

III-203 - ELETROFORESE EM GEL DE GRADIENTE DE DESNATURAÇÃO (DGGE) NA ANÁLISE DAS COMUNIDADES MICROBIANAS EM LIXIVIADO DE RESÍDUOS SÓLIDOS DOMICILIARES E DE RESÍDUOS SÓLIDOS DE SERVIÇO DE SAÚDE CODISPOSTOS EM ATERRO EXPERIMENTAL

Bianca Ramalho Quintaes⁽¹⁾

Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos/ EQ/ UFRJ. Mestre em Microbiologia/UERJ. Biomédica/ UNIRIO. Gerente da Divisão de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aplicadas da COMLURB.

Carlos Augusto Machado da Costa e Silva

Doutorando pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos/EQ/UFRJ. Mestre em Eng. Ambiental/UERJ. Biólogo do Centro de Pesquisas Aplicadas da Companhia Municipal de Limpeza Urbana - COMLURB

Marco Antônio Lemos Miguel

D.S. em Ciências de Alimentos pela UFRJ. Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia) pela UFMG. Biólogo pela Universidade Gama Filho. Chefe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Professor Adjunto do Instituto de Microbiologia da UFRJ.

Juacyara Carbonelli Campos

D.Sc. em Engenharia Química - PEQ/COPPE/UFRJ. Engenharia Química/UFRJ. Professora Adjunta do Departamento de Processos Inorgânicos da Escola de Química /UFRJ

Kátia Regina Araújo da Silva

D.S. em Ciências pela UFRJ. Mestre em Ciências pela FIOCRUZ. Bióloga pela Universidade Gama Filho. Pesquisadora do Laboratório de Ecologia Microbiana do Instituto de Microbiologia da UFRJ

Endereço⁽¹⁾: Centro de Pesquisas Aplicadas – Companhia Municipal de Limpeza Urbana – COMLURB. Rua Américo de Souza Braga, 647 – Vargem Pequena – Rio de Janeiro – RJ– CEP 22783-385 - Brasil – Tel: +55 (21) 3417-2090 – Fax: +55 (21) 3417-2114 - e-mail: comlurb_ipm@rio.rj.gov.br.

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 microbianas em lixiviado de aterro de resíduos sólidos urbanos. Os potenciais e as limitações ao uso de técnicas tradicionais e moleculares serão discutidos, e apontados os principais grupos microbianos envolvidos na dinâmica dos processos de decomposição em aterros.

PALAVRAS-CHAVE: Aterro, Resíduos sólidos, Lixiviado, Comunidades microbianas.

INTRODUÇÃO

As mudanças ambientais resultantes da atividade humana, como é o caso das áreas de disposição de resíduos sólidos, significativamente afetam sistemas ecológicos no ambiente, incluindo as comunidades microbianas. Apesar das pesquisas envolvendo essas comunidades, há pouca informação para um melhor entendimento dos processos biológicos que se sucedem em um aterro de disposição de resíduos sólidos. Os micro-organismos que estão bem adaptados ao novo ambiente aumentam, enquanto que aqueles não tão adaptados às condições ambientais diminuem.

A diversidade microbiana é um importante fator na avaliação do processo de decomposição de resíduos. Assim, a avaliação dessa diversidade é um dos principais passos em direção ao entendimento das propriedades metabólicas espécie-específica responsáveis pela decomposição do lixo. As populações iniciais do lixo 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. A investigação dos processos de decomposição orgânica é indispensável para uma avaliação precisa dos riscos ambientais e da estabilidade dos aterros de resíduos.

No que concerne aos Resíduos Sólidos de Serviço de Saúde (RSS), a questão central que se coloca é sobre a periculosidade ou não deste resíduo. Embora esta seja uma questão não resolvida, os países desenvolvidos adotam uma política cautelosa e consideram tais resíduos como resíduos que exigem tratamento especial (perigosos, patogênicos, patológicos, entre outras denominações). A recomendação de incineração dos resíduos, ou de parte deles, é uma constante. No Brasil e em diversos países do terceiro mundo, da mesma forma que para os resíduos sólidos em geral, as propostas de gerenciamento para os resíduos hospitalares tem-se fundamentado em padrões do Primeiro Mundo.

