

Uso de Ferramentas Moleculares para Estudos de Comunidades Microbianas em Lixiviado de Aterro de Resíduos Sólidos Urbanos

Molecular Tools for Studying Microbial Communities in Urban Solid Waste Landfill Leachate

RESUMO

O lixiviado de aterro de resíduos sólidos pode ser entendido como o resultado das águas que infiltram e da degradação da fração orgânica dos resíduos sólidos, e tem sido identificado na literatura como fonte potencial de poluição das águas superficiais e subterrâneas. Conhecer a diversidade microbiana do lixiviado de aterro é um importante fator na avaliação do processo de degradação de resíduos. Ferramentas moleculares têm sido amplamente aplicadas na análise do perfil microbiano em diversos ambientes. O presente trabalho tem por objetivo apresentar uma revisão do uso de técnicas moleculares na avaliação das comunidades bacterianas em lixiviado de aterro de resíduos sólidos urbanos.

PALAVRAS-CHAVE: Aterro; Resíduos sólidos; Lixiviado; Comunidades bacterianas

ABSTRACT

Solid waste landfill leachate is the result of excessive rainwater percolating through the waste layers and the product from organic matter degradation processes and it is nowadays considered a potential source of groundwater and surface water pollution. The knowledge of the microbial diversity of landfill leachates is an important factor when it comes to evaluating the waste degradation process. Molecular techniques have been widely used in analyzing the microbial profile in diverse environments. This work presents a review of the molecular techniques to evaluate bacterial communities of solid waste landfill leachates.

KEYWORDS: Landfill; Solid waste; Leachate; Bacterial communities

Bianca Ramalho Quintaes
D.Sc. em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos/ EQ/ UFRJ. Biomédica - UNIRIO. Rio de Janeiro, RJ, Brasil
biaquintaes@yahoo.com.br

Juacyara Carbonelli Campos
D.Sc. em Engenharia Química - PEQ/COPPE/UFRJ. Professora Adjunta do Departamento de Processos Inorgânicos da Escola de Química - UFRJ Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Marco Antônio Lemos Miguel
D.Sc. em Ciências de Alimentos pela UFRJ. Chefe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Professor Adjunto do Instituto de Microbiologia da UFRJ. Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Analy M. de Oliveira Leite
D.Sc. em Ciências de Alimentos - UFRJ. Médica Veterinária UFRJ. Professora Assistente do Instituto de Microbiologia da UFRJ Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Marco A. Giovannini Hinojosa
Biólogo do Laboratório de Microbiologia do Dpto de Pesquisas Aplicadas da Companhia Municipal de Limpeza Urbana do Município do Rio de Janeiro - COMLURB Rio de Janeiro, RJ, Brasil

INTRODUÇÃO

As mudanças ambientais resultantes da atividade humana, como é o caso das áreas de disposição de resíduos sólidos, afetam de maneira significativa os sistemas ecológicos no ambiente, incluindo as comunidades bacterianas. Apesar das pesquisas envolvendo essas comunidades, há pouca informação para o entendimento dos processos biológicos que se sucedem em um aterro de disposição de resíduos sólidos (UCHIDA *et al.*, 2009). Os grupos microbianos adaptados ao novo ambiente aumentam, enquanto que aqueles não adaptados às condições ambientais diminuem. A ampla variedade de microrganismos existentes permite uma rápida adaptação da comunidade microbiana ao novo ambiente.

Métodos tradicionais de rastreamento, através de meios de cultura seletivos, não conseguem reproduzir as condições que um microrganismo requer para a proliferação no seu habitat natural. No entanto, o advento das técnicas de biologia molecular trouxe novas oportunidades para a análise de estruturas e composição de espécies de populações microbianas complexas. Algumas metodologias que têm sido aplicadas permitem estabelecer relações filogenéticas entre os microrganismos, determinar a diversidade genética de comunidades microbianas e identificar diversos microrganismos não cultiváveis (MUYZER e SMALLA, 1998).

A diversidade microbiana é um importante fator na avaliação do processo de decomposição de resíduos. Assim, essa tarefa é um dos principais passos em direção ao entendimento das propriedades metabólicas espécie-específica, responsáveis pela decomposição dos resíduos (KLAMMER *et al.*, 2008). As populações iniciais do resíduo disposto em aterro apresentam notável papel na

seleção de espécies dominantes presentes, tanto durante o estágio inicial de decomposição, quanto no resíduo decomposto. Um entendimento mais profundo da dinâmica dessa população microbiana fornecerá subsídios para compreender também a sua persistência e o poder de recuperação, na medida em que há mudanças nas condições ambientais e na qualidade do substrato ao longo do tempo (STALEY *et al.*, 2007). A investigação dos processos de decomposição orgânica é indispensável para uma avaliação precisa dos riscos ambientais e da estabilidade dos aterros de resíduos.

Diante das perspectivas tecnológicas disponíveis para o tratamento de lixo de aterro de resíduos sólidos urbanos, reconhece-se a necessidade de um estudo que acompanhe o desenvolvimento e a sucessão das comunidades microbianas, particularmente as populações bacterianas, presentes neste material, sua dinâmica ao longo do processo de decomposição, bem como as suas características fenotípicas e genotípicas.

O presente trabalho tem por objetivo apresentar uma revisão do uso de técnicas moleculares na avaliação das comunidades bacterianas em lixo de aterro de resíduos sólidos urbanos.

Aterro Sanitário como destinação final de resíduos sólidos urbanos

A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 8419, abril de 1992, conceitua aterro sanitário como uma técnica de disposição de resíduos sólidos urbanos no solo, sem causar danos ou riscos à saúde pública e à segurança, minimizando os impactos ambientais, fazendo uso dos 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.

Segundo a mais recente Pesquisa Nacional de Saneamento Básico do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), realizada em 2008 (IBGE, 2010), dos 5.562 municípios brasileiros que apresentam serviço de manejo de resíduos sólidos, 50,5% (2.810) utilizam os vazadouros a céu aberto (lixões) como unidade de destino dos resíduos sólidos domiciliares e/ou públicos; 0,2% (14) utilizam vazadouros em áreas alagadas ou alagáveis; 22,5% (1.254) utilizam os aterros controlados; 27,7% (1.540) utilizam os aterros sanitários; 3,8% (211) utilizam as usinas de compostagem de resíduos orgânicos; 11,6% (643) utilizam as unidades de triagem de resíduos recicláveis; 0,6% (34) utilizam as unidades de tratamento por incineração e 2,4% (134) utilizam outra forma de destinação. Observa-se que alguns municípios apresentam mais de um tipo de unidade de destinação de resíduos sólidos.

