



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**DNA METABARCODING DA MICROBIOTA DO CHORUME DO ATERRO
SANITÁRIO DA CIDADE DE FOZ DO IGUAÇU-PR VISANDO OS PROCESSOS
DE BIORREMEDIAÇÃO**

JOÃO VICTOR FONSECA MOREIRA

Foz do Iguaçu
2019

**DNA METABARCODING DA MICROBIOTA PRESENTE NO CHORUME DO ATERRO
SANITÁRIO DA CIDADE DE FOZ DO IGUAÇU-PR VISANDO OS PROCESSOS DE
BIORREMEDIAÇÃO**

JOÃO VICTOR FONSECA MOREIRA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos

Coorientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini

Dedico este trabalho a minha mãe, Débora.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo à minha orientadora, professora Rafaella, pelos quatro anos de orientação e ensinamentos. Obrigado por me ensinar quão linda a microbiologia é. Muito mais do que conhecimento científico, aprendi o valor da integridade. Nenhum trabalho de conclusão de curso seria grande o suficiente para conter tudo o que aprendi contigo. Ao professor Michel, meu co-orientador, gostaria de agradecer pelos conselhos dados e por todos esses anos ao nosso lado em sala de aula. Sem sua dedicação não seria possível chegarmos até aqui.

Ao Alejandro, por sua paciência e atenção ao me auxiliar no laboratório e ensinar a utilizar o QIIME, permitindo que esse trabalho fosse desenvolvido muito mais rápido.

Ao Eduardo, chefe da divisão do aterro sanitário de Foz do Iguaçu, e toda sua equipe por nos assessorar e serem muito prestativos. Esse trabalho não seria possível sem a colaboração de vocês.

À minha família, por todo o suporte, amor incondicional, e por me permitir viver o sonho de cursar uma universidade pública de qualidade. Valorizo todo o sacrifício feito para que eu chegasse até aqui.

Aos meus colegas de curso, em especial à turma de 2015, que foi minha família por esses cinco anos. Obrigado por todo o apoio, noites em claro estudando juntos, puxão de orelha quando preciso, e por me ensinar o valor da amizade. Dona Gertrudes, obrigado pelas palavras de sabedoria infinita.

Por fim, gostaria de agradecer a UNILA por fornecer um ensino superior de qualidade e apoiar os novos pesquisadores que surgem todos os anos dentro de seus laboratórios.

Fonseca Moreira, João Victor. **DNA metabarcoding da microbiota presente no chorume do aterro sanitário da cidade de Foz do Iguaçu-PR visando os processos de biorremediação**. 2019. 58. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2019.

RESUMO

O chorume é um composto tóxico, malcheiroso e de coloração escura produzido pelo depósito de resíduos sólidos urbanos (RSU) em decomposição. Ele possui uma alta carga de demanda química de oxigênio (DQO), compostos orgânicos xenobióticos tóxicos e metais pesados, com suas concentrações variando conforme questões socioambientais que modulam a produção de RSU. O depósito de RSU em lixões e aterros controlados podem causar a contaminação do solo e do lençol freático pelo chorume, o que pode resultar no consumo de água contaminada e impactos toxicológicos diretos aos seres humanos e animais, um grande problema socioambiental. Os aterros sanitários são construídos visando a captação de chorume e seu tratamento, diminuindo o impacto ambiental. Contudo, o chorume representa um resíduo sem destino correto e problemático para o gerenciamento dos aterros sanitários. Os microrganismos possuem grande flexibilidade e adaptação à ambientes extremos como o chorume, fato demonstrado pela grande diversidade de procariotos presente no chorume nos poucos trabalhos disponíveis na literatura até o momento. O tratamento biológico pode fazer uso desses consórcios microbianos presentes no chorume para sua estabilização e metabolização. Portanto, é necessário o entendimento dessas comunidades microbianas adaptadas para o desenvolvimento de métodos de biorremediação e seu aperfeiçoamento. O DNA metabarcoding é uma metodologia eficiente, rápida e de baixo custo para a caracterização de comunidade inteiras de microrganismos. Este trabalho objetivou a caracterização da microbiota do chorume do aterro sanitário da cidade de Foz do Iguaçu-PR através da técnica de DNA metabarcoding da região 16S. Para tanto foi realizado a extração do DNA total obtido a partir do chorume e o sequenciamento da região V3-V4 do gene 16S do RNAr. O processamento dos dados foi realizado pelo software QIIME2 através da pipeline proposta em etapas consecutivas de Manifest para importação de dados, deduplicação, definição de unidade taxonômica operacional (OTU) e atribuição taxonômica. A análise físico-química do chorume apresentou características mistas das fases ácida e metanogênica. As OTUs identificadas sugerem a dominância de bactérias fermentadoras do filo Firmicutes, com frequência relativa de 41,91%. Outros filos dominantes foram Proteobacteria, Bacteroidetes e Synergistetes. A maior diversidade foi encontrada nas sequências de baixa abundância, indicando grupos diversificados, porém com baixa representatividade, possivelmente com alguma função em determinados nichos ecológicos. A análise da diversidade indicou uma baixa abundância das arqueas metanogênicas e possivelmente a degradação do chorume nos reservatórios é realizada pelos gêneros dominantes através da digestão anaeróbia. O chorume apresentou grupos muito estudados no campo da biorremediação e estudos futuros devem avaliar a capacidade biorremediadora dos microrganismos isolados a partir do chorume.

Palavras-chave: resíduos sólidos urbanos. 16S RNAr. Sequenciamento de próxima geração. Diversidade de procariotos. Tratamento biológico.

Fonseca Moreira, João Victor. **DNA metabarcoding of the microbiota present in sanitarium landfill leachate from Foz do Iguaçu-PR for bioremediation process**. 2019. 58. Undergraduate thesis (Biotechnology Graduation) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2019.

ABSTRACT

Landfill leachate is a toxic, smelly and dark compound produced by municipal solid waste (MSW) disposal. It has a high load of CDO, toxic organic xenobiotic compounds and heavy metals, which concentrations vary by social and environmental factors that modulate the production of MSW. The disposal of MSW in controlled dumps and landfills may cause contamination of the soil and groundwater by leachate resulting in humans and animals poisoning by several toxic compounds, a social and environmental problem. Engineered landfills are built to obtain leachate and to treat it. However, leachate lacks a correct destination and presents a problem for landfill management. Microorganisms have great flexibility and adaptation to extreme environments such as leachate, a fact demonstrated by the great prokaryote diversity present on leachate by the few works available on literature so far. Biological treatment employs microbial consortium present in the leachate for its stabilization and metabolization. Therefore, it is necessary to understand these leachate microbial communities for the development of bioremediation methods. DNA metabarcoding is an efficient, quick and low-cost methodology for whole communities characterization. This work aimed the characterization of the leachate microbiota of the landfill of the city of Foz do Iguaçu-PR by 16S DNA metabarcoding approaches. For this purpose, DNA was extracted from leachate and send to private service sequencing of 16S rRNA V3-V4 regions. Data processing was performed by bioinformatic software QIIME2 through proposed pipeline of consecutive steps of data import by Manifest, deduplication, operational taxonomic unit definition and taxonomic assignment. Physicochemical analysis of leachate showed mixed characteristics from both acid and methanogenic phases. Identified OTUs suggested dominance of fermenting bacteria belonging to Firmicutes phylum, with relative frequency of 41,91%. Other dominant phyla were Proteobacteria, Bacteroidetes and Synergistetes. The greater diversity was found on low-abundance sequences, suggesting diversified groups with low representation, possibly presenting key function on certain ecological niches. Diversity analysis suggested low abundance of methanogenic archaea and that leachate degradation in reservoirs is carried through anaerobic digestion by dominant genera. Leachate sample presented groups extensively studied on bioremediation field and future researches should assess bioremediation capacity of isolated microorganisms from leachate.

Key words: Municipal solid waste. 16S RNAr. Next-generation sequencing. Prokaryote diversity. Biological treatment

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS E SUA DISPOSIÇÃO FINAL.....	10
2.1.1 Aterros Sanitários.....	11
2.2 CHORUME	13
2.2.1 Impacto Ambiental	15
2.2.2 Tratamentos	16
2.2.3 Tratamento Biológico	18
2.2.4 Caracterização Microbiológica do Chorume e Biorremediação	19
2.3 DNA METABARCODING	21
2.3.1 Metodologia de DNA Metabarcoding e Bioinformática.....	22
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 OBJETO DE ESTUDO.....	26
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO CHORUME.....	27
4.3 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL	27
4.4 SEQUENCIAMENTO	28
4.4.1 Avaliação de Qualidade da Amostra	28
4.4.2 Amplificação da Região 16S.....	28
4.4.3 Reação de Indexação	28
4.4.4 Purificação e Quantificação da Biblioteca.....	28
4.5 ANÁLISES BIOINFORMÁTICAS	29
4.5.1 Relatório de Qualidade	29
4.5.1 Manifest e Importação de Dados.....	29
4.5.2 Deduplicação das Sequências.....	29
4.5.3 Open Refence OTUs	30
4.5.4 Atribuição Taxonômica	30
4.5.5 Diversidade Alfa.....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 ESTRUTURA DA COMUNIDADE MICROBIANA	31
5.2 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO CHORUME.....	36

5.3 DIVERSIDADE FUNCIONAL DA COMUNIDADE E BIORREMEDIAÇÃO DO CHORUME	38
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICES	51
APÊNDICE A – TABELA DE FREQUÊNCIA DOS PROCARIOTOS IDENTIFICADOS	52
ANEXOS.....	55
ANEXO A – COMPOSTOS ORGÂNICOS XENOBIÓTICOS OBSERVADOS NO CHORUME (µG/L)	56

1 INTRODUÇÃO

O depósito de rejeitos sólidos, composto por matéria orgânica em decomposição, libera um resíduo líquido lixiviado cujo nome é chorume. Este resíduo, de cor escura e odor nauseante, originado de processos biológicos, químicos e físicos da decomposição é composto principalmente por matéria orgânica, sais inorgânicos, poluentes orgânicos e metais pesados (KJELDSEN et al., 2002). Sua composição é afetada pela idade do aterro, pela profundidade dos dejetos e pelo clima da região ou estação (MOODY; TOWNSEND, 2017), além dos processos físicos, microbianos e químicos que ocorrem no aterro (KJELDSEN et al., 2002).

A contaminação de corpos d'água subterrâneos por conta da dispersão do chorume no solo (MOR; NEGI; KHAIWAL, 2018) é uma importante fonte de contaminação, e estudos vêm demonstrando o potencial citotóxico, genotóxico, embriotóxico e causador de distúrbios reprodutivos dos micropoluentes presentes no chorume (KHALIL et al., 2018; XU et al., 2008).

O chorume pode ser tratado através de processos biológicos aeróbicos e anaeróbicos, processos físico-químicos e tratamentos oxidativos avançados (RENOU et al., 2008; WISZNIOWSKI et al., 2006).

No chorume existe uma grande diversidade de arqueas pertencentes aos filos Euryarchaeota e Crenarchaeota (CHEN, Y.-Q. et al., 2006; HUANG et al., 2003), assim como a dominância dos filos bacterianos Proteobacteria, Spirochaetes, Bacteroidetes, Firmicutes e Termotogas (ZHANG, W. et al., 2011).

A técnica de *metabarcoding* de DNA é uma ferramenta importante para a avaliação em larga escala da biodiversidade de forma rápida e precisa. Ela consiste no emprego de *primers* específicos para cada tipo de organismo durante a amplificação do DNA total de determinado ambiente por reação em cadeia da polimerase (PCR) (RUPPERT; KLINE; RAHMAN, 2019). Esses primers são direcionados aos genes 16S, pois são genes altamente conservados entre diferentes espécies, contendo regiões com variações espécie-específicas (KOLBERT; PERSING, 1999). Essas regiões variáveis são utilizadas para o reconhecimento da riqueza da microbiota, através da bioinformática.

A aplicação da técnica de metabarcoding no DNA obtido de amostras de chorume do aterro sanitário de Foz do Iguaçu elucidou a diversidade da microbiota presente no mesmo e também o potencial biotecnológico que estas possuem para a degradação dos compostos tóxicos presentes no chorume.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS E SUA DISPOSIÇÃO FINAL

A constituição brasileira define, através da lei nº 12.305 de 2 de agosto de 2010 que institui a política nacional de resíduos sólidos:

Art. 3º Inciso XVI - resíduos sólidos: material, substância, objeto ou bem descartado resultante de atividades humanas em sociedade, a cuja destinação final se procede, se propõe proceder ou se está obrigado a proceder, nos estados sólido ou semissólido, bem como gases contidos em recipientes e líquidos cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou em corpos d'água, ou exijam para isso soluções técnica ou economicamente inviáveis em face da melhor tecnologia disponível. (BRASIL, 2010).

Segundo o plano nacional de resíduos sólidos (2012), a composição dos resíduos sólidos urbanos (RSU) é dividida em materiais recicláveis, matéria orgânica e outros resíduos que não se enquadram nas duas primeiras categorias. A matéria orgânica é a que possui maior participação na composição dos resíduos sólidos (51,4%), seguido pelo material reciclado (31,9%) e outros resíduos (16,7%), como mostrado na tabela 1. A composição dos RSU varia de uma região para outra conforme os aspectos sociais, econômicos, tecnológicos, sanitários e culturais (SOARES, 2011).

Tabela 1 - Estimativa da composição gravimétrica dos resíduos sólidos urbanos coletados no Brasil em 2008

Resíduos	Participação (%)	Quantidade (t/dia)
Material reciclável	31,9	58.527,40
Metais	2,9	5.293,50
Aço	2,3	4.213,70
Alumínio	0,6	1.079,90
Papel, papelão e tetrapak	13,1	23.997,40
Plástico total	13,5	24.847,90
Plástico filme	8,9	16.399,60
Plástico rígido	4,6	8.448,30
Vidro	2,4	4.388,60
Matéria orgânica	51,4	94.335,10
Outros	16,7	30.618,90
Total	100,0	183.481,50

Fonte: Ministério do Meio Ambiente, 2012, p. 10.

Segundo o último panorama dos resíduos sólidos no Brasil da Abrelpe (2017), foram produzidas cerca de 78,4 milhões de toneladas de RSU no ano de 2017, onde 91,2% destes foram coletados e, portanto, 6,9 milhões de toneladas de RSU tiveram a destinação incorreta. Um total de 42,3 milhões de toneladas (59,1% do RSU coletado), foram enviados para aterros sanitários e 29,3 milhões de toneladas foram enviadas para lixões ou aterros controlados.

Em Foz do Iguaçu, a composição gravimétrica em 2012 dos RSU se deu

por 57,35% de matéria orgânica, 1,92% de metais, 5,26% de papel e papelão, 9,52% de plásticos, 3,72% de vidros e 22,24% de outros compostos (SECRETARIA MUNICIPAL DO MEIO AMBIENTE, 2012).

