

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

GENILTON DE OLIVEIRA CARDENES

**ANÁLISE GENÔMICA DE BACTÉRIAS COM CAPACIDADE DE DEGRADAR
COMBUSTÍVEIS FÓSSEIS, ISOLADAS DO RIO NEGRO, MANAUS-AM.**

MANAUS-AM

2025

GENILTON DE OLIVEIRA CARDENES

**ANÁLISE GENÔMICA DE BACTÉRIAS COM CAPACIDADE DE DEGRADAR
COMBUSTÍVEIS FÓSSEIS, ISOLADAS DO RIO NEGRO, MANAUS-AM.**

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia - PPGBIOTEC, da
Universidade Federal do Amazonas -
UFAM, como requisito para a obtenção
de título de doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade

Co-orientador: Prof. Dra. Isabelle Bezerra Cordeiro

MANAUS-AM

2025

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

-
- C266a Cardenes, Genilton Oliveira
 Análise genômica de bactérias com capacidade de degradar combustíveis
 fósseis, isoladas do rio negro, Manaus-Am. / Genilton Oliveira Cardenes. -
 2025.
 130 f. : il., color. ; 31 cm.
- Orientador(a): Edmar Vaz Andrade.
 Coorientador(a): Isabelle Bezerra Cordeiro.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de
 Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus-AM, 2025.
1. Hidrocarbonetos. 2. Degradação microbiana. 3. Acinetobacter seifertii.
 4. Achromobacter xylosoxidans. 5. Pseudomonas. I. Andrade, Edmar Vaz.
 II. Cordeiro, Isabelle Bezerra. III. Universidade Federal do Amazonas.
 Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título
-

GENILTON DE OLIVEIRA CARDENES

**ANÁLISE GENÔMICA DE BACTÉRIAS COM CAPACIDADE DE DEGRADAR
COMBUSTÍVEIS FÓSSEIS, ISOLADAS DO RIO NEGRO, MANAUS-AM.**

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia -
PPGBIOTEC, da Universidade Federal do
Amazonas - UFAM, como requisito para a
obtenção de título de doutor em Biotecnologia.
COMISSÃO EXAMINADORA:

Orientador: Edmar Vaz de Andrade

Co – Orientador: Isabelle Bezerra Cordeiro

Aprovado em 29/09/2025

BANCA EXAMINADORA

Dr. Edmar Vaz de Andrade (Presidente)

Dr. Edson Junior do Carmo (Membro)

Profa. Dra. Elen Bethleen de Souza Carvalho (Membro)

Dr. Jefferson Ferreira dos Santos (Membro)

Dr(a). Enedina Nogueira de Assunção (Membro)

Manaus, 29 de novembro de 2025.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, base e força em cada etapa da minha vida.

À minha noiva, Betina Raquel, por todo amor, apoio e paciência nos momentos mais desafiadores.

*Aos mestres que marcaram minha trajetória:
Ao professor Luiz Carlos, que despertou em mim a paixão pela música;
Ao meu orientador, Dr. Edmar Vaz de Andrade, pela orientação firme, confiança e incentivo constante;*

E à professora Gertrudes de Oliveira Cardenes, minha mãe, que nunca desistiu de mim — como mãe e como educadora — mostrando todos os dias o verdadeiro significado de dedicação.

A todos vocês, minha eterna gratidão

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente ao meu orientador, Dr. Edmar Vaz de Andrade, pela paciência em ensinar, corrigir, orientar e acreditar no meu potencial. Sou grato por cada conselho, por cada revisão e por ter aceitado caminhar comigo nesta etapa tão importante da minha vida acadêmica.

À minha coorientadora, cuja presença sempre trouxe apoio, segurança e aprendizado. Agradeço por me aconselhar, ajudar e, acima de tudo, por me lembrar de sorrir e encontrar alegria mesmo nos momentos mais difíceis.

Expresso minha eterna gratidão à minha família, que sempre esteve ao meu lado — no apoio financeiro, emocional e no amor incondicional. Aos meus irmãos, Gilvan Cardenes, Gefessi Cardenes, Kétene Cardenes e Gilfran Cardenes, por cada gesto de incentivo. E aos meus pais, Gertrudes Cardenes e Arlindo Cardenes, meu porto seguro, exemplos de força e dedicação.

À minha noiva, Betina Raquel, agradeço por todo amor, pela paciência infinita, pelo perdão e por estar sempre comigo, ajudando a me tornar alguém melhor a cada dia.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Proteômica, meu sincero reconhecimento pelo companheirismo, troca de conhecimentos e apoio diário.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse possível, deixo aqui meu muito obrigado.

“O trabalho duro supera o talento natural,
quando o talento não trabalha duro.” —
Masashi Kishimoto

Resumo

A poluição por hidrocarbonetos é reconhecida como um dos principais problemas ambientais das últimas décadas, resultante de derramamentos de petróleo e derivados. Na região amazônica, o risco é agravado pelo alto consumo de óleo diesel utilizado em embarcações, o que potencializa a contaminação de ecossistemas aquáticos e terrestres. Nesse contexto, a biorremediação surge como alternativa promissora para a mitigação desses impactos. Estudos prévios realizados com consórcios bacterianos isolados nas proximidades do porto do Ceasa (Manaus-AM) demonstraram a eficiência do consórcio A3 na degradação de hidrocarbonetos, alcançando taxas superiores a 70% em apenas sete dias. Esta pesquisa teve como foco a identificação e caracterização funcional de três linhagem bacterianas isoladas de ambientes contaminados: *Acinetobacter seifertii* (313), *Achromobacter xylosoxidans* (314) e *Pseudomonas* sp. (316). No caso da cepa 316, pertencente ao gênero *Pseudomonas*, os dados obtidos por análise filogenômica indicam que ela apresenta baixa identidade ANI e valores de dDDH inferiores a 70% em relação às espécies tipo mais próximas, sugerindo tratar-se de uma possível nova espécie de *Pseudomonas*. Através da montagem e anotação genômica, foram identificados genes associados à degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, com destaque para monooxigenases como, *alkB*, *ladA*, *almA* e *CYP450*. Essas enzimas participam das etapas iniciais da oxidação de hidrocarbonetos, facilitando sua entrada em rotas de β -oxidação e subsequente mineralização. As cepas foram avaliadas experimentalmente quanto à sua capacidade de degradar hidrocarbonetos utilizando dois métodos complementares: o ensaio colorimétrico com 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP), e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), que quantifica a degradação específica de n-alcanos presentes no diesel. Os resultados demonstraram que a cepa *Acinetobacter seifertii* (313) apresentou desempenho superior em ambos os testes, degradando entre 76% e 92% dos alcanos (C11–C26), à frente do consórcio bacteriano A3 e das culturas puras 314 e 316. A cepa 314 alcançou taxas de degradação mais modestas, variando de 10% a 52%, enquanto a 316 obteve desempenho intermediário, com variações entre 12% e 53%.

Palavras Chaves: Hidrocarbonetos; Degradação microbiana; *Acinetobacter seifertii*; *Achromobacter xylosoxidans*; *Pseudomonas*.

Abstract

Hydrocarbon pollution is recognized as one of the major environmental problems of recent decades, resulting from oil and petroleum derivative spills. In the Amazon region, the risk is exacerbated by the high consumption of diesel oil used in vessels, which increases the contamination of aquatic and terrestrial ecosystems. In this context, bioremediation emerges as a promising alternative for mitigating these impacts. Previous studies conducted with bacterial consortia isolated near the Ceasa port (Manaus-AM) demonstrated the efficiency of consortium A3 in hydrocarbon degradation, achieving rates above 70% in just seven days. This research focused on the identification and functional characterization of three bacterial strains isolated from contaminated environments: *Acinetobacter seifertii* (313), *Achromobacter xylosoxidans* (314), and *Pseudomonas* sp. (316). For strain 316, belonging to the *Pseudomonas* genus, phylogenomic analysis indicated low ANI identity and dDDH values below 70% compared to the closest type species, suggesting it may represent a potential new *Pseudomonas* species. Through genome assembly and annotation, genes associated with the degradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons were identified, particularly monooxygenases such as *alkB*, *ladA*, *almA*, and *CYP450*. These enzymes participate in the initial stages of hydrocarbon oxidation, facilitating their entry into β -oxidation pathways and subsequent mineralization. The strains were experimentally evaluated for their hydrocarbon-degrading abilities using two complementary methods: the colorimetric assay with 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCPIP), and gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS), which quantifies the specific degradation of n-alkanes present in diesel. The results showed that *Acinetobacter seifertii* (313) exhibited superior performance in both tests, degrading between 76% and 92% of alkanes (C11–C26), outperforming the bacterial consortium A3 and the pure cultures 314 and 316. Strain 314 achieved more modest degradation rates, ranging from 10% to 52%, while strain 316 displayed intermediate performance, varying between 12% and 53%.

