentos seqüenciados (103).

Na plataforma 454 FLX, a otimização do pirosequenciamento veio com a imobilização da reação em um espaço micrométrico (micro poços), incluindo a preparação da amostra. O simples desenvolvimento dessa fase sólida contribuiu de forma significativa para o aumento do comprimento das seqüências, bem como a acurácia do método (70). Os resultados obtidos pelos autores foi um sistema capaz de seqüenciar 25 milhões de bases em quatro de horas, o que significa um período 100 vezes superior ao tempo gasto no seqüenciamento convencional (101).

A preparação da amostra começa com a fragmentação do DNA ou amplificação do gene de interesse, seguida da ancoragem de seqüências chamadas de adaptadores ao final dos fragmentos de DNA. Esses adaptadores permitem que os fragmentos gerados (por fragmentação ou PCR) sejam ligados a pequenas esferas cujo diâmetro é de 28 µm, fazendo com que as etapas posteriores fiquem restritas a uma única fita simples de DNA por esfera.

As esferas são então compartimentalizadas em gotículas dentro de uma emulsão que contem todos os reagentes necessários para amplificar essa única fita de DNA acoplada na esfera, resultando em aproximadamente 10 milhões de cópias desse único fragmento. Como as esferas estão separadas nas gotículas, o risco de contaminação é praticamente nulo. Para que a reação de pirosequenciamento ocorra, a emulsão é rompida e as moléculas de DNA geradas são desnaturadas. As esferas são então distribuídas em pequenos poços (cada poço tem espaço para apenas uma esfera) acoplados a um conjunto de fibras ópticas capazes de detectar a luz emitida durante a reação, como ilustrado na figura 6. Em seguida cada poço recebe seqüencialmente todos os reagentes necessários para a reação de piroseqüenciamento que ocorrerá nos fragmentos imobilizados nas esferas, incluindo os quatro nucleotídeos possíveis.

Por razões econômicas, é interessante combinar em uma corrida diferentes amostras. A idéia de se utilizar “códigos de barras” nas seqüências produzidas foi introduzida por Binladen e colaboradores (2007) e permitiu reduzir o custo de uma única corrida (9). A idéia é bastante simples e consiste em incluir em nos iniciadores uma seqüência nucleotídica curta que permite a separação das seqüências geradas por amostras ao final do procedimento.

O uso de iniciadores para as regiões hipervariáveis do gene 16S rRNA aliado ao tamanho do fragmento gerado com o pirosequenciamento (150 – 350 pb) permite que as seqüências obtidas sejam comparadas a bancos de dados, como o “Ribossomal database Project – RDP” (<http://rdp.cme.msu.edu/>) obtendo assim uma classificação taxonômica das mesmas. Segundo o RDP, é possível obter uma classificação confiável ao nível de gênero com seqüências de 400 pb de comprimento, e ao nível das famílias com seqüências de até 200 pb (125).

Atualmente em um curto espaço de tempo, é possível o seqüenciamento *de novo* de genomas (bactéria e vírus), uma análise expressiva da diversidade taxonômica e gênica da comunidade microbiana de um dado ambiente com milhares de seqüências (17). A nova geração de seqüenciadores criou um cenário onde a limitação não é mais a habilidade de se produzir os dados, mas a capacidade de se analisar todo o volume de seqüências geradas de uma forma cientificamente elegante.



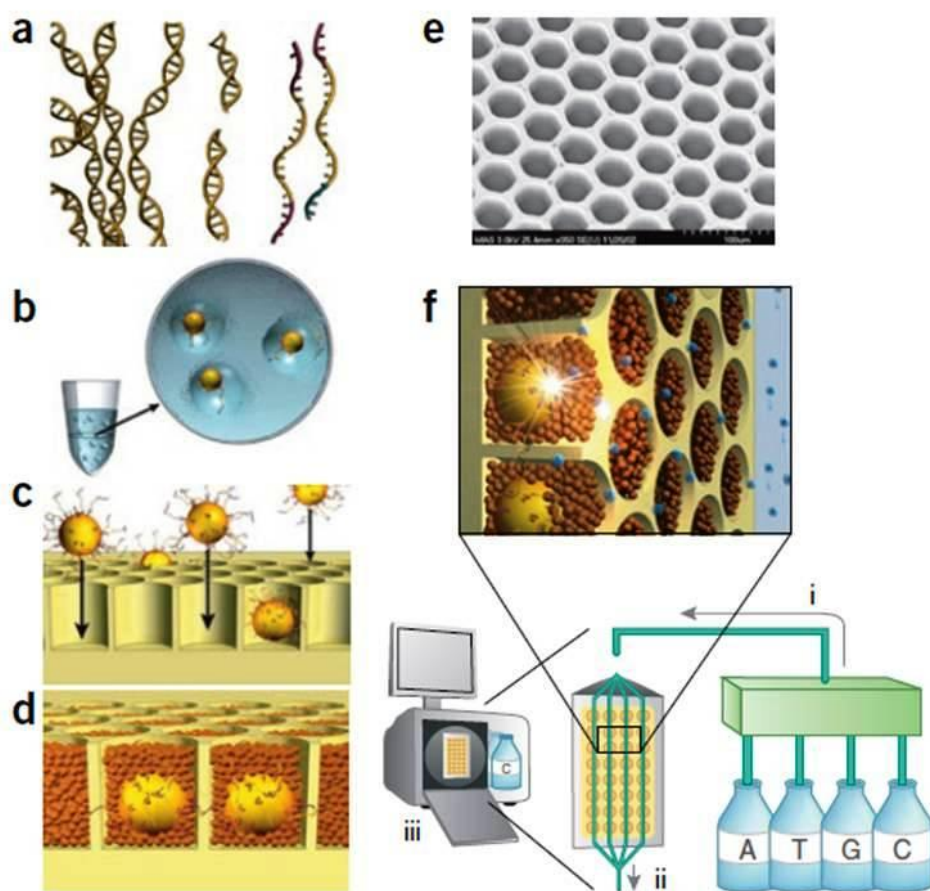


Figura 6. Diagrama das etapas do Pirosequenciamento na plataforma 454 FLX adaptado de Rothberg e Leamon (2008) (104). (a) O DNA fragmentado ou amplificado é ligado aos adaptadores, e desnaturados. (b) Os fragmentos são então ligados as esferas em condições que favoreçam que apenas um fragmento seja ligado por esfera e a amplificação ocorre nos micro compartimentos gerados na emulsão. (c) A emulsão é quebrada, as fitas de DNA desnaturadas, e as esferas são distribuídas nos micro poços. (d) (i) Os reagentes são seqüencialmente depositados em cada poço. (e) (ii) O sinal luminoso emitido ao final da reação é captado pelas fibras ópticas acopladas aos poços. (iii) Computador necessário para converter o sinal capturado pelas fibras ópticas nas seqüências.

## **2. JUSTIFICATIVA & OBJETIVO GERAL**

O estudo da diversidade microbiana de lixiviados via abordagem clássica, é uma tarefa extremamente difícil, devido às limitações apresentadas pelas técnicas microbiológicas clássicas e à própria dinâmica da comunidade microbiana, que por sua vez é influenciada por muitas variáveis bióticas e abióticas. Várias técnicas moleculares têm sido propostas para superar as limitações existentes, aportando elementos para a compreensão da ecologia microbiana dessas comunidades, fornecendo uma base sólida para o controle e a engenharia dos processos de tratamento desse resíduo. Até momento poucos estudos sobre a diversidade molecular dessas comunidades foram realizados para ambientes de clima tropical. Visto que essa diversidade microbiana, assim como aspectos funcionais, varia em função de fatores abióticos, a investigação sobre a ecologia microbiana de sistemas operados em nossas condições climáticas é uma tarefa de extrema necessidade e relevância.

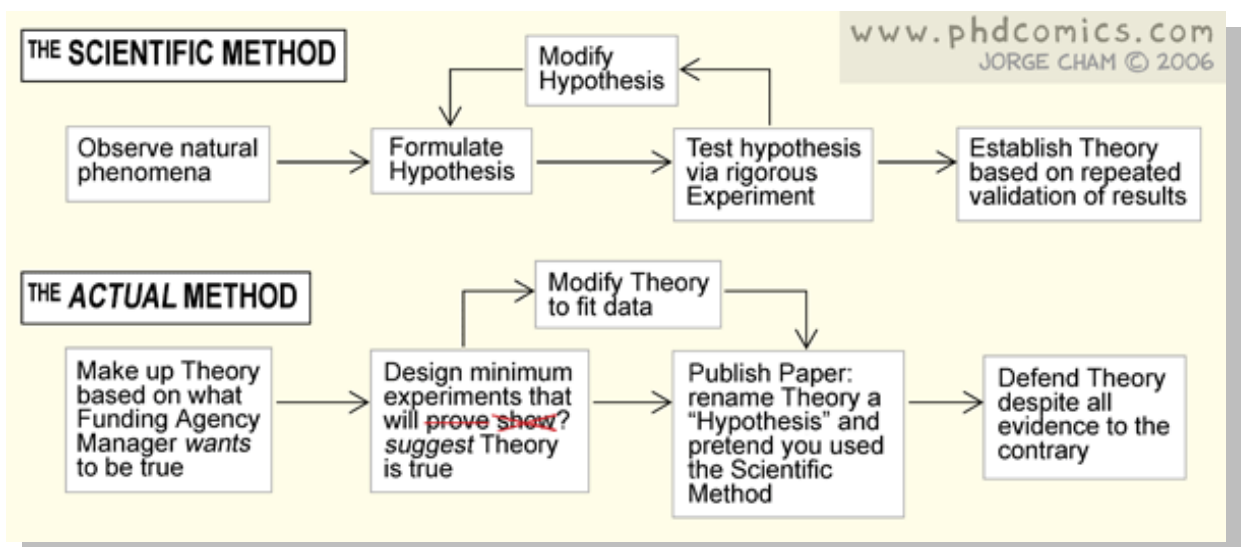
Assim, a proposta desse trabalho é avaliar e comparar a diversidade microbiana presente em cinco lixiviados oriundos de diferentes aterros, através do uso de técnicas moleculares, a fim de fornecer um conhecimento básico da composição microbiana desse tipo de resíduo. Esperamos que nossos resultados possam oferecer uma visão ampla e útil das populações bacterianas presentes nos aterros, e que estes dados possam servir de ponto de partida para estudos mais específicos, que venham a contribuir com a compreensão dos processos de degradação dos resíduos nos aterros. E que estes avanços se reflitam em metodologias mais eficientes de gestão e tratamento desses resíduos.

### **3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar a diversidade e a riqueza bacteriana presentes nos cinco lixiviados estudados através das técnicas moleculares de DGGE e piroseqüenciamento, identificando os principais grupos taxonômicos associados a esse resíduo;
- Através dos dados de seqüenciamento analisar a estrutura da comunidade presente em cada lixiviado;
- Analisar a correlação entre a composição microbiana dos lixiviados estudados e os parâmetros físicos – químicos observados das amostras analisadas.

# Materials & Métodos

---



## 4. MATERIAS & MÉTODOS

### 4.1. DESCRIÇÃO DOS LOCAIS AMOSTRADOS

Os pontos de amostragem escolhidos na Região metropolitana do Rio de Janeiro foram: Aterro Metropolitano de Gramacho (GR), Centro de Tratamento de Resíduos Geriçinó (GE), Aterro controlado de Morro do Céu (MC) e Aterro Sanitário de Nova Iguaçu (NI). No estado de Pernambuco, no Município de Jaboatão dos Guararapes, foi coletado o quinto lixiviado deste estudo, resultante da operação do Aterro controlado da Muribeca (MU).

A região metropolitana do Rio de Janeiro é a maior usuária do Aterro Metropolitano de Gramacho (aterro controlado de Gramacho), espaço criado em 1976, situado em uma área de 1.300.000 m<sup>2</sup> às margens da Baía de Guanabara, em uma área de manguezais. A bacia hidrográfica da Baía de Guanabara inclui toda a área metropolitana do Rio de Janeiro, incluindo, integralmente as cidades de Belford Roxo, Duque de Caxias, Guapimirim, Itaboraí, Magé, Nilópolis, São Gonçalo, São João de Meriti e Tanguá; e parcialmente as cidades do Rio de Janeiro, Niterói, Rio Bonito, Cachoeiras de Macacu, Petrópolis, Nova Iguaçu e Queimados. Em termos de resíduos sólidos as cidades da Baía de Guanabara geram 700g de resíduos/habitante/dia. São dispostas em média 6700 toneladas/ dia no aterro metropolitano de Gramacho, oriundos dos municípios do Rio de Janeiro, Duque de Caxias, Nilópolis, Queimados e São João de Meriti, que produz um volume de lixiviado de 1500 m<sup>3</sup>/dia (Fonte: COMLURB). O chorume em gramacho é captado por caminhões-pipa e usado na irrigação das pistas internas, que não são asfaltadas (Figura 7). Este tipo de procedimento é realizado para a recirculação interna do chorume e para diminuição da poluição do ar por partículas suspensas, originadas da movimentação dos caminhões coletores dentro do aterro (119).

Além de Gramacho, outro aterro controlado operado pela Comlurb é o Centro de tratamento de resíduos Geriçinó (CTR- Geriçinó). O CTR- Geriçinó recebe 2.600 toneladas de lixo por dia e é responsável por uma produção diária de 500 m<sup>3</sup> de lixiviado. O aterro encontra-se no Município do Rio de Janeiro no bairro Bangu, tendo como limites a Av. Brasil ao sul, o Parque Ecológico do Mendanha ao norte, o rio Sarapuí a leste, o Complexo

Penitenciário de Bangu a oeste e o campo de instrução das forças armadas na porção nordeste (Fonte: COMLURB).



Figura 7. Foto retirada em Agosto de 2008 no Aterro de Gramacho.

Inaugurado em caráter de emergência, o Aterro controlado do Morro do Céu começou a operar em 1983 como vazadouro de lixo. Atualmente seu sistema de operação permite enquadrá-lo na categoria de aterro controlado. O aterro controlado do Morro do Céu localiza – se no bairro do Caramujo, a cerca de 10 km do centro da cidade de Niterói (RJ), e vem operando desde 1983 (119). O local é operado pela Companhia de Limpeza Urbana de Niterói – CLIN. Até Março de 2004, apenas 15 m<sup>3</sup>/dia de chorume do Morro do Céu eram tratados no Aterro Metropolitano de Gramacho, em Duque de Caxias. Hoje, com as novas medidas e orientações adotadas, todo o chorume gerado, cerca de 150 m<sup>3</sup>/dia, passou a ser tratado na Estação de Icaraí.

Depois de quase 20 anos depositando seus resíduos no Lixão da Marambaia a cidade de Nova Iguaçu passou a ter sua própria Central de Tratamento de Resíduos- CTR Nova Iguaçu. A CTR – Nova Iguaçu esta localizada a 10km do centro urbano, no distrito de Vila da Cava na estrada de Andrianópolis nº 5213, abrangendo uma área de 120 ha. A unidade de tratamento de chorume utiliza um sistema que transforma a água existente no chorume em vapor e os materiais precipitados, que são o resíduo deste processo, são jogados posteriormente no aterro sanitário. A energia utilizada para acionar este processo é retirada do aproveitamento do biogás gerado no aterro (10).

O Aterro controlado da Muribeca é o maior aterro em operação na Região Metropolitana do Recife, com uma área de 62 ha, localizado a 16 km da Cidade do Recife, no Município de Jaboatão dos Guararapes. O Aterro da Muribeca foi desativado em Julho de 2009. Até então, recebia diariamente uma média de 2.600 toneladas de sólidos regulares (resíduos domésticos), sólidos volumosos (entulhos e raspagens) e resíduos de poda. A área do aterro era utilizada para disposição final dos resíduos desde 1985, quando funcionava como vazadouro a céu aberto. Em 1994, a Prefeitura do Recife iniciou um programa de recuperação ambiental, com o intuito de aumentar o tempo de vida útil do aterro, minimizar os danos ambientais causados pela disposição inadequada dos resíduos; transformando o lixão em aterro controlado (92).

As características gerais dos aterros coletados estão sumarizadas na tabela 5. Todos os lixiviados analisados neste trabalho são oriundos de aterros sanitários com mais de 20 anos de operação.

Tabela 5. Características gerais dos aterros coletados.

	<b>Localização</b>	<b>Área (m<sup>2</sup>)</b>	<b>Idade em anos (2010)</b>	<b>Vazão do lixiviado (m<sup>3</sup>/dia)</b>
<b>Gramacho (GR)</b>	Duque de Caxias/RJ	1300000	34	1500
<b>Gericinó (GE)</b>	Rio de Janeiro/RJ	-	25	500
<b>Morro do Céu (MC)</b>	Niterói/ RJ	95000	28	150
<b>Nova Iguaçu (NG)</b>	Nova Iguaçu/RJ	1200000	25	120
<b>Muribeca (MU)</b>	Jaboatão dos Guararapes/PE	620000	25	800

#### **4.2. COLETA DOS LIXIVIADOS**

Para a análise dos lixiviados, em Julho de 2009, foram realizadas 5 coletas com auxílio de uma garrafa de vidro estéril. Uma alíquota de 1 litro foi coletada na saída do dreno para a Estação de Tratamento, e posteriormente dividida em duas alíquotas de 500 ml. Após a coleta, o material foi transferido para o laboratório onde foi filtrado.

Para a filtração, cada alíquota de 500 ml foi dividida em duas alíquotas de 250 ml cada. Para cada alíquota foram realizadas três pré- filtrações com pré-filtro médio (Whatman Schleicher & Schuell, US) e duas filtrações com membrana de 0.45µm de

porosidade (Whatman Schleicher & Schuell, US), ambas a fim de remover os sólidos em suspensão e pequenos eucariotos. Por final, para coleta das células bacterianas, as duas alíquotas de 250 mL pré-filtradas foram concentradas em um filtro 0.22µm de porosidade (Sartorius Stedim, FR). A extração do DNA foi realizada a partir do material depositado no filtro de 0.22µm de porosidade.

#### 4.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS LIXIVIADOS

Como parte do PROSAB/tema 5 (Programa de Pesquisa em Saneamento Básico/tema 5 – resíduos sólidos os lixiviados) coletados foram analisados segundo os parâmetros DQO, DBO, pH, Nitrogênio total Kjeldahl, Nitrogênio amoniacal, Sólidos dissolvidos totais, Sólidos Suspensos Totais e Sólidos suspensos Voláteis. Os valores obtidos estão representados na tabela 6.

Tabela 6. Características físico – químicas dos lixiviados coletados. GE, lixiviado gerado no aterro de Gericinó; NG, lixiviado gerado no aterro de Nova Iguaçu; MC, lixiviado gerado no aterro de Morro do Céu; GR, lixiviado gerado no aterro de Gramacho; MU, lixiviado gerado no aterro da Muribeca; DBO, Demanda Bioquímica de Oxigênio; DQO, Demanda Química de Oxigênio.

