



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS  
NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**JORGE LUIS RODRÍGUEZ MANRIQUE**

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E DE AMBIENTE AQUÁTICO, COM  
POTENCIAL PARA BIORREMEDIAÇÃO, ISOLADAS DO IGARAPÉ DO  
QUARENTA, NA CIDADE DE MANAUS-AM**

**MANAUS – ABRIL  
2015**

**JORGE LUIS RODRÍGUEZ MANRIQUE**

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E DE AMBIENTE AQUÁTICO, COM  
POTENCIAL PARA BIORREMEDIAÇÃO, ISOLADAS DO IGARAPÉ DO  
QUARENTA, NA CIDADE DE MANAUS-AM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (MBT/UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Jair Max Furtunato Maia

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Antonia Queiroz Lima De Souza

**MANAUS – ABRIL**

**2015**

**JORGE LUIS RODRÍGUEZ MANRIQUE**

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E DE AMBIENTE AQUÁTICO, COM  
POTENCIAL PARA BIORREMEDIAÇÃO, ISOLADAS DO IGARAPÉ DO  
QUARENTA, NA CIDADE DE MANAUS-AM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (MBT/UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação 23 / 04 / 2015

Banca Examinadora:

---

Dr. Jair Max Furtunato Maia  
Universidade do Estado do Amazonas

---

Dr. Afonso Duarte Leão de Souza  
Universidade Federal do Amazonas

---

Dra. Erica Simplício de Souza  
Universidade do Estado do Amazonas

**MANAUS - ABRIL**

**2015**

## **DEDICATÓRIA**

A Dios por permitir mí llegada a este gran país, otorgarme la sabiduría, paciencia, perseverancia y tranquilidad necesaria para cumplir mis objetivos profesionales.

A mis padres, Roxana Manrique y Jorge Rodríguez, los que siempre, a pesar de la distancia, estuvieron a mi lado día a día durante este arduo periodo de trabajo y crecimiento profesional y personal. Por la educación y el inmenso amor recibido. Por sus siempre perfectas palabras de aliento que renovaban mis ganas de seguir adelante cuando lo necesitaba. Por sus sabios consejos que en más de una ocasión aclararon mi panorama haciéndome ver los problemas y situaciones de forma más simple y fáciles de resolver. Por mantenerme a salvo y libre de preocupaciones con la finalidad de mantener mi mente siempre en el objetivo.

A mis abuelos, Jesús Manrique, Lucrecia Linares y Nilda Montoya, que fueron una notable influencia durante mis etapas de crecimiento y educación, por sus grandes consejos, enseñanzas y reflexiones que formaron gran parte de mi personalidad. Por su insuperable cariño y su apoyo incondicional.

A toda mi familia, quienes siempre están apoyándome y por los que me esfuerzo cada día, para ser un orgullo más de ellos y retribuir de esta manera sus atenciones y buenos deseos.

*Nunca pares, nunca te conformes, hasta que lo bueno sea mejor, lo mejor excelente y lo excelente perfecto.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, porque sem sua graça nada acontece, ele que tem o poder de encaminhar nossas vidas e decidir sobre nosso futuro, por me manter livre de todo perigo e permitir alcançar mais um objetivo.

Aos meus pais e minha família, pelo apoio incondicional. Aos meus tios no Peru, que me ajudaram desde antes de eu viajar para o Brasil, na documentação e tramites do visto. Pelas suas palavras de motivação e bons desejos. Aos meus tios, nos EEUU que sempre, apesar da distância, me motivaram a seguir em frente, me aconselharam e ficaram do meu lado. Muito obrigado Família, vocês me ensinaram que a família está sempre na frente do resto.

Aos meus orientadores Jair e Antonia, pela oportunidade e apoio dado na realização deste trabalho. Pela orientação e dedicação no projeto de pesquisa. Pela ajuda profissional e emocional que me deram nos dois anos de trabalho. Fico sumamente grato a vocês.

Aos meus amigos Carolina, Carla, Daniel, Lucinaldo e Luciano que tornaram-se minha segunda família aqui no Brasil. Com eles compartilhei muitos momentos e experiências inesquecíveis além da vida profissional. Por seu apoio constante e desinteressado. Por sua confiança e fé em mim. Muito obrigado a todos vocês.

Aos meus amigos e colegas do mestrado Marta, Sarah e Messi, com os que trabalhei incansavelmente para conseguir nossos objetivos. Pela sua colaboração e ajuda profissional no meu trabalho. Pelos bons momentos compartilhados. Muito obrigado caros amigos.

Ao Felipe Moura, que me orientou na parte química e na técnica de espectrometria de massas. Obrigado pela paciência e ajuda no meu trabalho de pesquisa, por compartilhar seu conhecimento comigo e me ajudar numa parte importante do meu trabalho.

Ao professor Afonso Souza e ao pessoal do Laboratório de Espectrometria de Massas da Universidade Federal do Amazonas, Richardson, Bruna, Elza. Muito obrigado pela sua ajuda e colaboração na parte da química analítica. Foram um grande apoio na realização desta pesquisa.

Agradeço ao Programa da Organização dos Estados Americanos (OEA) pela oportunidade oferecida, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa e ajuda econômica ao longo do Mestrado. À Universidade do Estado do Amazonas (UEA) e ao programa em Biotecnologia e Recursos Naturais (MBT) pelo aprendizado.

## RESUMO

A cidade de Manaus vem apresentando grandes mudanças quanto ao desenvolvimento econômico, social e ambiental, principalmente com a chegada de grandes empresas ao seu Polo Industrial. Entretanto, isso também trouxe a migração de uma significativa massa humana que veio de todos os lugares do Brasil. A grande mudança socioeconômica produzida em um curto período de tempo gerou grandes problemas ambientais devido à falta de preparação desta cidade para uma mudança desse tipo, vindo-se afetados de forma crítica os corpos de água, utilizados como lugar de descarga de efluentes industriais e domésticos, sendo os Igarapés, o rio Negro e o Amazonas os mais afetados e, com isso, toda a biodiversidade circunvizinha. Isso porque, os surfactantes, um dos compostos com maior presença em águas de esgoto e efluentes industriais, podem prejudicar tanto a saúde das pessoas quanto a fauna, microbiota e o ambiente onde eles estão presentes. Todavia, os próprios microrganismos presentes nestes ambientes podem ser capazes de degradar tais compostos. Assim, realizar pesquisa sobre a capacidade de bactérias isoladas destes ambientes com potencial de biorremediação de surfactantes pode trazer alternativas para tratamentos econômicos de baixo custo. O objetivo do presente estudo foi selecionar bactérias cultiváveis endofíticas e de ambiente aquático poluído com potencial para biorremediação. A coleta foi realizada em dois pontos no percurso do Igarapé do Quarenta (Manaus/AM), sendo que o primeiro recebe grande influência da área urbana e o segundo do distrito industrial. Amostras de água foram diluídas na proporção de 1/10, semeadas em meios de cultura LB e NA e incubadas a 28 °C. As placas foram monitoradas a cada 24 horas por sete dias e as bactérias em crescimento foram transferidas a novas placas até conseguir um cultivo axênico. No caso das amostras vegetais, foram realizadas assepsia superficial das amostras, depois cortadas, cultivadas em meio LB e NA e incubadas a 28 °C. Realizou-se a coloração de gram nas bactérias isoladas e posteriormente foram preservadas em glicerol 20% e congeladas. As bactérias foram caracterizadas morfologicamente pelas características macro e microscópicas e pela fonte de isolamento. Destas, foram extraído DNA de 19 bactérias selecionadas e amplificado (PCR) para posterior sequenciamento. Os ensaios de biodegradação foram realizados utilizando as 19 bactérias selecionadas. Foi usado 10 ml de meio mineral M9 mais surfactante SDS (150 mg/l) e inoculado com 100 µl de solução bacteriana. Os ensaios foram colocados num shaker a 28 °C, 129 rpm por 15 dias. Duas bactérias conseguiram degradar por completo o SDS nos 15 dias. Foi realizada uma curva de degradação usando as 2 bactérias que apresentaram melhor potencial de degradação, inoculando as bactérias em culturas puras (isoladas) e em consórcio (misturando as 2). Este último (consórcio) conseguiu degradar mais rapidamente o surfactante, demorando apenas 9 dias.

## ABSTRACT

The Manaus city has shown great changes as the economic, social and environmental development, especially with the arrival of Big and important international companies to in Industrial Pole itseft. However, it also brought a significant mass migration of people from all parts of Brazil. The increase of socioeconomic condiction produced in a short period of time generated major environmental problems due to lack of preparation of this city for such a change, seeing themselves affected critically bodies of water, used as a place of discharge of industrial and domestic effluents, and the streams, the Rio Negro and the Amazonas the most affected and, therefore, all the surrounding biodiversity. This is because the surfactant, one of the compounds with the greatest presence in sewage and industrial effluents, can harm both people's health as the fauna, flora and the environment where they are present. However, the microorganisms present in these environments may be able to degrade these compounds. Thus, conduct research with bacteria isolated that surfactants bioremediation ability potential, in this environments, can bring low cost economic alternatives to treatments. The subject of this study was to select cultivable endophytic and aquatic environment polluted bacterias with potential for bioremediation. Samples were taken in two points of the "Igarapé do Quarenta", the first point has high influence of the urban zone and the second has industrial effluents. Water samples were diluted 1/10, grown in LB and NA medium and incubated at 28 °C. The cultures were monitored every 24 hours for 7 days, the growing bacteria were transferred to new petri dishes until an axenic culture was obtained. Vegetal samples were cleaned aseptically, cut, grown in LB and NA medium and incubated at 28 °C. A group of 19 bacteria were selected based in their macro and micro morphology and the isolating points. DNA of the 19 selected bacteria was extracted and amplified (PCR) and biodegradation assays were made. Mineral medium M9 (10 ml) enriched with SDS (150 mg/l) was used to inoculate 100 µl of bacteria. The assays were placed in a shaker at 28°C with 120 rpm for 15 days. Two bacteria decreased the SDS completely. A degradation curve was elaborated with these two degrading bacteria separately and together. The two bacteria achieved the reduction of the SDS faster when worked together (9 days).

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Interfaces utilizando face líquida. Baseado em Holmberg <i>et al.</i> , (2002).....	3
<b>Tabela 2.</b> Grupos hidrofílicos. Modificada de Farn, (2006) e Holmberg <i>et al.</i> , (2002).....	4
<b>Tabela 3.</b> Microrganismos com potencial para degradar xenobióticos. Baseado em Kumar <i>et al.</i> , (2011). .....	10
<b>Tabela 4.</b> Tipos de bactérias isoladas das plantas e da água coletadas no Igarapé do Quarenta, Manaus-AM.....	34
<b>Tabela 5.</b> Características macroscópicas e microscópicas das bactérias isoladas das plantas e da água coletadas no Igarapé do Quarenta, Manaus-AM.....	34

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Dodecil Sulfato de Sódio (SDS).....	5
<b>Figura 2.</b> Cloreto de Benzalkonium.....	5
<b>Figura 3.</b> Estrutura química da Cocoamidopropilbetaína (CAPB).....	6
<b>Figura 4.</b> Estrutura química da Cocodietanolamida.....	6
<b>Figura 5.</b> Degradação do dodecil sulfato de Sódio: A) Eliminação do grupo Sulfato e B) $\beta$ -oxidação. Baseado em Walczak & Donderski, (2004).....	13
<b>Figura 6.</b> Pontos de coleta de amostras localizados no percurso do Igarapé do Quarenta. Baseado em: Google Maps® .....	22
<b>Figura 7.</b> Espectro de massa do surfactante aniônico SDS.....	30
<b>Figura 8.</b> Resultados da PCR do DNAr extraído das bactérias. ....	35
<b>Figura 9.</b> Espectro de massas – Raspagem da CCD. ....	36
<b>Figura 10.</b> Controles – SDS em meio mineral M9: A) dia 0 de incubação, B) dia 15 de incubação. ....	38
<b>Figura 11.</b> Espectros das bactérias degradadoras de surfactantes (A-7 e T-25). ....	39
<b>Figura 12.</b> Espectros das bactérias que apresentam degradação parcial e produtoras de compostos. ....	40
<b>Figura 13.</b> Espectros das bactérias com pouca eficácia na degradação do SDS.....	41
<b>Figura 13.</b> Espectros das bactérias com pouca eficácia na degradação do SDS (continuação). ....	42
<b>Figura 14.</b> Espectro do controle utilizado na degradação progressiva do SDS. ....	43
<b>Figura 15.</b> Degradação do SDS durante os 15 dias de tratamento.....	43

## SUMARIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REFERENCIAL TEORICO.....</b>	<b>2</b>
1.1. SURFACTANTES .....	2
1.1.1. <i>Surfactantes aniônicos</i> .....	4
1.1.2. <i>Surfactantes Catiônicos</i> .....	5
1.1.3. <i>Surfactantes Anfotéricos</i> .....	5
1.1.4. <i>Surfactantes não iônicos</i> .....	6
1.2. BIORREMEDIAÇÃO .....	8
1.3. ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....	14
1.3.1. <i>Ionização</i> .....	14
1.3.2. <i>Analisadores de Massas</i> .....	15
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
GERAL.....	17
ESPECÍFICOS .....	17
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2. METODOLOGIA.....</b>	<b>21</b>
2.1. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE COLETA .....	21
2.1.1. <i>Pontos de Coleta</i> .....	21
2.1.2. <i>Coleta da água</i> .....	23
2.1.3. <i>Coleta do Material Vegetal</i> .....	23
2.2. ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DAS BACTÉRIAS .....	23
2.2.1. <i>Esterilização dos materiais</i> .....	23
2.2.2. <i>Isolamento das bactérias das amostras de água</i> .....	24
2.2.3. <i>Isolamento das bactérias endofíticas</i> .....	24
2.2.4. <i>Preservação das bactérias isoladas</i> .....	25
2.3. AGRUPAMENTO E SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS .....	26
2.4. EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO (PCR) DO rDNA (RIBOSOMAL) .....	26
2.4.1. <i>Extração do DNAr</i> .....	26
2.4.2. <i>Amplificação do DNAr (PCR)</i> .....	26
2.5. SEQUENCIAMENTO DAS BACTÉRIAS .....	27

2.6.	AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES MAJORITÁRIOS DA ÁGUA .....	27
2.6.1.	<i>Filtração da água.</i> .....	28
2.6.2.	<i>Extração em fase sólida (SPE).</i> .....	28
2.6.3.	<i>Separação dos compostos em CCD (cromatografia em camada delgada).</i> .....	28
2.6.4.	<i>Análise da amostra no espectrômetro de massas.</i> .....	29
2.7.	ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO .....	29
2.7.1.	<i>Perfil do SDS no Espectrômetro de Massas.</i> .....	30
2.7.2.	<i>Testes piloto.</i> .....	30
2.7.3.	<i>Ensaio de Biodegradação.</i> .....	31
2.7.4.	<i>Curva de Biodegradação.</i> .....	31
2.8.	ANÁLISES DAS AMOSTRAS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS .....	32
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
3.1.	ISOLAMENTO E AGRUPAMENTO DAS BACTÉRIAS .....	33
3.2.	EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DO DNAR .....	35
3.3.	AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES DA ÁGUA .....	35
3.4.	RESULTADOS DOS TESTES PILOTOS .....	36
3.5.	ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO COM AS 19 BACTÉRIAS EM MEIO M9 + SDS .....	37
3.5.1.	<i>Bactérias capazes de degradar SDS.</i> .....	38
3.5.2.	<i>Bactérias produtoras de compostos secundários.</i> .....	39
3.5.3.	<i>Bactérias pouco eficientes na degradação do SDS.</i> .....	41
3.6.	CURVA DE BIODEGRADAÇÃO DO SDS .....	42
3.6.1.	<i>Curva de Biodegradação – Bactérias A-7; T-25 e Consorcio (A-7 + T-25).</i> .....	43
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O crescimento de uma cidade é um indicativo do desenvolvimento de uma população e da melhora econômica e social das pessoas, porém este crescimento normalmente vem acompanhado de problemas de poluição por parte das indústrias e da própria população, quando um robusto e adequado planejamento não o precede.

Existem muitas técnicas capazes de promover remediação em corpos de águas e solos contaminados. Entretanto, tais técnicas são geralmente de alto custo e muitas delas não são completamente eficientes, por terem efeitos secundários ou por trazerem o risco de liberar componentes químicos que não podem ser degradados.

Uma solução alternativa para este problema, e que vem sendo trabalhada principalmente na última década, é a utilização de técnicas de biorremediação com base na microbiota local. Assim, espera-se que os resíduos do tratamento de águas e ambientes poluídos não provoquem a introdução de organismos exóticos na região nem derivados químicos de origem antrópica.

Embora se espere que os produtos químicos jogados no ambiente sejam degradados como resultado do metabolismo das comunidades microbianas presentes nos ambientes aquáticos, a realidade atual da degradação de compostos orgânicos xenobióticos nos ambientes naturais da cidade de Manaus não vem recebendo a suficiente atenção tanto na literatura quanto na prática sobre os produtos químicos utilizados em detergentes de diferente natureza.

A contaminação dos igarapés na cidade de Manaus é uma realidade e um problema crítico, que prejudica a saúde coletiva de seus moradores, o bem estar do rio Negro e Amazonas, e a biodiversidade circunvizinha.

Portanto, realizar pesquisas sobre a viabilidade da utilização de microrganismos (no caso bactérias) nativos que tenham potencial para a biorremediação de águas poluídas, com esgoto doméstico e/ou compostos químicos contaminantes, pode trazer economia financeira e soluções de restauração ambiental na cidade.

## **2. REFERENCIAL TEORICO**

Em Manaus (Amazonas), cidade com aproximadamente de 2,4 milhões de habitantes (IBGE, 2014), a implantação do complexo industrial na década de 1960 promoveu um crescimento urbano acelerado, com uma trajetória de evolução acentuada nos últimos 20 anos. A cidade acumula cerca da metade da população do Estado e contribui com aproximadamente 80% do seu PIB, com uma grande progressão a partir da década de 1970, tornando-se uma das 15 capitais mais densas do Brasil (CLETO FILHO & WALKER, 2001, NOGUEIRA *et al.*, 2007).

Esse desenvolvimento industrial em Manaus não foi acompanhado de um plano gestor. A quase nenhuma infraestrutura de saneamento básico da cidade não foi capaz de suportar o adensamento populacional. Nas zonas Leste e Norte, áreas de expansão das novas moradias, a falta de ordenamento urbano, a inexistência de um sistema de drenagem, tratamento de esgoto e a deficiência da coleta de lixo, têm provocado danos de grande impacto ao meio ambiente, tais como: destruição de nascentes; maior vulnerabilidade a problemas de erosão e alagamento; perda de áreas verdes importantes; entupimento das calhas de drenagem dos córregos que cortam a cidade; surgimento de ilhas de calor gerando um risco à saúde coletiva (doenças intestinais, de pele, envelhecimento precoce e câncer), principalmente nas pessoas que utilizam e/ou vivem próximos às águas dos igarapés (FREITAS & GIATTI, 2010, GIATTI *et al.*, 2011; MAGALHÃES, 1998; NOGUEIRA *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2006).

Os detergentes domésticos e industriais tecnicamente chamados de surfactantes, são compostos com uma grande e versátil função, sendo amplamente utilizados em diferentes tipos de atividades como na recuperação de petróleo, na lavagem de solos de terras contaminadas, em usinas de energia na mistura do carbono com água ou óleo, no processamento de minerais, etc. É pelo grande uso de surfactantes nas diversas atividades que eles se tornaram a principal fonte de compostos químicos orgânicos e inorgânicos jogados no ambiente, especialmente nos corpos de água (KARSA, 1999, PRATS *et al.*, 1997).

