UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Investigação do potencial genético da microbiota de mananciais do
estado de São Paulo para degradação de diferentes xenobióticos**

Fernanda Maciel de Melo

**Ribeirão Preto
2018**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Investigação do potencial genético da microbiota de mananciais do estado de São Paulo para degradação de diferentes xenobióticos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientado: Fernanda Maciel de Melo

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 09/04/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2018

DE MELO, F.M.	Investigação do potencial genético da microbiota de mananciais do estado de São Paulo para degradação de diferentes xenobióticos		MESTRADO FCFRPUSP 2018
------------------	--	--	------------------------------

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Maciel de Melo, Fernanda

Investigação do potencial genético da microbiota de mananciais do estado de São Paulo para degradação de diferentes xenobióticos. Ribeirão Preto, 2018.

53 p.: il.; 30 cm.

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Stehling, Eliana Guedes.

1. Água. 2. Agrotóxicos. 3. Metais pesados. 4. Hidrocarbonetos. 5. Polietileno.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernanda Maciel de Melo

Investigação do potencial genético da microbiota de mananciais do estado de São Paulo para degradação de diferentes xenobióticos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico esse trabalho aos meus pais e meus avós
pelo amor, dedicação e confiança.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo imenso amor.

À minha família pela confiança e dedicação.

À minha irmã Micheline Maciel de Melo e meus sobrinhos pelo carinho.

Ao amigo Danilo Sanchez, pela amizade e pelo companheirismo nas horas difíceis e nas de muitas risadas.

Aos meus amigos pelo incentivo

À Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling pela orientação e oportunidade de realizar o mestrado.

À equipe do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biorremediação (LAMAB) pela valiosos ensinamentos e apoio técnico que contribuíram para o presente trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e ao Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento desse projeto.

À Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), em especial ao Dr. Eduardo Angelino Savazzi, e à empresa AgroControl pelo fornecimento das amostras de água, indispensáveis para a realização desse trabalho.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

Teu sol não mais se deitará
E tua lua não terá mais declínio
Porque terás constantemente o Senhor por luz
E teus dias de luta estarão acabados.
(Isaías 60, 19-20)

RESUMO

DE MELO, F. M. **Investigação do potencial genético da microbiota de mananciais do estado de São Paulo para degradação de diferentes xenobióticos**. 2018. 53f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Os xenobióticos são potenciais contaminantes dos recursos hídricos, o que interfere no equilíbrio ecológico e na saúde humana. Uma potencial solução para tais problemas ambientais é a introdução da técnica de biorremediação. Para tanto, é necessário investigar genes da comunidade microbiana com potencial genético para degradação e resistência desses contaminantes e, assim, desenvolver biotecnologias para a descontaminação de ambientes poluídos. O presente estudo teve como objetivo extrair o DNA da microbiota total, da microbiota cultivável e dos isolados bacterianos provenientes de amostras de água superficial de mananciais e fontes do estado de São Paulo para investigar e padronizar reações de Multiplex PCR para os genes de degradação e resistência aos diferentes xenobióticos alvo do presente projeto de pesquisa. Os genes pesquisados foram amplamente encontrados no DNA da fração total, sendo os genes *alkB*, *alk* e *merA* os mais prevalentes na fração cultivável, indicando que micro-organismos portadores desses genes podem ser isolados para uso em processos de biorremediação. Os genes *puhA* e *puhB* foram detectados em menor frequência, tanto na fração total, quanto na cultivável, demonstrando pouca dispersão desses genes nas amostras estudadas. Os gêneros bacterianos portadores de genes de degradação isolados em maior frequência nas amostras de água analisadas foram *Bacillus* e *Aeromonas* e os genes mais frequentes nesses isolados foram o *atzA*, o *alk* e o *merA*. Para otimizar a detecção dos genes envolvidos na biodegradação da atrazina, dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, alcanos e resistência ao cobre, duas reações de Multiplex PCR foram padronizadas.

Palavras-chave: água, pesticidas, metais pesados, hidrocarbonetos, polietileno.

ABSTRACT

DE MELO, F. M. Investigation of the genetic potential of the microbiota of water sources from São Paulo State for degradation of different xenobiotics. 2018. 53f. Dissertation (Master). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Xenobiotics are potential contaminants of water resources, which interfere in the ecological balance and human health. A potential solution to such environmental problems is the introduction of the bioremediation. Therefore, it is necessary to investigate genes from the microbial community with degrading and resistance genetic potential to these contaminants and, thus, to develop biotechnologies for the decontamination of polluted environments. The present study aimed to extract DNA from the total microbiota, cultivable microbiota and bacterial isolates from 19 surface water samples from sources of the São Paulo State to investigate and standardize Multiplex PCR reactions for degradation and resistance genes to the different xenobiotics target of the present research project. The studied genes were widely found in the DNA from the total fraction, being the *alkB*, *alk* and *merA* genes the most prevalent in the cultivable fraction, indicating that microorganisms carrying these genes can be isolated for use in bioremediation processes. The *puhA* and *puhB* genes were detected at lower frequency, both in the total and in the cultivable microbiota, showing little dispersion of these genes in the studied samples. *Bacillus* and *Aeromonas* were the most frequent bacterial genera with degradation genes isolated in the analyzed water samples, and the most frequent genes in these isolates were *atzA*, *alk* and *merA*. To optimize the detection of the genes involved in the biodegradation of atrazine, polycyclic aromatic hydrocarbons, alkanes and copper resistance, two reactions of Multiplex PCR were standardized.

Keywords: water, pesticides, heavy metals, hydrocarbons, polyethylene.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Via catabólica de degradação da atrazina.....	5
Figura 2 - Degradação do diuron e formação dos metabólitos DCPMU, DCPU e DCA	6
Figura 3 - Interações entre metais e a célula microbiana	7
Figura 4 - Genes envolvidos no transporte do cobre em bactérias.....	8
Figura 5 - Via de degradação do polietileno	14
Figura 6 - Locais de coleta das amostras de água dos rios outras fontes (córregos e água residual) no mapa brasileiro.	21
Figura 7 - Detecção dos genes de degradação na fração total e cultivável	29
Figura 8 - Identificação dos isolados bacterianos.....	31
Figura 9 - PCR mulitplex para triagem do potencial de degradação em amostras de água. ...	32
Figura 10 - Produtos da amplificação dos genes <i>atzA</i> (200pb), <i>copB</i> (364pb) e <i>alkB</i> (550pb) ...	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação, data da coleta e localização das amostras de água de mananciais e diferentes fontes.....	21
Tabela 2 - Xenobióticos, genes e iniciadores utilizados nas reações de PCR para detecção dos genes catabólicos	24
Tabela 3 - Padronização das reações de Multiplex PCR para amplificação dos genes catabólicos.	26
Tabela 4 - Detecção de genes de degradação e resistência em amostras de DNA total e cultivável e dos isolados obtidos	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
A	Adenina
H ₂ O	Água
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Citosina
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CEW	<i>Cultivable environmental water</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
SDS	Dodecil sulfato de sódio
EW	<i>Environmental water</i>
F	<i>Forward</i>
FUNDHERP	Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto
G	Guanina
Tis	Hidroximetilaminometado
NaOH	Hidróxido de sódio
PAH	<i>Polycyclic aromatic hydrocarbon</i>
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Polietileno
R	<i>Reverse</i>
TAE	Tris Acetado EDTA
T	Timina
TEW	<i>Total environmental water</i>
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
g	Gramma
L	Litro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mL	Mililitro
M	Molar
n°	Número
nm	Nanômetro
®	Marca Registrada
%	Porcento
U	Unidade

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
LISTA DE SÍMBOLOS	vi
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Contaminantes Ambientais	3
1.1.1 Agrotóxicos	3
1.1.1.1 Atrazina	4
1.1.1.2 Diuron	5
1.1.2 Metais Pesados	6
1.1.2.1 Cobre	7
1.1.2.2 Mercúrio	8
1.1.3 Petróleo e seus derivados	9
1.1.3.1 Alcanos	10
1.1.3.2 Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP)	11
1.1.4 Polímeros	12
1.1.4.1 Polietileno (PE)	13
2 RELEVÂNCIA DO ESTUDO	16
3 OBJETIVOS	18
3.1 Objetivos gerais	18
3.2 Objetivos específicos	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Coleta das amostras de água	20
4.2 Localização dos mananciais e fontes de água	20
4.3 Extração do <i>pool</i> de DNA da microbiota total	22
4.4 Extração de DNA da fração cultivável	22
4.5 Obtenção dos isolados bacterianos	22
4.6 Extração de DNA genômico dos isolados bacterianos	22
4.7 Análise da concentração e pureza do DNA	23
4.8 Reações de PCR para detecção dos genes catabólicos	23

4.9 Eletroforese em gel de agarose	23
4.10 Caracterização molecular dos isolados.....	24
4.11 Sequenciamento dos genes amplificados por PCR.....	25
4.12 Multiplex PCR.....	25
5 RESULTADOS	28
5.1 Detecção dos genes catabólicos no pool de DNA da microbiota total e da microbiota cultivável	28
5.2 Isolamento e detecção dos genes catabólicos nos isolados bacterianos	29
5.3 Padronização de reações de Multiplex PCR para triagem do potencial de degradação utilizando amostras de água.....	31
6 DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A industrialização cresceu intensamente nas últimas décadas devido ao desenvolvimento econômico e ao crescimento das atividades antropogênicas, aumentando a quantidade e complexidade de resíduos tóxicos produzidos. O descarte inadequado de resíduos com elevada toxicidade e a sua incorreta manipulação nos diversos ecossistemas naturais ocasionam danos ao ambiente e contaminação da água, que é um recurso indispensável para a sobrevivência humana e de todas as espécies vivas, além de ser um importante insumo para a grande maioria das atividades econômicas. A água exerce uma influência decisiva na qualidade de vida das populações, especialmente no processo de abastecimento, o qual tem forte impacto sobre a saúde pública (BARRETO et al., 2014).

Resíduos industriais e outras substâncias, como hidrocarbonetos de petróleo, pesticidas, plásticos e metais pesados, são alguns dos contaminantes lançados em grande quantidade nos solos, na atmosfera e nos mananciais, os quais, por consequência, tornam-se poluídos (SPEIGHT et al., 2001; MATALLO et al., 2008; MELO et al., 2001; STEFFEN et al., 2011). Tais substâncias são classificadas como xenobióticos, ou seja, compostos que não ocorrem naturalmente em um ambiente. São substâncias com estruturas ou propriedades incomuns para os sistemas enzimáticos existentes e tipicamente são moléculas de difícil degradação (GAYLARDE et al., 2005).

Uma alternativa viável para o tratamento de ambientes contaminados, tais como águas superficiais e subterrâneas, solos e efluentes industriais de aterros ou áreas de contenção é a técnica de biorremediação, um processo no qual organismos vivos, normalmente plantas ou micro-organismos, são utilizados para remover ou reduzir (remediar) poluentes no ambiente (LEE et al., 2011). Embora outras tecnologias que usam processos físicos e/ou químicos sejam também indicadas para descontaminar ambientes poluídos, o processo biológico de biorremediação é uma alternativa ecologicamente mais adequada e eficaz para o tratamento de ambientes contaminados com moléculas orgânicas de difícil degradação, denominadas recalcitrantes, e de metais tóxicos (MANFIO et al., 2005).

As técnicas de biorremediação podem ser aplicadas *in situ*, onde o tratamento é realizado diretamente no local contaminado, permitindo o tratamento de áreas extensas, ou *ex situ*, onde é necessária a escavação e a remoção da região contaminada de seu local de origem (LU et al., 2011).

A escolha da técnica a ser utilizada deve considerar as características do poluente, a composição dos nutrientes do solo, a população microbiana local e a extensão da área afetada.

A técnica de bioestimulação tem como objetivo aumentar o número ou estimular a atividade dos micro-organismos degradadores autóctones de uma determinada região contaminada, através da adição de nutrientes e aceptores de elétrons. Pode-se utilizar também a técnica de bioadição, na qual ocorre a adição de micro-organismos cultivados em laboratório, com o objetivo de transferir a informação genética do micro-organismo degradador para a região afetada. As técnicas podem ser aplicadas isoladamente ou de forma combinada (ALISI et al., 2009).