	GR	GE	MC	NG	MU
<b>pH</b>	7.83	7.63	8.34	7.71	7.43
<b>DBO<sub>5</sub> (mg/L)</b>	361	279	76	270	2320
<b>DQO (mg/L)</b>	3635	1985	665	1826	4007
<b>DBO<sub>5</sub>/DQO (mg/L)</b>	0.1	0.1	0.1	0.1	0.6
<b>Nitrogênio Total (mg/L)</b>	1949	1330	946.8	1923	2338
<b>Nitrogênio amoniacal (mg/L)</b>	1237	918	778	582	1742
<b>Sólidos dissolvidos Totais (mg/L)</b>	11387	6787	4956	8383	10176
<b>Sólidos Suspensos Totais (mg/L)</b>	47	56	70	50	105
<b>Sólidos Suspensos Voláteis (mg/L)</b>	41	49	40	30	28

A razão dos valores DBO e DQO sugere que os lixiviados de Gramacho, Gericinó, Morro do Céu e Nova Iguaçu apresentam um biodegradabilidade fraca ( $DBO/DQO \leq 0,1$ ) sendo, portanto considerados estabilizados. Para Muribeca observa uma razão de 0,6, o que sugere que este lixiviado apresenta características de biodegradabilidade média (29).



#### 4.4. EXTRAÇÃO DE DNA

A partir dos filtros congelados foi realizada a extração de DNA utilizando o kit de extração *FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil*, da BIO101 (Califórnia, US) que utiliza o método da extração direta, seguindo-se o protocolo distribuído pelo fabricante. Para verificar a integridade do DNA extraído, uma alíquota de 5µl de cada amostra foi submetida a uma eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0.5X a 90 Volts por 30 minutos. Para visualização do material aplicado no gel, este foi corado por 15 minutos com Brometo de Etídio (EtBr) na concentração de 2µg/ml e o observado utilizando-se um transiluminador com luz ultravioleta.

#### 4.5. PCR E DGGE

De modo a obter o perfil da comunidade bacteriana contida nas amostras, os iniciadores F968 e 1401R (80) foram combinados em uma PCR a fim de amplificar o segmento compreendido entre os nucleotídeos 968 e 1401 do gene 16S rRNA (posições referente ao mesmo gene em *Escherichia coli* (15)). Uma seqüência de 40 nucleotídeos foi adicionada na extremidade 5' do iniciador F968 no intuito de melhorar a detecção das pequenas variações nucleotídicas contida nos fragmentos obtidos durante o DGGE (76). A seqüência dos iniciadores utilizados esta descrita na tabela 7.

As amplificações foram realizadas no termociclador “Eppendorf Mastercycler<sup>®</sup> Thermal Cyclers” (Eppendorf, DEU). Cada reação foi realizada em um volume de 50µl em um tubo contendo 5µl do Tampão de PCR com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10X, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada um dos quatro dNTPs, 0,1µM dos iniciadores, 2,5U de *Taq* polimerase, 1% formamida, 0,5 µl de 1% BSA (New England Biolabs, US), 5µl de DNA e água bidestilada estéril q.s.p 50µl. O ciclo aplicado foi: 1X (94°C por 2 minutos); 30X (94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos); 1X (72°C por 7 minutos) e 4°C. Os fragmentos obtidos nas reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, corados e visualizados conforme descrito no item 2.

Tabela 7. Seqüência dos iniciadores.

Iniciador	Seqüência nucleotídica
<b>U968F</b>	5'- AAC GCG AAG AAC CTT AC-3'
<b>1401R</b>	5' - CGG TGT GTA CAA GAC CC – 3'
<b>GC - grampo</b>	5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG G – 3'
<b>563F</b>	5'- AYTGGGYDTAAAGNG – 3'
<b>802R</b>	5'- TACCRGGGTHCTAATCC – 3'
	5'- TACCAGAGTATCTAATTC – 3'
	5'- CTACDSRGGTMTCTAATC – 3'
	5'- TACNVGGGTATCTAATCC – 3'

Os géis de gradiente desnaturante foram realizados no “Dcode™ Universal Mutation Detection System” (BioRad Laboratories, UK). Alíquotas dos produtos de PCR (15 - 25 µl) foram misturadas com 5µl do corante de corrida e então aplicadas nos géis de poliacrilamida 6% (p/v) em tampão TAE 1X contendo um gradiente desnaturante linear de 45 – 65% (formamida e uréia). O gradiente dos géis foi preparado a partir das soluções estoques 0% e 70% desnaturantes com adição de 60µl de APS 10%, 30µl de Temed e 50µl do corante “Dcode” (vide lista de soluções) a solução 70% desnaturante para visualização do gradiente. O tempo necessário para polimerização foi de, no mínimo, 2 horas. Uma vez polimerizados os géis foram submetidos à eletroforese a 75 Volts durante 12 horas a 60°C. Ao término da eletroforese, os géis foram corados com SYBR GREEN® (Invitrogen, US), segundo especificação do fabricante, por aproximadamente 30 minutos, e em seguida observados sob luz UV e digitalizados em um sistema de captura de imagem Storm™ (Amersham Pharmacia Biotech, UK).

#### 4.6. PIROSEQUENCIAMENTO

A região hipervariável 4 do gene 16S rRNA foi amplificada a partir nas amostras de lixiviado utilizando-se os iniciadores 563F e 802R (posições referente ao mesmo gene em *Escherichia coli* (15)). Para cada amostra foi utilizado o iniciador 563F com uma seqüência de

7 - 8pb específica na extremidade 5' (chamada de código de barras), possibilitando assim que o PCR em emulsão e as subseqüentes etapas do pirosequenciamento fossem realizadas a partir de uma mistura das amostras (9). O iniciador 802R na realidade consiste de uma mistura de quatro iniciadores reversos que anelam nesta região. Esses iniciadores (563F e 802R) foram desenvolvidos pelo grupo do RDP (Ribossomal Data base Project) e cobrem 94.6% das seqüências de 16S rRNA depositadas no banco de dados (<http://pyro.cme.msu.edu/pyro/help.jsp#pyrotagseq>). A seqüência dos iniciadores e dos códigos de barra utilizados esta descrita na tabela 7 e 8 respectivamente.

Tabela 8. Seqüência dos códigos de barra utilizados no pirosequenciamento.

<b>Códigos de barra</b>	<b>Seqüência nucleotídica</b>
<b>FUSION35</b>	ATGCTCA
<b>FUSION36</b>	CAGAGCA
<b>FUSION37</b>	CAGATGA
<b>FUSION38</b>	CAGCAGA
<b>FUSION39</b>	CAGCTCA
<b>FUSION40</b>	CATCTGA
<b>FUSION41</b>	CATGAGA
<b>FUSION44</b>	CTGCTGA
<b>FUSION46</b>	AGCAGATG
<b>FUSION47</b>	AGCAGCAG

Para cada amostra foram realizadas três ampliações de 20µl que continham 1µM de cada iniciador, 1,8 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada um dos quatro dNTPs, 1,5X de BSA, 1U de “FastStart high-fidelity PCR system enzyme” (Roche Applied Science, US), 5µl de DNA (10 – 40ng) e água bidestilada estéril q.s.p 20µl. O ciclo utilizado foi: 1X (94°C por 3 minutos); 30X (94°C por 45 segundos, 57°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto); 1X (72°C por 7 minutos) e 4°C. Um alíquota de 2µl das ampliações foi submetida à eletroforese em gel de agarose, corados e visualizados conforme descrito no item 2.

Uma vez que a integridade dos produtos foi confirmada, todo o volume da PCR foi novamente submetido à eletroforese em gel de agarose 0.8% em tampão TAE 1X a 90 V por 30 minutos; para que os fragmentos de interesse fossem purificados do gel, evitando-se assim qualquer contaminação por dímeros formados entre os iniciadores. Ao contrário do anterior, para visualização do material aplicado no gel, este gel foi corado por 15 minutos com “SYBR® Safe DNA gel stain” (Invitrogen, US) segundo orientações do fabricante. Seguindo-se então a orientação do fabricante, a purificação a partir do gel de agarose foi realizada utilizando-se o “QIAquick gel extraction kit” seguida de mais uma etapa de purificação efetuada com o kit “QIAquick PCR purification” kit ambos da Qiagen (DE). Uma vez purificados, quantidades equimolares dos produtos da PCR das diferentes amostras foram misturadas em uma única solução e submetidas ao pirosequenciamento no aparelho “Genome Sequencer FLX system (454 Life Sciences, US) na GTSF (Genomics Technology Support Facility) na MSU (Michigan State University).

#### **4.7. ANÁLISE DOS DADOS**

As imagens digitalizadas dos géis de DGGE foram analisadas com auxílio do pacote de programas BIONUMERICS 6.0 (Applied Math, BE). A partir do perfil de bandas apresentado nos géis uma matriz de similaridade foi calculada utilizando-se o coeficiente de similaridade Jaccard e Pearson, e como método de classificação hierárquico o UPGMA (94), a fim de gerar os dendogramas.

Para os dados gerados com o pirosequenciamento foram utilizadas diferentes ferramentas em função da análise a ser realizada. Todo processamento inicial das seqüências foi obtido através da “Pyrosequencing pipeline” presente na página do RDP (<http://pyro.cme.msu.edu/index.jsp>). Inicialmente, as seqüências de cada amostra foram separadas com base no código de barras (Figura 8) e aquelas que apresentavam comprimento inferior a 150pb e/ou substituições nucleotídicas em um dos iniciadores foram removidas. Nenhuma ambigüidade foi permitida nas seqüências. As seqüências qualificadas foram alinhadas com base na estrutura secundária utilizando-se a ferramenta “Infernal 1.0.2” (INFERENCE of RNA ALIGNment) (79), agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTU) definidas por 97% de similaridade usando-se o “Complete –

linkage” como método de agrupamento, e classificadas nos filós através da ferramenta “RDP-II classifier” com um limite de confiança de 50% (125). As seqüências que não foram classificadas ao nível de filo foram excluídas das análises subseqüentes de composição de filo.

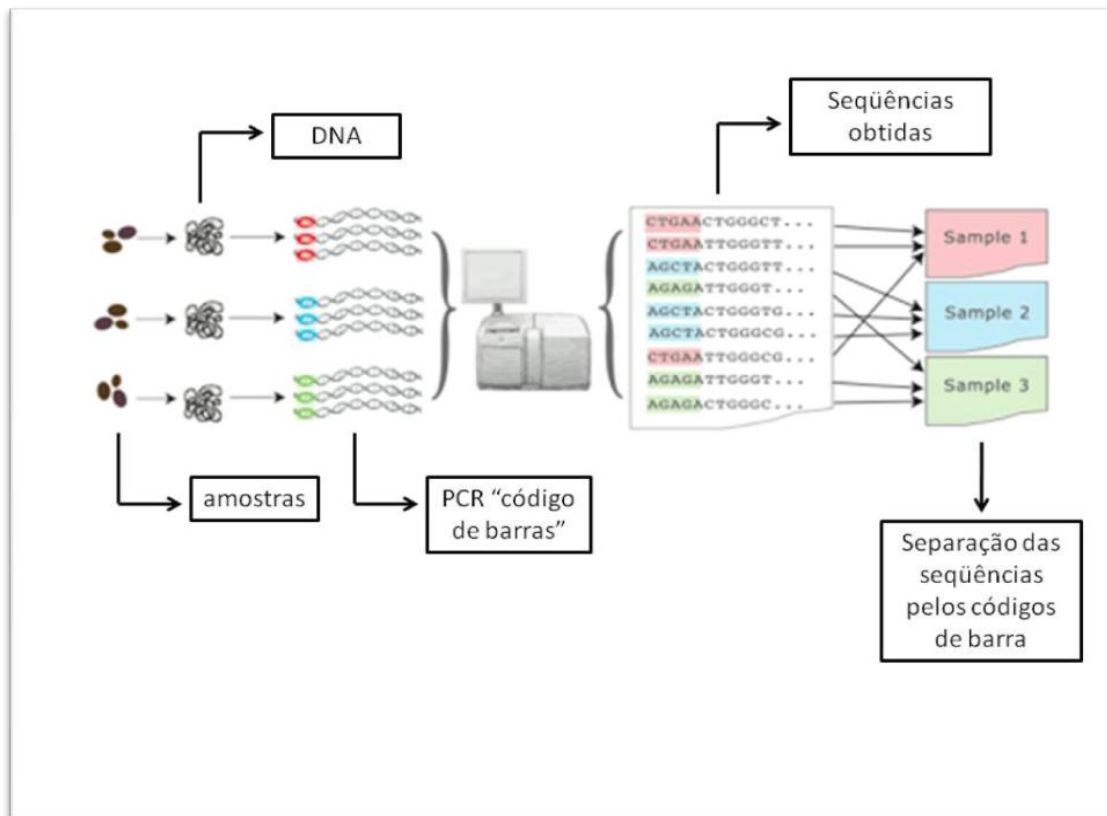


Figura 8. Representação esquemática das etapas do piroseqüenciamento. Adaptado do Ribossomal data base (<http://pyro.cme.msu.edu/pyro/help.jsp#pyrotagseq>).

As curvas de rarefação, os índices de diversidade, os estimadores de riqueza, os diagrams de Venn, assim como as OTUs únicas e compartilhadas foram calculados utilizando-se o pacote de programas Mothur 1.11.0 (113).

Para as análises estatísticas e o agrupamento das seqüências no dendograma foi utilizado o pacote estatístico de programas R 2.11.1 (<http://www.r-project.org/>), onde os pacotes Vegan e BiodiversityR foram empregados nas análises.

Primeiramente, as seqüências obtidas foram utilizadas para gerar uma matriz de distância utilizando-se como técnica hierárquica aglomerativa o método da ligação completa ou “Complete Linkage Cluster”, para tal a distância considerada entre os objetos

(seqüências) foi a distância evolutiva de 0.03 ou 97% de similaridade. A matriz gerada foi empregada no cálculo da medida de dissimilaridade de Bray-Curtis, e os valores obtidos representados graficamente na forma de dendograma, no qual o método de classificação hierárquico utilizado foi UPGMA (94).

Os dados obtidos com o pirosequenciamento e os dados abióticos foram combinados e ordenados na NMDS (nonmetric multidimensional scaling) e PCoA (Principal Coordinates Analysis) novamente utilizando-se o índice de Bray-Curtis. A significância da correlação na ordenação foi testada empregando-se o teste de Mantel e apenas os dados com correlação significativa ( $p \leq 0.05$ ) foram mostrados nas ordenações. A fim de comparar as distâncias utilizadas na ordenação com as distâncias originais recorreremos ao modelo de regressão GAM (Generalized additive models) e assim se certificar que o método de ordenação escolhido estava correto.

#### **4.8. LISTA DE SOLUÇÕES E TAMPÕES**

##### Tampão TBE 1X

Trisma base (Hidroximetil amino metano)	89 mM
EDTA (etileno diamino tetra acetado)	2,5 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Ácido bórico)	89 mM

##### Tampão TAE 50x

Trisma base	2 M
Ácido acético glacial	1 M
EDTA	50 mM

- As soluções foram autoclavadas por 20 minutos a 121<sup>0</sup>C e 1 atm, e estocadas à temperatura ambiente.

##### Corante para Eletroforese de DNA

Glicerol	50% (v/v)
EDTA pH 7.5	20mM

Azul de Bromofenol	0,05% (p/v)
Xileno Cianol	0,05% (p/v)

Corante "Dcode" para visualização do gradiente

Azul de Bromofenol	0,05g
Xileno Cianol	0,05g
Solução TAE 1X	10 ml

Solução de acrilamida 40%

Acrilamida	38,93g
Bis-acrilamida	1,07g
Água bisdestilada q.s.p	100 ml

Solução 0% desnaturante (gel 6% de acrilamida)

Solução de acrilamida 40%	15 ml
Tampão TAE 50X	2 ml
Água bisdestilada q.s.p	100 ml

Solução 70% desnaturante (gel 6% de acrilamida)

Solução de acrilamida 40%	15 ml
Tampão TAE 50X	2 ml
Formamida deionizada	28 ml
Uréia	29,4 g
Água bisdestilada q.s.p	100 ml

- as soluções contendo acrilamida foram filtradas em membrana Whatman 0,45 µm e estocadas a 4°C envoltas em papel laminado ou frasco âmbar.

Formamida deionizada

Resina AG 501-X8 (BioRad Laboratories, UK)	5 g
Formamida	100 ml

- Esta solução foi deixada sob agitação por uma hora, em seguida foi filtrada em membrana Whatman (qualitativo n=4) e estocada a temperatura ambiente.

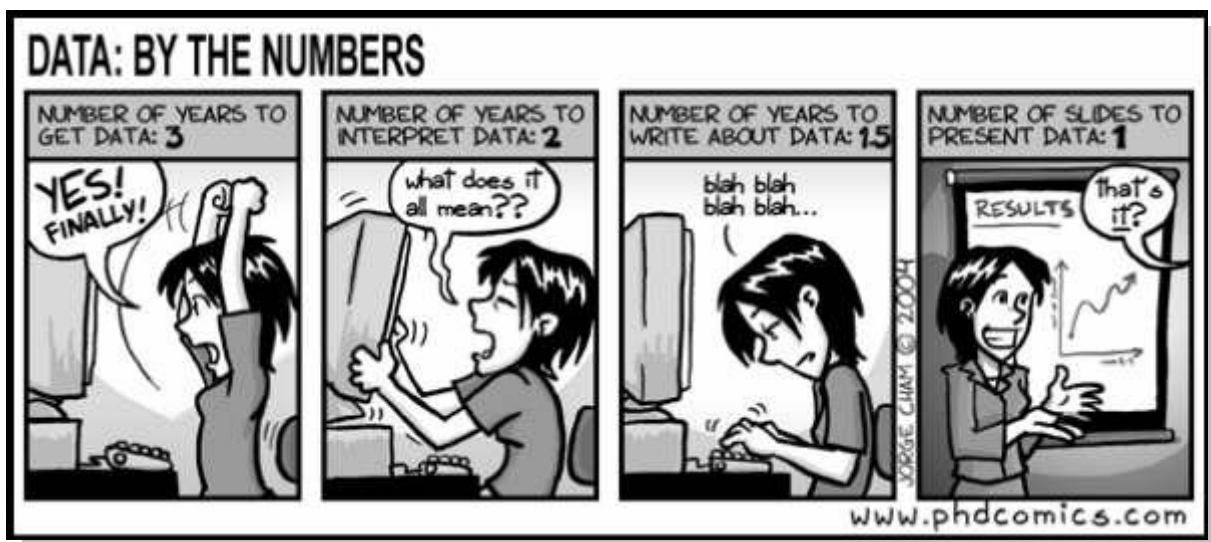
Solução de Persulfato de amônio 10%

Persulfato de amônio	0,1 g
Água bisdestilada q.s.p	1 ml



# Resultados

---



## 5. RESULTADOS

### 5.1. ANÁLISE DO PERFIL DE DGGE

O DNA extraído das amostras de lixiviado foi amplificado através de uma PCR (U968 - GC e L1401, tabela 5) gerando fragmentos de aproximadamente 400 pb do gene 16S rRNA. Estes fragmentos foram então submetidos à eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) obtendo-se um perfil de banda referente a cada amostra analisada. Este perfil de banda oferece uma visão geral da estrutura da comunidade bacteriana presente nas dez amostras de lixiviados coletadas (Figura 9A e 10B). Observa-se nas duplicatas que o perfil obtido para cada amostra é reprodutível, com apenas pequenas diferenças (Figura 9A e 10B).