A destinação final dos RSU é feita em lixões, aterros controlados e aterros sanitários. Os lixões são locais sem sistemas e isolamento espacial, onde os RSU são simplesmente descartados no solo a céu aberto (GOUVEIA, 2012). Os aterros controlados possuem isolamento espacial para impedir a entrada de pessoas não autorizadas e os RSU são depositados em valas, em contato direto com o solo, que são cobertas com camadas de solo após o seu preenchimento total (GOUVEIA, 2012). A contaminação do solo, dos lençóis freáticos e da atmosfera pelos compostos poluentes presentes nos RSU e produzidos durante sua decomposição ocorre tanto nos lixões como nos aterros controlados (PALERMO; GOMES, 2017). Os aterros sanitários são a forma mais segura atualmente para a destinação dos resíduos sólidos, pois são construídos baseados em sistemas consolidados de engenharia e gerenciados por normas operacionais estritas (PALERMO; GOMES, 2017). Atualmente, o número de municípios que utilizam os aterros sanitários no Brasil ainda não supera o número de municípios que dispõem de lixões e aterros controlados, como mostra a tabela 2.

Tabela 2 - Quantidade de municípios por tipo de destinação final adotada em 2017

Destinação	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sudeste	Sul	Brasil
Aterro sanitário	90	449	159	817	703	2.218
Aterro controlado	108	484	159	634	357	1.742
Lixão	252	861	149	217	131	1.610
Total	450	1.794	467	1.668	1.191	5.570

Fonte: ABRELPE, 2018, p. 20.

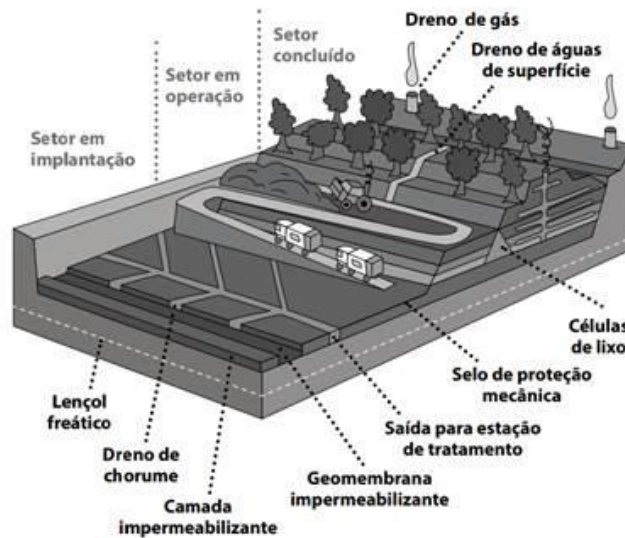
2.1.1 Aterros Sanitários

Os aterros sanitários foram desenvolvidos para minimizar o impacto ambiental e sanitário que o depósito indevido de RSU e sua degradação causam. Antes da instalação de um aterro sanitário alguns critérios devem ser levados em consideração, como a escolha de uma localização adequada, que tenham proximidade máxima de 200 metros de corpos d'água relevantes e 50 metros de qualquer corpo d'água; uma distância mínima de 1000 metros de áreas populacionais com mais de 200 habitantes; não seja próximo a aeroportos; tenha uma distância mínima de 1,5 metros do lençol freático no caso de impermeabilização por manta plástica sintética e 2,5 metros no caso de impermeabilização por geomembrana; o solo deve possuir impermeabilização natural (solo

argiloso); facilidade de acesso a veículos pesados; e proximidade a fontes de material de cobertura (ZVEIBIL, 2001). Uma vez escolhido o local, ocorre um processo de licenciamento ambiental para a instalação do aterro, que são estudos de viabilidade e de locais alternativos, estudo de impacto ambiental e relatório de impacto ambiental (EIA e Rima) e audiências públicas, todos estes necessários para a liberação de uma licença prévia (ZVEIBIL, 2001). Para a licença de instalação é necessário a elaboração do projeto executivo e, depois de liberado, é feita a construção do aterro e inspeção pelo órgão ambiental para liberar a licença de operação (ZVEIBIL, 2001).

O funcionamento dos aterros sanitários se inicia com a pesagem dos caminhões carregados de RSU que chegam ao local. Os RSU são levados até o setor em operação onde são depositados sobre uma camada impermeabilizante que não permite o contato direto com o solo, podendo ser uma manta plástica sintética ou uma geomembrana de argila compactada de baixa permeabilidade (SANTOS, 2011; ZVEIBIL, 2001). A célula de RSU depositada é então compactada por tratores para diminuir seu volume o máximo possível, otimizando assim, a área do aterro utilizada (SANTOS, 2011). Ao fim do dia, a célula compactada é coberta por uma camada fina de solo. Já quando as células de RSU atingem a altura máxima estipulada é aplicada uma manta impermeável juntamente com uma camada grossa de solo onde será plantada grama e arbustos para evitar a erosão das células (SANTOS, 2011). Também são usados sistemas de tubulações para drenagem do chorume e do biogás produzidos, assim como das águas superficiais acumuladas pela chuva (SANTOS, 2011), (Figura 1). O biogás pode ser reaproveitado ou queimado para evitar seu acúmulo na atmosfera, e o chorume é drenado para lagoas de tratamento (SANTOS, 2011) ou reservatórios. Nas áreas limítrofes do aterro sanitário são plantadas árvores de grande porte (geralmente eucaliptos) para impedir a dispersão de odores oriundos do aterro e atenuar sua poluição visual (CONSONI et al., 2018).

Figura 1 - Esquema de instalação e funcionamento de um aterro sanitário

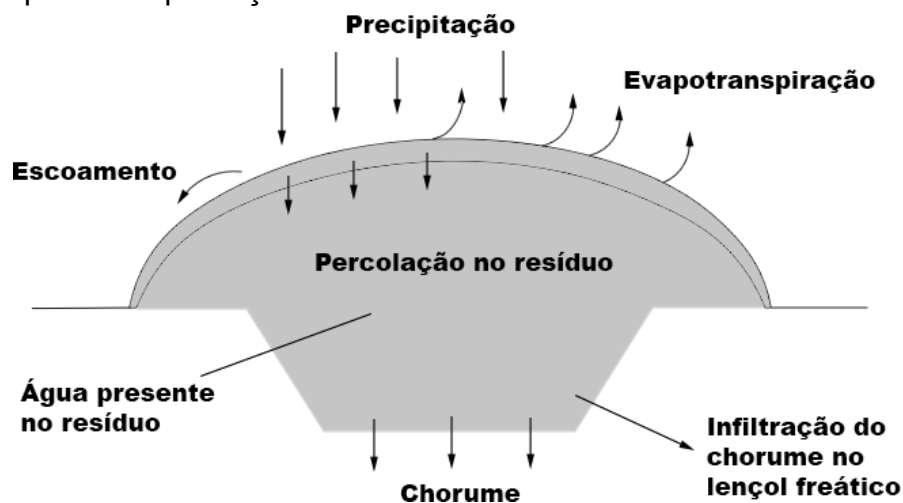


Fonte: PALERMO; GOMES, 2017, p. 161.

2.2 CHORUME

O chorume é um composto líquido com odor característico, escuro e de alta demanda bioquímica de oxigênio, produzido a partir da infiltração da água da chuva nas camadas de RSU que se soma à umidade do efluente e ao líquido produzido pela decomposição da matéria orgânica (PALERMO; GOMES, 2017). Os processos físicos, químicos e microbiológicos da decomposição dos RSU causam a transferência dos poluentes presentes nas camadas de RSU para a água percolada (KJELDSEN et al., 2002). Os processos físicos da produção do chorume são demonstrados na figura 2.

Figura 2 - Esquema da produção de chorume em aterros controlados



Adaptado de: MORLING, 2007

Existem cinco fases de degradação biológica dos resíduos sólidos, que irão

variar conforme a idade do aterro sanitário: (I) uma fase aeróbica inicial, (II) uma fase anaeróbica ácida, (III) uma fase metanogênica inicial, (IV) uma fase metanogênica estável e (V) uma fase aeróbica final oxidativa (ADHIKARI et al., 2014; KJELDSEN et al., 2002). Cada uma dessas fases irá ter um impacto direto na composição do chorume. O chorume de um aterro com menos de cinco anos contém uma grande quantidade de matéria orgânica biodegradável (muitos ácidos graxos voláteis e poucos compostos de alto peso molecular) (ADHIKARI et al., 2014). Já em aterros maduros a composição orgânica do chorume passa a ser de compostos de alto peso molecular (ADHIKARI et al., 2014), tornando este líquido mais tóxico (tabela 3).

Tabela 3 - Composição do chorume com parâmetros em valores médios e variáveis para a fase ácida e fase metanogênica e valores médios para parâmetros que não apresentam diferença observada entre as fases

Parâmetro	Fase ácida		Fase metanogênica		Média
	Média	Varição	Média	Varição	
pH	6,1	4,5-7,5	8,0	7,5-9,0	-
DBO ₅	13.000	4.000-40.000	180	20-550	-
DQO	22.000	6.000-60.000	3.000	500-4.500	-
DBO ₅ /DQO	0,58	-	0,06	-	-
Cádmio	-	-	-	-	0,005
Cálcio	1200	10-2.500	60	20-600	-
Chumbo	-	-	-	-	0,09
Cloreto	-	-	-	-	2.120
Cobalto	-	-	-	-	0,05
Cobre	-	-	-	-	0,065
Cromo	-	-	-	-	0,28
Ferro	780	20-2.100	15	3-280	-
Fósforos totais	-	-	-	-	6
Magnésio	470	50-1.150	180	40-350	-
Manganês	25	0,3-65	0,7	0,03-45	-
Mercúrio	-	-	-	-	0,0002
Níquel	-	-	-	-	0,17
Nitrogênio amoniacal	-	-	-	-	740
Potássio	-	-	-	-	1.085
Sódio	-	-	-	-	1.340
Sulfato	500	70-1.750	80	10-420	-
Zinco	5	0,1-120	0,6	0,03-4	-

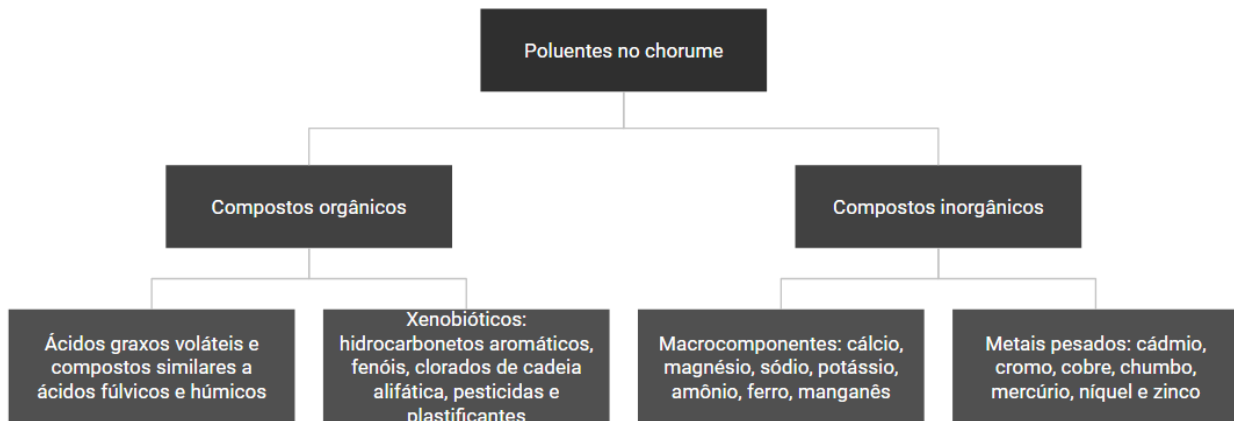
Adaptado de: KJELDSEN et al., 2002, p. 306; MORLING, 2007, p. 181.

Nota: todos os valores em mg.L⁻¹ exceto pH.

A composição dos poluentes do chorume pode ser dividida em quatro grupos principais (figura 3): matéria orgânica dissolvida composta por ácidos graxos voláteis e compostos refratários semelhantes a compostos fúlvicos e húmicos; macrocomponentes inorgânicos (tabela 3) composto por cálcio (Ca²⁺), magnésio (Mg²⁺), sódio (Na⁺), potássio (K⁺), amônio (NH₄⁺), ferro (Fe²⁺), manganês (Mn²⁺), cloreto (Cl⁻),

sulfeto (SO_4^{2-}) e carbonato de hidrogênio (HCO_3^-); metais pesados (tabela 3), composto por cádmio (Cd^{2+}), cromo (Cr^{3+}), cobre (Cu^{2+}), chumbo (Pb^{2+}), mercúrio (Hg), níquel (Ni^{2+}) e zinco (Zn^{2+}); e compostos orgânicos xenobióticos (anexo A) presentes em baixas concentrações (menos de 1 mg/L) que incluem hidrocarbonetos aromáticos, fenóis, clorados de cadeia alifática, pesticidas e plastificantes (KJELDSEN et al., 2002).

Figura 3 – Classificação dos poluentes presentes no chorume



Fonte: KJELDSEN et al., 2002.

2.2.1 Impacto Ambiental

A falta de impermeabilização do solo e ausência de drenagem do chorume nos lixões e aterros controlados causa a infiltração do mesmo no solo. Após esse processo, o chorume passa a ser diluído no lençol freático ou em um corpo d'água adjacente, contaminando o mesmo (CHRISTENSEN et al., 2001). Os aterros sanitários, apesar de possuírem sistemas de impermeabilização do solo e ductos coletores de chorume, não estão livres de potenciais vazamentos causados pela falha do sistema de impermeabilização do aterro (PALERMO; GOMES, 2017), que pode ser causado tanto pela má gestão, pelo emprego de materiais de pouca qualidade durante a construção e manutenção do aterro sanitário ou pela degradação da geomembrana (SUN et al., 2019). Uma vez que o chorume se infiltre no lençol freático ou nos corpos d'água sua dispersão é imprevisível e irá depender de fatores como gradiente hidráulico, viscosidade e densidade do chorume, viscosidade da água e temperatura do chorume e da água (CHRISTENSEN et al., 2001). Estes fatores podem causar uma dispersão local, de poucos metros, ou até mesmo quilômetros de distância da origem da contaminação (CHRISTENSEN et al., 2001).

A presença do chorume na água e no solo pode causar uma perturbação da microbiota presente na mesma, principalmente devido ao seu pH ácido ou alcalino (a depender da idade do aterro que o originou) assim como devido aos compostos tóxicos e

xenobióticos presentes no mesmo (KJELDSEN et al., 2002).