Apesar do elevado percentual de municípios que possui vazadouros a céu aberto, no Brasil e em diversos países, os aterros representam a principal destinação dos resíduos sólidos urbanos (MONTEIRO *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2011; SANG *et al.*, 2012, ZHAO *et al.*, 2013; OTHMAN *et al.*, 2013). Em 2010, os Estados Unidos geraram 249,9 milhões de toneladas de RSU, sendo que cerca de 135,5 milhões de toneladas destes foram dispostos em aterros (ZHAO *et al.*, 2013). No entanto, para Rich e outros (2008), a disposição em aterro, do modo como é praticada atualmente, é fundamentalmente insustentável já que os custos financeiros baixos não contabilizam os potenciais custos ambientais para uma gestão a longo prazo. A disposição de resíduos sólidos domiciliares em aterro é a principal

causa de risco para a saúde pública e de impacto ambiental, através da transmissão de doenças, da emissão de gases de efeito estufa, da poluição do solo e da contaminação das águas superficiais e subterrâneas (SENG *et al.*, 2013.). Outros efeitos negativos do aterro incluem a própria rotina, afetando as famílias que residem nos arredores, através de perturbações, como ruído, poluição visual, maus odores e presença de vetores, e o tráfego de veículos pesados, causando poluição do ar e impactos físicos e estruturais (HAM *et al.*, 2013). As alternativas propostas em substituição aos aterros sanitários vêm sendo estudadas e discutidas há muitos anos, mas até hoje não se encontrou opção que apresentasse melhor relação custo/benefício (MANFREDI *et al.*, 2010; SAWAMURA *et al.*, 2007; MANFREDI *et al.*, 2011; SANG *et al.*, 2012).

Degradação de resíduos sólidos nos aterros

As características construtivas dos aterros permitem minimizar os efeitos das duas principais fontes de poluição oriundas dos resíduos sólidos: o gás e o lixiviado (SOUTO, 2009).

O gás gerado no aterro é a mistura entre o biogás obtido com a decomposição anaeróbia dos resíduos sólidos e compostos voláteis liberados pelos mesmos. A grande diversidade microbiana que participa da cadeia alimentar nos resíduos gradualmente degrada as moléculas complexas a uma mistura de CH₄ e CO₂ sob condições ambientais favoráveis (WIRTH *et al.*, 2012). Esse gás pode ser drenado através de tubulações adequadas e encaminhado para queima ou eventual aproveitamento energético (SOUTO, 2009). A recuperação de energia a partir da fração orgânica dos resíduos sólidos tem um grande potencial de redução das emissões de gases do efeito estufa (KIM *et al.*, 2013).

Kjeldsen e outros (2002) dividem os processos de biodegradação em duas fases: aeróbia e anaeróbia. Assim que o resíduo é enterrado, um período de aclimação é observado, correspondendo 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. 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 aeróbia (SENIOR, 1995). Uma fase de transição se instala quando o oxigênio se esgota e o resíduo torna-se anóxico, com mudança de receptores de elétrons, como o oxigênio, para os nitratos e sulfatos (MATA-ALVAREZ, 2002).

A fase anaeróbia é subdividida em quatro estágios: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (POHLAND E HARPER, 1985). Rich e outros (2008) acrescentam uma quinta etapa, a estabilização biológica. 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. Nesse sentido, é possível encontrar as quatro fases ocorrendo simultaneamente em um único aterro (KJELDEN E CHRISTENSEN, 2001).

A fase de hidrólise é o início do processo de decomposição anaeróbia. 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, presente nos resíduos pela umidade inicial e pelas águas que infiltram ou são recirculadas (CUSSIOL, 2005), 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 (KJELDEN *et al.*, 2002).

A hidrólise 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 (MATA-ALVAREZ, 2002). Durante essa fase, que pode durar alguns anos, são produzidas quantidades consideráveis de compostos orgânicos simples e de alta solubilidade, principalmente ácidos graxos voláteis (MONTEIRO *et al.*, 2006).

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 de espécies metanogênicas (MATA-ALVAREZ, 2002). Frequentemente, uma redução do pH é observada, sendo acompanhada pela solubilização dos metais, tornando o lixiviado, nessa fase, quimicamente tóxico (VERGARA E TCHOBANOGLIOUS, 2012). Os subprodutos da etapa anterior agora são consumidos por um consórcio de arqueas metanogênicas, e convertidos a gás metano e dióxido de carbono (MATA-ALVAREZ, 2002). 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, alguns tipos de ligninas, por exemplo (AMARAL, 2007), resultante da biodegradação de componentes vegetais, e ácidos húmicos e fúlvicos, de coloração marrom escuro a preto (SANG *et al.*, 2012). Algumas bactérias do gênero *Pseudomonas* e actinobactérias termofílicas do gênero *Streptomyces* e *Nocardia* são as mais importantes na degradação da lignina (TUOMELA *et al.*, 2000). Sulfeto é formado a partir da decomposição anaeróbia de aminoácidos sulfurados. Apesar de os sulfetos serem parcialmente liberados como biogás (H₂S), a maior parte permanece dissolvido como sulfeto de hidrogênio (SANG *et al.*, 2012).

A degradação anaeróbia da fração orgânica requer a ação de uma população bacteriana variada, consistindo de muitos grupos de estirpes facultativas e estritas (MATA-ALVAREZ, 2002). A diversidade microbiana é um importante fator no processo de decomposição de resíduos e a avaliação dessa diversidade é um dos principais passos em direção ao entendimento das propriedades metabólicas espécie-específica responsáveis pela decomposição dos resíduos.

Geração de lixiviado a partir da degradação microbiológica nos aterros

O lixiviado é o resultado da mistura da água da chuva que infiltra e percola através dos resíduos, com os produtos da degradação biológica da massa orgânica do resíduo (KJELDSEN *et al.*, 2002; Boumechhour *et al.*,

2013). A formação de lixiviado representa risco ambiental e tem sido identificado na literatura como fonte de poluição das águas superficiais e subterrâneas (Zhao *et al.*, 2013), apresentando elevadas concentrações de matéria orgânica, ácidos, sais e microrganismos (Vilar *et al.*, 2013) e com um potencial de contaminação bem maior do que o de muitos despejos industriais (SILVA *et al.*, 2007).

A fração orgânica dos resíduos é um substrato complexo e requer uma via metabólica que transforme estes compostos em subprodutos menos complexos antes da conversão final em metano (MONTEIRO *et al.*, 2006). Senior (1995) ressalta que quando os resíduos sólidos municipais entram num aterro eles têm um grande conteúdo de sólidos e matéria orgânica solúvel suspensos. Dentre os principais componentes da matéria orgânica biodegradável estão os carboidratos, as proteínas e os lipídios. Após o resíduo ser enterrado, uma série de eventos químicos e biológicos dá início ao processo de transferência de massa do resíduo para a água percolante, de onde o lixiviado se origina. A quantidade e a composição do lixiviado gerado variam ao longo das fases e refletem qual processo microbiológico está acontecendo no aterro (MATA-ALVAREZ, 2002). Esses dados são importantes, pois indicam a quantidade de matéria orgânica disponível para a biodegradação (SANTOS, 2010).

Interação microrganismos e lixiviado de aterro

Os resíduos sólidos domiciliares apresentam composição microbiana variada, sendo possível a ocorrência de vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos (vermes), entre outros (UMAR *et al.*, 2011). Esses microrganismos se originam de seres humanos, dos animais, dos vegetais e do solo (AVERY *et al.*,

2012). Também são vias de entrada na massa de resíduos os papéis higiênicos, lenços de papel, fraldas descartáveis, absorventes, preservativos, carcaças e vísceras de animais, alimento deteriorado e outros materiais em decomposição, bem como curativos e resíduos de saúde provenientes de doentes em residências e de fezes *in natura*, humanas e de animais (especialmente cães e gatos) (CUSSIOL, 2005).