A similaridade entre as estruturas da comunidade bacteriana presente nas amostras foi determinada com base na presença ou ausência das bandas detectadas no gel. Ao considerar a presença/ausência, semelhanças entre os padrões de bandas, tomadas em pares, podem ser expressas em um valor percentual utilizando-se um coeficiente de similaridade (23). No caso, utilizamos do coeficiente de similaridade Jaccard e como método de classificação hierárquica, o UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Average). As análises foram realizadas com o auxílio do software BIONUMERICS 6.0 (Applied Math, BE) (Figura 9A).

Para o mesmo perfil obtido, a similaridade entre a estrutura da comunidade bacteriana presente nas amostras foi também determinada levando-se em consideração além da presença/ausência, a intensidade das bandas observadas; em outras palavras a abundância relativa das bandas observadas. Para tal utilizamos o coeficiente de correlação Pearson e mantivemos como método de classificação hierárquica, o UPGMA. Novamente, as análises foram realizadas com o auxílio do software BIONUMERICS 6.0 (Applied Math, BE) (figura 10A).

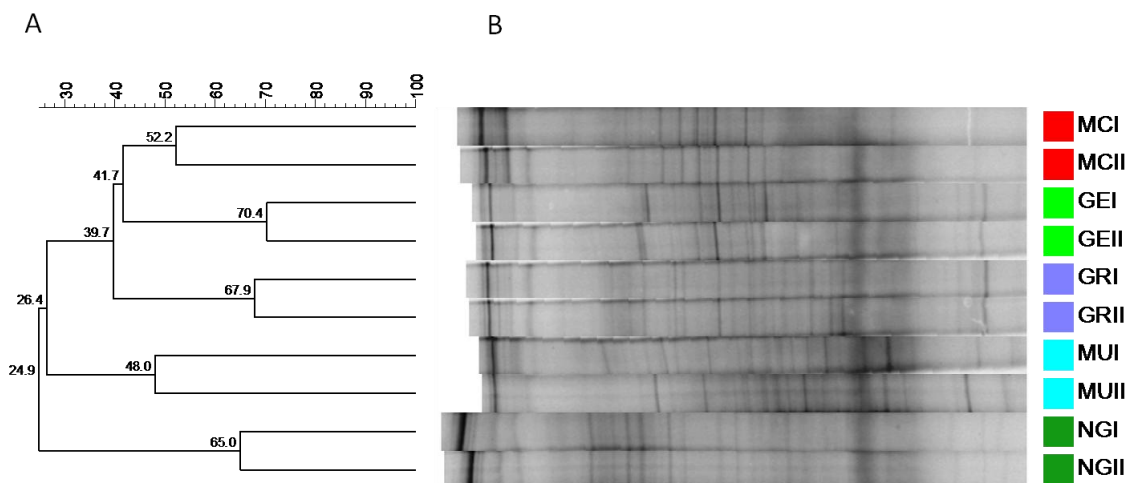


Figura 9. Estrutura das comunidades bacterianas com base nos perfis de fragmentos 16S rDNA das amostras de lixiviados. GEI e GEII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Gericinó; NGI e NGII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Nova Iguaçu; MCI e MCII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Morro do Céu; GRI e GRII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Gramacho; MU 1 e MU 2, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Muribeca. A) Dendograma gerado a partir dos valores de similaridade obtido com o perfil de bandas observado obtido com o coeficiente de similaridade Jaccard e método de classificação hierárquica, UPGMA. B) Perfil de bandas observado no DGGE.

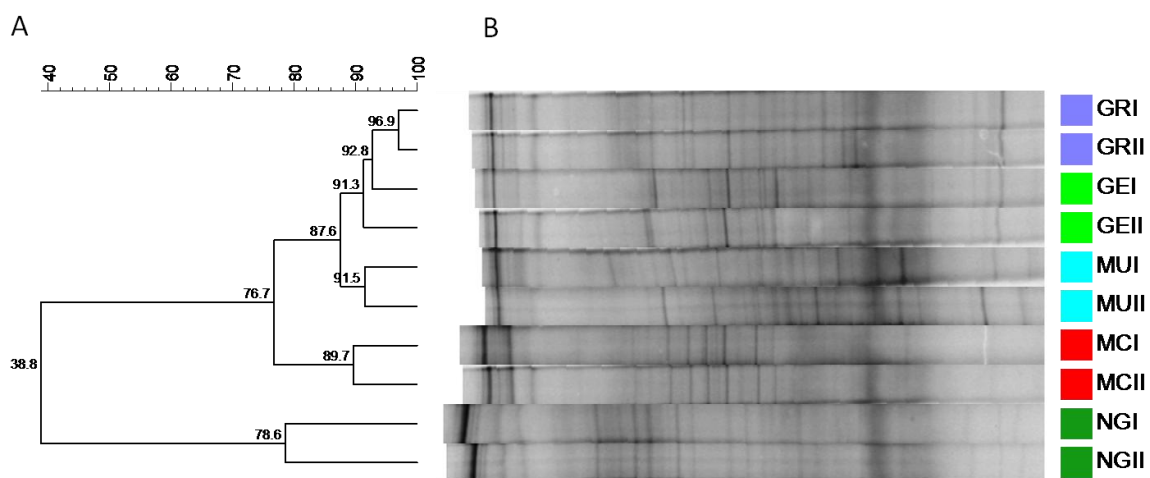


Figura 10. Estrutura das comunidades bacterianas com base nos perfis de fragmentos 16S rDNA das amostras de lixiviados. GEI e GEII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Gericinó; NGI e NGII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Nova Iguaçu; MCI e MCII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Morro do Céu; GRI e GRII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Gramacho; MU 1 e MU 2, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Muribeca. A) Dendograma gerado a partir dos valores de similaridade obtido com o perfil de bandas observado obtido com o coeficiente de similaridade Pearson e método de classificação hierárquica, UPGMA. B) Perfil de bandas observado no DGGE.

Para os dados obtidos com o coeficiente Jaccard o maior valor de similaridade observado foi de 42% entre as amostras de Morro do Céu e Gericinó. O lixiviado oriundo de Nova Iguaçu apresentou o menor valor de similaridade com os demais lixiviados, sendo este de 25%. Um agrupamento hierárquico diferente foi observado quando a matriz de similaridade foi calculada utilizando-se o Coeficiente Pearson. Neste caso valores maiores de similaridade foram observados. Por exemplo, o grupo formado entre os lixiviados de Gramacho e Gericinó apresentou um alto valor de similaridade, aproximadamente 91%. A similaridade entre essas amostras e o lixiviado de Muribeca foi de aproximadamente 77%. O menor valor observado foi novamente entre o lixiviado de Nova Iguaçu e os demais. Estes resultados sugerem uma estruturação diferencial da comunidade microbiana nessas amostras de lixiviado.

## **5.2. DIVERSIDADE BACTERIANA MOLECULAR**

### **5.2.1. ABUNDÂNCIA E RIQUEZA DAS OTUs OBTIDAS**

Todas as amostras de lixiviado foram submetidas ao pirosequenciamento. A região hipervariável 4 do gene 16S rRNA foi amplificada a partir das amostras de lixiviado utilizando-se os iniciadores 563F e 802R, descritos na tabela 7. Todo processamento inicial das seqüências foi realizado através da “Pyrosequencing pipeline” presente na página do RDP, como descrito anteriormente.

Ao final do processamento foram obtidas 35670 seqüências no total; o número de seqüências obtidas em cada amostra está descrito na tabela 9. Para o alinhamento das seqüências utilizamos a ferramenta “Infernal 1.0.2” (INFERENCE of RNA ALIGNMENT) (79). Esta ferramenta presente no RDP pyrosequencing pipeline foi bastante útil, pois permitiu o alinhamento de milhares de seqüências em poucos minutos. Ao computar a similaridade entre as seqüências e desta forma identificar os homólogos, alinhando-las, o algoritmo utilizado pelo programa leva em consideração a combinação da informação trazida pela estrutura secundária da molécula, bem como a seqüência primária.

Para determinar se a cobertura amostral com o pirosequenciamento foi representativa, curvas de rarefação foram construídas com as seqüências obtidas em cada

amostra, e estão representadas na figura 11. Todas as amostras apresentaram um mesmo padrão de cobertura entre as duplicatas e entre as diferentes amostras de lixiviado, evidenciando uma aparente estabilização das curvas, o que sugere uma boa cobertura da diversidade molecular presente nas amostras. Entretanto, observamos uma disparidade entre as curvas obtidas para as amostras GE (Figura 11).

Tabela 9. Indicadores de Riqueza (Chao e ACE) e Diversidade (Shannon-weaver) obtidos nas amostras de lixiviado.

<i>Lixiviado</i>	<b>Indicadores de Riqueza</b>					
	<i>NS</i>	<i>OTU 3%</i>	<i>Shannon<sup>a</sup></i>	<i>Chao1<sup>a</sup></i>	<i>ACE<sup>a</sup></i>	<i>ESC<sup>b</sup></i>
<b>GEI</b>	6359	1756	6.41 (6.37; 6.46)	3112 (2870; 3404)	3987 (3872; 4108)	0.865
<b>GEII</b>	2484	378	4.36 (4.29; 4.43)	812 (667; 1027)	1248 (1111; 1411)	0.738
<b>GRI</b>	3133	592	4.91 (4.84; 4.97)	1007 (888; 1171)	1330 (1215; 1464)	0.773
<b>GRII</b>	2896	532	4.81 (4.74; 4.88)	1128 (952; 1375)	1490 (1355; 1647)	0.768
<b>MCI</b>	2839	811	5.75 (5.70; 5.81)	1639 (1442; 1895)	2387 (2259; 2526)	0.864
<b>MCII</b>	2582	716	5.65 (5.59; 5.71)	1351 (1191; 1563)	1944 (1852; 2043)	0.865
<b>MUI</b>	3736	918	5.39 (5.32; 5.45)	1866 (1647; 2147)	2502 (2367; 2649)	0.806
<b>MUII</b>	3023	699	5.30 (5.24; 5.37)	1279 (1127; 1481)	1724 (1653; 1799)	0.812
<b>NGI</b>	4036	884	5.60 (5.55; 5.65)	1658 (1474; 1897)	2428 (2326; 2536)	0.831
<b>NGII</b>	4582	1003	5.81 (5.76; 5.85)	1765 (1591; 1987)	2573 (2453; 2703)	0.844

Abreviações: NS, Número de seqüências obtidas em cada amostra de lixiviado; OTU, Unidade Taxonômica Operacional; ESC, estimativa de cobertura de amostragem. <sup>a</sup> Indicadores calculados com 97% similaridade, isto é, distancia evolutiva de 0.03 para definição de OTU. Valores em parênteses correspondem ao intervalo de confiança de 95% obtido no Mothur v. 1.11.0.  $ESC = Cx = 1 - (N_x/n)$ , onde  $N_x$  é o número de seqüências únicas e  $n$  é o número total de seqüências, obtido no Mothur v.1.11.0.

Visto que o número de seqüências obtidas com esta amostra (6359) foi muito superior ao número obtido nas outras amostras (Tabela 9), verificamos a abundância das OTUs observadas nos níveis de similaridade de 0.03 e 0.05 para a amostra GEI e sua réplica GEII. Observamos que parte das OTUs obtidas é abundante, mas que a maioria é rara. Isto significa que algumas OTUs estão representadas por poucas seqüências, em alguns casos por apenas uma seqüência dando ao gráfico esse aspecto conhecido como “long tail”, observado nos dois gráficos (Figuras 12 e 13), característico de comunidades muito diversas.

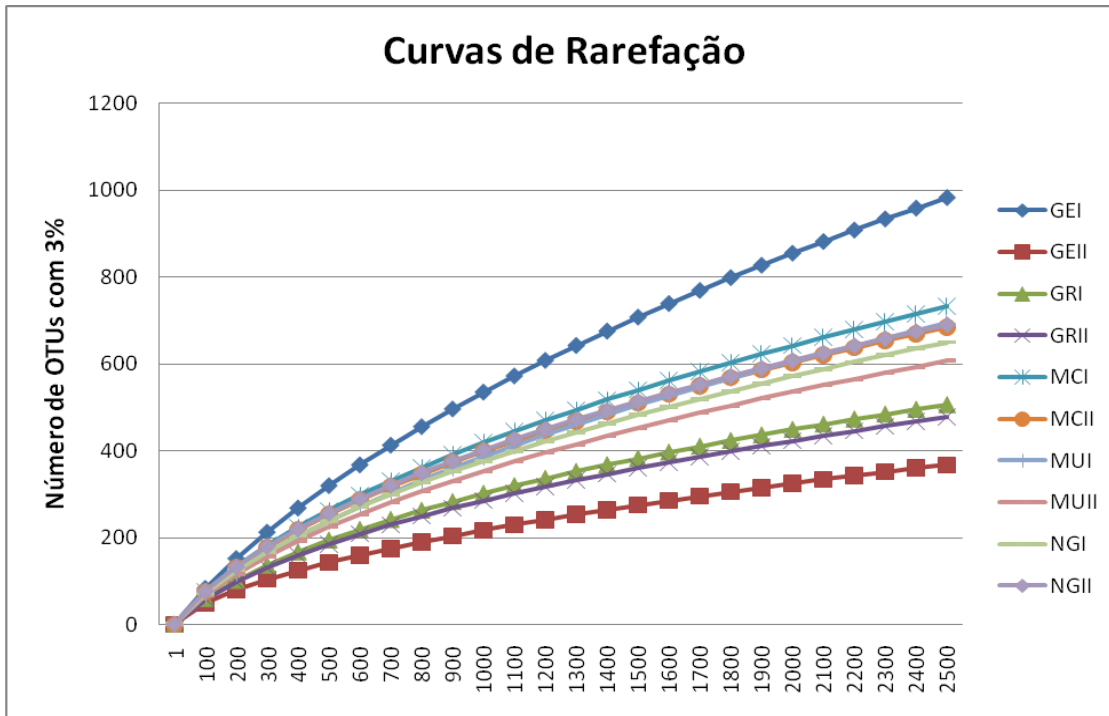


Figura 11. Curvas de rarefação das amostras de lixiviado com 97% de similaridade. GEI e GEII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Gericinó; NGI e NGII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Nova Iguaçu; MCI e MCII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Morro do Céu; GRI e GRII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Gramacho; MU 1 e MU 2, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Muribeca.

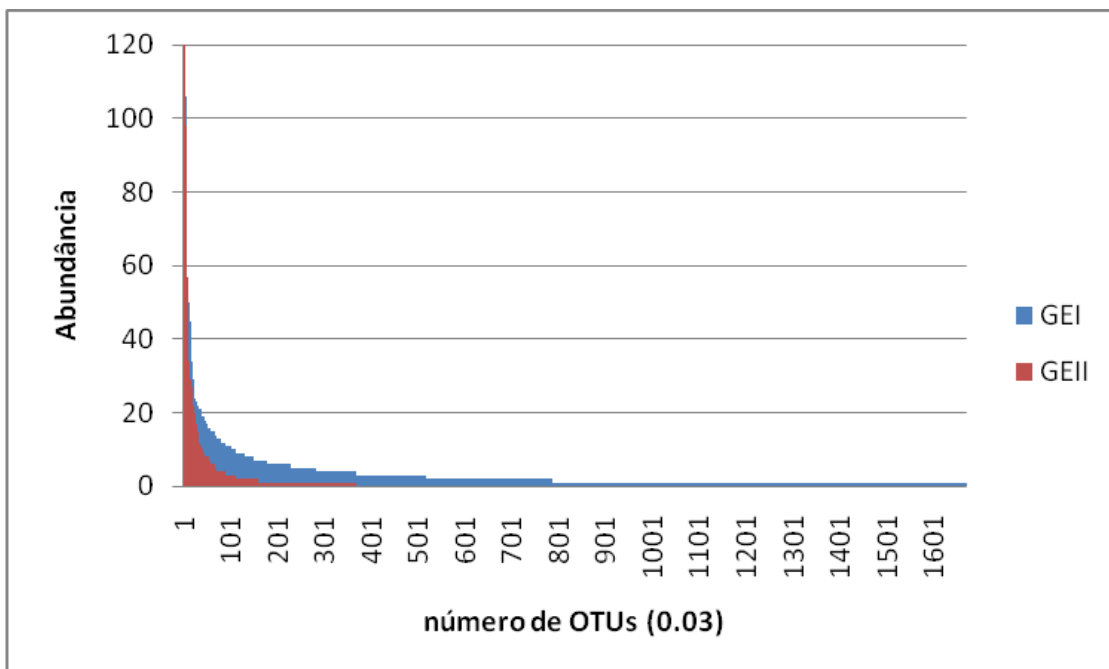


Figura 12. Abundância das OTUs obtidas para as amostras GEI e GEII ao nível de similaridade de 97%. GEI e GEII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Gericinó.

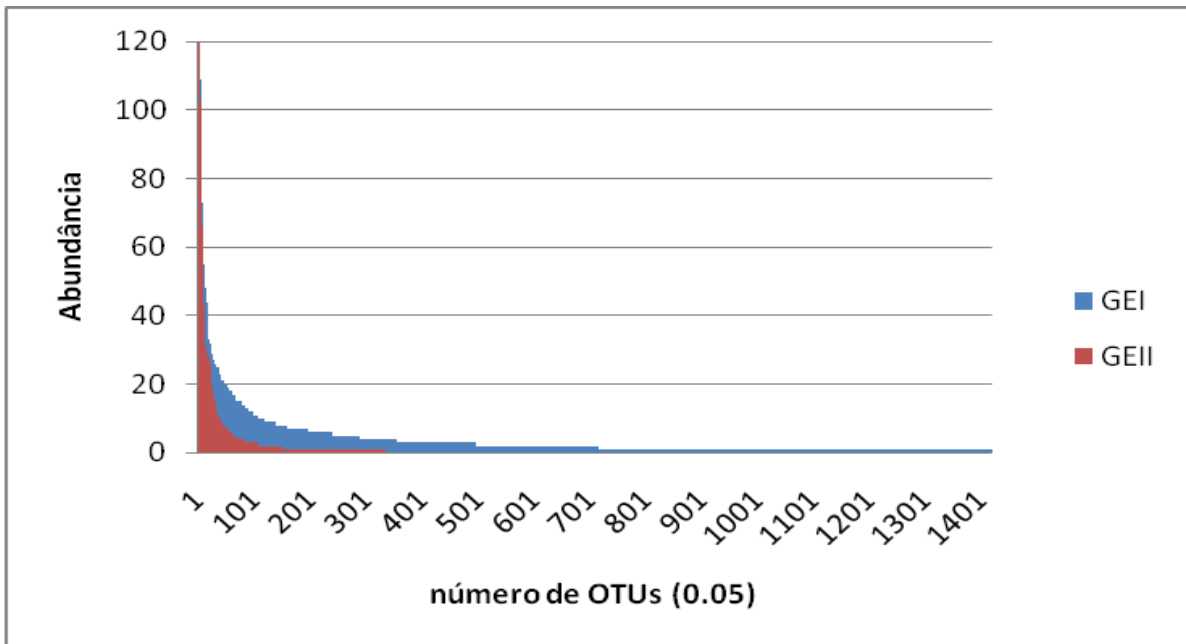


Figura 13. Abundância das OTUs obtidas para as amostras GEI e GEII ao nível de similaridade de 95%. GEI e GEII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Gericinó.