O consumo de água contaminada por choroume apresenta um grande problema socioambiental em populações não atendidas pelo saneamento básico, como populações ribeirinhas cujo rio esteja contaminado, por conta da matriz complexa de poluentes presentes no choroume (apresentado na seção 2.2 e nas tabelas 3 e 4). Khalil e colaboradores (2018) avaliaram o potencial citotóxico e mutagênico do choroume utilizando queratinócitos humanos modificados (HaCaT) expostos a diferentes concentrações de choroume. A citotoxicidade foi avaliada através da atividade da enzima mitocondrial desidrogenase dependente de NAD(P)H, um indicador de viabilidade celular, e mostrou uma redução brusca da viabilidade celular com menos de 30% de células vivas expostas à altas concentrações das amostras A e B de choroume. O dano ao DNA foi avaliado através de ensaio cometa, que quantifica o número de quebras da fita de DNA através de uma eletroforese, e apresentou um alto índice de dano em todas as amostras de choroume não-tratado. Este estudo demonstra como o choroume impacta negativamente a saúde ao entrar em contato com o corpo humano.

2.2.2 Tratamentos

Os aterros sanitários devem possuir sistemas de tratamento e estabilização do choroume coletado (ZVEIBIL, 2001). O quadro 1 demonstra os tratamentos para o choroume atuais que não envolvem processos biológicos. Segundo Renou e colaboradores (2008), no ano de 2002, 46% do tratamento do choroume na França era feito por métodos biológicos, 18% por membranas de filtração, 13% por métodos físico-químicos e 23% por outros métodos ou transferência para outras plantas de tratamento. No Brasil, segundo Costa, Alfaia e Campos (2019), a maioria dos aterros sanitários utilizam o tratamento biológico como tratamento único para o choroume.

Quadro 1 - Métodos não-biológicos de tratamento do chorume

Método	Descrição
Físicos, químicos ou físico-químicos Coagulação-floculação	Utilização de um (ou mais) composto coagulante (sulfato de alumínio, sulfato ferroso, cloreto férrico ou cloro sulfato férrico) para o pré-tratamento do chorume ou no tratamento final para remoção de matéria orgânica não-degradável. A adição de composto floculante pode ser feita para otimizar o processo.
Flotação	Consiste no borbulhamento de ar no chorume para a separação da solução por formação de espuma contento coloides, íons, macromoléculas, microrganismos e fibras. Poucos estudos visando a aplicação do método no tratamento do chorume.
Adsorção	Utilização de um composto com propriedades adsorptivas, geralmente carvão ativado. Permite a remoção de até 50-70% da DQO e nitrogênio amoniacal, além de metais pesados. É utilizada como uma das etapas de tratamentos integrados do chorume (químico-físico-biológico).
Air stripping	Consiste na transferência dos compostos voláteis do chorume para a fase gasosa, em uma torre chamada de <i>air stripper</i> . O chorume é pulverizado no topo da torre, enquanto o ar é bombeado na base da mesma, removendo os compostos voláteis. Esse método precisa de valores altos de pH para ser eficiente, e os gases devem ser tratados posteriormente com ácido. É o método mais comum para a remoção em alta concentração de nitrogênio amoniacal.
Precipitação química	É utilizada como pré-tratamento do chorume para remoção de nitrogênio amoniacal. Sais que podem ser utilizados como agentes precipitadores: cloreto de magnésio, fosfato de sódio bifásico, hidróxido de cálcio ou estruvita.
Ajustamento de pH	Faz parte do pré-tratamento do chorume e é combinada com outros métodos. É feita com adição de ácidos ou bases na solução para correção do pH, possibilitando a floculação de compostos orgânicos, inorgânicos e partículas suspensas.
Oxidação química	É feita para a degradação de compostos orgânicos solúveis que não podem ser removidos fisicamente e/ou não são metabolizados pelos processos biológicos. Os oxidantes químicos comuns são cloro, permanganato de potássio, cloridrato de cálcio e ozônio. A remoção da DQO é de 20-50%.

(continuação)

Método	Descrição
Membranas de filtração	
Microfiltração	É a utilização de uma membrana com microporos que irá reter moléculas de alto peso molecular quando o chorume passar pela mesma. Deve ser utilizada em conjunto a outros métodos, como pré-tratamento para ultrafiltração, nanofiltração e osmose reversa.
Ultrafiltração	Nesse método são utilizadas membranas de poros entre 1 a 100 nm e uma força matriz maior que nos outros processos. Pode ser utilizada como um pré-tratamento do chorume antes da osmose reversa pois pode remover compostos de alto peso molecular.
Nanofiltração	Diferente da ultrafiltração, a nanofiltração pode remover compostos de baixo peso molecular (entre 200 e 2000 Da). É capaz de remover até 70% da DQO do chorume.
Osmose reversa	É um dos métodos mais promissores e eficientes da nova geração para o tratamento do chorume. Mais de 90% da DQO do chorume pode ser removida por esse método. O maior obstáculo para sua utilização é o entupimento das membranas de filtração (assim como nos outros métodos de filtragem) e a geração de um composto altamente concentrado que precisa de tratamento posterior ou descarte.
Oxidação avançada	
Ozonização	Combinação da ozonização com outros compostos para aumentar o número de radicais hidroxilas (melhorando a oxidação do chorume) como peróxido de hidrogênio e catalizadores, aumento do pH (maior que 8,5) ou tratamento por eletromagnetismo. O radical hidroxila é o segundo oxidante mais forte (após o flúor) e não é específico.
Processo de Fenton	Utiliza a combinação do peróxido de hidrogênio com o íon ferroso em pH 3.0 para produzir radical hidroxila, conhecido como processo de Fenton. A sua eficiência na oxidação é de até 70%.

Fonte: RENO et al., 2008; WISZNIOWSKI et al., 2006.

2.2.3 Tratamento Biológico

O tratamento biológico do chorume possui muita relevância no Brasil (COSTA; ALFAIA; CAMPOS, 2019), principalmente por ser uma via de baixo custo comparado aos processos físico-químicos e de membranas de filtração. Apesar disso, esse cenário demonstra que o Brasil está atrasado tecnologicamente em relação aos países desenvolvidos (RENOU et al., 2008) pois o tratamento adequado é feito através da combinação dos métodos biológicos com os não-biológicos. O quadro 2 demonstra os

principais tratamentos biológicos do chorume.

Quadro 2: Métodos biológicos de tratamento do chorume

Método	Descrição
Lagoa de estabilização anaeróbica	São lagoas mais profundas (3 a 5 metros) que as aeróbicas, para impedir o crescimento de microrganismos fotossintéticos (e produção de O ₂ , por consequência). Os microrganismos anaeróbicos possuem uma metabolização mais lenta dos compostos orgânicos, mas em compensação produzem menos lodo.
Lagoa de estabilização aeróbica	Consiste em lagoas que recebem o chorume onde a comunidade microbiana aeróbica converte seus compostos em metano e gás carbônico e lodo, o que requer uma maior área de operação e menor profundidade. Depende de temperaturas altas para seu funcionamento ótimo. Possuem a capacidade de remoção da DQO entre 55-64% e remoção de até 88% dos compostos fenólicos.
Lodo ativado	É um método menos utilizado para o tratamento do chorume por não ser tão eficiente quanto no tratamento de esgoto. Consiste de um sistema composto de gradeamento, removedor de areia, decantador primário, reator (para degradação dos compostos orgânicos pelos microrganismos), e decantador secundário. O resultado do processo é o lodo livre de poluentes.
Filtros biológicos	Podem ser compostos de microrganismos aeróbicos quanto anaeróbicos. Os microrganismos são imobilizados em um suporte inerte e o chorume passa por ele, sendo tratado à medida que os microrganismos o utilizam como substrato para seu crescimento.
Wetlands	Os <i>wetlands</i> são sistemas construídos baseado nos pântanos. Existe um substrato por onde irá circular o chorume a ser tratado e nele estão presentes plantas, que irão realizar o tratamento desse efluente. Os microrganismos da rizosfera e do solo também possuem papel na degradação dos compostos orgânicos e remoção de metais pesados.

Fonte: RENO et al., 2008; WISZNIOWSKI et al., 2006.

2.2.4 Caracterização Microbiológica do Chorume e Biorremediação

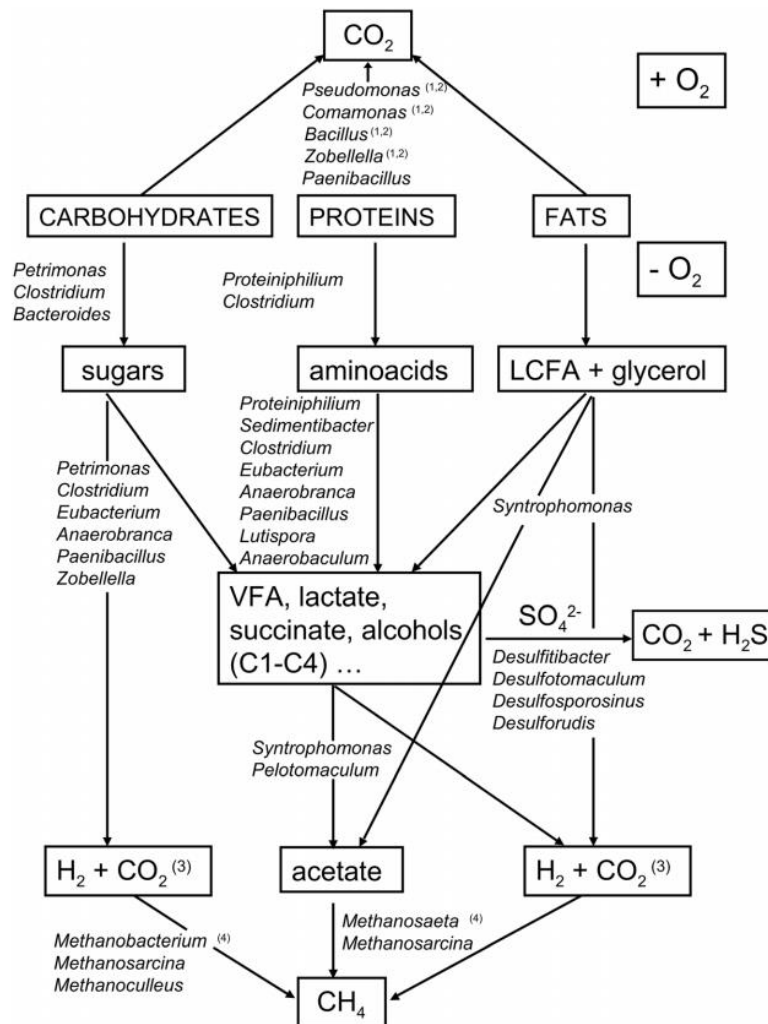
Segundo Weaver e colaboradores (2019), a análise microbiana de aterros e do chorume costumava ser feita por métodos tradicionais de cultivo, como UFC (unidade formadora de colônias) e número mais provável (NMP). Krishnamurthi e Chakrabarti (2013) comparou a diversidade de bactérias presentes no aterro de Chandigarh, Índia, por métodos dependentes e independentes de cultivo, e os autores sugerem a utilização dos métodos independentes de cultivo por não possuírem viés proveniente do meio de cultivo

e das condições de cultivo.

Os métodos moleculares ganharam grande destaque no âmbito da caracterização microbiológica dos aterros e do chorume, pois permitem a identificação de microrganismos que não podem ser cultivados em laboratório. O avanço das técnicas moleculares de *high throughput* (alto rendimento), nomeadas sequenciamento de nova geração (*next generation sequencing*), possibilitaram a caracterização de comunidades microbianas inteiras de forma rápida e em grandes quantidades (WEAVER et al., 2019). Essas técnicas envolvem novas metodologias que são mais rápidas que o sequenciamento de Sanger. Entre elas está o pirosequenciamento 454, utilizado por Köchling e colaboradores (2015) na caracterização microbiana do chorume do aterro de Candeias, Recife-PE, através da amplificação das regiões V6-V8 do gene 16S; e o sequenciador Illumina Miseq, utilizado por Dao e colaboradores (2016) para sequenciar o gene 16S rRNA que foi amplificado por PCR, utilizando primers universais, a partir da amostra de chorume.

O tratamento biológico do chorume se baseia na competência que os microrganismos possuem em metabolizar os compostos poluentes. A composição dos resíduos sólidos define a composição do chorume, e como ela varia conforme o aterro e sua idade, grupos diferentes de microrganismos são encontrados em abundância variada (DAO et al., 2016; KÖCHLING et al., 2015; STALEY; DE LOS REYES; BARLAZ, 2012). A figura 4 demonstra as diversas rotas metabólicas de uma comunidade microbiana presente no chorume do aterro de Candeias, proposta por Köchling e colaboradores (2015). Grupos diferentes, em níveis taxonômicos diferentes, possuem papel fundamental na metabolização dos diversos compostos tóxicos do chorume. Por esse motivo, o conhecimento da diversidade microbiana é imprescindível para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas de biorremediação do chorume.

Figura 4 – Diagrama da metabolização dos compostos orgânicos presentes no chorume



Fonte: KÖCHLING et al., 2015.

2.3 DNA METABARCODING

A técnica de DNA *barcoding* consiste na identificação de organismos por determinadas regiões do genoma, com tamanhos variando entre 400 a 800 pares de base (AJMAL ALI et al., 2014). O DNA é coletado e amplificado por PCR utilizando *primers* específicos (RUPPERT; KLINE; RAHMAN, 2019) que irão variar para o grupo ao qual o organismo pertence (16S em procaríotos e 18S em eucariotos). Esses genes, apesar de serem altamente conservados, possuem regiões hipervariáveis que funcionam como código de barras para a identificação em nível de espécies (KOLBERT; PERSING, 1999). As sequências amplificadas são sequenciadas e, através da bioinformática, é feita a identificação das espécies.

O DNA metabarcoding é a aplicação da técnica de DNA barcoding em nível de comunidades inteiras baseada na amplificação de amostras ambientais de DNA (PAVAN-

KUMAR; GIREESH-BABU; LAKRA, 2015; TABERLET; COISSAC, 2012). A metagenômica, apesar de fornecer um nível maior e mais completo de informações, é muito mais onerosa e lenta comparada com a técnica de DNA metabarcoding (PAVAN-KUMAR; GIREESH-BABU; LAKRA, 2015), quando o objetivo é o conhecimento da diversidade de microrganismos.

Ambientes extremos, como o chorume, possuem microrganismos altamente adaptados a ele. Isto causa uma impossibilidade de cultivar estes microrganismos em laboratório. Portanto, por ser uma técnica independente de cultivo, e objetiva, diferente da metagenômica, o DNA metabarcoding é uma ferramenta valiosa e rápida para a identificação e avaliação da biodiversidade desses ambientes (HUSSAIN et al., 2018; VILLAVERDE et al., 2018).