Diante das perspectivas tecnológicas disponíveis para o tratamento de lixiviado de aterro de resíduos sólidos urbanos, reconhece-se a necessidade de um estudo que acompanhe, ao longo do tempo e do espaço, o desenvolvimento e a sucessão das comunidades bacterianas dos RSD e dos RSS dispostos em aterro, sua dinâmica ao longo do processo de decomposição, bem como as suas características fenotípicas e genotípicas. Dessa forma, considerado a emissão mais impactante, sob o ponto de vista ambiental, o lixiviado de aterro pode servir de base para a verificação das comunidades microbianas que se sucedem nos processos degradativos em uma massa de resíduos sólidos domiciliares (RSD), em uma massa de resíduos sólidos de serviço de saúde (RSS) e em sua codisposição.

O presente trabalho tem como objetivo analisar as comunidades microbianas em lixiviado de resíduos sólidos domiciliares (RSD) e resíduos sólidos de serviço de saúde (RSS) codispostos em aterro experimental através da técnica de eletroforese em gel de gradiente de desnaturação (DGGE-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Os resultados obtidos com esta investigação permitirão avaliar a influência de determinados grupos bacterianos na dinâmica do processo de degradação dos resíduos sólidos domiciliares, dos resíduos de serviço de saúde e da codisposição de ambos e estudar as interações ocorridas no processo de codisposição de resíduos sólidos urbanos e resíduos sólidos de serviço de saúde.

MATERIAIS E MÉTODOS

A área destinada à construção dos aterros experimentais situa-se na Usina de Reciclagem e de Compostagem de Jacarepaguá da COMLURB, no bairro de Vargem Pequena, zona Oeste do Município do Rio de Janeiro. A concepção dos aterros foi realizada avaliando-se os critérios básicos de construção de aterros sanitários: impermeabilização do solo, compactação dos resíduos, sistema de drenagem dos líquidos e gases e cobertura superficial. São 3 áreas distintas para a disposição com as seguintes concentrações de Resíduos Sólidos Domiciliares (RSD) e Resíduos Sólidos Serviço de Saúde (RSS): célula 1, com 100% de RSD; célula 2, com 100% de RSS e a mistura de ambos resíduos, célula 3, com 98% de RSD e 2% de RSS.

Para formação dos taludes e das bermas foram utilizados resíduos de construção civil. A Figura 1 mostra um esquema contendo as dimensões da área experimental.

