



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

PPGBTC-UFSC/Biologia Molecular e Métodos Analíticos

Bioresource Technology 192 (2015) 735–740



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech



Use of PCR-DGGE based molecular methods to assessment of microbial diversity during anaerobic treatment of antibiotic combinations

Sevcan Aydin^{a,*}, Aiyoub Shahi^a, E. Gozde Ozbayram^a, Bahar Ince^b, Orhan Ince^a

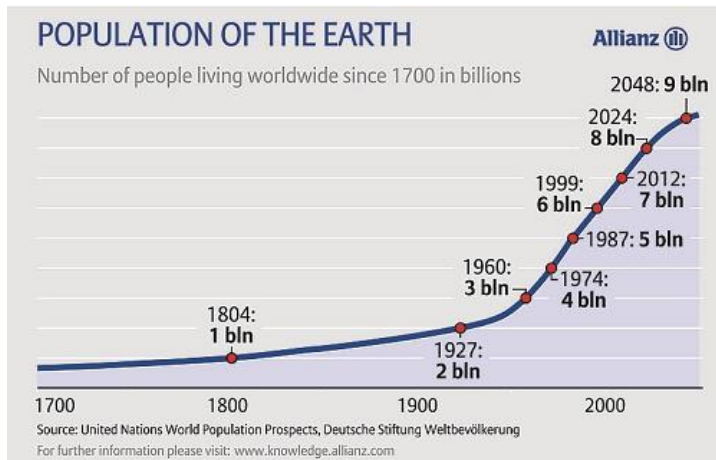
^a Environmental Engineering Department, Istanbul Technical University, Maslak, Istanbul, Turkey

^b Institutes of Environmental Sciences, Bogazici University, Bebek, Istanbul, Turkey

Angela Alves dos Santos

Introdução – Antibióticos

- A produção e o uso de antibióticos têm aumentado nos últimos anos;



- Após o uso, os componentes não metabolizados vão parar no esgoto/efluente.

Introdução - Tratamento de esgoto

- Os sistemas de tratamento atuais são incapazes de eliminar os antibióticos e seus componentes

Resultado: Poluição do meio ambiente
Impacto na microbiota →

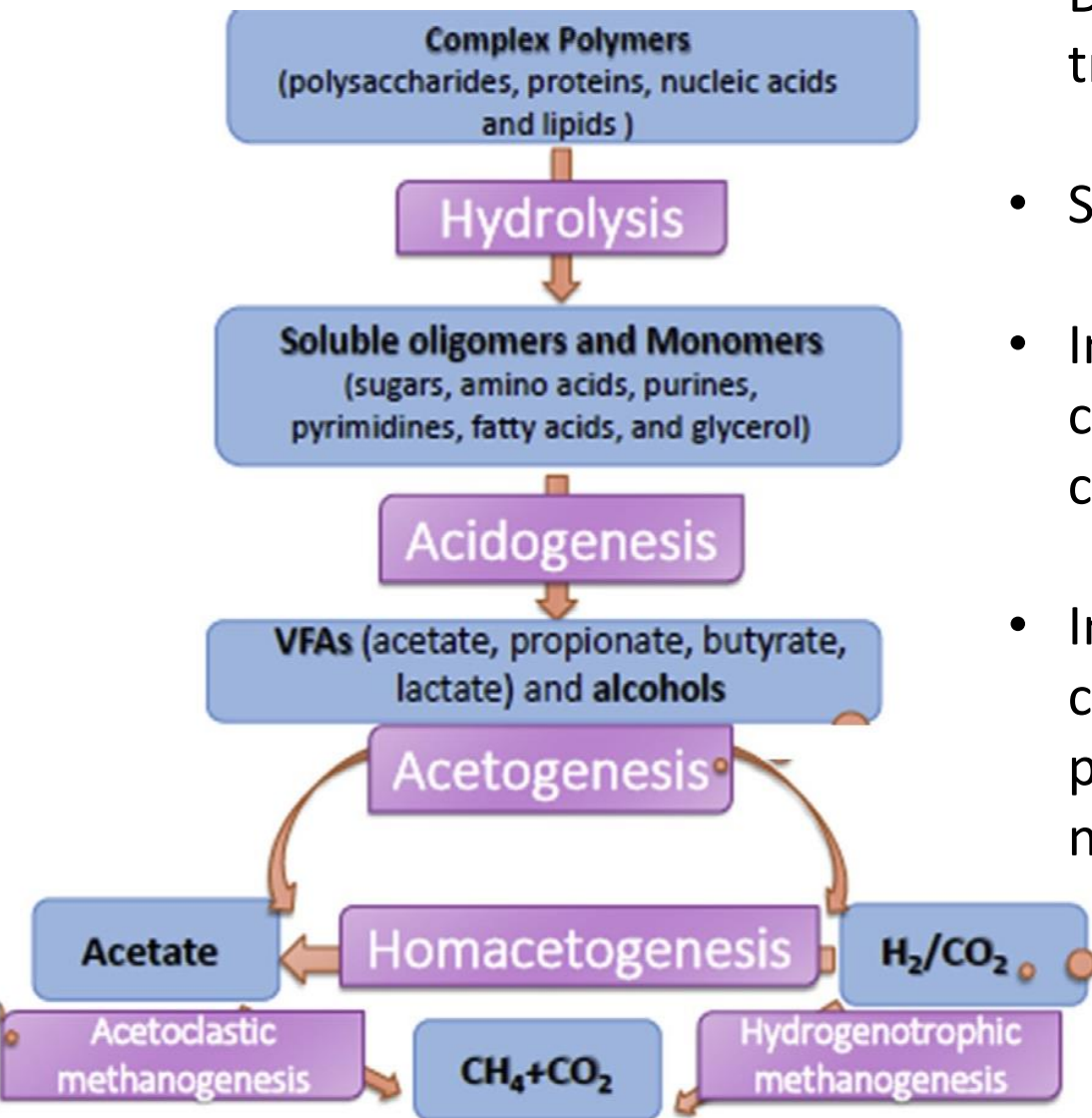


- Pouco se sabe sobre o efeito dos antibióticos nos mecanismos de tratamento de efluentes industriais:

Ex. Tratamento de efluentes de indústrias farmacêuticas

Introdução – Tratamento de efluentes industriais

- Reatores Anaeróbios



- Domínios Archaea e Bacteria trabalham juntos;
- Sistema complexo;
- Importante entender a composição e a dinâmica das comunidades microbianas;
- Importante entender como essas comunidades são impactadas pela presença dos antibióticos nos efluentes.

Aydin, et al. 2015b.

Métodos Moleculares



Amplificação e sequenciamento de regiões do DNA

Gene que codifica o 16S rRNA: Gene presente no DNA procariótico:

↳ Apresenta regiões conservadas (para iniciadores) separadas por regiões de variações de sequência (para análise filogenética).

PCR-DGGE

PCR- Amplificação de regiões do gene que codifica o 16s rRNA de diferentes microrganismos de amostras;

DGGE - Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação.