Com base nas seqüências obtidas, os indicadores de riqueza Chao e ACE (Abundance-based coverage estimators), e o índice de diversidade Shannon-Weaver foram calculados para as amostras de lixiviados. Estes dados estão resumidos na tabela 9 onde estão listados os valores obtidos para o índice de diversidade, estimativa do número de OTUs (espécies) e estimativa de cobertura amostral considerando-se uma distância evolutiva de 0.03 para a definição de OTU, além dos indicadores de riqueza.

Ao analisar a diversidade nas amostras observamos que não houve diferença significativa entre os lixiviados MC e NG, considerando os intervalos obtidos para os valores de Shannon-Weaver (Tabela 9). Ao compararmos essas amostras com o lixiviado oriundo do aterro de Muribeca notamos que esta amostra apresenta uma diversidade pouco menor que MC e NG, sendo significativamente diferente se levarmos em consideração o intervalo obtido.

As amostras provenientes do aterro de Gramacho apresentaram baixos valores para o índice de diversidade Shannon-Weaver (GRI e GRII,  $H' = 4.91$  e  $H' = 4.81$  respectivamente) quando comparadas as outras amostras. O mesmo foi observado quando os valores de riqueza foram analisados (Tabela 9). Desta forma, os lixiviados oriundos do aterro Metropolitano de Gramacho apresentaram valores de riqueza e diversidade significativamente abaixo dos demais valores observados. Os valores obtidos com os

métodos não paramétricos listados não foram comparados com o lixiviado GE, visto que houve uma grande diferença no tamanho amostral entre as réplicas estudadas.

### 5.2.2. ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS GRUPOS BACTERIANOS PRESENTES NAS AMOSTRAS.

As abundâncias relativas dos filos detectados nas amostras de lixiviado através da técnica de pirosequenciamento estão representadas na figura 14.

Todas as seqüências foram agrupadas em 24 filos, dos quais 12 foram abundantes o suficiente para serem visualizados no gráfico. Apenas foram representados os filos que apresentavam um número superior ou igual a 10 seqüências. Em todas as amostras de lixiviado analisadas, a maioria das seqüências foi associada aos filos: Proteobacteria e Firmicutes, exceto para as amostras GR (GRI e GRII), onde o filo Tenericutes foi mais abundante, seguido do filo Firmicutes e por ultimo Proteobacteria. De uma maneira geral as amostras apresentaram os mesmos filos com abundâncias peculiares a cada uma; os filos Gemmatimonadetes e Acidobactéria foram apenas observados na amostra GEI (Figura 14).

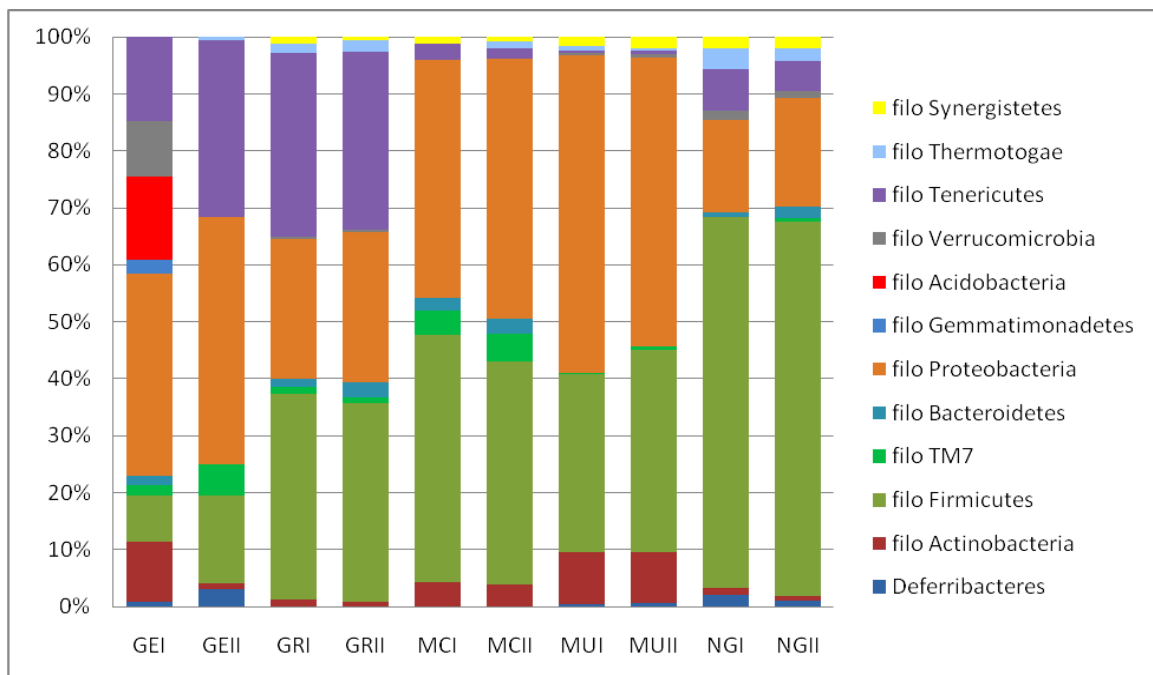


Figura 14. Abundância relativa dos filos nas amostras de lixiviado ao nível de similaridade de 97%. GEI e GEII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Gericinó; NGI e NGII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Nova Iguaçu; MCI e MCII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Morro do Céu; GRI e GRII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Gramacho; MU 1 e MU 2, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Muribeca.



A fim de obter uma melhor idéia da distribuição dos grupos filogenéticos nos efluentes gerados nos aterros analisados, nós comparamos com maior detalhamento a abundância relativa das seqüências dentro dos filos Proteobacteria e Firmicutes, devido à alta prevalência destes nas amostras.

Para o filo Proteobacteria, observamos na figura 15 que a classe mais prevalente foi a classe Gammaproteobacteria, sendo esta responsável por aproximadamente 50% das seqüências agrupadas neste filo. Um padrão semelhante de distribuição foi observado entre as amostras, excetuando-se a amostra GEI. Também observamos um número grande de seqüências que permaneciam não classificadas que foram analisadas separadamente a fim de fornecer uma idéia de qual classe estaria contribuindo mais com essa diversidade desconhecida (Figura 16).

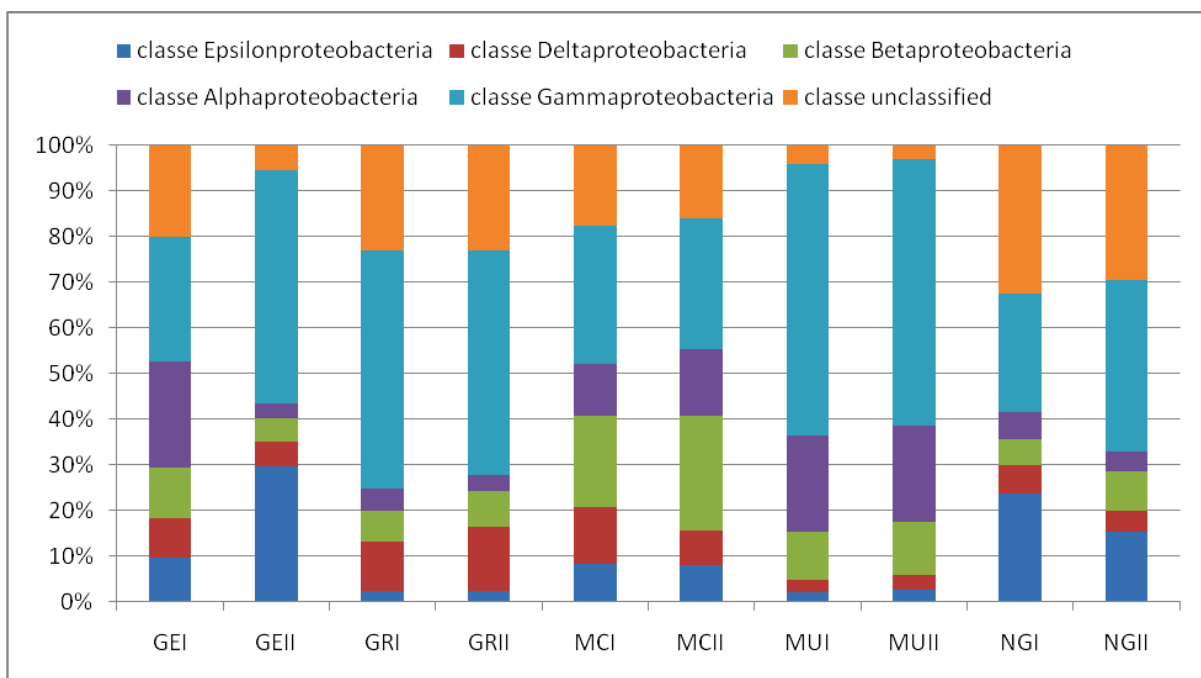


Figura 15. Abundância relativa das classes pertencentes ao filo Proteobacteria nas amostras de lixiviado. GEI e GEII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Gericinó; NGI e NGII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Nova Iguaçu; MCI e MCII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Morro do Céu; GRI e GRII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Gramacho; MU 1 e MU 2, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Muribeca.

Observamos que para as amostras GEII, GR (I e II) e MU (I e II) mais de 50% das seqüências não classificadas encontravam-se dentro da classe Gammaproteobacteria (GEII – 75%, GRI – 86%, GRII – 87%, MUI – 53% e MUII – 72%), contudo para as amostras MC (I e II) e NG (I e II) cerca de 50% das seqüências não foram classificadas ao nível de classe, denotando uma diversidade totalmente desconhecida nessas amostras (Figura 16).

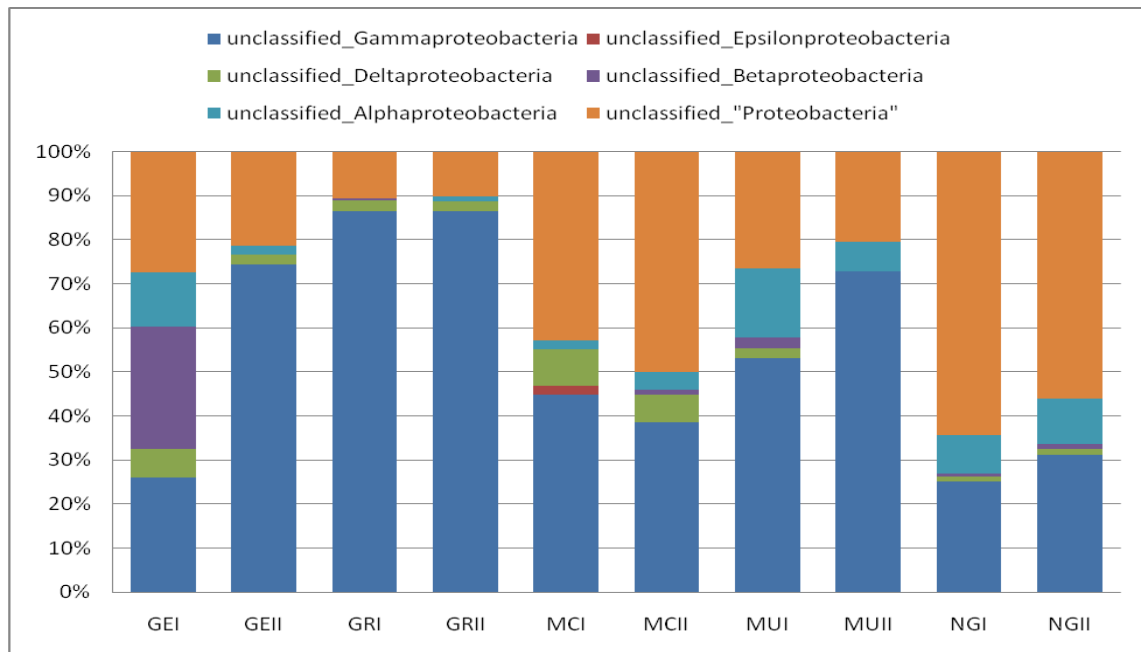


Figura 16. Abundância relativa das seqüências não classificadas nas classes pertencentes ao filo Proteobacteria nas amostras de lixiviado. GEI e GEII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Gericinó; NGI e NGII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Nova Iguaçu; MCI e MCII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Morro do Céu; GRI e GRII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Gramacho; MU 1 e MU 2, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Muribeca.

Ao analisarmos o filo Firmicutes observamos que mais 60% das seqüências pertenciam à classe Clostridia, o que indica uma alta freqüência de bactérias anaeróbias nas amostras analisadas. Novamente as amostras de lixiviado apresentaram um grande número de seqüências não classificadas dentro do filo (Figura 17), dentre as quais 78% não foram agrupadas em nenhuma das classes obtidas (Figura 18).

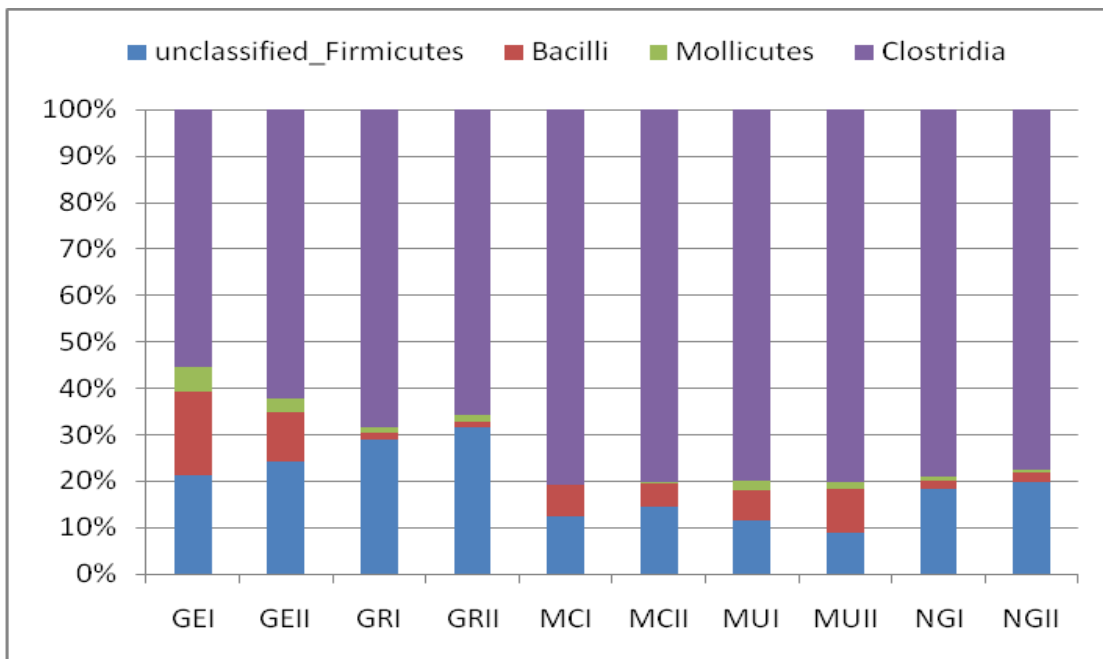


Figura 17. Abundância relativa das classes pertencentes ao filo Firmicutes nas amostras de lixiviado. GEI e GEII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Gericinó; NGI e NGII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Nova Iguaçu; MCI e MCII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Morro do Céu; GRI e GRII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Gramacho; MU 1 e MU 2, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Muribeca.

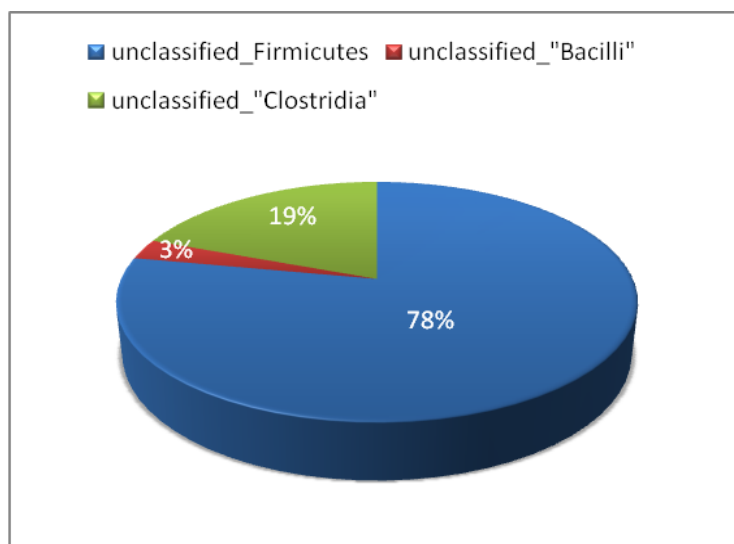


Figura 18. Abundância relativa de todas as seqüências não classificadas no filo Firmicutes.

### 5.3. ESTRUTURA DA COMUNIDADE BACTERIANA PRESENTE NAS AMOSTRAS.

O dendograma obtido com os dados do pirosequenciamento indica uma boa estruturação entre as comunidades bacterianas presentes nos lixiviados (Figura 19). Observa-se a formação de três grupos, sendo o primeiro representado pelas amostras oriundas dos aterros de Nova Iguaçu e Gramacho. Os demais são representados pelas réplicas individuais de cada local, demonstrando uma baixa similaridade na estrutura das comunidades bacterianas presentes nos aterros estudados. O lixiviado do aterro de Muribeca apresentou a mais baixa similaridade quando comparado aos demais lixiviados (Figura 19).