O monitoramento de populações bacterianas degradadoras de xenobióticos em ambientes contaminados pode ser feito utilizando métodos microbiológicos tradicionais e técnicas moleculares, as quais se baseiam na análise dos ácidos nucleicos de micro-organismos contidos na comunidade microbiana a partir de amostras ambientais (OMORI et al., 2002). A principal vantagem dos métodos de análise molecular é a capacidade de estudar comunidades microbianas sem o crescimento em culturas, preservando o estado metabólico e a composição da comunidade, que não é facilmente cultivada em laboratório, mas pode ser responsável pela maior parte da atividade de biodegradação. A combinação dos métodos microbiológicos clássicos e moleculares fornece uma interpretação mais abrangente da comunidade microbiana do local, facilitando os processos de biorremediação (OMORI et al., 2002).

A possibilidade de amplificação de sequências de DNA microbianas a partir de amostras ambientais permite estudos de natureza variada e análises sobre a diversidade genética de populações. A extração e a purificação de ácidos nucleicos são etapas fundamentais para se obter alta eficiência de amplificação nas técnicas de PCR, no entanto, é necessário a padronização adequada dos protocolos a serem utilizados em todas as fases dos procedimentos (HANDELSMAN J., 2004).

1.1 Contaminantes Ambientais

1.1.1 Agrotóxicos

Os agrotóxicos são substâncias químicas utilizadas para prevenir, destruir, repelir ou inibir seres considerados nocivos às culturas agrícolas (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000). Essas substâncias químicas são essenciais para o setor agrícola uma vez que, sem elas, a demanda por alimentos se tornaria rapidamente maior do que a oferta em razão de perdas

por pragas, sendo sua utilização na agricultura vasta e extensiva (FERMAM & ANTUNES, 2009).

Os agrotóxicos são os compostos mais encontrados em corpos hídricos superficiais e subterrâneos no mundo todo devido ao amplo uso em áreas agrícolas e urbanas. Incluem uma variedade de moléculas com diferentes características que resultam em diferentes graus de persistência ambiental e mobilidade, além de potencial tóxico, carcinogênico, mutagênico e teratogênico (ARMAS, 2006).

Diversas terminologias são usadas genericamente como sinônimo de agrotóxicos, entre elas, defensivos agrícolas, pesticidas e praguicidas. No entanto, agrotóxico é o termo legal, utilizado pela legislação brasileira de agrotóxicos (BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989). Os agrotóxicos podem ser divididos em diferentes grupos, sendo classificados como fungicidas, herbicidas, inseticidas e nematicidas. O uso anual de pesticidas está estimado em 3 bilhões de quilogramas por todo o mundo (GHIMIRE & WOODWARD, 2013) e o glifosato é o herbicida mais utilizado, representando 29% das vendas nacionais, entretanto, outros herbicidas são extensivamente utilizados, entre eles a atrazina e o diuron (ANVISA, 2012).

1.1.1.1 Atrazina

A atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) é classificada como um herbicida seletivo que pertence à família das s-triazinas e é usada para o controle de ervas daninhas de folhas largas, especialmente em culturas de milho, sorgo, soja e cana de açúcar (SENE et al., 2010; WACKETT et al., 2002). A atrazina foi detectada em águas superficiais e subterrâneas em vários países de todo o mundo. A legislação Brasileira estabelece um limite de 2,0 µg. L⁻¹ como concentração máxima permitida para a atrazina em água destinada ao consumo humano (SOUZA, 2011).

A bactéria *Pseudomonas* sp. ADP (de *Atrazine Degrading Pseudomonas*) tem a capacidade de mineralizar a atrazina e é o micro-organismo de referência para esse processo degradativo. A mineralização de atrazina pela *Pseudomonas* sp. ADP envolve a formação de ácido cianúrico e a sua consequente transformação em CO₂ e amônia. A mineralização desse herbicida pela *Pseudomonas* sp. ADP envolve seis etapas codificadas pelos genes *atzA*, *atzB* e *atzC* e pelo operon *atzDEF*. O primeiro gene envolvido na via de degradação (*atzA*) codifica a enzima atrazina clorohidrolase, que remove o cloro da atrazina converte-a em

hidroxiatrazina (Figura 1). Os genes da via de degradação de atrazina estão geralmente presentes em plasmídios (GARCÍA-GONZÁLEZ, et al., 2005; SADOWSKY et al., 1998).

Figura 1 - Via catabólica de degradação da atrazina

1.1.1.2 Diuron

O diuron (3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilureia) é um herbicida pertencente à família das fenilamidas da subclasse das fenilureias. É um herbicida sistêmico de largo espectro utilizado no controle de ervas daninhas nas culturas de café, cana-de-açúcar, algodão e citros (CASTILLO et al., 2006).

A biorremediação é um processo importante para a redução da concentração do diuron no ambiente, bem como outros pesticidas, sendo esse o principal mecanismo de eliminação do diuron no solo (CASTILLO et al., 2006; ROQUE & MELO, 2000). O diuron é biodegradado principalmente sob condições aeróbicas pela N-demetilação do grupo ureia e, posteriormente, ocorre uma hidrólise e produção de três diferentes metabólitos, o 3-(3,4-diclorofenil)-3-metilureia (DCMPU), o 3,4- diclorofenilureia (DCPU) e o 3,4-dicloroanilina (DCA) (GIACOMAZZI & COCHET, 2004) (Figura 2). Os genes *puhA* e *puhB*, responsáveis pela

hidrólise do diuron, codificam as enzimas PuhA e PuhB, as quais foram caracterizadas como pertencentes à superfamília das amidohidrolases (Khurana et al., 2009).

O diuron é considerado um composto tóxico. Estudos sobre a toxicidade desses compostos indicam que o diuron e seus metabólitos podem causar deficiência no desenvolvimento dos peixes, com ocorrência de disfunções reprodutivas, malformações e alterações comportamentais (ZHU, 2013). O diuron é considerado teratogênico quando administrado em doses elevadas (250 mg/kg/dia) e o metabólito 3,4-DCA pode induzir aneuploidias em células de mamíferos por interação com o aparelho mitótico (GIACOMAZZI & COCHET, 2004).

Figura 2 - Degradação do diuron e formação dos metabólitos DCPMU, DCPU e DCA

1.1.2 Metais Pesados

Metais pesados são elementos químicos com densidade igual ou superior a 5 g/cm³. Os metais pesados podem ser classificados de acordo com suas funções fisiológicas em três categorias: (1) Essenciais não tóxicos: Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg); (2) Essenciais, mas nocivos em altas concentrações: Ferro (Fe), Manganês (Mn), Cromo (Cr), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Níquel (Ni), Zinco (Zn); e (3) Tóxicos: Mercúrio (Hg) e Cádmio (Cd) (BECKETT, 1991).

Os metais pesados são considerados uma ameaça ao sistema ecológico devido ao seu impacto negativo sobre diversas formas de vida. Embora alguns metais pesados possam ser elementos essenciais para diversos seres vivos, em concentrações elevadas passam a ser tóxicos. Enquanto que os organismos superiores usualmente sucumbem ao efeito tóxico dos metais, tal efeito não é observado para muitos micro-organismos que possuem uma variabilidade genética que lhes permite contornar o estresse causado por esses elementos (APPANNA et al, 1996, VALDMAN et al, 2001).

Os micro-organismos não podem degradar ou eliminar elementos inorgânicos, no entanto, podem imobilizar esses compostos, sendo essa a única forma de proteger o ambiente. Micro-organismos, diante da superexposição aos metais tóxicos, selecionam e mantêm linhagens capazes de tolerar seus efeitos danosos. Esses mecanismos de resistência têm sido identificados em bactérias e fungos, os quais possuem a capacidade de imobilizar metais pesados ou produzir proteínas quelantes de metais, sendo seletivos para certos tipos de metais. Esses micro-organismos produzem compostos que influenciam na solubilidade ou realizam reações de oxido-redução de metais (VALLS & LORENZO, 2002). Os diferentes tipos de interação podem ser observados na figura 3.

Figura 3 - Interações entre metais e a célula microbiana

1.1.2.1 Cobre

Níveis excessivos de cobre são tóxicos aos micro-organismos, porém eles desenvolveram mecanismos de resistência para sobreviver nesses ambientes (ANDREAZZA et al., 2003). O principal mecanismo de resistência é conferido por quatro genes localizados no operon *cop*, o qual é regulado pela quantidade de cobre na célula. O gene *copA* é responsável por captar o cobre, quando este se encontra em baixa concentração, e o transporta para o citoplasma, enquanto o gene *copB* retira o cobre de dentro das células quando este se encontra em alta concentração. Os genes *copY* e *copZ* exercem um papel de proteção, sendo

responsáveis pela regulação da concentração de cobre dentro da célula. O gene *copY* reprime as ATPases *copA* e *copB*, diminuindo o transporte deste elemento para dentro do citoplasma, evitando a morte da célula (SOLIOZ & STOYANOV, 2003) (Figura 4).

Figura 4 - Genes envolvidos no transporte do cobre em bactérias

1.1.2.2 Mercúrio

Mercúrio (Hg) é um metal de ocorrência natural que existe em três formas químicas: orgânica, inorgânica e elementar (CLARKSON & MAGOS, 2006), contudo, é considerado um metal pesado extremamente tóxico (EBINGHAUS et al., 2002).

Na atmosfera, o mercúrio existe principalmente na forma inorgânica em dois estados de oxidação, Hg^0 e Hg^{2+} . O mercúrio elementar gasoso (Hg^0) é relativamente inerte às reações químicas com outros constituintes atmosféricos, portanto, uma vez liberado para a atmosfera, ele pode ser disperso e transportado por longas distâncias antes de ser depositado em ecossistemas terrestres e aquáticos. O Hg^{2+} , por outro lado, pode ser encontrado tanto na fase gasosa quanto na fase particulada ligada aos aerossóis. Comparado ao Hg^0 , o Hg^{2+} tem um tempo de vida muito mais curto na atmosfera, de vários dias a algumas semanas (LINDQVIST et al., 1991).

O mercúrio é reconhecido como um dos principais problemas ambientais globais. Sua alta toxicidade causa vários efeitos adversos na saúde humana, animal e no meio ambiente. Além disso, sua capacidade de bioacumulação ao longo dos níveis tróficos da cadeia alimentar concentra o mercúrio principalmente em animais marinhos e,

consequentemente, em humanos (BIDONE et al., 1997). O metilmercúrio (MeHg), que é mais tóxico que Hg^{2+} ou Hg^0 , é a forma mais comum em redes aquáticas alimentares (MERGLER et al., 2007) e pode causar toxicidade para humanos e animais que consomem peixes contaminados (ROMAN et al., 2011).

Os genes de resistência bacteriana ao mercúrio (genes *mer*) são fatores importantes no ciclo biogeoquímico desse metal. Esse operon catalisa a conversão de Hg^{2+} em Hg^0 (BHRIAIN & FOSTER, 1986) e todos os operons *mer* contêm um gene que codifica a redutase MerA, que converte Hg^{2+} em Hg^0 , conferindo assim resistência (BARKAY et al., 2003). Alguns operons *mer*, chamados operons *mer* de amplo espectro, contêm um gene adicional que codifica MerB, uma alquilmercúrio liasa (AML), que degrada MeHg para Hg^{2+} e metano (SCHAEFER et al., 2004).

1.1.3 Petróleo e seus derivados

O petróleo é uma das principais fontes de energia utilizadas pela humanidade e seus derivados são a matéria-prima para a manufatura de inúmeros bens de consumo. O petróleo é um composto orgânico, oleoso, inflamável, menos denso que a água, com odor característico e de cor variando entre o negro e o castanho escuro.

É constituído em sua maior parte por uma mistura complexa de hidrocarbonetos, sendo os alcanos e os hidrocarbonetos aromáticos os principais poluentes associados ao petróleo, os quais representam aproximadamente 80% do total de hidrocarbonetos do petróleo em óleos brutos. Pequenas quantidades de compostos orgânicos contendo enxofre, nitrogênio e oxigênio, e também baixas concentrações de compostos organometálicos, principalmente níquel e vanádio, também fazem parte da composição do petróleo. Sua composição química e suas propriedades físicas e biológicas variam de acordo com a sua origem (TONINI et al., 2010).

As atividades de extração, transporte e refinamento de petróleo têm contribuído para a contaminação do ambiente com esse composto e seus derivados em todo o mundo, que mesmo em pequenas concentrações podem constituir um grande perigo à saúde humana e ao meio ambiente (DEON et al., 2012).