Objetivos do artigo

- Determinar as mudanças no perfil das comunidades de Bacteria e Archaea em um Reator Anaeróbico em Batelada Sequencial para o tratamento de efluentes com a adição combinada e gradual de três tipos de antibióticos:

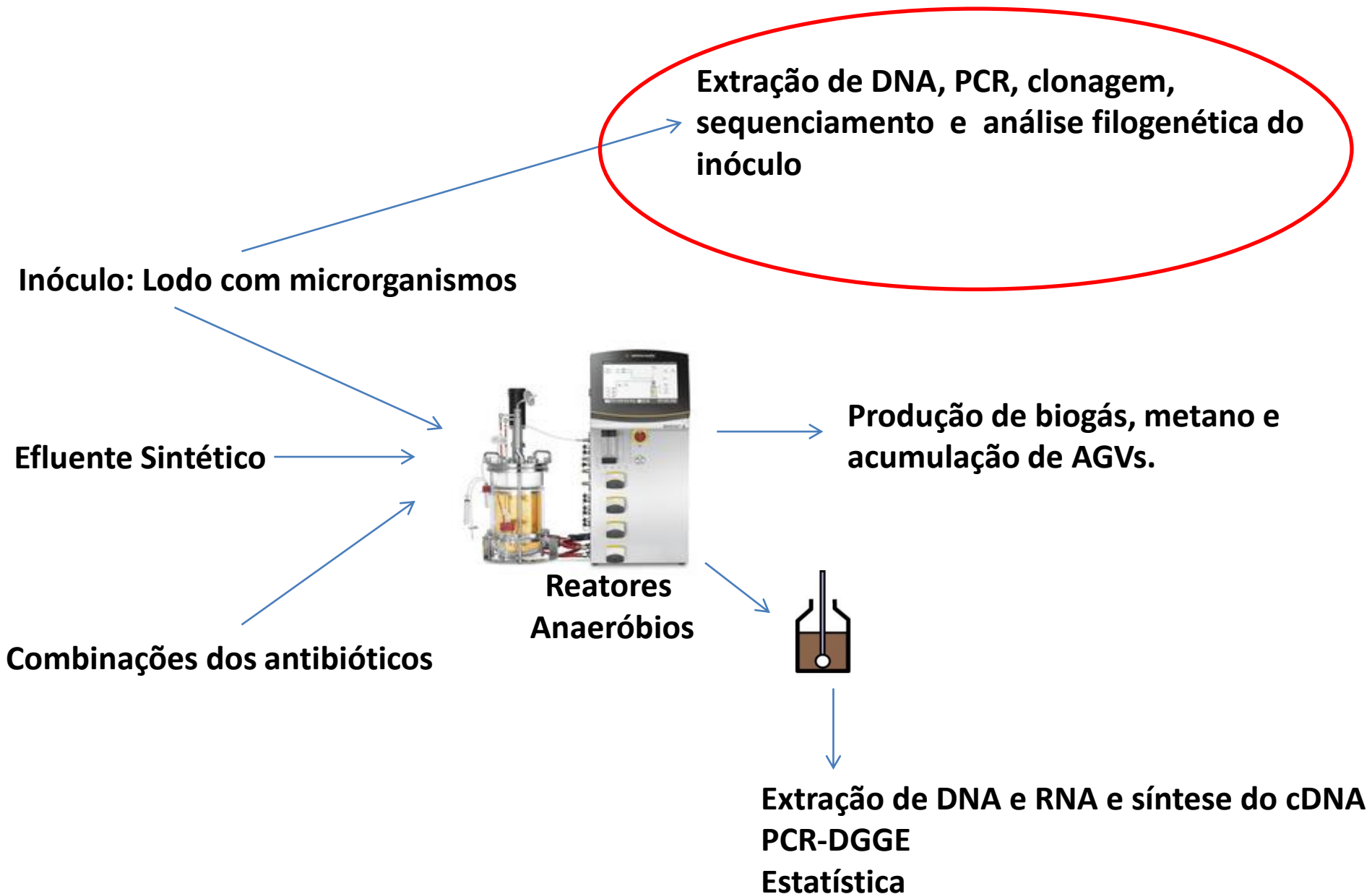
Sulfametoxazol

Eritromicina

Tetraciclina

- Examinar o efeito combinado desses antibióticos na comunidade microbiana e na produção de biogás.

Metodologia – Geral

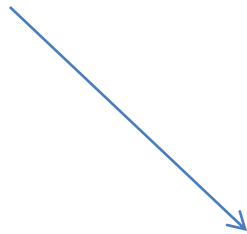


Metodologia – Extração de DNA e PCR

Amostras do Inóculo



Extração de DNA com o kit



DNA



Regiões do gene do 16S rRNA

PCR



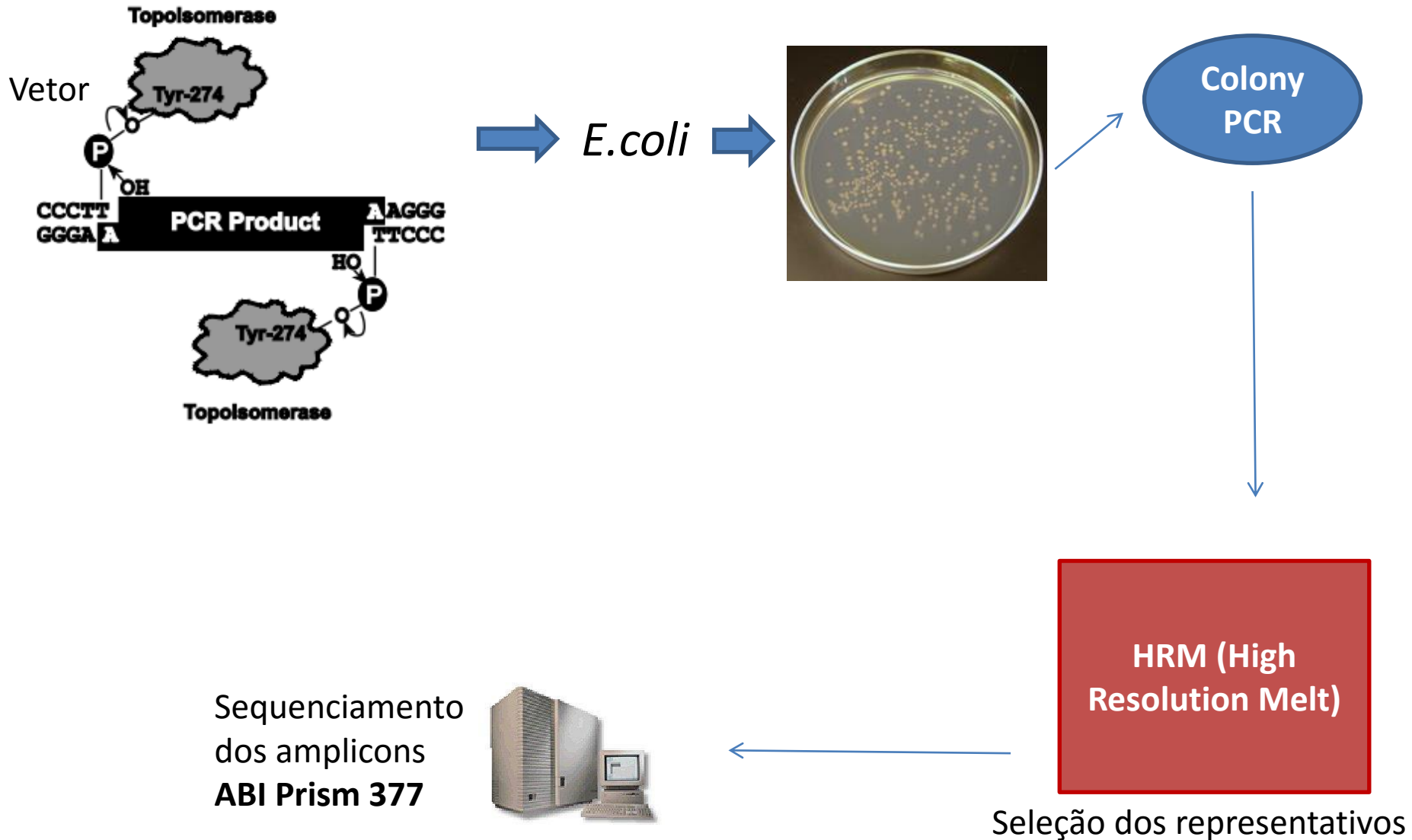
Bact8f-Bact1541r Bactéria
Arch233f-Arch855r Archaea