### **1.1. Surfactantes**

Os surfactantes (ou “agente ativador de superfície”) são compostos orgânicos criados por sulfonação química com matéria prima hidrocarbonada. Possuem pelo menos um grupo hidrofóbico e um grupo hidrofílico na molécula, ou seja, os surfactantes possuem pelo menos

um grupo apolar e um grupo polar (ou iônico). A parte hidrofóbica é normalmente uma cadeia carbônica apolar de aproximadamente entre 10 e 18 átomos de carbono e em alguns casos pode até possuir estruturas como o benzeno. Por outra parte, o grupo hidrofílico apresenta uma variedade de possíveis estruturas, sendo alguns exemplos o grupo sulfato ( $-\text{OSO}_3^-$ ), o grupo nitrogênio quaternário ( $\text{NR}_4^+$ ) ou o grupo polioxetilênico ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ )<sub>n</sub>. (CAROLEI, 2005; DATYNER, 1983, SCHWARTZ & PERRY, 1949).

Um agente surfactante se caracteriza pela tendência de reduzir ao mínimo as superfícies e interfaces, sendo que uma interface significa um limite entre duas fases não miscíveis. Por exemplo, em um meio aquoso, as moléculas de surfactante migrarão às interfaces sólido/água e ar/água se orientando de tal forma que se consiga reduzir ao mínimo o contato entre os grupos hidrofóbicos e a água (FARN, 2006).

Diferentes tipos de interfaces podem ser adsorvidas pelos surfactantes (Tabela 1), sendo que a mais comum é a interface líquida, não sempre água. Em muitos produtos fabricados vários tipos de interfaces estão presentes ao mesmo tempo. As pinturas com base de água e cores usados na indústria do papel são exemplos dessas interações, mas desde o ponto de vista coloidal, os dois possuem sistemas mais complexos como interfaces sólido-líquido (partículas dispersas de pigmentos) e líquido-líquido (borracha ou outras uniões de gotas). Além disso, a formação de espuma é um fenômeno comum quando eles são aplicados. Todas as interfaces são estabilizadas pelos surfactantes (HOLMBERG *et al.*, 2002).

**Tabela 1.** Interfaces utilizando face líquida. Baseado em Holmberg *et al.*, (2002).

<b>Interface</b>	<b>Tipo de sistema</b>	<b>Produto</b>
Sólido – Líquido	Suspensão	Solvente de tinta
Líquido – Líquido	Emulsão	Leite, creme
Líquido – Vapor	Espuma	Creme de barbear

O grupo hidrofílico do surfactante poderia levar uma carga positiva, negativa, ambas (positivas e negativas) ou nenhuma delas (Tabela 2). É por meio desse tipo de cargas que os surfactantes podem ser classificados como: a) aniônicos: carregado negativamente; b) catiônicos: carregado positivamente; c) anfotéricos: duas cargas e d) não iônicos: não apresentam carga.

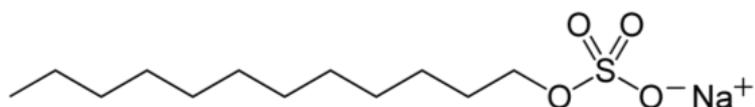
**Tabela 2.** Grupos hidrofílicos. Modificada de Farn, (2006) e Holmberg *et al.*, (2002).

TIPO	EXEMPLO	ESTRUTURA	IMPORTÂNCIA
Aniônico	Sulfato	$-\text{OSO}_2\text{O}^-$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Possuem a cadeia mais longa dos surfactantes;</li> <li>• Uma curta cadeia de Polioxietileno melhora a tolerância à sal;</li> <li>• A curta cadeia de Polioxietileno melhora a solubilidade em solventes orgânicos;</li> <li>• Sulfatos são rapidamente hidrolisados por ácidos num processo autocatalítico.</li> </ul>
	Sulfonato	$-\text{SO}_2\text{O}^-$	
	Éter sulfato	$-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OSO}_2\text{O}^-$	
	Éter fosfato	$-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{P}(\text{O})\text{O}^-$	
	Éter Carboxilato	$-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CO}_2^-$	
	Carboxilato	$-\text{C}(\text{O})\text{O}^-$	
Catiônico	Amônia Primária	$-\text{N}^+\text{H}_3$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Possuem a terceira cadeia mais larga dos surfactantes;</li> <li>• Não são compatíveis com os aniônicos;</li> <li>• Adsorvem-se fortemente na maioria das superfícies.</li> </ul>
	Amônia Secundária	$-\text{N}^+(\text{R})\text{H}_2$	
	Amônia Terciária	$-\text{N}^+(\text{R})_2\text{H}$	
	Amônia Quaternária	$-\text{N}^+(\text{R})_3$	
Anfotéricos	Óxido de amina	$-\text{N}^+(\text{R})_3\text{O}^-$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• São os menores dos surfactantes;</li> <li>• São compatíveis com outras classes de surfactantes;</li> <li>• Não são sensíveis em água dura;</li> <li>• São estáveis em ácidos e bases.</li> </ul>
	Betaína	$-\text{N}^+(\text{R})_3(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{O})\text{O}^-$	
	Aminocarboxilatos	$-\text{N}^+\text{H}(\text{R})_2(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{O})\text{O}^-$	
Não Iônicos	Polioxietileno	$-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Possuem a segunda cadeia mais longa dos surfactantes;</li> <li>• São normalmente compatíveis com todos os outros tipos de surfactantes;</li> <li>• Não são sensíveis em água dura.</li> </ul>
	Acetilênicos	$-\text{CH}(\text{OH})\text{C}\equiv\text{CH}(\text{OH})-$	
	Monoetanolamina	$-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	
	Dietanolamina	$-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$	
	Poliglucósido	$(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5)_n\text{O}-$	

### 1.1.1. Surfactantes aniônicos

São os mais utilizados na indústria devido aos baixos custos de produção e são usados praticamente em todos os tipos de detergentes, produtos de higiene pessoal e limpeza doméstica. São surfactantes que possuem a cabeça polar com carga negativa e que para uma ação ótima, a cadeia hidrofóbica é um grupo alquila linear com um comprimento da cadeia de 12 a 16 átomos de carbono. Os surfactantes aniônicos mais utilizados são o lauril éter sulfato

de sódio (LESS) e o dodecil sulfato de sódio (SDS) (Figura 1). Os grupos hidrofílicos mais comumente usados são carboxilatos, sulfatos, sulfonatos e fosfatos (TADROS, 2005).

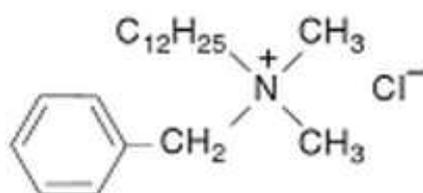


**Figura 1.** Dodecil Sulfato de Sódio (SDS).

### 1.1.2. *Surfactantes Catiônicos*

Os surfactantes catiônicos mais comuns são os que possuem uma amônia quaternária com uma formula geral  $R'R''R'''R''''N^+X^-$ , onde  $X^-$  é normalmente um íon de Cloro e R representa grupos alquila. Um bom exemplo deste tipo de surfactantes é o “Cloreto de Benzalkonium” (Figura 2), que apresentam em sua estrutura um nitrogênio ligado com 4 moléculas de carbono.

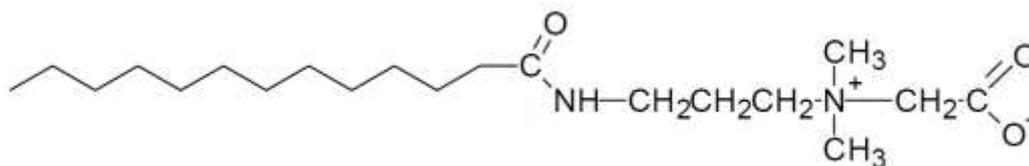
Os surfactantes catiônicos são geralmente solúveis em água quando existe somente um grupo alquila longo. Eles são geralmente compatíveis com mais íons inorgânicos e água dura como, por exemplo, o Cloreto de Benzalkoinum. São estáveis a câmbios de pH, ácidos ou alcalinos e são incompatíveis com muitos surfactantes aniônicos mas existe compatibilidade com os não iônicos. (TADROS, 2005).



**Figura 2.** Cloreto de Benzalkonium.

### 1.1.3. *Surfactantes Anfotéricos*

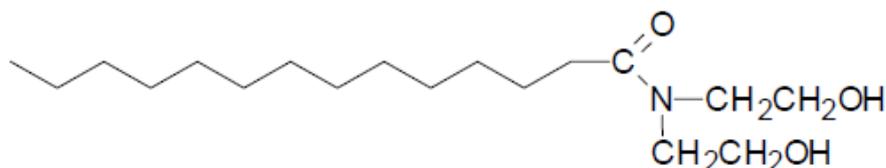
São surfactantes que contem os dois grupos (catiônico e aniônico) podendo apresentar diferentes características dependendo do meio em que se encontram. O mais comum deste tipo de surfactantes são os N-alkilbetainas, que são derivados do trimetilglicina  $(CH_3)_3NCH_2COOH$  (descrito como betaína). As betaínas são amplamente usadas na indústria cosmética, aplicadas como “cocoamidopropilbetaína” (Figura 3), atuando como surfactante com maior suavidade, evitando a irritação e o ressecamento da pele.



**Figura 3.** Estrutura química da Cocoamidopropilbetaína (CAPB).

#### 1.1.4. Surfactantes não iônicos

Não possuem uma carga efetiva, porém apresentam estruturas e elementos químicos que tem a capacidade de produzir um pequeno dipolo permitindo sua solubilização em água. Eles são muito utilizados na indústria cosmética, tendo como principal característica a eficácia na remoção de gorduras e estabilização de espuma, as vezes atuando como co-surfactante. Os principais surfactantes não iônicos são os álcoois graxos etoxilados, amidas de coco (Figura 4) e alquil poliglicosídeos que possuem um ou mais átomos de oxigênio ou nitrogênio promovendo a polaridade das estruturas. (TADROS, 2005 e CAROLEI, 2005).



**Figura 4.** Estrutura química da Cocodietanolamida.

Mais de 13 000 milhões de Kg de surfactantes são produzidos anualmente no mundo, o que significa que eles são um dos produtos com mais alta produção e consumo de compostos orgânicos sintéticos devido a seus diversos usos. Da produção mundial de surfactantes, 15% pertencem a América Latina onde são utilizados como produtos de limpeza doméstica, industrial, indústria cosmética, têxtil, papel, construção, farmacêutica e outros. Grandes empresas como Procter & Gamble, Colgate Palmolive, Unilever, Johnson & Johnson são os maiores fabricantes de produtos de limpeza e cuidado pessoal no mundo, e com presença no Brasil, utilizando grandes quantidades anuais de surfactantes nos processos produtivos. (KARSA, 1999, LARA-MARTÍN *et al.*, 2006).

Como já foi descrito anteriormente, os surfactantes aniônicos são os mais utilizados no mundo atual, motivo pelo qual existe uma grande presença deles nos corpos de água, sendo liberados em quantidades consideráveis no meio ambiente que causam impactos contra a atividade biológica animal, humana e saúde ambiental. A adsorção de surfactantes aniônicos pode mudar as características das superfícies e a transferência de elétrons,

provocando a formação de superfícies micelares aumentando o tamanho das moléculas adsorvidas. Além disso, os surfactantes aniônicos também podem aumentar a solubilidade de compostos perigosos na água. (CAMACHO-MUÑOZ *et al.*, 2014, CSERHÁTI *et al.*, 2002).

O impacto dos surfactantes aniônicos sobre a atividade enzimática tem sido demonstrada em muitos estudos. Por exemplo, o lauril sulfato de sódio (LAS) se pode acumular nos lipossomas hepáticos de rato inibindo a atividade da enzima fosfatase alcalina e fosfatase ácida (BRAGADIN *et al.*, 1996). Por outro lado, o SDS inibe a atividade da ATPase da glicoproteína-P em concentrações muito baixas pela delipidação da membrana lipídica. (DOIGE *et al.*, 1993).

A contaminação do meio ambiente por parte dos surfactantes é um fato e a concentração deles nos corpos de água pode depender da temporada e/ou da influencia que a zona urbana apresenta sobre eles. O tratamento não eficiente destes compostos pode representar um risco de contaminação nas águas subterrâneas ou até em águas que são destinadas para o consumo humano. Embora algumas das soluções são específicas para cada localidade, sem conseguir ser aplicadas em outros lugares, a solução ao longo prazo precisa da cooperação e colaboração do mundo inteiro (FREDINGER *et al.*, 1992, ZOLLER, 1993, DECEMBRINI *et al.*, 1981).

No Brasil, a contaminação dos rios é um acontecimento comum. As plantas de tratamento de esgoto não recebem nem 20% do que é descarregado pela população, o que resulta na contaminação de águas superficiais, que recebe continuamente quantidades não tratadas de esgoto doméstico, sendo os surfactantes os compostos com maior presença neste tipo de águas (EICHHORN *et al.*, 2002).

No mundo atual, muitos métodos têm sido aplicados na degradação e remoção de surfactantes aniônicos. Processos químicos e físicos têm sido testados com a finalidade de eliminar este tipo de compostos. Um dos processos físico-químicos testado na degradação de surfactantes aniônicos foi a eletroquímica, onde anodos de Ti (Tálio), Ru (Ruténio) e Sn (Estanho) em presença de íons de Cl conseguiram remover o surfactante dodecil benzeno sulfonato de sódio (PANIZZA *et al.*, 2005).

Os métodos químicos de adsorção são outra das alternativas muito estudadas. Um exemplo de um método químico é o uso de cetilmetilamoníaco (CTMA) ou alumina como adsorventes na eliminação de surfactantes aniônicos da água utilizando o SDS como amostra

problema, conseguindo-se resultados favoráveis. (ADAK *et al.*, 2005, ARIAPAD *et al.*, 2012).

Os processos físicos permitem uma depuração dos efluentes, mas as substâncias contaminantes não são eliminadas ou degradadas só transferidas de fase, por tanto o problema continua presente de forma concentrada sem ser efetivamente degradados. Osmose reversa (OR), microfiltração (MF), nanofiltração (NF) e ultrafiltração (UF) são os mais conhecidos e utilizados devido a que permitem o reuso da água, porém o custo de produção/operação aumenta consideravelmente. Processos oxidativos avançados (POA) ou de adsorção resultam ser muito eficientes em volumes pequenos, mas podem chegar a ser extremadamente caros no tratamento de efluentes de grandes volumes. Estas medidas são as mais utilizadas no tratamento de efluentes industriais e de esgoto urbano, pois se apresentam como as mais eficazes, conseguindo reduzir as substâncias poluentes até níveis aceitáveis. (FREIRE *et al.*, 2000, KUNZ & ZAMORA, 2002).

Dentre essas medidas destaca-se a contribuição dada pela microbiologia com a utilização de processos que usam seres vivos microscópicos (*Processos Biológicos*), que nos últimos anos, vêm ganhando muita importância no tratamento de compostos nocivos ao médio ambiente presentes nos efluentes industriais, esgoto urbano e qualquer tipo de superfície poluída. Esses processos biológicos se denominam biorremediação<sup>1</sup>.

## 1.2. Biorremediação

O termo biorremediação é utilizado para descrever uma tecnologia que utiliza o metabolismo ou a estrutura dos organismos vivos, bactérias, fungos, leveduras, plantas ou suas enzimas, para remover, transformar, ou reduzir até concentrações aceitáveis, compostos tóxicos que causam impactos negativos na sociedade e no meio ambiente. Durante muitos anos os enfoques de engenharia tradicional se sobrepuseram às tecnologias de remediação, mas nas últimas décadas os métodos e processos biológicos vêm ganhando apreciável importância (BAKIYARAJ *et al.*, 2014, COLLA & COSTA, 2003, GAYLARDE *et al.*, 2005, LYNCH, 2005, SINGH; *et al.*, 2014)

---

<sup>1</sup> Biorremediação: processos que utilizam organismos vivos para degradar ou reduzir até concentrações aceitáveis um poluente.

Os principais agentes de biorremediação são as bactérias, organismos microscópicos que estão presentes em todo lugar. Os microrganismos são idealmente adequados para este tipo de trabalhos de destruição de contaminantes porque possuem enzimas que lhes permitem utilizar os contaminantes como fonte de alimento convertendo-os em compostos mais simples produtos do metabolismo bacteriano como CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (SRIVASTAVA, 2015). Para que uma biorremediação seja efetiva, os microrganismos devem agir enzimaticamente sobre o poluente reduzindo-o ou convertendo-o em um produto menos tóxico, necessitando que as condições ambientais favoreçam o crescimento, desenvolvimento e atividade do microrganismo, o que significa que em muitos casos é necessária a manipulação dos parâmetros ambientais, para permitir o crescimento microbiano e como resultado acelerar os processos de degradação (VIDALI, 2001).

As bactérias utilizadas nos processos biológicos podem ser de três tipos segundo o processo de respiração que elas apresentam: Aeróbicas, anaeróbicas e facultativas. As bactérias aeróbicas realizam suas atividades na presença de oxigênio onde os compostos orgânicos são oxidados completamente originando compostos inorgânicos simples, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus* e *Mycobacterium*, são alguns exemplos de bactérias aeróbicas com capacidade de degradar pesticidas, hidrocarbonetos e compostos poliaromáticos (Tabela 3). Os processos que envolvem bactérias anaeróbicas são desenvolvidos em ausência completa de oxigênio onde as bactérias utilizam nitratos, sulfatos ou outros compostos como aceptor de hidrogênios, mas elas não são frequentemente usadas quanto às aeróbicas. Por último as bactérias facultativas tem a capacidade de crescer tanto em presença quanto em ausência de oxigênio (HADDOCK & JONES, 1977, KUMAR *et al.*, 2011, KUNZ & ZAMORA, 2002)

Nos últimos anos o uso de processos biológicos combinados apresentou resultados muito atraentes no tratamento de esgoto doméstico no Brasil. A utilização de reatores anaeróbicos é uma alternativa bastante apropriada na depuração de dejetos orgânicos com altas cargas de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) e sólidos em suspensão, como por exemplo, os reatores anaeróbicos tipo RALF (Reator Anaeróbico de Leito Fluidizado) que acoplado com um pós-tratamento aeróbico como filtros biológicos aerados, conseguiu superar na maioria dos casos aos tratamentos químicos tradicionais de depuração de águas (AISSE & SOBRINHO, 2001, HENRIQUE *et al.*, 2014, SCARASSATI *et al.*, 2003).