Keywords: Hydrocarbons; Microbial degradation; *Acinetobacter seifertii*; *Achromobacter xylosoxidans*; *Pseudomonas*.

LISTA DE SIGLAS

BGCS – agrupamentos de genes biossintéticos

AVERAGE NUCLEOTIDE IDENTITY – ANI

BACTERIAL AND VIRAL BIOINFORMATICS RESOURCE CENTER – BV-BRC

BTEX – Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno

BTEXN – Benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno e naftaleno

CDSs – genes codificadores de proteínas

DCPIP – 2,6-diclorofenol-indofenol

DIGITAL DNA-DNA HYBRIDIZATION – dDDH

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

HPAS – Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

NGS – Next-Generation Sequencing

RAPID ANNOTATION USING SUBSYSTEM TECHNOLOGY – RAST

rRNA. – ribosomal RNA

TCE – pelo tricloroetileno

TRNAS – RNAs transportadores

TYGS – Type Strain Genome Server

USEPA 2020 – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

TPH -hidrocarbonetos de petróleo

DCPIP - 2,6-diclorofenol-indofenol

CAGR - Compound Annual Growth Rate

USD - United States dollar

ITOPF - International Tanker Owners Pollution Federation

Sumário

1.INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Bioeconomia.....	15
2.2 Bioeconomia microbiana.....	16
2.3 Avanços e inovações recentes na bioeconomia microbiana	19
2.4 Biorremediação.....	19
2.5 Poluição por óleo diesel.....	22
2.6 Propriedades de hidrocarbonetos e sua degradação	24
2.7 Microrganismos com capacidade de degradar hidrocarbonetos.....	26
2.9 Potencial do gênero <i>Acinetobacter</i> , <i>Achromobacter</i> e <i>Pseudomonas</i> na degradação de hidrocarbonetos de diesel.	28
2.10 Estratégias genômicas aplicadas à identificação e análise de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos.	29
2.11 Anotação funcional do genoma	31
2.11.1 Mineração de genes com potencial aplicação biotecnológica	31
2.11.2 Anotação de genes especializados em degradação de hidrocarbonetos.	32
2.12 Estudo da atividade metabólica de cepas degradadoras de hidrocarbonetos.....	33
2.13 Especificidade metabólica de degradação microbiana	34
2.14 Estudos dos genes de degradação de alcanos	36
3 OBJETIVO GERAL	38
3.1 Objetivos específicos.....	38
4 JUSTIFICATIVA.....	39
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
5.1. Obtenção das linhagens bacterianas	40
5.2. Extração de DNA genômico.....	41
5.3. Sequenciamento e montagem do genoma	41
5.4 Taxonomia molecular do consórcio A3.....	42
5.5 Mineração genômica e prospecção de produtos naturais com potencial aplicação biotecnológicas.	44
5.6 Anotação funcional dos genomas.....	45
5.7 Anotação das vias de degradação dos hidrocarbonetos.....	45
5.8 Análise de degradação dos hidrocarbonetos pelo consórcio A3 e suas linhagens isoladas 313, 314 e 316.	46
5.8.1 Análise de degradação utilizando DCPIP.....	46
5.8.2 Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC- MS).	46

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
6.1 Montagem do genoma das linhagens Laprot 313, Laprot 314 e Laprot 316.....	48
6.2 Identificação filogenômica das linhagens Laprot 313, Laprot 314 e Laprot 316.	50
6.3 Anotação genômica de linhagens bacterianas do consórcio A3.....	58
6.4 Mineração genômica e prospecção de produtos naturais com potencial aplicação biotecnológicas	65
6.5 Genes de degradação de metais pesados	73
6.6 Anotação funcional de genes especializados na degradação de combustíveis fósseis	74
6.6.1 Degradação de composto aromáticos	74
6.7 Degradação de hidrocarbonetos alifáticos.....	79
6.8 Distribuição genômica de vias de degradação de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos: abordagem baseada em mapa de calor"	87
6.9 Avaliação da Atividade Degradação de alcanos por Redução de DCPIP	88
6.9.1. Redução do DCPIP utilizando Diesel Comercial (C11–C23) como substrato	89
6.9.2 Redução do DCPIP utilizando Diesel Puro (C11–C23) como substrato.....	89
6.9.3 Redução do DCPIP utilizando Gasolina (C5–C12) como substrato.	90
6.9.4 Redução do DCPIP utilizando Petróleo Bruto (C1–C78) como substrato	91
6.10 Degradação de alcanos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometrias de massas (GCMS).....	92
6.10.1 Especificidade de degradação de n-Alcanos por Bactérias Isoladas	98
7 CONCLUSÃO.....	100
8 REFERENCIAS.....	102
9 ANEXO	117

1. INTRODUÇÃO

A bioeconomia é uma abordagem sustentável que visa o uso eficiente de recursos biológicos renováveis, promovendo a inovação e desenvolvimento em setores como agricultura, saúde, biotecnologia e energia. Em um cenário de crescente preocupação com a degradação ambiental, a bioeconomia emerge como uma solução para a substituição de recursos fósseis e o desenvolvimento de novos processos e produtos sustentáveis. Através do uso de matérias-primas renováveis e biotecnologias, a bioeconomia tem o potencial de promover um crescimento econômico mais sustentável, reduzindo a dependência de combustíveis fósseis e diminuindo o impacto ambiental por esses gerados (Salvador et al., 2022). Ampliando essa perspectiva, destaca-se a bioeconomia microbiana, um campo que explora o potencial dos microrganismos na produção de bens e serviços voltados à sustentabilidade, na qual se destaca a utilização dos microrganismos para limpar ambientes contaminados por poluentes (biorremediação). A biorremediação complementa a bioeconomia circular ao contribuir para a restauração de ambientes degradados, permitindo que esses espaços possam ser reutilizados de forma produtiva, como em atividades agrícolas, de reflorestamento ou em processos industriais sustentáveis. Com isso a biorremediação reforça os princípios da bioeconomia circular, que se baseia no reaproveitamento de recursos e na minimização dos impactos ambientais. (Maglione et al., 2024; Akinsemolu et al., 2023).

Dando suporte a essas aplicações, avanços nas ciências ômicas e nas ferramentas de engenharia genética têm permitido a seleção e o aprimoramento de linhagens microbianas com propriedades específicas. Técnicas como o sequenciamento genômico e a edição de genes têm sido empregadas para aumentar a eficiência na degradação de poluentes ou na produção de compostos industriais. Essas inovações tecnológicas não apenas otimizam o desempenho dos microrganismos, como também expandem o escopo de atuação da bioeconomia, oferecendo soluções cada vez mais eficazes para os desafios ambientais contemporâneos (Onyeaka et al., 2022). Entre esses desafios, a contaminação ambiental por óleo diesel se destaca como um dos problemas mais críticos, especialmente em zonas urbanas e industriais. Esse combustível, composto por uma mistura complexa de hidrocarbonetos, apresenta alta resistência à degradação natural, dificultando sua remoção do solo e da água. Vazamentos acidentais de diesel podem causar danos severos a ecossistemas aquáticos e terrestres, além de representar riscos substanciais à saúde humana (Wyszkowski et al., 2021). Essa problemática se intensifica quando se considera

a poluição causada também por derivados do petróleo, como gasolina e querosene, que compartilham a característica de serem compostos recalcitrantes. Sua persistência prolongada no ambiente compromete a biodiversidade, contamina recursos hídricos e afeta a qualidade do solo, exigindo abordagens inovadoras e eficazes para mitigação. Nesse cenário, a biotecnologia surge como uma alternativa promissora, especialmente por meio da biorremediação (Kebede et al., 2022).