A susceptibilidade desses compostos à biodegradação varia de acordo com a natureza química dos compostos, devido à complexidade da mistura de hidrocarbonetos, e também devido à concentração do poluente e às condições ambientais. Aproximadamente 60% a 90% dos componentes do petróleo é biodegradável, entretanto, o restante (de 10% a 40%), em

estado bruto ou refinado, é recalcitrante. Por esse motivo, o tratamento de áreas contaminadas por essas substâncias é bastante difícil e problemático (CRAPEZ et al., 2002).

O estudo realizado por Zobell (1946) apresentou pela primeira vez a capacidade de certos micro-organismos em utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono. Bactérias capazes de quebrar cadeias de hidrocarbonetos são chamadas de bactérias hidrocarbonoclásticas. Já foram isolados diversos gêneros e espécies com essa capacidade e a grande maioria das bactérias foi isolada de ambientes aquáticos. Estes micro-organismos têm a capacidade de metabolizar essas substâncias orgânicas quebrando parte da molécula em compostos mais simples e intermediários de outras vias via metabólicas, utilizando o carbono como fonte de energia (LIMA et al., 2015). Os processos metabólicos necessários à degradação dos hidrocarbonetos levam à formação de consórcios microbianos de diferentes gêneros e espécies, cada um especializado em degradar uma ou várias frações do petróleo, visto que nenhum micro-organismo é capaz de degradar sozinho todos os compostos (JACQUES et al., 2007).

Os genes *alkB* e *nah* codificam as enzimas alcano monooxigenases, também conhecidas como alcano hidroxilases, e naftaleno dioxigenases. Essas enzimas promovem a primeira etapa do metabolismo de alcanos e HAPs, respectivamente (BEILEN & FUNHOFF, 2007; ZHANG et al., 2013).

1.1.3.1 Alcanos

Os alcanos possuem cadeias de carbono com C8 ~ C40 e são tóxicos para plantas e/ou invertebrados do solo, além de representar um risco para humanos e animais selvagens. Os alcanos alifáticos são produzidos por processos geoquímicos como consequência da deterioração de material vegetal e pelas atividades envolvendo extração, transporte ou processamento de petróleo, que levam à liberação extensiva de alcanos no meio ambiente. Assim, a maioria das bactérias terrestres ou aquáticas desenvolvem sistemas para sobreviver na presença dos alcanos (VAN BEILEN & FUNHOLFF, 2007).

As bactérias que utilizam os alcanos geralmente possuem o sistema enzimático Alk, envolvido na via metabólica para a degradação de alcanos. O sistema enzimático Alk compreende a AlkB monooxigenase, codificada pelo gene *alkB*, o qual é responsável pelo passo de ativação inicial do metabolismo de hidrocarbonetos alifáticos aeróbicos, e dois cofatores denominados rubredoxina (AlkF) e rubredoxina redutase (AlcG), os quais são

responsáveis pela transferência dos elétrons envolvidos na hidroxilação dos alceno por AlkB (VAN BEILEN & FUNHOLFF, 2007).

1.1.3.2 Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP)

A família dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) é caracterizada pela presença de dois ou mais anéis aromáticos condensados. Quanto maior o número de anéis, maior estabilidade química e hidrofobicidade terá a molécula de HAP, tornando-a menos susceptível à biodegradação e, conseqüentemente, aumentando a sua persistência no ambiente (YU & CHU, 2005). HAPs contendo até seis anéis aromáticos fundidos são frequentemente conhecidos como "HAPs" pequenos, e aqueles que contêm mais de seis anéis aromáticos são chamados de HAPs "grandes". Os HAPs mais simples, conforme definido pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC, 2010), são o naftaleno e o antraceno, os quais são constituídos por dois e três anéis aromáticos condensados, respectivamente (CCME, 2010).

As fontes comuns de HAPs no ambiente incluem tanto aquelas naturais quanto antropogênicas. As fontes naturais são incêndios florestais e de pastagens, infiltrações de óleo, erupções vulcânicas e exudatos de árvores. As fontes antropogênicas de HAPs incluem a queima de combustível fóssil, alcatrão de carvão, lixo, óleos lubrificantes, filtros de óleo, incineração de resíduos sólidos municipais e vazamentos de petróleo (KAUSHIK & HARITASH, 2006).

Os HAPs são poluentes muito importantes devido às suas propriedades cancerígenas, mutagênicas, tóxicas e também devido à sua natureza persistente (MANOLI & SAMARA, 1999). A carcinogenicidade dos HAPs aumenta com o aumento do peso molecular (IARC, 2010). A exposição humana aos HAPs é associada a um risco aumentado de desenvolver câncer numa variedade de órgãos, como pulmão, bexiga, estômago, pele, laringe, mama, esôfago, próstata, rim e pâncreas. Além disso, eles são conhecidos por suprimir o sistema imunológico e são considerados disruptores endócrinos (SIDDENS et al., 2012).

Os PAHs aderem a colóides presentes na matéria orgânica do solo, o que pode resultar em uma diminuição da biodisponibilidade para os micro-organismos degradantes de PAHs e um aumento na recalcitrância desses compostos (CARRERAS et al., 2013; BALACHANDRAN et al., 2012).

A degradação bacteriana do naftaleno foi bem caracterizada pelo sistema enzimático catabólico codificado pelo plasmídeo NAH7 em *Pseudomonas putida* G7 (SIMON et al.,

1993; GOYAL & ZYLSTRA, 1996). No plasmídio NAH7, os genes catabólicos da naftalina (*nah*) são organizados em dois operons: o operon *nal*, contendo os genes codificadores das enzimas envolvidas na conversão de naftaleno em salicilato, e o operon *sal*, contendo os genes codificadores das enzimas envolvidas na conversão de salicilato em piruvato e acetaldeído (SIMON et al., 1993). Os operons são regulados positivamente por um regulador comum NahR e por um regulador transcricional positivo LysR, os quais são amplamente dispersos em bactérias. O NahR é induzido na presença de salicilato, levando à expressão de altos níveis dos genes *nah* em bactérias (YEN & GUNSALUS, 1985).

1.1.4 Polímeros

Os plásticos são originados a partir de resinas derivadas do petróleo e pertencem ao grupo dos polímeros, que são longas cadeias moleculares. São formados por unidades químicas unidas por ligações covalentes que se repetem ao longo da cadeia (SPINACÉ & PAOLI, 2005). A classificação dos polímeros pode ser feita de acordo com diferentes critérios, entre eles, ocorrência, estrutura molecular, natureza da cadeia, tipo de monômeros constituintes, disposição espacial dos monômeros, comportamento mecânico, tipo de reação que os origina e morfologia (ALVES, 2005).

Quanto à ocorrência, os polímeros podem ser classificados em naturais e sintéticos. Os naturais são aqueles encontrados normalmente na natureza e os sintéticos são aqueles obtidos industrialmente e podem ser classificados como termoplásticos e termorrígidos. Os termoplásticos são mais “moles” e não sofrem alteração em sua estrutura química após o aquecimento. Os principais tipos de polímeros termoplásticos são o polipropileno (embalagens de massas e biscoitos), polietileno de alta densidade (embalagens de detergentes), polietileno de baixa densidade (sacolas de mercado), polietileno tereftalato (garrafas PET), poliestireno (potes de iogurte), policloreto de vinila (embalagens de água mineral), entre outros (ALBUQUERQUE et al., 2015).

A produção dos polímeros vem crescendo amplamente nas últimas décadas, sendo produzidos mais de 100 milhões de toneladas por ano devido às suas propriedades de aplicabilidade, durabilidade e resistência. Entretanto, apesar do benefício econômico que o uso desse material representa, seu descarte incorreto e a sua persistência no meio ambiente constituem um sério problema de poluição, pois os produtos produzidos com esses materiais são considerados inertes ao ataque imediato de micro-organismos (ALBUQUERQUE et al., 2015).

Alguns micro-organismos secretam enzimas que iniciam a quebra dos polímeros, sendo denominadas despolimerases intracelulares e extracelulares. As exoenzimas dos micro-organismos quebram os polímeros complexos originando cadeias curtas ou monômeros, pequenos o suficiente para permear as paredes celulares e serem utilizados como fontes de carbono e de energia. O processo é conhecido como despolimerização (Dey et al., 2012).

1.1.4.1 Polietileno (PE)

O polímero mais comum dentre os plásticos é o polietileno, feito de monômeros de etileno ($\text{CH}_2=\text{CH}_2$). O primeiro polietileno foi produzido em 1934 e atualmente ele é denominado polietileno de baixa densidade (PEBD) devido à sua capacidade para flutuar em uma mistura de álcool e água. As fibras do PEBD são entrelaçadas e organizadas imprecisamente tornando-o macio e flexível. Atualmente ele é utilizado em embalagens, garrafas, luvas descartáveis e sacos de lixo.

O PE é parcialmente cristalino, com alta durabilidade e resistência. Em condições normais não são tóxicos e podem ser usados em contato com produtos alimentícios e farmacêuticos. Devido à baixa biodegradabilidade, insolubilidade em água, ausência de grupos funcionais e alto peso molecular, estes compostos podem persistir no ambiente durante décadas, contribuindo para a poluição ambiental (USHA et al., 2011).

Alguns micro-organismos já foram estudados e relatados por possuírem capacidade para degradar o PE. Enzimas específicas para a degradação desse composto são produzidas e excretadas para o meio, disponibilizando os monômeros, que por sua vez podem atuar como fonte de carbono para o crescimento do micro-organismo. Os principais produtos da degradação biológica de polímeros são, na maioria das vezes, biomassa microbiana, água e dióxido de carbono (RAZIYAFATHIMA et al., 2016).

Este processo resulta na alteração das propriedades do PE, como cristalinidade, hidrofobicidade/hidrofilicidade, topografia da superfície, distribuição de massa molar e propriedades mecânicas. A biodegradação pode ocorrer na presença de culturas puras de micro-organismos ou pela formação de consórcios microbianos (GAJENDIRAN et al., 2016). As principais espécies bacterianas envolvidas nessa degradação são: *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus sphaericus*, *Brevibacillus parabrevis*, *Pseudomonas citronellolis*, *Rhodococcus ruber* e *Staphylococcus epidermis*.

RELEVÂNCIA DO ESTUDO

2 RELEVÂNCIA DO ESTUDO

A poluição ambiental tem se tornado cada vez mais crítica e comum devido ao aumento da atividade industrial e do crescimento populacional, os quais estão causando sérios impactos ambientais por contaminação do solo, dos oceanos, das águas superficiais e subterrâneas. Portanto, as técnicas para remediação do ambiente têm recebido destaque nas últimas décadas.

A degradação de diferentes xenobióticos por micro-organismos, assim como a pressão seletiva exercida pela presença dos contaminantes ambientais, determinam a aquisição dos genes de degradação e de resistência a esses compostos. Logo, verifica-se a importância de pesquisar bactérias com potencial de degradação para diferentes xenobióticos. Além disso, houve também uma intensificação nas pesquisas biotecnológicas para a obtenção de processos e recursos ambientalmente favoráveis, em substituição aos processos químicos.

Estudos mostram que o meio ambiente reage a cada intervenção antropogênica e mostra a atuação de micro-organismos na busca da autopreservação, degradando os poluentes e utilizando-os como fonte de nutrientes. Portanto, o uso de micro-organismos com potencial de biodegradação é uma ferramenta importante para a biorremediação e a pesquisa dos genes que estão envolvidos na degradação de diferentes xenobióticos é parte primordial para essa técnica, os quais atuariam como biomarcadores.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O presente projeto de pesquisa teve como objetivo determinar o potencial genético de degradação da microbiota presente em mananciais e fontes de água do estado de São Paulo para diferentes xenobióticos, analisando se existem variações nas frações cultiváveis e não cultiváveis dessa microbiota. Além disso, o estudo teve como objetivo identificar os principais gêneros bacterianos cultiváveis portadores desses genes de degradação.

3.2 Objetivos específicos

- Extrair o *pool* de DNA da microbiota total, da fração cultivável e dos isolados bacterianos de diferentes amostras de água de mananciais do estado de São Paulo.
- Pesquisar genes de degradação de alguns xenobióticos (herbicidas, hidrocarbonetos e polietileno) e também de resistência a metais pesados no *pool* de DNA das amostras obtidas da fração total, da fração cultivável e nos isolados bacterianos obtidos.
- Identificar os principais isolados bacterianas obtidos da fração cultivável que são portadoras dos genes de degradação.
- Padronizar reações de Multiplex PCR para triagem dos diferentes genes catabólicos pesquisados.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das amostras de água

Para a realização do presente estudo, foram coletadas 19 amostras de água superficial de diferentes cidades do estado de São Paulo. Entre essas amostras, 16 foram coletadas de mananciais e fornecidas pela CETESB. Três amostras foram coletadas de outras fontes de água (córregos e água residual) e fornecidas pela empresa AgroControl.