**Tabela 3.** Microrganismos com potencial para degradar xenobióticos. Baseado em Kumar *et al.*, (2011).

<b>Organismo</b>	<b>Químico Tóxico</b>	<b>Referência</b>
<i>Pseudomonas spp</i>	Benzeno, antraceno, hidrocarbonetos, PCBs.	Kapley <i>et al.</i> , (1999); Cybulski <i>et al.</i> , (2003).
<i>Alcaligenes spp</i>	Hidrocarbonetos halogêneos, Sulfonatos de alquil benzeno lineares, aromáticos policíclicos, PCBs	Lal e Khanna, (1996).
<i>Arthrobacter</i>	Benzeno, hidrocarbonetos, pentacloro fenol, fenoxiacetato.	Jogdand, (1995).
<i>Bacillus spp</i>	Aromáticos, Alquenos de cadeia longa, fenol, cresol hidrocarbonetos halogêneos, fenoxiacetato.	Cybulski <i>et al.</i> , (2003)
<i>Corynebacterium spp</i>	Aromáticos	Jogdand, (1995)
<i>Flavobacterium spp</i>	Naphthalene, biphenyl	Jogdand, (1995)
<i>Azotobacter spp</i>	Aromáticos, hidrocarbonetos, benzeno,	Jogdand, (1996); Dean-Ross <i>et al.</i> , (2002)
<i>Rhodococcus spp</i>	Hidrocarbonetos aromáticos	Sunggyu, (1995)
<i>Mycobacterium spp</i>	Hidrocarbonetos, hidrocarbonetos policíclicos.	Park <i>et al.</i> , (1998)
<i>Nocardia spp</i>	Fenoxiacetato, hidrocarbonetos halogêneos.	Jogdand, (1995)
<i>Methosinus spp</i>	PCBs, Formaldeído.	Jogdand, (1995)
<i>Methanogens</i>	PCBs, Aromáticos policíclicos.	Jogdand (1995); Ijah,(1998)
<i>Xanthomonas</i>	Bifenils	Jogdand, (1995)

Entre as diferentes técnicas e estratégias de biorremediação, estão as que: (1) utilizam microrganismos autóctones, ou seja, do próprio local, sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação (biorremediação intrínseca ou natural); (2) envolvem a adição de agentes estimulantes, como nutrientes, oxigênio (bioventilação) e biosurfactantes (bioestimulação) e (3) as que utilizam consórcios microbianos enriquecidos (bioaumento). Essas abordagens podem melhorar a eficiência da atividade microbiana em relação à biodegradação dos poluentes (ALMEIDA *et al.*, 2010; ALMEIDA & SILVA, 2006).

A Biorremediação Intrínseca ou Natural se fundamenta nos processos naturais de atenuação realizados pelos microrganismos para remover ou conter os contaminantes dissolvidos (WEIDEMEIER *et al.*, 1996). É indicada quando as demais técnicas de remediação causarem mais danos que benefícios ao ambiente contaminado ou, por exemplo, quando ocorrerem derrames de óleos leves ou derrames de pequena proporção, que serão naturalmente evaporados e degradados muito rápido. Neste caso, mesmo que não seja utilizada a técnica de limpeza o óleo será degradado, sendo que de forma mais lenta. A vantagem desta técnica é que o único custo desse processo é com o monitoramento do local contaminado, através de análises de água e solo. Também pode ser analisada a concentração de contaminantes em animais e nos vegetais (NOAA, 2010).

A técnica de bioestimulação de microrganismos é utilizada *in situ* quando existe uma população nativa capaz de degradar os poluentes presentes e as condições ambientais estão limitando as taxas de biodegradação. Ela consiste em ajustar os nutrientes inorgânicos e/ou substratos orgânicos encontrados no solo, visando estimular a atividade dos microrganismos nativos que irão degradar o contaminante. É a forma mais imediata e simples de tratamento que envolve a adição de nutrientes e oxigênio necessários para acelerar o processo (ALMEIDA *et al.*, 2010; ALMEIDA, & SILVA, 2006, ASQUITH *et al.*, 2012).

O Bioaumento é um tipo de técnica que envolve a aplicação dos microrganismos no lugar específico para aumentar a biodegradação do poluente. Essa técnica é normalmente realizada quando existe uma deficiência na microbiota autóctone, ou seja, presentes nas áreas contaminadas que se pretende recuperar. (AYOTAMUNO *et al.*, 2009, CUNHA & LEITE, 2000) Utiliza-se microrganismos cultivados dentro de um sistema que podem ser derivados de um solo contaminado qualquer ou obtidos de uma cultura estoque (SARKAR *et al.*, 2005, WIKSTROM *et al.*, 1996).

Outro tipo de estratégia muito utilizada na biorremediação é a fitorremediação. Esta técnica consiste em utilizar plantas para o tratamento de ambientes contaminados sendo testada na degradação de hidrocarbonetos, solventes, metais pesados e outros contaminantes orgânicos. Essa característica das plantas de degradar compostos contaminantes pode estar diretamente associada com a capacidade de fornecer aos microrganismos endofíticos e epifíticos as condições necessárias para que expressem sua atividade de degradação (DOTY, 2008, MURATOVA, 2003)

Nos processos de biorremediação geralmente são realizadas duas fases: Na fase 1, são consideradas as propriedades químicas do poluente e as propriedades físicas, químicas e microbiológicas do lugar, visando selecionar o método de biorremediação mais adequado e estabelecer as rotas metabólicas que irão acontecer durante o processo. Na fase 2, são consideradas a cinética da biorremediação e a factibilidade de conseguir o final desejado, justamente com os parâmetros que serão utilizados no biorreator. Além disso, um protocolo de biorremediação poderia envolver o lugar de estudo (lugar poluído), a análises de regulação, revisão (avaliação ou estudo) da microbiota e testes de biorremediação (CRAWFORD & CRAWFORD 1996).

Por tanto, a biorremediação pode ser aplicada num lugar ou contaminante específico dependendo do microrganismo utilizado e dos conhecimentos dos mecanismos de crescimento, atividade do microrganismo, capacidade metabólica e resposta a mudanças ambientais a que o microrganismo será sometido, sendo que em muitos casos conseguem desenvolver mecanismos de defesa incluindo a formação de outra membrana celular protetora, que frequentemente resulta ser hidrofóbica ou uma bomba de saída de solventes (SIKKEMA *et al.*, 1995).

Todas as alternativas de biorremediação mencionadas anteriormente podem ser também aplicadas na restauração de ambientes contaminados por surfactantes, sendo que as bactérias são as únicas com capacidade para degradar surfactantes (WALCZAK & DONDESKI, 2004). O isolamento de bactérias de ambientes aquáticos para serem utilizadas como agentes restauradores na biorremediação de surfactantes de diferentes classes, está sendo trabalhado por muitos anos em diferentes lugares do mundo, especialmente nos lugares que apresentam grandes problemas de contaminação por este tipo de compostos químicos.

A biodegradação de um surfactante vai ser efetiva só se a bactéria apresentar o mecanismo enzimático necessário para degradar passo a passo este tipo de compostos. A degradação do dodecil sulfato de sódio (SDS) inicia na liberação do enxofre inorgânico por meio da sulfatase básica, depois o álcool liberado é oxidado a ácido láurico pela enzima álcool desidrogenase (figura 5).

No final o ácido láurico é degradado no processo de  $\beta$  – oxidação que é desenvolvido no interior da mitocôndria (SCOTT & JONES, 2000, WALCZAK & DONDESKI, 2004).



### 1.3. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica analítica muito utilizada em que as moléculas da amostra analisada são convertidas em íons gasosos que serão sequencialmente separados e registrados no espectro de massas de acordo à razão massa-carga ( $m/z$ ) detectadas. A técnica permite auxiliar na identificação de compostos e materiais desconhecidos assim como na elucidação das propriedades químicas e estruturais das moléculas. O espectro de massas é um gráfico da abundancia ou intensidade (relativa) dos íons de acordo com a  $m/z$ . O instrumento de medição que esta técnica utiliza é chamado de “Espectrômetro de Massas” (EM), os quais possuem basicamente: a) Um sistema de alto vácuo; b) Uma entrada da amostra; c) uma fonte de ionização; d) Um filtro/analizador de massa; e) Um detector (WILSON & WALKER, 2010).

#### 1.3.1. Ionização

Basicamente os íons são produzidos a partir de uma molécula neutra pela remoção de elétron ou pela adição ou remoção de próton. Vários métodos de ionização altamente especializados são utilizados na atualizada na química analítica, por exemplo:

- a) Ionização por impacto eletrônico (EI): É uma técnica amplamente utilizada no análise de metabólitos, poluentes e compostos farmacêuticos como nos programas de testes de drogas. As amostras na fase de vapor são bombardeadas por elétrons de alta energia produzindo íons e a quebra de ligações. Apresentando alta reprodutibilidade e são típicos para cada composto. Atualmente existem bibliotecas com espectros de massas de mais de 390000 compostos facilitando a identificação de muitos compostos em amostras desconhecidas.
- b) Ionização química (CI): É considerada uma técnica menos destrutiva que EI. Na ionização química, um gás reagente (metano, isobutano, amônia ou outros) é utilizado, introduzido na fonte e ionizado. As moléculas das amostras colidem com as moléculas de gás ionizadas. Os íons produzidos são geralmente espécies de elétrons. A ionização química não é útil no estudo de fragmentação, porém é utilizada na detecção de íons moleculares e por tanto pesos moleculares de substancias pouco estáveis.

- c) Espectrometria de massas por termopulverização: Na metodologia de termopulverização (thermospray), a solução da amostra é introduzida no espectrômetro de massas por um capilar aquecido. O tubo nebuliza e vaporiza o solvente formando uma corrente de gotículas finas que entram na fonte de ionização. Este método pode trabalhar com altas taxas de fluxo e buffers, mas foi suplantado em grande parte por técnica de ionização Electrospray.
- d) Espectrometria de massas por Electrospray (ES): A fonte de íons electrospray é operada à atmosférica. A amostra em solução (usualmente polar) entra na fonte de ionização por meio de um capilar que é rodeado por um fluxo de nitrogênio chamado de gás nebulizador. A evaporação do solvente pela ação do gás que diminui o tamanho das gotas aumenta a repulsão eletrostática, tornando as gotas cada vez menores até provocar a explosão coulômbica com posterior liberação dos íons. A espectrometria de massas por electrospray tem sido altamente utilizada a partir de 1990 principalmente para os compostos que tem múltiplos sítios de carga (SILVERSTAIN *et al.*, 2001, MILLER, 2006).

Um levantamento na literatura mostra que, de 1980 a 2000, o número aproximado de artigos publicados usando “electrospray” passou de 100 para 7800, sendo que 80% destes estão relacionados com análise de biomoléculas e de compostos orgânicos, 10% são relativos à instrumentação e estudos sobre os aspectos fundamentais da formação do “electrospray” e 10% das publicações estão associadas a espécies organometálicas e inorgânicas nas mais diferentes formas (MORAES & LAGO, 2003).

### 1.3.2. Analisadores de Massas

O analisador de massas separa a mistura dos íons que são gerados durante a ionização pela razão  $m/z$  para produzir o espectro. Ele é o coração do espectrômetro de massas e existem vários tipos com diferentes características.

- a) **Quadrupolo:** O quadrupolo é constituído de 4 hastes em paralelo cuja disposição paralela forma um quadrado. Os pares opostos das hastes estão conectados eletricamente e uma voltagem com radiofrequência de  $180^\circ$  fora de fase é aplicada entre eles. A faixa da massa é geralmente menor que 5000  $m/z$ , a resolução é baixa, mas a sensibilidade é geralmente alta.

- b) ***Triplo quadrupolo***: Este instrumento é constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo não é utilizado para separar íons, mas como cela de colisão na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo, geralmente por dissociação induzida por colisão com um gás inerte (“collision induced dissociation”) – DIC. Esta técnica pode melhorar a sensibilidade do método para os fragmentos de um íon característico de uma molécula. Todos os quadrupolos são controlados para transmitir íons de uma única razão  $m/z$  ou de um intervalo de razões  $m/z$  para gerar informação analítica mais exata.
- c) ***Ion-trap***: O ion-trap (armadilha de íons) é uma variante do quadrupolo (quadrupolo tridimensional) que “captura” todos os íons que são introduzidos em seu interior e os mantém “aprisionados” até que uma determinada radiofrequência seja aplicada e torna os íons de certa razão  $m/z$  instáveis, de forma que são libertados da armadilha, apresentando maior sensibilidade que a quadrupolo.
- d) ***MS-TOF***: Na espectrometria de massas por tempo de voo os íons são acelerados por meio de um potencial ( $V$ ) e depois são derivados através do tubo para um detector. O aspecto crítico desse instrumento é a necessidade de produzir os íons numa hora com precisão e posição conhecida. Um dos pontos positivos deste detector é que a faixa de massas é ilimitada e como os quadrupolos, eles apresentam uma ótima sensibilidade. Esta técnica é a mais utilizada para biomoléculas de grandes tamanhos (SILVERSTAIN *et al.*, 2001, CHIARADIA *et al.*, 2008).

A junção de diferentes áreas do conhecimento como a microbiologia, química e biotecnologia apresenta incríveis vantagens na luta contra a contaminação ambiental, trazendo soluções alternativas como a utilização de sistemas de tratamento e processos biológicos combinados, que apresentam ótimos resultados na degradação de poluentes e com baixos custos de operação. É por isso que realizar pesquisas sobre a capacidade da microbiota nativa na degradação de poluentes, pode trazer benefícios tanto ambientais quanto socioeconómicos com o desenvolvimento de produtos e serviços biotecnológicos viáveis para a remediação e tratamento de ambientes poluídos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **Geral**

Selecionar bactérias cultiváveis endofíticas e de ambiente aquático poluído com potencial para biorremediação.

#### **Específicos**

- Investigar a biodiversidade bacteriana cultivável do Igarapé do Quarenta isoladas da água e de plantas adjacentes;
- Avaliar e caracterizar as bactérias isoladas segundo a macro e micro-morfologia;
- Avaliar o potencial de biorremediação de culturas puras e em consorcio por Espectrometria de massas (MS/ESI);
- Avaliar o tempo de degradação do SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) pelas melhores bactérias separadas e em consorcio;
- Identificar as bactérias molecularmente mediante o sequenciamento da região 16s do rDNA.

## CAPITULO I

# **Seleção de Bactérias com Potencial para Biorremediação Isoladas do Igarapé do Quarenta.**

Seleção de Bactérias, com Potencial para Biorremediação, Isoladas do Igarapé do Quarenta.

Manrique, J.L.R.<sup>1</sup>; Souza, A.Q.L.<sup>1</sup> & Maia, J.M.F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus – Brasil.* <sup>2</sup>*Escola Normal Superior, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus - Brasil.*

## Resumo

O crescimento de uma cidade é um indicativo do desenvolvimento de uma população e da melhora econômica e social das pessoas. O problema é que este crescimento normalmente vem acompanhado de problemas de poluição por parte das indústrias e da própria população, quando um robusto e adequado planejamento não o precede. A contaminação dos igarapés na cidade de Manaus por parte do setor industrial e da população é uma realidade e um problema crítico, que prejudica a saúde coletiva de seus moradores, a saúde do rio Negro e Amazonas e a biodiversidade circunvizinha. Os surfactantes são um dos compostos com maior presença em águas de esgoto e efluentes industriais e podem prejudicar tanto a saúde das pessoas quanto a fauna, microbiota e o ambiente onde se eles estão presentes. Por tanto realizar pesquisa sobre a capacidade de bactérias isoladas do córrego quarenta com potencial de biorremediação de surfactantes pode trazer alternativas de solução para esse problema mediante tratamentos econômicos de baixo custo. O objetivo do presente estudo foi isolar e caracterizar bactérias presentes na água e plantas coletadas no Córrego do Quarenta. A coleta foi realizada em dois pontos no percurso do Igarapé sendo que o primeiro ponto recebe grande influencia da área urbana e o segundo ponto do distrito industrial. Nas amostras de água se realizou uma diluição 1/10 e foram semeadas em meios de cultura LB e NA e incubadas a 28 °C. As placas foram monitoradas cada 24 horas por 7 dias onde as bactérias em crescimento foram transferidas em novas placas até conseguir um cultivo axénico. No caso das amostras vegetais, foi realizada uma assepsia superficial e depois cortadas e cultivadas em meio LB e NA e incubadas a 28 °C. Realizou-se a coloração de gram nas bactérias isoladas e posteriormente foram preservadas em glicerol 20% e congeladas. Foram selecionadas um grupo de bactérias pelas características morfológicas macro e microscópicas e pela fonte de isolamento. O DNA das 19 bactérias selecionadas foi extraído, amplificado (PCR) e finalmente sequenciado. Os ensaios de biodegradação foram realizados utilizando as 19 bactérias selecionadas. Foi usado 10 ml de meio mineral M9 mais surfactante SDS (150 mg/l) e colocados num shaker a 28 °C, 129 rpm por 15 dias. Duas bactérias conseguiram degradar por completo o SDS. Foi realizada uma curva de degradação das duas bactérias degradadoras em cultura pura e em consorcio contendo as duas melhores juntas. O consorcio conseguiu degradar mais rapidamente o surfactante (9 dias) sendo que as bactérias por separado demoraram os 15 dias em degradar o SDS.

## 1. INTRODUÇÃO

Por muitas décadas a atividade industrial tem produzido rejeitos líquidos, sólidos e gasosos nocivos ao meio ambiente. Por sua vez, a atividade industrial que cresce assustadoramente satisfazendo o consumismo que caracteriza nossa sociedade, contribui com grandes volumes de resíduo de natureza diversa, os quais, geralmente, carregam espécies químicas de caráter tóxico (KUNZ & ZAMORA, 2002; BRITO *et al.*, 2004). Tais substâncias xenobióticas<sup>2</sup> têm alterado consideravelmente a qualidade dos ecossistemas, da mesma forma que processos industriais que utilizam grandes volumes de água contribuem com a contaminação dos corpos de água, principalmente pela ausência de sistemas de tratamento adequados (FREIRE *et al.*, 2000).

O crescimento da cidade de Manaus devido ao desenvolvimento industrial tem provocado uma forte degradação ambiental. A urbanização não planejada tem contribuído com a poluição dos igarapés devido a que eles são receptores de esgoto domésticos, efluentes industriais, surfactantes e reforçadores de detergentes, assim como também restos de material de construção civil, apresentando valores acima dos normais em parâmetros físico-químicos como condutividade, dureza, alcalinidade, etc, colocando à cidade num grande desafio no processo de desenvolvimento urbano e preservação do meio ambiente. ( SANTOS *et al.*, 2006; PINTO *et al.*, 2009)

Junto com o aumento das áreas destinadas à expansão industrial, veio o estabelecimento de conglomerados de alta densidade populacional, o que contribui significativamente para o fenômeno de contaminação ambiental, em função do aumento da quantidade de resíduos produzidos. A contaminação de águas naturais tem sido um dos grandes problemas da sociedade moderna. A economia da água em processos produtivos vem ganhando especial atenção devido ao valor agregado que tem sido atribuído a este bem, por meio de princípios, como consumidor pagador e poluidor pagador, recentemente incorporado na legislação brasileira (KUNZ & ZAMORA 2002).

Isso porque atualmente, existe uma preocupação e conscientização da sociedade em relação à qualidade ambiental, exigindo atuações cada vez mais efetivas das autoridades. Desta forma, em função da crescente demanda em relação ao gerenciamento de áreas contaminadas e passivos ambientais, avanços significativos ocorreram nas últimas décadas

---

<sup>2</sup> Substâncias produzidas pelo homem: Xenos = estranho – compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico.

nos estudos que visavam à recuperação ambiental (SPILBORGHS, 1997), porque quando os processos naturais de atenuação dos contaminantes são limitados pela disponibilidade de nutrientes e aceitadores de elétrons, tecnologias de remediação ativas são utilizadas. Essas tecnologias foram consolidadas principalmente pelos países desenvolvidos e nas últimas décadas o Brasil também vem buscando desenvolver suas próprias tecnologias, bem como melhorar tecnologias já existentes, a os processos às nossas condições ambientais para remediar os locais contaminados (MARIANO, 2006).

A biorremediação é uma opção robusta na degradação de muitos tipos de poluentes, demonstrando vantagens sobre outros métodos de tratamento, pois consiste em um processo natural e algumas técnicas podem ser aplicadas *in situ* com perturbação ambiental mínima, sendo muitas vezes mais baratas e mais seguras. Além disso, muitos microrganismos degradam vários poluentes permanentemente, podendo ser associados a métodos de tratamento físicos ou químicos (MANDRI & LIN, 2007 e YAKUBU, 2007). As vantagens estão associadas ao uso da população microbiana resistente aos contaminantes e à possibilidade da manutenção dessa população no ambiente (MULLIGAN *et al.*, 2001; RAHMAN *et al.*, 2002 e BENTO *et al.*, 2003).