Clonagem e Sequenciamento

Metodologia – Clonagem e Sequenciamento

- Produtos de PCR clonados com o **TOPO TA Cloning Kit**

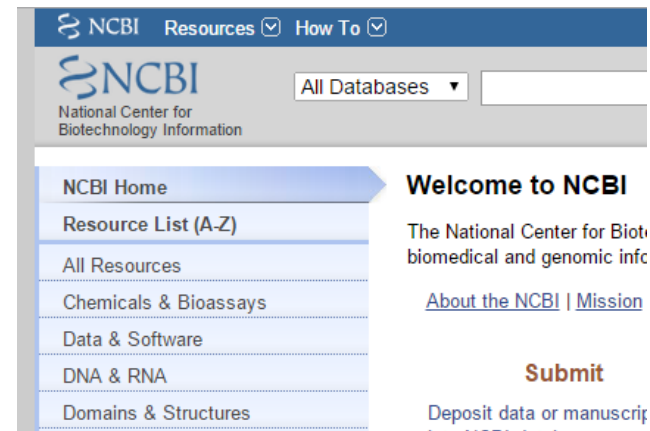


Metodologia – Análise das sequências e estatística



Análise das sequências

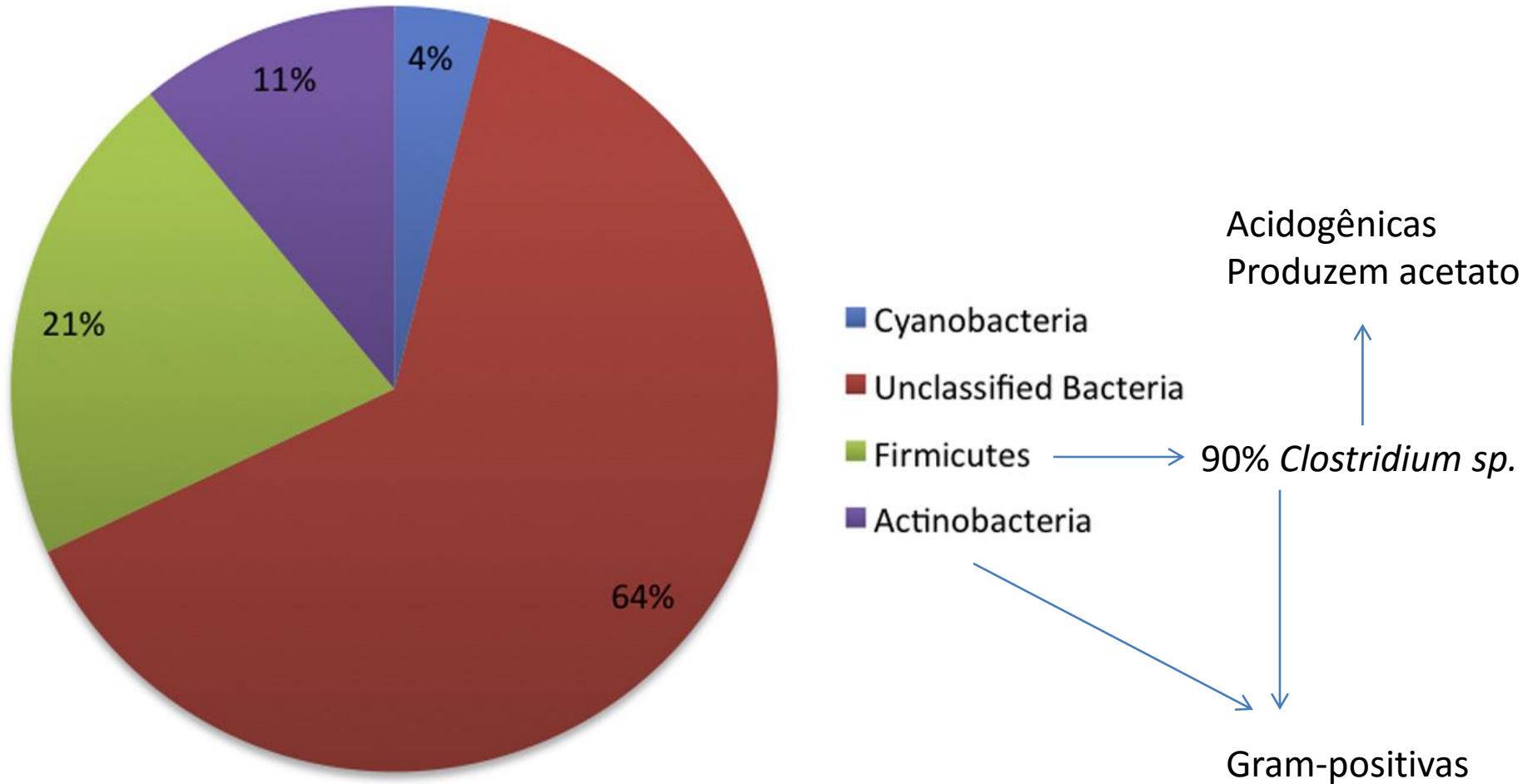
Análise Filogenética



Resultados

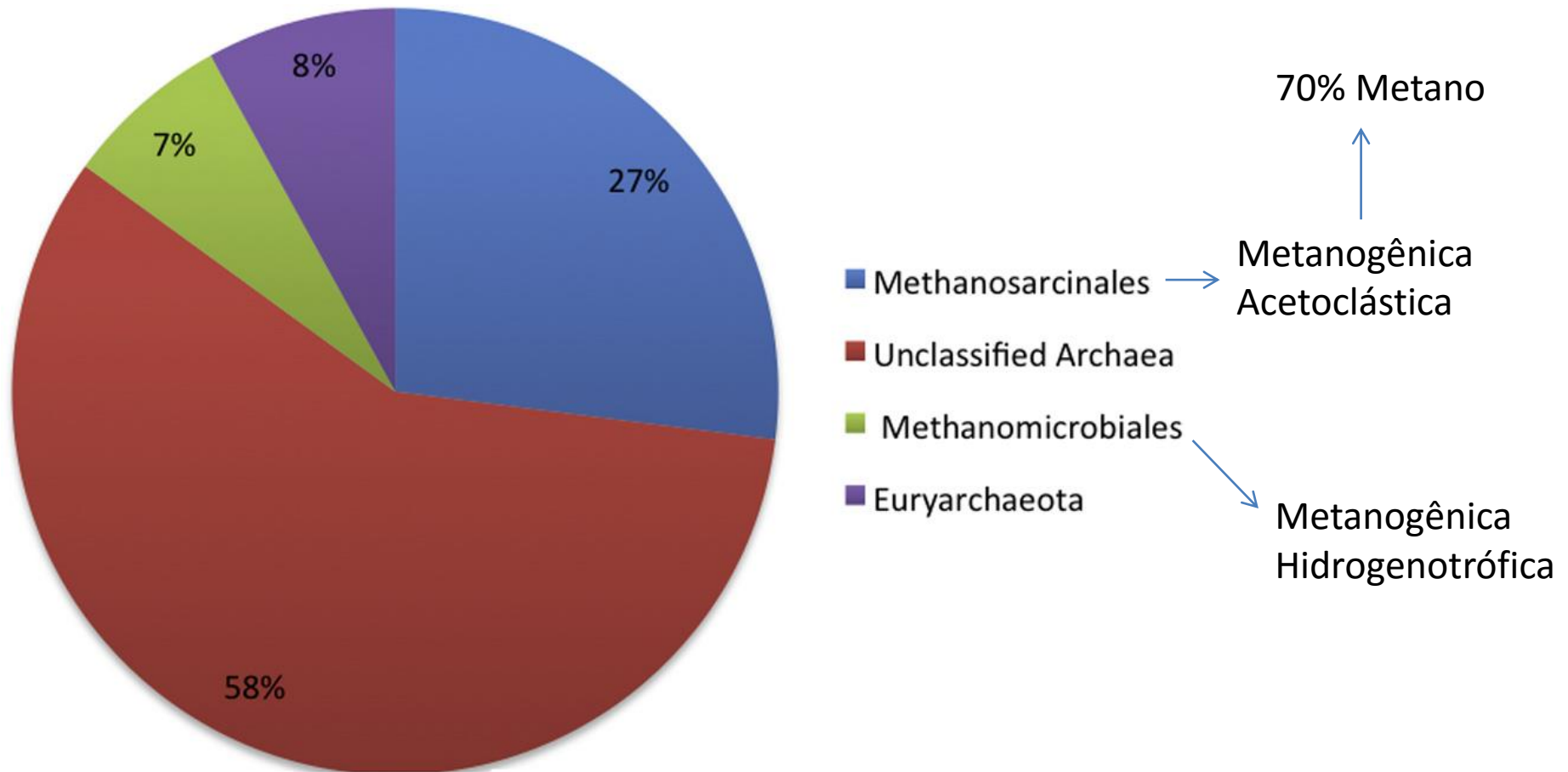
Resultados – Caracterização do inóculo

- Distribuição dos filos de **Bacteria** a partir do sequenciamento das regiões do gene que codifica o 16S rRNA.