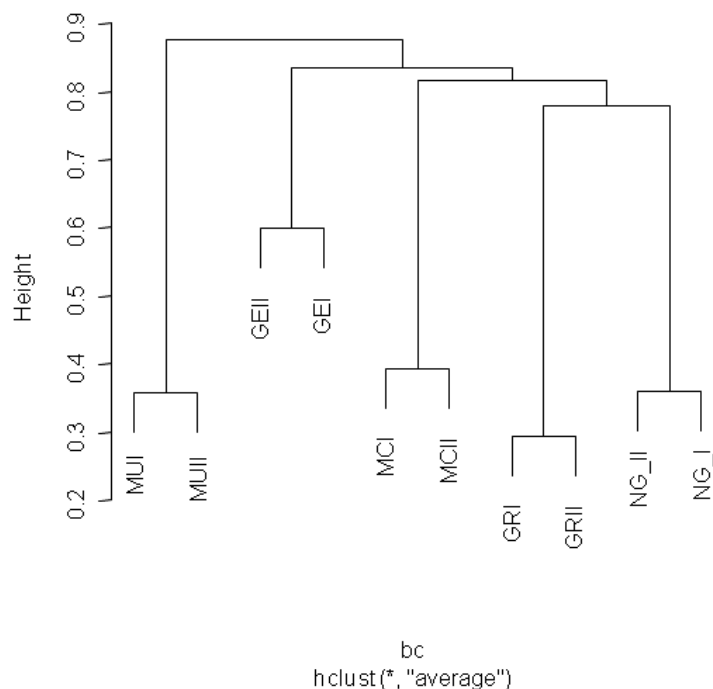


Figura 19. Estrutura das comunidades bacterianas com base no agrupamento das seqüências obtidas ao nível de similaridade de 97%, construído com o índice Bray-Curtis e método de classificação hierárquico UPGMA . GEI e GEII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Gericinó; NG\_I e NG\_II, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Nova Iguaçu; MCI e MCII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Morro do Céu; GRI e GRII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Gramacho; MUI e MUII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Muribeca.

A combinação dos dados obtidos com o pirosequenciamento e os dados abióticos representada nas ordenações, PCoA e na NMDS, mostrou a mesma estruturação entre as comunidades bacterianas presentes nos lixiviados observada no dendograma (Figura 20A e

20B) . As distâncias utilizadas na ordenação foram comparadas com as distâncias originais obtidas com os dados do pirosequenciamento utilizando-se o modelo de regressão GAM (Generalized additive models). O valor de  $r^2$  obtido foi de 0.945, o que indica uma alta correlação entre as matrizes utilizadas.

A redução dimensional dos dados do pirosequenciamento pela PCoA explicou cerca de 47% (com as coordenadas 1 e 2) da variância total entre os lixiviados analisados. A componente 1 (PC1, 25.9%) discriminou o grupo formado pelos lixiviados de Nova Iguaçu e Gramacho, do grupo constituído apenas pelas réplicas dos lixiviados de Muribeca . Na componente 2 (PC2, 21,7%) observa-se a discriminação entre os grupos de lixiviados Gericinó/Morro do Céu e Gramacho/Nova Iguaçu (Figura 20A).

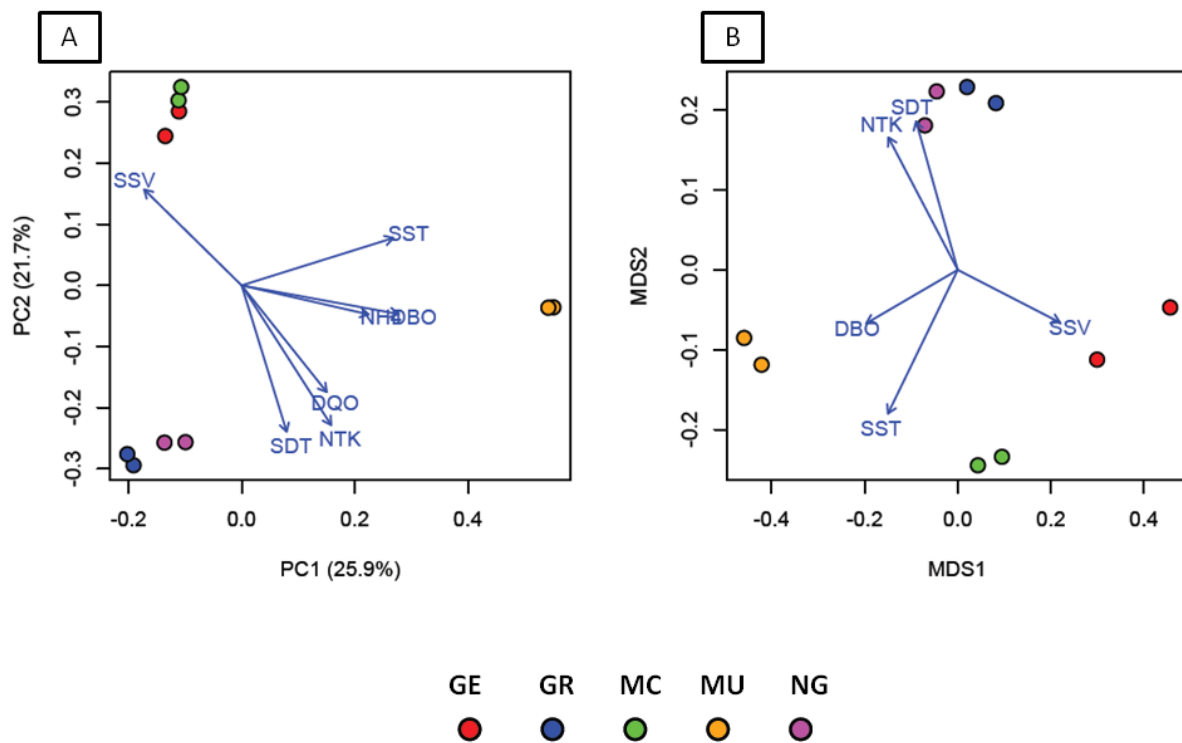


Figura 20. PCoA (A) e NMDS (B) resultante da análise das seqüências obtidas nas amostras agrupadas a um nível de similaridade de 97% combinadas com os dados abióticos observados. O eixo PC1 responde por 25.9% da variação entre as amostras e o eixo PC2 por 21.7% da variação. As variáveis ambientais que apresentaram correlação significativa ( $p \leq 0.05$ ) estão representadas nas ordenações. GE, lixiviado gerado no aterro de Gericinó; NG, lixiviado gerado no aterro de Nova Iguaçu; MC, lixiviado gerado no aterro de Morro do Céu; GR, lixiviado gerado no aterro de Gramacho; MU, lixiviado gerado no aterro da Muribeca. DBO, Demanda Bioquímica de Oxigênio; DQO, Demanda Química de Oxigênio; NH4, Nitrogênio amoniacal; NTK, Nitrogênio Total Kjeldahl; SDT, Sólidos Dissolvidos Totais; SSV, Sólidos Solúveis Voláteis; SST, Sólidos Solúveis Totais.

As ordenações descritas na figura 20 mostram que a estrutura observada entre as comunidades bacterianas dos lixiviados está relacionada a alguns dos fatores abióticos analisados. Segundo o teste de Mantel aplicado na NMDS, os resultados apresentaram uma alta correlação ( $r=0.9138$ ) com um nível de significância de  $p < 0.001$ , indicando uma forte correlação entre os dados abióticos analisados e a distribuição das OTUs nas amostras analisadas, isto é, na estrutura da comunidade bacteriana presente nos lixiviados. Os dados obtidos para pH e idade não mostraram correlação significativa em nenhuma das ordenações, assim como Nitrogênio amoniacal e DQO na NMDS.

Testamos a hipótese de que havia diferença significativa na estrutura microbiana entre as amostras analisadas com base na significância do teste  $P$  descrito por Lozupone e colaboradores (2006) e adaptado por Hamady *et al* em 2010 para análise de grande “data sets” de seqüências, como estes obtidos com o pirosequenciamento (43, 65). Os valores de  $p$  obtidos com o “Fast Unifrac” ao comparar as amostras par a par com 1000 randomizações foram inferiores a 0.001 ( $p < 0.001$ ), sugerindo que de fato há uma diferença significativa na estrutura das comunidades analisadas. Para todas as réplicas, exceto aquelas do lixiviado de Gericinó, obtivemos  $p$  igual a 1, isto é, não significativo.

Com base nesses resultados fomos buscar qual seria a interseção entre as comunidades analisadas e quais seriam as peculiaridades de cada uma. Para tal construímos diagramas de Venn (26), identificando o número de OTUs únicas e compartilhadas entre as amostras; ressaltando que utilizamos a distância evolutiva de 0.03 para definir as OTUs e que as seqüências obtidas em cada amostra foram agrupadas por aterro.

Os diagramas estão representados na figura 21. As cinco amostras de lixiviado compartilham aproximadamente 2% das espécies (OTUs) identificadas, isto é, na figura 21A observa-se que 85 (1,92%) das 4435 OTUs identificadas eram comuns entre as amostras GR, GE, MU, e MC. Para o grupo formado pelos aterros GR, GE, NG e MC 115/4316 (2,66%) (Figura 21B); 93/4435 (2,09%) no grupo GR, NG, GE e UM (Figura 21C) e finalmente 110/3681 (2,98%) para o grupo formado pelos aterros MC, NG, GR e MU (Figura 21D).

Uma vez determinadas as OTUs comuns de cada amostra, buscamos as seqüências presentes nessas OTUs identificadas a fim de classificá-las e assim determinar a proporção relativa dos grupos bacterianos comuns entre as amostras (Figura 22). A mesma

metodologia anterior foi empregada para classificar as seqüências. Observa-se que 75% das OTUs compartilhadas entre os lixiviados são oriundas dos filos Proteobacteria e Firmicutes (Figura 22), o que era esperado visto que estes filos foram os mais abundantes entre a maioria das amostras (Figura 14).

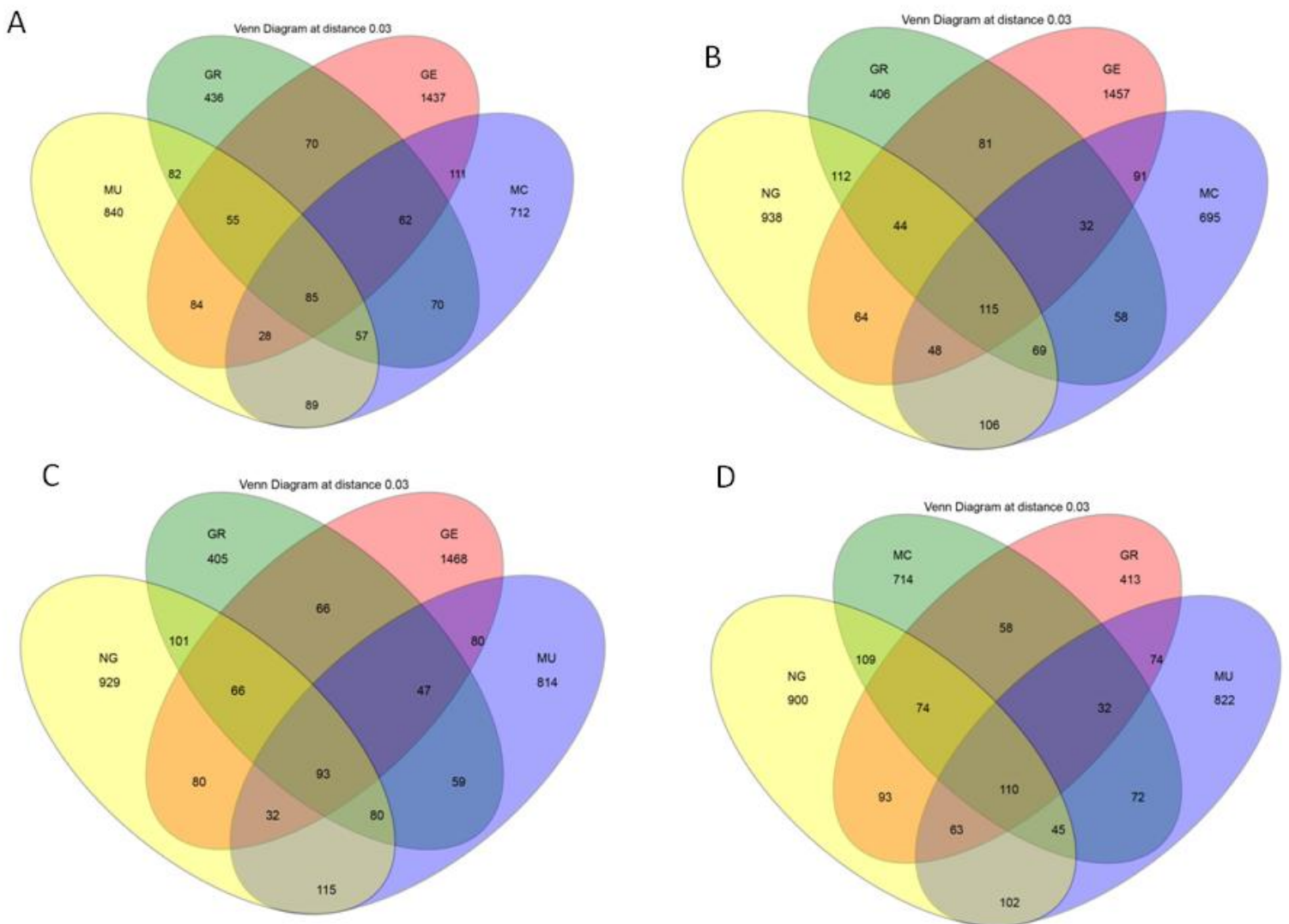


Figura 21. Diagramas de Venn obtidos com as OTUs com nível de similaridade de 97% construídos com auxílio do programa Mothur v. 1.11.0. GEI e GEII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Gericinó; NG\_I e NG\_II, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Nova Iguaçu; MCI e MCII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Morro do Céu; GRI e GRII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Gramacho; MUI e MUII, réplicas de lixiviados gerado de resíduos sólidos de Muribeca.

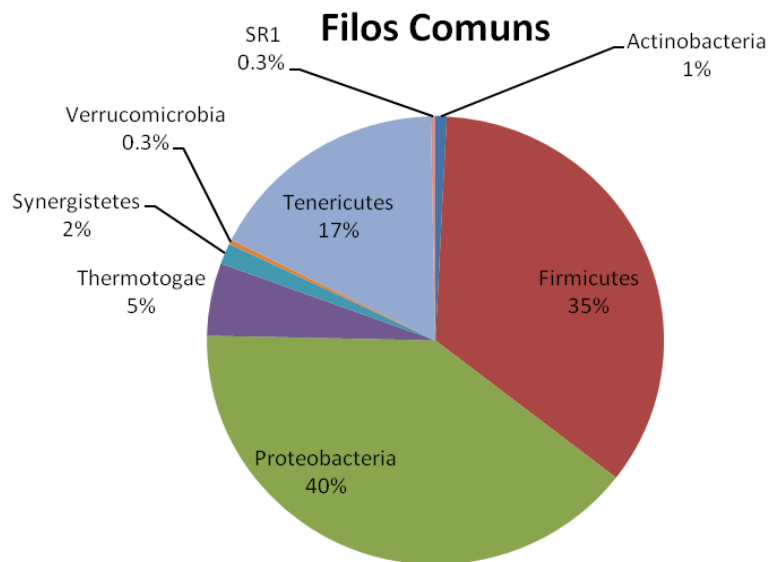


Figura 22. Distribuição relativa dos filos comuns aos lixiviados obtida a partir das OTUs compartilhadas entre as amostras.

As OTUs únicas de cada lixiviado também foram classificadas representando assim a distribuição peculiar dos grupos nos lixiviados analisados (Figura 23). Para os aterros individualmente observa-se uma distribuição desigual destes filos, como a presença de filos exclusivos em algumas amostras (Figura 23). Por exemplo, encontramos o filo *Deferribacteres* apenas no lixiviado oriundo do aterro de Muribeca, assim como o filo *Lentisphaerae* identificado apenas no lixiviado de Nova Iguaçu. Uma visão geral da distribuição relativa dos filos denota uma diversidade diferencial das OTUs menos abundantes nas amostras de lixiviado, representados na figuras 23 e 22.



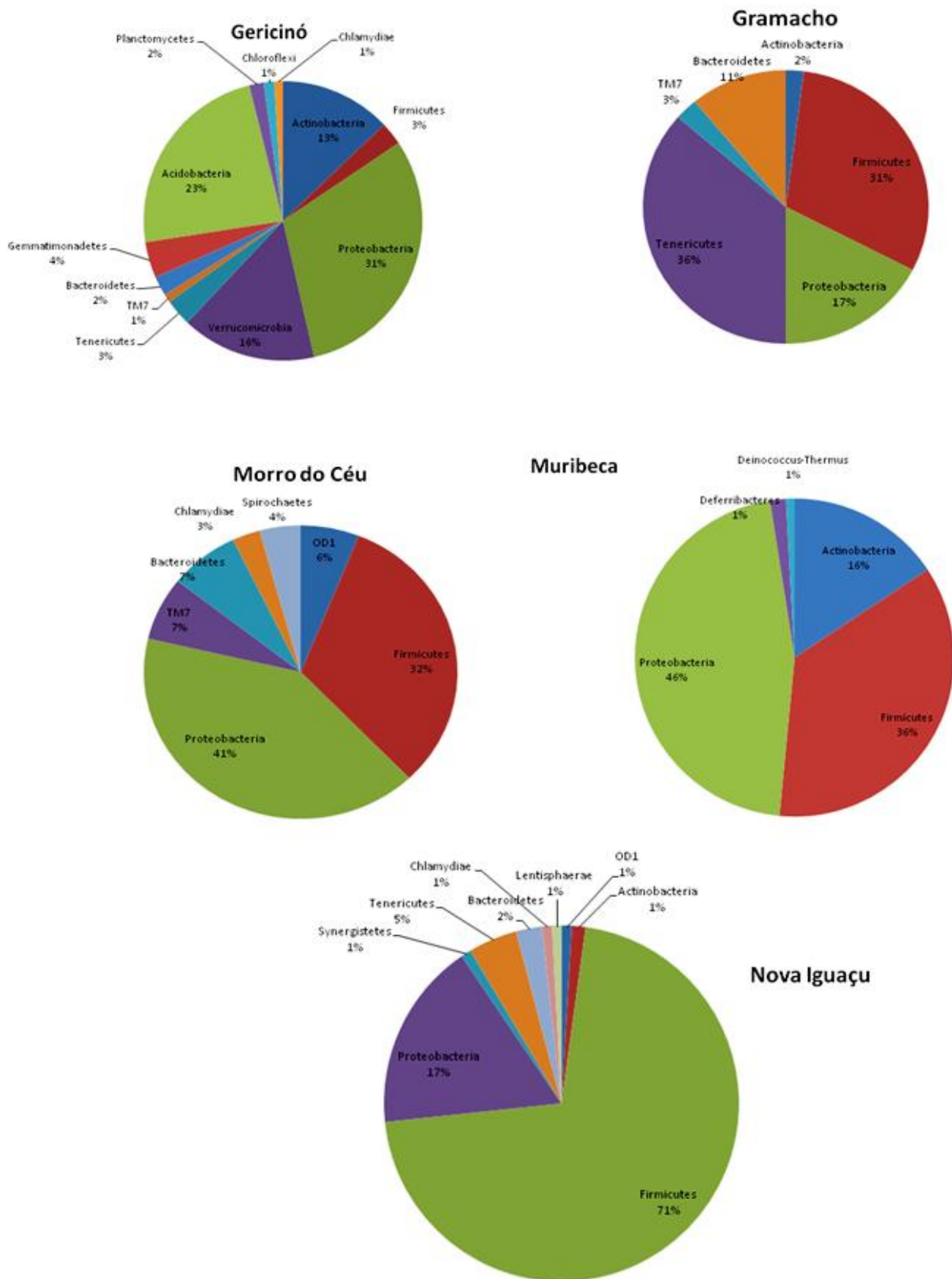
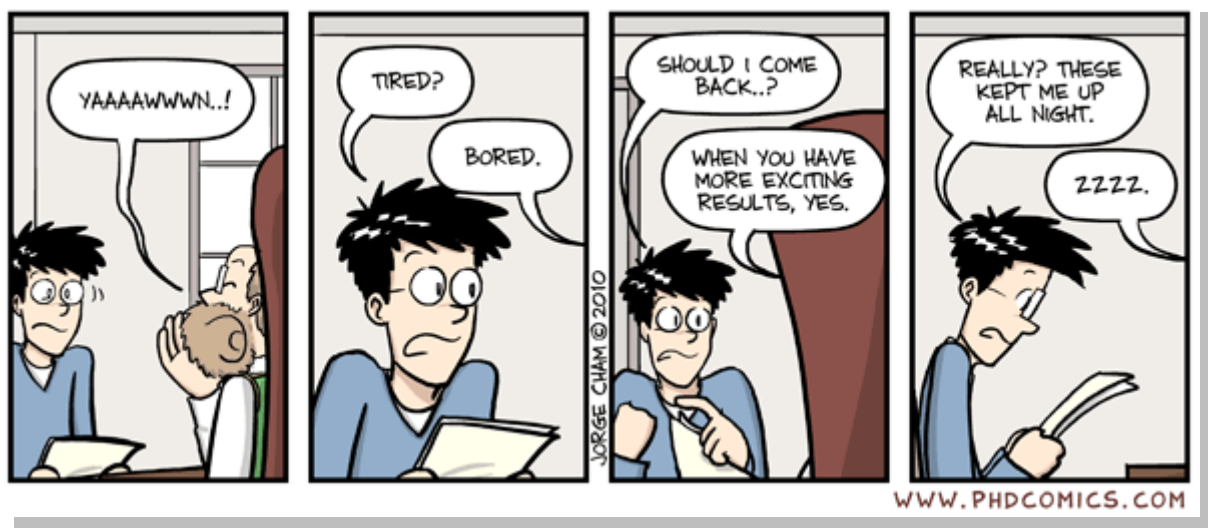


Figura 23. Distribuição relativa dos filos em cada lixiviados obtidas a partir das OTUs exclusivas de cada amostra.