Os processos de Biorremediação baseiam-se nas atividades aeróbicas ou anaeróbicas de microrganismos. Os processos aeróbicos são caracterizados por atividades metabólicas que utilizam oxigênio comoceptor final de elétrons. Os microrganismos anaeróbicos tiram proveito de aceptores de elétrons, os quais, em função da sua disponibilidade e as condições prevalecentes redox, incluem o nitrato, o ferro, o manganês, o sulfato e dióxido de carbono (BOOPATHY, 2000 e MANDRI & LIN, 2007). É por meio deste mecanismo que a biorremediação é efetivada. Este processo é mais provável quando a estrutura química do poluente é semelhante à estrutura de moléculas naturais (GAYLARDE *et al.*, 2005).

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Caracterização da Área de Coleta

O Igarapé do Quarenta (Manaus, Amazonas) é um dos mais importantes igarapés da cidade de Manaus (que é cortada por mais de 30 igarapés). Pertence à microbacia hidrográfica Quarenta/Educandos, sua nascente, provavelmente está localizada na Unidade de Conservação Sauim-Castanheira (Zona Leste de Manaus), apresentando cobertura vegetal nativa. Embora haja outras duas, igualmente reconhecidas, tais como: Instituto Federal do Amazonas – Escola Agrotécnica (IFAM) e Bairro Zumbi dos Palmares. Esta última se encontra bem degradada e com níveis elevados de contaminação por esgoto doméstico (PROSAMIM, 2004).

Suas margens além de serem densamente ocupadas, possuindo uma das maiores densidades populacionais da cidade, também recebem efluentes do Distrito Industrial, contaminados principalmente por metais pesados, surfactantes industriais, domésticos e lixo urbano (SILVA *et al.*, 1999; VIEIRA *et al.*, 2012; BATISTA & MENDONÇA, 2004 e PROSAMIM, 2004).

No que diz respeito às variáveis físicas e químicas, os valores registrados encontram-se acima dos encontrados em outros igarapés da região de Manaus, responsável, provavelmente, pelo aumento da temperatura da água em cerca de 3°C. Os resultados publicados por Vieira *et al.*, (2012) de sólidos totais, em suspensão e dissolvidos revelaram que existe uma grande quantidade de substâncias transportadas, a condutividade elétrica revelou que a quantidade de íons dissolvidos nas águas está muito acima das condições naturais e a turbidez indica o despejo acentuado de resíduos domésticos e industriais. Há uma variação razoável em seus parâmetros físico-químicos, ao longo do igarapé, de acordo com a influência da ocupação e uso do solo, além da variação do volume de água (PROSAMIM, 2004).

#### 2.1.1. Pontos de Coleta

As coletas foram realizadas em dois pontos ao longo do Igarapé do Quarenta, de acordo com suas características ambientais bem distintas. O primeiro ponto (no cruzamento da Avenida Silves), denominado **Silves** (3° 7'43.08" S e 59° 59'35.88" L), é caracterizado por ser o trecho mais largo do igarapé, sem mata ciliar, com maior incidência radioativa direta, margeado por uma densa ocupação urbana nas duas margens (figura 6), com descarga de

esgoto doméstico, em quase sua totalidade *in natura*. As características físico-químicas publicadas por Waichman, (1999) mostraram pH por volta de 6,24, condutividade elétrica de 166,67  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , dureza 34,38  $\text{mgCaCO}_3/\text{L}$ , turbidez 43,09 NTU, oxigênio dissolvido 0,94  $\text{mg}/\text{L}$ . A realidade atual parece ser pior devido ao aumento da população que mora nas proximidades deste igarapé de ao crescimento da zona industrial, o que resulta no aumento de resíduos e efluentes jogados nas águas do Igarapé do Quarenta.

O segundo ponto (3°6'57.24" S 59°58'22.92" w), denominado **Seduc**, é caracterizado por ser o trecho mais estreito, com mata ciliar, com baixa incidência radioativa direta, com velocidade maior que no ponto Silves, margeado por uma reduzida ocupação urbana em suas margens, não sofre descarga direta de esgoto ou drenagem de chuva, mas localiza-se logo após um trecho de intensa ocupação de indústria e o Condomínio Residencial Eliza Miranda (figura 6). Suas características físico-químicas mostram pH por volta de 6,32, condutividade elétrica de 185,66  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , dureza 28,71  $\text{mgCaCO}_3/\text{L}$ , Turbidez 49,73 NTU, oxigênio dissolvido 3,78  $\text{mg}/\text{L}$  (WAICHMAN, 1999). Da mesma forma que no ponto anterior, a realidade atual apresenta um lugar mais poluído, com maior incidência de efluentes industriais.



**Figura 6.** Pontos de coleta de amostras localizados no percurso do Igarapé do Quarenta. Baseado em: Google Maps®

### *2.1.2. Coleta da água*

As amostras de água foram coletadas em frascos de vidro de tampa de rosca estéreis de 1L de capacidade. O frasco foi aberto utilizando uma mão só e ficando a outra livre para segurar o frasco e coletar a amostra de água. Cuidadosamente a água foi coletada nos frascos até eles ficarem completamente cheios evitando a presença de ar dentro do frasco devido a que o oxigênio poderia reagir com a amostra. Os frascos foram identificados e guardados numa caixa com fecho hermético contendo gelo e transportados para o laboratório. Foram coletados dois frascos por cada ponto.

### *2.1.3. Coleta do Material Vegetal.*

Foram coletadas espécies vegetais encontradas na ladeira do Igarapé do Quarenta, retiradas cuidadosamente, tentando obter a raiz e todas suas partes intactas. As plantas foram cortadas e guardadas em sacos plásticos estéreis para evitar contaminação externa, colocadas numa caixa com fecho hermético e transportadas para o laboratório. Foi coletada uma espécie vegetal por ponto de coleta.

## **2.2. Isolamento e Preservação das Bactérias**

As bactérias foram isoladas das amostras de água e plantas coletadas nos pontos anteriormente descritos. Os procedimentos de isolamento e preservação das bactérias foram realizados em completa assepsia evitando a contaminação por parte do ambiente de trabalho.

### *2.2.1. Esterilização dos materiais.*

Os meios de cultura e as placas de petri utilizadas foram esterilizados utilizando a autoclave encontrada nos laboratórios do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais (MBT) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA).

A esterilização foi realizada respeitando os seguintes parâmetros:

- Temperatura : 121 °C
- Pressão : 1,5 Kgf/cm<sup>2</sup>
- Tempo : 15 min.

No caso da câmara de fluxo, ela primeiro foi limpa com álcool 70% e posteriormente esterilizada utilizando luz UV. A câmara de fluxo possui duas lâmpadas de UV, as quais permaneceram ligadas por um período de 30 minutos.

### *2.2.2. Isolamento das bactérias das amostras de água.*

Antes de começar o isolamento foi necessário homogeneizar as amostras mexendo bem os frascos. Para facilitar o isolamento das bactérias presentes nas amostras foi feita uma diluição 1/10 (100 µL da amostra e diluir em 900 µL de água destilada estéril), a diluição foi feita para cada amostra (4 frascos = 4 diluições). Após a diluição transferiu-se, utilizando uma pipeta automática e ponteiros estéreis, 50 µL para as placas de petri contendo os meios de cultura esterilizados. Colocando a amostra no meio da placa e posteriormente utilizando uma alça de Drigalsky espalhou-se na placa toda até que a amostra foi absorvida no meio de cultura. Foram utilizados dois meios de cultura: Agar LB e Agar Nutritivo.

As placas foram incubadas a 26°C e monitoradas a cada 24 horas por uma semana para identificar as diferentes novas espécies de bactérias que foram aparecendo. Estas novas espécies foram transferidas, imediatamente depois de identificadas na placa, para novas placas devidamente esterilizadas, colocando as bactérias nas placas contendo o mesmo meio de cultura do que foram tiradas e depois incubadas por 48 horas.

### *2.2.3. Isolamento das bactérias endofíticas.*

As amostras vegetais foram levadas para o laboratório e cortadas separando suas partes (folha, caule, raiz), estas partes foram empregadas para o isolamento dos microrganismos endofíticos destas espécies.

Antes de iniciar o isolamento foi necessário fazer uma desinfecção superficial com o objetivo de eliminar a comunidade microbiana externa, mantendo viável a microbiota interna da espécie vegetal. As amostras vegetais foram lavadas em água corrente com detergente neutro, cada parte anteriormente mencionada foi cortada em fragmentos de 10 a 12 cm e submetidas a uma sequência de submersões em diferentes soluções e com a seguinte ordem de tempo:

- **Folhas** - álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 3% por 2,5 minutos, novamente álcool a 70% por 30 segundos, e água destilada estéril por 2 minutos.

- **Raiz e Caule** - álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 4% por 3 minutos, álcool a 70% por 30 segundos, e água destilada estéril por 2 minutos.

Como prova de que a desinfecção superficial foi efetiva, foram semeadas em meio LB, alíquotas de água (50 µL) da última lavagem dos fragmentos vegetais e submetidas a uma temperatura de 26°C por 15 dias (SOUZA *et al.*, 2004).

Depois que o material vegetal for esterilizado, os fragmentos estéreis foram cortados em pedaços menores de aproximadamente 6 mm<sup>2</sup> e inoculados em placas petri contendo os dois meios de cultura anteriormente descritos. As placas contendo as amostras vegetais foram mantidas em incubadora a temperatura de 26°C por 7 dias. Nesse período, as bactérias que apresentaram crescimento foram transferidas para novas placas contendo meio de cultura do que foram tiradas.

#### 2.2.4. *Preservação das bactérias isoladas.*

As bactérias isoladas foram preservadas para posteriores pesquisas. Antes de realizar a preservação foi realizada a coloração de Gram em lamina porta objeto. As lamina foram observadas no microscópio óptico utilizando a lente objetiva 100x (óleo de imersão) para conseguir visualizar a morfologia das bactérias e o tipo de coloração que elas apresentam (gram positivas: azul violeta e gram negativas: vermelho).

A coloração de Gram ajudou a definir quais culturas poderiam estar puras e quais precisavam ser ainda purificadas. As culturas possivelmente puras apresentaram a mesma morfologia e coloração, enquanto nas culturas impuras ou contaminadas foi possível observar diferentes tipos de morfologia e coloração.

Depois de ver que as culturas estavam aparentemente puras, foi feita a preservação das bactérias em tubos criogênicos. A preservação se realizou segundo Costa *et al.*, (2009) e Andreatti Filho *et al.*, (2007) utilizando tubos criogênicos de 2 mL que continham 0,8 mL do meio de cultura e 0.2 mL de glicerina para depois ser inoculada a amostra bacteriana. Uma vez inoculadas as bactérias os tubos foram fechados e congelados.

### **2.3. Agrupamento e Seleção das Bactérias**

Uma vez isoladas as bactérias, foi feito o agrupamento, considerando a fonte da que foram isoladas, as características macroscópicas, a morfologia microscópica e coloração de gram. Foram selecionadas 19 bactérias, das 87, com características diferentes em quanto à morfologia macro e microscópica (cor das bactérias, tipo de colônias, coloração gram) sendo selecionadas das duas fontes (água e plantas) e tentando conseguir a maior diversidade possível. As bactérias selecionadas foram utilizadas posteriormente nos ensaios de biorremediação.

### **2.4. Extração e Amplificação (PCR) do rDNA (ribossomal)**

A extração e PCR do DNAr das bactérias foi realizada com passo prévio para a identificação das bactérias trabalhadas.

#### *2.4.1. Extração do DNAr.*

O DNA das bactérias foi extraído por meio do “Choque Térmico”. Um volume de 1,5 mL do cultivo bacteriano foi colocado num tubo de 2 ml de capacidade e centrifugado a 12000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado, o pellet foi lavado com 500 µl água destilada estéril e centrifugado novamente. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi resuspendido em 300 µL de água destilada estéril num micro tubo de 1,5 ml.

O tubo foi colocado em banho maria com água a 100 °C durante 5 min e depois deixado no congelador aprox. 10 min até a amostra ficar congelada. Depois que a amostra estava congelada, ela foi colocada novamente no banho maria fervendo (100 °C) por 5 min, após esse tempo foi deixada novamente no congelador até congelar. A amostra congelada foi retirada, esquentada até descongelar e centrifugada a 12000 rpm por 10 min., o sobrenadante foi coletado e transferido para um tubo novo. O procedimento foi realizado nas 19 bactérias trabalhadas.

#### *2.4.2. Amplificação do DNAr (PCR).*

A amplificação do DNAr foi mediante a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando o primer 16s.

Na PCR foi utilizado um mix com os componentes seguintes:

- |                             |        |                          |       |
|-----------------------------|--------|--------------------------|-------|
| • H <sub>2</sub> O          | : 34,5 | • Primer R. (10 pmol)    | : 1,5 |
| • Tampão (10X)              | : 5    | • DNTP (2,5 mM)          | : 2   |
| • MgCl <sub>2</sub> (50 mM) | : 3    | • Taq Polimerase (5 Un.) | : 0,5 |
| • Primer F. (10 pmol)       | : 1,5  | • DNA                    | : 2   |

Volume total do Mix: 50 µl (para 1 amostra/bactéria) .

Os tubos contendo o mix foram levados num termociclador onde será efetiva a reação em cadeia da polimerase. O termociclador trabalha mudando as temperaturas por determinados períodos de tempo fazendo às enzimas e componentes do mix trabalharem em condições adequadas. O equipamento foi configurando segundo os seguintes tempos e temperaturas:

- |                   |       |
|-------------------|-------|
| • 95 °C - 5 min.  |       |
| • 94 °C - 1 min.  |       |
| • 56 °C - 1 min.  | → 30X |
| • 72 °C - 2 min.  |       |
| • 72 °C - 10 min. |       |
| • 04 °C - ∞       |       |

## 2.5. Sequenciamento das bactérias

Os produtos obtidos da PCR foram purificados utilizando um kit de purificação (Ilustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit), seguindo as especificações do fabricante. Uma alíquota de 200 ng de DNA puro foi utilizada para as reações de sequenciamento usando o Kit de sequenciamento DYEnamic™ e 0,5 µM do primer utilizado na PCR. As amostras foram colocadas no sequenciador. As sequencias foram analisadas e comparadas com sequências do GenBank utilizando o programa BLAST.

## 2.6. Avaliação dos Componentes Majoritários da Água

Para conseguir obter uma resposta do que se encontra nas águas do Igarapé do Quarenta a água coletada foi avaliada utilizando técnicas de filtração, cromatográficas e no final uma leitura no espectrômetro de massas.

### *2.6.1. Filtração da água.*

Na água coletada foram realizadas diferentes tipos de filtrações para conseguir eliminar sólidos maiores, suspensos e até microrganismos com a finalidade de obter a água sem interferentes e avaliar qual é o componente que se encontra em maior quantidade.

Para começar, realizou-se uma filtração usando gaze para conseguir eliminar os sólidos maiores presentes na água. A gaze foi colocada num funil de 90 mm de diâmetro e posteriormente a água foi filtrada. Após a filtração com gaze a água filtrada foi centrifugada usando tubos falcon de 50 mL de capacidade, com a centrifugação conseguiu-se eliminar os sólidos em suspensão sedimentando os, separando o sobrenadante para a seguinte filtração em membrana Millipore.

A última etapa de filtração foi realizada em um sistema de filtração com vácuo usando uma membrana Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$ . Nessa etapa conseguiu-se retirar todo o material biológico, deixando pronto o líquido filtrado para começar a separação dos componentes da água por técnicas cromatográficas.

### *2.6.2. Extração em fase sólida (SPE).*

Usando a água obtida das diferentes filtrações, foi realizada uma extração em fase sólida utilizando uma coluna de sílica de 10 gr. A coluna foi acoplada num kitasato ligado a uma bomba de vácuo. A coluna inicialmente foi condicionada usando metanol para depois passar 1L de amostra. A sílica encontrada na coluna tem a função de reter os compostos polares e deixar passar os não polares, ficando presos os compostos de interesse. Depois que a amostra líquida atravessou a coluna de sílica e os compostos não polares foram descartados a amostra retida na coluna foi eluída usando 2 ml de metanol que foi recebida num frasco limpo de 5 mL de volume previamente pesado. Depois que o metanol passou pela coluna e coletou os compostos polares retidos nela, se deixou evaporar o metanol na capela de fluxo. Após evaporar o metanol, o frasco, contendo um pó de cor laranja, foi novamente pesado para calcular a quantidade em massa de compostos obtidos por litro de amostra.

### *2.6.3. Separação dos compostos em CCD (cromatografia em camada delgada).*

Pela complexidade da matriz que estava sendo utilizada (água do Igarapé do Quarenta) foi realizada uma CCD para separar e identificar o composto com maior presença na amostra. Antes de começar com a CCD, o pó anteriormente mencionado foi resuspendido

em uma mistura de metanol/hexano e depois, usando um capilar, a amostra foi colocada na placa cromatográfica.

Para a CCD foi utilizada uma placa de alumínio revestida com sílica-gel (fase estacionária) onde foi colocada a amostra. Foi utilizada uma mistura de três solventes (metanol, acetato de etila e hexano) em proporções 1:3:6 respectivamente para conseguir separar melhor os compostos contidos na amostra.

#### *2.6.4. Análise da amostra no espectrômetro de massas.*

Depois que a CCD foi realizada e o composto com maior presença foi encontrado, a sílica da placa do CCD contendo o composto aderido nele foi retirada e analisada no espectrômetro de massas para conseguir visualizar o espectro de um ou mais compostos que estiveram presentes na amostra. Inicialmente, a sílica retirada contendo a amostra foi misturada com 1 mL de metanol para extrair a amostra da sílica.

A mistura foi centrifugada a 12000 rpm por 5 min para separar a sílica do metanol e o sobrenadante (metanol + amostra) foi analisado no espectrômetro de massas. O espectrômetro de massas ajudou visualizar o perfil do composto que se encontrava em maior quantidade para depois usando as bactérias isoladas, tentar biodegradar o composto encontrado.

No análise da amostra foi utilizado um espectrômetro de marca *ThermoScientific LCQ Fleet*, a fonte utilizada foi ESI (Electrospray). Foi definido um fluxo de solvente (metanol) de 0,20 mL/min e uma faixa de m/z de 100 até 1000. Usando a seringa do equipamento, 10 µL foram das amostras foram injetados no loop do espectrômetro de massas e posteriormente os resultados foram analisados usando o software “Xcalibur”.