Para a escolha das amostras de águas superficiais de mananciais, foram analisados os diferentes índices de qualidades das águas disponibilizados pela CETESB no ano anterior e aqueles pontos que tiveram maior grau de poluição foram escolhidos. As amostras de água superficial de outras fontes não foram escolhidas previamente e foram coletadas pela empresa AgroControl de locais potencialmente contaminadas com resíduos de café, tinta e petróleo.

A CETESB e a empresa AgroControl coletaram e forneceram 2 litros de água de cada ponto. Os frascos para coleta foram esterilizados previamente sem adição de conservantes e posteriormente acondicionados em caixas térmicas. A coleta da água seguiu o protocolo do manual de procedimentos disponibilizado pela CETESB.

4.2 Localização dos mananciais e fontes de água

Um total de 16 amostras de água de mananciais foram coletadas de oito localizações diferentes (amostras 1-8) (Figura 6), sendo que, para cada localização, foram coletadas duas amostras em épocas diferentes do ano, entre o período de outubro de 2015 a abril de 2016. As três amostras de água fornecidas pela empresa AgroControl (amostras 9-11) (Figura 6) foram coletadas como amostras únicas em três fontes diferentes, entre os períodos de fevereiro a abril de 2016 (Tabela 1).

As amostras de água de mananciais provenientes da mesma localização foram identificadas com números iguais e letras diferentes (A e B), enquanto as amostras de água de outras fontes foram identificadas apenas com números. A tabela 1 apresenta os nomes das amostras, a data da coleta e a localização das diferentes amostras.

Os dados de pH, oxigênio dissolvido e turbidez são fornecidos pela CETESB no endereço eletrônico <http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-e-relatorios/>.

Tabela 1 - Identificação, data da coleta e localização das amostras de água de mananciais e diferentes fontes

Amostra	Data da coleta	Manancial/ Cidade	Latitude	Longitude
1.A	27/10/2015	Rio do Carmo/Ituverava	20 16 47	47 47 49
1.B	08/12/2015			
2.A	26/10/2015	Rio Ribeirão dos Bagres/ Franca	20 33 18	47 24 50
2.B	07/12/2015			
3.A	14/10/2015	Córrego Ponte da SP-255/Ribeirão Preto	21 16 34	47 48 09
3.B	02/12/2015			
4.A	13/10/2015	Córrego/Sertãozinho	21 05 19	48 02 40
4.B	01/12/2015			
5.A	28/10/2015	Rio Pitangueiras/ Pitangueiras	20 33 39	48 27 27
5.B	08/12/2015			
6.A	10/11/2015	Rio Preto/São José do Rio Preto	20 37 40	49 21 18
6.B	01/03/2016			
7.A	12/11/2015	Rio Ribeirão da Onça /Palmares Paulista	21 04 41	48 47 31
7.B	03/03/2016			
8.A	12/11/2015	Rio Ribeirão São Domingos/ Catiguá	21 03 02	49 03 49
8.B	03/03/2016			
9	22/02/2016	Rio Monjolinho/São Carlos	-	-
10	15/03/2016	Água Residual de Lavagem de Café / Espírito Santo do Pinhal	-	-
11	04/04/2016	Córrego Av. Caramuru/ Ribeirão Preto	-	-

Figura 6 - Locais de coleta das amostras de água dos rios outras fontes (córregos e água residual) no mapa brasileiro.

1: Ituverava; 2: Franca; 3: Ribeirão Preto; 4: Sertãozinho; 5: Pitangueiras; 6: São José do Rio Preto; 7: Palmares Paulista; 8: Catiguá; 9: São Carlos; 10: Espírito Santo do Pinhal; 11: Ribeirão Preto.

4.3 Extração do *pool* de DNA da microbiota total

Para obter uma maior concentração do *pool* de DNA da microbiota total da água foi realizada a filtração de 300 mL de água em membranas de celulose com 0,22 µm x 25 mm de diâmetro (MLLIPORE ®), adaptadas a um filtro a vácuo. Posteriormente, essas membranas foram transferidas para um tubo com pérolas e foi realizada a extração do DNA genômico utilizando o *Kit* PowerWater DNA Isolation (MO-BIO ®) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.4 Extração de DNA da fração cultivável

Para a extração de DNA da microbiota da fração cultivável, 1 mL de cada amostra de água foi adicionada a 5mL de meio líquido LB (Luria Bertani) em tubo, e este incubado a temperatura de 37°C por 24 horas, sob agitação a 130 rpm. Após este período, uma alíquota de 1,5 mL do crescimento bacteriano foi usada para a extração de DNA utilizando o *Kit* QIAamp DNA Mini (QIAGEN ®), conforme as instruções do fabricante.

4.5 Obtenção dos isolados bacterianos

Para o isolamento bacteriano a partir das amostras de água superficial, 1 mL de cada amostra coletada foi adicionado a 5mL de meio líquido Luria-Bertani (LB) (Oxoid, Reino Unido) em tubo, e estes incubados a temperatura de 37°C por 24 horas, sob agitação a 130 rpm. Após este período, uma alíquota de 50 µL do crescimento bacteriano foi inoculada nos meios de cultura Ágar Mueller-Hinton (MH) (Oxoid, Reino Unido) e Ágar MacConkey (MC) (Oxoid, Reino Unido) e estes foram incubados à temperatura de 35 °C por 24 horas.

As colônias bacterianas que apresentaram características morfológicas diferentes foram isoladas nos meios de cultura MH e MC. Os isolados bacterianos foram transferidos para meio líquido Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid, Reino Unido) com 15% de glicerol e mantidos a -20 °C e -80 °C.

4.6 Extração de DNA genômico dos isolados bacterianos

Para a extração de DNA genômico dos isolados bacterianos foi utilizado o *Kit* QIAamp DNA Mini (QIAGEN ®), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.7 Análise da concentração e pureza do DNA

Após as extrações do DNA gênomico obtido do *pool* de DNA da microbiota total, do DNA da fração cultivável e do DNA de cada isolado bacteriano, a concentração e a pureza do DNA foram determinadas no espectrofotômetro DS-11 (DeNovix, USA) utilizando os comprimentos de onda de 260 e 280 nm. As extrações com razão entre 1,6 e 1,9 foram consideradas de boa qualidade devido ao baixo nível de impurezas.

4.8 Reações de PCR para detecção dos genes catabólicos

As reações de PCR para detecção dos genes *atzA*, *puhA*, *puhB*, *copA*, *copB*, *merA*, *alkB*, *nah* e *alk* foram realizadas com o DNA obtido das extrações das amostras de água do *pool* da microbiota total, da fração cultivável e dos isolados bacterianos.

Cada reação de PCR foi realizada com um volume final de 50 μL , sendo composta de 31,1 μL de água deionizada esterilizada, 5 μL de tampão, 3,5 μL de MgCl_2 (25 mM), 1 μL de solução contendo 10 mmol.L^{-1} de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2 μL (25 pmol) de cada iniciador, 5 μL de DNA genômico (100ng) e 0,4 μL (1,25 U) da enzima JumpStart™ Taq DNA Polymerase (Sigma Aldrich). Foi utilizado ainda um controle negativo, livre de DNA.

As condições dos ciclos de amplificação foram: uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, composta por 30 ciclos, com uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos. A reação de amplificação foi realizada no termociclador ProFlex™ PCR system (Life Technologies ®). A Tabela 2 apresenta os xenobióticos, os genes pesquisados, as sequências dos iniciadores, o tamanho dos fragmentos e a referência utilizada.

4.9 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados nas reações de PCR foram visualizados em eletroforese de gel de agarose (1%) horizontal com TAE 1X (solução estoque 50X – Tris 2 mol.L^{-1} , ácido acético 1 mol.L^{-1} e EDTA 0,5 mol.L^{-1} pH 8,0), e o mesmo tampão foi utilizado para as corridas eletroforéticas. Ao término da corrida, as bandas foram visualizadas após coloração em brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) no transluminador E Gel Imager (Life Technologies, Israel ®).

Tabela 2 - Xenobióticos, genes e iniciadores utilizados nas reações de PCR para detecção dos genes catabólicos

Xenobiótico	Gene	Iniciadores (5' - 3')	Fragmento (pb)	Ta (°C)	Referência
Atrazina	<i>atzA</i>	F:ACGGGCGTCAATTCTATGAC R:CACCCACCTCACCATAGACC	200	58	DEVERS et al., 2007
Diuron	<i>puhA</i>	F:ACCGTGTTTCGACACGTACAA R:GCCCCGATGAAGTGGAAATC	156	58	PESCE et al., 2013
Diuron	<i>puhB</i>	F: CGGACGTTTCGTAGACCGTAT R: CGCGATCTTGAGCATGTCTAC	158	58	PESCE et al., 2013.
Cobre	<i>copA</i>	F: CGGTCTCTACGAATACCGCTTCAA R:GAAATAGCTCATTGCCGAGGCGTT	475	59	BOUSKILL et al., 2007
Cobre	<i>copB</i>	F:TTCCTGCTCGACCAGTTGGAATAC R:GGTTGGTCAACAGGATGTCGTACT	364	58	BOUSKILL et al., 2007
Mercúrio	<i>merA</i>	F:GTGCCGTCCAAGATCATGAT R:TAGCCYACRGTSGCSACYTG	932	58	DEREDJIAN et al., 2011
Alcano	<i>alkB</i>	F: AAYACIGCICAYGARCTIGGICAYAA R: GCRTGRTGRTCIGARTGICGYTG	550	57	YANG et al., 2015
PAH	<i>nah</i>	F: CAAAARCACTGATTYATGG R:ABRCGRGSGACTTCTTTCAA	377	60	BALDWIN et al., 2003
Polietileno	<i>alk</i>	F: TCGAGCACATCCGCGGCCACCA R: CCGTAGTGCTCGACGTAGTT	330	57	KOHNO et al., 2002

Ta: Temperatura de anelamento

4.10 Caracterização molecular dos isolados

Os isolados bacterianos obtidos foram identificados molecularmente através da amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA, utilizando os iniciadores fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rp2 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') para amplificação de um fragmento de 1495 pb, conforme metodologia descrita por Weisburg et al. (1991). Para cada reação de PCR foram utilizados 29,5 µL de água deionizada esterilizada, 5 µL do tampão PCR *buffer minus* Mg-10X, 3,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL de solução contendo 10 mmol.L⁻¹ de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2 µL de cada *primer* (25 µM) (*forward* e *reverse*), 5 µL de DNA genômico (100 ng) e 2 µL (1,25 U) da enzima Taq DNA Polimerase (JumpStart™ Taq DNA Polimerase, Sigma Aldrich), obtendo um volume final de 50 µL. As condições utilizadas foram: 3 minutos a 94°C para desnaturação inicial, um total de 30 ciclos: 1 minuto a 94°C para desnaturação; 1 minuto a 57°C para anelamento; 2 minutos a 72°C para extensão e 5 minutos a 72°C para extensão final. A técnica de PCR foi realizada no termociclador ProFlex™ PCR System (Applied Biosystems, Cingapura).

4.11 Sequenciamento dos genes amplificados por PCR

O sequenciamento de alguns genes catabólicos dos xenobióticos em estudo foi realizado para confirmar a identidade genética com outros genes depositados no GenBank. Para tal, os produtos amplificados obtidos foram purificados utilizando o kit Illustra™ GFX™ PCR (GE Health Care ®, Reino Unido) para, posteriormente, serem sequenciados.

As reações de sequenciamento foram realizadas no Núcleo de Serviços em Biotecnologia (NSB) da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP/HC/FMRP/USP) (<http://lgmb.fmrp.usp.br/nsb/>), no sequenciador ABI 3130 GeneticAnalyser (AppliedBiosystems ®, EUA). As sequências obtidas foram analisadas no site NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) através da ferramenta BLAST, para pesquisa da identidade com sequências disponíveis no GenBank.

4.12 Multiplex PCR

A padronização da reação de Multiplex PCR foi realizada utilizando três diferentes combinações para a amplificação dos genes catabólicos (Tabela 3).

As reações foram realizadas com um volume final de 50 µL, sendo composta de 24,5 µL de água deionizada esterilizada, 6 µL de tampão, 7 µL de MgCl₂ (25 mM), 2 µL de solução contendo 10 mmol.L⁻¹ de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1 µL (25 pmol) de cada iniciador, 100 ng de DNA de cada amostra e 0,5 µL (1,25 U) da enzima JumpStart™ Taq DNA Polymerase (Sigma Aldrich). Como controle negativo foi utilizado água livre de DNA.