A biorremediação, por sua vez, utiliza organismos vivos em especial microrganismos para degradar contaminantes ambientais. Essa estratégia se destaca por seu baixo impacto ecológico em comparação aos métodos convencionais de descontaminação, que frequentemente envolvem substâncias químicas agressivas e custos elevados. No caso dos hidrocarbonetos, microrganismos degradadores metabolizam esses compostos, convertendo-os em substâncias inócuas como dióxido de carbono e água (Patel et al., 2022). Diversas espécies bacterianas têm sido identificadas como eficazes na degradação de hidrocarbonetos, graças à presença de enzimas que lhes conferem essa capacidade metabólica, por exemplo a patente US20080138883A1 (2008) descreve um método para biorremediação que emprega microrganismos encapsulados em suportes biodegradáveis, assim como a patente RU2705290C1 (2019) descreve um consórcio microbiano eficaz na biorremediação de solos contaminados por petróleo, já a patente BR 10 2021 024758 0 (2023) descreve o uso de esferas de quitosana contendo as bactérias *Micrococcus* sp. Hex 06 e *Gordonia* sp. Hex 05, que atuam na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos. A eficiência desses microrganismos, no entanto, é influenciada por fatores como pH, temperatura, concentração de oxigênio e disponibilidade de nutrientes, que afetam diretamente a taxa de degradação (Imam et al., 2021). Nesse contexto, a identificação molecular de microrganismos degradadores de diesel torna-se uma etapa estratégica para otimizar os processos de biorremediação, técnicas como sequenciamento de DNA têm sido amplamente empregadas para identificar genes associados à degradação de hidrocarbonetos. Além disso, a anotação funcional de genomas microbianos tem revelado importantes vias metabólicas e enzimas envolvidas nesse processo, como monooxigenases e dioxigenases (Stancu 2023). Dentre os alvos moleculares mais estudados nesse campo estão os genes *CYP 450*, *alkB*, *ladA* e *almA* que codificam as enzimas essenciais na oxidação inicial de alcanos, etapa chave na degradação de hidrocarbonetos, como os presentes no óleo diesel. A compreensão dos mecanismos de degradação desses genes tem sido crucial para aprimorar estratégias

biotecnológicas aplicadas à remediação ambiental, permitindo a seleção de linhagens com maior desempenho de degradação (Guo et al., 2023).

Diante da crescente demanda por soluções biotecnológicas eficientes na remediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos, este trabalho investiga o potencial de degradação de um consórcio bacteriano denominado (A3) e de suas cepas constituintes isoladas, linhagem 313, linhagem 314 e linhagem 316. As principais perguntas que nortearam este estudo envolvem: (1) qual a eficiência individual e coletiva dessas cepas na degradação de diferentes frações de hidrocarbonetos, como gasolina, diesel comercial, diesel puro e petróleo cru; (2) como o comprimento da cadeia dos n-alcanos influencia a taxa de degradação; e (3) de que forma os genes relacionados à oxidação de alcanos contribuem para o desempenho metabólico observado. Para responder a essas questões, foi empregada a técnica de redução do indicador redox DCPIP Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, permitindo o monitoramento da atividade de degradação. Os resultados obtidos foram analisados com base em parâmetros de absorbância, complementados por inferências genômicas e comparação com dados da literatura. Esta abordagem integrativa possibilitou avaliar não apenas a eficiência das cepas frente a diferentes substratos, mas também as possíveis interações sinérgicas e limitações metabólicas que influenciam o desempenho do consórcio microbiano, com implicações diretas para estratégias aplicadas de biorremediação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bioeconomia

A Amazônia tem sido objeto de atenção em todo o mundo por sua rica natureza, com cerca de 15% de toda a biodiversidade, como 20% da água doce existente e milhares de espécies, assim como pela ameaça a toda essa riqueza que se tornou destaque na imprensa global, devido a causas complexas, acompanhadas pelo cenário de baixo desenvolvimento socioeconômico (Reis, 2022).

Nesse cenário de vulnerabilidade ecológica e social, a destruição contínua da floresta amazônica, o maior ecossistema de floresta tropical remanescente, traz consequências sociais e ambientais impactantes, não apenas para as populações locais, mas também para o clima, a segurança alimentar global e a biodiversidade. Com cerca de 20% da floresta já perdida e a região amazônica se aproximando de um possível ponto crítico, próximo ao chamado ponto de não retorno, em que o ecossistema pode sofrer colapsos irreversíveis, torna-se evidente a urgência de ações voltadas à sua conservação (Rosenfeld, 2024). A grandiosidade da biodiversidade local é tamanha que, por exemplo, estudos mostram que em uma única árvore amazônica podem ser encontradas mais espécies de formigas do que em todo o Reino Unido (Vaugahn, 2015). Diante disso, cresce o interesse por estratégias que conciliem preservação e geração de renda, como o uso sustentável de produtos florestais associado à ascensão do conceito de bioeconomia. A compreensão contemporânea da bioeconomia, no entanto, tem raízes em debates iniciados ainda na década de 1970, quando Georgescu-Roegen (1971) questionou os paradigmas da economia neoclássica ao propor uma visão biofísica da economia, em que natureza e tecnologia seriam pilares para a redução da dependência de recursos não renováveis (Vivien et al., 2019).

A partir da década de 1990, esse debate ganhou um caráter mais técnico, impulsionado pelo desenvolvimento de biotecnologias, como a engenharia genética (Broring et al., 2020), e pela busca por substitutos biológicos renováveis (Bugge et al., 2016). A consolidação da bioeconomia como eixo estratégico ocorreu especialmente a partir de sua incorporação em políticas de desenvolvimento econômico na Europa, com propostas de substituição dos combustíveis fósseis por insumos biológicos, impulsionando empregos, tecnologias verdes e novos mercados (Costa et al., 2022). Com base nesse histórico e diante da criticidade da situação amazônica, fica evidente que a conservação da floresta está diretamente ligada à mitigação de duas grandes crises

contemporâneas: as mudanças climáticas e a perda acelerada da biodiversidade. O atual modelo econômico, centrado na exploração predatória dos recursos naturais, carece de ajustes estruturais profundos. Por isso, torna-se urgente a criação de mecanismos de incentivo que favoreçam o pleno desenvolvimento da bioeconomia na região, a aplicação de tecnologias sustentáveis voltadas à valorização de produtos da sociobiodiversidade, configurando-se como uma opção de grande potencial.

A Amazônia, com sua abundância e diversidade, oferece uma ampla gama de matérias-primas com elevado potencial bioeconômico, capazes de gerar renda e promover o desenvolvimento regional de forma responsável. Nesse sentido, diversas espécies vegetais, frutíferas e microrganismos amazônicos têm sido identificados como fontes de compostos bioativos de alto valor agregado. Estudos científicos têm demonstrado que muitas dessas espécies produzem metabólitos secundários com propriedades anti-inflamatórias, anticancerígenas, antidiabéticas, antimicrobianas, antiglicantes e alelopáticas, além disso, apresentam concentrações expressivas de antioxidantes, vitaminas, fibras e outros compostos funcionais que podem ser aplicados em diversos segmentos industriais (Curimbaba et al., 2020; Peixoto Araujo et al., 2021). Esses recursos naturais podem ser aproveitados por meio de tecnologias limpas e ecologicamente corretas, contribuindo para a construção de cadeias produtivas sustentáveis (Barbosa e Carvalho Junior, 2022; Bergamo et al., 2022; Freitas et al., 2021; Valli et al., 2018).