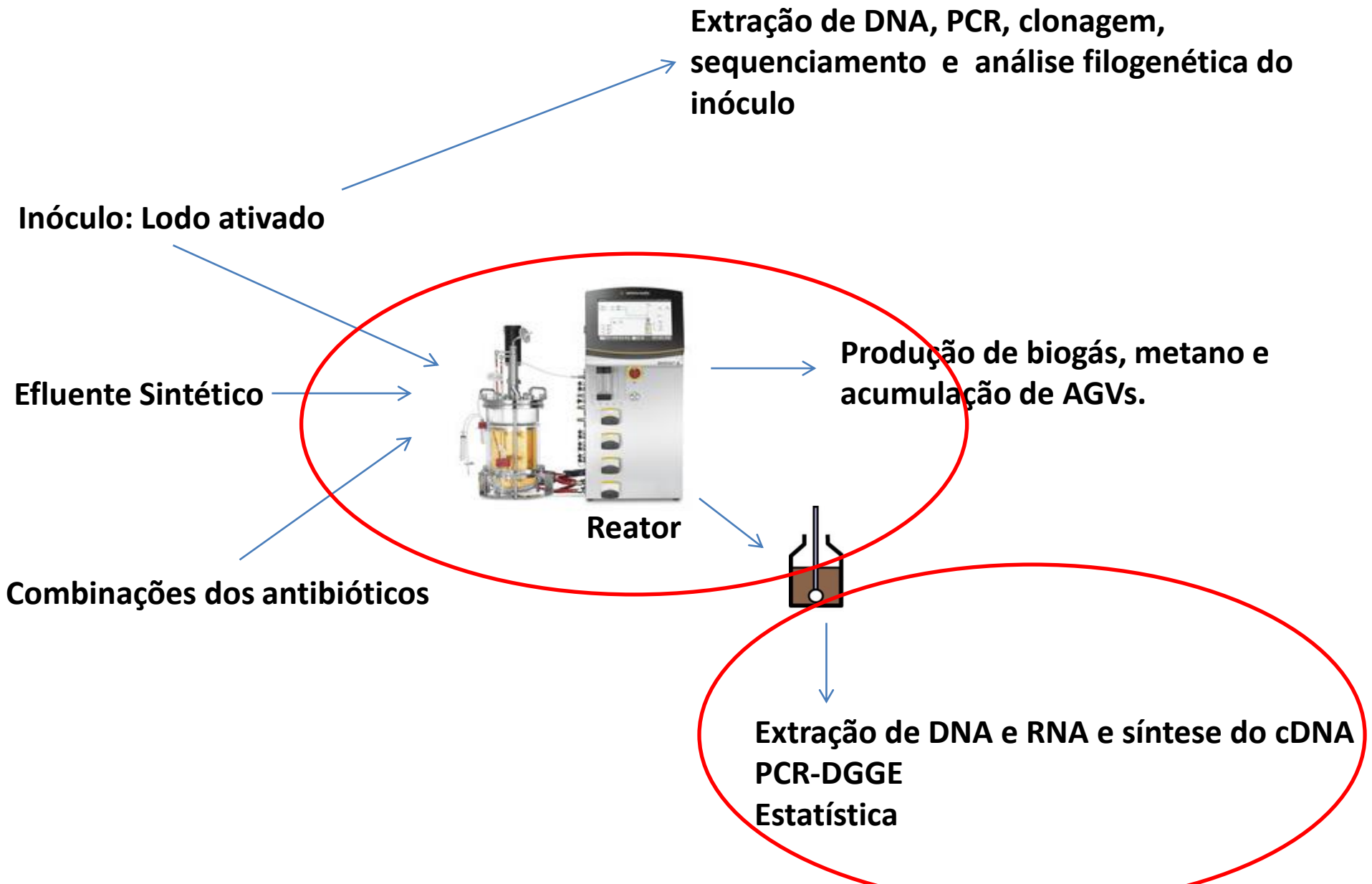


Resultados - Caracterização do inóculo

- Distribuição dos filos de **Archaea** a partir do sequenciamento das regiões do gene que codifica o 16S rRNA.

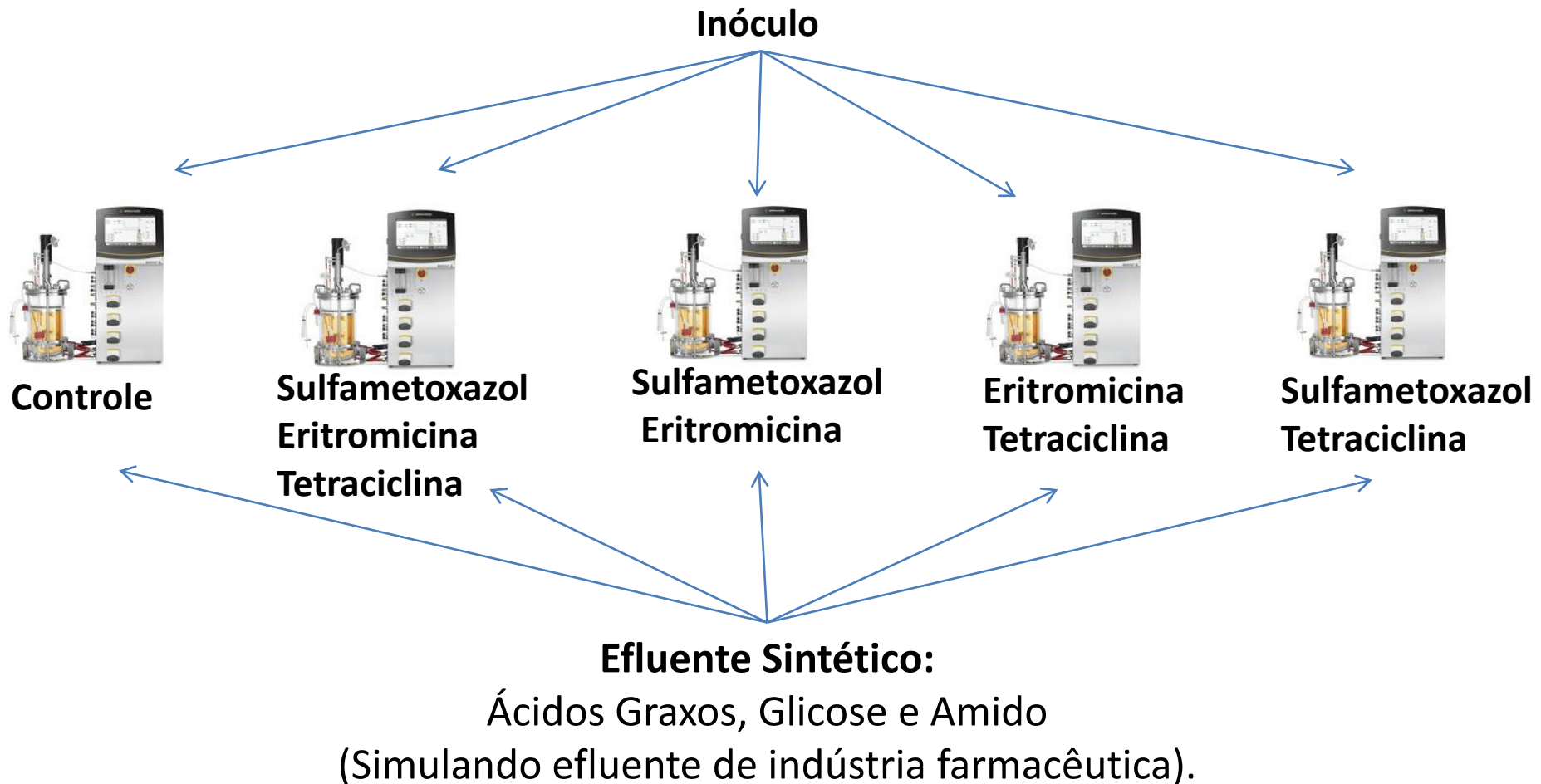


Metodologia - Geral



Metodologia – Reatores Anaeróbios

- 5 Reatores de 1,5 L

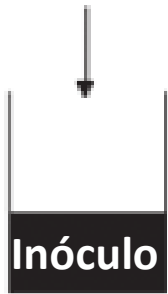


Metodologia – Reatores Anaeróbios

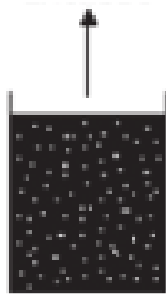
Reatores Anaeróbios em Batelada Sequencial

Alimentação

Efluente Sintético



Reação



Sedimentação



Descarga



Produção de biogás, metano e
acumulação de AGVs.