2.3.1 Metodologia de DNA Metabarcoding e Bioinformática

Segundo Ruppert, Kline e Rahman (2019) as metodologias na literatura referentes ao DNA metabarcoding se diferem substancialmente e, portanto, uma padronização das técnicas não é possível devido às diferentes rotas de processamento inerentes ao tipo de amostra (água, solo, sedimento, esgoto, etc).

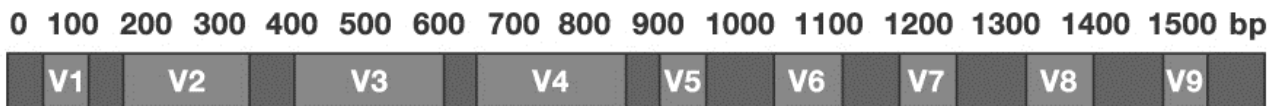
Os laboratórios devem ter rotinas bem estabelecidas de descontaminação, pois qualquer DNA alheio que contamine a amostra pode causar resultados incorretos (RUPPERT; KLINE; RAHMAN, 2019). Para isso, é necessário que os equipamentos não sejam removidos e que seja feita a descontaminação periódica das instalações e dos equipamentos (RUPPERT; KLINE; RAHMAN, 2019).

A coleta da amostra deve ser feita pensando-se na hipótese a ser respondida, para que o resultado represente a diversidade real. A extração do DNA geralmente é feita utilizando kits, e nesse caso deve-se utilizar o kit mais apropriado aos organismos de interesse e ao tipo de amostra (DEINER et al., 2015).

A escolha ou elaboração dos primers a serem utilizados na PCR é uma das etapas mais críticas para a técnica (RUPPERT; KLINE; RAHMAN, 2019), pois o primer também define o quão representativo serão os resultados em relação à diversidade real do ambiente (BAKER; SMITH; COWAN, 2003). A figura 5 demonstra o gene ribossomal 16S de procariotos e suas regiões conservadas e variadas. A região V4 é o alvo mais utilizado em primers para avaliação da diversidade de procariotos por demonstrar precisão e ser reprodutível (MORALES GÓMEZ, 2019). Os fragmentos amplificados por PCR para DNA metabarcoding são chamados de amplicons. Os primers usados no DNA metabarcoding

são desenvolvidos para amplificar o gene 16S acrescentando a ele tags moleculares (*barcodes* de quatro a cinco nucleotídeos) para identificar as amostras e facilitar o seu processamento posterior. Essa etapa embutida na PCR é chamada de *multiplexing* (PAVAN-KUMAR; GIREESH-BABU; LAKRA, 2015).

Figura 5 – Gene ribossomal 16S com suas regiões conservadas em cinza escuro e variáveis em cinza claro



O quadro 3 demonstra as plataformas de sequenciamento e suas características. A escolha da plataforma dependerá da necessidade do projeto de pesquisa e dos recursos disponíveis.

Quadro 3 - Comparação das tecnologias de NGS disponíveis

Plataforma	Comprimento de leitura (bp)	Número máximo de reads por corrida	Tamanho do arquivo gerado	Tempo
Roche 454 GS FLX	400-500	1x10 ⁶	450 Mb	10 horas
Roche 454 GS FLX+	600-800	1x10 ⁶	700 Mb	23 horas
Roche 454 GS Junior	400	1x10 ⁵	~35 Mb	10 horas
Roche 454 GS junior+	~700	1x10 ⁵	~70 Mb	18 horas
Illumina Hi Seq 2500	100-200	3x10 ⁸	10-300 Gb	7-60 horas
Illumina Hi Seq 3000	100-200	2x10 ⁹	125-750 Gb	<1-3,5 dias
Illumina Hi Seq 4000	100-200	2x10 ⁹	125-1500 Gb	<1-3,5 dias
Illumina Mi Seq	100-300	7x10 ⁶	0,3-15 Gb	5-55 horas
AB SOLiD 5500 system	35-75	2.4x10 ⁹	~100 Gb	4 dias
AB SOLiD 5500xl system	35-75	6x10 ⁹	~250 Gb	7-8 dias
Ion Torrent 314 chip	100-200	1x10 ⁹	≥10 Mb	3,5 horas
Ion torrent 316 chip	100-200	6x10 ⁶	≥ 100 Mb	4,7 horas
Ion Torrent 318 chip	100-200	11x10 ⁶	≥ 1 Gb	5,5 horas

Adaptado de: PAVAN-KUMAR; GIREESH-BABU; LAKRA, 2015, p. 3.

O sequenciamento gera um arquivo contendo os *reads* e seus valores de qualidade (PAVAN-KUMAR; GIREESH-BABU; LAKRA, 2015). Os *reads* são processados através de softwares de bioinformática em sequências de passos (*pipelines*). Uma *pipeline* pode ser resumida em três etapas principais: o pré-processamento dos dados que consiste no agrupamento dos dados por amostra de origem (usando os *barcodes* como guia) e o *demultiplexing*, que é a remoção dos *barcodes* inseridos durante a PCR; a limpeza e remoção de ruídos do dados (*denoising*), que consiste na remoção de *reads* contendo nucleotídeos ambíguos, homopolímeros, *reads* contendo menos de 10 bp e *reads* com

baixa ocorrência, sequências de ocorrência única (*singletons*), sequências quiméricas causadas por erro na PCR e sequências idênticas (deduplicação, mantendo apenas uma cópia de cada sequência); e a análise dos dados que é feita pelo agrupamento taxonômico com identidade mínima de 97% em OTUs e identificação dos OTUs através da sua comparação com banco de dados consolidados, chamado de *BLASTing* (PAVAN-KUMAR; GIREESH-BABU; LAKRA, 2015). Uma pipeline adequada garante a qualidade dos resultados e a representatividade da diversidade real de um ambiente.

3 OBJETIVOS

O presente projeto teve como objetivo a caracterização da microbiota do chorume do aterro sanitário da cidade de Foz do Iguaçu-PR através da técnica de DNA metabarcoding da região 16S.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Coletar a amostra de chorume e extrair o DNA total;
2. Analisar as características físico-químicas do chorume;
3. Amplificar e sequenciar a região 16S da amostra;
4. Processar e analisar os dados brutos de sequenciamento usando ferramentas de bioinformática;
5. Caracterizar a diversidade de bactérias e arqueas;
6. Avaliar a diversidade e o potencial de biorremediação dos compostos tóxicos do chorume.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBJETO DE ESTUDO

O aterro sanitário de Foz do Iguaçu ($25^{\circ}27'47.9''S$ $54^{\circ}36'26.4''W$) fica localizado na região noroeste da cidade, próximo aos bairros Jardim Califórnia e Porto Belo. O aterro possui uma área total de $389.737,44 \text{ m}^2$ e é composto por três células de depósito de RSU, onde a célula 1 e 2 possuem seis camadas cada e sua área é de $58.387,15 \text{ m}^2$ e $61.584,01 \text{ m}^2$, respectivamente. O depósito de resíduos na célula 1 ocorreu de 2001 até 2010, e na célula 2 de 2010 a 2017 (SECRETARIA MUNICIPAL DO MEIO AMBIENTE, 2012). A célula 3 iniciou sua operação em julho de 2017 e possui área de $64.780,63 \text{ m}^2$.

No aterro sanitário existem quatro reservatórios que recebem o chorume produzido nas células de RSU. A figura 6 mostra a configuração física do aterro e o local da coleta, indicado pela seta branca.

Figura 6 - Visão aérea do aterro sanitário de Foz do Iguaçu



Fonte: GOOGLE MAPS, 2019

Segundo relatado pelo chefe de divisão de aterro sanitário, Eduardo Roberto Duarte, até o mês de setembro de 2019 o chorume bruto era apenas bombeado dos reservatórios para as células do aterro (processo de recirculação). No dia 20 de setembro de 2019 foi inaugurada no aterro a estação de tratamento de chorume por osmose reversa, a primeira do Paraná. O chorume passou então a ser bombeado dos reservatórios até a estação, onde passa por filtragens e tem seu pH corrigido para 6,4. Após a osmose reversa, o concentrado resultante é bombeado para as células de RSU inativas, sendo recirculado. Já a água pura é armazenada em um reservatório e utilizada para diversas operações dentro do aterro. Esse reservatório de água contém peixes como indicadores biológicos. Apesar da estação inaugurada, o aterro ainda depende grandemente do tratamento biológico para a degradação do concentrado resultante.

A coleta da amostra foi realizada no dia 15 de maio de 2019, do reservatório de chorume número 1. Para que a coleta do chorume fosse feita, foi necessária a devida autorização do diretor do aterro sanitário e da prefeitura da cidade. A coleta visou obter amostras de uma profundidade mínima de um metro. A amostra foi transferida para *falcons* estéreis de 50 mL e congeladas em *ultrafreezer* a -80°C , garantindo a preservação do DNA para a extração posterior.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO CHORUME

Em maio de 2019, uma fração da amostra foi enviada para a empresa TECLAB – Tecnologias em Análises Laboratoriais, em São José dos Pinhais-PR, para realizar a caracterização físico-química do chorume como serviço terceirizado.

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL

Para a extração do DNA foi realizado uma concentração das células presentes na amostra do chorume. Para tanto, 10 mL de amostra foram centrifugados a $10.000 \times g$ por 25 minutos. Após esse processo, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspenso com 250 μL de água deionizada e utilizado para a extração.

A extração do DNA total foi feita utilizando o kit DNeasy® PowerSoil®, da empresa QIAGEN, seguindo o protocolo do kit (QIAGEN, 2016).

A amostra foi então quantificada usando o espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 da Thermo Scientific (FISCHER SCIENTIFIC INC., 2008). O equipamento estimou a massa do DNA extraído e informou as razões de absorbância 260.280^{-1} e 260.230^{-1} . O valor de aproximadamente 1.8 da razão 260.280^{-1} foi considerado puro para uma amostra de DNA.

4.4 SEQUENCIAMENTO

O DNA total foi amplificado e sequenciado como serviço de terceiro na empresa BPI BIOTECNOLOGIA EPP conforme detalhamento abaixo.

4.4.1 Avaliação de Qualidade da Amostra

A análise de qualidade foi realizada através da quantificação por fluorescência utilizando o equipamento Qubit® 3.0 Fluorometer e kit Qubit™ dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific). A amostra de DNA foi quantificada em 1,24 ng/μL.

4.4.2 Amplificação da Região 16S

As reações de PCR foram feitas tendo como volume final de 20 μL, contendo 10 μL de GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, USL), 0,3μM de oligonucleotideo foward e 0,3μM de oligonucleotideo reverse, 1uL de DNA genômico e água ultrapura estéril suficiente para 20uL. A região 16S (V3 e V4) do RNAr foi amplificada com primer 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3' (foward). O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida por 27 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos; extensão a 72°C por 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. As reações de amplificação foram conduzidas no termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems). Após reação de amplificação da amostra a mesma foi comprovada através de eletroforese em gel de agarose 2% corado com UniSafe Dye 0,03% (v/v) onde os amplicons possuíam aproximadamente 600bp de tamanho.

4.4.3 Reação de Indexação

Nesta etapa foi inserindo os indexadores nos adaptadores comuns, que são necessários para a geração de clusters e sequenciamento das amostras. A reação de indexação foi realizada seguindo o protocolo do kit Nextera XT Index (Illumina). O programa de amplificação consiste de: incubação à 72°C por 3 minutos, desnaturação inicial à 95°C por 30 segundos, seguidos de 12 ciclos de 95°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems). Os indexadores utilizados foram N701 (TAAGGCGA) e S502 (ATAGAGAG).

4.4.4 Purificação e Quantificação da Biblioteca

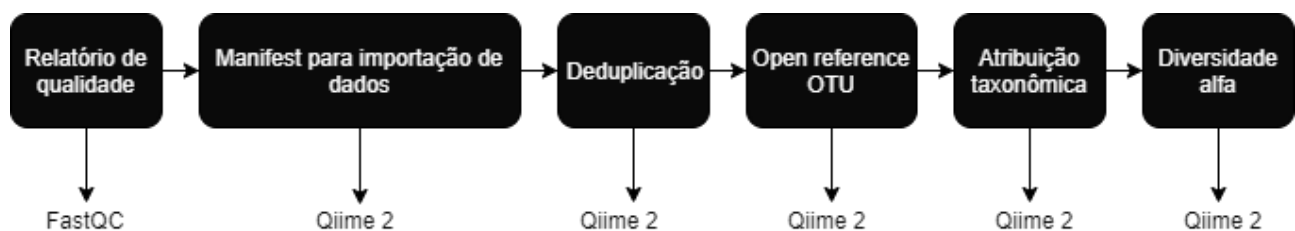
As bibliotecas geradas foram submetidas as etapas de purificação utilizando bead magnética Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter), para remoção

fragmentos muito pequenos da população total de moléculas e restos de primers. Após, foi realizado uma quantificação pela metodologia de PCR Tempo Real utilizando Kit KAPA-KK4824 (Library Quantification Kit - Illumina/Universal), todos de acordo com protocolo do fabricante. Gerou-se um Pool equimolar de DNA, através da normalização de todas as amostras a 3nM, para realização do sequenciamento, o qual foi conduzido utilizando-se o sistema Illumina MiSeq de sequenciamento de nova geração (Illumina® Sequencing) e kit MiSeq Reagent Kit V2 Nano 500 ciclos – leitura de 2 x 250pb.

4.5 ANÁLISES BIOINFORMÁTICAS

Para realizar a análise do processamento dos dados, foram utilizadas ferramentas tanto do pipeline Qiime2 (BOLYEN et al., 2018) – 2019.10 e o FastQC compilado na plataforma Galaxy Europe (AFGAN et al., 2018), conforme figura 7.

Figura 7 - Sequência das análises de bioinformática



Adaptado de: MORALES GÓMEZ, 2019.

4.5.1 Relatório de Qualidade

O sequenciamento foi recebido já demultiplexado. Para avaliar a qualidade do mesmo foi utilizado o software FastQC (ANDREWS, 2010) através da plataforma Galaxy Europe. Além disso, o FastQC possibilita saber o tipo de codificação do sequenciamento, fundamental para a etapa de importação de dados. Escolheu-se trabalhar com a fita *forward* pois ela apresentou a maior qualidade.

4.5.1 Manifest e Importação de Dados

As sequências foram importadas num artefato SampleData[SequencesWithQuality], devido à sua codificação Phred +33. O processo de importação gera um arquivo manifest dentro do artefato que serve para indicar ao Qiime2 o diretório das sequências, seu nome, tipo de leitura (F ou R) e sua codificação.

4.5.2 Deduplicação das Sequências

As sequências importadas foram processadas utilizando o ambiente

Qiime2 e o plugin DADA2 (CALLAHAN et al., 2016). Esse plugin filtra, reduz o ruído e deduplica as sequências, além de remover as quimeras. Conforme o relatório de qualidade, foi definido o corte de 5 pb na terminação 5' e nenhuma alteração na terminação 3' para uniformizar o tamanho das sequências e filtrar as que fossem muito amplas.