As condições dos ciclos de amplificação foram: uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, composta por 35 ciclos, com uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador ProFlex™ PCR system (Life Technologies ®). (Tabela3).

Tabela 3 - Padronização das reações de Multiplex PCR para amplificação dos genes catabólicos.

Reações	Genes/ PM (pb)	Temperatura de anelamento (°C)
1	<i>merA</i> (932pb), <i>alk</i> (330pb) e <i>atzA</i> (200pb)	59
2	<i>nah</i> (377pb) e <i>atzA</i> (200pb)	59
3	<i>atzA</i> (200pb), <i>copB</i> (364pb) e <i>alkB</i> (550pb)	62

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Detecção dos genes catabólicos no pool de DNA da microbiota total e da microbiota cultivável

A tabela 4 apresenta o resultado da pesquisa de nove genes envolvidos na biodegradação dos seguintes compostos: alcanos (*alkB*), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (*nah*), atrazina (*atzA*), diuron (*puhA* e *puhB*), polietileno (*alk*), cobre (*copA* e *copB*) e mercúrio (*merA*). Esses genes foram pesquisados nas amostras do *pool* de DNA da microbiota total e da microbiota cultivável de amostras de água de onze diferentes locais, incluindo rios, córregos e água residual, todos localizados no estado de São Paulo (Figura 6). Para os pontos 1 a 8 foram coletadas duas amostras de água em épocas diferentes do ano, designadas de A e B (Tabelas 1 e 3) e para os pontos 9 a 11 foi feita uma única coleta.

Os resultados obtidos com o *pool* de DNA da microbiota total mostram uma maior prevalência na detecção dos genes *alkB* (15), *nah* (11), *atzA* (12), *alk* (15), *copA* (10), *copB* (12) e *merA* (15), entretanto, apenas uma amostra (6B) apresentou o gene *puhA*, relacionado à degradação do herbicida diuron e nenhuma amostra apresentou o gene *puhB* (Tabela 4). As amostras coletadas dos mananciais (1-8) apresentaram o maior número de genes, enquanto as amostras 9 e 10 tiveram um menor número de genes detectados (Tabela 4). Não foi possível obter o *pool* de DNA da amostra 11 em virtude da grande quantidade de óleo diesel presente nessa amostra, tornando a extração com o *Kit* utilizado inviável.

Os resultados da análise do *pool* de DNA da fração cultivável mostraram que os genes *alkB* (12), *alk* (18) e *merA* (16) foram os mais prevalentes, enquanto os genes *puhA* e *puhB* foram novamente detectados em menor número, sendo o *puhA* detectado em duas amostras (3A e 8B) e o *puhB* em uma única amostra (3A). Os genes *atzA*, *copA* e *copB* foram encontrados em menor quantidade na fração cultivável. O gene *atzA* foi detectado em oito amostras e os genes *copA* e *copB* em apenas três amostras cada um (Tabela 4). O gene *nah* foi encontrado apenas na amostra 11.

A análise entre as amostras coletadas em dois períodos diferentes do ano (amostras A e B) mostrou que, embora a maioria dos resultados tenha se mantido inalterado, foi possível observar que algumas amostras de água apresentam resultados diferentes nas duas coletas. No resultado do DNA total, as amostras 1 e 6 foram aquelas que apresentam maior diferença. A amostra 1A, coletada em 27/10/2015 do Rio do Carmo/Ituverava, apresentou os genes *alkB*, *nah*, *atzA*, *alk*, *copA*, *copB* e *merA*, enquanto a amostra 1B, coletada em 08/12/2015

apresentou apenas os genes *alk* e *copA*. A amostra 6A, coletada em 10/11/2015, apresentou os genes *alkB*, *nah*, *atzA*, *alk*, *copB* e *merA*, entretanto, a amostra 6B que foi coletada em 01/03/2016 apresentou apenas o gene *puhA*, que não havia sido encontrado na primeira coleta. Um resultado similar foi observado nas amostras 1 e 8 na análise do DNA cultivável. Na amostra 1A foi detectado apenas o gene *merA*, enquanto na amostra 1B foram detectados quatro genes (*alkB*, *atzA*, *alk* e *merA*). A amostra 8A apresentou o gene *alk*, enquanto que na amostra 8B foram detectados os genes *alkB*, *alk*, *merA* e *puhA* (Tabela 4).

A comparação entre os resultados obtidos com o *pool* de DNA da fração total e da cultivável mostra que todos os genes pesquisados foram encontrados em maior número na fração total, entretanto, não foi observada uma diferença acentuada para os genes *alkB* (alcanos), *alk* (polietileno) e *merA* (mercúrio), sendo particularmente preocupante o predomínio e a dispersão do gene *merA*. A maior diferença entre as duas frações ocorre com os genes *nah*, *copA* e *copB*. Os genes de degradação do diuron foram detectados em maior número na fração cultivável (Figura 7).

Figura 7 - Detecção dos genes de degradação na fração total e cultivável

5.2 Isolamento e detecção dos genes catabólicos nos isolados bacterianos

Um total de 52 isolados bacterianos foram obtidos das 19 amostras de água. Os isolados foram selecionados no meio de cultura Ágar Mueller-Hinton e Ágar MacConkey, sendo selecionados todos os morfotipos presentes nesses meios. Os isolados bacterianos foram inicialmente analisados quanto ao potencial de degradação pela pesquisa dos mesmos

Tabela 4 - Detecção de genes de degradação e resistência em amostras de DNA total e cultivável e dos isolados obtidos

Amostra	Genes encontrados		Isolado	Identificação	Genes encontrados
	DNA total	DNA cultivável			DNA genômico
1A	<i>alkB, nah, atzA, alk, copA, copB, merA</i>	<i>merA</i>	NA	-	-
1B	<i>alk, copA</i>	<i>alkB, atzA, alk, merA</i>	1BEW2	<i>Bacillus</i> sp.	<i>atzA</i>
			1BEW3	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>atzA</i>
2A	<i>alkB, nah, atzA, alk, copA, copB, merA</i>	<i>alk, copB, merA</i>	NA	-	-
2B	<i>alkB, nah, atzA, alk, copB, merA</i>	<i>alkB, alk, copB, merA</i>	2BEW 7	<i>Bacillus</i> sp.	<i>alk</i>
3A	<i>alkB, nah, atzA, alk, copA copB, merA</i>	<i>alkB, puhA, puhB, alk, merA</i>	3AEW9	<i>Bacillus</i> sp.	<i>puhB</i>
			3AEW10	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>alkB, alk</i>
			3AEW11	<i>Bacillus</i> sp.	<i>alk</i>
3B	<i>alkB, nah, atzA, alk, copB, merA</i>	<i>alkB, atzA, alk, copB, merA</i>	3BEW12	<i>Bacillus</i> sp.	<i>atzA</i>
			3BEW14	<i>Citrobacter</i> sp.	<i>atzA, alk</i>
4A	<i>alkB, atzA, alk, copA copB, merA</i>	<i>alkB, alk</i>	4AEW15	<i>Bacillus</i> sp.	<i>puhA</i>
			4AEW17	<i>Bacillus</i> sp.	<i>alk</i>
4B	<i>alkB, nah, atzA, alk, copA, copB, merA</i>	<i>alkB, alk, merA</i>	4BEW20	<i>Escherichia coli</i>	<i>merA</i>
5A	<i>alkB, nah, atzA, alk, copA, copB, merA</i>	<i>alkB, atzA, alk, copA, merA</i>	5AEW21	<i>Bacillus</i> sp.	<i>atzA</i>
			5AEW23	<i>Serratia marcescens</i>	<i>atzA</i>
			5BEW24	<i>Escherichia coli</i>	<i>atzA</i>
			5BEW25	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>atzA</i>
5B	<i>alkB, nah, atzA, alk, copB, merA</i>	<i>alkB, atzA, alk, merA</i>	5BEW26	<i>Bacillus</i> sp.	<i>alk</i>
			5BEW27	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>atzA, merA</i>
			6AEW28	<i>Bacillus</i> sp.	<i>atzA</i>
6A	<i>alkB, nah, atzA, alk, copB, merA</i>	<i>alkB, atzA, alk, copA, merA</i>	6AEW29	<i>E. coli</i>	<i>atzA, alk</i>
6B	<i>puhA</i>	<i>alkB, alk, merA</i>	6BEW31	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>alk, merA</i>
			6BEW33	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>merA</i>
7A	<i>alkB, nah, atzA, alk, copA, copB, merA</i>	<i>alk, merA</i>	NA	-	-
7B	<i>alkB, alk, copA, merA</i>	<i>alkB, atzA, alk, copA, merA</i>	7BEW37	<i>Bacillus</i> sp.	<i>atzA</i>
			7BEW39	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>merA</i>
8A	<i>alkB, nah, atzA, alk, copA, copB, merA</i>	<i>alk</i>	NA	-	-
8B	Nenhum gene encontrado	<i>alkB, alk, merA, puhA</i>	8BEW44	<i>Bacillus</i> sp.	<i>puhA</i>
			8BEW46	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>puhA, merA</i>
9	<i>alkB, alk, copA, merA</i>	<i>alk</i>	9EW47	<i>Bacillus</i> sp.	<i>alk</i>
10	<i>alkB, merA</i>	<i>atzA, alk, merA</i>	10EW49	<i>Bacillus</i> sp.	<i>atzA</i>
			10EW50	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>atzA, merA</i>
11	Nenhum gene pesquisado	<i>nah, atzA, alk, merA</i>	11EW51	<i>Bacillus</i> sp.	<i>atzA</i>
			11EW52	<i>Bacillus</i> sp.	<i>alk</i>

Genes já pesquisados e detectados na fração cultivável de onde foram isolados.

Todos os isolados que apresentaram um ou mais genes, foram identificados pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, totalizando 30 isolados (Tabela 4). A maioria deles (16) foi identificada com *Bacillus* sp., seis foram identificados como *Aeromonas* sp., três como *Escherichia coli*, dois como *Pseudomonas* sp., e apenas um isolado dos gêneros *Serratia*, *Klebsiella* e *Citrobacter* foi identificado (Figura 8).

Figura 8 - Identificação dos isolados bacterianos

A maioria dos isolados (15) foi portador do gene *atzA*, dez deles apresentaram o gene *alk* (polietileno), sete o gene *merA* (mercúrio), três o gene *puhA* (diuron), um o *puhB* (diuron) e um foi positivo para o gene *alkB* (alcano). Sete desses isolados apresentaram dois dos genes pesquisados, sendo que dois deles tiveram concomitantemente os genes *atzA* e *merA* (isolados 5BEW27 e 10 EW50), os quais foram identificados como *Aeromonas* sp., e dois outros tiveram os genes *atzA* e *alk* [isolados 3BEW14 (*Citrobacter* sp.) e 6AEW29 (*E. coli*)]. Três outros isolados apresentaram a seguinte combinação de genes: isolado 3AEW10 (*Pseudomonas* sp.) teve os genes *alk* e *alkB*; isolado 6BEW31 (*Aeromonas* sp.) teve os genes *alk* e *merA*; isolado 8BEW46 (*Aeromonas* sp.) foi positivo para os genes *puhA* e *merA*.

5.3 Padronização de reações de Multiplex PCR para triagem do potencial de degradação utilizando amostras de água

As reações de Multiplex PCR foram montadas com o objetivo de avaliar o potencial genético de degradação de diferentes contaminantes ambientais em amostras de água com uma única ou em poucas reações de PCR.

Para a escolha dos genes a serem agrupados em uma mesma reação foram selecionados os seguintes critérios: aqueles que não tivessem o peso molecular próximo entre si e aqueles genes que estão relacionados com a degradação de xenobióticos de grupos distintos.

Na tentativa de padronizar as reações de multiplex, foram montadas inicialmente duas reações. A primeira reação agrupou os quatro pares de oligonucleotídeos dos genes catabólicos como a seguir: *atzA* (200pb), *alk* (330pb), *alkB* (550pb) e *merA* (932pb), responsáveis pela degradação de atrazina, polietileno, alcanos e resistência ao mercúrio, respectivamente. Entretanto, foram observadas várias interferências. Houve o aparecimento de algumas amplificações inespecíficas e a banda do gene *alkB* foi observada apenas no DNA da amostra cultivável 1B. As amplificações dos genes catabólicos podem ser visualizadas na figura 9A.