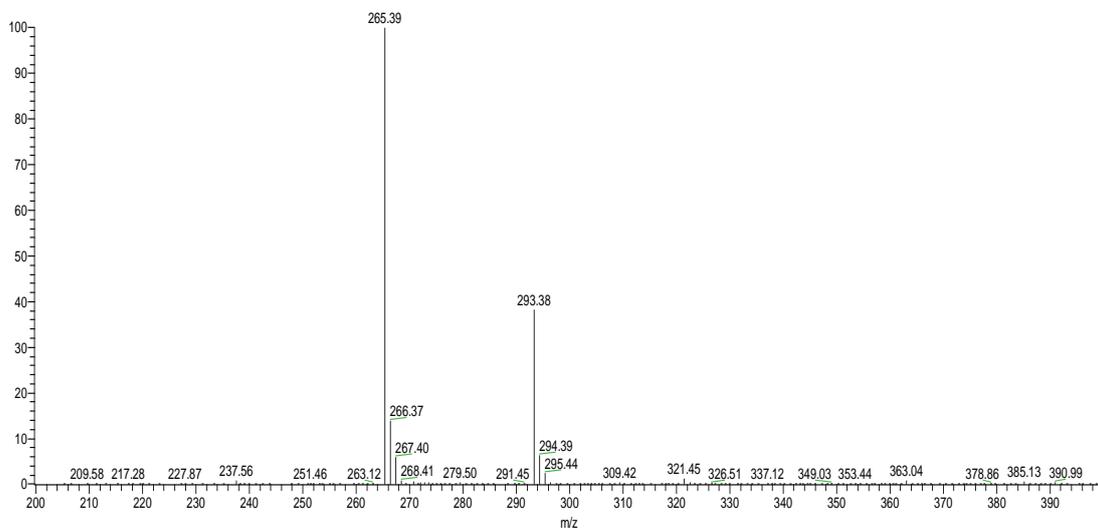
## **2.7. Ensaios de Biodegradação**

O composto com maior presença encontrado na análise anterior foi o PEG (Polietilenoglicol), muito utilizado na indústria farmacêutica, industrial, alimentícia assim como também para fins domésticos. O PEG é um constituinte dos surfactantes, pelo que nos velou a pensar que a água do igarapé do quarenta está sendo poluída por este tipo de substâncias. Portanto para os testes de biodegradação foi utilizado um surfactante aniônico de

nome SDS (dodecil sulfato de sódio) devido a que ele é um dos mais utilizados pelas indústrias e apresenta grande presença nos corpos aquáticos.

### 2.7.1. Perfil do SDS no Espectrômetro de Massas.

Para conhecer o perfil do SDS e os picos que estariam envolvidos na degradação, preparou-se uma solução (1gr/L) de SDS em água destilada estéril e fez-se análise em espectrômetro de massas com fonte electrospray. No espectro de massa obtido (figura 7) pode ser observado um pico majoritário de m/z 265 que pertence a um éter lauril de 12 átomos de carbono ligados a um grupo sulfato.



**Figura 7.** Espectro de massa do surfactante aniônico SDS.

A obtenção do perfil do SDS foi necessária para saber o que estava acontecendo nos ensaios de degradação, ou seja, se as bactérias conseguiam diminuir o surfactante no meio, mudar as características dele ou produzir algum metabólito secundário.

### 2.7.2. Testes piloto.

Foram realizados 4 testes-piloto com a finalidade de estabelecer o tipo de sistema de biodegradação, natural (água do Igarapé do Quarenta) ou artificial (solução de SDS), que seria utilizado. Para os testes-piloto foram escolhidas aleatoriamente 4 bactérias das 19 visando avaliar os meios em que as bactérias atuariam na biodegradação dos compostos. As bactérias foram testadas em culturas puras utilizando quatro tipos de meio com as seguintes características:

- a) Água natural do Quarenta: As bactérias foram inoculadas em água *in natura* do Igarapé do Quarenta.
- b) Água filtrada do Quarenta: As bactérias foram inoculadas em água filtrada em membrana Millipore 0,22 µm.
- c) Meio Mineral M9 + SDS: As bactérias foram inoculadas em uma solução de meio mineral M9 suplementado com SDS (surfactante) com concentração final de SDS de 150 mg/L.
- d) Água estéril + SDS: As bactérias foram inoculadas em uma solução de água destilada estéril suplementada com SDS (surfactante) com concentração final de SDS de 150 mg/L.

Os testes foram realizados em frasco erlenmeyer de 50 mL de capacidade. Um volume de 100 µL de cultura bacteriana foi inoculado em 10 mL de cada meio e as baterias foram incubadas num shaker a 28 °C e 120 rpm durante 15 dias. Após esse tempo os frascos foram retirados e o conteúdo foi centrifugado em tubos falcon a 7000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi coletado e analisado no espectrômetro de massas. Todos os testes foram feitos em triplicata.

### 2.7.3. Ensaio de Biodegradação.

Depois que os testes piloto terminaram e os resultados foram avaliados, montaram-se ensaios de biodegradação utilizando as 19 bactérias selecionadas. Os ensaios foram realizados em frasco erlenmeyer de 50 mL de volume, onde foram misturados 10 mL de meio mineral M9 (pH ajustado a 7), 0,5 mL de SDS (3 mg/L) e 100 µL de cultivo bacteriano. Os erlens foram deixados no agitador a 28 °C e 120 rpm durante 15 dias. Cada ensaio foi feito em triplicata para comprovar a veracidade dos resultados.

Após os 15 dias de tratamento os frascos foram retirados do agitador e o conteúdo foi transferido para tubos falcon de 15 mL e centrifugados a 7000 rpm por 20 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em filtro seringa de acetato de celulose de 0,20 µm e 30 mm de diâmetro. O filtrado foi coletado em tubos falcon de 15 ml para depois ser analisados por espectrometria de massas.

### 2.7.4. Curva de Biodegradação.

As bactérias que apresentaram melhores resultados de biodegradação foram selecionadas para realizar um novo ensaio avaliando o potencial de degradação em relação ao

tempo. As bactérias foram testadas em culturas puras e também em consorcio (juntas), utilizando a mesma metodologia dos ensaios de biodegradação descritos anteriormente sendo que nesta etapa a avaliação da biodegradação foi realizada cada 3 dias durante 15 dias para determinar o momento mais próximo em que acontecesse a biodegradação total do surfactante. Os resultados foram analisados por espectrometria de massas e foi construída uma curva de degradação.

## **2.8. Análises das amostras no Espectrômetro de Massas**

As amostras foram analisadas usando um espectrômetro de massa de marca *Thermo Scientific LCQ Fleet*, a fonte utilizada foi ESI (Eletrospray), usando metanol como solvente com fluxo de 0,20 mL/min e uma faixa de  $m/z$  de 100 até 1000.

Antes de iniciar as análises das amostras no espectrômetro de massas, uma solução de SDS dissolvido em água com concentração de 150 mg/L foi filtrada em membrana de acetato de celulose e analisada no equipamento para conseguir obter o perfil do surfactante. Em seguida, uma segunda solução contendo SDS (150 mg/L) em meio mineral M9 foi analisada para ter certeza de que o espectro que apareceu na solução anteriormente analisada é semelhante com a solução de SDS e meio mineral M9, mostrando que o meio mineral não tem interação nenhuma com o surfactante. Todas as amostras foram filtradas antes de serem injetadas no equipamento.

Os espectros de massas foram analisados utilizando o software Xcalibur. Os ensaios de biodegradação foram avaliados segundo a intensidade dos picos apresentada nos espectros de massas que foram comparados com a intensidade final encontrada no controle (sem bactéria). A redução da intensidade nos espectros de massas indicou que acontece uma diminuição na concentração do composto fazendo a biodegradação efetiva.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Isolamento e Agrupamento das Bactérias

Das duas fontes de isolamento utilizadas (plantas e água), conseguiu-se isolar 87 bactérias. Do total, 26 foram encontradas em ambiente endofítico (nove em *Clitoria racemosa* e 17 em *Senna reticulada*). As 61 bactérias restantes foram isoladas da água (38 da Silves e 23 da SEDUC). Deste total, 6% foram gram positivas e 94% gram negativas (Tabela 4).

Em *Clitoria racemosa*, a microbiota predominante foi do tipo gram negativa, sendo que apenas um coco gram positivo foi isolado da parte do caule, enquanto as restantes foram cocos e bacilos gram negativos. De igual forma, em *Senna reticulada*, apenas três bactérias gram positivas foram encontradas, e o resto todas gram negativas (Tabela 4). A maioria das bactérias endofíticas apresentaram cores claras como amarelo e branco, outras bactérias quase não apresentaram cor mostrando uma aparência “transparente”, por ultimo, duas bactérias apresentaram uma tonalidade rosa (Tabela 5).

As bactérias isoladas da água em ambiente aberto, com incidência solar direta e mais diluída (Silves), são quase em sua totalidade gram negativas e de cores claras. Das bactérias isoladas, uma foi gram positiva de cor rosa, uma gram negativa de cor vermelha, cinco de cor amarela e as 31 restantes foram brancas sendo que algumas possuem morfologias macroscópicas diferentes como o tamanho, textura e/ou aparência das colônias (Tabela 4 e 5).

Por sua vez, as bactérias encontradas na região sombreada e menos diluída do Igarapé e com maior potencial de influência do esgoto do distrito industrial (SEDUC), foram todas gram-negativa e também de cores claras. Das 23 bactérias isoladas, 3 foram amarelas, 19 brancas e apenas uma vermelha, apresentando diferenças quanto à morfologia macroscópica da colônia.

Conforme a parte de acima, das 87 bactérias isoladas só 6% foram gram positivas e 94% gram negativas, portanto poderia se dizer que a microbiota bacteriana presente no Igarapé do Quarenta são quase em sua totalidade gram negativas, dados de grande importâncias pois as bactérias gram negativas são conhecidas por serem mais perigosas, devido que sua membrana celular é mais resistente que das gram positivas. De outra forma, 59% das bactérias foram Cocos e 41% bacilos, não apresentando uma diferença grande entre as duas morfologias.

Outra característica das bactérias isoladas da água e das espécies vegetais coletadas foi a cor clara (amarelas e brancas) das colônias, encontrando também morfologias diferentes em relação ao tamanho, textura, aparência (plana, puntiforme, circular, irregular, convexa) e no tipo de crescimento. Esse resultado foi importante porque ajudou na seleção das bactérias que foram utilizadas nos testes de biodegradação.

**Tabela 4.** Tipos de bactérias isoladas das plantas e da água coletadas no Igarapé do Quarenta, Manaus-AM.

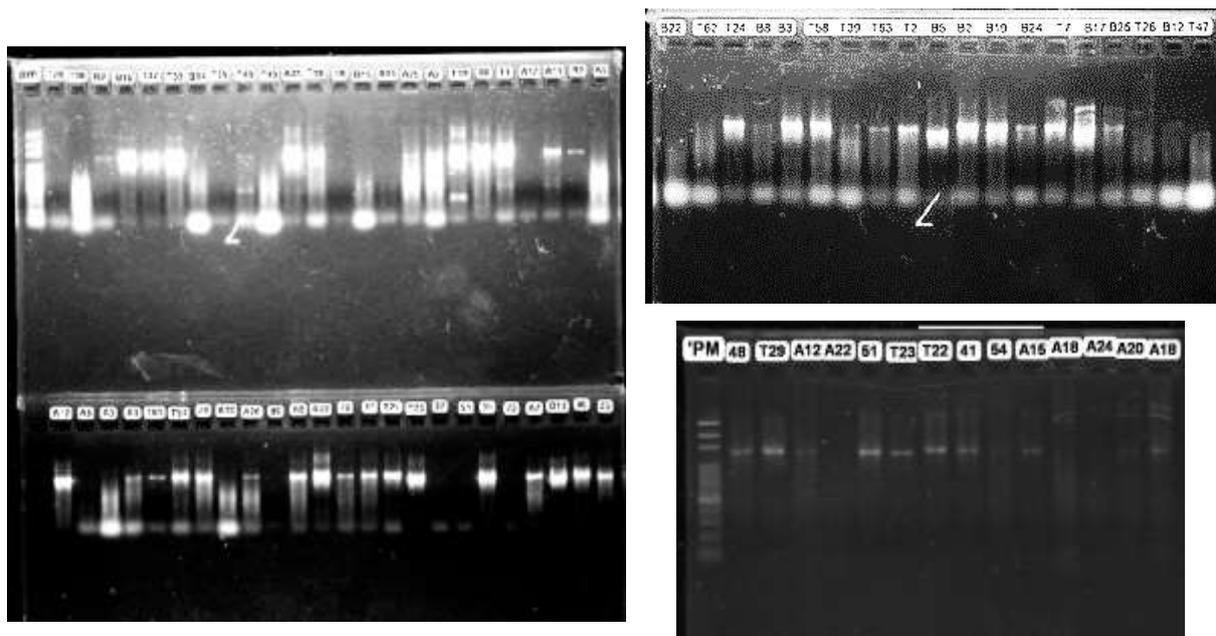
Tipo	<i>Clitoria racemosa</i>		<i>Senna reticulada</i>		Córrego		Total
	Caule	Raiz	Caule	Raiz	Silves	SEDUC	
Bacilo	2	0	2	0	21	11	36
-	2	0	2	0	21	11	36
+	0	0	0	0	0	0	0
Coco	4	3	10	5	17	12	51
-	3	3	8	4	16	12	46
+	1	0	2	1	1	0	5
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>12</b>	<b>5</b>	<b>38</b>	<b>23</b>	<b>87</b>

**Tabela 5.** Características macroscópicas e microscópicas das bactérias isoladas das plantas e da água coletadas no Igarapé do Quarenta, Manaus-AM.

Característica		Bacilo		Coco		Total
		-	+	-	+	
Amarela	Simples	1	0	9	3	13
	Colônias grandes	0	0	1	0	1
	Lisa	1	0	0	0	1
	Colônias pequenas	2	0	0	0	2
Branca	Simples	6	0	19	1	26
	Brilhante	1	0	0	0	1
	Lisa	12	0	4	0	16
	Transparente	1	0	9	0	10
	Colônias grandes	1	0	0	0	1
	Colônias pequenas	5	0	1	0	6
	Pontos amarelos	2	0	0	0	2
Rosa	1	0	1	1	3	
Transparente	3	0	0	0	3	
Vermelha	0	0	2	0	2	
<b>Total</b>	<b>36</b>	<b>0</b>	<b>46</b>	<b>5</b>	<b>87</b>	

### 3.2. Extração e Amplificação do DNAr

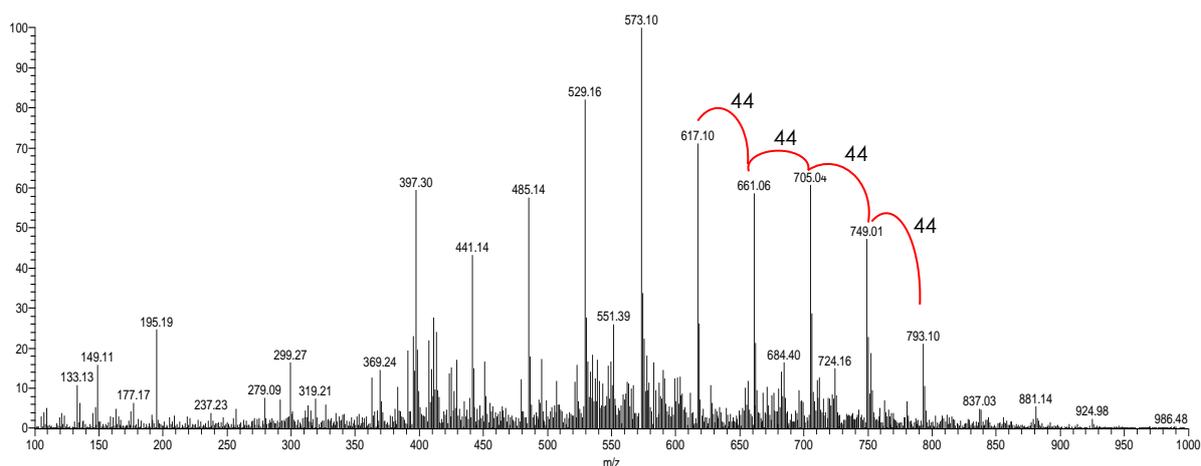
Conseguiu-se extrair o DNA das bactérias trabalhadas mediante choque térmico, e por meio da reação em cadeia da polimerase, conseguiu-se amplificar as frações do rDNA. A eletroforese em gel de agarose (1%) mostrou que a PCR foi efetuada com sucesso e que as amostras estão prontas para realizar o sequenciamento do DNAr amplificado. (Figura 8). A presença ou ausência das bandas ajudaram também na confirmação da pureza das bactérias.



**Figura 8.** Resultados da PCR do DNAr extraído das bactérias.

### 3.3. Avaliação dos Componentes da Água

A mistura de solventes na cromatografia de camada delgada conseguiu separar alguns compostos mostrando bandas de diferentes tamanhos, uma das quais apresentou a maior intensidade. Esta foi raspada e analisada no espectrômetro de massas mostrando um espectro com perdas de  $m/z$  44 (Figura 9) que correspondem à quebra de um fragmento molecular de  $[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2]$  que é um componente característico dos PEG (polietilenglicol), que estão presentes em quase todas as classes de surfactantes.



**Figura 9.** Espectro de massas – Raspagem da CCD.

O resultado da análise por espectrometria de massas da raspagem da CCD evidenciou a presença de surfactantes na água do Igarapé do Quarenta. Tendo em consideração esse resultado, decidiu-se adicionar nos testes pilotos um surfactante de grande uso para avaliar o comportamento das bactérias na degradação deste contaminante através da obtenção dos perfis do composto e de seus derivados por espectrometria de massas.

### 3.4. Resultados dos Testes Pilotos

Os quatro testes piloto ofereceram resultados muito importantes para a presente pesquisa. A partir desses resultados foi selecionado o meio de cultura mais adequado para evidenciar as reações que estivessem acontecendo por ação das bactérias.

Os dois primeiros meios usados, água do Quarenta *in natura* e água do Quarenta filtrada, não ofereceram bons resultados devido a que a espectrometria de massas para esses dois primeiros meios não mostrou nenhum tipo de perfil de alguma substância conhecida, isso devido a que a matriz avaliada era muito complexa e não poderia identificar o que estava sendo degradado. Por outro lado, o meio com água destilada estéril e SDS, mostrou um perfil conhecido, que foi o perfil do SDS, porém as bactérias não conseguiram crescer por falta de nutrientes e sais minerais não apresentando mudanças nos espectros de massas e por tanto não sendo considerado para os ensaios posteriores.

Por último o meio composto pelo meio mineral M9 + SDS, resultou ser o de resultados mais promissórios pelo fato de se conseguiu obter o perfil do meio com SDS, as

bactérias mostraram crescimento e provocaram variações em comparação com o perfil inicial obtido. A partir desse resultado, decidiu-se utilizar o meio mineral M9 suplementado com SDS como única fonte de carbono avaliando a biodegradação (consumo) do SDS.