4.5.3 Open Reference OTUs

As OTUs foram agrupadas pelo método open reference com 99% de identidade, através do Qiime2 com o plugin vsearch (RICE; LONGDEN; BLEASBY, 2000). A base de dados ribossomal SILVA (QUAST et al., 2013) versão 132 (<https://www.arb-silva.de/download/archive/qiime>) foi utilizada como referência externa.

4.5.4 Atribuição Taxonômica

O plugin Taxa, presente no Qiime2, realizou a atribuição taxonômica a cada OTU observado utilizando as etiquetas taxonômicas com 99% de identidade da base de dados SILVA. Esse plugin gerou um gráfico interativo do tipo barplot e uma tabela de frequência de cada OTU etiquetada. O gráfico gerado foi processado para sua melhor visualização, onde as famílias que apresentaram frequência relativa menor que 0,5% foram agrupadas na categoria "outros".

4.5.5 Diversidade Alfa

Através do plugin diversity alpha, do ambiente Qiime2, foi possível calcular a curva de rarefação das sequências da amostra com uma profundidade de 9000 sequências, o índice de Shannon (SHANNON, C.E. AND WEAVER, 1962), o índice de Simpson (SIMPSON, 1949) e a estimativa de cobertura de Good (GOOD, 1953).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTRUTURA DA COMUNIDADE MICROBIANA

Foram obtidas 40.705 sequências de DNA da amostra de chorume. A etapa de deduplicação resultou em 25.039 sequências filtradas não-quiméricas (61,51% em relação ao total). As sequências foram agrupadas em 365 OTUs. Dos OTUs observados foi possível atribuir a taxonomia a 252 deles (69,04% em relação ao total), listados no apêndice A. Esses OTUs pertencem à 29 filos diferentes, dos quais 27 são do domínio Bacteria e apenas dois pertencem ao domínio Archaea. Os filos dominantes foram Firmicutes (41,91%), Proteobacteria (20,90%), Bacteroidetes (11,90%) e Synergistetes (7,36%), todos pertencentes ao domínio Bacteria (gráfico 2). Os filos Euryarchaeota e Nanoarchaeota, pertencentes ao domínio Archaea, tiveram uma frequência relativa de 0,392% e 0,020%, respectivamente. Apenas 102 sequências foram atribuídas ao domínio Archaea, o que representa 0,41% de todas as sequências identificadas.

A estimativa de Good indicou uma cobertura completa da microbiota presente na amostra e a curva de rarefação apresentada no gráfico 1 demonstrou que houve uma cobertura expressiva dos organismos procariotos presentes na amostra, dado o platô obtido pela curva. Esse platô indica que mesmo que houvessem mais sequências obtidas, o número de OTUs não seria expressivamente maior. O índice de Shannon (tabela 5) é um indicador de diversidade que leva em conta a abundância e uniformidade das espécies presentes. Seu valor foi de 7,70, o que indica uma grande diversidade presente na amostra e que está dentro do intervalo calculado nas diferentes amostras de chorume por Dao e colaboradores (2016). O índice de Simpson, que mede a probabilidade de dois OTUs selecionados aleatoriamente a partir da amostra pertencerem a espécies diferentes, foi de 0,99, o que também indica uma alta diversidade presente na amostra. Estes resultados são importantes para validar a metodologia utilizada do metabarcoding na análise da microbiota do chorume.

Gráfico 1 – Curva de rarefação da amostra para nível de similaridade de 99% e profundidade de 9000 sequências.

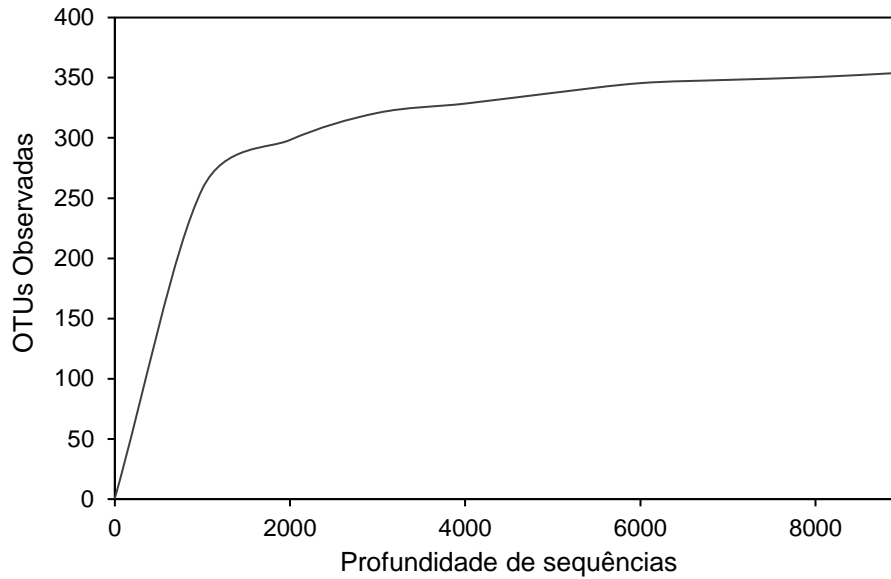
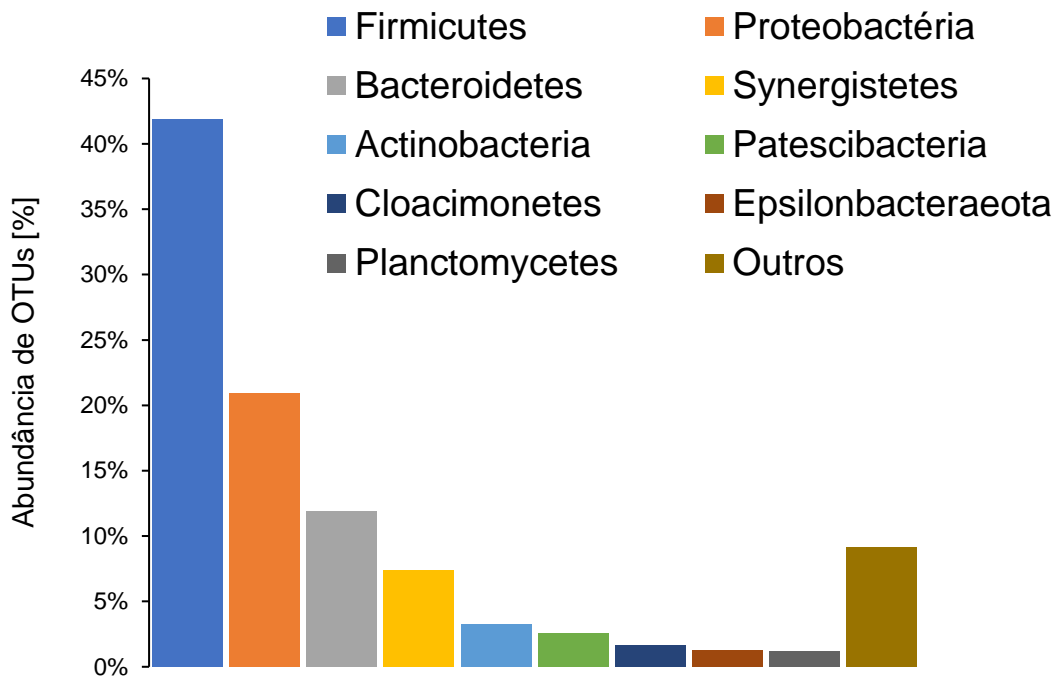


Tabela 5 – Índices de diversidade alfa

Índice	Shannon	Simpson	Good
Valor	7,70	0,99	100%

O gráfico 2 apresenta a abundância dos OTUs através dos filos relevantes detectados na amostra. A abundância dos filos observados não seguiu a mesma tendência encontrada por Köchling e colaboradores (2015) no aterro sanitário Candeias, em Jaboatão dos Guararapes-PE, onde o filo mais abundante foi Firmicutes seguido por Proteobactéria, Bacteroidetes, Spirochaetes, Synergistetes, Tenericutes, Planctomycetes, Lentisphaerae e outros filos. É possível que essa diferença ocorra porque o aterro sanitário Candeias foi construído em 2007, sendo seis anos mais novo do que o aterro sanitário de Foz do Iguaçu, que iniciou suas operações em 2001, e o chorume ainda era novo na época do estudo. Os filos dominantes descritos por Dao e colaboradores (2016), presentes no chorume em tratamento do aterro Khanh Son (fundado também em 2007), Vietnã, também divergem do observado na amostra do aterro sanitário de Foz do Iguaçu-PR. Nesse estudo, o filo Proteobacteria foi o mais abundante, seguido por Firmicutes, Bacteroidetes e Euryarchaeota. As diferenças geográficas e climáticas onde cada aterro está localizado também tem papel determinante na composição da comunidade. Contudo, em todos os estudos sempre ocorre um grande predomínio dos filos Firmicutes e Proteobacteria, como no presente trabalho.

Gráfico 2 – Abundância dos OTUs através dos filios detectados na amostra.



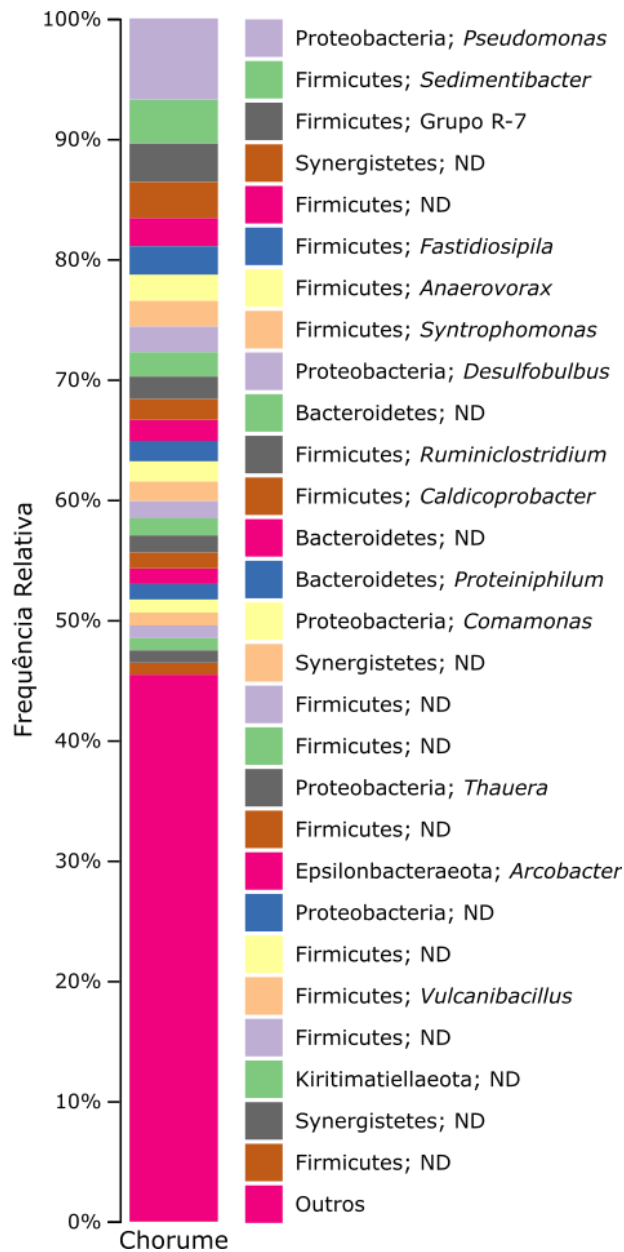
A prevalência dos filios Firmicutes e Proteobactéria se deve principalmente à grande diversidade desses grupos. O filo Proteobactéria é o maior filo gram-negativo, dividido em 9 classes. Muitos gêneros patogênicos pertencem a esse filo, como *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Helicobacter* e muitos outros (MICHAEL T. MADIGAN, KELLY S. BENDER, DANIEL H. BUCKLEY, 2018). Também inclui muitos gêneros de vida livre e muitas bactérias responsáveis pela fixação de nitrogênio. O filo Firmicutes, formado na grande maioria por bactérias gram-positivas, inclui bactérias patogênicas de vida livre e com diversas relações ecológicas como as *Actinobacteria* (KURTBÓKE, 2017).

O gênero *Pseudomonas*, pertencente ao filo Proteobactéria, apresentou a maior frequência entre todos os gêneros identificados, com 1666 sequências. Em seguida vieram os gêneros *Sedimentibacter*, grupo candidato R-7 (não caracterizado a nível de gênero), *Fastidiosipila*, *Anaerovorax* e *Syntrophomonas*, com 901, 794, 582, 542 e 529 sequências, respectivamente.

A frequência relativa dos gêneros encontrados pode ser vista no gráfico 3. Percebe-se que quase a metade da diversidade encontrada possui frequência abaixo de 1%. Essa grande diversidade em baixa abundância pode funcionar como um reservatório de microrganismos que se tornam dominantes conforme a mudança na composição do chorume (WITTEBOLLE et al., 2008). A análise de outros microbiomas mostraram que bactérias de baixa abundância dominam respostas específicas durante um determinado

processo (DAWSON et al., 2017). Em contrapartida, altos níveis de diversidade bacteriana levaram à suposição de que muitos táxons são funcionalmente redundantes (RIVETT; BELL, 2018).

Gráfico 3 – Gêneros de procariotos com frequência relativa maior que 1% presentes na amostra de chorume.

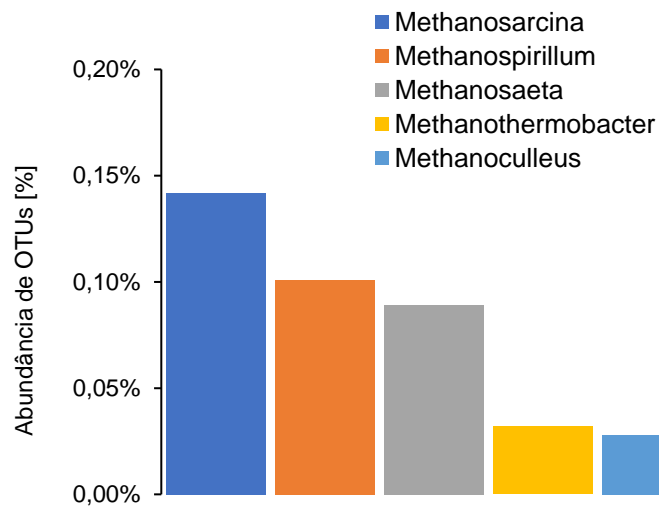


Nota: consta na legenda o nome do filo e do gênero. ND: não identificado ao nível de gênero ou táxons anteriores.

Em relação às arqueas, os gêneros identificados foram *Methanosarcina*, *Methanospirillum*, *Methanosaeta*, *Methanothermobacter* e *Methanoculleus*. Suas respectivas frequências relativas são mostradas no gráfico 4. Todos esses gêneros também

foram observados em baixa abundância por Köchling e colaboradores (2015) no chorume do aterro de Candeias-PE, com exceção do gênero *Methanospirillum*, que não foi observado.