O lixiviado de aterro apresenta condições propícias ao desenvolvimento de microrganismos patogênicos (SOUZA, 2003). Bactérias de interesse médico, como as enterobactérias e *Staphylococcus aureus*, já foram detectadas no lixiviado produzido a partir de RSS dispostos em aterro sanitário, reforçando o papel destes resíduos como reservatórios de patógenos microbianos, bem como, de linhagens resistentes aos antimicrobianos (NASCIMENTO *et al.*, 2009).

A relação entre os microrganismos patogênicos e o lixiviado de aterro pode ser interpretada como o ambiente oferecendo as condições propícias para a transferência de genes entre os grupos bacterianos. A exposição do ambiente ao lixiviado pode ocorrer de diferentes formas: através do excesso de chuvas, do transbordamento descontrolado das lagoas de equalização, de infiltrações ou por falhas no tratamento do lixiviado lançado nos corpos d'água. O impacto do lixiviado de aterro sobre a microflora e microfauna é determinado por fatores como elevadas concentrações de matéria orgânica, e de nitrogênio amoniacal, além de outros contaminantes transportados pela massa de resíduos (LIU *et al.*, 2011). Nesse sentido, o aterro sanitário se mostra como um sistema heterogêneo complexo quanto às características físicas, químicas e biológicas onde

diferentes microrganismos coexistem e interagem (SZYŁAK-SZYDŁOWSKI e KORNIŁOWICZ-KOWALSKA, 2011).

Quando os resíduos oriundos de unidades hospitalares são descartados juntamente com os resíduos comuns em aterros, as bactérias entéricas, como *E. coli*, originada de resíduos contaminados por fezes, podem estar expostas a diferentes tipos de medicamentos, incluindo antimicrobianos. É possível que microrganismos possam trocar propriedades de resistência aos antimicrobianos durante longos períodos de incubação dentro do aterro (THREDEACH *et al.*, 2012). Esses genes de resistência aos antimicrobianos podem ser transferidos por conjugação, transformação e transdução para bactérias ambientais ou patogênicas adaptadas ao ambiente, através do mecanismo de transferência horizontal de genes (ZHANG *et al.*, 2011). A detecção de estirpes multirresistentes em esgoto doméstico e em lixo de aterro pode demonstrar que estes ambientes são altamente favoráveis à proliferação e à transferência de genes, consistindo de uma mistura de microrganismos, nutrientes e substâncias químicas (CHAGAS *et al.*, 2011).

Microbiota do lixo de aterro

O grau de conhecimento sobre a composição de microrganismos em lixo de aterro é limitado (GRISEY *et al.*, 2010) em comparação às características físicas e químicas deste poluente (BOUMECHHOUR *et al.*, 2013). A quantificação de microrganismos aeróbios e a identificação dos grupos de microrganismos celulolíticos, proteolíticos e amilolíticos através de meios de cultura foi estabelecida por Monteiro e outros (2006) com o objetivo de correlacionar as diferentes fases de degradação dos

resíduos sólidos urbanos. Alguns trabalhos têm focado na detecção de grupos de bactérias patogênicas isolados em amostras de lixo de aterro, como é caso dos estudos de Efuntoye e outros (2011) demonstrando a capacidade de proliferação e os fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* e de *Clostridium perfringens* isolados de amostras de lixo de aterro. Grisey e outros (2010) utilizaram análises bacterianas para identificar a origem de bactérias patogênicas no lixo de aterro e em águas subterrâneas e fazer correlações com a variabilidade sazonal. Umar e outros (2011) estabeleceram uma metodologia de inativação bacteriana do lixo de aterro através da cloração utilizando a quantificação de bactérias patogênicas indicadoras, como os coliformes totais e a *E. coli*.

As análises bacterianas do lixo de aterro revelam um grande número de bactérias patogênicas e oportunistas. Muitas espécies pertencentes ao gênero *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Proteus*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* têm sido reportadas por diversos autores (ADEYEMI *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2009; EFUNTOYE *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011). Coliformes totais, *E. coli*, enterococos, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Staphylococcus aureus* são capazes de se desenvolver em lixo de aterro e, desta forma, a presença destas populações pode ser discutida no que tange à saúde pública (GRISEY *et al.*, 2010).

No monitoramento do lixo de aterro dos RSD do município do Rio de Janeiro através de parâmetros bacteriológicos, realizado pela Gerência de Pesquisas Aplicadas da COMLURB, são determinadas as populações de coliformes totais, de *E. coli* e de enterococos, e a identificação de microrganismos potencialmente patogênicos, como *Salmonella* e outras enterobactérias e

Staphylococcus aureus. Os resultados desse estudo revelam similaridade nos valores obtidos para o grupo dos coliformes ao longo dos anos de 2004 a 2013. A mesma similaridade foi observada na identificação das enterobactérias, havendo a prevalência de 3 espécies de importância sanitária: *E. coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae* (COMLURB, 2013).

Uchida e outros (2009), na investigação de fontes de poluição ambiental por emissão de sulfeto de hidrogênio em um aterro no Japão, monitoraram as estruturas das comunidades bacterianas em amostras de lixo de aterro durante 8 meses usando a técnica molecular da DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação), com o objetivo de determinar o impacto da degradação da matéria orgânica nos aterros sobre estas comunidades. Além disso, compostos químicos decorrentes da degradação dos materiais químicos artificiais, como borracha, plásticos, metais, vidros e materiais de construção (entulhos) enterrados no aterro sanitário também foram qualitativamente analisados. Nesse estudo, as análises dos padrões de bandeamento gerados indicaram que as comunidades bacterianas habitantes do local eram muito estáveis e que os principais microrganismos apresentavam relação com a família *Comamonadaceae*, que inclui os gêneros *Acidovorax* e *Comamonas* que são conhecidos por desempenharem importantes papéis na biodegradação de compostos aromáticos, na desnitrificação, e na biorremediação de ambientes contaminados. Os autores concluíram que a geração de sulfeto de hidrogênio também pode ser considerada o resultado da adaptação da atividade microbiana ao ambiente alterado.

Através de técnicas moleculares, a natureza da composição bacteriana foi determinada em lixiviados oriundos

de diferentes aterros sanitários no Brasil e foi possível verificar a diversificação do domínio Bactéria, com destaque para o filo Proteobacteria, como o mais abundante (SANTOS, 2010). As Proteobacterias compreendem uma das maiores divisões dentro do domínio Bactéria e representam a grande maioria das bactérias gram-negativas conhecidas. O outro grupo igualmente abundante foi Firmicutes, particularmente, as classes Clostridia e Bacilli. O estudo das comunidades bacterianas, oriundas de lixo de um aterro estabilizado, analisadas por pirosequenciamento, já revelaram a predominância das bactérias sobre os demais microrganismos, destacando *Pseudomonas*, *Lysobacter*, *Bacillus* e δ -Proteobactérias como as responsáveis pela remoção de poluentes (XIE *et al.*, 2012).

Ecologia microbiana

Em 1978, Martin Dworkin submeteu à revista Science a seguinte proposição: “a inclinação para ver microrganismos como seres independentes, separáveis do seu ambiente natural, surgiu no século 19 como consequência direta do espetacular sucesso das culturas puras de Robert Koch e seus colegas”. Durante todo esse século, a atenção dos fisiologistas microbianos foi focada no crescimento de culturas puras em meios de cultivo em laboratório. Isso impede que se pense que o microrganismo é apenas um membro de um complexo de interações em um nicho ecológico, o que é crucial para o entendimento, tanto da ecologia, quanto da evolução do organismo (GÓMEZ *et al.*, 2012).