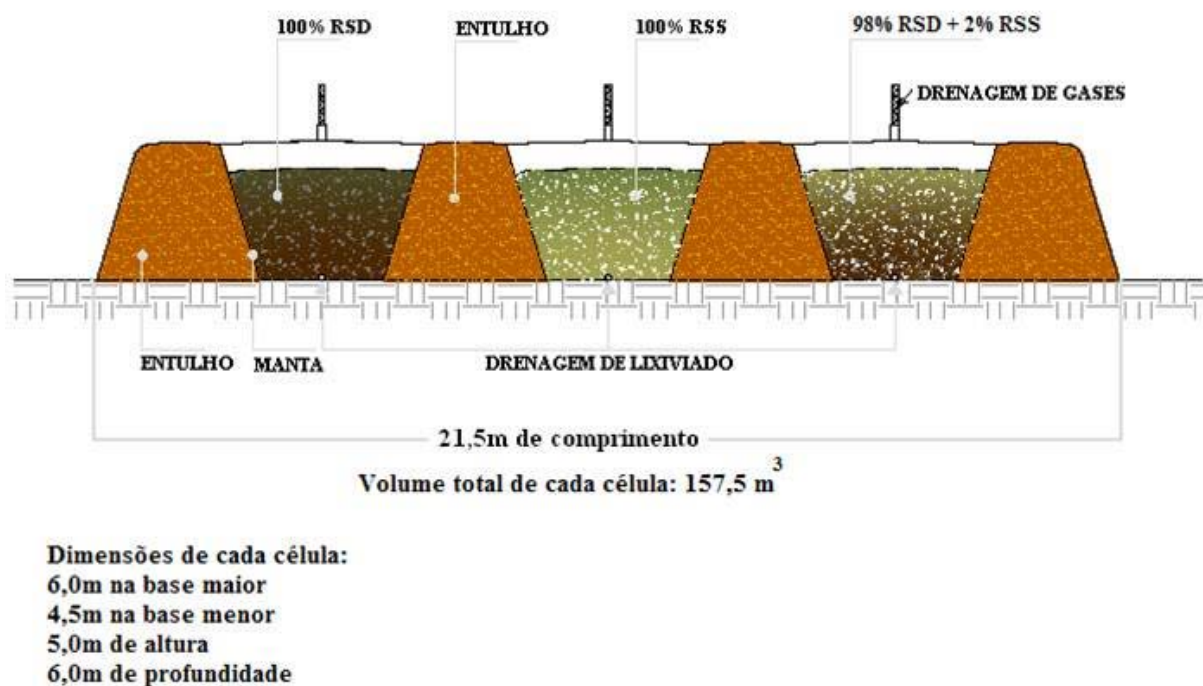


Figura 1: Área experimental: dimensões das células e percentual de Resíduos Sólidos Domiciliares (RSD) e de Resíduos Sólidos de Serviço de Saúde (RSS) a ser disposto em cada célula.

SISTEMA DE IMPERMEABILIZAÇÃO DE BASE

A base e as laterais das células foram impermeabilizadas com uma manta de polietileno de alta densidade (PEAD), com 1,0 mm de espessura. A manta foi estendida sobre a área, acompanhando a topografia das células. Após a conclusão dessa etapa, as células receberam uma camada de 20 cm de solo argiloso (com exceção da área destinada ao sistema de drenagem de lixiviado e de gases), compactado com o auxílio de um compactador manual.

Dessa forma, procurou-se garantir que os líquidos que percolarem verticalmente através da massa de resíduos encontrem a camada impermeável de argila e, não tendo como prosseguir, passem a escoar horizontalmente, minando para as valetas de coleta do lixiviado.

SISTEMA DE DRENAGEM DE LIXIVIADO

As valetas de drenagem foram escavadas manualmente no centro da célula com profundidade de 30cm, 20 cm de largura e 4 m de comprimento. Após a impermeabilização com manta PEAD, as valetas de drenagem foram cobertas com uma manta de BIDIM 400 (5mx2,5m). Em sequência, foi instalado o sistema de drenagem, composto por um tubo do tipo canaflex, conectado a um receptor de tubo PVC 50mm acoplado a uma união-registro de PVC 50mm e a uma torneira com saída curva de 90°, para coleta das amostras. As valetas contendo os tubos foram preenchidas com brita nº3, iniciando com uma altura de 10 cm de altura (parte posterior da célula), que ia se aprofundando até 30cm (parte frontal da célula). O BIDIM foi, então, dobrado sobre a cama de brita, envolvendo-a completamente. Esse dispositivo além de filtrar o efluente, facilita seu escoamento, evitando a colmatação.

SISTEMA DE DRENAGEM DE GASES

Foram construídos drenos verticais, de seção circular, com tubulação de PVC DN 100 mm perfurada (furos de 3/8mm), com 2,3 m de comprimento e uma tela de arame de 1 m de altura e 2 m de comprimento, indo, desta forma, desde a base da massa de resíduos até a 20 cm acima da camada superficial de argila. O tubo foi disposto no centro da célula, sobre a valeta de drenagem de lixiviado. Em seguida, a tela de arame foi arrumada

em torno do tubo, com uma distância de 10 cm, e suas laterais costuradas com arame de forma a envolver todo o tubo. O espaço entre o tubo e a tela foi preenchido com brita nº3. Esse trabalho foi realizado na medida em que os resíduos iam sendo depositados, dando suporte ao sistema. Após o enchimento das células e impermeabilização superficial, foram colocados queimadores de ferro galvanizado acoplados ao tubo de PVC, uma vez que não está prevista a coleta dos gases gerados.

ESPALHAMENTO E COMPACTAÇÃO DOS RESÍDUOS NA CÉLULA

Finalizadas as etapas de montagem do sistema de drenagem de lixiviado, colocação da camada de argila sobre a manta e preparação para o sistema de drenagem de gases, deu-se início ao preenchimento das células com os resíduos sólidos.