Gráfico 4 – Gêneros de arqueas identificadas na amostra de chorume.



5.2 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO CHORUME

A composição do chorume possui forte influência na riqueza da comunidade microbiana. A tabela 6 apresenta o resultado da análise físico-química do chorume estudado.

Tabela 6 – Análise físico-química da amostra de chorume do aterro sanitário da cidade de Foz do Iguaçu - PR

Parâmetro	Resultado	Unidade	L.Q.	Método	V.M.P.
Arsênio	< 0,10	mg.L ⁻¹	0,10	SM 3111	0,5
Cádmio total	0,048	mg.L ⁻¹	0,005	SM 3500-Cd	0,2
Chumbo total	< 0,005	mg.L ⁻¹	0,005	SM 3500-Pb	0,5
Cobre total	0,120	mg.L ⁻¹	0,005	SM 3500-Cu	1,0
Cromo total	0,080	mg.L ⁻¹	0,005	SM 3500-Cr	1,1
DBO ₅ /DQO	0,58	-	-	-	N.E.
DBO ₅	2.074,0	mg.L ⁻¹	2,0	SM 5210/B	N.E.
DQO	3.599,0	mg.L ⁻¹	5,0	SM 5220/D	N.E.
Mercúrio	< 0,01	mg.L ⁻¹	0,01	SM 3111	0,01
Nitratos	< 1,0	mg.L ⁻¹	1,0	IAL/4ª edição	N.E.
Nitritos	0,20	mg.L ⁻¹	0,02	SM2012	N.E.
Nitrogênio Amoniacal	486,0	mg.L ⁻¹	0,05	SM 4500-NH/F	20,0
Nitrogênio Orgânico	638,80	mg.L ⁻¹	0,50	SM 4500-N	N.E.
Nitrogênio total	1.125,0	mg.L ⁻¹	0,50	SM 4500-N	N.E.
Oxigênio dissolvido	6,6	mg.L ⁻¹	0,10	SM 4500-O/G	N.E.
pH	8,50	-	-	NBR 9251	5 a 9

Notas: N.E: Não Estabelecida; L.Q: Limite de Quantificação. V.M.P: valor mínimo permitido para lançamento de efluentes segundo o CONAMA (2011).

O chorume estudado apresentou características mistas (tanto de fase ácida quanto metanogênica). Esse fenômeno pode ser explicado pela heterogeneidade dos reservatórios uma vez que recebem o chorume metanogênico advindo das duas células já finalizadas e o chorume ácido proveniente da célula em operação.

O pH, um dos principais indicadores para a caracterização do chorume, estava em 8,52, dentro dos limites estabelecidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (2011). Esse valor é característico da fase metanogênica.

O nível de DBO₅ estava muito abaixo do relatado na literatura, inclusive do nível mais baixo que é apresentado pela fase ácida (tabela 3). Já o nível de DQO estava dentro do intervalo característico da fase metanogênica (RIGUETTI et al., 2015). A razão

DBO₅/DQO indica a biodegradabilidade de um efluente e quanto menor seu valor mais difícil sua biodegradação (BERTOLINO; CARVALHO; AQUINO, 2008). A amostra de chorume apresentou a mesma razão descrita na literatura para a fase ácida, valor que indica uma boa biodegradabilidade e que estava elevado por conta da mistura com o chorume ácido, indicando que possivelmente nossa amostra apresentou um caráter misto em relação as fases (condições típicas da fase metanogênica e fase ácida).

A concentração de nitrogênio amoniacal estava 0,66 vezes menor do que o valor médio. Esta amostra de chorume possui nitritos e nitratos em sua composição, diferente do relatado por Gabarró e colaboradores (2013), e a concentração de nitrogênio total estava 0,38 vezes menor do que o relatado pelos mesmos autores. Esses dados indicam os estágios finais do ciclo do nitrogênio e estão fortemente relacionados com o metabolismo de bactérias anaeróbias nitrificantes, uma vez que a amônia ou nitrogênio amoniacal é convertida a nitrito, e esses a nitrato.

O nitrito é formado a partir da oxidação da amônia ou amônio (NH₄⁺). Quando o nitrito é oxidado, forma-se nitrato, que é a fonte mais comum de nitrogênio nos solos. O nitrato possui grande solubilidade e é carregado para os corpos d'água através da lixiviação, contaminando os mesmos. A ingestão de água contaminada por nitritos e nitratos por crianças menores de seis meses é um problema de saúde pública, que pode causar um déficit no transporte de oxigênio (MAHLER; COLTER; HIRNYCK, 2007). Além disso, bovinos intoxicados por nitritos e nitratos podem sofrer abortos (RIET-CORREA, 2007). O gênero *Pseudomonas* é muito empregado na desnitrificação de corpos d'água contaminados, pela sua capacidade de oxidar esses compostos (YANG et al., 2019).

Em relação aos metais, a concentração de cádmio no chorume estudado estava 9,6 vezes maior que o valor médio encontrado na literatura. A cidade de Foz do Iguaçu não conta com um sistema efetivo de coleta de pilhas e baterias, em especial as que contém cádmio, chumbo e mercúrio (PMFI, 2012). Portanto, esses resíduos são descartados diretamente ao aterro sanitário, elevando a concentração destes metais, principalmente o cádmio. Este metal pesado, assim como o chumbo, também pode ser liberado a partir da decomposição de eletrônicos, metais ferrosos e galvanizados, plásticos, lâmpadas e resíduos químicos (RIGUETTI et al., 2015). Apesar do valor elevado, a concentração do metal não ultrapassou o valor máximo permitido estabelecido pelo CONAMA. A intoxicação por cádmio altera a proliferação, divisão e apoptose celular além de inibir a respiração celular ao se ligar com as mitocôndrias em baixas concentrações (RAHIMZADEH et al., 2017). A espécie *Pseudomonas aeruginosa* foi descrita como

resistente a esse metal pesado e consegue realizar a biossorção e bioacumulação do mesmo através de respostas de estresse (CHELLAIAH, 2018).

A concentração de cobre também estava mais alta que o valor médio da literatura, cerca de 1,84 vezes. O cobre, ao ser absorvido pelo organismo, se acumula no fígado e impede sua detoxificação, permitindo o aumento da concentração desse metal em outros tecidos do corpo, afetando o sistema nervoso, sistema reprodutivo, tecido conjuntivo, funções adrenais, e uma série de outras complicações (BADIYE; KAPOOR; KHAJURIA, 2013). A biorremediação do cobre foi descrita por Kumar e colaboradores (2016), onde a bactéria *Bacillus thuringiensis* foi capaz remover mais de 50% da concentração de cobre em meio líquido.

A concentração de cromo estava 3,5 vezes menor que o valor médio. Não é possível saber precisamente os níveis de arsênio, mercúrio e de chumbo pois seus valores estão abaixo do limite de quantificação. Nenhum metal apresentou níveis maiores que os valores máximos permitidos pelo CONAMA.

5.3 DIVERSIDADE FUNCIONAL DA COMUNIDADE E BIORREMEDIAÇÃO DO CHORUME

Como as bactérias dominam a comunidade microbiana do chorume, foram selecionados apenas os gêneros com frequência relativa igual ou maior que 1% para uma breve descrição (quadro 4). Todos os gêneros de arqueas identificados foram descritos.

Quadro 4: Descrição funcional dos gêneros relevantes presentes na amostra de chorume

Gênero	Descrição
<i>Anaerovorax</i>	Quimiorganotróficas anaeróbias estritas que não utilizam aceptores de elétrons inorgânicos. Caracterizadas pela fermentação da putrescina, uma molécula orgânica que se forma na carne podre e a esta dá um odor característico, contingente com o odor do chorume. Isoladas a partir de corpos d'água doce anóxicos e de sedimentos marinhos.
<i>Arcobacter</i>	Realizam respiração anaeróbia e toleram a presença de oxigênio. Existem espécies patogênicas a humanos e animais. Identificadas nos aparelhos reprodutores e fetos abortados de humanos e de animais. Podem ser autotróficas, a partir do hidrogênio ou sulfeto de hidrogênio, heterotrófica (enxofre elementar) e também quimiorganotróficas.
<i>Caldicoprobacter</i>	Anaeróbias obrigatórias, termofílicas e quimiorganotróficas. Temperatura ótima a 70°C e pH ótimo 7,2. Conseguem utilizar celulose, celobiose, glicose, xilose, galactose, frutose, manose, lactose, rafinose e xilana como fontes de carbono.

(continuação)

Gênero	Descrição
<i>Comamonas</i>	Quimiorganotróficas e realizam respiração aeróbia. Representam um gênero altamente patogênico, que podem provocar apendicites, bacteremias e meningites. Altamente versáteis metabolicamente, desde quimioheterotróficos, a anaeróbios facultativos capazes de usar nitrato ou ferro férrico (Fe^{3+}) como um acceptor de elétrons.
<i>Desulfobulbus</i>	Anaeróbias estritas e quimiorganotróficas versáteis podendo até reduzir sulfato, sulfito e tiosulfato em sulfeto de hidrogênio. O pH ótimo varia entre 6,6-7,5 e a temperatura ótima varia de 25-40°C.
<i>Fastidiosipila</i>	Anaeróbias que toleram microaerobiose, isoladas a partir do sangue. É incapaz de fermentar açúcares e também degrada aminoácidos. Produz ácidos graxos voláteis, como o ácido acético que possivelmente age como substância crítica na metanogênese acetoclástica.
<i>Methanoculleus</i>	Metanogênicas hidrogenotróficas mesofílicas com crescimento ótimo em torno de 37°C e pH neutro.
<i>Methanosaeta</i>	Metanogênicas acetoclásticas. Acredita-se que as arqueas desse gênero sejam as maiores produtoras de metano do mundo. Possuem grande afinidade com o acetato, superando o gênero <i>Methanosarcina</i> .
<i>Methanosarcina</i>	Possuem maior versatilidade na produção de metano do que os outros gêneros metanogênicos, utilizando vias alternativas. O crescimento ótimo se dá a 45°C e pH neutro.
<i>Methanospirillum</i>	Metanogênicas estritamente anaeróbias, mesofílicas e que crescem em pH neutro ou levemente alcalino. Encontradas no solo e em estação de tratamento de esgoto anaeróbio
<i>Methanothermobacter</i>	Metanogênicas termófilas que pertenciam ao gênero <i>Methanobacterium</i> . A temperatura de crescimento varia ente 55-65°C.
<i>Proteiniphilum</i>	São quimiorganotróficas, anaeróbias estritas, relacionadas com a degradação de proteínas e aminoácidos. Isoladas a partir do sistema de tratamento anaeróbio de rejeitos da indústria de cerveja.
<i>Pseudomonas</i>	Possuem uma grande diversidade metabólica, permitindo a colonização de uma enorme variedade de nichos. Respiração aeróbia estrita (algumas espécies utilizam nitrato como acceptor de elétrons) e quimiorganotrofia. Muitas espécies patogênicas relacionadas com doenças em plantas e animais, incluindo humanos.
Grupo R-7	Pertencem à família <i>Christensenellaceae</i> . Realizam respiração anaeróbia estrita e quimiorganotrofia. Encontradas no intestino de humanos e outros animais, o que explica a sua presença no chorume.
<i>Ruminiclostridium</i>	Anaeróbias obrigatórias formadoras de esporos. Utilizam celulose, celobiose, glicose e xilose como fonte de carbono. Temperatura de crescimento varia 28-41°C e pH ótimo em torno do neutro.
<i>Sedimentibacter</i>	Quimiorganotróficas de respiração anaeróbia estrita por fermentação do piruvato ou de aminoácidos. Crescimento ótimo a 33-37°C e pH ótimo na faixa 7-8,2. Observadas na desalogenação e declorinação de compostos orgânicos em conjunto com arqueas metanogênicas.

(continuação)

Gênero	Descrição
<i>Syntrophomonas</i>	Quimiorganotróficas que realizam sintrofismo com arqueas metanogênicas na degradação de lipídios, onde a oxidação anaeróbia dos lipídios libera hidrogênio que é utilizado pelas arqueas.
<i>Thauera</i>	Quimiorganotróficas que realizam respiração aeróbia e são incapazes de realizar fermentação. A temperatura ótima varia de 28-40°C e o pH de 7,2-8,4.
<i>Vulcanibacillus</i>	Quimiorganotróficas incapaz de realizar fermentação e capazes de utilizar nitrato como aceptor de elétrons na oxidação de carboidratos, proteínas e ácidos orgânicos.

Fonte: BEAURUELLE et al., 2014; BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001; FALSEN et al., 2005; GARRITY et al., 2005a, b; IINO; MORI; SUZUKI, 2010; KERN et al., 2016; KRIEG et al., 2010; L'HARIDON et al., 2006; LIU et al., 2016; MAPHOSA et al., 2012; MATTHIES et al., 2000; MICHAEL T. MADIGAN, KELLY S. BENDER, DANIEL H. BUCKLEY, 2018; MOROTOMI; NAGAI; WATANABE, 2011; ROALKVAM et al., 2015; SMITH; INGRAM-SMITH, 2007; VOS et al., 2009; WASSERFALLEN et al., 2000; WU; ZAIDEN; CAO, 2018; YOKOHAMA; WAGNER; WIEGEL, 2010; ZHANG, X. et al., 2018.

A maior parte da diversidade dominante encontrada foi de bactérias anaeróbias fermentadoras pertencentes ao filo Firmicutes e fazem parte da ordem Clostridiales. Portanto, esse grupo é o que possivelmente mais contribui para a degradação da matéria orgânica e para o ciclo de carbono, além de compostos xenobióticos dado a capacidade em degradar uma variedade de compostos orgânicos recalcitrantes por fermentação (WINDED et al., 2008). Esse resultado já era esperado devido às condições anóxicas das células de RSU em decomposição e também foi relatado por Köchling e colaboradores (2015). A abundância dos gêneros *Ruminiclostridium* e *Caldiprobacter* no chorume implica um papel fundamental na fermentação da matéria orgânica vegetal presente, que é um dos principais componentes do RSU. Apesar disso, o armazenamento do chorume nos reservatórios a céu aberto possibilita a difusão de oxigênio, criando nichos aeróbios e permitindo a dominância do ambiente, como observado nos gêneros *Comomonas*, *Pseudomonas* e *Thauera*.

Do filo Bacteroidetes, apenas o gênero *Proteiniphilum* foi identificado. Esse é um gênero exclusivamente proteolítico (KRIEG et al., 2010) e sua abundância sugere uma contribuição na degradação de proteínas presentes no chorume.