2.2 Bioeconomia microbiana

A utilização de microrganismos na produção de bens e serviços remonta a civilizações antigas, como no caso dos egípcios que empregavam o fermento na panificação de pães (Lonestar College, 2002). Com o avanço do conhecimento científico, essa prática ancestral evoluiu para uma área estratégica da biotecnologia: a bioeconomia microbiana. Nas últimas décadas, os esforços têm se concentrado no desenvolvimento de microrganismos aprimorados e na otimização de processos industriais. Ferramentas como a engenharia metabólica e a engenharia genética permitiram a utilização de microrganismos com capacidades inovadoras, incluindo a produção de biocombustíveis a partir de matéria-prima não comestível (Hanif, 2022). Paralelamente, tecnologias avançadas de fermentação vêm viabilizando a fabricação de produtos de alto valor, como plásticos biodegradáveis e compostos químicos especializados (Nduko e Tagushi, 2021), além de promoverem alternativas mais sustentáveis a processos intensivos como o refino

de petróleo (Português et al., 2020). Nesse panorama, destaca-se o papel estratégico da bioeconomia microbiana, cuja atuação vai além da produção de bens, ampliando-se para áreas diretamente ligadas à sustentabilidade ambiental. Um dos focos emergentes dessa vertente é a valorização de resíduos e a recuperação de ambientes contaminados por meio da aplicação de microrganismos em processos como a biocatálise, biotransformações e a biorremediação. Essas abordagens utilizam resíduos orgânicos e biomassa como substrato, permitindo tanto a descontaminação de solos e corpos hídricos afetados por poluentes, quanto a conversão desses resíduos em insumos valiosos, como biogás, fertilizantes e compostos bioquímicos de interesse industrial (Joshi et al., 2021; Nattassha et al., 2020).

Tais processos reforçam o protagonismo dos microrganismos em tecnologias limpas, com impactos positivos para a transição rumo a uma economia circular e de baixo carbono. A biocatálise, por exemplo, destaca-se por sua alta seletividade em reações químicas, enquanto as biotransformações já são amplamente empregadas em setores como o farmacêutico, de alimentos e de insumos animais (Singh et al., 2017; Bell et al., 2022). Nisso, a própria biorremediação integra essas abordagens ao empregar mecanismos de biocatálise e biotransformação para degradar, converter compostos contaminantes, reforçando seu potencial como uma ferramenta central para soluções ambientais sustentáveis.

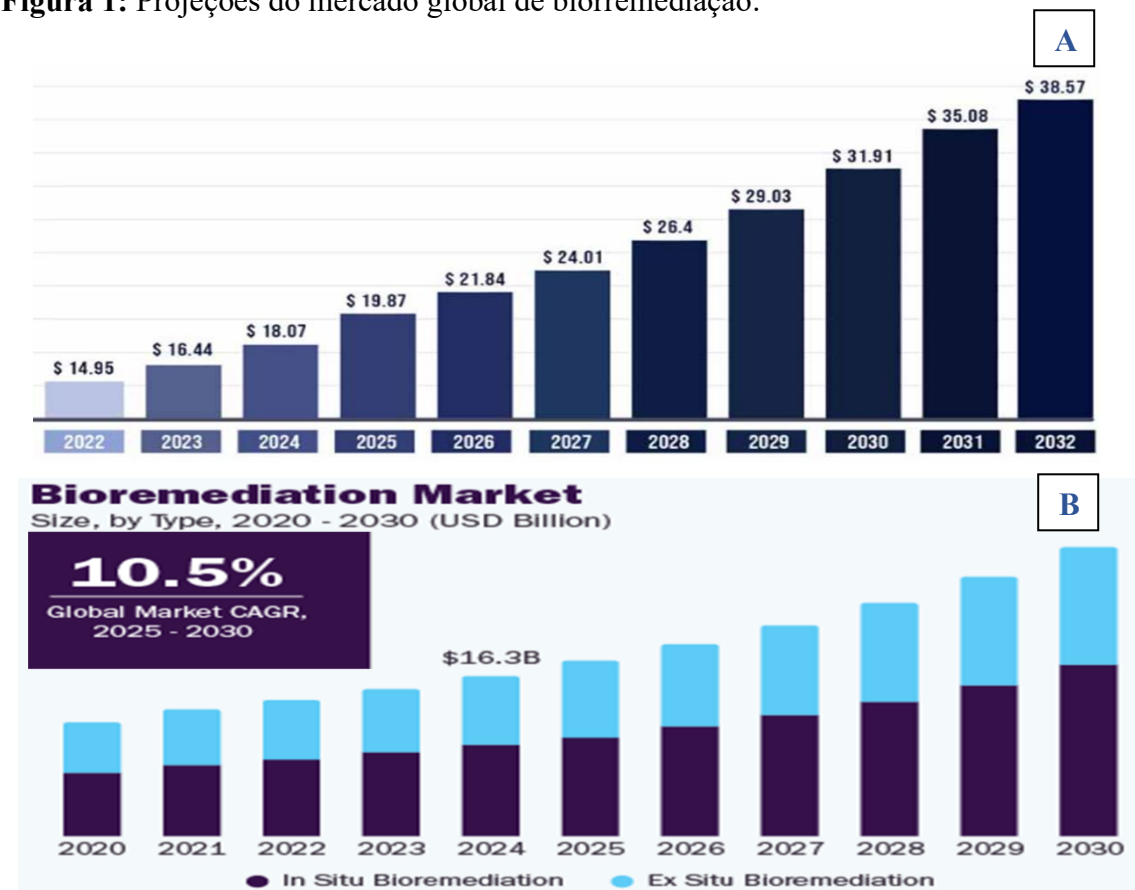
Nesse contexto, compreender as estratégias de aplicação da biorremediação torna-se essencial para otimizar seu desempenho em diferentes cenários de contaminação. A técnica pode ser implementada de forma *in situ*, quando o tratamento ocorre diretamente no local afetado, ou *ex situ*, quando o material contaminado é removido para tratamento em ambiente controlado. Cada abordagem apresenta vantagens e limitações: enquanto a biorremediação *in situ* é menos invasiva e geralmente mais econômica, a *ex situ* permite maior controle sobre os parâmetros físico-químicos do processo. Ambas as estratégias, quando bem conduzidas, contribuem significativamente para a recuperação ambiental, ao mesmo tempo em que reduzem a necessidade de métodos mais agressivos e de maior impacto ecológico (Pérez-Vázquez et al., 2024).

De acordo com a Comissão Europeia (2022), o mercado microbiano global movimentava cerca de 250 bilhões de euros e já caminha para atingir os 700 bilhões previstos até 2030. No setor de biorremediação, observa-se um crescimento expressivo: de USD (United States dólar) 14,95 bilhões em 2022, o mercado projeta ultrapassar USD 38,57 bilhões até 2032, mantendo uma taxa anual composta (CAGR) superior a 9,9%

(Figura 1 – A). Além disso, outros relatórios já indicavam que esse mercado poderia alcançar USD 16,34 bilhões ainda em 2024 (Figura 1 – B), previsão que se confirmou com o impulso gerado pela crescente demanda por soluções sustentáveis e pelos avanços em tecnologias biológicas.

Além da valorização de resíduos e da mitigação de impactos ambientais, esses processos oferecem vantagens econômicas, como a redução de custos operacionais e a criação de novos nichos de mercado. Essa dinâmica é fortemente estimulada por políticas públicas voltadas à economia verde, mudanças nas preferências dos consumidores e regulamentações ambientais mais rigorosas, consolidando a biorremediação e demais estratégias microbianas como alternativas viáveis, eficientes e sustentáveis frente aos desafios ambientais contemporâneos.

Figura 1: Projeções do mercado global de biorremediação.



Fonte: NOVA ONE ADVISOR, 2024 e GRAND VIEW RESEARCH, 2024.
Nota: (A) Projeção do mercado global de biorremediação, com crescimento estimado de USD 14,95 bilhões em 2022 para USD 38,57 bilhões até 2032, com taxa anual composta (CAGR) superior a 9,9%. (B) Estimativa de crescimento validada para o ano de 2024, atingindo USD 16,34 bilhões, impulsionada pela demanda por tecnologias sustentáveis e avanços em biotecnologia.

2.3 Avanços e inovações recentes na bioeconomia microbiana

Os avanços recentes na biotecnologia levaram a um progresso, particularmente no desenvolvimento e aplicação de microrganismos para a produção de bens e serviços. Esses avanços não apenas ampliaram as possibilidades técnicas da biotecnologia microbiana, como também viabilizaram o desenvolvimento de processos e produtos mais sustentáveis, a exemplo da produção de biocombustíveis a partir de resíduos e da aplicação de microrganismos para a biorremediação de ambientes contaminados (Santos-Beneit, 2024).