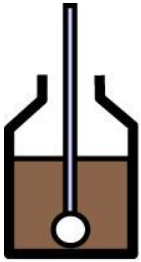
**Cromatografia
Gasosa**

Table 1

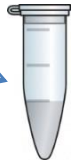
Tested antibiotic concentrations.

	Sulfamethoxazole (mg/L)	Erythromycin (mg/L)	Tetracycline (mg/L)
Stage 1	0.5	0.1	0.1
Stage 2	5	0.2	0.2
Stage 3	5	0.5	0.5
Stage 4	10	0.5	0.5
Stage 5	10	1	1
Stage 6	15	1	1
Stage 7	15	1.5	1.5
Stage 8	20	1.5	1.5
Stage 9	20	2	2
Stage 10	25	2.5	2.5
Stage 11	40	2.5	2.5
Stage 12	40	3	3
Stage 13	40	4	4

Metodologia – PCR-DGGE



Amostras de lodo foram coletadas em cada estágio de antibiótico.



Extração de DNA com o kit



Extração de RNA com o kit Purelink RNA Extraction

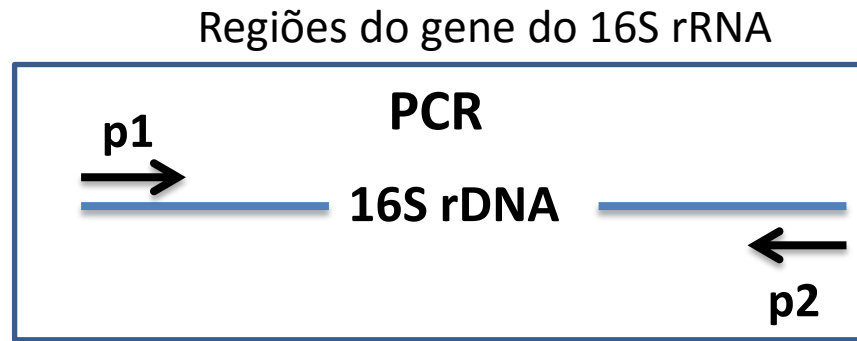
Síntese do cDNA com o kit SuperScript cDNA Synthesis



DNA



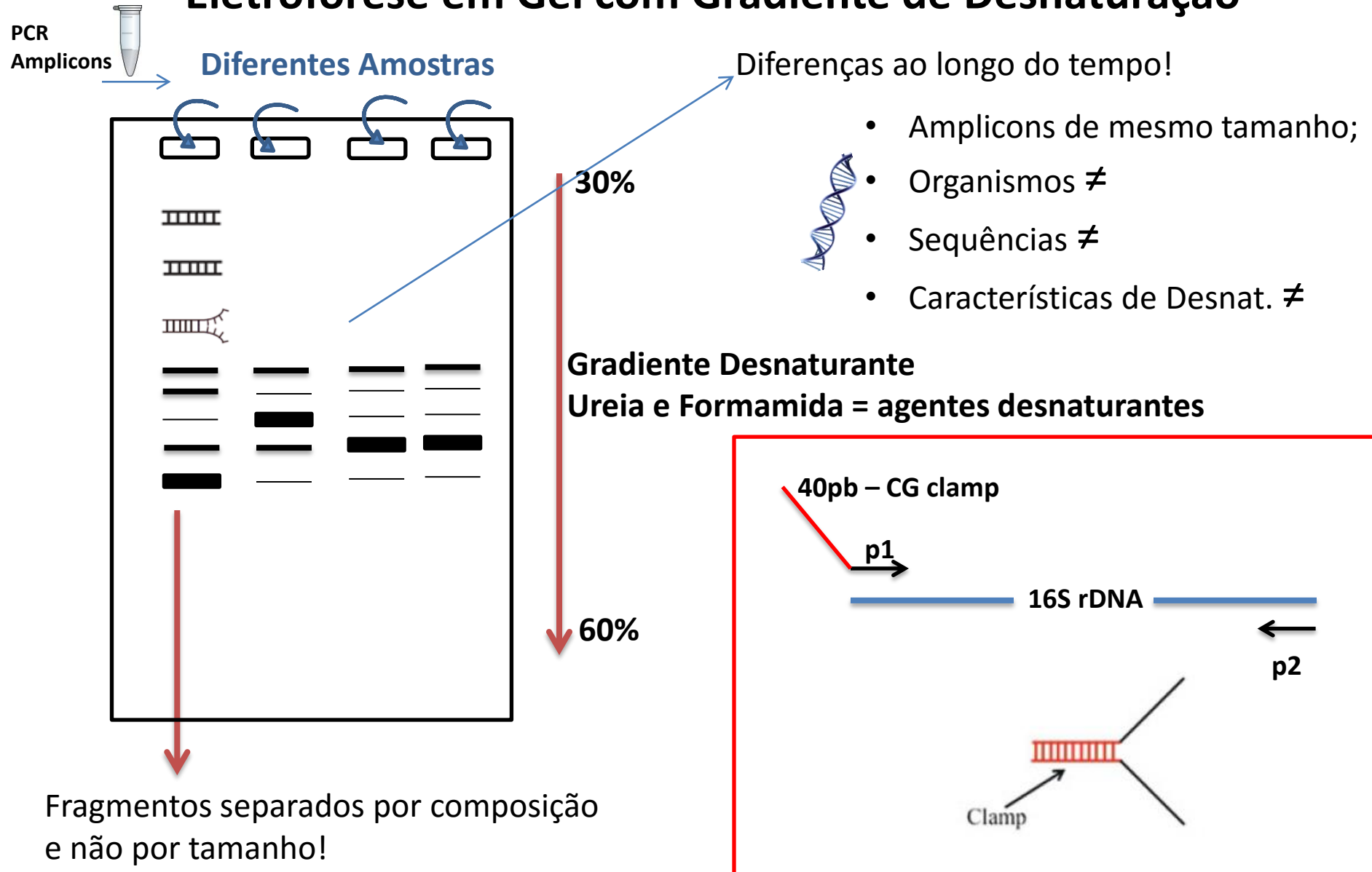
cDNA



Eletoforese em Gel com Gradiente de Desnaturação (DGGE)