Foi detectado apenas um OTU associado ao gênero *Clostridium*. A primeira bactéria de vida livre observada capaz de fixar nitrogênio, *Clostridium pasteurianum*, pertence a esse gênero (CHEN, J.-S., 2006). Entretanto, é improvável que esse OTU pertença a essa espécie uma vez que ela é sensível a presença de oxigênio. Dos gêneros detectados, *Comamonas*, *Pseudomonas* e *Thauera* são capazes de realizar a

desnitrificação utilizando nitratos ou nitritos como aceptores de elétrons. É provável que esses dois grupos reduzam a concentração desses compostos e atenuem o seu efeito bactericida sobre a comunidade.

A decomposição de matéria orgânica libera amônia e amônio no ambiente. As bactérias nitrificantes oxidam esses dois compostos, liberando nitrito, que então é oxidado a nitrato por outro grupo. Apesar de não serem identificadas, existem bactérias nesse chorume realizando a etapa de nitrificação. Esses dados são validados uma vez que foi observado a presença de nitratos e nitritos na amostra.

A presença de bactérias redutoras de sulfato indica que a via redutiva do ciclo do enxofre está ativa. Dois filos possuem representantes relacionados a redução do enxofre: Proteobacteria, representado pelos gêneros *Desulfobulbus*, *Desulfomicrobium*, *Desulfovibrio*, *Desulfuromonas*, *Geobacter*, *Pelobacter* e Firmicutes, representado pelos gêneros *Desulfitibacter* e *Desulfuribacillus*.

Como os reservatórios de chorume do aterro recebem o chorume das três células de RSU muito provavelmente os grupos metanogênicos são inibidos ao entrar em contato com o chorume da célula 3, que contém uma alta carga de matéria orgânica comparado com o chorume das células mais antigas. É altamente provável, entretanto, que esses organismos metanogênicos dominem as células 1 e 2. A amostra foi coletada em baixa profundidade, o que é um outro fator que explica a baixa abundância dos grupos metanogênicos.

A abundância relativa do gênero *fastidiosipila* é preocupante uma vez que este é um gênero patogênico encontrado no sangue, relacionado com casos de osteíte (BEAURUELLE et al., 2014), e pode indicar a presença de resíduo hospitalar no aterro. O bioaerossol gerado por um aterro é um vetor de dispersão de patógenos por via aérea para outras regiões (KAŻMIERCZUK; BOJANOWICZ-BABLOK, 2014). Como o chorume está armazenado a céu aberto, ele pode ser uma fonte de patógenos para a atmosfera.

As técnicas de biorremediação de metais pesados se baseiam na capacidade que os microrganismos tem em bioacumulá-los. Os microrganismos do chorume possuem maior versatilidade metabólica e, portanto, resistência a compostos tóxicos como metais pesados. O gênero *Pseudomonas* é conhecido pela capacidade de acumular cádmio (CHELLAIAH, 2018), e o gênero *Bacillus* consegue reduzir a concentração de cobre em meio líquido (KUMAR et al., 2016). Entretanto, nenhum microrganismo isolado a partir do chorume foi utilizado para a biorremediação desses metais.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O chorume armazenado nos reservatórios do aterro sanitário de Foz do Iguaçu-PR apresenta condições físico-químicas mistas, com características de fase ácida e metanogênica. Isso se reflete na comunidade de procariotos, que possivelmente não representa as comunidades presentes em cada uma das três células de RSU.

A comunidade do chorume armazenado nos reservatórios caracterizou-se por uma dominância dos grupos fermentadores do filo Firmicutes e em menor grau pelo filo Proteobactérias, Bacteroidetes e Synergistetes. Foi observado também uma alta diversidade de gêneros nos OTUs de baixa abundância. Essa comunidade, por estar presente em um ambiente extremo, apresenta grupos com resistência a diversos compostos tóxicos, como *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Thauera*, *Caldiprobacter*. Esses grupos, por possuírem resistência e versatilidade metabólica, são peça chave para o desenvolvimento de estratégias de biorremediação de compostos tóxicos presentes no chorume. Estudos futuros devem testar o potencial biorremediador dos microrganismos isolados a partir do chorume ou avaliar o potencial metabólico através da metagenômica.

Para se entender efetivamente as comunidades de procariotos do chorume, o aterro sanitário de Foz do Iguaçu-PR deve ser revisitado e amostras de chorume de cada uma das três células de RSU devem ser coletadas e sequenciadas, revelando quais são os grupos dominantes e qual a sua diversidade levando em consideração a idade de cada célula.

Esse estudo é o primeiro do seu gênero na cidade de Foz do Iguaçu e servirá como base de comparação para pesquisas futuras relacionadas a diversidade do aterro sanitário da cidade.

REFERÊNCIAS

- ABRELPE. **Panorama dos resíduos sólidos no Brasil**. 15. ed. São Paulo: Associação de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais, 2017.
- ADHIKARI, B. et al. Seasonal variation of pH, BOD, COD and BOD/COD ratio in different ages of landfill leachate in Nepal. **Journal Biomolecule Reconstruction**, v. 11, n. 02, p. 89–99, 2014.
- AFGAN, E. et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W537–W544, 2018.
- AJMAL ALI, M. et al. The changing epitome of species identification - DNA barcoding. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 3, p. 204–231, 2014.
- ANDREWS, S. **FastQC - A quality control tool for high throughput sequence data**. Disponível em: <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>. Acesso em: 13 jul. 2019.
- BADIYE, A.; KAPOOR, N.; KHAJURIA, H. Copper Toxicity: A Comprehensive Study. **Research Journal of Recent Sciences**, v. 2, p. 58–67, 2013.
- BAKER, G. C.; SMITH, J. J.; COWAN, D. A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, n. 3, p. 541–555, 1 dez. 2003.
- BEAURUELLE, C. et al. First human case of *Fastidiosipila sanguinis* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2713–2715, 2014.
- BERTOLINO, S. M.; CARVALHO, C. F.; AQUINO, S. F. Caracterização e biodegradabilidade aerobia e anaeróbia dos esgotos produzidos em campus universitário. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 13, n. 3, p. 271–277, 2008.
- BOLYEN, E. et al. QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. **PeerJ Preprints**, 2018.
- BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W.; GARRITY, G. M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria**. New York, NY: Springer New York, 2001.
- BRASIL. **Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei no 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências**. . Brasil: [s.n.] , 2010
- CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon

- data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016.
- CHELLAIAH, E. R. Cadmium (heavy metals) bioremediation by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. **Applied Water Science**, v. 8, n. 6, out. 2018.
- CHEN, J.-S. Nitrogen Fixation in the Clostridia. **Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria**, p. 53–64, 2006.
- CHEN, Y.-Q. et al. Diversity and structure of the archaeal community in the leachate of a full-scale recirculating landfill as examined by direct 16S rRNA gene sequence retrieval. **FEMS Microbiology Letters**, v. 214, n. 2, p. 235–240, 2006.
- CHRISTENSEN, T. H. et al. Biogeochemistry of landfill leachate plumes. **Applied Geochemistry**, v. 16, n. 7–8, p. 659–718, 2001.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. **CONAMA 430 - Condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005**. . [S.l: s.n.]. , 2011
- CONSONI, Â. J. et al. **Disposição final de lixo & Legislação e Licenciamento Ambiental**. [S.l: s.n.], 2018.
- COSTA, A. M.; ALFAIA, R. G. de S. M.; CAMPOS, J. C. Landfill leachate treatment in Brazil – An overview. **Journal of Environmental Management**, v. 232, n. November 2018, p. 110–116, 2019.
- DAO, H. T. N. et al. 16S rRNA gene-based comprehensive analysis of microbial community compositions in a full-scale leachate treatment system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 122, n. 6, p. 708–715, 1 dez. 2016.
- DAWSON, W. et al. A small number of low-abundance bacteria dominate plant species-specific responses during rhizosphere colonization. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAY, 29 maio 2017.
- DEINER, K. et al. Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. **Biological Conservation**, v. 183, p. 53–63, 1 mar. 2015.
- FALSEN, E. et al. *Fastidiosipila sanguinis* gen. nov., sp. nov., a new Gram-positive, coccus-shaped organism from human blood. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 853–858, 2005.
- FISCHER SCIENTIFIC INC., T. **NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3. 7 User's Manual**. Thermo Fisher Scientific. [S.l: s.n.], 2008.

GABARRÓ, J. et al. Nitrous oxide reduction genetic potential from the microbial community of an intermittently aerated partial nitrification SBR treating mature landfill leachate. **Water Research**, v. 47, n. 19, p. 7066–7077, 2013.

GARRITY, G. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria**. Boston, MA: Springer US, 2005a.

_____. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2: The Proteobacteria, Part C**. Boston, MA: Springer US, 2005b.

GOOD, I. J. The Population Frequencies of Species and the Estimation of Population Parameters. **Biometrika**, v. 40, n. 3/4, p. 237, 1953.

GOOGLE MAPS. **Imagem por satélite do aterro sanitário da cidade de Foz do Iguaçu**. Disponível em: <<https://www.google.com.br/maps/@-25.4616426,-54.6088068,1250m/data=!3m1!1e3>>. Acesso em: 14 jul. 2019.

GOUVEIA, N. Resíduos sólidos urbanos: impactos socioambientais e perspectiva de manejo sustentável com inclusão social. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 6, p. 1503–1510, 2012.

HUANG, L. N. et al. Characterization of methanogenic Archaea in the leachate of a closed municipal solid waste landfill. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 46, n. 2, p. 171–177, 2003.

HUSSAIN, F. et al. Combined application of biochar, compost, and bacterial consortia with Italian ryegrass enhanced phytoremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil. **Environmental and Experimental Botany**, v. 153, p. 80–88, 1 set. 2018.

IINO, T.; MORI, K.; SUZUKI, K. I. *Methanospirillum lacunae* sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from a puddly soil, and emended descriptions of the genus *Methanospirillum* and *Methanospirillum hungatei*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 11, p. 2563–2566, 2010.

KAŹMIERCZUK, M.; BOJANOWICZ-BABLOK, A. Bioaerosol concentration in the air surrounding municipal solid waste landfill. **Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych - Environmental Protection and Natural Resources**, v. 25, n. 2, p. 17–25, 2014.

KERN, T. et al. *Methanosarcina flavescens* sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from a full-scale anaerobic digester. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1533–1538, 2016.

KHALIL, C. et al. Municipal leachates health risks: Chemical and cytotoxicity assessment from regulated and unregulated municipal dumpsites in Lebanon. **Chemosphere**, v. 208, p.

1–13, 1 out. 2018.

KJELDSEN, P. et al. Present and long-term composition of MSW landfill leachate: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 4, p. 297–336, 2002.

KÖCHLING, T. et al. Analysis of microbial community structure and composition in leachates from a young landfill by 454 pyrosequencing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 13, p. 5657–5668, 5 jul. 2015.

KOLBERT, C. P.; PERSING, D. H. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 299–305, 1 jun. 1999.

KRIEG, N. R. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 4: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes**. New York, NY: Springer New York, 2010.

KRISHNAMURTHI, S.; CHAKRABARTI, T. Diversity of Bacteria and Archaea from a landfill in Chandigarh, India as revealed by culture-dependent and culture-independent molecular approaches. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 56–68, 2013.

KUMAR, M. et al. An efficient approach towards the bioremediation of copper, cobalt and nickel contaminated field samples. **Journal of Soils and Sediments**, v. 16, n. 8, p. 2118–2127, 2016.

KURTBÓKE, D. Ecology and habitat distribution of actinobacteria. **Biol. Biotechnol. Actinobacteria**. [S.l.]: Springer International Publishing, 2017. p. 123–149.

L'HARIDON, S. et al. *Vulcanibacillus modesticaldus* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, nitrate-reducing bacterium from deep-sea hydrothermal vents. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1047–1053, 2006.

LIU, C. et al. Evolution of microbial community along with increasing solid concentration during high-solids anaerobic digestion of sewage sludge. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 87–94, 1 set. 2016.

MAHLER, R. L.; COLTER, A.; HIRNYCK, R. Nitrate and Groundwater. **Quality water for Idaho**, p. 1–4, 2007.

MAPHOSA, F. et al. Metagenome analysis reveals yet unexplored reductive dechlorinating potential of *Dehalobacter* sp. E1 growing in co-culture with *Sedimentibacter* sp. **Environmental Microbiology Reports**, p. n/a-n/a, set. 2012.

- MATTHIES, C. et al. *Anaerovorax odorimutans* gen. nov., sp. nov., a putrescine-fermenting, strictly anaerobic bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1591–1594, 2000.
- MICHAEL T. MADIGAN, KELLY S. BENDER, DANIEL H. BUCKLEY, M. W. S. and D. A. S. **Brock Biology of Microorganisms**. [S.l: s.n.], 2018.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Plano Nacional de Resíduos Sólidos**. [S.l: s.n.], 2012.
- MOODY, C. M.; TOWNSEND, T. G. A comparison of landfill leachates based on waste composition. **Waste Management**, v. 63, p. 267–274, 2017.
- MOR, S.; NEGI, P.; KHAIWAL, R. Assessment of groundwater pollution by landfills in India using leachate pollution index and estimation of error. **Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management**, v. 10, p. 467–476, 2018.
- MORALES GÓMEZ, J. A. **Estudo de comunidades microbianas: uma abordagem in silico**. 2019. 82 f. UNILA, 2019.
- MORLING, S. Landfill leachate, generation, and some findings from leachate treatment at Swedish plants. **Vann** 2, p. 174–184, 2007.
- MOROTOMI, M.; NAGAI, F.; WATANABE, Y. Description of *Christensenella minuta* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, which forms a distinct branch in the order Clostridiales, and proposal of Christensenellaceae fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 144–149, 2011.
- PALERMO, G. C.; GOMES, A. P. P. **Tratamento e Gestão de Resíduos**. 1. ed. Rio de Janeiro: UVA, 2017.
- PAVAN-KUMAR, A.; GIREESH-BABU, P.; LAKRA, W. S. DNA Metabarcoding: A New Approach for Rapid Biodiversity Assessment. **Journal of cell science & molecular biology**, v. 2, n. 1, p. 1–10, 2015.
- PMFI. **Plano municipal de saneamento básico do município de Foz do Iguaçu-PR**. Foz do Iguaçu: [s.n.], 2012.
- QIAGEN. DNeasy® PowerSoil® Kit. n. June, p. 8–9, 2016.
- QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Database issue, p. D590-6, jan. 2013.
- RAHIMZADEH, M. R. et al. **Cadmium toxicity and treatment: An update**. **Caspian**

- Journal of Internal Medicine.** [S.l.]: Babol University of Medical Sciences. , 2017
- RENOU, S. et al. Landfill leachate treatment: Review and opportunity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 150, n. 3, p. 468–493, 2008.
- RICE, P.; LONGDEN, I.; BLEASBY, A. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. **Trends in genetics : TIG**, v. 16, n. 6, p. 276–7, jun. 2000.
- RIET-CORREA, F. Plantas Tóxicas E Micotoxinas Que Afetam a Reprodução Em Ruminantes E Eqüinos No Brasil *. **Biológico**, v. 69, n. 20, p. 63–68, 2007.
- RIGUETTI, P. F. et al. Manganês, zinco, cádmio, chumbo, mercúrio e crômio no chorume de aterro sanitário em Dourados, MS, Brasil. **Revista Ambiente e Agua**, v. 10, n. 1, p. 153–163, 2015.
- RIVETT, D. W.; BELL, T. Abundance determines the functional role of bacterial phylotypes in complex communities. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 7, p. 767–772, 1 jul. 2018.
- ROALKVAM, I. et al. Physiological and genomic characterization of arcobacter anaerophilus IR-1 reveals new metabolic features in epsilonproteobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. SEP, 2015.
- RUPPERT, K. M.; KLINE, R. J.; RAHMAN, M. S. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. **Global Ecology and Conservation**, v. 17, p. e00547, 2019.
- SANTOS, G. G. D. Dos. **Análise e Perspectivas de Alternativas de Destinação dos Resíduos Sólidos Urbanos: O Caso da Incineração e da Disposição em Aterros**. 2011. 1–208 f. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.
- SHANNON, C.E. AND WEAVER, W. **The mathematical theory of communication**. 9. ed. Chicago: [s.n.], 1962.
- SIMPSON, E. H. Measurement of diversity. **Nature**, v. 163, n. 4148, p. 688, 1949.
- SMITH, K. S.; INGRAM-SMITH, C. Methanosaeta, the forgotten methanogen? **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 150–155, 2007.
- SOARES, E. L. de S. F. **Estudo Da Caracterização Gravimétrica E Poder Calorífico Dos Resíduos Sólidos Urbanos**. 2011. 150 f. 2011.
- STALEY, B. F.; DE LOS REYES, F. L.; BARLAZ, M. A. Comparison of Bacteria and Archaea communities in municipal solid waste, individual refuse components, and leachate. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 79, n. 2, p. 465–473, fev. 2012.