Em dias típicos de coleta, os resíduos sólidos domiciliares chegam à Usina de Reciclagem e Compostagem de Jacarepaguá em caminhões após cumprir o roteiro em área residencial de um determinado bairro. Essa carga de resíduos é, então, despejada na Estação de Transferência, de onde os resíduos são retirados e depositados em uma carreta para serem transportados ao aterro de Gramacho. Para o experimento, os caminhões eram selecionados ao acaso, ou seja, não havia escolha de itinerário, e quantificada a massa, em toneladas, dos resíduos a serem colocados nas células. Da balança, os caminhões se dirigiam à área do experimento e todo o seu conteúdo era esvaziado no solo. Com o auxílio de uma ferramenta do tipo gadanho, a equipe de garis rasgava os sacos para exposição dos resíduos.

O nível de compactação da massa de resíduos e da cobertura superficial, previsto para o dimensionamento das células, está embasado na operação de uma retro-escavadeira. A cada colocação dos resíduos, as pás do veículo pressionavam o conteúdo sobre a base das células até a última camada de resíduo e de selagem com argila. O fim da etapa de selagem foi tido como a data de início de operacionalização de cada célula.

A Figura 2 mostra uma vista panorâmica após a cobertura superficial de argila.



Figura 2 – Panorâmica das células após finalização da cobertura com solo argiloso.

VAZÃO E TEMPERATURA DO LIXIVIADO GERADO

A quantidade de lixiviado gerado em um aterro é função basicamente de dois fatores: teor de matéria orgânica e de umidade dos resíduos e a precipitação pluviométrica da região. A avaliação da vazão de líquidos será realizada 1 vez por semana. Os líquidos serão escoados da valeta de coleta através da torneira até a seu

completo esvaziamento. Decorridas 24 horas, o procedimento será repetido com a retenção do volume escoado para aferição.

Para um melhor acompanhamento das águas pluviais, que possivelmente infiltram na célula, está sendo consultado o site da prefeitura www2.rio.rj.gov.br/georio/site/alerta/alerta.htm para verificação dos índices pluviométricos da região.

A temperatura será medida no volume de líquido tomado para a aferição da vazão, com o auxílio de um termômetro de mercúrio em vidro, com escala de -10 a 100°C.

COLETA DAS AMOSTRAS

A primeira amostra corresponderá ao líquido gerado 15 dias após o fechamento das células com a camada de argila. Toda amostra será composta pelo líquido gerado nas células em 24 horas (Figura 3). Em sequência, as amostras serão encaminhadas para os seguintes laboratórios:

Laboratório de Microbiologia da Gerência de Pesquisas Aplicadas da COMLURB para as análises colimétricas e de identificação bacteriana;

Laboratório de Tratamento de Águas e Reúso de Efluentes (LABTARE/EQ/UFRJ) para as análises físico-químicas.

Laboratório de Ecologia Molecular Microbiana do Instituto Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) para a análise molecular.

As coletas de lixiviado serão realizadas mensalmente. As condições climáticas do período (temperatura, índice pluviométrico e umidade relativa do ar) orientarão as frequências das coletas e servirão de base para análise dos resultados. A coleta deve ser feita com a amostra obtida em 24 horas após o escoamento de líquidos do sistema de drenagem.



Figura 3: Coleta da amostra de lixiviado

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LIXIVIADO

Os parâmetros físico-químicos analisados serão: pH, Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), determinação de metais e sólidos totais dissolvidos e suspensos. As análises serão realizadas de acordo com os procedimentos preconizados pela 21ª edição do STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, publicado em conjunto por AWWA, WPCF e APHA (2005).

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO LIXIVIADO

Os procedimentos das análises microbiológicas terão por base as metodologias preconizadas pela Environmental Protection Agency – EPA, American Public Health Association – APHA e pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB (1984, 1993a, bL5.218, bL5.220 e c; 1996). As densidades de coliformes totais, *Escherichia coli* e enterococos serão expressas em números mais prováveis por 100 mL de amostra (NMP/100mL) e determinadas pela Técnica dos Tubos Múltiplos. As ocorrências de *Staphylococcus aureus* e de *Salmonella* e outras enterobactérias serão registradas como presença ou ausência. A identificação das espécies bacterianas foi obtida a partir dos resultados fornecidos pelos testes bioquímicos e sorológicos de acordo com o Manual do Bergey para sistemática bacteriana.

METODOLOGIA PROPOSTA PARA A PCR-DGGE

O protocolo da PCR-DGGE consistirá de 6 etapas: coleta da amostra, extração do ácido nucléico (DNA ou RNA), amplificação pela PCR do gene alvo (geralmente o gene RNAr 16S), separação dos amplificadores da PCR pela DGGE, visualização dos perfis, e análise de dados.