# Discussão

---



## 6. DISCUSSÃO

No intuito de determinar a natureza da composição bacteriana de lixiviados oriundos de cinco tradicionais aterros sanitários, fragmentos do gene 16S rRNA foram analisados através das técnicas moleculares de DGGE e pirosequenciamento.

Inicialmente investigamos o perfil da comunidade bacteriana presente nas amostras através da técnica de DGGE no intuito de avaliar a estrutura dessas comunidades. Realizamos a análise através de dois diferentes coeficientes (Pearson e Jaccard); ao utilizar Jaccard consideramos apenas a ausência e a presença das bandas no gel como fator para diferenciar os perfis eletroforéticos obtidos em cada amostra. Quando Jaccard é aplicado na análise, o programa leva em consideração o exato posicionamento das bandas, dando o mesmo peso a todas as bandas observadas. Ao passo que ao utilizarmos Pearson, a informação das curvas densiométricas dos perfis obtido é também levada em consideração.

O resultado obtido com as duas análises foi complementar; o agrupamento baseado na intensidade das bandas por vezes não revela as diferenças nos padrões observados no DGGE, como foi o caso das amostras de Gramacho e Gericinó que apresentaram um alto valor de similaridade (Figura 10A). Esta baixa resolução é causada pela presença de bandas pequenas e difusas oriundas de fragmentos de DNA com múltiplos domínios de dissociação, isto é, o retardo na mobilidade do fragmento no gel esta relacionado à desnaturação gradual desses curtos domínios localizados próximos. Isso resultará em um retardo gradual desse fragmento gerando assim uma larga banda difusa. Este problema foi abordado por diversos autores (8, 58, 102). No trabalho de Kisand e Wikner (2003) os autores identificaram que quando fragmentos de DNA oriundos de espécies da Classe Flavobactéria (Filo Bacteroidetes), amplificados com iniciadores universais para o gene 16s, eram submetidos ao DGGE, um perfil de bandas largas e difusas era obtido (58).

Por outro lado, perfis semelhantes podem ficar agrupados com valores baixos de similaridade quando apenas a presença ou ausência das bandas é levada em consideração, como observado na figura 9. Este fato indica que nenhuma inferência sobre riqueza (número de bandas) deve ser realizada com a informação obtida com apenas com o DGGE (8, 91). Desta forma, o resultado do DGGE foi considerado como um “screening” inicial, de

onde avaliamos que deveríamos prosseguir com as cinco amostras de lixiviados para análise no pirosequenciamento, uma vez que os DGGEs mostraram similaridade entre as réplicas e diferenças na estrutura da comunidade bacteriana presente nos diferentes lixiviados.

A definição de espécie para bactérias, apesar de sua importância prática na identificação, diagnóstico e uso em diversas pesquisas na avaliação da diversidade bacteriana de um dado ambiente, permanece uma questão difícil de ser abordada (33). Estudos de genômica sugerem uma abordagem onde vários genes constitutivos (“Housekeeping genes”) são analisados (análise multi loci) a fim de classificar e definir os grupos bacterianos ou grupo de espécies (44, 60). Contudo a praticidade dessa abordagem é questionável quando o objetivo é a análise exploratória da heterogeneidade microbiana de um dado ambiente. Desta forma, para fins práticos assume-se que com uma distância evolutiva de 0.03, definem-se espécies, ou melhor, OTUs nas análises realizadas com gene 16S rRNA (111). Neste trabalho, para as análises realizadas com as seqüências obtidas através da técnica do pirosequenciamento, assumiu-se como distância evolutiva 0.03 para determinar as OTUs.

Devido à potencialidade da técnica de pirosequenciamento em se obter um número alto de seqüências do gene 16S rRNA (marcador analisado neste trabalho) observamos que houve uma boa cobertura amostral em todas as amostras analisadas (vide curvas de rarefação na figura 11 e valores de ESC na tabela 9). Observamos que as amostras oriundas do aterro metropolitano de Gramacho apresentaram os menores valores de índice de diversidade Shannon-Weaver e riqueza quando comparadas as demais (Tabela 9). Acreditamos que este resultado possa estar atrelado ao fato do aterro metropolitano de Gramacho ser o mais antigo em operação dentre os aterros analisados (Tabela 7). Como descrito no Manual de Gerenciamento Integrado de Resíduos Sólidos (74), a principal característica do chorume é a variabilidade de sua composição em decorrência do esgotamento progressivo da matéria orgânica biodegradável (74).

Ao consideramos que tanto na PCoA quanto na NMDS os vetores representam as variáveis ambientais significativas ( $p < 0.05$ ) e que seu comprimento indica a intensidade da correlação entre essas variáveis e as distâncias (scores) utilizadas na ordenação das comunidades bacterianas presentes nas amostras de lixiviados, verificamos que os dados

abióticos NTK (Nitrogênio Total) e SDT (Sólidos Dissolvidos Totais) e foram preponderantes na estruturação das comunidades analisadas, principalmente para as amostras de Gramacho (Figura 20).

É sabido que a matéria orgânica nitrogenada pode ser encontrada tanto na forma solúvel (amônia) como na forma insolúvel (sais inorgânicos), dependendo da biodegradabilidade da fração orgânica (59), e que ao final de 10 anos (em média) a matéria orgânica presente nos aterros é caracterizada por um material recalcitrante de difícil degradação (59, 74). Estes dados são importantes, pois indicam a quantidade de matéria orgânica disponível para biodegradação, em outras palavras atividade microbiana.

Os sólidos são representados pelo conjunto de todas as substâncias orgânicas e inorgânicas contidas numa solução sob as formas moleculares, ionizadas ou microgranulares (57). Estes podem ser subdivididos em dissolvidos ou suspensos, segundo características físicas, voláteis ou fixos segundo características químicas. Isto é, sólidos dissolvidos possuem dimensões inferiores a 2,0  $\mu\text{m}$ , e os suspensos caracterizam-se por dimensões superiores 2,0  $\mu\text{m}$ . Do ponto de vista químico, são classificados em voláteis aqueles que se volatilizam a temperaturas inferiores a 550  $^{\circ}\text{C}$ , geralmente associados ao material particulado orgânico. Os sólidos fixos são aqueles que permanecem após a completa evaporação da água, geralmente os sais (57). No lixiviado, as partículas sólidas presentes são constituídas não só por frações de matéria orgânica como por partículas de materiais inertes não dissolvidos e carregados pelo percolado (20, 59). Observa-se que para o lixiviado de Gramacho, os sólidos suspensos voláteis não foram preponderantes na ordenação da comunidade bacteriana presente nesse lixiviado, é provável que a matéria orgânica presente nesse aterro esteja na forma recalcitrante, não sendo mais um elemento crucial na estrutura dessa comunidade.

É importante ressaltar que os ecossistemas encontrados nos aterros são enormes e heterogêneos, o que dificulta a obtenção de uma visão global e ao mesmo tempo detalhada sobre a ecologia microbiana das populações e comunidades presentes nesse ecossistema. Torna-se ainda mais complicada a correlação do perfil dessas comunidades com as variáveis que influenciam esse ecossistema (composição do resíduo, percolação da água, regime de chuvas locais, idade do aterro, etc) quando estas são tomadas pontualmente.

Valores muito superiores de riqueza e diversidade foram obtidos para a amostra I do CTR Gericinó (Tabela 9), dados estes que não foram considerados para fins de comparação entre os outros lixiviados, tendo em vista a diferença no número de seqüências obtidas em cada réplica (Tabela 9). Todos esses indicadores não paramétricos sofrem reflexos do tamanho amostral, pois são derivações dos métodos tradicionais de captura/recaptura utilizados em ecologia (18). É interessante salientar a importância das réplicas nas inferências de diversidade, pois os valores de diversidade e riquezas obtidos para GEI foram corroborados com os gráficos de abundância obtidos para essa amostra. Como descrito por Hughes *et al* (2001) e Magurran (2003), gráficos de abundância com aspecto “long tail” são obtidos com amostras que apresentam muitas espécies raras (espécies com baixa abundância) (51, 69).

Gomez-Alvarez e colaboradores (2009) reportaram um artefato intrínseco à técnica de pirosequenciamento que leva a uma “amplificação artificial” de mais de 15% em algumas das seqüências utilizadas como “template”, acarretando numa super estimativa na abundância dos táxons observados (36). Essa amplificação artificial foi detectada em diferentes dados de metagenômica, onde grupos de seqüências começavam exatamente no mesmo ponto, mas diferiam no comprimento e continham discrepâncias na seqüência nucleotídica. Como no pirosequenciamento empregado neste trabalho utilizamos uma PCR para gene 16S rRNA, todas as seqüências obtidas possuem os mesmos nucleotídeos iniciais provenientes do iniciador utilizado, dificultando assim a detecção desse tipo de artefato.

Dados moleculares sobre a microbiologia de lixiviados oriundos de grandes aterros são escassos, com apenas dois estudos focando em todo domínio Bactéria (48, 49). Uma vez que espécies que desempenham um papel importante nas etapas de degradação dos resíduos, por exemplo espécies celulolíticas, podem ser facilmente isoladas de efluentes de aterros sanitários (90, 98, 128), parece razoável dizer que estes sistemas pouco explorados abrigam uma grande diversidade microbiana que pode ser isolada e manipulada durante os processos de tratamento.

Descrever “quem” está presente em uma determinada comunidade parece ser crucial no entendimento do que essa comunidade é capaz de fazer. Uma vez que os ecossistemas encontrados nos aterros são heterogêneos e que as comunidades microbianas

presentes nesses ecossistemas parecem não estar distribuídas uniformemente nas camadas de resíduos (109), acreditamos que o lixiviado apresenta-se como um concentrador dessa diversidade, constituindo um bom meio para o estudo da diversidade microbiana presente nos aterros. Neste trabalho tivemos acesso a uma visão geral das populações bacterianas presentes nos efluentes dos cinco diferentes aterros sanitários analisados.

A representação do domínio Bactéria nas amostras foi bastante diversificada, com seqüências distribuídas em 24 filos, sendo 12 mais abundantes (Figura 14). A abundância relativa dos filos nas amostras analisadas foi similar aos resultados previamente descritos por Huang e colaboradores em 2004 e 2005, onde os filos mais abundantes foram Firmicutes e Proteobacteria para a maioria das amostras analisadas (48, 49). Membros de alguns outros filos também foram observados por esses autores a uma baixa freqüência, como por exemplo, Bacteroidetes, Actinobacteria e Verrucomicrobia, corroborando os resultados encontrados no nosso trabalho. Entretanto, nossos dados apontam a presença de outros filos além desses descritos pelos autores, como por exemplo, os filos TM7, Deferribacteres, Tenericutes, Synergistetes, Thermotogae, Acidobacteria e Gemmatimonadetes.

As Proteobactérias compreendem uma das maiores divisões dentro do domínio Bactéria e representam a grande maioria das bactérias gram-negativas conhecidas. Estes microrganismos englobam um complexo conjunto de atributos fenotípicos e fisiológicos, que incluem muitos microrganismos fototróficos, quimiotróficos e heterotróficos (41). Desta forma não é surpreendente que dentre os filos mais abundantes observados neste trabalho esteja o filo Proteobacteria.

Dentro do filo Proteobacteria, as classes  $\beta$  e  $\gamma$ -Proteobacteria foram as mais abundantes. Atualmente sabemos que os aterros sanitários são responsáveis por grandes emissões de óxido nitroso ( $N_2O$ ) (7, 56). Além de ser considerado como um dos gases responsáveis pelo efeito estufa, o  $N_2O$  é capaz de reagir com o oxigênio atômico presente na estratosfera, resultando em óxido nítrico (NO) que leva a destruição do ozônio estratosférico. Zhu e colaboradores (2007) demonstraram que, ao analisar as comunidades de bactérias oxidantes de amônia (AOB) e denitrificantes de três lixiviados diferentes as seqüências obtidas pertenciam ao grupo  $\beta$ -Proteobacteria e  $\gamma$ -Proteobacteria

respectivamente (135). As análises foram realizadas através de bibliotecas de clones dos genes *amoA* (subunidade A da amônia monooxigenase) para AOB e *nosZ* (óxido nitroso redutase) para denitrificantes. Tendo em vista que mais de 50% das seqüências não classificadas no filo Proteobacteria encontravam-se na classe  $\gamma$ -Proteobacteria (Figura 16), ressaltamos a importância de estudos mais detalhados de isolamento, caracterização e enumeração das espécies envolvidas nestes processos associadas à lixiviados.

O outro grupo igualmente abundante foi Firmicutes, onde 60% das seqüências pertenciam à classe Clostridia, resultado similar ao descrito por Huang e colaboradores (48, 49). Como a celulose corresponde a 40-50% da composição dos resíduos sólidos urbanos (6), é provável que os microrganismos celulolíticos desempenhem um papel importante na degradação desses resíduos. Embora a celulose seja um substrato importante para degradação nos aterros sanitários, a diversidade microbiana responsável pela degradação anaeróbia desse material é pouco explorada. Através dos métodos clássicos de cultivo, Westlake e colaboradores (1995) identificaram alguns isolados celulolíticos associados à lixiviados que pertenciam ao grupo Clostridia (126). Os mesmos resultados foram alcançados por Van Dyke e McCarthy (2002), que através de uma abordagem molecular, identificaram algumas espécies celulolíticas pertencentes ao grupo Clostridia associadas à lixiviados (122, 128). Ao comparar com os resultados obtidos neste trabalho, é provável que a degradação anaeróbia da celulose em aterros sanitários esteja relacionada a bactérias do grupo Clostridia. Do ponto de vista comercial este resultado é bastante interessante, pois atualmente sabe-se que algumas espécies de *Clostridium* são capazes de gerar etanol a partir da degradação da celulose. Por exemplo, a espécie *C. thermocellum* isolada de fardos de algodão (34) tem recebido grande atenção, pois é capaz de utilizar resíduos lignocelulósicos e produzir etanol (combustível), tornando-se uma forte candidata na produção de biocombustível. Em geral, as espécies deste gênero são termotolerantes, o que reduz o custo de resfriamento do processo (<http://genomicscience.energy.gov/benefits/cellulosicethanol.shtml>). Isto abre uma janela para transformação da biomassa contida nos resíduos nas chamadas energia limpa.

Nossos resultados também apontam para uma abundância menor, mas igualmente distribuída nas amostras da classe Bacilli no filo Firmicutes e do filo Actinobacteria (Figura 17). Pourcher e colaboradores (2001) analisaram o fenótipo de 355 isolados associados a 29



diferentes lixiviados. Os autores observaram uma considerável heterogeneidade de bactérias aeróbicas com capacidade celulolítica, distribuídas na classe Bacilli e Actinobacteria (90). A degradação do resíduo nos aterros envolve a ação mutua e coordenada de vários grupos microbianos, e segue um processo similar ao encontrado em solos e sedimentos. Desta forma, não é surpreendente que espécies presentes na Classe Bacilli e Actinobacteria estejam associadas à degradação da celulose, visto que são comumente descritas como bactérias celulolíticas encontradas em solos e composto (90).

Ao contrário dos resultados obtidos por McDonald e colaboradores (2008), nenhuma das seqüências obtidas foi agrupada no filo Fibrobacteres, que inclui muitas das principais bactérias do rúmen, permitindo a degradação de material celulósico em animais ruminantes (73). Já o filo Bacteroidetes foi detectado nas amostras NG, MC e GR em baixa abundância (Figura 14). Esses dois filios apresentam uma estreita relação filogenética quando analisados os genes 16S rRNA dos representantes destes grupos, além da presença de proteínas que são exclusivas a espécies presentes nestes grupos indicando um possível ancestral comum (40). As espécies representantes destes grupos exibem uma ampla variedade metabólica habilitando-as a colonizar os mais diversos ambientes. Assim como descrito para Fibrobacteres, Bacteroidetes podem usar como fonte de carbono uma série de polímeros, incluindo celulose e lignina, e são encontradas na cavidade oral humana e no trato intestinal de vários mamíferos (83). Como existe uma interseção na atividade metabólica desses dois grupos e seus membros apresentam uma estreita relação, acreditamos que dadas às condições abióticas adversas dos aterros os membros desses grupos sejam encontrados em separado nesse ambiente, já que ocupam o mesmo nicho.

Firmicutes são bactérias gram-positivas, com baixo conteúdo G+C (menos de 50%) e constituem um dos principais filios no domínio Bactéria. Estudos filogenéticos com gene 16S rRNA mostram que o grupo é extremamente heterogêneo, com grandes ramificações nos “cluster”, dados estes corroborados com os estudos a cerca da fisiologia e morfologia de representantes deste grupo (68). Nossos resultados apontam que no filo Firmicutes, 78% das seqüências não classificadas não foram assinadas em nenhuma das classes observadas, indicando que a maioria das espécies deste filo associada aos lixiviados estudados permanece não identificada (Figura 18).