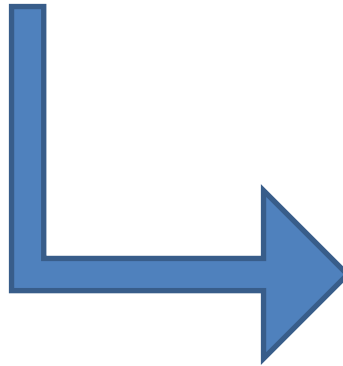
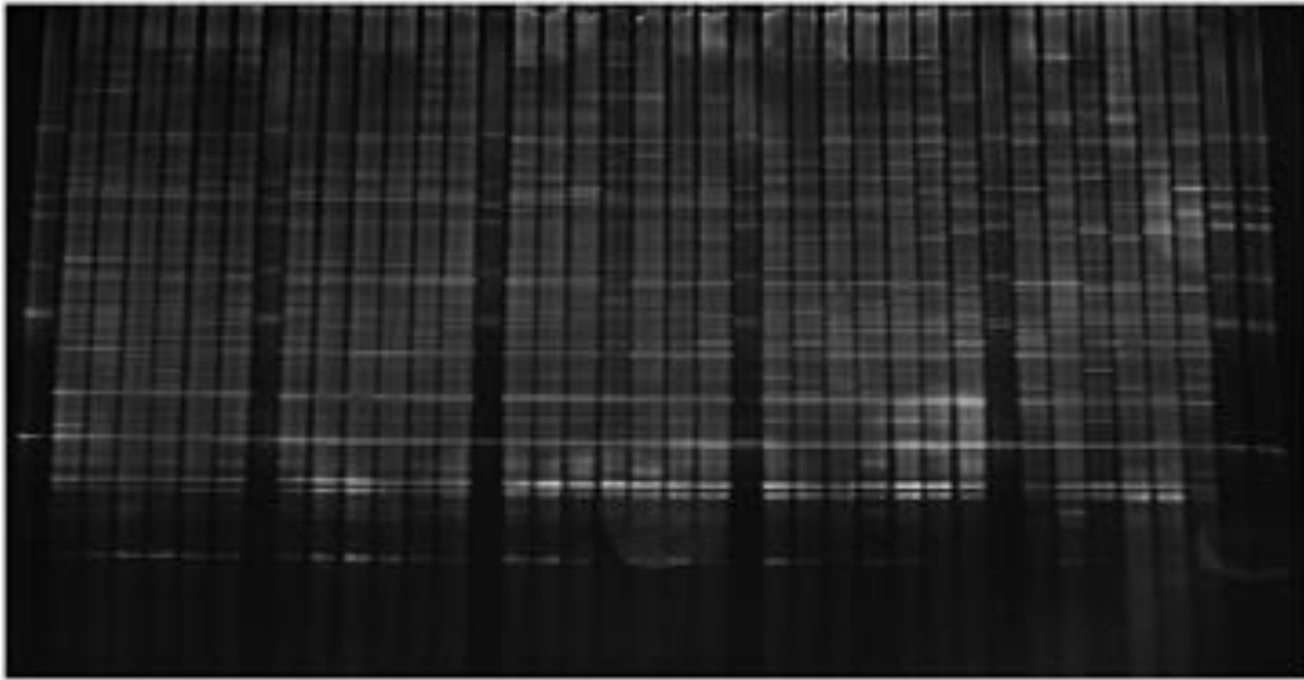
Metodologia – PCR-DGGE - Princípio

Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação

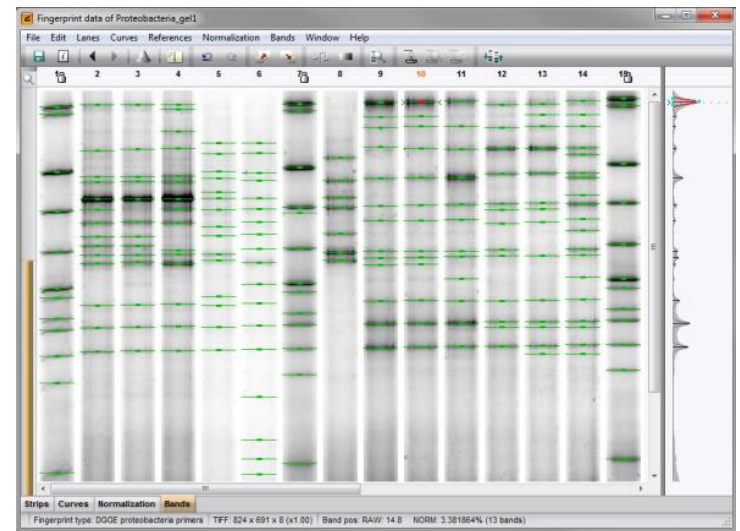


Metodologia – PCR-DGGE

Denaturing gradient
↓
Charge
+



Perfil e intensidade das bandas



Metodologia – Análise das bandas e estatística

Perfil e intensidade das bandas

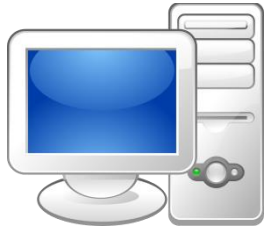
BioNumerics 5.0



www.applied-maths.com

Análise Cluster e de Similaridade entre as amostras

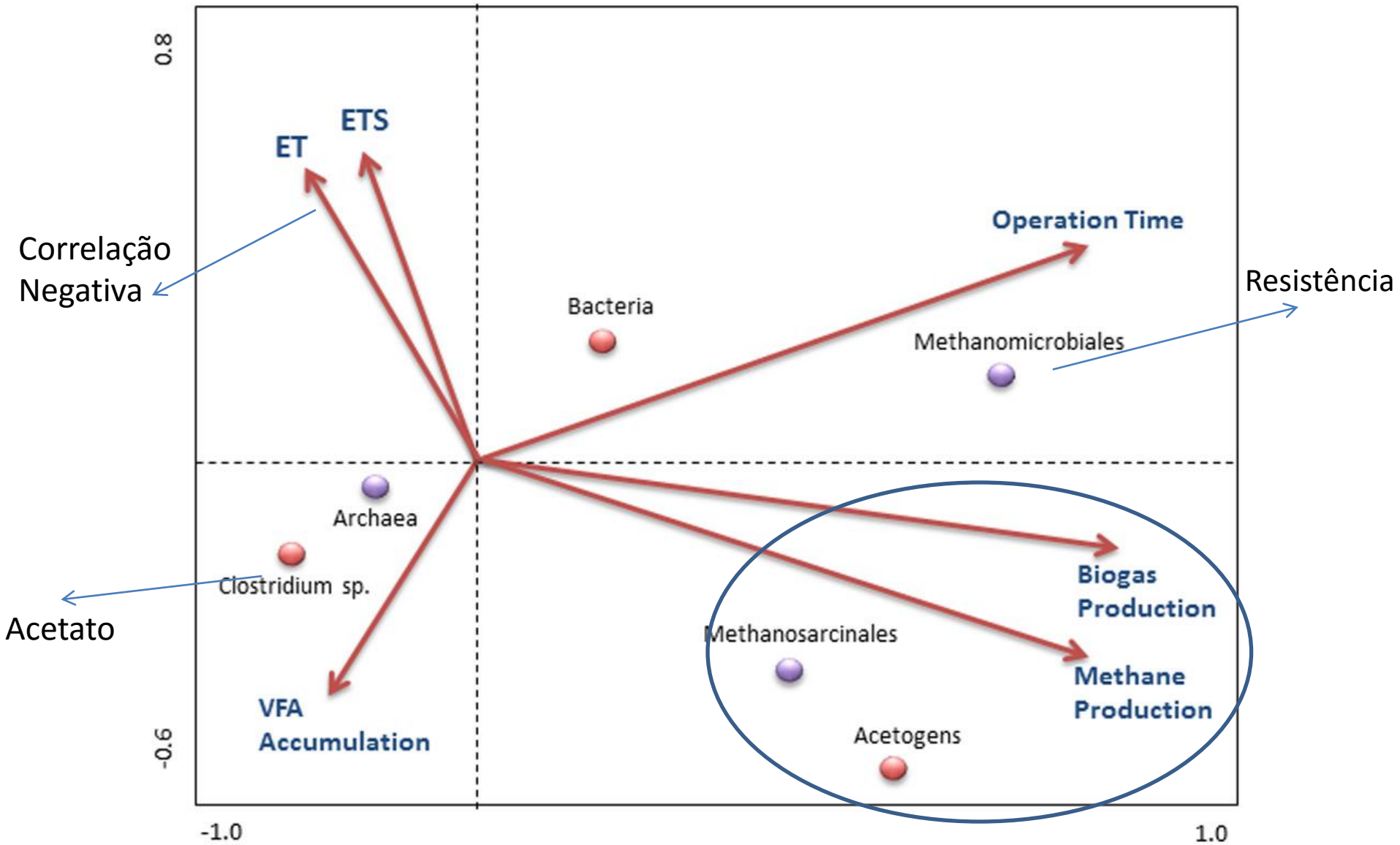
Análise de Correspondência Canônica entre as variáveis (Produção de biogás, tempo de operação, adição de antibióticos, acúmulo de AGVs) e o perfil de microrganismos das amostras