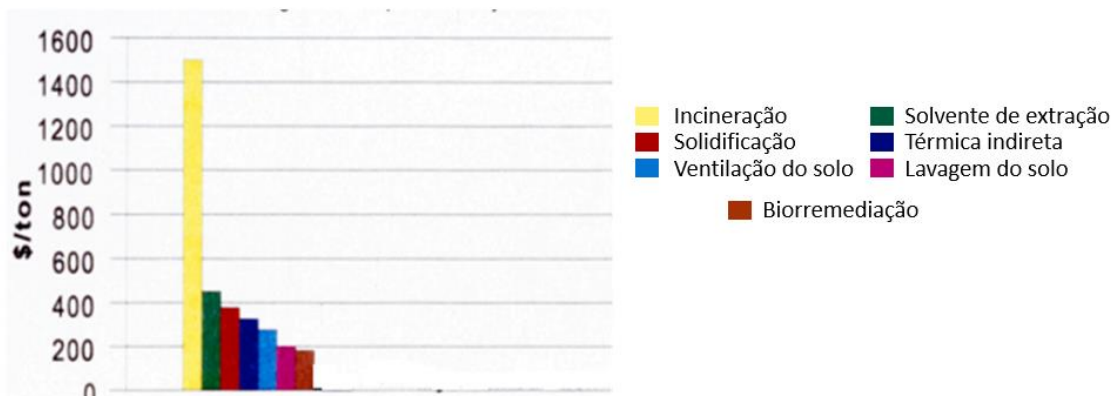
Paralelamente ao avanço técnico científico, observa-se transformações significativas na esfera econômica, com destaque para a consolidação de novos modelos de negócios baseados na bioeconomia microbiana. A emergência de *start-ups* de biotecnologia, aliada à maior disponibilidade de capital de risco em determinados países, tem impulsionado a comercialização de produtos e serviços microbianos em escala global. Entre as principais estratégias comerciais adotadas estão o reaproveitamento de biomassas agroindustriais, a oferta de consultorias especializadas e a prestação de treinamentos técnicos (Donner et al., 2023). Esse movimento evidencia a crescente maturidade do setor, que hoje abrange aplicações comerciais e industriais diversas, incluindo produção de insumos de base biológica, alimentos e rações, recuperação de energia, biorremediação, gestão de resíduos, reciclagem em cascata e cadeias produtivas multipropósito. Entre essas aplicações, destaca-se o papel dos microrganismos na biorremediação, por exemplo, o uso da compostagem microbiana, que transforma resíduos orgânicos em compostos que enriquecem o solo, melhorando propriedades físicas como aeração, infiltração de água, retenção hídrica e estrutura. Essa abordagem sustentável não apenas valoriza os resíduos, como também reduz o volume destinado a aterros sanitários, onde normalmente ocorreriam processos de decomposição (Saradha et al., 2020). A seguir, apresentam-se os principais avanços na área da Biorremediação e como o uso de microrganismos têm contribuído nessa esfera.

2.4 Biorremediação

Os processos de biorremediação convertem substâncias perigosas, como metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e outros compostos tóxicos em compostos não tóxicos ou menos tóxicos. Comparados com outras tecnologias de remediação, os processos de biorremediação oferecem muitas vantagens: 1º - A biorremediação remove elementos perigosos de meios poluídos em vez de simplesmente

transferi-los; 2º - É notavelmente menos prejudicial ao meio ambiente do que os vários métodos físicos e químicos e 3º - por meio de processos de biorremediação, o tratamento de locais de resíduos perigosos pode ser expressivamente menos dispendioso do que quaisquer métodos convencionais (Alori et al., 2022). (Figura 2)

Figura 2: Os principais custos de tecnologias de remediação de solos referente aos hidrocarbonetos de petróleo. Na imagem são listadas diferentes tecnologias como incineração, biorremediação, extração de solventes, solidificação, dentre outros.



Fonte: Adaptado Stamets, 2012

A biorremediação tem se destacado como uma das estratégias mais eficientes e economicamente viáveis para o tratamento de áreas contaminadas, especialmente quando comparada a métodos físicos e químicos convencionais. Técnicas como a incineração de solos, escavação e confinamento de resíduos, ou a aplicação de reagentes químicos para neutralização de contaminantes, geralmente envolvem altos custos operacionais, logísticos e energéticos, além de gerarem resíduos secundários que exigem descarte adequado. Em contrapartida, a biorremediação, particularmente na modalidade *in situ*, utiliza os próprios microrganismos presentes no ambiente para degradar poluentes de forma natural, o que reduz significativamente os gastos com transporte, energia e infraestrutura. Além disso, essa abordagem pode ser conduzida com mínima intervenção mecânica, evitando a remoção de solo e diminuindo o impacto ambiental do processo. Mesmo em sua forma *ex situ*, onde há necessidade de remoção e tratamento em biorreatores ou leitos preparados, a biorremediação ainda apresenta custos inferiores em relação a tecnologias mais agressivas, sendo especialmente vantajosa em projetos de médio e longo prazo voltados à recuperação de áreas degradadas de forma sustentável e com menor impacto financeiro (Kuppan et al., 2024).

Com isso, o processo de biorremediação envolve uma ampla gama de microrganismos capazes de desintoxicar, reduzir, degradar, mineralizar ou transformar

poluentes tóxicos em formas menos nocivas ou não tóxicas. Dessa forma, diversas espécies bacterianas já foram descritas que utilizam compostos orgânicos presentes nos poluentes como fonte de nutrientes e energia para seu crescimento, o que resulta na degradação dos contaminantes ou na sua conversão em substâncias menos prejudiciais. Dentre essas, destacam-se várias bactérias aeróbicas frequentemente associadas à degradação de poluentes, como *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Flavobacterium*, *Nitrosomonas* e *Xanthobacter* (Mehariya et al., 2018; Patel et al., 2016). A eficiência desse processo está intimamente relacionada às características químicas dos poluentes orgânicos, que podem incluir agroquímicos, corantes, metais pesados, plásticos, resíduos nucleares e, como abordado nesta pesquisa, os hidrocarbonetos oriundos de combustíveis fósseis, como o óleo diesel.

2.5 Poluição por óleo diesel

O óleo diesel é um dos combustíveis mais importantes utilizados para alimentar motores a combustão, contudo, também se configura como um dos principais agentes poluentes no ambiente, impactando tanto o solo quanto os corpos d'água, por ser uma mistura complexa, o diesel é amplamente empregado tanto na indústria quanto no cotidiano, ao lado de outros combustíveis fósseis como a gasolina, o querosene e o gás natural (Sarikoç, 2020; Van Hamme et al., 2003). Devido a essa necessidade, a poluição por diesel está frequentemente relacionada a vazamentos em oleodutos, falhas no transporte, problemas em tanques de armazenamento e acidentes com derramamentos. Os impactos resultantes comprometem seriamente o equilíbrio ecológico, representando riscos substanciais à fauna e à flora.

Uma vez derramado, especialmente em águas subterrâneas ou ambientes marinhos, o diesel apresenta comportamento físico-químico que agrava seu impacto ambiental. O óleo insolúvel forma barreiras físicas que impedem a penetração de luz solar e reduzem a oxigenação da água, causando a morte de organismos aquáticos e prejudicando a microbiota local, o que pode levar à perda de biodiversidade, colapso de cadeias ecológicas e danos prejudiciais a seres humanos (Beyer et al., 2016) (Tabela 1). As frações moleculares mais pesadas afundam, acumulando-se nas camadas mais profundas da água, o que dificulta ainda mais sua remoção (Zhao et al., 2016). Além disso, estudos indicam que a água contaminada com diesel pode se tornar ainda mais tóxica do que o próprio óleo em seu estado original, devido às transformações químicas decorrentes da interação com o meio aquático (Khalid et al., 2021; Agency For Toxic Substances And Disease Registry, 1995)

Essa elevação da toxicidade está diretamente relacionada à complexidade de sua composição química, formada majoritariamente por cerca de 64% de hidrocarbonetos alifáticos, especialmente n-alcanos e cicloalcanos e aproximadamente 35% de hidrocarbonetos aromáticos, incluindo compostos monoaromáticos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), enquanto os 1% restantes correspondem a olefinas (Lominchar et al., 2018).

Tabela 1: Efeitos dos derramamentos de óleo em diferentes organismos em diferentes locais.