SUN, X. chen et al. Evolution of geomembrane degradation and defects in a landfill: Impacts on long-term leachate leakage and groundwater quality. **Journal of Cleaner Production**, v. 224, p. 335–345, 2019.

TABERLET, P.; COISSAC, E. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. **Molecular Ecology**, v. 33, p. 2045–2050, 2012.

VILLAVERDE, J. et al. Combined use of microbial consortia isolated from different agricultural soils and cyclodextrin as a bioremediation technique for herbicide contaminated soils. **Chemosphere**, v. 193, p. 118–125, 1 fev. 2018.

VOS, P. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 3: The Firmicutes**. New York, NY: Springer New York, 2009.

WASSERFALLEN, A. et al. Phylogenetic analysis of 18 thermophilic Methanobacterium isolates supports the proposals to create a new genus, Methanothermobacter gen. nov., and to reclassify several isolates in three species, Methanothermobacter thermautotrophicus comb. nov., Methano. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 43–53, 2000.

WEAVER, J. E. et al. Systems and Methods for Studying Microbial Processes and Communities in Landfills. [S.l: s.n.], 2019. p. 129–150.

WINDED, C. et al. Depth-resolved quantification of anaerobic toluene degraders and aquifer microbial community patterns in distinct redox zones of a tar oil contaminant plume. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 792–801, fev. 2008.

WISZNIOWSKI, J. et al. Landfill leachate treatment methods: A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 4, n. 1, p. 51–61, 2006.

WITTEBOLLE, L. et al. Quantifying community dynamics of nitrifiers in functionally stable reactors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 286–293, jan. 2008.

WU, Y.; ZAIDEN, N.; CAO, B. The core- and pan-genomic analyses of the genus Comamonas: From environmental adaptation to potential virulence. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. DEC, 12 dez. 2018.

XU, Y. et al. Occurrence and removal of organic micropollutants in the treatment of landfill leachate by combined anaerobic-membrane bioreactor technology. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n. 11, p. 1281–1287, 2008.

YANG, L. et al. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a metal resistant bacterium Pseudomonas putida strain

NP5. **Bioresource Technology**, v. 285, 1 ago. 2019.

YOKOHAMA, H.; WAGNER, I. D.; WIEGEL, J. *Caldicoprobacter oshimai* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, xylanolytic, extremely thermophilic bacterium isolated from sheep faeces, and proposal of *Caldicoprobacteraceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 67–71, 2010.

ZHANG, W. et al. Bacterial community composition and abundance in leachate of semi-aerobic and anaerobic landfills. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 11, p. 1770–1777, 2011.

ZHANG, X. et al. *Petroclostridium xylanilyticum* gen. Nov., sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from an oilfield, and reclassification of clostridial cluster iii members into four novel genera in a new *hungateiclostridiaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 3197–3211, 2018.

ZVEIBIL, V. Z. **Manual de Gerenciamento Integrado de Resíduos Sólidos**. Rio de Janeiro: Ibam, 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TABELA DE FREQUÊNCIA DOS PROCARIOTOS IDENTIFICADOS

Identificação	Frequência
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; <i>Pseudomonas</i> ; e_	1666
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Family XI; <i>Sedimentibacter</i> ; e_	901
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Christensenellaceae; Christensenellaceae R-7 group; e_	794
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Family XIII; <i>Anaerovorax</i> ; e_	542
Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfobacterales; Desulfobulbaceae; <i>Desulfobulbus</i> ; e_	522
Bacteria; Synergistetes; Synergistia; Synergistales; Synergistaceae; g_; e_	496
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae; <i>Ruminiclostridium</i> ; e_	458
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Dysgonomonadaceae; <i>Proteiniphilum</i> ; e_	421
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae; <i>Comamonas</i> ; e_	417
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptococcaceae; g_; e_	405
Bacteria; Synergistetes; Synergistia; Synergistales; Synergistaceae; g_; e_	396
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Syntrophomonadaceae; <i>Syntrophomonas</i> ; e_	374
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Family XI; g_; e_	357
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Syntrophomonadaceae; g_; e_	339
Bacteria; Epsilonbacteraeota; Campylobacteria; Campylobacteriales; Arcobacteraceae; <i>Arcobacter</i> ; e_	322
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae; g_; e_	317
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Caldicoprobacteraceae; <i>Caldicoprobacter</i> ; e_	303
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae; <i>Fastidiosipila</i> ; e_	268
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae; <i>Ruminiclostridium</i> 1; e_	268
Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; <i>Vulcanibacillus</i> ; e_	267
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Family XIII; <i>Anaerovorax</i> ; e_	263
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Rikenellaceae; DMER64; e_	261
Bacteria; Kiritimatiellaeota; Kiritimatiellae; WCHB1-41; f_; g_; e_	253
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Rhodocyclaceae; <i>Thauera</i> ; e_	253
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; f_; g_; e_	249
Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfuromonadales; Geobacteraceae; <i>Geobacter</i> ; e_	245
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Rikenellaceae; DMER64; e_	243
Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Micrococcales; Microbacteriaceae; g_; e_	240

Identificação	(continuação)
	Frequência
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Rikenellaceae; g_; e_	234
Bacteria; Synergistetes; Synergistia; Synergistales; Synergistaceae; Syner-01; e_	224
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; MBA03; f_; g_; e_	209
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae; g_; e_	204
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Rikenellaceae; g_; e_	197
Bacteria; Synergistetes; Synergistia; Synergistales; Synergistaceae; g_; e_	178
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Rhodocyclaceae; <i>Dechlorobacter</i> ; e_	177
Bacteria; Cloacimonetes; Cloacimonadia; Cloacimonadales; W27; g_; e_	175
Bacteria; Firmicutes; Erysipelotrichia; Erysipelotrichales; Erysipelotrichaceae; g_; e_	175
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae; Ercella; e_	172
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; <i>Thiopseudomonas</i> ; e_	170
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; MBA03; f_; g_; e_	168
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae; Fastidiosipila; e_	166
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Sphingobacteriales; Lentimicrobiaceae; Bacteroidetes bacterium ADurb.BinA012; e_	160
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptococcaceae; <i>Cryptanaerobacter</i> ; e_	160
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Chromatiales; Chromatiaceae; <i>Thiophageococcus</i> ; e_	147
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Gracilibacteraceae; <i>Lutispora</i> ; e_	143
Bacteria; Planctomycetes; Planctomycetacia; Pirellulales; Pirellulaceae; p-1088-a5 gut group; e_	141
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptococcaceae; <i>Pelotomaculum</i> ; e_	140
Bacteria; Synergistetes; Synergistia; Synergistales; Synergistaceae; <i>Aminobacterium</i> ; e_	140
Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; OPB41; f_; g_; e_;	139
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; o_; f_; g_; e_	139
Bacteria; Deferribacteres; Deferribacteres; Deferribacterales; Deferribacteraceae; <i>Geovibrio</i> ; e_	139
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae; g_; e_	139
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Dysgonomonadaceae; <i>Fermentimonas</i> ; e_	134
Bacteria; Thermotogae; Thermotogae; Petrotogales; Petrotogaceae; <i>Defluviitoga</i> ; e_	132
Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfovibrionales; Desulfomicrobiaceae; <i>Desulfomicrobium</i> ; e_	131
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae; <i>Pusillimonas</i> ; e_	131

(continuação)

Identificação	Frequência
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Dysgonomonadaceae; <i>Petrimonas</i> ; e_	129
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Family XIII; <i>Anaerovorax</i> ; e_	129
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; o_; f_; g_; e_	126
Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; OPB41; f_; g_; e_	125
Bacteria; Firmicutes; c_; o_; f_; g_; e_	125
Bacteria; Patescibacteria; Berkelbacteria; o_; f_; g_; e_	125

Notas: Os OTUs foram identificados ao menor nível possível. A tabela apresenta os OTUs identificados que possuem frequência relativa mínima de 0,5%. As etiquetas taxonômicas em branco para classe (c_), ordem (o_), família (f_), gênero (g_) ou espécie (e_) correspondem à uma sequência de referência que possui sua taxonomia pobremente definida na base de dados SILVA versão 132.

ANEXOS

ANEXO A – COMPOSTOS ORGÂNICOS XENOBIÓTICOS OBSERVADOS NO CHORUME
(µG/L)

Composto	Varição
Hidrocarbonetos aromáticos	
Benzeno	0,2-1.630
Tolueno	1.0-12.300
Xilenos	0,8-3.500
Etilbenzeno	0,22
Trimetilbenzenos	0,3-250
n-Propilbenzenos	0,3-16
t-Butilbenzenos	2,1-21
o-Etiltolueno	0,5-46
m-Etiltolueno	0,3-21
p-Etiltolueno	0,2-10
Naftaleno	0,1-260
Hidrocarbonetos halogenados	
Clorobenzeno	0,1-110
1,2-Diclorobenzeno	0,1-32
1,3-Diclorobenzeno	5,4-19
1,4-Diclorobenzeno	0,1-16
1,2,3-Triclorobenzeno	1,0
1,2,4-Triclorobenzeno	4,3
Hexaclorobenzeno	0,025-10
1,1-Dicloroetano	0,6-46
1,2-Dicloroetano	<6
1,1,1-Tricloroetano	0,01-3.810
1,1,2-Tricloroetano	2,5-16
1,1,2,2-Tetracloroetano	1,0
trans-1,2-Dicloroetileno	1,6-6.582
cis-1,2-dicloroetileno	1.4-470
Tricloroetileno	0,05-750
Tetracloroetileno	0,01-250
Diclorometano	1,0-827
Triclorometano	1,0-70
Tetracloro de carbono	4,0-9,0
Fenóis	
Fenol	0,6-1.200
Etilfenóis	<300
Cresóis	1,0-2.100
Bisfenol A	200-240
3,5-Dimetilfenol	0,7-27,3
2,5-Dimetilfenol	0,4-4,5
2,4-Dimetilfenol	0,1-12,5
3,4-Dimetilfenol	0,03-10,4
2,6-Dimetilfenol	0,3-1,9
2-Metoxifenol	!'
2/3-Clorofenol	0,03-1,6
4-Clorofenol	0,2-1,3
4-Cloro-m-cresol	1,2-10,2
3,5-Di-clorofenol	0,08-0,63
2,3,4,6-Tetraclorofenol	0,079-3,0

(continuação)	
Composto	Variação
Alquilfenóis	
Nonilfenol	6,3-7,0
Nonilfenol monocarboxilato	0,5-3,0
Pesticidas	
Ametrina	0,12
AMPA	3,8-4,3
Atrazina	0,16
Bentazon	0,3-4,0
Cloridazon	1,6
Cloroprofame	26
Diclobenil	0,1-0,3
Fenproprimorfe	0,1
Glifosato	1,7-27
Hexazinona	1,3
Hidroxiatrazina	0,7-1,7
Hidroxisimazina	0,6-1,7
Isoproturon	1,2
Lindano	0,025-0,95
Mecoprop	0,38-150
MCPA	0,2-9,1
Propoxuron	2,6
Simazina	2,3
Tridimefon	2,1
4-CPP	15-19
2,4-D	1,0-5,0
2,4,5-T	1 ¹
2,4-DP	0,3-5,2
2,6-DCPP	0,7-1,3
Ftalatos	
Monometil ftalato	1,0
Dimetil ftalato	0,1-7,7
Dietil ftalato	0,1-660
Metil-etil ftalato	2,0-340
Mono-(2-etilhexil) ftalato	4,0-14
Di-(2-etilhexil) ftalato	0,6-235,9
Mono-butilftalato	4,0-16
Di-n-butilftalato	0,1-70 5,0-15
Di-isobutilftalato	3,0-6,0
Mono-benzilftalato	6,0-16
Butilbenzil ftalato	0,2-8,0
Dioctilftalato	1,0-6,0
Ácido ftálico	2,0-14.000
Sulfonatos aromáticos	
Naftaleno-1-sulfonato	505-616
Naftaleno-2-sulfonato	1.143-1.188
Naftaleno-1,5-dissulfonato	<2,5-51
Naftaleno-1,6-dissulfonato	366-397
Naftaleno-2,7-dissulfonato	129-145
2-aminonaftaleno-4,8-dissulfonato	73-109
p-toluenossulfonato	704-1.084
Fosfonatos	
Tri-n-butilfosfato	1,2-360
Trietilfosfato	15

Composto	(continuação) Variação
Diversos	
Acetona	6,0-4.400
2(3H)-Benzotiazolona	10-50
Camphor	20,6-255,2
Cumen	0,3-7,4
Fenchone	7,3-83
Tetrahidrofurano	9,0-430
Indane	0,2-20
Metiletilcetona	110-6.600
Metil-isso-butilcetona	1.1-176
Dimetoximetano	1.1
MTBE	0,8-35
Estireno	0,5-1,6

Fonte: KJELDEN et al., 2002, p. 313-315

Nota: “1” indica que o composto não pode ser quantificado.