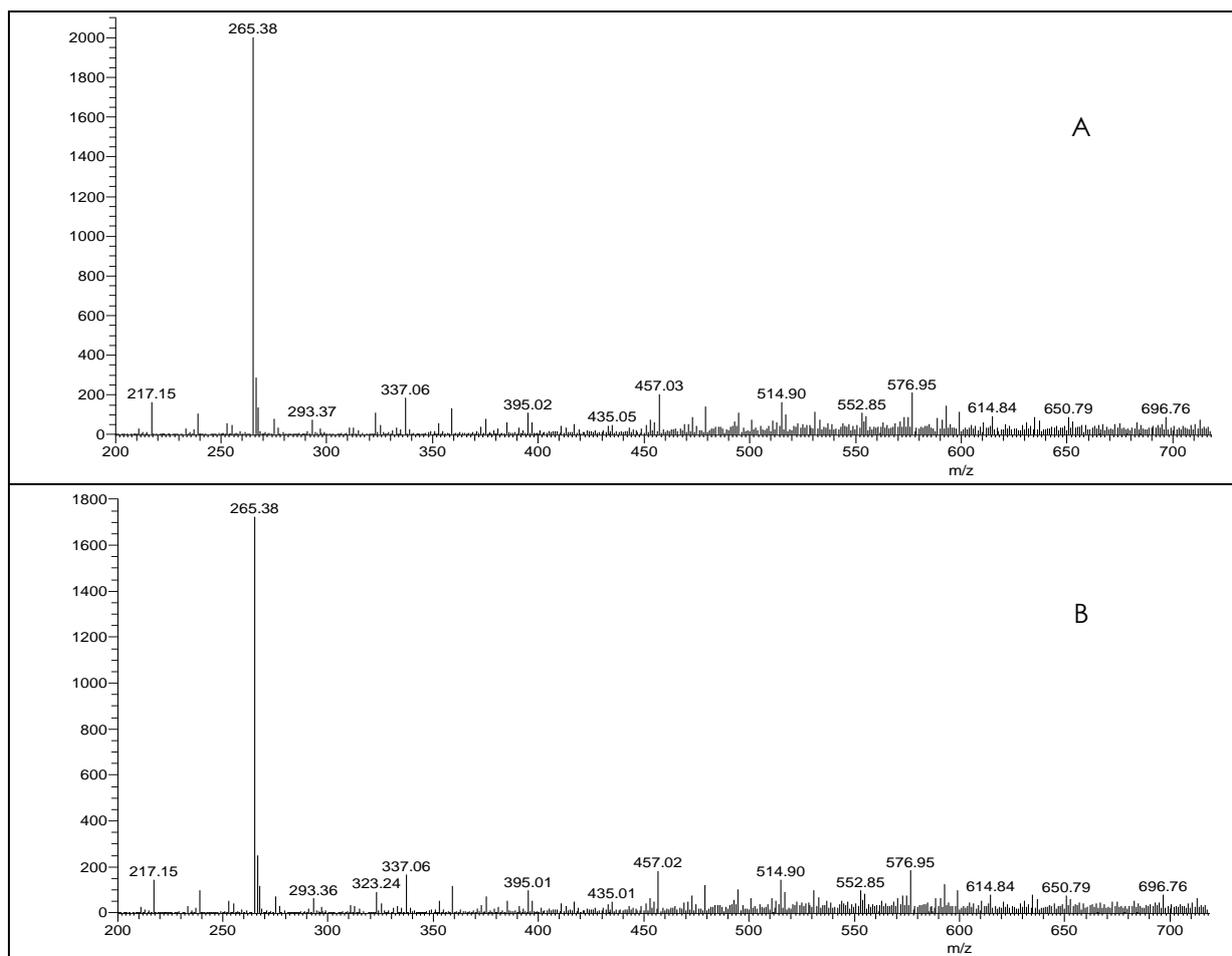
Inicialmente, foi determinado o perfil característico do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) usado nos testes de degradação. O resultado desse perfil foi necessário para comparar com os espectros obtidos dos ensaios de biodegradação e constatar se existe uma diminuição da intensidade do pico entre os tratamentos e o controle. Os espectros de massas foram ajustados tendo em consideração o espectro do controle, fixando como intensidade máxima aquela alcançada pelo pico de  $m/z$  265 no controle, com a finalidade de conseguir medir e visualizar a diminuição (biodegradação) da intensidade do pico nos tratamentos em relação ao controle.

### **3.5. Ensaios de Biodegradação com as 19 Bactérias em Meio M9 + SDS**

Terminados os 15 dias de tratamento (incubação) das bactérias, o controle foi avaliado no espectrômetro de massas para confirmar se o tempo, luz ou condições físicas do ambiente não eram fatores responsáveis pela degradação ou se provocavam alguma alteração no meio.

Nos espectros de massas, foram reportadas intensidades de 2001.5 e 1778.7 para o controle sem incubação e com 15 dias de incubação respectivamente (Figura 10). A redução da intensidade nos 15 dias transcorridos foi mínima considerando o tempo transcorrido, podendo afirmar que não existem grandes mudanças. Por outro lado, o espectro em geral continua com o mesmo perfil, ou seja, não se produziu alteração nenhuma no controle que possa ser detectada no espectrômetro de massas.

As bactérias foram testadas nos ensaios de biodegradação do SDS obtendo um espectro para cada bactéria avaliada. As análises dos espectros de massas mostraram que as bactérias reagiram de forma diferente em presença do SDS. Algumas bactérias conseguiram utilizá-lo como fonte de carbono degradando o composto, ação que se conseguiu visualizar pela redução do pico característico do SDS no espectro de massas.



**Figura 10.** Controles – SDS em meio mineral M9: A) dia 0 de incubação, B) dia 15 de incubação.

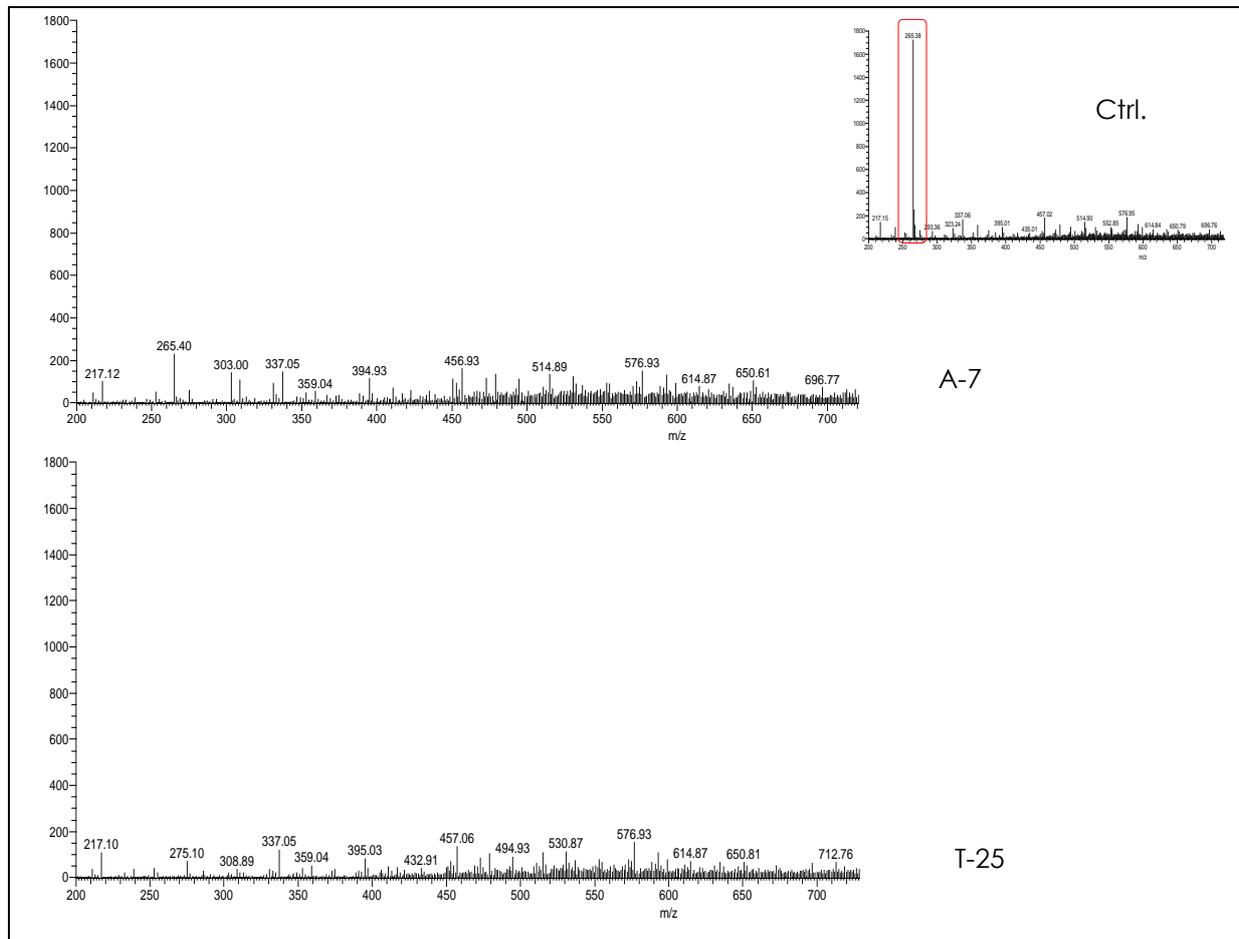
Outras bactérias realizaram uma degradação parcial, ou seja, não foram eficientes na degradação do surfactante e por sua vez começaram produzir alguns compostos desconhecidos que foram detectados pelo espectrômetro de massas, observando-se a aparição de novos picos nos espectros. Um terceiro grupo de bactérias não mostrou maiores mudanças nos espectros de massas em comparação ao controle, indicando que elas não apresentam capacidade para degradação o SDS.

### *3.5.1. Bactérias capazes de degradar SDS.*

Duas bactérias foram capazes de degradar o SDS de forma eficaz durante os 15 dias de tratamento. O potencial de degradação foi confirmado pela forte redução ou desaparecimento do pico m/z 265 apresentado nos espectros de massas analisados e que uma vez comparados com o espectro do controle (15 dias) mostraram diferença significativa.

Os espectros das duas bactérias com capacidade de degradação de SDS, observou-se com clareza a ausência total do pico m/z 265. Além de efetuar a degradação do SDS, também

é possível observar que não existe produção considerável de metabólitos secundários que possam ser detectados na técnica utilizada (Figura 11).



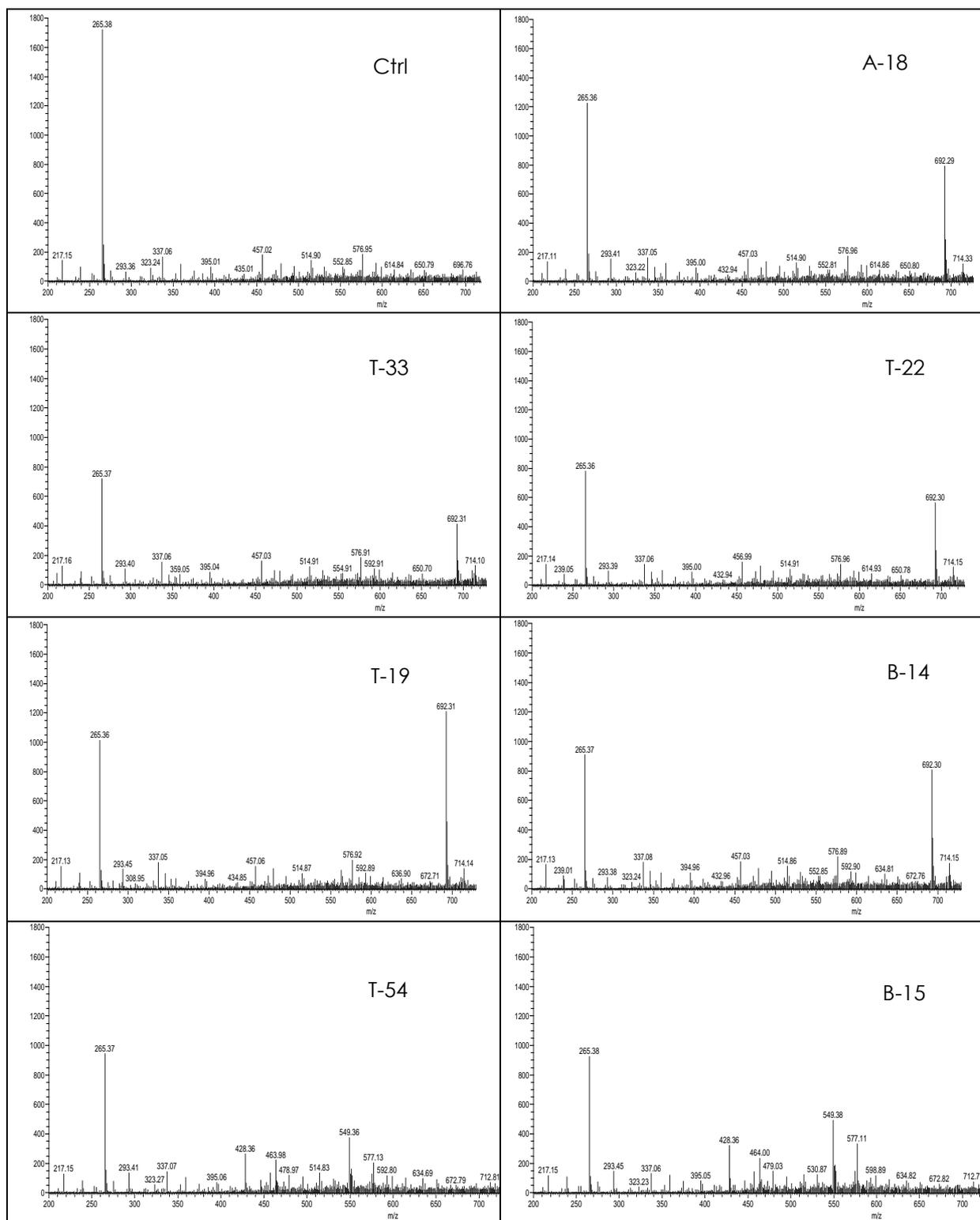
**Figura 11.** Espectros das bactérias degradadoras de surfactantes (A-7 e T-25).

A partir dessas duas bactérias que apresentaram capacidade para degradar o surfactante aniônico SDS, foi elaborado outro ensaio sobre a velocidade de biodegradação do SDS (ver ponto 3.5), visando conhecer o momento em que o surfactante era degradado no meio.

### 3.5.2. Bactérias produtoras de compostos secundários.

Um grupo de 7 bactérias das 19 analisadas mostrou capacidade de degradar o SDS de forma parcial, ou seja, não conseguiram reduzir o suficiente a intensidade do pico do SDS, o que significa que o composto ainda estava presente na amostra, em menores quantidades, mas ainda detectável (Figura 12).

Por outra lado foi observada a aparição de novos picos nos espectros, o que indica produção de metabólitos secundários pelas bactérias.



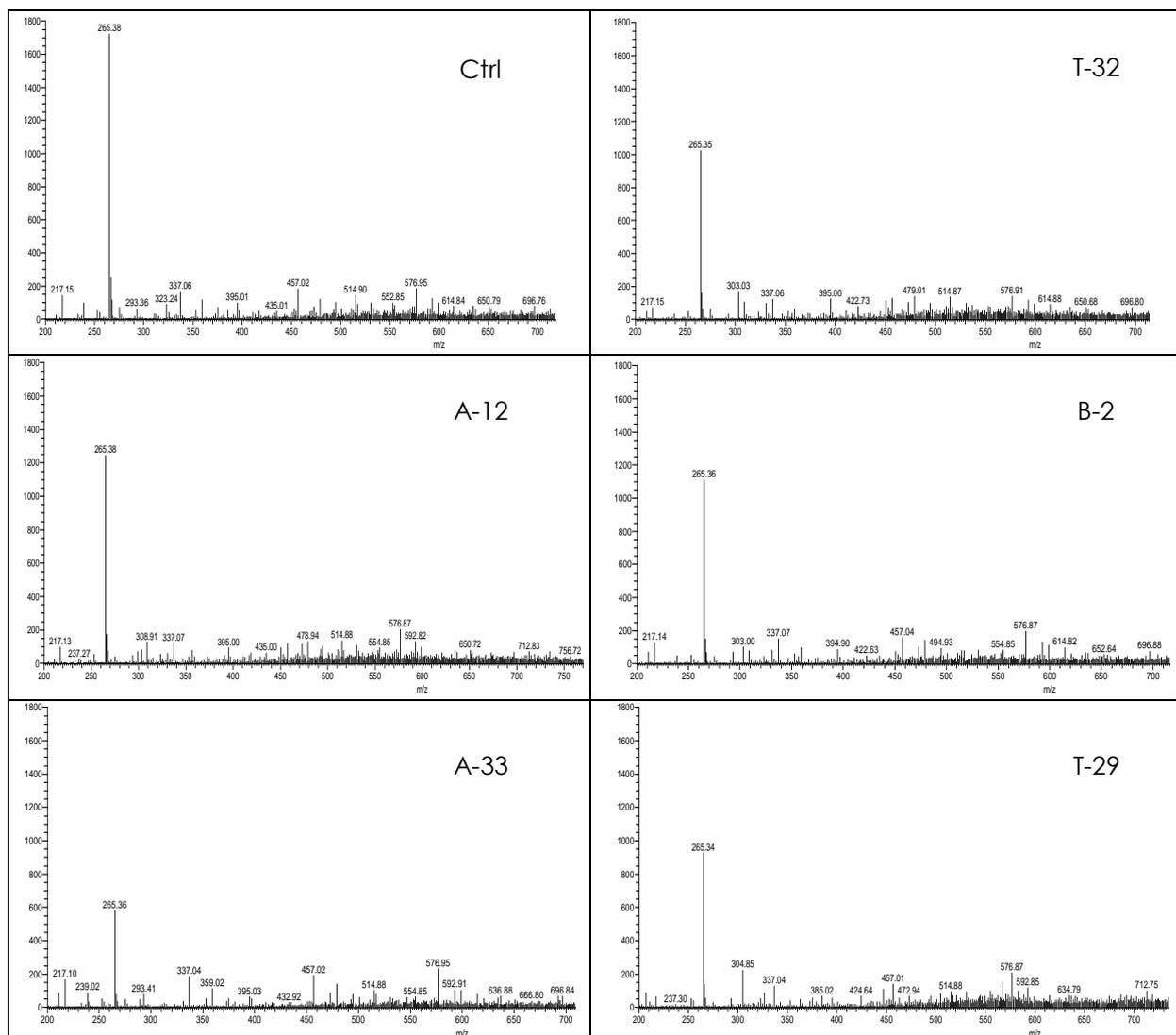
**Figura 12.** Espectros das bactérias que apresentam degradação parcial e produtoras de compostos.