Resultados

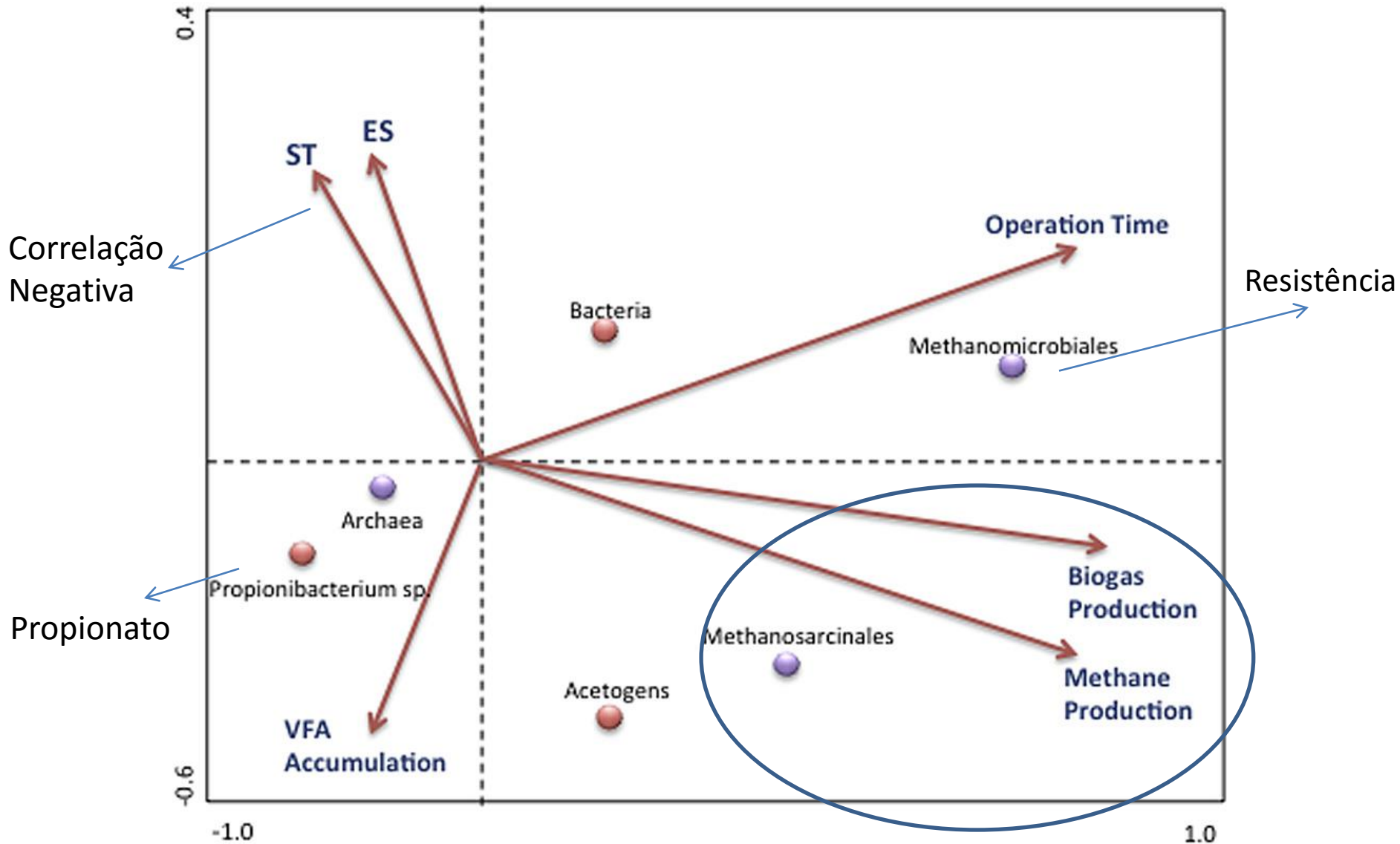
Resultados – Análise de Correspondência Canônica

- Influência das combinações: **Sulfametoxazol+Eritromicina+Tetraciclina (ETS)**
Eritromicina+Tetraciclina (ET)

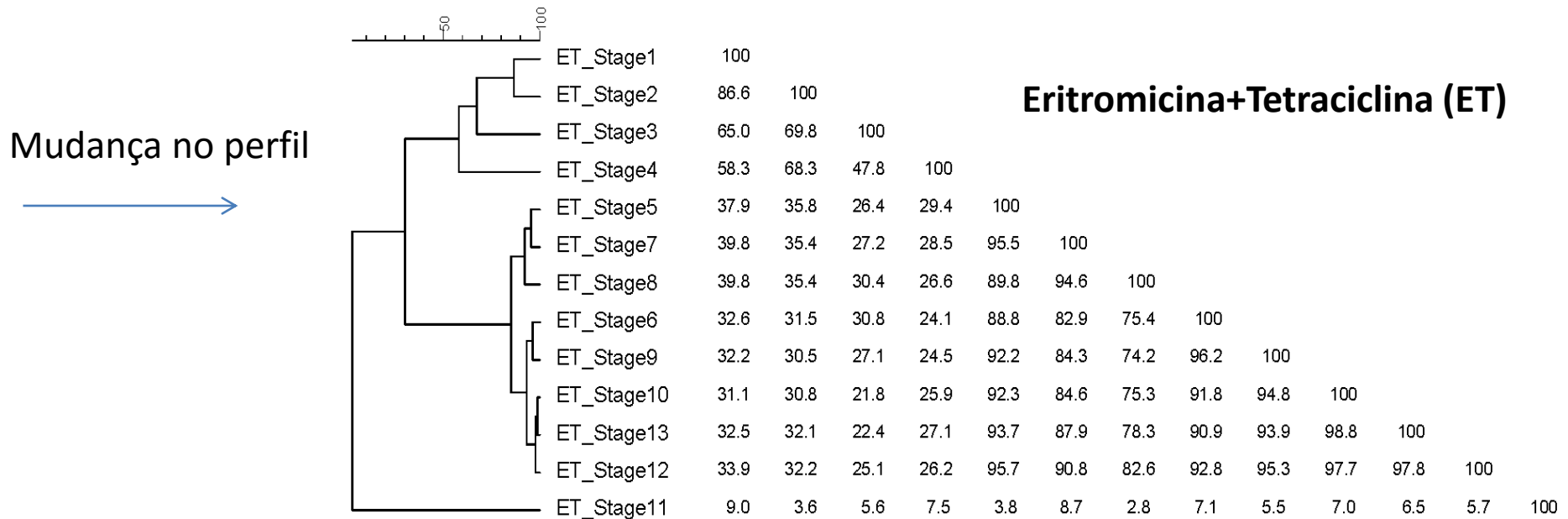
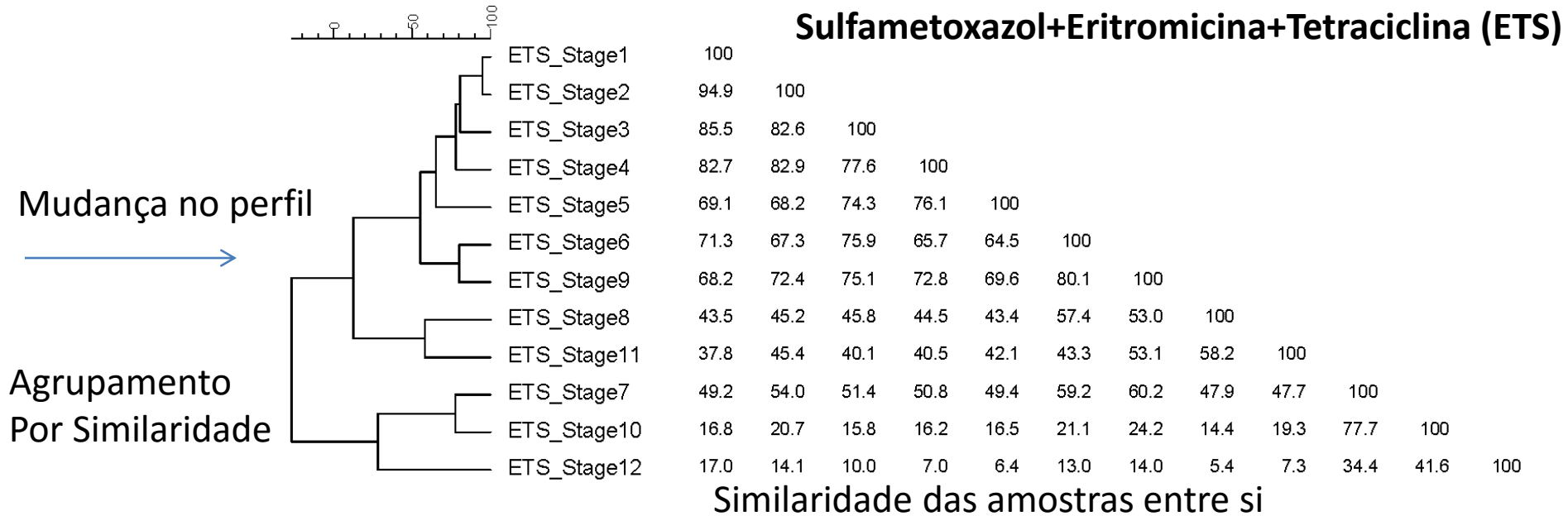