Para as amostras do aterro metropolitano de Gramacho o filo mais abundante juntamente com Firmicutes, não foi Proteobacteria, mas sim o filo Tenericutes (Figura 14). Este filo foi recentemente separado do filo Firmicutes, onde a classe Mollicutes foi elevada ao nível de filo, denominado Tenericutes, dado o baixo suporte do filo por marcadores adicionais ao 16S rRNA e fenótipo único caracterizado pela ausência de uma parede celular rígida. Os membros desta classe que permaneceram no filo firmicutes originaram a classe Erysipelotrichi (68).

Outro filo detectado nas amostras foi o Thermotogae. Os organismos representantes deste grupo são em geral termófilos ou hipertermófilos, com distintas tolerâncias à salinidade e oxigênio. Durante a fase aeróbia de degradação, a temperatura do resíduo pode atingir até 60<sup>0</sup>C, o que reduziria o crescimento de alguns microrganismos, mas favoreceria o crescimento dos membros desse grupo (133).

Sawamura e colaboradores (2010) investigaram a composição química e bacteriana de diferentes camadas de resíduos depositadas ao longo dos 14 anos de operação de um aterro sanitário no Japão. Os autores observaram que membros do grupo  $\gamma$ -Proteobacteria eram encontrados até as camadas mais profundas do resíduo, denotando a alta diversidade metabólica desse grupo. Representantes da classe Clostridia foram detectados apenas nas camadas mais profundas, sugerindo as condições anaeróbias dessas camadas. Também nas camadas mais profundas os autores identificaram membros do grupo Thermotogae, indicando as condições extremas de salinidade e temperatura encontradas nessas camadas (109). Estes dados corroboram os dados obtidos neste trabalho, onde foi possível detectar esses filios nas amostras de lixiviados analisadas.

Alem desses, representantes de outros filios também foram detectados pela primeira vez associados à lixiviados como é o caso Gemmatimonadetes; um filo descrito recentemente (2003), que inclui bactérias aeróbias, gram-negativas que parecem se reproduzir por gemulação (134). Os membros desse filo já foram descritos associados a lodos ativados oriundos de sistema de tratamento de esgotos. Sabemos que os aterros recebem os lodos provenientes dos sistemas de tratamento de esgoto, o que também poderia explicar a detecção desse filo nas amostras analisadas.

Devido à variação entre as comunidades, compreender a diversidade beta é fundamental para estudos de ecologia microbiana, mesmo quando estas são oriundas de ambientes similares. Em contraste com a diversidade alfa (representada pelas curvas de rarefação, estimadores de riqueza e diversidade), que mede quantos tipos de organismos estão em uma única comunidade, medidas de  $\beta$  - diversidade oferecem uma comparação da estrutura da comunidade (66). No trabalho de 2005, Huang e colaboradores levantaram a hipótese de que as comunidades bacterianas presentes em diferentes aterros estariam diferencialmente estruturadas, dados estes obtidos através da análise de biblioteca de clones do gene 16S rRNA (49). Os autores chegaram a essa conclusão ao observar uma distribuição distinta de alguns grupos bacterianos presentes nos lixiviados dos aterros de Gouzikeng e Likeng, ambos localizados na região metropolitana da China.

Desta forma testamos a hipótese de que havia diferença significativa na estrutura microbiana entre as amostras analisadas com base na significância do teste  $P$  descrito por Lozupone e colaboradores (2006) e adaptado por Hamady *et al* em 2010 para análise de grande “data sets” de seqüências, como estes obtidos com o pirosequenciamento (43, 65). Os resultados obtidos com o “Fast Unifrac” corroboram a hipótese levantada por Huang e colaboradores, sugerindo que de fato há uma diferença significativa na estrutura das comunidades analisadas, logo na comunidade bacteriana presente nos aterros estudados. Este resultado sugere que os dados microbiológicos de cada aterro devem ser utilizados como critério para escolha do tratamento biológico mais adequado, visto que há uma diferença significativa nas comunidades bacterianas encontradas nestes locais. Dada a diversidade e heterogeneidade dos aterros, vários são fatores que podem estar relacionados com distribuição dos microrganismos nos resíduos, e conseqüentemente nesses efluentes. Como mencionado anteriormente, a natureza e compactação dos resíduos, temperatura, pH, nível de oxigenação, atividade microbiológica, regime de chuvas local, percolação de águas pluviais, equilíbrio químico e solubilidade, variações hidrogeológicas, idade do aterro, topografia vegetação são variáveis que afetam a composição e a quantidade do lixiviado produzido (59), logo a disposição e composição da microbiota nesses ambientes.

Tendo em mãos a informação de que esses lixiviados apresentavam diferenças na estrutura da comunidade bacteriana, buscamos qual a proporção das espécies compartilhadas entre estes ambientes, e se de fato essas espécies pertenciam aos grupos

descritos como mais abundantes. Os diagramas de Venn (Figura 21) mostraram que apenas 2% das espécies (OTUs) eram compartilhadas entre as diferentes amostras de lixiviado. Ao analisar a distribuição filogenética dessas espécies (OTUs) observamos que 40% pertenciam ao filo Proteobacteria e 35% ao filo Firmicutes; indicando que a alta abundância dessas poucas OTUs seria responsável distribuição desses filios nas amostras (Figura 22). Ao observarmos as espécies ou OTUs não compartilhadas entre as amostras (Figura 23), verificamos que um número grande de OTUs pertence a esses filios, confirmando a abundancia dos mesmos.

A aparente abundância e diversidade desses grupos sugerem que esses organismos podem desempenhar papéis importantes, mas ainda pouco explorado nos os processos de degradação biológica dos resíduos nos aterros. Alguns grupos tiveram uma baixa abundância, sendo representados por raras OTUs, como é o caso dos filios Chloroflexi e Planctomycetes observados apenas no lixiviado do CTR Gericinó, ou Deferribacteres e Deinococcus-Thermus detectados no lixiviado de Muribeca. A importância desses grupos minoritários para o desempenho dessa comunidade é uma questão importante e difícil de ser respondida com apenas esses dados. Neste trabalho observamos que essa comunidade rara ou pouco abundante é única de cada aterro estudado.

A aplicação das novas tecnologias de seqüenciamento no estudo da ecologia microbiana molecular permitiu a detecção de populações bacterianas em baixa abundância nas complexas comunidades bacterianas. Uma propriedade importante dessa população rara é que dada as características de reprodução assexuada dos microrganismos, uma pequena população bacteriana pode se tornar abundante simplesmente pela replicação clonal, uma vez que as condições ambientais favoreçam o crescimento da mesma (87). Isto se torna particularmente interessante quando um determinado grupo da comunidade pode ser estimulado a fim que se obtenha um processo de biorremediação desses efluentes, ou durante o tratamento biológico do mesmo.

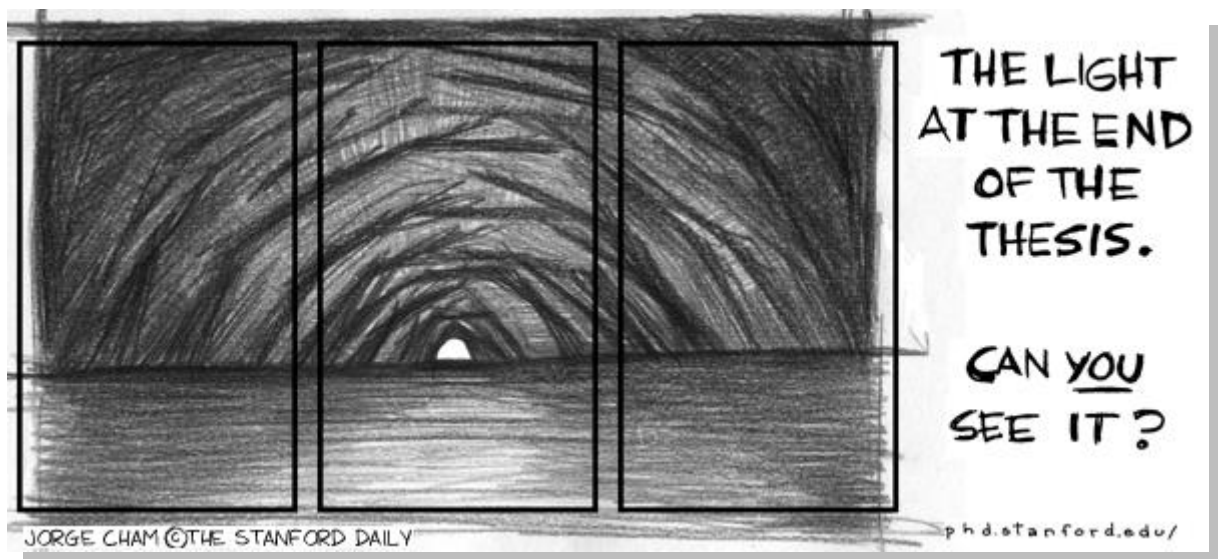
No entanto, essa capacidade de gerar mais seqüências e assim uma descrição mais detalhada da diversidade microbiana introduz novos desafios para estimativa dessa diversidade e riqueza, uma vez que importantes questões sobre a precisão das estimativas de riqueza e assim sua extrapolação para os ambientes analisados têm sido levantadas (95).

Erros durante o sequenciamento acoplados a uma escolha inadequada dos algoritmos utilizados para definir as OTUs tem levado a uma super estimativa da diversidade em alguns ambientes (53, 61).

Devido à falta de dados sobre a microbiologia do lixiviado, a estrutura da comunidade presente nesses “consórcios” microbianos de degradação tem sido tratada como uma “caixa-preta”, dificultando o aperfeiçoamento dos métodos de tratamento biológico desse efluente. Uma boa fração das seqüências permaneceu sem classificação sugerindo que as comunidades bacterianas presente nesses lixiviados são complexas e permanecem inexploradas. O desafio agora é acoplar os muitos dados a respeito da diversidade microbiana, gerados com os métodos como pirosequenciamento, metagenômica, metatranscriptoma, metaproteômica e isolamento, na caracterização das diversas e complexas comunidades microbianas, criando assim uma figura mais completa desses microbiomas. A partir desse maior conhecimento, a aplicação de estratégias mais eficientes de remediação e tratamento de resíduos poderão ser alcançados através da seleção, utilização e/ou estímulo de populações microbianas específicas presentes nos aterros ou nos lixiviados.

# Conclusão

---



## 7. CONCLUSÃO

Esperamos que os resultados obtidos neste trabalho juntamente com estudos mais específicos, venham a contribuir com a compreensão dos processos de degradação dos resíduos nos aterros. Desta forma, enumeramos como contribuições para trabalhos futuros os seguintes resultados:

- Observamos que as populações bacterianas presentes nos lixiviados estudados eram características de cada local amostrado, ou seja, de cada aterro coletado.
- Em termos de Diversidade e Riqueza de espécies, os aterros não apresentaram diferenças significativas na comunidade. Apenas o aterro de Gramacho, o mais antigo em operação dentre os aterros analisados, apresentou os menores índices quando comparados aos demais, corroborando os dados da literatura que indicam que a idade do aterro influencia na qualidade do lixiviado.
- Devido uma boa representação do domínio Bactéria, ilustrada pela identificação de 12 filós (mais abundantes, tendo sido identificados 24 filós no total), acreditamos que o lixiviado apresenta-se como um bom meio para o estudo da diversidade microbiana presente nos aterros.
- Os filós mais abundantes identificados nas amostras analisadas foram Firmicutes e Proteobacteria. A aparente abundância e diversidade desses grupos sugerem que esses organismos podem desempenhar papéis importantes, mas ainda pouco explorado nos processos de degradação biológica dos resíduos nos aterros.
- Em menor abundância observamos os filós: Bacteroidetes, Actinobacteria, Verrucomicrobia, TM7, Deferribacteres, Synergistetes, Thermotogae, Tenericutes, Acidobacteria e Gemmatimonadetes.
- Dentro do filo Proteobacteria, as classes  $\beta$  e  $\gamma$ -Proteobacteria foram as mais abundantes. Para o filo Firmicutes, nossos resultados apontam que 78% das seqüências não classificadas não foram assinadas em nenhuma das classes observadas (Bacilli, Mollicutes e Clostridia, sendo esta última mais abundante),

indicando que a maioria das espécies deste filo, presentes nos lixiviados, permanece não identificada.

- Observamos que apenas 2% das espécies (OTUs) eram compartilhadas entre as diferentes amostras de lixiviado. E que 40% dessas OTUs pertenciam ao filo Proteobacteria e 35% ao filo Firmicutes. Ao passo que OTUs únicas de cada lixiviado demonstraram uma distribuição peculiar de diversos filios nos lixiviados analisados, com grupos exclusivos de alguns aterros.
- Uma boa fração das seqüências permaneceu sem classificação sugerindo que as comunidades bacterianas presente nesses lixiviados são complexas e permanecem inexploradas.



# Bibliografía

---



## 8. BIBLIOGRAFIA

1. ABNT. 1984. **Apresentação de projetos de aterros sanitários de resíduos sólidos urbanos – Procedimento**. Rio de Janeiro.
2. ABNT. 2004. **Resíduos Sólidos: Classificação**. Rio de Janeiro.
3. Ait-Benichou, S., L. B. Jugnia, C. W. Greer & A. R. Cabral. 2009. **Methanotrophs and methanotrophic activity in engineered landfill biocovers**. Waste Manag 29:2509-17.
4. Alexander, M. 1964. **Biochemical Ecology of Soil Microorganisms**. Annu Rev Microbiol 18:217-52.
5. Amann, R. I., W. Ludwig & K. H. Schleifer. 1995. **Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation**. Microbiol Rev 59:143-69.
6. Barlaz, M. A., D. M. Schaefer & R. K. Ham. 1989. **Bacterial population development and chemical characteristics of refuse decomposition in a simulated sanitary landfill**. Appl Environ Microbiol 55:55-65.
7. Barton, P. & J. Atwater. 2002. **Nitrous oxide emissions and the anthropogenic nitrogen in wastewater and solid waste**. Journal Environmental Engineering 128:137–150.
8. Bent, S. J., J. D. Pierson, L. J. Forney, R. Danovaro, G. M. Luna, A. Dell'anno & B. Pietrangeli. 2007. **Measuring species richness based on microbial community fingerprints: the emperor has no clothes**. Appl Environ Microbiol 73:2399-401; author reply 2399-401.
9. Binladen, J., M. T. Gilbert, J. P. Bollback, F. Panitz, C. Bendixen, R. Nielsen & E. Willerslev. 2007. **The use of coded PCR primers enables high-throughput sequencing of multiple homolog amplification products by 454 parallel sequencing**. PLoS One 2:e197.
10. Borba, S. M. P. 2006. **Análise de modelos de geração de gases em aterros sanitários: estudo de caso**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
11. Borglin, S. & J. P. van der Meer. 2010. **Environmental biotechnology**. Curr Opin Biotechnol 21:311-2.
12. Bowers, T. H., N. M. Reid & G. Lloyd-Jones. 2008. **Composition of nifH in a wastewater treatment system reliant on N(2) fixation**. Appl Microbiol Biotechnol 79:811-8.
13. Boyle, W. C. & R. K. Ham. 1974. **Biological Treatability of Landfill Leachate**. Journal Water Pollution Control Federation 46:860-872.
14. Braker, G., J. Zhou, L. Wu, A. H. Devol & J. M. Tiedje. 2000. **Nitrite reductase genes (nirK and nirS) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities**. Appl Environ Microbiol 66:2096-104.

15. Brosius, J., T. J. Dull, D. D. Sleeter & H. F. Noller. 1981. **Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli***. J Mol Biol 148:107-27.
16. Cammarota, M. C. & D. M. Freire. 2006. **A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content**. Bioresour Technol 97:2195-210.
17. Cardenas, E. & J. M. Tiedje. 2008. **New tools for discovering and characterizing microbial diversity**. Curr Opin Biotechnol 19:544-9.
18. Chao, A. 1987. **Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability**. Biometrics 43:783-91.
19. Chian, E. S. K. & F. B. DeWalle. 1976. **Sanitary landfill leachates and their treatment**. Journal of the Environmental Engineering Division 102:411-431.
20. Christensen, T. H., R. Stegmann & R. Cossu. 1992. **Landfilling of Waste: Leachate**. Editora: Taylor & Francis.
21. Curtis, T. P. & W. T. Sloan. 2004. **Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology**. Curr Opin Microbiol 7:221-6.
22. Demain, A. L. & J. L. Adrio. 2008. **Contributions of microorganisms to industrial biology**. Mol Biotechnol 38:41-55.
23. Diez, B., C. Pedros-Alio, T. L. Marsh & R. Massana. 2001. **Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques**. Appl Environ Microbiol 67:2942-51.
24. Engelen, B., K. Meinken, F. von Wintzingerode, H. Heuer, H. P. Malkomes & H. Backhaus. 1998. **Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures**. Appl Environ Microbiol 64:2814-21.
25. Farquhar, G. J. & F. A. Rovers. 1973. **Gas production during refuse decomposition**. Water, Air, & Soil Pollution 2:483-495.
26. Fauth, J. E., J. Bernardo, M. Camara, W. J. R. Jr., J. V. Buskirk & S. A. McCollum. 1996. **Simplifying the Jargon of Community Ecology: A Conceptual Approach**. The American Naturalist 147:282-286.
27. Feinstein, L. M., W. J. Sul & C. B. Blackwood. 2009. **Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil**. Appl Environ Microbiol 75:5428-33.
28. Felske, A. & A. D. L. Akkermans. 1998. **Spatial Homogeneity of Abundant Bacterial 16S rRNA Molecules in Grassland Soils**. Microb Ecol 36:31-6.

29. Fernandez - Viña, M. B. D. 2000. **"Vertedores Controlados de Residuos Sólidos Urbanos: una Perspectiva Internacional"** In: Lins, E.A.M. A utilização da capacidade de campo na estimativa do percolado gerado no aterro da muribeca. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
30. Fischer, S. G. & L. S. Lerman. 1983. **DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory.** Proc Natl Acad Sci U S A 80:1579-83.
31. Fischer, S. G. & L. S. Lerman. 1979. **Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis.** Cell 16:191-200.
32. Foo, K. Y. & B. H. Hameed. 2009. **An overview of landfill leachate treatment via activated carbon adsorption process.** J Hazard Mater 171:54-60.
33. Fox, G. E., J. D. Wisotzkey & P. Jurtshuk, Jr. 1992. **How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity.** Int J Syst Bacteriol 42:166-70.
34. Freier, D., C. P. Mothershed & J. Wiegel. 1988. **Characterization of Clostridium thermocellum JW20.** Appl Environ Microbiol 54:204-211.
35. Gebert, J., N. Stralis-Pavese, M. Alawi & L. Bodrossy. 2008. **Analysis of methanotrophic communities in landfill biofilters using diagnostic microarray.** Environ Microbiol 10:1175-88.
36. Gomez-Alvarez, V., T. K. Teal & T. M. Schmidt. 2009. **Systematic artifacts in metagenomes from complex microbial communities.** Isme J 3:1314-7.
37. Gomez, J. M., M. Verdu & F. Perfectti. 2010. **Ecological interactions are evolutionarily conserved across the entire tree of life.** Nature 465:918-21.
38. Griffiths, B. S., K. Ritz & L. A. Glover. 1996. **Broad-Scale Approaches to the Determination of Soil Microbial Community Structure: Application of the Community DNA Hybridization Technique.** Microb Ecol 31:269-80.
39. Grover, V. I. 2000. **Solid waste management.** Editora: Rotterdam - A.A. Balkema.
40. Gupta, R. S. 2004. **The phylogeny and signature sequences characteristics of Fibrobacteres, Chlorobi, and Bacteroidetes.** Crit Rev Microbiol 30:123-43.
41. Gupta, R. S. 2000. **The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes.** FEMS Microbiol Rev 24:367-402.
42. Gutell, R. R., N. Larsen & C. R. Woese. 1994. **Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective.** Microbiol Rev 58:10-26.