As bactérias desse grupo, apesar de não conseguirem degradar completamente o surfactante, formaram picos que não pertencem ao perfil do SDS. O pico de m/z 692 apareceu nos espectros das bactérias A-18, T-33, T-22, T-19 e B-14. B-15 e T-54 mostraram um perfil diferente em comparação às demais com picos significativos de m/z 549 e 428

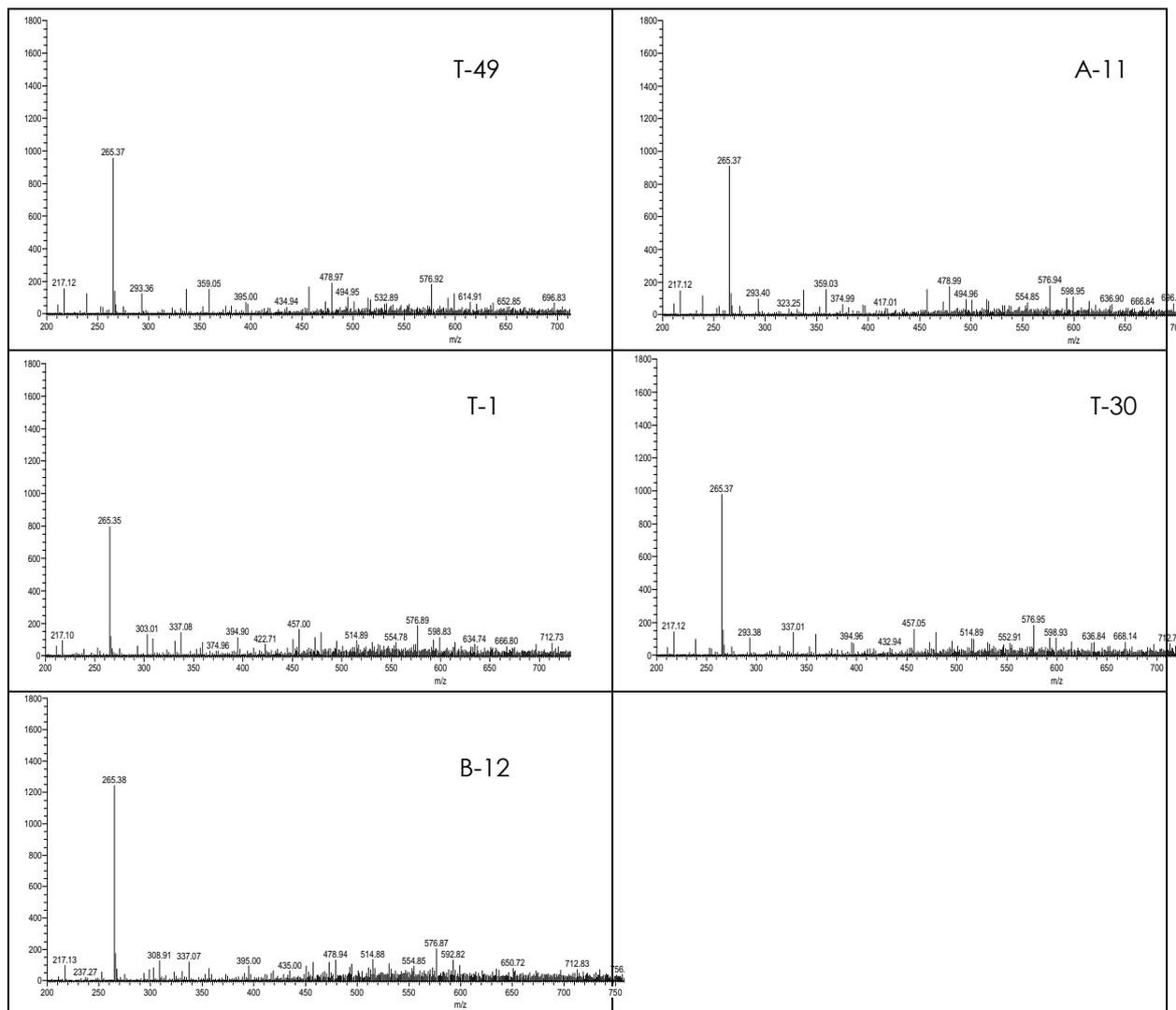
(Figura 12). Os picos produzidos por este grupo de bactérias são desconhecidos e apresentam maior massa que o SDS pelo que podemos deduzir que são moléculas de maior complexidade e que devem ser estudadas posteriormente.

### 3.5.3. Bactérias pouco eficientes na degradação do SDS.

Algumas bactérias realizaram uma degradação pouco significativa do surfactante, reduzindo a intensidade do pico até a metade em quase todos os casos (Figura 13). Além de não serem bons na degradação do surfactante, também não apresentaram mudanças significativas nos espectros avaliados.



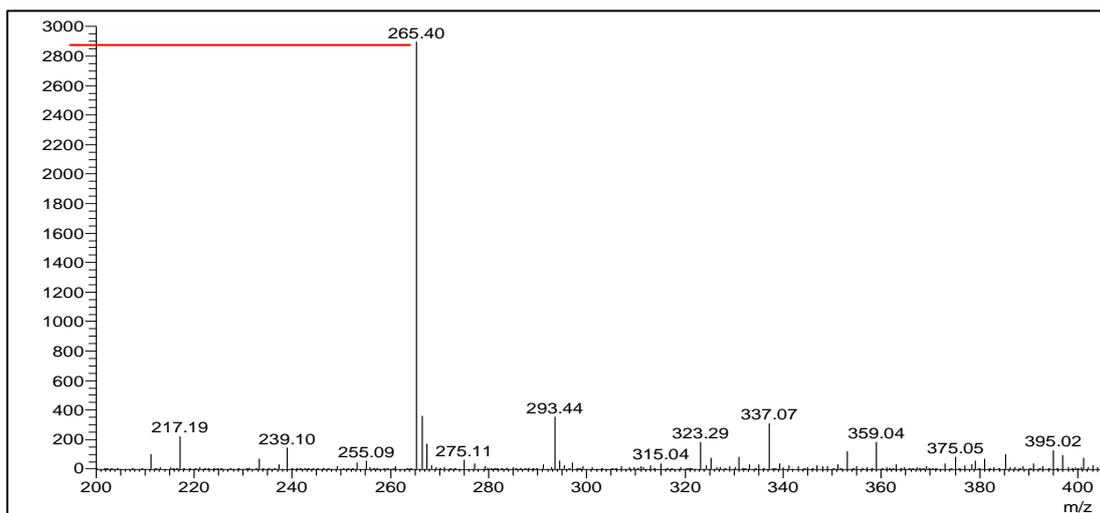
**Figura 13.** Espectros das bactérias com pouca eficácia na degradação do SDS.



**Figura 14.** Espectros das bactérias com pouca eficácia na degradação do SDS (continuação).

### 3.6. Curva de Biodegradação do SDS

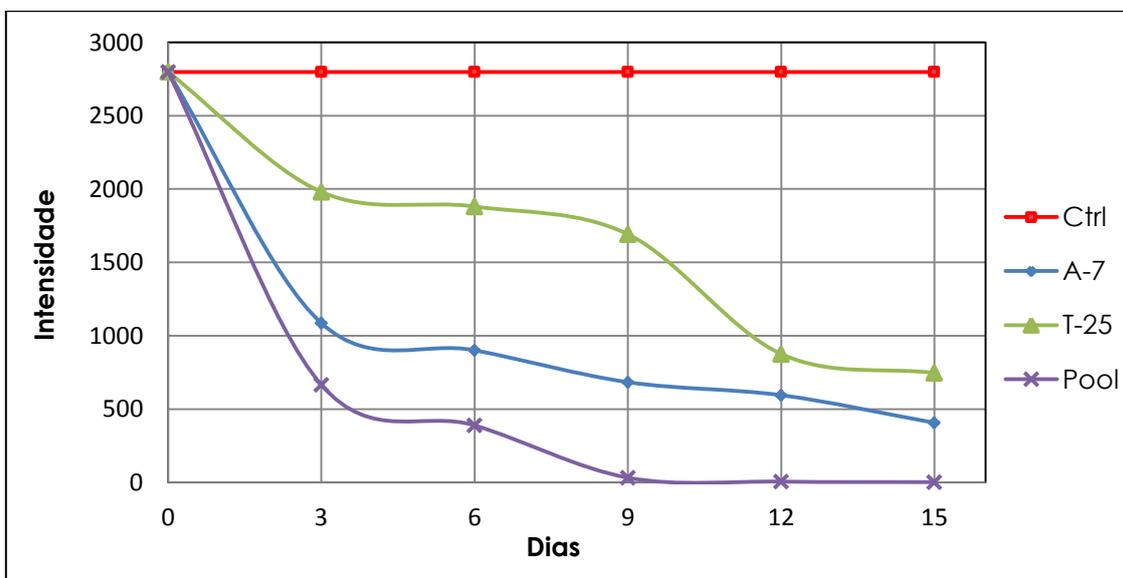
Foi elaborada uma curva de biodegradação das bactérias A-7 e T-25 para conhecer o momento aproximado em que acontece a degradação completa do SDS. O espectro do controle utilizado na curva de degradação mostrou uma intensidade de 2895 (Figura 14), portanto todos os espectros do teste foram ajustados a um limite máximo de intensidade de 3000.



**Figura 15.** Espectro do controle utilizado na degradação progressiva do SDS.

### 3.6.1. Curva de Biodegradação – Bactérias A-7; T-25 e Consorcio (A-7 + T-25).

Na curva de degradação do SDS pelas bactérias A-7, T-25 em cultura pura e em consórcio, foi avaliada a redução da intensidade do pico m/z 265 com respeito ao tempo. Os resultados da espectrometria de massas mostraram que depois dos 15 dias de tratamento conseguiu-se reduzir 85% e 73% da intensidade com as bactérias A-7 e T-25 respectivamente (Figura 15). No caso do consorcio, a velocidade de degradação foi mais rápida, conseguindo-se a redução completa da intensidade no 9º dia do ensaio.



**Figura 16.** Degradação do SDS durante os 15 dias de tratamento.

As amostras avaliadas apresentaram uma intensidade inicial de 2900 aproximadamente em todos os casos. No caso da bactéria A-7, a degradação apresentou uma redução acelerada da intensidade entre o dia 0 e 3, baixando de 2900 até 1085 (63% de

redução do total). A partir do dia 3 na frente, a degradação foi mais lenta baixando dos 1085 até 406 no dia 15, ou seja, 62% de redução em 12 dias.

Por outro lado, a degradação pela bactéria T-25 aconteceu de forma mais homogênea, sendo que do dia 0 até o dia 9 conseguiu-se uma redução de 939 da intensidade (68% de redução do total) e do dia 9 até o dia 15 uma redução de 1216 (56% nos últimos 3 dias). No caso do consórcio a redução foi mais rápida, sendo que no dia 3 já se tinha alcançado uma diminuição da intensidade de 76%, completando a degradação no dia 9 do ensaio.

#### 4. DISCUSSÃO

O Igarapé do Quarenta é um dos córregos mais poluídos da cidade de Manaus/AM. Durante seu continuum, ele recebe dejetos industriais, lixo sólido, esgoto e efluentes domésticos, mudando as características físico-químicas do ambiente em comparação com um Igarapé natural e também uma microbiota diferente da normalmente encontrada em ambientes naturais.

Os resultados do isolamento de bactérias mostraram que existe uma predominância de bactérias gram negativas, sendo que do total de bactérias trabalhadas (87) apenas cinco foram gram positiva. As bactérias gram negativas são conhecidas por serem mais perigosas que as gram positivas pelas propriedades particulares que elas podem apresentar ou desenvolver, dependendo da influência dos fatores ambientais que elas estão expostas. Segundo Tafur *et al.*, (2008) as bactérias gram negativas possuem vários mecanismos de resistência, um deles é a modificação enzimática do antibiótico criando mudanças na estrutura dele, na permeabilidade da membrana e alterações no sítio de ação, fazendo-as mais perigosas e difíceis de eliminar, podendo causar doenças que podem levar até a morte.

No caso das bactérias endofíticas, a maior riqueza de morfoespécies foi encontrada nas partes da raiz e do caule, sendo que na parte das folhas não foi encontrado crescimento bacteriano com diversidade de cores ou tipos de colônias que visualmente mostrassem diferença de tamanhos ou texturas, concluindo que não existe uma boa biodiversidade bacteriana nessa parte da planta. Isso poderia ser explicado segundo o trabalho de Azevedo, (1998) onde relata que os microrganismos endofíticos adentram nas plantas por aberturas naturais e feridas, sendo as raízes uma das portas mais utilizadas devido a que as raízes secundárias laterais sempre estão acompanhadas por uma ferida que serve de entrada para o microrganismo. Então, as bactérias endofíticas isoladas teriam como porta de ingresso as partes baixas da planta.

Tanto as bactérias isoladas do córrego quanto as endofíticas apresentaram características similares quanto à macro e micro-morfologia. A morfologia “cocos” foi encontrada em 59% das bactérias e a morfologia “bacilos” foi encontrada nos 41% restantes. Não houve diferença significativa entre as duas morfologias, ou seja, não existe uma morfologia predominante nas amostras (água e plantas) coletadas no Igarapé do Quarenta. Por outro lado, as cores predominantes das bactérias isoladas da água e espécies vegetais coletadas foram cores claras (amarelas e brancas) até algumas transparentes, porém em

alguns casos as colônias apresentaram características diferentes como o tamanho das colônias, aparência das colônias (plana, puntiforme, circular, irregular, convexa), etc.

A espectrometria de massas é uma técnica muito utilizada na detecção de compostos orgânicos como os surfactantes. Field *et al.*, (1992) conseguiram juntar técnicas de química analítica como CG (cromatografia gasosa) e EM (espectrometria de massas) na quantificação e determinação de surfactantes alifáticos e aromáticos conseguindo bons resultados. Utilizando cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas, Moody *et al.*, (2001) conseguiram identificar a presença dos perfluorinatos (PFOS), uma classe de surfactantes muito utilizados em lubrificantes, tintas, cosméticos, etc. Os dois trabalhos anteriores demonstraram que a espectrometria de massas pode ser utilizada com sucesso na detecção de diferentes tipos de surfactantes.

No trabalho de Nishikawa *et al.*, (2003), utilizando técnicas de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com fonte de ionização electrospray (LC/ESI-MS), identificaram-se diversos surfactantes. Entre seus resultados relataram que os íons de  $m/z$  265 são correspondentes de um alquil sulfato (AS) de 12 átomos de carbono. Da mesma forma nos resultados do trabalho de Harvey *et al.*, (2004), conseguiram-se identificar por meio de espectrometria de massas por íons secundários por tempo de voo (ToF-SIMS) em modo negativo, o perfil do surfactante aniônico alquil sulfato SDS, cujo maior componente foram espécies do  $C_{12}$  com  $m/z = 265$ . No presente trabalho, os resultados obtidos da espectrometria de massas com ionização por electrospray (MS/ESI) em modo negativo do SDS em água destilada estéril, mostraram a marcada presença do mesmo pico ( $m/z$  265), e sabendo que o SDS é um surfactante aniônico de 12 átomos de carbono que pertence aos alquil sulfatos, confirmaria a veracidade de nossos resultados, além de que a soma dos elementos que o compõem  $[CH_3(CH_2)_{11}OSO_3^-]$  dá como resultado 265.

No trabalho de dissertação de Oliveira (2010), foi avaliada a resistência das bactérias isoladas da Lagoa Ria de Aveiro (Portugal), considerado um local de descarga de resíduos industriais e domésticos. As bactérias foram cultivadas em meio salino basal (MBS) suplementado com SDS (8 mM) e incubado a 25 °C durante 8 semanas com agitação (120 rpm). A pesquisa apresentou 127 isolados bacterianos morfologicamente distintos resistentes ao surfactante, desse total, um conjunto de 77 bactérias foi estudado em quanto a sua caracterização molecular sendo o gênero *Pseudomonas* quem apresentou maior predominância, confirmando a resistência e potencial de degradação desse gênero. Tendo

como referência esse tipo de pesquisas baseadas em que a solução se encontra localizada no lugar do problema, é que nasce a hipótese de que é possível encontrar bactérias com capacidade de degradação de poluentes, isoladas das águas contaminadas com resíduos industriais e domésticos do Igarapé do Quarenta.

Das 19 bactérias utilizadas no presente trabalho, 49% degradaram parcialmente o surfactante, conseguindo diminuir a intensidade até a metade, isso porque provavelmente não apresentam a capacidade enzimática necessária para conseguir realizar a degradação ou as condições trabalhadas não são as ideais para esses tipos de bactéria representando um resultado não favorável na biodegradação de surfactantes em comparação com trabalhos anteriormente citados devido a pouca eficiência no bioprocessamento.

Por outra parte duas bactérias (A-7 e T-25) conseguiram reduzir a intensidade do pico até um 90% do surfactante nos 15 dias de tratamento, o que representa um resultado favorável devido a que essa redução da intensidade indica que a concentração inicial do surfactante (150 mg/L) baixou em 90%. No trabalho de Walczak & Donderski, (2004), células bacterianas isoladas da subcapa de água do Lago Jezeroak Maly (Polônia) que apresentava concentrações de surfactantes até 2.40 mg/L, mostraram capacidade de degradação reduzindo a essa concentração até um 77.48%. Fazendo uma comparação com o presente trabalho, as bactérias A-7 e T-25 mostraram ótimos resultados considerando que a se conseguiu uma melhor degradação (90%) do surfactante trabalhando com concentrações mais altas.

Estas duas bactérias com capacidade de degradar o SDS foram isoladas de fontes diferentes, sendo que a A-7 é proveniente da água e a T-25 do caule da espécie vegetal *Clitoria racemosa*, mas as duas fontes estão localizadas no ponto 1 (Silves) de coleta. Essas duas bactérias demonstraram possuir o conjunto enzimático necessário para realizar a degradação do SDS que segundo Scott & Jones, (2000) as enzimas envolvidas no processo de degradação são a sulfatase básica e a ácido álcool desidrogenase, responsáveis pela liberação do enxofre e da formação do ácido láurico quem será degradado finalmente na  $\beta$  – oxidação. Além de possuir os mecanismos necessários para realizar a degradação, as bactérias conseguiram crescer nas condições oferecidas utilizando o surfactante SDS como única fonte de carbono no meio.

Embora os resultados obtidos nos testes de degradação podem ser considerados bons utilizando as bactérias de forma individual, os dados mais importantes foram encontrados

quando as duas melhores bactérias que conseguiam degradar o SDS (A-7 e T-25) foram juntadas para trabalhar em consorcio.

Scott & Jones (2000), descreve que a completa biodegradação dos surfactantes precisa de um consorcio bacteriano, devido à limitada capacidade metabólica que apresentam os microrganismos individualmente sendo que a biodegradação do lauril alquil sulfato (LAS), um tipo de surfactante aniônico, precisa de pelo menos quatro membros no consorcio, onde três são os responsáveis da degradação e que o sinergismo dos quatro consiga a mineralização do anel aromático.

Concordando com essa afirmação, os resultados da degradação do SDS utilizando as bactérias em consorcio, apresentou resultados bastante melhores que nos encontrados com as bactérias de forma individual, conseguindo degradar o SDS em sua totalidade no dia 9 do tratamento, baixando o tempo de degradação e desaparecendo o surfactante (substancia contaminante) do meio de crescimento.

Amirmozafari *et al.*, (2007) mostrou a degradação de um surfactante aniônico lineal alquilbezeno sulfonato (LABS) pelas bactérias *Pseudomona beteli* e *Acinetobacter johnsoni*, conseguindo degradar até o 97.2% dos níveis originais do surfactante depois de 10 dias de crescimento. Esse tempo de degradação foi parecido com o apresentado quando as bactérias (A-7 e T-25) trabalharam em consorcio, sendo que no presente trabalho o SDS foi degradado em sua totalidade depois de 9 dias de crescimento.

Por tanto, as bactérias com potencial de biodegradação, isoladas do Igarapé do Quarenta apresentaram bons resultados em comparação com outros trabalhos encontrados, conseguindo degradar totalmente o surfactante em um período de tempo aceitável. Muitos outros estudos têm sido desenvolvidos na área de degradação de surfactantes, mas não existe evidencia na literatura em quanto ao isolamento de bactérias endofíticas e do ambiente aquático do Igarapé do Quarenta com potencial de degradação para este tipo de compostos com ampla presença nos corpos aquáticos como são os surfactantes.

## 5. CONCLUSÃO

A biodiversidade bacteriana isolada das duas fontes trabalhadas não apresentou diferença significativa entre cada fonte, mostrando colônias com características macro e microscópicas parecidas.

Os isolados bacterianos foram em sua maioria cocos e bacilos gram negativos apresentando colônias de cores claras, sendo a cor branca a mais encontrada. Foram encontradas colônias com a mesma cor, porém com diferentes formas de crescimento e texturas.

Duas bactérias das 19 testadas apresentaram capacidade acentuada de degradação do surfactante aniônico – SDS, conseguindo reduzir o pico m/z 265 (característico do SDS) do meio de cultura. Conseguiu-se avaliar a degradação por EM/ESI, visualizando a redução do pico (m/z 265) pela ação das bactérias. O uso de um consórcio bacteriano, utilizando as duas bactérias com capacidade de degradar SDS apresentou melhores resultados de degradação, mostrando-se mais eficiente que nos testes realizados em culturas puras.

A aplicação de um consórcio bacteriano conseguiu degradar o SDS em menor tempo. A degradação usando o consórcio bacteriano aconteceu no dia 9 do tratamento, sendo que quando trabalhou-se em culturas puras, a degradação aconteceu no dia 15.