A segunda reação agrupou os genes *atzA* (200pb) e *nah* (377pb), responsáveis pela degradação da atrazina e PAH, respectivamente. Observou-se amplificação satisfatória com os dois genes utilizados, como pode ser observado na figura 9B.

Figura 9 - PCR multiplex para triagem do potencial de degradação em amostras de água.

(A): Produtos da amplificação dos genes *merA* (932pb), *alk* (330pb) e *atzA* (200pb). P) Marcador de 100pb (Sinapse); 1) DNA cultivável da amostra 1B; 2) DNA cultivável da amostra 5A; 3) DNA cultivável da amostra 6A; 4) Controle Negativo. (B): Produtos da amplificação dos genes *nah* (377pb) e *atzA* (200pb). P) Marcador de 100pb (Sinapse); 5) DNA cultivável da amostra 11; 6) Controle Negativo.

Uma terceira reação foi testada agrupando os genes *atzA* (200 pb), *alkB* (550 pb) e *copB* (364 pb), responsáveis pela degradação da atrazina, alcanos e resistência ao cobre, respectivamente. A reação se mostrou reprodutiva e sem o surgimento de reações inespecíficas. As amostras de água testadas foram a 1A e a 5A (Figura 10).

Figura 10 - Produtos da amplificação dos genes *atzA* (200pb), *copB* (364pb) e *alkB* (550pb).

P) Marcador de 100pb (Sinapse); 1) DNA total da amostra 1A; 2) DNA total da amostra 5A.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A água vem se tornando cada vez mais escassa, tanto em qualidade quanto em quantidade e o aumento da demanda por água é consequência direta do aumento do consumo e do crescimento populacional. Entretanto, a água liberada para consumo doméstico deve ser considerada potável, com qualidade adequada ao ser humano, havendo a necessidade de tratamento prévio. Entre os requisitos básicos de qualidade da água para consumo deve-se considerar a isenção de substâncias químicas, de organismos prejudiciais à saúde e ausência de organismos visíveis (CANAL, 2000).

Algumas situações favorecem a degradação das áreas de mananciais, entre elas, as práticas inadequadas de uso do solo e da água, falta de infraestrutura de saneamento com condições precárias nos sistemas de tratamento sanitário, atividades industriais desenvolvidas sem legislação ambiental, exploração indevida dos recursos hídricos e remoção da cobertura vegetal. Esses fatores resultam na baixa qualidade da água distribuída, expondo a população à ingestão de substâncias potencialmente danosas que podem levar ao surgimento de doenças. Portanto, a água encontrada na natureza possui diversas impurezas que definem suas características e as áreas contendo os mananciais, fontes de água doce superficial ou subterrânea utilizada para consumo humano, devem ser alvo de atenção, contemplando todos os aspectos legais (GASPARINI, 2001).

Embora um dos problemas relacionados à contaminação das águas de mananciais seja a presença de micro-organismos patogênicos e os riscos decorrentes do consumo de água contendo tais organismos, a água também apresenta uma grande biodiversidade de micro-organismos que exercem um importante papel na descontaminação do meio ambiente. Assim, a microbiota natural de cada ambiente é determinante para promover e ajudar a recuperar essas fontes de água, contudo menos de 1% das bactérias são cultiváveis (STALEY & KONOPKA, 1985; AMANN et al., 1995; HUGENHOLTZ et al., 1998).

No presente estudo foi possível observar que as amostras do *pool* de DNA da microbiota total apresentaram um grande número de genes de degradação. Entre os nove genes pesquisados, sete deles (*alkB*, *nah*, *alk*, *atzA*, *copA*, *copB* e *merA*) aparecem na grande maioria das amostras, principalmente naquelas coletadas dos mananciais (amostras 1 a 8). Esses genes estão relacionados à degradação dos alcanos, hidrocarbonetos poli-aromáticos, polietileno, atrazina e resistência ao cobre e ao mercúrio. Entretanto, o gene *puhA*, envolvido na degradação do diuron, foi detectado apenas na amostra 6B, sendo o único gene daquela amostra e o gene *puhB* não foi detectado em nenhuma amostra. Assim, é possível sugerir que

bactérias portadoras desses genes provavelmente não são amplamente distribuídas no meio ambiente e que a detecção do gene *puhA* na amostra 6B, quando não se detectou nenhum outro gene, indica que houve a prevalência de uma comunidade microbiana portadora desse gene naquele momento da coleta, o que pode estar relacionado à presença do diuron ou alguma substância correlacionada a esse herbicida no local.

A amostra 8, coletada do rio São Domingos, na cidade de Catiguá, foi a única amostra de água onde se observa uma redução total dos genes pesquisados na fração total da segunda coleta. A amostra 8A apresentou todos os genes, enquanto a amostra 8B não teve nenhum deles. O rio São Domingos passa pelos municípios de Santa Adélia, Pindorama, Catanduva, Catiguá, Tabapuã e Uchoa. Esse rio recebeu por muitos anos esgoto doméstico, entretanto, desde maio de 2015, a Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de Catanduva está operando com 100% do esgoto urbano e com licença expedida pela CETESB após a construção de redes de coletores e interceptores de esgoto em suas margens durante o percurso urbano em Catanduva. Embora as duas coletas tenham sido feitas após a implantação da ETE, a segunda coleta, realizada em março de 2016, provavelmente teve uma redução dos contaminantes observados anteriormente. Além disso, os mananciais de água apresentam um fluxo constante, não sendo um ambiente estático, portanto, muitas variações podem interferir na detecção dos micro-organismos e genes envolvidos em diferentes processos.

Ao analisar os resultados obtidos com o *pool* de DNA da fração cultivável e comparar os resultados com aqueles da fração total, se observa que os genes *alkB* (alcanos), *alk* (polietileno) e *merA* (mercúrio) se mantiveram presentes em quase todas as amostras de DNA da amostra cultivável, sendo particularmente preocupante o predomínio e a dispersão do gene *merA*. Portanto, não houve uma diferença acentuada entre as frações quando se analisa a presença desses genes. A maior diferença entre as duas frações ocorre com os genes *nah*, *copA* e *copB*. Os genes de degradação do diuron foram detectados em apenas duas amostras de água.

O gene *nah* foi detectado apenas na amostra 11, obtida de um córrego da cidade de Ribeirão Preto, amplamente contaminado com diesel. Embora esse gene tenha sido detectado em várias amostras da fração total, e não tenha sido possível a sua pesquisa na fração total da amostra 11 em virtude da impossibilidade de extrair o DNA total dessa amostra, ele foi detectado na fração cultivável da única amostra de água que possuía visivelmente contaminação por derivados de petróleo, indicando que micro-organismos da fração cultivável com potencial para biodegradação de PAH estariam presentes.

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) são amplamente encontrados no ambiente e persistem durante longos períodos de tempo. A descontaminação de um ambiente poluído por HAP é importante, visto que alguns são tóxicos, mutagênicos e cancerígenos (MANOLI & SAMARA, 1999; IARC, 2010). A biorremediação utilizando bactérias aeróbicas tem sido amplamente estudada e o gene *nah* foi encontrado em bactérias Gram-negativas, incluindo espécies do gênero *Pseudomonas* e também em bactérias Gram-positivas (HABE & OMORI, 2003; GRATIVOL et al., 2010).

Embora o mesmo inoculo de onde foi extraído o DNA da fração cultivável também tenha sido utilizado para o isolamento de bactérias, apenas uma fração reduzida dessa microbiota cultivável foi isolada nos meios de cultura sólidos utilizados. Para ampliar o isolamento de diferentes gêneros e espécies microbianas, o ideal seria a utilização de diferentes meios de cultura e condições de temperatura e cultivo, inclusive para obtenção de fungos. Entretanto, o objetivo do estudo foi detectar as bactérias mais prevalentes e mais facilmente isoladas em meios de cultura convencionais, sob condições aeróbicas, e verificar quais delas carregavam os genes detectados na fração cultivável. Os principais gêneros bacterianos detectados foram *Bacillus* e *Aeromonas*, e as bactérias *Escherichia coli*, *Serratia* sp., *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. também foram isoladas.

A grande maioria das bactérias isoladas apresentou o gene *atzA*, o primeiro gene da via de degradação do herbicida atrazina. Embora a degradação total da atrazina envolva seis etapas enzimáticas codificadas pelos genes *atzA*, *atzB* e *atzC* e pelo operon *atzDEF*, apenas o gene *atzA* foi escolhido para a pesquisa, visto que o objetivo era apenas avaliar o potencial de degradação do local. A biodegradação da atrazina não é realizada apenas por bactérias do gênero *Pseudomonas* ou por culturas puras individuais. A mineralização por consórcios simples ou complexos contendo até oito espécies bacterianas diferentes já foi realizada. Espécies de *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Nocardia*, *Flavobacterium*, *Agrobacterium* e *Achromobacter* foram descritas em consórcios bacterianos, contendo genes *atz* (BOUQUARD et al. 1997; SMITH et al. 2005; MARTIN-LAURENT et al. 2006; UDIKOVIĆ-KOLIĆ et al. 2010).

A atrazina é frequentemente detectada como poluente orgânico em águas superficiais e subterrâneas em vários países (UETA et al., 1999; RHINE et al., 2003). Um estudo realizado em Luxemburgo para avaliar a contaminação ambiental encontrou níveis significativos de atrazina e de seus produtos de degradação na água potável, em água encanada e em água de nascentes e a atrazina foi o herbicida predominante, sendo detectados até 44 ng.L⁻¹ em água de torneira (BOHN et al., 2011). De acordo com a Embrapa, o padrão aceitável de

potabilidade da água para consumo humano é uma concentração de até 2 µg.L⁻¹ de atrazina (Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde), contudo, a Agência de Proteção Ambiental (EPA), nos Estados Unidos, determina um nível aceitável de 3 µg.L⁻¹.

Além do gene *atzA*, outros dois genes, *merA* e *alk*, foram encontrados em alguns dos isolados bacterianos. O gene *merA*, altamente prevalente no DNA da fração total e da fração cultivável, foi detectado em sete isolados bacterianos. A presença desse gene sugere uma contaminação das amostras de água pelo mercúrio, um metal extremamente tóxico. O mercúrio ocorre naturalmente em pequenas quantidades no meio ambiente, sendo o 16º elemento mais raro da Terra. Seus níveis aumentaram devido à contaminação ambiental em decorrência de atividades humanas como queima de carvão e produtos petrolíferos, seu uso em amálgamas odontológicas e em lâmpadas fluorescentes compactas, além de ser encontrado nos termômetros caseiros. Muitas vezes, o mercúrio não é manuseado e descartado de forma adequada, o que acarreta altos índices de contaminação com a consequente liberação de mercúrio no ar, na água e no solo (TUOVINEN, 1984).

A resistência a esse metal tem sido reportada por vários autores e o gene *merA* foi encontrado em plasmídios de *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (SUMMERS & SILVER, 1978; BHRIAIN & FOSTER, 1996; OSBORN et al., 1997). Devido à natureza plasmidial desse gene, ele pode ser encontrado em diferentes espécies bacterianas e se disseminar facilmente pelo meio ambiente e pode ainda contribuir para o aumento da resistência aos antibióticos (MCARTHUR & TUCKFIELD, 2000; SANT'ANA et al., 1989).

O gene *alk*, envolvido na degradação do polietileno, foi encontrado em nove isolados bacterianos. Kohno et al. (2002) detectaram o gene *alkB* em isolados pertencentes a, pelo menos, nove gêneros diferentes e sugeriram que essas bactérias são degradadoras de alcanos. Yoon et al., (2012) demonstraram que a alcano hidroxilase codificada pelo gene *alkB* é uma enzima chave que catalisa o primeiro passo na degradação dos alcanos e que esse mesmo tipo de enzima também pode participar da degradação de polietileno. Muitos trabalhos concluíram que micro-organismos do solo podem degradar o polietileno (GAJENDIRAN et al., 2016; KATHIRESAN et al., 2003; DEEPIKA E JAYA, 2015; USHA et al., 2011).

Entre os diferentes gêneros bacterianos, *Pseudomonas* tem sido melhor investigada (SINGH et al., 2016; DEEPIKA E JAYA, 2015; BALASUBRAMANIAN et al., 2010; KATHIRESAN et al., 2003, PRIYANKA & ARCHANA, 2011, NANDA E SAHU, 2010), mas muitos outros gêneros estão envolvidos com a biodegradação desse polímero, entre eles, *Staphylococcus*, *Bacillus* (SINGH et al., 2016), *Streptomyces* (DEEPIKA E JAYA, 2015), *Arthrobacter* (BALASUBRAMANIAN et al., 2010), *Moraxella* (KATHIRESAN et al.,

2003), *Streptococcus*, *Proteus*, *Micrococcus* (PRIYANKA & ARCHANA, 2011) e *Rhodococcus* (GILAN et al., 2004; NANDA & SAHU, 2010).