A ecologia microbiana é uma ciência que tem como objetivo compreender como as comunidades microbianas interagem entre si e com o ambiente (SANTOS, 2010). Atualmente, os estudos em ecologia microbiana permitem responder a

questionamentos como, quais fatores influenciam a diversidade microbiana e quão estáveis as comunidades microbianas se apresentam na natureza.

As respostas a essas perguntas fundamentam a realização de práticas biotecnológicas. A biotecnologia ambiental aplica os conceitos e as ferramentas da ecologia microbiana para melhor gerenciar seus processos (BASSIN e ROSADO, 2011). Em contrapartida, a biotecnologia ambiental fornece os modelos de ecossistemas para que os ecologistas microbianos possam estudar e aperfeiçoar os seus conceitos e métodos, tornando a ecologia microbiana e a biotecnologia ambiental intrinsecamente ligadas (RITMANN, 2006).

Diversidade microbiana

Rosado e Duarte (2002) afirmam que a diversidade microbiana é tão vasta quanto desconhecida. Os microrganismos são o grupo mais diversificado e abundante de organismos na Terra e com a mais longa história evolucionária (cerca de 3,5 bilhões de anos) (Coutinho *et al.*, 1999). Sabe-se que um pequeno percentual das espécies bacterianas do planeta foi identificado, deixando vasta porção dessa biota desconhecida e não estudada (Amann *et al.*, 1995). A utilização de metodologias de cultivo impõe às populações bacterianas uma pressão seletiva, impedindo a detecção de muitos microrganismos “não cultiváveis” (ZAK *et al.*, 1994; COUTINHO *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2009). Torna-se, então, limitante o estudo da diversidade associada a determinado ambiente com a utilização de meios de cultivo seletivos a grupos particulares.

A análise da diversidade em comunidades microbianas complexas pode ser examinada em vários níveis. As análises mais simples usam perfis de DNA para

identificar diferenças na composição das comunidades. Abordagens mais refinadas descrevem as diferenças não só na composição da comunidade, mas também na sua organização através da medida do número (riqueza) e abundância relativa de espécies ou filotipos (DUNBAR *et al.*, 2000). As novas tecnologias desenvolvidas têm conferido à diversidade microbiana uma posição prioritária para o avanço da biotecnologia (BASSIN e ROSADO, 2011).

Importância do uso de ferramentas moleculares em estudos de comunidades microbianas

A evolução da biologia molecular nas últimas décadas propiciou avanços nos estudos da microbiologia ambiental e da ecologia microbiana. A ecologia microbiana molecular é baseada na compreensão das relações entre microrganismos e suas interações com o ambiente, através da análise de moléculas representativas de organismos (proteínas, enzimas, ou ácidos nucleicos) ou de processos por eles desencadeados (SANTOS, 2010).

As principais razões para o uso de técnicas independentes do cultivo são a ausência de conhecimento das condições reais sob as quais a maioria das bactérias está crescendo no seu habitat natural, e a dificuldade para se desenvolverem meios de cultura adequados que simulem estas condições (ERCOLINI, 2004). Esse é o caso do lixo de aterro, podendo ser considerado um meio de cultivo microbiano de composição e condições indeterminadas e variáveis.

O estudo da biologia molecular dos microrganismos, que, sem dúvida nenhuma, trouxe avanço ao estudo da diversidade microbiana, só passou a ganhar importância em meados da década de 80, a partir dos estudos de

Stackenbrandt *et al.* (1985), que sugeriram o uso do ácido desoxirribonucléico ribossomal (DNAr) para afiliação de grupos bacterianos, embora o uso do conteúdo de Guanina-Citosina do DNA fosse sugerido para a taxonomia de bactérias ainda na década de 60 (ZILLI *et al.*, 2003). Dessa forma, o conhecimento da variabilidade genética foi amplamente beneficiado pela aplicação de técnicas de biologia molecular. A capacidade de examinar diretamente o DNA permitiu atingir níveis elevados de sensibilidade e detalhamento, contornando os problemas relacionados à expressão gênica e às influências ambientais.

A detecção e a identificação bacterianas, tradicionalmente, são feitas de acordo com os meios de obtenção de carbono e energia, exigências nutricionais, meio de cultivo para seu crescimento, e observação direta através do microscópio (Kennedy, 1999). No entanto, a utilização dessas metodologias fornece informações limitadas, impedindo a detecção de bactérias “não cultiváveis” (ZAK *et al.*, 1994; SANTOS *et al.*, 2009).

As limitações das técnicas tradicionais de detecção e de identificação de bactérias são ainda maiores quando se quer estudar a diversidade associada a determinado ambiente. Sabe-se que a diversidade das bactérias é maior que a de qualquer outro grupo de organismos, no entanto, os meios de cultivo são seletivos a grupos particulares. Até mesmo quando se quer utilizar um meio seletivo para determinado organismo-alvo, algumas estirpes não cultiváveis, provavelmente, serão excluídas das análises (COUTINHO *et al.*, 1999). AMANN *et al.* (1995) sugerem que um pequeno percentual das espécies bacterianas do planeta tenham sido identificadas, deixando vasta porção dessa biota desconhecida e não estudada. De fato, até recentemente, apenas 20% das bactérias que ocorrem

naturalmente foram isoladas e caracterizadas (KLAMMER *et al.*, 2008).

Como exemplo da limitação conferida pelas técnicas convencionais, podem-se citar os resultados de nove anos de monitoramento do lixiviado dos resíduos sólidos domiciliares do município do Rio de Janeiro, através de parâmetros bacteriológicos, promovido pela Companhia Municipal de Limpeza Urbana (COMLURB). Nesse trabalho são determinadas as densidades de coliformes totais, de *Escherichia coli* e de Enterococos, bem como a identificação de microrganismos potencialmente patogênicos, como as enterobactérias e *Staphylococcus aureus*. Os resultados desse estudo (dados não publicados) revelam uma homogeneidade nos valores obtidos com a determinação de coliformes. A mesma homogeneidade foi observada nos grupos de bactérias identificadas, havendo a prevalência de 3 espécies de importância sanitária: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae*, e de bactérias do grupo dos Enterococos.

Os métodos moleculares, independentes de cultivo, em geral utilizam, como etapa inicial, a amplificação de genes marcadores por PCR (Polymerease Chain Reaction). Após a extração do DNA total de uma dada amostra, o material extraído serve como molde para a reação de PCR. A região a ser amplificada deverá conter sequências conservadas que irão permitir o pareamento dos iniciadores, e regiões variáveis que serão utilizadas pela filogenia (YE *et al.*, 2012). A extração de DNA de amostras ambientais, com posterior amplificação e análise do material genético, tem sido uma alternativa ou complemento ao método clássico de cultivo e análises fisiológicas de microrganismos (ZILLI *et al.*, 2003; ERCOLINI, 2004).

O gene que codifica o RNAr 16S e sua utilização na identificação de espécies bacterianas

O RNA é bastante conservado tanto funcionalmente como em sua sequência, e está associado a regiões de moderada variação genética (WARD e BATESON, 2000). Assim, a comparação de sequências de RNA ribossomal (RNAr) se tornou uma poderosa ferramenta para deduzir relações filogenéticas e evolutivas de organismos, assim como, sua própria identificação.