Conseguiu-se realizar com sucesso a PCR da região 16s do rDNA, mas devido a alguns problemas com o sequenciador e falta de tempo não concluiu-se com o sequenciamento. Motivo pelo qual não foram apresentados os resultados na dissertação. As amostras amplificadas na PCR encontram-se congeladas para posteriormente concluir com o sequenciamento.

No presente trabalho, foram encontradas duas bactérias das 19 selecionadas com potencial para biorremediação, sendo um ponto de partida para futuras aplicações em tratamento de efluentes contaminados, trazendo grandes benefícios para a cidade, à economia local, à qualidade de vida das pessoas e ao meio ambiente.

## 6. REFERÊNCIAS

- ADAK, Asok; BANDYOPADHYAY, Manas; PAL, Anjali. Removal of anionic surfactant from wastewater by alumina: A case study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 254, p. 165–171, 2005.
- AISSE, M. M.; SOBRINHO, P. Avaliação Do Sistema Reator Uasb E Filtro Biológico Aerado Submerso Para O Tratamento De Esgoto Sanitário. **Pós-tratamento de Efluentes de Reatores Anaeróbios - Colectânea de Trabalhos Técnicos - Volume II** p. 131–140 , 2001.
- ALMEIDA, J.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Ecletica química** v. 35, n. n. 3, p. p. 17–43 , 2010.
- ALMEIDA, Larissa; SILVA, Janaína. Principais técnicas de biorremediação in situ utilizadas na recuperação de áreas contaminadas por derivados de petróleo. **Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação em Biociências Forenses**, p. p. 1–20, 2006..
- AMIRMOZAFARI, N; MALEKZADEH, F; HOSSEINI, F; et al. Isolation and identification of anionic surfactant degrading bacteria from activated sludge. **Iranian Biomedical Journal**, v. 11, n. April, p. 81–86, 2007.
- ANDREATTI FILHO, R.; LIMA, E. OKAMOTO, A.; SAMPAIO, H. Uso de microbiota cecal congelada com crioprotetores em pintos infectados experimentalmente com. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v. v. 59, n. n. 3, p. 647–653 p. , 2007.
- ARIAPAD, A.; ZANJANCHI, M. a.; ARVAND, M. Efficient removal of anionic surfactant using partial template-containing MCM-41. **Desalination** v. 284, p. 142–149 , 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2011.08.048>>.
- ASQUITH, Elise A; GEARY, Phillip M; NOLAN, Annette L; et al. Comparative Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil by Biostimulation, Bioaugmentation and Surfactant Addition. v. 1, p. 637–650, 2012.
- AYOTAMUNO, J. M.; OKPARANMA, R. N.; ARAKA, P. P. Bioaugmentation and composting of oil-field drill-cuttings containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Journal of Food, Agriculture and Environment** v. 7, n. April, p. 658–664 , 2009.
- AZEVEDO, J. Microrganismos Endofíticos. In: GOIÁS, Universidade Federal de (Org.). **Ecologia Microbiana**. [s.l.: s.n.], 1998.

- BAKIYARAJ, R; BASKARAN, L; CHIDAMBARAM, A L; et al. Original Research Article Bioremediation of Chromium by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. v. 3, n. 9, p. 715–719, 2014.
- BATISTA, R.; MENDONÇA, S. Avaliação de parâmetros físico-químicos das águas do igarapé do quarenta (Manaus - AM). **Universidade Federal do Amazonas, Instituto de ciencias exatas** n. Dissertação de Mestrado, p. 97 p. , 2004.
- BENTO, F.; CAMARGO, F.; OKEKE, B.; et al. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. v. 34(1), p. p. 65–68, 2003..
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology** v. 74, p. p. 63–67 , 2000.
- BRAGADIN M, PERIN G, RACCANELLI S, MANENTE S. The accumulation in lysosomes of the anionic detergent linear alkylbenzene sulfonate. *Environ Toxicol Chem* 1996;15:1749– 52.
- BRITO, N. N. et al. 2004. "Utilização de fungos na remediação de efluentes industriais". In: FÓRUM DE ESTUDOS CONTÁBEIS, 4, Rio Claro. Anais.
- CAMACHO-MUÑOZ, Dolores; MARTÍN, Julia; SANTOS, Juan Luís; et al. Occurrence of surfactants in wastewater: Hourly and seasonal variations in urban and industrial wastewaters from Seville (Southern Spain). *Science of the Total Environment*, v. 468-469, p. 977–984, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.020>>.
- CAROLEI, Luciano. Determinação de surfactantes e água em formulações de sabonetes líquidos e shampoos por infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) utilizando a técnica de reflectância total atenuada (ATR). Universidade de São Paulo, 2005.
- CHIARADIA, Mariza C.; COLLINS, Carol H.; JARDIM, I. C S F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Quimica Nova* v. 31, n. 3, p. 623–636 , 2008.0100-4042.
- CLETO FILHO, S.; WALKER, I. Efeitos da ocupação urbana sobre a acrofauna de invertebrados aquáticos de um igarapé da cidade de Manaus, AM. **Acta Amazonica** v. v. 31(1), p. p. 69–89 , 2001.
- COLLA, L.; COSTA, J. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor, Rio Grande** v. v. 13, p. p. 85–103 , 2003.

- COSTA, A.; NUNES, C.; CORSEUIL, H. Nitrate bioremediation of groundwater impacted with gasoline and ethanol *Biorremediação de águas subterrâneas impactadas por gasolina e etanol com o uso de nitrato. Eng Sanit Ambient*, v. 14, n. 2, p. 265–274, 2009..
- CRAWFORD R. and CRAWFORD D. (1996). *Bioremediation: principles and applications.* (Crawford R. and Crawford D., Ed.) (1st ed., p. 391). British: Cambridge.
- CSERHÁTI, T.; FORGÁCS, E.; OROS, G. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment International* v. 28, p. 337–348 , 2002.0160-4120.
- CUNHA, Cláudia; LEITE, Selma. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. v. 31, p. p. 45–49, 2000.
- CYBULSKI, Zefiryn; DZIURLA, Ewa; KACZOREK, Ewa; et al. The influence of emulsifiers on hydrocarbon biodegradation by pseudomonadacea and bacillacea strains. *Spill Science and Technology Bulletin*, v. 8, n. 5-6, p. 503–507, 2003.
- DATYNER, A. *Surfactants in Textile Processing*; Marcel Dekker; **Surfactant Sciencie Series**, v. 14, New York, 1983.
- DEAN-ROSS, Deborah; MOODY, Joanna; CERNIGLIA, C. E. Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 41, n. 1, p. 1–7, 2002.
- DECEMBRINI F, AZZARO F, CRISAFI E. Distribution of chemical polluting factors in South Italian seas along Calabria waters (low Tyrrhenian sea, high Ionian sea and straits of Messina). *Water Sci Technol* 1995;32:231–8.
- DOIGE, C. a.; YU, X.; SHAROM, F. J. The effects of lipids and detergents on ATPase-active P-glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* v. 1146, p. 65–72 , 1993.
- DOTY, S. L. Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytologist* v. 179, p. 318-333, 2008.
- EICHHORN, Peter; RODRIGUES, Silvana V.; BAUMANN, Wolfram; et al. Incomplete degradation of linear alkylbenzene sulfonate surfactants in Brazilian surface waters and pursuit of their polar metabolites in drinking waters. *Science of the Total Environment*, v. 284, p. 123–134, 2002.
- FARN, R. **Chemistry and Technology of Surfactants**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2006. p. 1–315. 1405126965.
- FENDINGER NJ, BEGLEY WM, MCAVOY DC, ECKHOFF WS. Determination of alkyl sulfate surfactants in natural waters. *Environ Sci Technol* 1992;26:2493– 9.

- FIELD, J a; MILLER, D J; FIELD, T M; et al. Quantitative determination of sulfonated aliphatic and aromatic surfactants in sewage sludge by ion-pair/supercritical fluid extraction and derivatization gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical chemistry**, v. 64, n. 3, p. 3161–3167, 1992.
- FREIRE, R.; KUBOTA, R.; DURÁN, N. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química nova** v. 23, n. 4, p. 504–511 , 2000.
- FREITAS, C.; GIATTI, L. **Sustentabilidade ambiental e de saúde na Amazônia Legal, Brasil: Uma análise através de indicadores**. 1ra Ed. ed. Brasília: [s.n.], 2010. p. 42. 9788579670480.
- GAYLARDE, C.; BELLINASSO, M.; MANFIO, G. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal , South Africa. **Biociência & Desenvolvimento** v. v. 34, p. p. 36–43 , 2005.
- GIATTI, L.; FREITAS, C.; DESMOULIÈRE, S.; et al. Manaus: Uma análise ecossistêmica através de indicadores de sustentabilidade ambiental e de saúde. **ciudades Saudáveis: Saúde, Ambiente e Desenvolvimento**, p. 53 p., 2011.
- GUCCIONE, Alessia; BIONDI, Natascia; SAMPIETRO, Giacomo; et al. Chlorella for protein and biofuels: from strain selection to outdoor cultivation in a Green Wall Panel photobioreactor. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 84, 2014. Disponível em: <<http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/7/1/84>>.
- HADDOCK, B.; JONES, C. Bacterial respiration. **Bacteriological reviews**. [S.l.: s.n.], 1977. 41 v. p. 47–99. 0080325092.
- HARVEY, A; CARR, C M; PEREIRA, A. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) analysis of the application of a cationic conditioner to “clean” hair. **Journal of cosmetic science**, v. 55, n. June, p. 265–279, 2004.
- HENRIQUE, Israel Nunes; LIMA, Alane; SOUTO, De Freitas; et al. Tratamento de esgoto doméstico em regime de recirculação com utilização de reator anaeróbio anóxico seguido de reator aeróbio com meio suporte. **Ciência & Engenharia** (Science & Engineering Journal), v. 23, n. 1, p. 103–113, 2014.
- HOLMBERG, Krister; JONSSON, Bo; KRONBERG, Bengt; et al. **Surfactants And Polymers In Aqueous Solutions**. Second Edi. England: John Wiley & Sons, LTD, 2002.
- IJAH, U. J J. Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil. *Waste Management*, v. 18, n. 5, p. 293–299, 1998.

- JOGDAND, S. N. Environmental biotechnology. 1<sup>st</sup> Edition, Himalaya Publishing House, Bombay, India, 2010.
- KAPLEY, Atya; PUROHIT, Hemant J.; CHHATRE, Suneel; et al. Osmotolerance and hydrocarbon degradation by a genetically engineered microbial consortium. **Bioresource Technology**, v. 67, n. 3, p. 241–245, 1999.
- KARSA, D.R. **Industrial application of surfactants** .Special Publication. Ed. The Royal Society of Chemistry, 1999.P. 0-279.
- KUMAR.A *et al.* Review on Bioremediation of Polluted Environment : A Management Tool. **International journal of environmental sciences** v. 1, n. 6, p. 1079–1093 , 2011.
- KUNZ, A.; ZAMORA, P. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química nova** v. 25, n. 1, p. 78–82 , 2002.
- LAL, B.; KHANNA, S. Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 81, n. 4, p. 355-362, 1996.
- LARA-MARTÍN, Pablo a.; GÓMEZ-PARRA, Abelardo; GONZÁLEZ-MAZO, Eduardo. Simultaneous extraction and determination of anionic surfactants in waters and sediments. **Journal of Chromatography A** v. 1114, p. 205–210 , 2006.0021-9673.
- LEE, Sunggyu; CUTRIGHT, Teresa J. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. U.S. Patent n. 5,427,944, 27 jun. 1995.
- LYNCH, J. M.; MOFFAT, A. J. Bioremediation–prospects for the future application of innovative applied biological research. *Annals of Applied Biology*, v. 146, n. 2, p. 217-221, 2005.
- MAGALHÃES, C. **Impacto Ambiental: Avaliação física e química dos solos da bacia do Igarapé do Quarenta (Manaus-AM)**. Universidade do Amazonas, 1998.
- MANDRI, T; LIN, J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal , South Africa. **African Journal of Biotechnology** v. v. 6 (1), p. p. 23–27 , 2007.
- MARIANO, A. Avaliação do Pontencial de Biorremediação de Solos e de Águas Subterrâneas Contaminados com Óleo Diesel. **Universidade Estadual Paulista, Instituto de Genciencias e Ciências Exatas** n. Tese de Doutorado, p. 147 p. , 2006.
- MILLER, A; VESSECCHI, R; CALLEGARI, J; PEPORINE, N. Espectrometria de Massas com Ionização por “Electrospray”: Processos Químicos Envolvidos na Formação de Íons de Substâncias Orgânicas de Baixo Peso Molecular. **Quim. Nova.** v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006

- MORAES, Maria Carolina B; LAGO, Claudimir Lucio. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Quimica Nova**, v. 26, n. 4, p. 556–563, 2003.
- MOODY, Cheryl a. et al. Determination of Perfluorinated Surfactants in Surface Water Samples by Two Independent Analytical Techniques: Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry and <sup>19</sup>F NMR. *Analytical Chemistry* v. 73, n. 10, p. 2200–2206 , 2001. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac0100648>>.
- MURATOVA, A; HUBNER, T; NARULA, N; TURKOVSKAYA O; KUSCHK P; JAHN R; MERBACH, W. Rhizosphere microflora of plants used for the phytoremediation of bitumen-contaminated soil. **Microbiological Research**, v. 158, p. 151-161. 2003.
- MULLIGAN, C.; YONG, R.; GIBBS, B. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil : a review. **Engineering Geology** v. v. 60, p. p. 371–380 , 2001.
- NISHIKAWA, Mayumi; KATAGI, Munehiro; MIKI, Akihiro; et al. Forensic Toxicological Determination of Surfactant by Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Health Science**, v. 49, n. 2, p. 138–148, 2003.
- NOAA, - NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION. Oil Spills in Mangroves: Planning & response considerations. p. 71 p. , 2010.
- NOGUEIRA, A.C.F.; SANSON, F.; PESSOA, K. A expansão urbana e demográfica da cidade de Manaus e seus impactos ambientais Ana. **XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Florianópolis, Brasil** p. 5427–5434 , 2007.
- OLIVEIRA, António. Isolamento e Caracterização de Bactérias Resistentes a Surfactantes. Universidade de Aveiro, 2010.
- PANIZZA, M.; DELUCCHI, M.; CERISOLA, G. Electrochemical degradation of anionic surfactants. *Journal of applied electrochemistry*, v. 35, n. 4, p. 357-361, 2005.
- PARK, Andrew J.; CHA, Daniel K.; HOLSEN, Thomas M. Enhancing solubilization of sparingly soluble organic compounds by biosurfactants produced by *Nocardia erythropolis*. *Water environment research*, v. 70, n. 3, p. 351-355, 1998.
- PINTO, Antônia; HORBE, Adriana; SILVA, Maria; et al. Efeitos da ação antrópica sobre a hidrogeoquímica do rio Negro na orla de Manaus / AM The human action effects on the hydrogeochemistry of Negro river at the. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 3, p. 627–638, 2009.
- PRATS, D; RUIZ, F; VAZQUEZ, B; et al. Removal of Anionic and Nonionic Surfactants in a Wastewater Treatment Plant With Anaerobic Digestion . a Comparative Study. **Science**, v. 31, n. 8, p. 1925–1930, 1997.

- PROSAMIM – Programa Social e Ambiental dos Igarapés de Manaus. 2004. Relatório.
- RAHMAN, K.; BANAT, I.; THAIRA, J.; et al. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. v. 81, p. p. 25–32, 2002.
- SANTOS, Izaias; HORBE, Adriana; SILVA, Maria; et al. Influência de um aterro sanitário e de efluentes domésticos nas águas superficiais do Rio Tarumã e afluentes - AM. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 2, p. 229–235, 2006.
- SARKAR, Dibyendu; FERGUSON, Michael; DATTA, Rupali; et al. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental pollution** (Barking, Essex: 1987), v. 136, n. 1, p. 187–95, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15809120>>. Acesso em: 27 jan. 2014.
- SCOTT, M. J.; JONES, M. N. The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* v. 1508, p. 235–251, 2000.
- SIKKEMA, J; DE BONT, J a; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological reviews** v. 59, n. 2, p. 201–222, 1995.0146-0749 (Print)r0146-0749 (Linking).
- SILVA, M.; RAMOS, J.; PINTO, A. *Metais de Transição nos Sedimentos de Igarapés de Manaus-AM*. Manaus/AM: Acta Limnologica Brasiliensia, Vol. 11(2)., 1999.
- SILVERSTEIN, R.; BASSLER, G.; MORRILL, T. Spectrometric identification of organic compounds. NY: John Wiley & Sons, 2001.–196 p.
- SINGH, R.; SINGH, P.; SHARMA, R. Microorganism as a tool of bioremediation technology for cleaning environment : A review. v. 4, n. 1, p. 1–6, 2014.
- SOUZA AQL, SOUZA ADL, ASTOLFI-FILHO S, PINHEIRO BM: Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazônica* 2004, 34:185-195.
- SPILBORGHS, M. C. F. Biorremediação de aquífero contaminado com hidrocarboneto. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, 1997.
- SRIVASTAVA, S. Bioremediation Technology: A Greener and Sustainable Approach for Restoration of Environmental Pollution. In: *Applied Environmental Biotechnology: Present Scenario and Future Trends*. Springer India, 2015. p. 1-18.
- SCHWARTZ, A. M.; PERRY, J.W. *Surface Active Agents*; Interscience Publishers; New York, 1949.

- TADROS, T. Applied Surfactants, principles and applications. Ed Wiley-VCH verlag GmbH & Co. 2005. P. 0-631.
- TAFUR, David.; TORRES, Julián.; VILLEGAS, Virginia. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. **Centro Internacional de Investigaciones Médicas, CIDEIM**. Cali, Colombia: [s.n.], 2008. 12 v. p. 217–226.
- VIDALI, M. Bioremediation - An overview. **Pure and Applied Chemistry**., v. 73, n. 7, p. 1163–1172, 2001.
- VIEIRA, F.; BRITO, E.; TEIXEIRA, A. Contaminação dos igarapes urbanos na cidade de Manaus. **VIII Fórum Ambiental da Alta Paulista** v. v. 8, n. n. 2, p. p. 360–372 , 2012.
- WAICHMAN, A. V. 1999. Variações espacial e temporal da comunidade de sulfobactérias em igarapés da cidade de Manaus e sua relação com a qualidade da água e dos sedimentos. Tese de Doutorado. INPA.
- WALCZAK, M.; DONDESKI, W. Decomposition of anionic surface active substances by bacteria from the surface microlayer of Lake Jeziorak Mały. **Polish Journal of Environmental Studies** v. 13, n. 3, p. 325–331 , 2004.1230-1485.
- WEIDEMEIER, T.; SWANSON, M.; WILSON, J.; et al. Approximation of Biodegradation Rate Constants for Monoaromatic Hydrocarbons ( BTEX ) in Ground Water. **U.S.Environmental Protection Agency Papers**, v. n.26, p. p. 186–194, 1996.
- WIKSTROM, P; WIKLUND, A; ANDERSSON, a C; et al. DNA recovery and PCR quantification of catechol 2,3-dioxygenase genes from different soil types. **Journal of biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 107–20, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9084210>>.
- WILSON, K. & WALKER, J. (Ed.). Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. Cambridge University Press, 2010.
- YAKUBU, M. Biological approach to oil spills remediation in the soil. **African Journal of Biotechnology** v. 6, n. 24, p. p. 2735–2739 , 2007.
- ZOLLER U. Groundwater contamination by detergents and polycyclic aromatic hydrocarbons - a global problem of organic contaminants: is the solution locally specific *Water Sci Technol* 1993;27:187– 95.