A coleta das amostras será realizada como descrito anteriormente, com o auxílio de um frasco de 1 litro previamente esterilizado por autoclavagem. Posteriormente, a amostra de lixiviado será dividida em 2 alíquotas de 500mL e imediatamente encaminhada ao laboratório.

Para a filtração, cada alíquota de 500 ml será dividida em duas alíquotas de 250mL 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 fim, para a coleta das células bacterianas, as duas alíquotas de 250 mL pré- filtradas serão concentradas em um filtro 0.22µm de porosidade (Sartorius Stedim, FR). A extração do DNA será realizada a partir do material depositado no filtro de 0.22µm de porosidade. Em sequência, as amostras serão mantidas a -20°C até o momento da análise.

A partir dos filtros congelados será realizada a extração do DNA total do lixiviado através do método de extração direta, segundo o protocolo do Kit FastDNA®SPIN for soil da Bio 101 (Califórnia, EUA).

Posteriormente, o DNA precisará ser analisado quanto à pureza e à eficiência das extrações por meio de uma eletroforese em gel de agarose a 0,8% por 15 a 20 minutos. Para visualização do material, o gel deverá ser corado por 15 minutos com Brometo de Etídio na concentração de 2µg/ml e observado utilizando-se um transiluminador com luz ultravioleta. Se a extração de DNA for bem sucedida, o resultado aparecerá sob a forma de bandas relativamente uniformes, no alto do gel de agarose, alinhados com a primeira banda do marcador, ou acima desta.

O DNA obtido a partir das amostras é então amplificado pela reação de polimerização em cadeia (PCR) usando pares de iniciadores (“primers”) de acordo com a região-alvo a ser amplificada. Um dos iniciadores de cada par apresenta um grampo GC, necessário aos experimentos subsequentes de DGGE.

De modo a obter o perfil da comunidade bacteriana contida nas amostras, os iniciadores F968 e 1401R serão combinados em uma reação de PCR a fim de amplificar o segmento compreendido entre os nucleotídeos 968 e 1401 do DNAr 16S. Uma sequência de 31 nucleotídeos deve ser adicionada na extremidade 5’ do iniciador F968 com o objetivo de melhorar a detecção das pequenas variações nucleotídicas contida nos fragmentos obtidos durante o DGGE. A sequência dos iniciadores a serem utilizados está descrita na Tabela 1.

As amplificações foram realizadas no termociclador “Eppendorf Mastercycler® Thermal Cyclers” (Eppendorf, DEU). Cada reação foi realizada em um volume de 50µl em um tubo contendo 5µl do Tampão de PCR com (NH₄)₂SO₄ 10X, 2,5 mM de MgCl₂, 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 observados utilizando-se um transiluminador com luz ultravioleta.

Tabela 1: Sequência de iniciadores

INICIADOR	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA
U96F	5' – AAC GCG AAG AAC CTT AC – 3'
1401R	5' – CGG TGT GTA CAA GAC CC – 3'
GC – grampo	5' – CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG G – 3'

Os experimentos com DGGE serão realizados com o equipamento “Dcode™ Universal Mutation Detection System” (ABOIM *et al.*, 2004, PINHATI, 2008). O gradiente do gel desnaturante pode ser ajustado de acordo com o fragmento de DNA amplificado por PCR. Como, por exemplo, um gel de poliacrilamida com um gradiente linear de desnaturantes de 40% a 70%, formados a partir de soluções estoque de poliacrilamida (6%), uma com 0% e outra contendo 100% dos agentes desnaturantes (100% corresponde a 7M de uréia e 40% de formamida deionizada).

Alíquotas dos produtos de PCR (15 - 25 µl) serão 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 deve ser preparado a partir das soluções estoques 0% e 70% de desnaturantes. O tempo necessário para polimerização será de, no mínimo, 2 horas. Uma vez polimerizados, os géis serão acoplados ao aparelho de DGGE e submetidos à eletroforese a 75 Volts durante 12 horas a 60°C. Como pode ser observado, entre os tubos há uma válvula que, quando aberta, permite a passagem da solução menos concentrada para o tubo contendo a solução mais concentrada. A mistura das soluções é bombeada para os suportes com placas de vidro onde o gradiente é formado.

Ao término da eletroforese, os géis serão 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).