43. Hamady, M., C. Lozupone & R. Knight. 2010. ***Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data.*** *Isme J* 4:17-27.
44. Hanage, W. P., C. Fraser & B. G. Spratt. 2006. ***Sequences, sequence clusters and bacterial species.*** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1917-27.
45. Head, I. M., J. R. Saunders & R. W. Pickup. 1998. ***Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms.*** *Microb Ecol* 35:1-21.
46. Hilgeri, H. & M. Humer. 2003. ***Biotic landfill cover treatments for mitigating methane emissions.*** *Environ Monit Assess* 84:71-84.
47. Horz, H. P., J. H. Rotthauwe, T. Lukow & W. Liesack. 2000. ***Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of amoA PCR products.*** *J Microbiol Methods* 39:197-204.
48. Huang, L. N., H. Zhou, S. Zhu & L. H. Qu. 2004. ***Phylogenetic diversity of bacteria in the leachate of a full-scale recirculating landfill.*** *FEMS Microbiol Ecol* 50:175-83.
49. Huang, L. N., S. Zhu, H. Zhou & L. H. Qu. 2005. ***Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with the leachate of a closed municipal solid waste landfill.*** *FEMS Microbiol Lett* 242:297-303.
50. Hugenholtz, P., B. M. Goebel & N. R. Pace. 1998. ***Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity.*** *J Bacteriol* 180:4765-74.
51. Hughes, J. B., J. J. Hellmann, T. H. Ricketts & B. J. Bohannan. 2001. ***Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity.*** *Appl Environ Microbiol* 67:4399-406.
52. Hunkapiller, T., R. J. Kaiser, B. F. Koop & L. Hood. 1991. ***Large-scale and automated DNA sequence determination.*** *Science* 254:59-67.
53. Huse, S. M., D. M. Welch, H. G. Morrison & M. L. Sogin. 2010. ***Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering.*** *Environ Microbiol* 12:1889-98.
54. IBGE. 2002. Instituto Brasileiro e Geografia e Estatística - ***PESQUISA NACIONAL DE SANEAMENTO BÁSICO.***
55. Janssen, D. B., I. J. Dinkla, G. J. Poelarends & P. Terpstra. 2005. ***Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities.*** *Environ Microbiol* 7:1868-82.
56. Jha, A. K., C. Sharma, N. Singh, R. Ramesh, R. Purvaja & P. K. Gupta. 2008. ***Greenhouse gas emissions from municipal solid waste management in Indian mega-cities: a case study of Chennai landfill sites.*** *Chemosphere* 71:750-8.

57. Jordão, E. P. & C. A. Pessoa. 2005. **Tratamento de Esgotos Domésticos**. Quarta ed, Editora: SEGRAC, Rio de Janeiro.
58. Kisand, V. & J. Wikner. 2003. **Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences**. J Microbiol Methods 54:183-91.
59. Kjeldsen, P., M. A. Barlaz, A. P. Rooker, A. Baun, A. Ledin & T. H. Christensen. 2002. **Present and Long-Term Composition of MSW Landfill Leachate: A Review**. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 32:297-336.
60. Konstantinidis, K. T., A. Ramette & J. M. Tiedje. 2006. **The bacterial species definition in the genomic era**. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 361:1929-40.
61. Kunin, V., A. Engelbrekton, H. Ochman & P. Hugenholtz. 2010. **Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates**. Environ Microbiol 12:118-23.
62. Lacerda, C. M. & K. F. Reardon. 2009. **Environmental proteomics: applications of proteome profiling in environmental microbiology and biotechnology**. Brief Funct Genomic Proteomic 8:75-87.
63. Lema, J. M., R. Mendez & R. Blazquez. 1988. **Characteristics of landfill leachates and alternatives for their treatment: review**. Water, Air, & Soil Pollution 40:223 - 250.
64. Lopez-Garcia, P. & D. Moreira. 2008. **Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology**. Res Microbiol 159:67-73.
65. Lozupone, C., M. Hamady & R. Knight. 2006. **UniFrac--an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context**. BMC Bioinformatics 7:371.
66. Lozupone, C. A. & R. Knight. 2007. **Global patterns in bacterial diversity**. Proc Natl Acad Sci U S A 104:11436-40.
67. Lu, J. C. S., B. Eichenberger & R. J. Stearns. 1985. **Leachate from municipal landfills; production and management**. Editora: Noyes Publications, New Jersey.
68. Ludwig, W., K. H. Schleifer & W. B. Whitman. 2009. **"Revised road map to the phylum Firmicutes"** In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 3 (The Firmicutes).
69. Magurran, A. E. 2003. **Measuring Biological Diversity**. Editora: Wiley-Blackwell.
70. Margulies, M., M. Egholm, W. E. Altman, S. Attiya, J. S. Bader, L. A. Bemben, J. Berka, M. S. Braverman, Y. J. Chen, Z. Chen, S. B. Dewell, L. Du, J. M. Fierro, X. V. Gomes, B. C. Godwin, W. He, S. Helgesen, C. H. Ho, G. P. Irzyk, S. C. Jando, M. L. Alenquer, T. P. Jarvie, K. B. Jirage, J. B. Kim, J. R. Knight, J. R. Lanza, J. H. Leamon, S. M. Lefkowitz, M. Lei, J. Li, K. L. Lohman, H. Lu, V. B. Makhijani, K. E. McDade, M. P. McKenna, E. W. Myers, E.

- Nickerson, J. R. Nobile, R. Plant, B. P. Puc, M. T. Ronan, G. T. Roth, G. J. Sarkis, J. F. Simons, J. W. Simpson, M. Srinivasan, K. R. Tartaro, A. Tomasz, K. A. Vogt, G. A. Volkmer, S. H. Wang, Y. Wang, M. P. Weiner, P. Yu, R. F. Begley & J. M. Rothberg. 2005. **Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors**. Nature 437:376-80.
71. Marttinen, S. K., R. H. Kettunen, K. M. Sormunen, R. M. Soimasuo & J. A. Rintala. 2002. **Screening of physical-chemical methods for removal of organic material, nitrogen and toxicity from low strength landfill leachates**. Chemosphere 46:851-8.
72. McBean, E. A., F. A. Rovers & G. J. Farquhar. 1995. **Solid Waste Landfill Engineering and Design**. Editora: Prentice Hall, Englewood Cliffs.
73. McDonald, J. E., R. J. Lockhart, M. J. Cox, H. E. Allison & A. J. McCarthy. 2008. **Detection of novel Fibrobacter populations in landfill sites and determination of their relative abundance via quantitative PCR**. Environ Microbiol 10:1310-9.
74. Monteiro, J. H. P. 2001. **Manual de Gerenciamento Integrado de resíduos sólidos**. Rio de Janeiro.
75. Muller, M., D. Patureau, J. J. Godon, J. P. Delgenes & G. Hernandez-Raquet. 2010. **Molecular and kinetic characterization of mixed cultures degrading natural and synthetic estrogens**. Appl Microbiol Biotechnol 85:691-701.
76. Muyzer, G., E. C. de Waal & A. G. Uitterlinden. 1993. **Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA**. Appl Environ Microbiol 59:695-700.
77. Muyzer, G. & K. Smalla. 1998. **Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology**. Antonie Van Leeuwenhoek 73:127-41.
78. Myers, R. M., S. G. Fischer, L. S. Lerman & T. Maniatis. 1985. **Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis**. Nucleic Acids Res 13:3131-45.
79. Nawrocki, E. P. & S. R. Eddy. 2007. **Query-dependent banding (QDB) for faster RNA similarity searches**. PLoS Comput Biol 3:e56.
80. Nubel, U., B. Engelen, A. Felske, J. Snaidr, A. Wieshuber, R. I. Amann, W. Ludwig & H. Backhaus. 1996. **Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in Paenibacillus polymyxa detected by temperature gradient gel electrophoresis**. J Bacteriol 178:5636-43.
81. Nyren, P., B. Pettersson & M. Uhlen. 1993. **Solid phase DNA minisequencing by an enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay**. Anal Biochem 208:171-5.

82. Ogata, M. G. 1983. ***Os resíduos sólidos na organização do espaço e na qualidade do ambiente urbano., vol. IBGE, Superintendência de Recursos Naturais e Meio Ambiente.*** Rio de Janeiro.
83. Ohkuma, M., S. Noda, Y. Hongoh, and T. Kudo. 2002. ***Diverse bacteria related to the bacteroides subgroup of the CFB phylum within the gut symbiotic communities of various termites.*** Biosci Biotechnol Biochem 66:78-84.
84. Olsen, G. J., D. J. Lane, S. J. Giovannoni, N. R. Pace & D. A. Stahl. 1986. ***Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach.*** Annu Rev Microbiol 40:337-65.
85. Pace, N. R. 1997. ***A molecular view of microbial diversity and the biosphere.*** Science 276:734-40.
86. Pace, N. R., D. A. Stahl, D. J. Lane & G. J. Olsen. 1986. ***The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences.*** Adv Microb Ecol 9:1 - 55.
87. Pedros-Alio, C. 2007. ***Ecology:Dipping into the rare biosphere.*** Science 315:192-3.
88. Peixoto, R. S., H. L. da Costa Coutinho, N. G. Rumjanek, A. Macrae & A. S. Rosado. 2002. ***Use of rpoB and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE.*** Lett Appl Microbiol 35:316-20.
89. Philippi, A. 2005. ***Saneamento, Saúde e Meio Ambiente.*** Editora: Manole LTDA, Barueri, SP.
90. Pourcher, A., L. Sutra, I. I. Hebe, G. Moguedet, C. Bollet, P. Simoneau & L. Gardan. 2001. ***Enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from refuse of a landfill.*** FEMS Microbiol Ecol 34:229-241.
91. Prosser, J. I. 2010. ***Replicate or lie.*** Environ Microbiol.
92. Purificação, R. C. 2009. ***Utilização de biocamada metanotrófica como alternativa para redução de emissões de metano por aterros sanitários.*** Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
93. Purkhold, U., A. Pommerening-Roser, S. Juretschko, M. C. Schmid, H. P. Koops & M. Wagner. 2000. ***Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys.*** Appl Environ Microbiol 66:5368-82.
94. Rademaker, J. L. W., F. J. Louws, U. Rossbach, P. Vinuesa & F. J. De Bruijn. 1999. ***Computer-assisted pattern analysis of molecular fingerprints and database construction.*** Editora: Dordrecht - Kluwer Academic Publisher.
95. Reeder, J. & R. Knight. 2009. ***The "rare biosphere": a reality check.*** Nat Methods 6:636-7.
96. Renou, S., J. G. Givaudan, S. Poulain, F. Dirassouyan & P. Moulin. 2008. ***Landfill leachate treatment: Review and opportunity.*** J Hazard Mater 150:468-93.



97. Renouf, V., O. Claisse, C. Miot-Sertier & A. Lonvaud-Funel. 2006. ***Lactic acid bacteria evolution during winemaking: use of rpoB gene as a target for PCR-DGGE analysis.*** Food Microbiol 23:136-45.
98. Riley, R. D., R. G. Benedict, R. W. Seabloom & D. A. Carlson. 1977. ***Chemical and microbiological studies on leachates from a waste tip.*** J Appl Bacteriol 42:285-8.
99. Rittmann, B. E. 2006. ***Microbial ecology to manage processes in environmental biotechnology.*** Trends Biotechnol 24:261-6.
100. Roesch, L. F., R. R. Fulthorpe, A. Riva, G. Casella, A. K. Hadwin, A. D. Kent, S. H. Daroub, F. A. Camargo, W. G. Farmerie & E. W. Triplett. 2007. ***Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity.*** ISME J 11:283-90.
101. Rogers, Y. H. & J. C. Venter. 2005. ***Genomics: massively parallel sequencing.*** Nature 437:326-7.
102. Roling, W. F., B. M. van Breukelen, M. Braster, M. T. Goeltom, J. Groen & H. W. van Verseveld. 2000. ***Analysis of Microbial Communities in a Landfill Leachate Polluted Aquifer using a New Method for Anaerobic Physiological Profiling and 16S rDNA Based Fingerprinting.*** Microb Ecol 40:177-188.
103. Ronaghi, M., S. Karamohamed, B. Pettersson, M. Uhlen & P. Nyren. 1996. ***Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release.*** Anal Biochem 242:84-9.
104. Rothberg, J. M. & J. H. Leamon. 2008. ***The development and impact of 454 sequencing.*** Nat Biotechnol 26:1117-24.
105. Sagan, C. 2008. ***Bilhões e Bilhões - Reflexões Sobre Vida e Morte na Virada do Milênio.*** Editora: Companhia das letras.
106. Sang, N., G. Li & X. Xin. 2006. ***Municipal landfill leachate induces cytogenetic damage in root tips of Hordeum vulgare.*** Ecotoxicol Environ Saf 63:469-73.
107. Sanger, F. & A. R. Coulson. 1975. ***A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase.*** J Mol Biol 94:441-8.
108. Sanz, J. L. & T. Köchling. 2007. ***Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview.*** Process Biochemistry 42:119 - 133.
109. Sawamura, H., M. Yamada, K. Endo, S. Soda, T. Ishigaki & M. Ike. 2010. ***Characterization of microorganisms at different landfill depths using carbon-utilization patterns and 16S rRNA gene based T-RFLP.*** J Biosci Bioeng 109:130-7.

110. Schimidt, L. T., P. F. Dias, S. M. Souto, R. O. P. Rossiello, A. D. M. Zanine, G. D. L. M. Junior & B. M. Pereira. 2003. Efeitos de doses de N de chorume e épocas de coleta no desenvolvimento do capim Tanzânia Revista Ciência Agronômica 34:5 - 10.
111. Schloss, P. D. & J. Handelsman. 2005. **Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness.** Appl Environ Microbiol 71:1501-6.
112. Schloss, P. D. & J. Handelsman. 2004. **Status of the microbial census.** Microbiol Mol Biol Rev 68:686-91.
113. Schloss, P. D., S. L. Westcott, T. Ryabin, J. R. Hall, M. Hartmann, E. B. Hollister, R. A. Lesniewski, B. B. Oakley, D. H. Parks, C. J. Robinson, J. W. Sahl, B. Stres, G. G. Thallinger, D. J. Van Horn & C. F. Weber. 2009. **Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities.** Appl Environ Microbiol 75:7537-41.
114. Sheffield, V. C., D. R. Cox, L. S. Lerman & R. M. Myers. 1989. **Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes.** Proc Natl Acad Sci U S A 86:232-6.
115. Shendure, J. & H. Ji. 2008. **Next-generation DNA sequencing.** Nat Biotechnol 26:1135-45.
116. Shendure, J., G. J. Porreca, N. B. Reppas, X. Lin, J. P. McCutcheon, A. M. Rosenbaum, M. D. Wang, K. Zhang, R. D. Mitra & G. M. Church. 2005. **Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome.** Science 309:1728-32.
117. Silva, A. C., M. Dezotti & G. L. Sant'Anna, Jr. 2004. **Treatment and detoxification of a sanitary landfill leachate.** Chemosphere 55:207-14.
118. Singh, J., A. Behal, N. Singla, A. Joshi, N. Birbian, S. Singh, V. Bali & N. Batra. 2009. **Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances.** Biotechnol J 4:480-94.
119. Sisinno, C. L. S. & J. C. Moreira. 1996. **Avaliação da Contaminação e Poluição Ambiental na Área de Influência do Aterro Controlado do Morro do Céu, Niterói, Brasil.** Cadernos de Saúde Pública 12:515-523.
120. Staley, J. T. 1984. **Biogeochemistry: microbial geochemistry.** Science 225:1141-2.
121. Theron, J. & T. E. Cloete. 2000. **Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments.** Crit Rev Microbiol 26:37-57.
122. Van Dyke, M. I. & A. J. McCarthy. 2002. **Molecular biological detection and characterization of Clostridium populations in municipal landfill sites.** Appl Environ Microbiol 68:2049-53.
123. Veríssimo, L. F. 2002. **Todas as Histórias do Analista de Bagé.** Editora: Objetiva.

124. Verstraete, W. 2007. **Microbial ecology and environmental biotechnology**. Isme J 1:4-8.
125. Wang, Q., G. M. Garrity, J. M. Tiedje & J. R. Cole. 2007. **Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy**. Appl Environ Microbiol 73:5261-7.
126. Ward, M. L., G. Bitton & T. Townsend. 2005. **Heavy metal binding capacity (HMBC) of municipal solid waste landfill leachates**. Chemosphere 60:206-15.
127. Ware, S. 1980. **A Survey of Pathogen Survival during Municipal Solid Waste and Manure Treatment Processes**. Environmental Protection Agency Report EPA-600/8-80-034:115.
128. Westlake, K., D. B. Archer & D. R. Boone. 1995. **Diversity of cellulolytic bacteria in landfill**. Journal of Applied Bacteriology 79:73-78.
129. White, J., J. Robinson & Q. Ren. 2004. **Modelling the biochemical degradation of solid waste in landfills**. Waste Manag 24:227-40.
130. Whitman, W. B., D. C. Coleman & W. J. Wiebe. 1998. **Prokaryotes: the unseen majority**. Proc Natl Acad Sci U S A 95:6578-83.
131. Woese, C. R. & G. E. Fox. 1977. **Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms**. Proc Natl Acad Sci U S A 74:5088-90.
132. Xu, J. 2006. **Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances**. Mol Ecol 15:1713-31.
133. Yesiller, N., J. L. Hanson & W.-L. Liu. 2005. **Heat Generation in Municipal Solid Waste Landfills**. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering 131:1330-1344.
134. Zhang, H., Y. Sekiguchi, S. Hanada, P. Hugenholtz, H. Kim, Y. Kamagata & K. Nakamura. 2003. **Gemmatimonas aurantiaca gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov.** Int J Syst Evol Microbiol 53:1155-63.
135. Zhu, S., G. Y. Chan, K. L. Cai, L. H. Qu & L. N. Huang. 2007. **Leachates from municipal solid waste disposal sites harbor similar, novel nitrogen-cycling bacterial communities**. FEMS Microbiol Lett 267:236-42.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)