A molécula amplamente utilizada para análises filogenéticas em procariontes é a 16S, subunidade menor do RNAr. É um polirribonucleotídeo de aproximadamente 1500 nucleotídeos, codificado pelo gene *rrs* (ácido desoxirribonucleotídeo ribossomal - DNAr).

A estrutura primária do RNAr 16S é composta por regiões alternadas de alta e baixa variabilidade. As regiões com sequências variáveis contêm informação de baixo nível filogenético, enquanto, as regiões com sequências conservadas contêm informação dos eventos evolutivos. O RNA ribossomal é um excelente marcador molecular para a reconstrução da maioria das relações filogenéticas (FRY *et al.*, 1991).

No entanto, o DNAr 16S é a molécula preferida pelo seu tamanho e por ser manejável experimentalmente. Quando se pretende amplificar o DNAr 16S completo, as sequências conservadas do gene são utilizadas para o desenho dos oligonucleotídios iniciadores. De fato, embora existam posições filogeneticamente informativas ao longo de todo o gene, a maior variabilidade se concentra nas primeiras 500 bases nucleotídicas (PATEL *et al.*, 2002). *GenBank*, o maior banco de dados de

sequências, tem aproximadamente 20 milhões de sequências depositadas, das quais 90.000 são referentes ao gene que codifica o RNAr 16S, o que permite a comparação da sequência das linhagens desconhecidas com as sequências disponíveis.

Principais técnicas aplicadas às amostras de lixiviado de aterro

Diferentes técnicas moleculares vêm recentemente sendo aplicadas ao lixiviado de aterro, destacando-se: a Análise do Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição (T-RFLP ou TRF - Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) (Sawamura *et al.*, 2007); Biblioteca de clones do gene RNAr 16S (Huang *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2011), Hibridização fluorescente *in situ* - FISH (Sanz e Kochling, 2007), Análise da Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis – ARDRA) (WALSH *et al.*, 2002); Eletroforese do Gel de Gradiente Desnaturante – DGGE (RÖLING *et al.*, 2001; BRAT *et al.*, 2008; MEHMOOD *et al.*, 2009), e pirosequenciamento (SANTOS, 2010).

A técnica de DGGE, inicialmente introduzida em ecologia microbiana molecular para determinar a diversidade genética de misturas complexas de comunidades microbianas (MUYZER *et al.*, 1993), pode ser amplamente utilizada, como no estudo das mudanças ocorridas nas comunidades microbianas no ambiente natural ou submetido a condições de estresse, ou no monitoramento de microrganismos específicos em um ambiente natural, sendo esta uma poderosa ferramenta de estudo (ROSADO e DUARTE, 2002). É um método de separação eletroforético baseado em diferenças no comportamento de desnaturação de fragmentos de DNA de cadeia dupla, previamente

amplificados pela PCR, em gel com gradiente desnaturante. Esses fragmentos ficam sujeitos a um ambiente com crescentes níveis de desnaturação, que acabam por promover mudanças conformacionais na molécula, reduzindo sua migração (MUYZER e SMALLA, 1998). Assim, fragmentos com mesmo tamanho, mas com composição de bases diferentes, irão apresentar diferentes padrões eletroforéticos, diferenciando cada microrganismo, ou seja, cada banda no gel representa uma espécie ou um grupo de espécies de bactéria, e a imagem final do gel corresponderá a um padrão de “códigos de barra” referente à comunidade bacteriana estudada.

As aplicações mais recentes dessa técnica têm focado no estudo das estruturas e evolução das comunidades microbianas do solo (NAKATSU, 2007); composto orgânico (KLAMMER *et al.*, 2008), rizosfera (DUINEVELD *et al.*, 1998), lodo de refinaria de petróleo (PINHATI, 2008), e lixiviado de digestão anaeróbia (SILVEY *et al.*, 2000).

Os estudos de Röling e outros (2001), e Brat e outros (2008), em aquíferos contaminados por lixiviado de aterro, mostram a relação entre as comunidades microbianas e a hidrogeoquímica do local, com a aplicação da DGGE. A análise de clones dos perfis de DGGE, gerados com os iniciadores para bactérias e para arqueas, foi capaz de separar comunidades microbianas pertencentes à água contaminada daquelas pertencentes à água limpa, bem como clones bacterianos de amostras coletadas próximas ao aterro, daquelas coletadas a distâncias maiores. Os resultados baseados nos dados da biblioteca genômica que associam um determinado organismo às bandas dos perfis de DGGE foram consistentes com as condições redox observadas, sendo também possível revelar um variado número de sequências relacionadas às bactérias fermentativas

degradadoras de compostos complexos e acetogênicas. Para os autores, a análise por DGGE do RNAr 16S gera perfis de bandeamento que podem servir de base para informações sobre a presença e a atividade de comunidades microbianas, sendo útil na determinação do potencial na biorremediação de aquíferos contaminados por lixiviado de aterro.

Na análise da comunidade microbiana de composto oriundo de diversos materiais, como resíduos orgânicos, lodo de esgoto, fezes de animais e resíduos sólidos urbanos, Klammer *et al.*, (2008) concluíram que os métodos moleculares e, em particular, a DGGE, provaram ser uma poderosa ferramenta na análise comparativa de amostras de resíduos orgânicos em decomposição. Ainda assim, os autores não obtiveram um padrão de DGGE que pudesse servir para comparações laboratoriais. No caso da compostagem, as comunidades microbianas podem somente servir como um parâmetro adicional, indicando a fase do processo de degradação, mas os resultados devem ser associados aos parâmetros químicos.

Moura *et al.* (2007) utilizaram a técnica de PCR-DGGE para estimar a diversidade bacteriana e monitorar mudanças nas comunidades de 2 lagoas aeradas de uma usina de tratamento de água residuária, receptora de afluentes urbanos e industriais. Tal pesquisa procurou mostrar a composição, a estrutura e a dinâmica ao longo de um ano, permitindo entender que as mudanças nas estações podem afetar a estrutura da comunidade e, conseqüentemente, o tratamento do lixiviado em lagoas aeradas. Considerando que há pouca informação disponível com relação às comunidades bacterianas que habitam esses ecossistemas, a técnica de PCR-DGGE, aplicada neste trabalho, demonstrou ser eficaz em fornecer dados sobre a

estrutura e a dinâmica dessas comunidades. Os autores relataram que as estruturas das comunidades bacterianas nas lagoas foram similares, tendo sido identificadas comunidades bacterianas compostas de organismos pertencentes ao filo Firmicutes (3/15), β -Proteobacteria(1/15), ϵ -Proteobacteria (1/15), mas a maioria pertencia ao grupo *Cytophaga Flexibacter Bacteroides* (CFB) (10/15).