A separação completa da cadeia de DNA é impedida pela presença de um domínio de fusão elevado, que geralmente é criado artificialmente numa extremidade da molécula pela incorporação de um grampo Guanina-Citosina (GC), que nunca desnatura nas circunstâncias escolhidas para a experiência. A adição de um grampo contendo 30 a 40 pb GC a um dos iniciadores da PCR garante que o fragmento de DNA permaneça parcialmente como fita-dupla, impedindo sua completa desnaturação e consequente perda da definição dos padrões eletroforéticos. Isso é realizado durante a amplificação de PCR usando um iniciador de PCR com uma extremidade 5'.

Os géis de DGGE devem ser digitalizados e impressos para análise da diversidade. A similaridade entre as estruturas das comunidades deve ser determinada com base na presença ou ausência de bandas detectadas no gel. É construída uma matriz de acordo com a posição que as bandas ocupam no gel, onde 0 indica ausência e 1, presença.

As matrizes binárias geradas a partir dos dados de PCR-DGGE serão submetidas a análises de agrupamento (*clustering*) com o auxílio do programa STATISTICA 5.0. Será empregado o coeficiente de Pearson para o cálculo da distância métrica e o UFGMA (“Unweighted Pair Group Method Average) para a construção dos dendrogramas, que demonstrarão os agrupamentos existentes e as proximidades entre as amostras avaliadas.

RESULTADOS PRELIMINARES

É importante considerar que avaliações preliminares, até a presente data, comprovam a eficiência do sistema de drenagem de lixiviado e dos gases. A constante geração de lixiviado em quantidades satisfatórias, no colchão de brita, lançado pela abertura da torneira (variando entre /dia) mostram a eficiência do sistema de captação de lixiviado. No entanto, o lixiviado produzido durante esta fase inicial é provavelmente resultado da carga imposta pelo próprio resíduo sobre a massa úmida depositada durante a compactação e construção das células aliada aos períodos de chuva.

Os resultados disponibilizados até o momento são referentes à análise das amostras coletadas após 45 dias de confinamento dos resíduos.

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos através da análise de metais pesados. A coluna à direita exibe os padrões de lançamento de efluentes segundo a Norma Técnica NT-202, R-10 e DZ-205, R06 do Instituto Estadual do Ambiente (INEA). A concentração de metais como o Zn, Cu, Pb e Cd pode ser elevada em aterros jovens devido ao ambiente ácido que permite a solubilização dos íons metálicos. Entretanto, essas considerações serão mais bem avaliadas com a ampliação dos resultados oriundos das análises de monitoramento.

Tabela 2: Concentração de metais pesados no lixiviado das Células após 45 dias de confinamento dos resíduos.

PARÂMETRO	CÉLULA 1	CÉLULA 2	CÉLULA 3	Padrões para Lançamento de Efluentes Líquidos* (Valor máximo)
Níquel (mg/L)	<0,01	<0,01	<0,01	1,0
Chumbo (mg/L)	<0,01	<0,01	<0,01	0,5
Zinco (mg/L)	0,1	0,4	0,1	1,0
Cobre (mg/L)	<0,01	<0,01	<0,01	0,5
Cádmio (mg/L)	<0,01	<0,01	<0,01	0,1
Cromo (mg/L)	<0,01	<0,01	<0,01	0,5

Os dados reportados na literatura sugerem que há uma grande variação nas concentrações de metais pesados de diferentes aterros. Entretanto, essas concentrações são geralmente baixas. Isso foi demonstrado em diversos estudos, nos quais os pesquisadores detectaram as concentrações de metais pesados em grandes aterros, em células experimentais e em ensaios laboratoriais. A concentração de metais pesados é baixa durante a fase metanogênica estável e a liberação para o meio não é considerada problemática.

O pH se apresentou próximo da neutralidade nas 3 células, conforme mostra a Tabela 3. Nos processos de degradação que se sucedem em um aterro, o pH pode ser entendido como o retrato da decomposição biológica da matéria orgânica, uma vez que o desenvolvimento dos micro-organismos está diretamente relacionado às faixas de pH. Os ácidos voláteis são excelentes indicadores do grau de degradabilidade e dos processos anaeróbios, pois são gerados na fase acidogênica e consumidos na fase metanogênica.