Localização	Organismo	Fonte	Efeito	Referência
Tondiarpet, Chennai	Humano	Benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno e naftaleno (BTEXN)	Alto risco cancerígeno	Rajasekhar et al 2020
-	<i>Hippocampus reidi</i> (cavalo-marinho)	Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX)	Alterações na morfologia patológica e alteração do epitélio branquial	Delunardo et al 2020
Fiorde de Van-Mijen, Suécia	Bactérias, pequenos fitoplânctons e nanoflagelados heterotróficos	HPAs	Mudanças na estrutura e na biomassa do principal grupo funcional	Pančić et al 2019
Trondheimsfjorden, Noruega	<i>Gadus morhua</i> L. (bacalhau do Atlântico)	Óleo bruto naftênico	Toxicidade aguda e tardia, deformação morfológica, deformação da coluna vertebral, aumento da taxa de mortalidade, alterações no desenvolvimento craniofacial e da mandíbula	Hansen et al 2019
Heishijiao, China	<i>Ulva pertusa</i> (macroalga)	Óleo combustível e óleo diesel	Inibição do crescimento e alteração do conteúdo de ácidos graxos	Liu et al 2019
Obuaku, Estado de Abia Nigéria	Pecuária (gado)	HPAs	Alto risco não cancerígeno	Ugochukwu et al 2018
Skjervøy, norte da Noruega	<i>Mytilus edulis</i> spp.	HPAs	Estresse oxidativo e modulação da	Breitwieser et al 2018

		(mexilhões azuis)			função imunológica	
Ring Jos, Nigéria	Road,	Humano	Benzo(a)pireno e benzo(a)antraceno		Risco para a saúde não cancerígeno e cancerígeno	Ugochukwu et al 2018
Paranaguá, sul do Brasil (Baía subtropical)		<i>Anomalocardia flexuosa</i> (amêijoia)	Óleo diesel e HPAs		Alterações na atividade das enzimas antioxidantes e no nível de peróxidos lipídicos	Sardi sulvar án et al 2016

Fonte: Adaptado de Khalid, 2021.

2.6 Propriedades de hidrocarbonetos e sua degradação

A contaminação por hidrocarbonetos provenientes combustíveis fósseis se tornou um sério problema ambiental, isso não só aumenta as preocupações com a saúde humana, mas também com o ecossistema. Em 2019, de acordo com as estatísticas apresentadas pela *International Tanker Owners Pollution Federation Ltd. (ITOPF)*, o volume total de derramamentos persistentes e não persistentes de hidrocarbonetos no meio ambiente registrados foi de cerca de 1000 toneladas. As estatísticas também relatam dois derramamentos médios e um grande derramamento variando de 7 a 700 toneladas que ocorreu em 2019 (ITOPF, 2019).

Nesse cenário os hidrocarbonetos, que incluem três grandes classes: os alifáticos (como alcanos, alcenos e alcinos), os aromáticos (mono e policíclicos) e os compostos contendo heteroátomos (enxofre, nitrogênio, oxigênio). Dentre esses, os hidrocarbonetos alifáticos, especialmente os alcanos, estão presentes em grande proporção no diesel comercial, variando entre 50 a 70% da composição total, dependendo da origem e do refino do produto (ITRC, 2022). Os alcanos são hidrocarbonetos saturados formados por cadeias lineares (n-alcanos), ramificadas ou cíclicas. Os n-alcanos presentes no diesel variam geralmente de C9 a C26. Em um cenário de derramamento, esses compostos possuem alta hidrofobicidade, o que influencia sua distribuição ambiental. Alcanos de cadeia curta (C9–C12) tendem a volatilizar mais rapidamente, enquanto os de cadeia média e longa (C13–C26) permanecem aderidos ao sedimento, vegetação ou em camadas da superfície da água (ITRC, 2022). A biodisponibilidade dos n-alcanos no ambiente é determinada por fatores como viscosidade do óleo, adsorção a partículas sólidas, formação de agregados e tensão superficial. Esses fatores dificultam o contato com

microrganismos degradadores, tornando necessário o uso de biossurfactantes ou agentes emulsificantes naturais ou artificiais para aumentar sua solubilidade e absorção pelas células bacterianas (Nikolova e Gutierrez, 2021).

E embora os n-alcanos sejam considerados menos tóxicos do que os hidrocarbonetos aromáticos, eles ainda representam risco ecológico, especialmente para organismos aquáticos e bentônicos em fases iniciais de desenvolvimento. Sua toxicidade está associada principalmente à sua capacidade de perturbar membranas biológicas e provocar efeitos narcóticos em peixes e invertebrados, principalmente os alcanos de cadeia média (C12–C16) (Kuppusamy et al., 2020). Além disso, alcanos longos (C20–C26) tendem a apresentar maior recalcitrância, ou seja, resistência à degradação biológica, devido à sua baixa solubilidade em água, alto peso molecular e dificuldade de transporte através da membrana celular bacteriana.

Mesmo entre microrganismos especializados, a degradação desses compostos ocorre de forma mais lenta e demanda maior energia enzimática, geralmente associada a grupos de hidroxilases como expressa pelo gene *CYP 450*, *alkB*, *AlmA* e *LadA* (Varjani, 2017).

Enquanto os HPAs são amplamente reconhecidos por sua toxicidade, mutagenicidade e persistência no ambiente, os n-alcanos têm sido historicamente subestimados em relação aos HPAs, a abundância relativa de alcanos, especialmente em frações do diesel, os torna um alvo prioritário, sua remoção eficiente é necessária para evitar acúmulo em ambientes (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB, 2025). Estudos demonstram que a degradação dos n-alcanos pode inclusive facilitar o acesso dos microrganismos a outras frações mais recalcitrantes, como os HPAs. Além disso, sua presença contínua em ambientes aquáticos pode favorecer a seleção de comunidades microbianas com perfis catabólicos especializados, o que, embora benéfico para a biorremediação, pode desequilibrar ecossistemas naturais (Cruz e Marsiaoli, 2012). Portanto, apesar de sua menor toxicidade individual, a relevância dos n-alcanos na contaminação ambiental está relacionada à sua ubiquidade, persistência relativa e impacto indireto na ecologia microbiana e química do ambiente. Considerá-los como alvo prioritário em programas de biorremediação é essencial para estratégias integradas e eficazes de recuperação ambiental.

Além de sua alta abundância no óleo diesel, petróleo e derivados, os hidrocarbonetos alifáticos, particularmente os alcanos lineares (n-alcanos), constituem uma fração prioritária em estratégias de remediação devido à sua ampla dispersão no

ambiente. Estudos conduzidos na Ilha de Khark, Irã, demonstraram que 26 tipos de hidrocarbonetos alifáticos estavam associados a fontes de poluição mistas, com destaque para efluentes industriais, insumos petrolíferos e deposição atmosférica contendo metais pesados e contaminantes orgânicos persistentes (Akhbarizadeh et al., 2016; Jafarabadi et al., 2017). Tais contextos reforçam a necessidade de estratégias de remediação que considerem também a complexidade das interações entre compostos alifáticos e contaminantes co-ocorrentes. Particularmente, compostos como os hidrocarbonetos alifáticos clorados, representados pelo tricloroetileno (TCE), são reconhecidos por sua recalcitrância, toxicidade elevada e propriedades carcinogênicas, o que os torna contaminantes prioritários em águas subterrâneas em diversas regiões dos Estados Unidos (Li et al., 2017).

Do ponto de vista da biodegradação, os primeiros estudos em ambientes marinhos indicaram que os n-alcanos são mais prontamente degradados do que os alcanos cíclicos, cuja estrutura conformacional confere maior estabilidade química e toxicidade, fatores que contribuem para sua persistência ambiental (Ejaekel et al., 2015). Isso reforça o conceito de que, mesmo entre compostos alifáticos, existem graus distintos de complexidade estrutural que afetam diretamente sua biodegradabilidade. Em geral, quanto mais complexas e ramificadas forem as ligações moleculares de um hidrocarboneto, menor será sua solubilidade em água e maior sua recalcitrância, dificultando o acesso enzimático e a ação microbiana (Imron et al., 2020).

Portanto, considerando a ampla distribuição ambiental, os diferentes graus de toxicidade e a variabilidade estrutural dos hidrocarbonetos alifáticos, os n-alcanos se destacam não apenas por sua relevância quantitativa nos derramamentos de diesel e petróleo, mas também como ponto de partida crítico para processos de remediação. Sua degradação pode permitir maior acesso às frações mais recalcitrantes e tóxicas, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, evidenciando a necessidade de estratégias integradas que combinem abordagem por classes químicas e condições ambientais locais.