O uso de polietileno está crescendo em todo o mundo a uma taxa de 12% ao ano e cerca de 140 milhões de toneladas de polímeros sintéticos são produzidos em todo o mundo a nível mundial (SHARMA et al., 2015). Devido a esta grande quantidade de polietileno, ele se acumula no meio ambiente, gerando resíduos que precisam de milhares de anos para serem degradados (USHA et al., 2011).

Os genes *puhA* e *puhB*, envolvidos na degradação do diuron, foram detectados em baixa frequência no DNA total e cultivável, entretanto, cinco isolados apresentaram um desses genes. O diuron é amplamente utilizado na agricultura nacional e é considerado um poluente biologicamente ativo, persistente no solo e em águas superficiais e subterrâneas (CASTILLO et al., 2006). Entretanto, poucos trabalhos pesquisaram os genes de degradação do diuron (*puhA* e *puhB*). Turnbull et al. (2001) correlacionaram um plasmídio de 30 MDa com o potencial de degradação desse herbicida, uma vez que esses genes estavam inseridos no mesmo.

A pesquisa dos genes de biodegradação mostrou uma grande dispersão dos mesmos nas amostras de DNA total e da fração cultivável. Entretanto, como as fontes de água, principalmente aquelas obtidas de grandes mananciais, sofrem influência de diversos fatores e estão em contínua mudança, uma forma de avaliar o potencial genético de degradação dessas amostras em diferentes épocas e estações pode ser feita pela pesquisa de genes envolvidos na degradação de diferentes poluentes ambientais. Pelos motivos apresentados, o presente estudo teve como um dos objetivos padronizar reações de Multiplex PCR para detectar de forma eficiente e prática, os genes de degradação para cinco tipos de contaminantes (alcanos, PAH, atrazina, diuron e polietileno) e de resistência para dois deles (mercúrio e cobre).

Em virtude da complexidade de montar uma única reação com a amplificação de nove genes, três reações Multiplex PCR foram montadas para agrupar os genes que foram mais prevalentes no estudo. A primeira reação agrupando os genes *atzA* (200 pb), *alk* (330 pb), *alkB* (550 pb) e *merA* (932 pb), responsáveis pela degradação de atrazina, polietileno, alcanos e resistência ao mercúrio não foi satisfatória, com o aparecimento de algumas amplificações inespecíficas. A segunda reação agrupou os genes *atzA* (200 pb) e *nah* (377 pb), responsáveis pela degradação da atrazina e HAP, respectivamente. Observou-se amplificação satisfatória com os dois genes utilizados e a terceira reação amplificou os genes *atzA* (200 pb), *alkB* (550 pb) e *copB* (364 pb), responsáveis pela degradação da atrazina, alcanos e resistência ao cobre,

respectivamente. A reação se mostrou reprodutiva e sem o surgimento de reações inespecíficas.

Dessa forma, pela análise de todos os resultados obtidos, é possível concluir que os genes de biodegradação estão presentes tanto na fração total de DNA quanto na cultivável e que a seleção de bactérias portadoras desses genes pode ser realizada para uso em técnicas de biorremediação, uma alternativa para contornar muitos dos problemas ambientais existentes atualmente. Além disso, se observa que praticamente todos os genes foram encontrados na fração total, demonstrando o potencial natural de micro-organismos, cultiváveis ou não, para adquirirem genes de degradação e atuarem em seu habitat natural na degradação de diferentes contaminantes ambientais.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- Os genes pesquisados foram amplamente encontrados no DNA da fração total.
- Os genes *alkB*, *alk*, *atzA* e *merA* foram os mais prevalentes na fração cultivável, indicando que micro-organismos portadores desses genes podem ser isolados para uso em processos de biorremediação.
- Os genes *puhA* e *puhB* foram detectados em menor frequência, tanto na fração total, quanto na cultivável, demonstrando pouca dispersão desses genes nas amostras estudadas.
- *Bacillus* e *Aeromonas* foram os gêneros bacterianos portadores de genes de degradação isolados em maior frequência nas amostras de água analisadas.
- Duas reações de Multiplex PCR foram padronizadas para detecção dos genes envolvidos na biodegradação da atrazina, PAH, alcanos e resistência ao cobre.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE CCZ, BRUM MCC, CASTRO MC. 2015. Degradação microbiológica e enzimática de polímeros: uma revisão. *Quimica. Nova.* 38(2): 259-267.

ALISI C, MUSELLA R, TASSO F, UBALDI C, MANZO S. 2009. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. *Science of the Total Environment.* 407: 3024-3032.

ALVES CJ. 2005. Desenvolvimento de metodologia de ensaios para avaliação comparativa do envelhecimento de borrachas nitrílicas expostas à diversas condições de temperatura e ambiente. 2005. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

AMANN RI, LUDWIG W, SCHLEIFER KH, AMANN RI, LUDWIG W, SCHLEIFER KH. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143–169.

ANDREAZZA R, CAMARGO FAO, ANTONIOLLI ZI, QUADRO MS, BARCELOS AA. 2013. Biorremediação de áreas contaminadas com cobre. *Revista de Ciências Agrárias.* 36 (2):127-136.

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Seminário volta a discutir mercado de agrotóxicos em 2012, Brasília; 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>> Acesso em: 12 jun. 2013.

APPANNA VD, GAZSO LG, PIERRE MS. 1996. Multiple-metal tolerance in *Pseudomonas* fluorescence and its biotechnological significance. *J. Biotech.* 52: 75-80.

ARMAS ED. 2006. Biogeodinâmica de herbicidas utilizados em cana-de-açúcar *Saccharum* spp. na subbacia do rio Corumbataí. Tese de doutorado apresentada a ESALQ/USP, 186.

BALASUBRAMANIAN V, NATARAJAN K, HEMAMBIKA B, RAMESH N, SUMATHI CS, KOTTAIMUTHU R, KANNAN VR, 2010. High-density polyethylene (HDPE)-degrading potential bacteria from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India. *Let. Applied Microbiol.* 51: 205–211.

BALDWIN BR, NAKATSU CH, NIES L. 2003. Detection and Enumeration of Aromatic Oxygenase Genes by Multiplex and Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(6):3350–3358.

BARKAY T, MILLER SM, SUMMERS AO. 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol Rev*. 27: 355–384.

BARRETO LV, FRAGA MS, BARROS FM, ROCHA FA, AMORIM JS, DE CARVALHO SR, BONOMO P, DA SILVA DP. 2014. Relationship between stream flow and water quality in a river section *Rev. Ambient. Água*. 9(1):118-129.

BECKETT PHT. 1991. Critical tissue concentrations as indicators of toxicity. *Suelos Ecuatoriales*. Bogotá. 39.

BHRIAIN NN, FOSTER TJ. 1986. Polypeptides specified by the mercuric resistance (mer) operon of plasmid R100. *Gene*. 42: 323-330.

BIDONE ED, CASTILHOS ZC, CID de SOUZA TM, LACERDA LD. 1997. Fish contamination and human exposure to mercury in the Tapajos river basin, Para State, Amazon, Brazil: A screening approach. *Bulletin of Environment Contaminant Toxicology*. 59:194-201.

BOHN T, COCCO E, GOURDOL L, GUIGNARD C, HOFFMAN L. 2011. Determination of atrazine and degradation products in Luxembourgish drinking water: origin and fate of potential endocrine-disrupting pesticides. *Food Additives and Contaminants*. 28: 1041–1054.

BOUQUARD C, OUZZANI J, PROMÉ J-C, MICHEL-BRIAND Y, PLÉSIAT P. 1997. Dechlorination of Atrazine by a *Rhizobium* sp. Isolate. *Applied and Environmental Microbiology*. 3: 862–866.

BOUSKILL NJ, BARNHART EP, GALLOWAY TS, HANDY RD, FORD TE. 2007. Quantification of changing *Pseudomonas aeruginosa* *sodA*, *htpX* and *mt* gene abundance in response to trace metal toxicity: a potential in situ biomarker of environmental health. *FEMS Microbiol Ecol*. 60(2):276-86.

BRASIL. Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989 - Decreto n.º 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. *Diário Oficial*, Brasília; 08 de janeiro de 2002.

CANAL M R. 2000. Monitoramento da qualidade da água da represa do Alagados – Ponta Grossa (PR). UEPG. Ponta Grossa.

CASTILLO MA, FELIS N, ARAGON P, CUESTA G, SABATER S. 2006. Biodegradation of the herbicide diuron by streptomycetes isolated from soil. *Internation Biodeterioration & Biodegradation*. 58:196–202.

CASTRO AM, COSTA CZ, ALBUQUERQUEA MCC, BRUMB MC. 2015. Degradação microbológica e enzimática de polímeros: uma revisão. *Quimica Nova*. 38(2): 259-267.

CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment). 2010. Canadian Soil Quality Guidelines for Carcinogenic and Other Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Environmental and Human Health Effects). Scientific Criteria Document (revised). Quebec (Canada). 216p.

CLARKSON TW, MAGOS L. 2006. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol*. 36(8):609-62.

CRAPEZ MAC, BORGES ALN, BISPO MGS, PEREIRA DC. 2002. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. *Ciência Hoje*. 30: 179.

DEEPIKA S, JAYA MR. 2015. Biodegradation of low density polyethylene by microorganisms from garbage soil. *J. Exp. Biol. Agric. Sci*. 3:1-5.

DEON MC, ROSSI A, MAGRO C, REINEHR CO, COLLA LC. 2012. Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através de bioaumentação e atenuação natural. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*. Londrina. 33(1):73-82.

DEREDJIAN A, COLINON C, BROTHIER E, FAVRE-BONTÉ S, COURNOYER B, NAZARET S. 2011. Antibiotic and metal resistance among hospital and outdoor strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Res Microbiol*. 162:689–700.

DEVERS M, AZHARI NE, KOLIC N-U, MARTIN-LAURENT F. 2007. Detection and organization of atrazine-degrading genetic potential of seventeen bacterial isolates belonging to divergent taxa indicate a recent common origin of their catabolic functions. *FEMS Microbiol Lett*. 273 (1): 78-86.

EBINGHAUS R, KOCK H, TEMME C, EINAX JW, LOWE AG, RICHTER A, BURROWS JP, SCHROEDER W. 2002. Antarctic springtime depletion of atmospheric mercury, *Environ. Sci. Technol*. 36: 1238 – 1244.

FERMAM RKS, ANTUNES MAS. 2009. Uso de defensivos agrícolas, limites máximos de resíduos e impacto no comércio internacional: Estudo de caso. *Revista de Economia e Agronegócio*. 7(2): 197-214.

FUENTES S, SEEGER M, MÉNDEZ V, AGUILA P. 2014. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98(11):81-94.

GAJENDIRAN A, KRISHNAMOORTHY S, ABRAHAM J. 2016. Microbial degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Aspergillus clavatus* strain JASK1 isolated from landfill soil. *Biotech*. 6: 52-58.

GARCÍA-GONZÁLEZ V, GOVANTES F, PORRÚA O, SANTERO E. 2005. Nitrogen control of atrazine utilization in *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 6987-6993.

GASPARINI VA. 2001 - Repercussões econômicas da utilização incorreta das áreas de mananciais. UFSC. Engenharia de Produção. Dissertação de Mestrado.

GAYLARDE CC, BELLINASSO ML, MANFIO GP. 2013. Biorremediação – aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 34:36-43.

GHIMIRE N, WOODWARD RT. 2013. Under- and over-use of pesticides: An international analysis. *Ecological Economics*. 89: 73-81.

GIACOMAZZI S, COCHET N. 2004. Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere*. 56:1021-103.

GILAN I, HADAR Y, SIVAN A. 2004. Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus rubber*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 65: 97–104.

GOYAL AK, ZYLSTRA GJ. 1996. Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GE39. *Appl Environ Microbiol*. 62: 230–236.

GRATIVOL AD, TONINI RMCW, REZENDE CE. 2010. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por Bactérias: revisão. *Oecol. Aust*. 14(4): 1027-1035.

HABE H, OMORI T. 2003. Genetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism in Diverse Aerobic Bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 67(2): 225-243.