Tabela 3: DBO, DQO e pH do lixiviado das Células após 45 dias de confinamento dos resíduos.

PARÂMETRO	CÉLULA 1	CÉLULA 2	CÉLULA 3	Padrões para Lançamento de Efluentes Líquidos* (Valor máximo)
pH	7,7	6,2	7,5	5,0 a 9,0
DQO (mg/L)	91	544	824	< 200
DBO ₅ (mg/L)	16	Nr	Nr	-

Nr, teste não realizado

A relação DBO/DQO tem sido usada como indicador do nível de degradação biológica do lixiviado. A idade do aterro também varia a relação DBO/DQO, e permite estabelecer correlações com o estado de degradação dos percolados. Para aterros jovens, os valores da relação DBO/DQO variam entre 0,5 e 0,8, pois uma fração considerável corresponde a ácidos graxos voláteis. Para aterros antigos, esses valores caem para a variação de 0,04 a 0,08, pois a maior parte dos compostos biodegradáveis já foi degradada.

A razão dos valores DBO e DQO para o lixiviado produzido pelas células sugere que os lixiviados apresentam características de aterro estabilizado (Tabela 3). No entanto, no caso do lixiviado produzido pelas células após

45 dias de confinamento, o valor da relação DBO/DQO pode ser atribuído ao período de aclimação da atividade microbiana, que ocorre assim que os resíduos são aterrados, acrescentando ainda que os valores de ambos os parâmetros ainda apresentam-se bem baixos.

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, que influenciam na entrada de luz e diminui o valor de saturação do oxigênio dissolvido. Os primeiros resultados obtidos da análise do lixiviado da célula para Sólidos Totais e Sólidos Suspensos Totais se mostraram elevados. A salinidade, inferida do parâmetro de Sólidos Dissolvidos Totais (SDT), também se apresentou elevada.

Corroborando esses resultados, o lixiviado produzido pelo aterro metropolitano de Gramacho gera valores de 11434 mg/L para os sólidos totais, 11387 para os sólidos dissolvidos totais e 47 mg/L para os sólidos suspensos totais. Ao correlacionar este último parâmetro com as populações microbianas identificadas no aterro de Gramacho, essa autor observou que os sólidos suspensos totais não foram preponderantes na ordenação dos diversos filos observados nesse lixiviado, sendo provável que a matéria orgânica presente nesse aterro esteja na forma recalcitrante, não sendo mais um elemento crucial na estrutura dessa comunidade.

Quanto à caracterização microbiológica do lixiviado, as amostras analisadas apresentaram ausência de colônias suspeitas de *Salmonella sp* e de *Staphylococcus aureus* com o emprego de métodos de enriquecimento e de inoculação direta em meios seletivos. A colimetria revelou baixo valor, em média, para o NMP (Número Mais Provável/ 100mL) de coliformes totais (23 NMP/ 100mL) e de *Escherichia coli* (13 NMP/ 100mL) e para o grupo dos Enterococos (140 NMP/ 100mL) nas coletas do lixiviado das células com 45 dias de confinamento, conforme mostra a Tabela 4.

Tabela 4: Caracterização microbiológica do lixiviado coletado nas células após 45 dias de confinamento.

PARÂMETRO	CÉLULA 1	CÉLULA 2	CÉLULA 3
Coliformes Totais (NMP/100mL)	33	500.000	30.000
<i>Escherichia coli</i> (NMP/100mL)	26	300.000	23.000
Enterococos (NMP/100mL)	230	300	3.000

Contrapondo-se a esses resultados, a série histórica da caracterização microbiológica do lixiviado da bacia dos caminhões de coleta de RSD do município do Rio de Janeiro, realizada pela COMLURB em 2009, revela valores médios de coliformes totais, *E. coli* e Enterococos da ordem de 10^{10} , 10^9 e 10^8 NMP/100mL, respectivamente. Outro detalhe dessa pesquisa é a presença das espécies *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* na totalidade das amostras analisadas, o que confirma a presença de matéria fecal nos resíduos sólidos domiciliares.

O aspecto límpido das amostras das células aliado a estes resultados preliminares sugerem que há muita infiltração das chuvas e os processos degradativos ainda não estão se refletindo no lixiviado.