2.7 Microrganismos com capacidade de degradar hidrocarbonetos

O carbono é o nutriente mais importante para os microrganismos, os quais têm sido amplamente estudados em diferentes ambientes devido ao seu potencial na biorremediação de hidrocarbonetos. Entre os gêneros com aplicações promissoras nesse processo, destacam-se *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Xanthobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*,

Flavobacterium, *Nitrosomonas*, entre outros (Sharma et al., 2021; Giri et al., 2021). Esses microrganismos têm demonstrado a capacidade de degradar diversos contaminantes orgânicos, como pesticidas, hidrocarbonetos alcanos e compostos poliaromáticos, utilizando-os frequentemente como fonte de carbono e energia (Tarekegn et al., 2020).

Além disso é possível melhorar a eficácia da biorremediação aumentando a capacidade de biodegradação de microrganismos empregados usando as mais recentes tecnologias de suporte, no qual se inclui os microrganismos geneticamente modificados (EGM).

2.8 Consórcios Bacterianos na degradação de diesel

Nas últimas décadas, a utilização de consórcios bacterianos nativos tem se consolidado como uma estratégia promissora para a biodegradação de misturas complexas de hidrocarbonetos derivados do petróleo. Esses consórcios combinam diferentes capacidades metabólicas em uma única comunidade, permitindo que compostos de difícil degradação sejam transformados de forma mais eficiente (Pal et al., 2024; Xu et al., 2018). O efeito sinérgico entre as espécies envolvidas amplia o espectro de biodegradação, tornando os consórcios mais eficazes que muitas culturas isoladas em ambientes contaminados. De fato, espécies bacterianas individuais raramente conseguem degradar todos os constituintes do petróleo e derivados, dada a complexidade e a diversidade química desse combustível (Kour et al., 2021). Nesse contexto, os consórcios bacterianos se destacam pela complementaridade funcional, já que diferentes microrganismos atuam em etapas metabólicas distintas, assegurando um processo mais completo e sustentável de biorremediação.

Além da complementaridade metabólica, outro aspecto que fortalece o uso de consórcios é a diversidade funcional, como a produção de biossurfactantes, que aumenta a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos. Um exemplo emblemático foi descrito por Chen et al., (2020), que construiu um consórcio formado por *Dietzia* sp. CN-3 e *Acinetobacter* sp. HC8-3S. Enquanto uma cepa atuava diretamente na degradação dos hidrocarbonetos, a outra produzia biossurfactantes que facilitavam o acesso aos compostos hidrofóbicos. O resultado foi uma degradação significativamente maior do total de hidrocarbonetos de petróleo (TPH) em comparação às culturas isoladas.

Apesar dessa vantagem, estudos recentes apontam que cepas bacterianas isoladas ainda desempenham um papel importante em determinados cenários, Renuka et al., (2025) mostraram que, embora consórcios possuam maior abrangência metabólica, cepas

únicas altamente eficientes podem ser empregadas com sucesso, seja em aplicações diretas ou como componentes centrais no desenho de consórcios personalizados para misturas específicas de contaminantes. De modo semelhante, Barzegar et al. (2025) observaram que a superioridade entre culturas mistas ou isoladas depende do contexto: em certas condições ambientais, uma cepa única pode apresentar desempenho comparável ou até superior ao de consórcios.

Assim, a literatura recente evidencia que consórcios bacterianos oferecem vantagens claras em termos de eficiência, mas também reforça a importância de compreender o desempenho de cepas individuais. O caminho mais promissor para a biorremediação de ecossistemas contaminados parece residir na combinação equilibrada dessas duas abordagens: valorizando a eficiência singular de determinadas bactérias e, ao mesmo tempo, explorar a complexidade funcional dos consórcios.

2.9 Potencial do gênero *Acinetobacter*, *Achromobacter* e *Pseudomonas* na degradação de hidrocarbonetos de diesel.

A biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos do óleo diesel, é uma boa estratégia para mitigar os impactos ambientais desse poluente. Diversas bactérias têm sido identificadas com a capacidade de degradar esses compostos, onde podemos estar destacando o gênero *Acinetobacter*, *Achromobacter* e *Pseudomonas*.

Acinetobacter é conhecida por sua capacidade de sobrevivência em ambientes adversos. Estudos têm demonstrado que o gênero *Acinetobacter* são capazes de degradar hidrocarbonetos presentes no diesel, utilizando-os como única fonte de carbono e energia. Por exemplo, *Acinetobacter baumannii* mostrou uma taxa de degradação de aproximadamente 61% de diesel após 21 dias de incubação, indicando seu potencial em processos de biorremediação (Jerin et al., 2021). Já o gênero *Achromobacter*, apresenta capacidade metabólica versátil permitindo a degradação de diversos compostos orgânicos, incluindo hidrocarbonetos. Pesquisas identificaram linhagens com eficiência significativa na degradação de diesel, alcançando taxas de remoção de até 96,6% em 10 dias de incubação (Deng et al., 2014). Além disso, sua habilidade em formar biofilmes e produzir biosurfactantes contribui para a emulsificação e subsequente degradação dos hidrocarbonetos. O gênero *Pseudomonas* engloba diversas espécies reconhecidas por sua capacidade de degradar uma ampla gama de hidrocarbonetos, *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, demonstrou eficiência na degradação de diesel, removendo até 79,3% do contaminante após 7 dias de incubação (Liu et al., 2022). Além disso, linhagens como

Pseudomonas aeruginosa DTF1 foram capazes de degradar alcanos de cadeia longa (C20–C26) presentes no diesel, aumentando a eficiência de remoção do contaminante em solos contaminados (Yang et al., 2023).

A utilização de bactérias do gênero *Acinetobacter*, *Achromobacter* e *Pseudomonas* em processos de biorremediação pode ser uma abordagem eficaz para a degradação de hidrocarbonetos presentes no petróleo e derivados como o óleo diesel. Suas capacidades metabólicas, aliadas à produção de biossurfactantes e formação de biofilmes, destacam essas bactérias com grande potencial para aplicação em processos de biorremediação de ambientes contaminados por petróleo e derivados. A seleção e aplicação adequadas dessas linhagens podem contribuir para a recuperação de ecossistemas afetados por hidrocarbonetos.

2.10 Estratégias genômicas aplicadas à identificação e análise de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos.

O avanço das tecnologias de sequenciamento de nova geração *Next-Generation Sequencing* (NGS) revolucionou a microbiologia ambiental, permitindo análises genômicas detalhadas de microrganismos isolados de ambientes contaminados. No contexto da biorremediação, essas abordagens têm se mostrado essenciais para identificar com precisão as espécies envolvidas na degradação de poluentes e, sobretudo, para elucidar os conjuntos gênicos responsáveis por essas atividades metabólicas especializadas Satam et al., 2023. A montagem genômica representa o primeiro passo crucial na caracterização molecular de microrganismos. Essa montagem consiste na reconstrução da sequência genômica completa a partir de leituras geradas por plataformas como *Illumina*, assim como abordagens híbridas, que combinam alta precisão de leituras curtas com o poder de contiguidade de leituras longas, e isso tem sido amplamente recomendadas para microrganismos ambientais, cuja composição genômica pode incluir plasmídeos, ilhas genômicas, elementos genéticos móveis e repetições (Koren et al., 2015).

Tradicionalmente, a identificação bacteriana era baseada em sequências do gene 16S RNA ribossômico (rRNA). No entanto, esse marcador apresenta limitações importantes, especialmente quando se busca discriminar espécies próximas ou avaliar relações filogenéticas com resolução genômica (Ramos et al., 2025). Nesse sentido, plataformas como o *Type Strain Genome Server* (TYGS) oferecem ferramentas robustas para análise filogenômica, utilizando comparações baseadas em genomas completos, com

o suporte de algoritmos como o dDDH (*digital DNA-DNA hybridization*) e ANI (*Average Nucleotide Identity*) (Meier-Kolthoff & Göker, 2019). Valores de dDDH superiores a 70% e ANI acima de 95% são atualmente adotados como critérios de referência para a delimitação de espécies bacterianas (Chun et al., 2018). No presente estudo, a análise genômica das linhagens evidenciou relações próximas com linhagens-tipo específicas, o que reforça sua correta identificação e valida sua inclusão em análises funcionais voltadas à degradação de hidrocarbonetos.