HANDELSMAN J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68 (4): 669-685.

HUGENHOLTZ P, GOEBEL BM, PACE NR. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol*. 180: 4765–4774.

IARC. 2010. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 92: 35-121.

JACQUES RJS, SILVA KJ, BENTO FM, CAMARGO FA. 2010. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. *Ciência Rural*, 40: 310- 317.

KATHIRESAN K. 2003. Polythene and plastic degrading microbes from mangrove soil. *Rev. Biol. Trop*. 51: 629–633.

KAUSHIK CP, HARITASHI AK. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and environmental health. *Our Earth*. 3(3):1-7.

KOHNO T, SUGIMOTO Y, SEI K, MORI K. 2002. Design of PCR Primers and gene probes for general detection of alkane-degrading bacteria. *Microb. Environ*. 17:114-121.

LEE, KANG, Y-S., CHO, K-S. 2011. Bioremediation of Diesel-Contaminated Soils by Natural Attenuation, Biostimulation and Bioaugmentation Employing *Rhodococcus* sp. EH831. *Korean Journal of Microbiol. Biotechnol.*, v. 39, n. 1, 86–92.

LIMA ASB, SIMÃO CJB, SILVA FJS, RODRIGUES JRF, ARAÚJO TC. 2015. A biorremediação como técnica de tratamento de efluentes contaminados por petróleo. *Blucher Chemistry Proceedings*. 3(1).

LINDQVIST O, JOHANSSON K, AASTRUP M, ANDERSSON A, BRINGMARK L, HOVSENIUS G, HÅKANSON L, IVERFELDT Å, MEILI M, TIMM B. 1991. Mercury in the Swedish environment - recent research on causes, consequences and corrective methods. *Water, Air and Soil Pollution*. 56(1):169-186.

LÜ JC, LI ZT, HUSSAIN K, YANG GK. 2011. Bioremediation: The New Directions of Oil Spill Cleanup. Middle-East Journal of Scientific Research. 7 (5): 738-740.

MANFIO GP, GAYLARDE CC, BELLINASSO ML. 2005. Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicas de biorremediação de xenobióticos. Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento. 34: 36-43.

MANOLI E, SAMARA C. 1999. Polycyclic aromatic hidrocarbons in natural Waters: sources, occurrence e analysis. Trends Anal. Chem. 18(6): 417-428.

MARCHESI JR, SATO T, WEIGHTMAN AJ, MARTIN TA, FRY JC, HIOM SJ, DYMOCK D, WADE WG. 1998. Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 64(2): 795-799.

MARTIN-LAURENT F, BARRÈS B, WAGSCHAL I, PIUTTI S, DEVERS M, SOULAS G, PHILIPPOT L. 2006. Impact of the maize rhizosphere on the genetic structure, the diversity and the atrazine-degrading gene composition of cultivable atrazine-degrading communities. Plant Soil. 282(1):99–115.

MATALLO M B, MOURA MAM, FRANCO DAS. 2008. Impacto De Herbicidas Sobre Os Recursos Hídricos. Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária. 1(1): 142-151.

MCARTHUR JV, TUCKFIELD RC. 2000. Spatial patterns in antibiotic resistance among stream bacteria: effects of industrial pollution. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3722-3726.

MELO IS, SILVA CMMS, SCRAMIN S, SPESSOTO A. 2001. Embrapa Meio Ambiente. 440p.

MERGLER D, ANDERSON HA, CHAN LHM, MAHAFFEY KR, MURRAY M, SAKAMOTO M, STERN HA. 2007. Methylmercury exposure and health effects in humans: A worldwide concern, Ambio. 36(1):3–11.

NANDA S, SAHU SS. 2010. Biodegradability of polyethylene by *Brevibacillus*, *Pseudomonas*, and *Rhodococcuss* sp. New York Sci. J. 3(7):95-98.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2000. The future role of pesticides in US agriculture. Washington, D.C.: National Academy Press. Brasil. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989.

OMORI T, WIDADA J, NOJIRI H. 2002. Recent developments in molecular techniques for identification and monitorig of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation. Appl Microbiol Biotechnol 60:45–59.

OSBORN AM, BRUCE KD, STRIKE P, RITCHIE DA. 1997. Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. FEMS Microbiol. Rev. 19: 239-262.

PESCE S, BEQUET J, DEVERS-LAMRANI M, MARTIN-LAURENT F. 2013. Response of a diuron-degrading community to diuron exposure assessed by real-time quantitative PCR monitoring of phenylurea hydrolase A and B encoding genes. Applied Microbiology Biotechnology. 97 (4): 1661-1668.

PORTARIA MS n. °518/2004 Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005. 28 p.

PRIYANKA N, ARCHANA T. 2011. Biodegradation of polythene and plastic by the help of microorganisms: a way for brighter future. J. Environ. Anal. Toxicol. 1(4): 1-11.

RAZIYAFATHIMA M, PRASEETHA PK, RIMAL IRS. 2016. Microbial Degradation of Plastic Waste: A Review. J Pharm Chem Biol Sci. 4(2):231-242.

RHINE ED, FUHRMANN JJ, RADOSEVICH M. 2003. Microbial community responses to atrazine exposure and nutrient availability: Linking degradation capacity to community structure. Microb Ecol. 46:145-160.

ROMAN HA, WALSH TL, COULL B, DEWAILLY E, GUALLAR E, HATTIS D, MARIEN K, SCHWARTZ J, STERN A, VIRTANEN J, RICE G. 2011. Evaluation of the cardiovascular effects of methylmercury exposures: does current evidence support development of dose-response functions for benefits analysis? Environ Health Persp. 119(5):607–614.

ROQUE MRA, MELO IS. 2000. Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras do herbicida diuron. Scientia Agricola. 57(4):723-728.

SADOWSKY MJ, TONG Z, DE SOUZA M, WACKETT LP. 1998. *AtzC* is a new member of the amidohydrolase protein super-family and is homologous to other atrazine-metabolizing enzymes. Journal of Bacteriology, 180(1):152-158.

SANT'ANA YX, CHARTONE-SOUZA E, FERREIRA MD. 1989. Drug resistance and colicinogeny of *Salmonella typhimurium* strains isolated from sewage-contaminated surface water and humans in Belo Horizonte, Brazil. Rev. Microbiol. 20: 41-49.

SCHAEFER JK, YAGI J, REINFELDER J, CARDONA-MAREK T, ELLICKSON K, TEL-OR S, et al. 2004. The role of the bacterial organomercury lyase (MerB) in controlling methylmercury accumulation in mercury contaminated natural waters. *Environ. Sci. Technol.* 38(16):4304–4311.

SENE L, CONVERTI A, SECCHI GAR, SIMAO RCG. 2010. New aspects on atrazine biodegradation. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53(2):487-496.

SHARMA J, GURUNG T, UPADHYAY A, NANDY K, AGNIHOTRI P, MITRAA K. 2015. Isolation and Characterization of Plastic Degrading Bacteria from Soil Collected from the Dumping Grounds of an Industrial Area. *Int. J. Adv. Innov. Res.* 3(3): 2278-7844.

SIDDENS LK, LARKIN A, KRUEGER SK, BRADFIELD CA, WATERS KM, TILTON SC, PEREIRA CB, LÖHR CV, ARLT VM, PHILLIPS DH, WILLIAMS DE, BAIRD WM, SILVER, S. AND PHUNG, L.T. 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 753-789.

SIDDENS LK, LARKIN A, KRUEGER SK, BRADFIELD CA, WATERS KM, TILTON SC, PEREIRA CB, LÖHR CV, ARLT VM, PHILLIPS DH, WILLIAMS DE, BAIRD WM. 2012. Polycyclic aromatic hydrocarbons as skin carcinogens: comparison of benzo[a]pyrene, dibenzo[def,p]chrysene and three environmental mixtures in the FVB/N mouse. *Toxicol Appl Pharmacol.* 264(3):377-86.

SIMON MJ, OSSLUND TD, SAUNDERS R, ENSLEY BD, SUGGS S, HARCOURT A, SUEN WC, CRUDEN DL, GIBSON DT, ZYLSTRA GJ. 1993. Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. *Gene* 127(1): 31–37.

SINGH G, SINGH AK, BHATT K. 2016. Biodegradation of polyethylene by bacteria isolated from soil. *Inter. J. Res. Develop. Pharm. Life Sci.* 5(2): 2056-2062.

SMITH D, ALVEY S, CROWLEY DE. 2005. Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. *FEMS Microbiology Ecology.* 53(2):256-273.

SOLIOZ M, STOYANOV JV. 2003. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae* FEMS Microbiol Rev, 27(2-3):183-196.

SOUZA BS. 2011. Avaliação do Processo de H₂O₂/UV como Pós- Tratamento e Remoção da Atrazina de um Efluente Secundário de ETE para Fins de Reuso. Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química.

SPEIGHT JG. 2001. Handbook of petroleum analysis. Wiley-Interscience, New York.

SPINACÉ MAS, DE PAOLI MA. 2005. A tecnologia da reciclagem de polímeros. *Quim. Nova*. 28(1):65-72.

STALEY JT, KONOPKA A. 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol*. 39: 321–346.

STEFFEN GPK, ANTONIOLLI ZI. 2011. Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxico. *Tecnológica*. 15: 15-21.

SUMMERS AO, SILVER S. 1978. Microbial transformation of metals. *Annu. Rev. Microbiol*. 32: 637-672.

TONINI RMCW, REZENDE CE, GRATIVOL AD. 2010. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. *Oecol. Aust*. 14: 1027-1035.

TUOVINEN OH. 1984. Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical and genetic analyses. *Microbiol. Rev*. 48: 95-124.

TURNBULL GA, OUSLEY M, WALKER A, SHAW E, MORGAN JAW. 2001. Degradation of substituted phenylurea herbicides by *Arthrobacter globiformis* strain D47 and characterization of a plasmid associated hydrolase gene, *puhA*. *Appl. Environ. Microbiol*. 67(5): 2270–2275.

UDIKOVIÉ-KOLIÉ K, HRSAK D, DEVERS M, KLEPAC-CERAJ M, PETRIC I, MARTIN-LAURENT F. 2010. Taxonomic and functional diversity of atrazine-degrading bacterial communities enriched from agrochemical factory soil. *J. Appl. Microbio*. 109:1364-5072.

UETA J, PEREIRA NL, SHUHAMA IK, CERDEIRA AL. 1999. Biodegradação de Herbicidas e Biorremediação. *Biotechnology Ciência & Desenvolvimento*. 10:10-13.

USHA R, SANGEETHA T, PALANISWAMY M. 2011. Screening of Polyethylene Degrading Microorganisms from Garbage Soil. *Lib. Agric. Res. Cent. J. Int*. 4: 200-204.

VALDMAN E, ERIJMAN L, PESSOA FLP, LEITE SGF. 2001. Continuous biosorption of Cu and Zn by immobilized waste biomass *Sargassum* sp. *Proc. Biochem.* 36: 869-873.

VALLS M, LORENZO V. 2002. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology Reviews.* 26: 327-338.

WACKETT LP, SADOWSKY MJ, MARTINEZ B, SHAPIR N. 2002. Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: from enzymes to field studies. *Microbiol. Biotechnol.* 58: 39-45.

WEISBURG WG, BARNES SM, PELLETIER BA, LANE DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 173(2):697-703.

WHITELEY CG, LEE DJ. 2006. Enzyme technology and biological remediation. *Enzyme and Microbial Technology.* 38(3-4): 291-316.

YANG Y, WANG J, LIAO J, XIE S, HUANG, Y. 2015. Abundance and diversity of soil petroleum hydrocarbon-degrading microbial communities in oil exploring areas. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99:1935-1946.

YEN KM, GUNSALUS IC. 1985. Regulation of naphthalene catabolic genes of plasmid NAH7. *J. Bacteriol.* 162: 1008-1013.

YOON MG, JEON HJ, KIM MN. 2012. Biodegradation of Polyethylene by a Soil Bacterium and AlkB Cloned Recombinant Cell. *J. Bioremed. Biodegrad.* 3:145-152.

YU CP, Chu KH. 2005. A quantitative assay for linking microbial community function and structure of a naphthalene-degrading microbial consortium. *Environ Sci Technol* 39: 9611-9619.

ZHU B, LIU T, HU X, WANG G. 2013. Developmental toxicity of 3,4-dichloroaniline on rare minnow (*Gobiocrypris rarus*) embryos and larvae. *Chemosphere.* 90: 1132-1139.

ZOBELL CE. 1946. Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriol. Rev.* 10: 1-49.