Uma outra técnica que merece destaque dada a sua aplicação a amostras de lixiviado é a RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) - Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição. Essa técnica pode ser aplicada para monitorar mudanças na estrutura e na composição de comunidades microbianas, sendo também baseada no PCR. No entanto, o gene de interesse é amplificado com o emprego de iniciadores ou "primers", um ou dois deles sendo marcados por fluorescência, e o produto é digerido com uma ou mais enzimas de restrição. Os genes resultantes marcados são então analisados por sequenciamento. Já que diferenças na sequência gerarão genes marcados de diferentes tamanhos, será possível agrupar as populações de microrganismos que são geneticamente distintas (LIU *et al.*, 2011)

Alguns autores empregam a técnica de T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism), polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição terminal, para avaliar a comunidade microbiana de sistemas de tratamento de resíduos. Briones *et al.* (2009) monitoraram, por T-RFLP, as populações microbianas de bactérias e arqueas em um biorreator anaeróbio. Os autores notaram uma mudança no fluxo de elétrons de butirato a propionato como consequência da presença de populações bacterianas, como os clostrídios produtores de butirato. Por outro lado, houve a seleção de

um grupo novo de bactérias, *Thermotogaceae*, que estava mais bem adaptada às condições sulfidogênicas do biorreator.

Dunbar *et al.* (2000), ao avaliar a habilidade dos padrões de fragmentos de restrição terminal (T-RFLP ou TRF) do RNAr 16S, em fornecer informações sobre a diversidade de comunidades microbianas em solos, verificaram que os perfis de TRF não foram capazes de diferenciar os diferentes filotipos de comunidades microbianas de solo. Advertem, no entanto, que tais perfis podem ser uma nova ferramenta em ecologia microbiana, desde que sejam cuidadosamente interpretados e associados a outras técnicas, como o DGGE.

Huang *et al.* (2005) reportaram os resultados de ensaios moleculares para determinação de grupos bacterianos associados ao lixiviado de aterro municipal através da técnica de RFLP. Para tanto, um banco de dados de DNAr foi gerado a partir do DNA total recuperado de amostras de lixiviado, usando um iniciador universal e um iniciador bactéria-específico. Os clones recombinantes do banco genômico foram selecionados ao acaso e submetidos ao sequenciamento. A análise filogenética revelou que a maioria dos clones bacterianos pertencia ao grupo das Proteobactérias, ao grupo CFB e ao filo Spirochaetes. Membros de diversos outros grupos foram identificados em baixa frequência, incluindo o filo Verrucomicrobia, o grupo Deinococcus - Thermus, Cyanobacteria e as bactérias verdes não sulfurosas. Os autores concluem que, devido às comunidades desconhecidas, o consórcio microbiano em aterros tradicionais tem sido tratado como "caixas-pretas". Os resultados sugeriram que as comunidades bacterianas em sistemas de aterro são mais complexas do que previamente estimado e permanecem ainda pouco exploradas. A aparente abundância

e diversidade das novas sequências de DNA sugerem que os grupos de microrganismos correspondentes podem desempenhar um importante papel em processos anaeróbios nos aterros. Os autores acreditam que as sequências de DNAr obtidas com a pesquisa podem fornecer um panorama mais consistente para as investigações futuras usando técnicas baseadas no RNAr 16S.

Recentemente, a tecnologia de pirosequenciamento vem se destacando por ser um sistema capaz de sequenciar 25 milhões de bases em um período de quatro horas, ou seja, cerca de 100 vezes mais rápido do que o tempo gasto no sequenciamento convencional (ROGERS e VENTER, 2005). Quando utilizada na avaliação das comunidades microbianas em lixiviado de aterro sanitário, a tecnologia de pirosequenciamento revela uma maior diversidade microbiana quando comparada ao sequenciamento tradicional (XIE *et al.*, 2012).

No Brasil, o trabalho mais recente sobre a microbiota do lixiviado de aterro observada através de DGGE e pirosequenciamento foi realizado por Santos (2010). Os filos mais abundantes foram Proteobacteria e Firmicutes, seguidos pelos filos Tenericutes, Thermotogae, Actinobacteria, Synergistetes e Verrucomicrobia. Além desses, representantes de outros filos 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. A autora conclui que as estruturas das comunidades microbianas presentes nesses "consórcios" são complexas e permanecem inexploradas, dificultando o aperfeiçoamento dos métodos de tratamento biológico desse efluente.

CONCLUSÕES

Da análise das literaturas pesquisadas, pode-se concluir que a riqueza e o dinamismo das comunidades microbianas presentes no lixiviado de aterro de resíduos sólidos, evidenciados através de técnicas de biologia molecular, refletem o comportamento que deve ser esperado em amostras ambientais, em que diferentes variáveis concorrem para influenciar os ecossistemas, como, por exemplo, a composição física dos resíduos, o regime de chuvas locais e a percolação da água, a compactação dos resíduos, a presença de poluentes e a disponibilidade de nutrientes.

RFLP, DGGE e o pirosequenciamento são as técnicas mais empregadas na observação das comunidades bacterianas em lixiviado de aterro. Os filos Proteobacteria e Firmicutes foram identificados como os mais abundantes com as técnicas empregadas. No entanto, o pirosequenciamento se destacou por ser um sistema capaz de sequenciar 25 milhões de bases em quatro de horas, o que significa um período 100 vezes superior ao tempo gasto no sequenciamento convencional, além de permitir a detecção de populações bacterianas em baixa abundância nas complexas comunidades bacterianas.

O desafio é aplicar os muitos dados a respeito da diversidade microbiana, gerados com esses métodos em estratégias mais eficientes de remediação e de tratamento de resíduos sólidos através da seleção, utilização e/ou estímulo de populações microbianas específicas presentes nos aterros ou nos lixiviados.

REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NORMA

BRASILEIRA (NBR) 8419 – Apresentação de projetos de aterros sanitários de resíduos sólidos urbanos - Procedimento. Rio de Janeiro, 2008.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NORMA BRASILEIRA (NBR) 15849 – Resíduos sólidos urbanos – Aterros sanitários de pequeno porte – Diretrizes para localização, projeto, implantação, operação e encerramento. Rio de Janeiro, 2010.

ADEYEMI, O., OLOYEDE, O., OLADIJI, A. Physicochemical and Microbial Characteristics of Leachate-Contaminated Groundwater. *Asian. J. Biochem.*, v.5, p. 343-348, 2007.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHKEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*, v.59, p. 143, 1995.

AMARAL, M. C. S. **Caracterização de lixiviados empregando parâmetros coletivos e identificação de compostos**. Dissertação de mestrado. Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007, 207 p.

AVERY, L. M., BOOTH, P., CAMPBELL, C., TOMPKINS, D. HOUGH, R. L. Prevalence and survival of potential pathogens in source-segregated green waste compost. *Science of the Total Environment*, v. 431, p. 128–138, 2012.

BASSIN, J. P.; ROSADO, A. S. Técnicas de biologia molecular aplicadas ao estudo da diversidade microbiana. In: **Processos biológicos avançados para tratamento de efluentes**. Ed Interciência, Rio de Janeiro, 2011, 357 p.

BOUMECHHOUR, F., RABAH, K., LAMINE, C., SAID, B. M. Treatment of landfill leachate using Fenton process and coagulation/flocculation. *Water and*

Environment Journal, v. 27, 114–119, 2013.

BRAT, T.; BRASTER, M.; VAN BREUKELEN, B.M.; VAN STRAALLEN, N.M.; ROLING, W.F.M. Eukaryotic Diversity in an Anaerobic Aquifer Polluted with Landfill Leachate. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n.13, p. 3959, 2008.

BRIONES, A. M.; DAUGHERTY, B. J.; ANGENENT, L. T. Characterization of microbial trophic structures of two anaerobic bioreactors processing sulfate-rich waste streams. *Water Research*, v. 43, p. 4451-4460, 2009.