Resultados - Análise de Correspondência Canônica

- Influência das combinações: **Sulfametoxazol+Tetraciclina (ST)**
Eritromicina+Sulfametoxazol (ES)

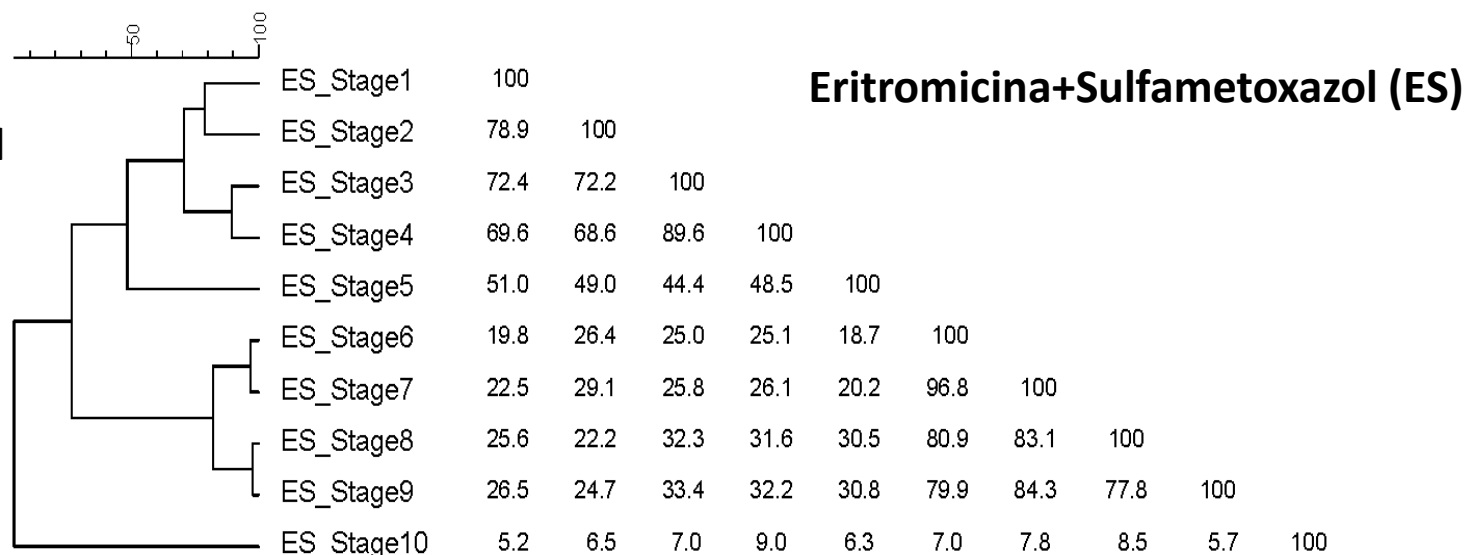


Resultados – Análise Cluster e de Similaridade

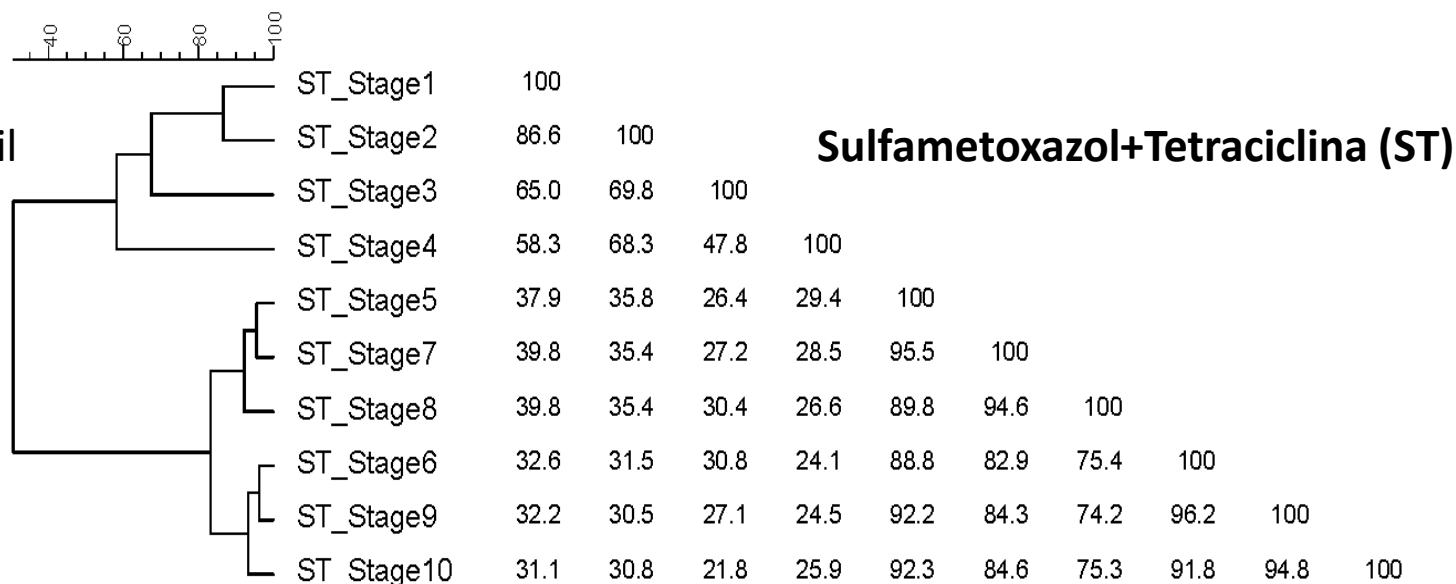


Resultados - Análise Cluster e de Similaridade

Mudança no perfil
→



Mudança no perfil
→



Conclusões

- As concentrações crescentes de antibiótico impactaram negativamente a estrutura das comunidades microbianas e a função do reator anaeróbio;
- Combinações de antibióticos tem maior efeito sobre as Archaeas metanogênicas acetoclásticas;
- Importância das bactérias Gram-negativas;
- A interação entre Bactérias acetogênicas e Archaeas metanogênicas é crítica para o desempenho dos reatores;
- PCR-DGGE mostrou-se como uma análise útil para avaliar mudanças nos perfis das comunidades microbianas em sistemas anaeróbios.

Referências

MUYZER, G. et al. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**. 1993.

AYDIN, S. et al. Use of PCR-DGGE based molecular methods to assessment of microbial diversity during anaerobic treatment of antibiotic combinations. **Bioresource Technology**. 2015a.

AYDIN, S. et al. Application of real-time PCR to determination of combined effect of antibiotics on Bacteria, Methanogenic Archaea, Archaea in anaerobic sequencing batch reactors. **Water Research**. 2015b.

OBRIGADA! 😊