A ausência de *Salmonella sp* e de *Staphylococcus aureus* pode ser justificada pela necessidade de aplicação de uma outra metodologia de isolamento destas espécies, bem como pela dificuldade de sobrevivência desses gêneros de bactéria em meios com as características físicas e biológicas (competição microbiana) do lixiviado de resíduos sólidos.

Os micro-organismos cultiváveis típicos do lixiviado de aterro são representados pelo grupo dos Enterococos, por espécies de *Staphylococcus*, particularmente *aureus* e *epidermidis*, pelas Salmonelas e pelas enterobactérias. A técnica de tubos múltiplos, apesar de ser laboriosa, apresenta resultados confiáveis, particularmente, com a introdução do substrato fluorogênico. Pode ser aplicada ao lixiviado na detecção qualitativa e quantitativa de coliformes totais, coliformes termotolerantes, grupo *Enterococcus* e *Pseudomonas aeruginosa* variando-se a série de tubos por diluição, o volume das alíquotas distribuídas em cada tubo e os meios de cultura, conforme as exigências nutricionais de cada micro-organismo.

A técnica de eletroforese em gel desnaturante ainda não foi aplicada, pois será necessário maior número de amostras para um melhor dimensionamento dos procedimentos laboratoriais. Até o presente momento, as

amostras coletadas foram filtradas e estão mantidas a -20°C no Laboratório de Ecologia Microbiana do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes-UFRJ.

Em ecologia microbiana molecular, quando se deseja 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, as técnicas de “fingerprinting” são excelentes ferramentas. É o que se espera obter, neste trabalho, com a DGGE aplicada ao lixiviado de aterro. Contudo, se não for possível estabelecer correlações entre as comunidades microbianas nas diferentes células de resíduos, será necessário identificar as espécies ou os táxons presentes na população através de técnicas de identificação, como a biblioteca de clones, sejam eles clones do gene 16S rRNA ou de genes funcionais. O sequenciamento das bandas de interesse será importante para a detecção dos filos microbianos envolvidos comparando-se com a literatura ou identificando-se a introdução de novos grupos. O desenvolvimento rápido desses métodos de sequenciamento de DNA e o acúmulo da informação de seqüências em bases de dados públicas de livre acesso (como o GenBank ou Ribosomal Database Project) tem permitido o sequenciamento comparativo de genes homólogos entre espécies microbianas e é agora procedimento padrão em sistemática microbiana.

CONCLUSÕES

A diversidade em comunidades microbianas permanece ainda hoje complexa, mas uma importante ferramenta para a ecologia dos micro-organismos. A metodologia ideal para se investigar uma comunidade microbiana caracterizada por mudanças contínuas ao longo do tempo ou variabilidades espaciais, como é o que ocorre no caso do lixiviado de aterro, deve permitir o acesso à riqueza filogenética das populações, bem como ao seu papel metabólico nas diversas etapas de degradação microbiana estabelecidas ao longo do processo de estabilização das áreas de disposição de resíduos sólidos.

O presente trabalho pretende reportar as semelhanças e as diferenças nas comunidades microbianas presentes nos RSD e nos RSS quando dispostos em aterro sanitário através de técnicas tradicionais de cultivo e ensaios físico-químicos e da técnica de eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE). Ainda, espera-se que os resultados obtidos neste trabalho contribuam para a compreensão dos processos de degradação dos resíduos nos aterros.

Diante da hipótese sustentada por esta investigação de que micro-organismos presentes no RSS e no RSD não se diferenciam significativamente quanto ao seu potencial patogênico, a aplicação da técnica de DGGE para determinação das comunidades microbianas presentes no lixiviado destes resíduos codispostos em aterro é uma tentativa inédita de se obterem resultados que permitam considerar desnecessário o tratamento e a disposição final diferenciados para os RSS. Espera-se que a técnica de DGGE seja capaz de gerar padrões de bandamento que reflitam a biodiversidade do lixiviado de aterro no que tange aos impactos ambientais e aos riscos à saúde pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CUSSIOL, N.A.M.; *Disposição final de resíduos potencialmente infectantes*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 2005.
2. 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.
3. MATA-ALVAREZ, J. Biomethanization of the organic fraction of municipal solid waste. 2nd ed., Iwa Publishing, 2002, 323p.
4. 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.
5. LOPES, A. S. 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.

6. 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.
7. 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 micro-organismos*. Mello, I.S., ed.; EDUSP: São Paulo, 2002.
8. 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.
9. 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.