CHAGAS, T.P.G., SEKI, L.M. CURY, J.C., OLIVEIRA, J.A.L., D' VILA, A.M.R., SILVA, D.M., ASENSI, M.D. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, v.111, p. 572-581, 2011.

COMPANHIA MUNICIPAL DE LIMPEZA URBANA - COMLURB. **Caracterização gravimétrica e microbiológica dos resíduos sólidos do município do Rio de Janeiro**. Gerência de Pesquisas Aplicadas. Diretoria Técnica e Logística, 2013.

COUTINHO, H.L.C.; OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G. P.; ROSADO, A.S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. In: **Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v 71, n.3, p. 491-503, 1999.

CUSSIOL, N.A.M.; **Disposição final de resíduos potencialmente infectantes**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 2005.

DWORKIN, MARTIN. Microbial Interactions. *Science*, vol. 201, 1978

- DUINEVELD, B. M.; ROSADO, A. S.; ELSAS, J. D. VAN; VEEN, J. A. VAN. Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.4950, 1998.
- DUNBAR, J.; TICKNOR, L.O.; KUSKE, C. R. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.7, p. 2943, 2000.
- EFUNTOYE, M. O., BAKARE, A. A., SOWUNMI, A. A. Virulence factors and antibiotic resistance in **Staphylococcus aureus** and **Clostridium perfringens** from landfill leachate. *Afr. J. Microbiol. Res.*, v. 523, p.3994-3997, 2011.
- ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of Microbiological Methods**, v.56, p.297, 2004.
- FRY, N. K.; ROWBOTHAM, T. J.; SAUNDERS, N. A.; EMBLEY, T. M. Direct amplification and sequencing of the 16S ribosomal DNA of an intracellular *Legionella* species recovered by amoebal enrichment from the sputum of a patient with pneumonia. **FEMS Microbiological Letters**, v. 83, n.2, p.165, 1991.
- GÓMEZ, M. A., BALDINI, M., MARCOS, M., MARTINEZ, A., FERNÁNDEZ, S., REYES, S. Aerobic microbial activity and solid waste biodegradation in a landfill located in a semi-arid region of Argentina. **Ann Microbiol.**, v. 62, 745–752, 2012.
- GRISEY, E., BELLE, E. DAT, J. MUDRY, J., ALEYA, L. Survival of pathogenic and indicator organisms in groundwater and landfill leachate through coupling bacterial enumeration with tracer tests. **Desalination**, v.261, p. 162–168, 2010.
- HUANG, L. N.; ZHU, S.; ZHOU, H.; QU, L. H. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with the leachate of a closed municipal solid waste landfill. **FEMS Microbiological Letters**, v. 242, p. 297-303, 2005.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais, Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2008, publicada em setembro de 2010.
- KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment.**, v.74, p.65, 1999.
- KIM, M. H., SONG, H. B., SONG, Y. Evaluation of food waste disposal options in terms of global warming and energy recovery: Korea. **Journal of Energy and Environmental Engineering**, v. 4, p. 1-12, 2013.
- KLAMMER, S.; KNAPP, B.; INSAM, H. Bacterial community patterns and thermal analyses of composts of various origins. **Waste Management Research**, v.26, p.173, 2008.
- KJELDSSEN, P.; CHRISTENSEN. A simple model for the distribution and fate of organic chemicals in a landfill: MOCLA **Waste Management Research**, v.19, p. 201–216, 2001.
- KJELDSSEN, P.; MORTON, J.; BARLAX, A.; ROOKER, P.; BAUN, A.; LEDIN, A.; CHRISTENSEN. Present and long-term composition of MSW landfill leachate: a review. *Critical Reviews in: Environmental Science Technology*, v. 32, n. 4, p. 297-336, 2002.
- KLAMMER, S.; KNAPP, B.; INSAM, H. Bacterial community patterns and thermal analyses of composts of various origins. **Waste Management and Research**, v.26, p.173, 2008.
- LIU, J., WU, W., CHEN, C., SUN, F., CHEN, Y. Prokaryotic diversity, composition structure, and phylogenetic analysis of microbial communities in leachate sediment ecosystems. **Appl Microbiol Biotechnol** v. 91, 1659–1675, 2011.
- MANFREDI, S., TONINI, M., CHRISTENSEN, T. H. Contribution of individual waste fractions to the environmental impacts from landfilling of municipal solid waste. **Waste Management**, v.30, p. 433–440, 2010.
- MANFREDI, S., TONINI, M., CHRISTENSEN, T. H. Environmental assessment of different management options for individual waste fractions by means of life-cycle assessment modeling. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 55, p. 995– 1004, 2011.
- MATA-ALVAREZ, J. **Biomethanization of the organic fraction of municipal solid waste**. 2nd ed., Iwa Publishing, 2002, 323p.
- MEHMOOD, M. K.; ADETUTU, E.; NEDWELL, D. B.; BALI, A. S. *In situ* microbial treatment of landfill leachate using aerated lagoons. **Bioresearch Technology**, v. 100, p. 2741-2744, 2009.
- MONTEIRO, V. E. D.; MELO, M. C.; ALCÂNTARA, P. B.; ARAÚJO, J. M.; ALVES, I. R. F. S.; JUCÁ, J. F. T. Behavior study of msw in a experimental cell and its correlations with microbiological, physical and chemical aspects. **Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 2, n.3, p. 223.2006.
- MOURA, A.; TACAO, M.; HENRIQUES, I.; DIAS, J.; FERREIRA, P.; CORREIA, A. Characterization of bacterial diversity in two aerated lagoons of a wastewater treatment plant using PCR-DGGE analysis.

- Microbiological Research**, v. 164, p. 560-569, 2007.
- MUYZER, G., WAAL, E. C., UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n.3, p. 695, 1993.
- MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 73, p.127, 1998.
- NAKATSU, C.H. Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. **Soil Science Society American Journal**, v.71, n.2, p. 562, 2007.
- NASCIMENTO, T. C.; JANUZZI, W.A.; LEONEL, M.; SILVA, V. L.; DINIZ, C. G. Ocorrência de bactérias clinicamente relevantes nos resíduos de serviço de saúde em um aterro sanitário brasileiro e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 4. p. 415-419, 2009.
- OTHMAN, S. N.; NOOR, Z. Z.; ABBA, A. H.; YUSUF, R. O.; HASSAN, M. A. A. Review on life cycle assessment of integrated solid waste management in some Asian countries. **J. Cleaner Production** 41, 251 – 262, 2013.
- PATEL, J. B.; LEONARD, D. G.; PAN, X.; MUSSER, J. M.; BERMAN, R. E.; NACHAMKIN, I. Sequence-based identification of Mycobacterium species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p. 246, 2002.
- PINHATI, F.R.; **Caracterização molecular da população microbiana do lodo de Refinaria de Petróleo por PCR-DGGE e RAPD**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2008.
- POHLAND, F. G.; HARPER, S. R. Critical review and summary of leachate and gas production from landfill. **Tech. Project**, n. E20G01, 1985.
- RICH, C., GRONOW, J., VOULVOULIS, N. The potential for aeration of MSW landfills to accelerate completion. **Waste Management**, v. 28, p.1039–1048, 2008.
- RITTMANN, B. E. Microbial ecology to manage processes in environmental biotechnology. **Trends Biotechnol.** V. 24, p.261-266, 2006.
- ROGERS, Y. H.; VENTER, J. C. **Genomics: massively parallel sequencing**. *Nature*, v.437, p.326-327, 2005.
- RÖLING, W.F.; VAN BREUKELEN, B.M.; BRASTER, M.; LIN, B.; VAN VERSEVELD, H.W. Relationships between microbial community structure and hydrochemistry in a landfill leachate polluted aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.4619, 2001.
- ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F. Utilização de eletroforese em gel com gradientes de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura para estudar a diversidade microbiana. In: **Genética e melhoramento de microrganismos**. Mello, I.S., ed.; EDUSP: São Paulo, 2002.
- SANG, N. N., SODA, S., ISHIGAKI, T., IKE, M. Microorganisms in landfill bioreactors for accelerated stabilization of solid wastes. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 114, 243-250, 2012.
- SANTOS, A. L.; PEIXOTO, R.; ROSADO, A. S. New approaches to understanding microbial diversity in wastewater, landfills and leachate treatment. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 4, p. 631-648, 2009.
- SANTOS, A. L. **Diversidade molecular microbiana de lixiviados de aterros**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010, 98p.
- SANZS J. L.; KOCHLING, T. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: an overview. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 119-133, 2007.
- SAWAMURA, H.; YAMADA, M.; ENDO, K.; SODA, S.; ISHIGAKI, T.; IKE, M. Characterization of microorganisms at different landfill depths using carbon utilization patterns and 16S rRNA gene based T-RFLP. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 109, n. 2, p. 130-137, 2010. 2007
- SENG, B., HIRAYAMA, K., KATAYAMA-HIRAYAMA, K., OCHIAI, S., KANEKO, H.. Scenario analysis of the benefit of municipal organic-waste composting over landfill, Cambodia. **Journal of Environmental Management**, v.114, p. 216-224, 2013.
- SENIOR, E. **Microbiology of landfill sites**. 2nd ed., Lewis Publishers, 1995, 205p.
- SILVA, J.D.; KOGA, E.M.; MARTINS, C.L.; COSTA, R.H.R.; CASTILHO JR., A.B. **Variação nictemeral de parâmetros de qualidade ambiental em lagoas de estabilização do tipo facultativa e de maturação tratando lixiviados de aterros sanitários**. Resumos do 24^o Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Belo Horizonte, Brasil, 2007.

- SILVEY, P.; PULLAMMANAPPALLI, P.C.; BLACKALL, L.; NICHOLS, P. Microbial ecology of the leach bed anaerobic digestion of unsorted municipal solid waste. **Water Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 9-12, 2000.
- SOUZA, L. F. **Codisposição de resíduos sólidos de serviço de saúde com resíduos sólidos urbanos**. 306p, 2003. Tese (Doutorado em Engenharia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2003.
- SOUTO, G. D. B. **Lixiviados de aterros sanitários brasileiros - estudo de remoção do nitrogênio amoniacal por processo de arraste com ar ("stripping")**. Tese de Doutorado, Universidade de São Carlos, 2009.
- STACKENBRANDT, E., MURRAY, R. G. E., TRÜPER, H. G. *Proteobacteria* classis nov. a name for the phylogenetic taxon that includes the "Purple Bacteria and Their Relatives". **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, n. 3, p.321-325, 1985.
- STALEY, B. F., BARLAZ, M. A., DE LOS REYES, F. L., ELLIS, J. C. Microbial community of profiling of municipal solid waste at different stages of degradation. Proceedings Sardinia 2007. In: **Eleventh International Waste Management and Landfill Symposium**. S. Margherita di Paula, Cagliari, Italy; 1-5 October 2007.
- SZYŁAK-SZYDŁOWSKI, M., KORNIŁOWICZ-KOWALSKA, T. The mycobiota of landfill leachates in the pretreatment process in a sequencing batch reactor. **Cent. Eur. J. Biol.**, v. 7, 250-258, 2012.
- THREDEACH, S., CHIEMCHASRI, W., WATANABE, T., CHIEMCHASRI, T., HONDA, R., YAMAMOTO, K. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* in leachates from municipal solid waste landfills: Comparison between semi-aerobic and anaerobic operations. **Bioresource Technology**, v.113, p. 253–258, 2012.
- TUOMELA, M., VIKMAN M., HATAKKA, A., ITAVAARA, M., Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, v.72, p.169-183, 2000.
- UCHIDA, M.; HATAYOSHI, H.; SYKUNOBE, A.; SHIMOYAMA, T.; NAKAYAMA, T.; OKUWAKI, A.; NISHINO, T.; HEMMI, H. Polymerase chain reaction – denaturing gradient gel electrophoresis analysis of microbial community structure in landfill leachate. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, p.1503-1508, 2009.
- UMAR, M., AZIZ, H. A., YUSOFF, M. F. Assessing the chlorine disinfection of landfill leachate and optimization by response surface methodology (RSM). **Desalination**,v.274, p.278-283, 2011.
- VERGARA, S. E., TCHOBANOGLOUS, G. Municipal Solid Waste and the Environment: A Global Perspective. *Annu. Rev. Environ. Resour.*, v. 37, 277–309, 2012.
- VILAR, A., EIROA, M., KENNES, C., VEIGA, M. C. Optimization of the landfill leachate treatment by the Fenton process. **Water and Environment Journal**, v. 27, 120–126, 2013.
- WALSH, K.A.; MOFFETT, T.C.J.; MOFFETT, B.F.; HARRIS, J.A.; SHAW, P.J.; WALLACE, J.S. Molecular characterization of bacteria in a wetland used to remove ammoniacal-N from landfill leachate. **Waste Management and Research**, v. 20, p. 529, 2002.
- WARD, D.M.; BATESON, M.M.; 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, v. 345, p. 63, 2000.
- WIRTH, R., KOVÁCS, E., MARÓTI, G., BAGI, Z., RÁKHELY, G., KOVÁCS, K. L. Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. **Biotechnology for Biofuels.**, v. 5, 2012.
- XIE, B., XIONG, A. B., LIANG, A S., XIAOJUN, C. H., ZHANG, B. JUN, L. C. Performance and bacterial compositions of aged refuse reactors treating mature landfill leachate. **Bioresource Technology**, v. 103, p.71–77, 2012.
- YE, L.; ZHANG, T.; WANG, T.; FANG, Z. Microbial structures, functions, and metabolic pathways in wastewater treatment bioreactors revealed using high-throughput sequencing. **Environmental Science and Technology**, v.46, p.13244–13252, 2012.
- ZAK, J. C.; WILLIG, M. R.; MOORTHEAD, D. L.; WILDMAN, H. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n.9, p. 1101, 1994.
- ZHANG, W., YUE, B., WANG, Q., HUANG, Z., HUANG, Q., ZHANG, Z. Bacterial community composition and abundance in leachate of semi-aerobic and anaerobic landfills. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, 1770–1777, 2011.
- ZHAO, R., GUPTAB, A., NOVAKB, J. T., GOLDSMITHC, D., DRISKILL, N. Characterization and treatment of organic constituents in landfill leachates that influence the UV disinfection in the publicly owned treatment works (POTWs). **Journal of Hazardous Materials**, v.1, p. 258–259, 2013.
- ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de**

Ciência e Tecnologia, v.20, n.3,
p.391-411, 2003.

Recebido em: abr/2012
Aprovado em: mar/2014