A aplicação de estudos genômicos em microrganismos degradadores de hidrocarbonetos possibilita não apenas sua identificação precisa, mas também o rastreamento de genes adaptativos relacionados à sobrevivência em ambientes contaminados. Entre esses estão genes associados ao transporte de compostos hidrofóbicos, regulação do estresse oxidativo, resistência a metais pesados e vias catabólicas específicas para n-alcenos e compostos aromáticos (Rojo, 2009; van Beilen & Funhoff, 2007). Ademais, essa abordagem permite detectar regiões genômicas codificantes de produtos naturais com interesse biotecnológico, como biossurfactantes e sideróforos, que favorecem a solubilização de contaminantes e conferem vantagens ecológicas na competição microbiana.

Diante disso, diversos gêneros bacterianos têm sido isolados de solos e ambientes aquáticos, demonstrando capacidade para degradar hidrocarbonetos. A identificação de linhagens indígenas com esse potencial é especialmente relevante em contextos regionais como o da Amazônia, onde derramamentos acidentais ou decorrentes da atividade de transporte fluvial representam fontes significativas de poluição em ecossistemas aquáticos e terrestres. Nesses cenários, o uso de isolados nativos na biorremediação é vantajoso, pois eles apresentam maior adaptação ao ambiente local e, conseqüentemente, maior eficiência em processos de recuperação ambiental. A identificação dessas bactérias começa com o sequenciamento de seus genomas, etapa que permite a obtenção da sequência completa dos nucleotídeos que compõem seu DNA. Posteriormente, é realizada a anotação funcional, composta por duas etapas principais: a identificação de genes e a predição de suas funções com base em bancos de dados genômicos (Zhou et al., 2022).

2.11 Anotação funcional do genoma

2.11.1 Mineração de genes com potencial aplicação biotecnológica

Microrganismos sintetizam compostos bioativos de baixo peso molecular como parte de seu metabolismo secundário, estes metabólitos podem apresentar atividades antimicrobianas, anticancerígenas, antifúngicas, antivirais e outras bioatividades relevantes para aplicações na medicina e agricultura. A mineração de genoma vem se consolidando como uma ferramenta poderosa para explorar, acessar e analisar a biodiversidade desses compostos. A análise de antibióticos e metabólitos especializados utilizando a plataforma antiSMASH" (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>) auxilia pesquisadores em suas tarefas de mineração de genoma microbiano desde 2011, tanto como servidor *web* gratuito quanto como ferramenta autônoma sob licença de código aberto, sendo a ferramenta mais utilizada para detectar e caracterizar agrupamentos de genes biossintéticos (BGCs) em arqueas, bactérias e fungos (Mohamadkhani, 2021). Nessa abordagem, os avanços nas técnicas genômicas revelaram que espécies bacterianas e fúngicas codificam muito mais grupos genéticos biossintéticos BGCs do que se pensava anteriormente, com apenas cerca de 10% sendo expressos em condições de laboratório, significando que muitos metabólitos especializados ainda precisam ser descobertos com seus BGCs. Isolar bactérias de nichos ambientais e minerar seus genomas para descoberta de novos BGCs é, portanto, uma alternativa para o desenvolvimento de compostos bioativos, essa abordagem tem o potencial de levar à descoberta de novos compostos com propriedades únicas e aplicações em diversos campos, como a indústria farmacêutica, cosmética e de biotecnologia (Devine et al 2021).

Nessa perspectiva, a análise retrospectiva do espaço químico de todos os produtos naturais publicados derivados da biodiversidade microbiana e marinha do período de 1941 – 2015, abrange uma ampla variedade de origens biossintéticas, e demonstra que os produtos naturais conhecidos, ocupam uma parte relativamente estreita do espaço químico natural disponível, indicando uma oportunidade para novas descobertas de compostos (Pye et al., 2017 e Palazzolo 2017). Ao mesmo tempo, existem sérias preocupações quanto às limitações das abordagens tradicionais de triagem de produtos naturais para fornecer novos compostos, enquanto avanços no sequenciamento de DNA nos mostraram que a maior parte do potencial biossintético codificado em genomas microbianos não é expresso em condições de laboratório e espera para ser descoberto (Genilloud, 2019). Para descobrir novas moléculas com potencial aplicação

biotecnológica, os microbiologistas estão se voltando cada vez mais para o sequenciamento de genomas de uma ampla variedade de microrganismos. No entanto, identificar rapidamente e com confiança todos os grupos de genes potenciais para metabólitos especializados em dezenas de genomas recentemente sequenciados tem sido uma tarefa difícil, devido à sua heterogeneidade bioquímica, à presença de enzimas desconhecidas e à natureza dispersa das ferramentas e recursos de bioinformática especializados necessários.

2.11.2 Anotação de genes especializados em degradação de hidrocarbonetos.

A anotação genômica representa uma etapa essencial após a montagem do genoma, pois permite traduzir as sequências de DNA em informações biológicas interpretáveis. No contexto da microbiologia ambiental, especialmente no estudo de cepas bacterianas degradadoras de hidrocarbonetos, essa abordagem revela não apenas a arquitetura básica do genoma, mas também os genes responsáveis por vias metabólicas específicas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos e outros contaminantes ambientais. Ferramentas amplamente utilizadas, como RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) e o BV-BRC (*Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center*), têm se mostrado eficientes na detecção de genes bacterianos com alta acurácia (Seemann, 2014; Tatusova et al., 2016). Essas plataformas baseiam-se em bancos de dados funcionais e métodos de comparação por similaridade, possibilitando gerar anotações baseadas em funções conhecidas, levando a predição de processos biológicos dos genes com base em bases de dados como KEGG e UniProt. Particularmente em microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, a identificação de genes relacionados à degradação de compostos como n-alcanos, benzeno, tolueno, fenol e HPAs tem despertado crescente interesse na biotecnologia ambiental. Esses genes são alvos de atenção tanto pelo seu valor ecológico quanto pelas aplicações práticas em estratégias de bioremediação (Ehis et al 2020).

A análise funcional de genomas bacterianos é uma tarefa complexa, que exige a integração de múltiplas ferramentas bioinformáticas e a curadoria manual de resultados, garantindo a confiabilidade da função atribuída a cada gene (Li et al., 2013). Essa complexidade é especialmente acentuada quando se busca genes especializados na biodegradação de hidrocarbonetos, os quais podem ser explorados para o desenvolvimento de biocatalisadores, biossensores ou microrganismos geneticamente modificados. A anotação de tais genes permite não apenas o entendimento da biologia

das cepas envolvidas, mas também embasa o desenvolvimento de estratégias de biorremediação mais eficazes e direcionadas, além de servir como base para a engenharia genética de cepas bacterianas com maior desempenho catabólico (Coa et al., 2009; Peixoto et al., 2011). Adicionalmente, em ambientes contaminados simultaneamente por hidrocarbonetos e metais pesados, como áreas de mineração de ouro ou zonas costeiras afetadas por vazamentos de óleo, a presença de genes de resistência metálica torna-se crucial para a sobrevivência e funcionalidade das comunidades microbianas. Evidências apontam que a co-ocorrência de hidrocarbonetos e metais pesados atua como força seletiva, favorecendo o enriquecimento de determinantes genéticos de resistência não apenas a metais, mas também a antibióticos (Long et al 2021). A anotação desses genes, fornece dados valiosos sobre a adaptabilidade microbiana e seu potencial em ambientes co-contaminados, onde mesmo níveis residuais de metais podem impactar significativamente a dinâmica ecológica e a efetividade da remediação (Nies, 2003).

2.12 Estudo da atividade metabólica de cepas degradadoras de hidrocarbonetos

O ensaio com 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) é baseado na capacidade do microrganismo de oxidar hidrocarbonetos e transferir elétrons ao corante, promovendo a mudança de coloração de azul (forma oxidada) para incolor (reduzida). Essa mudança serve como indicador visual da atividade metabólica aeróbica e tem sido amplamente utilizada para triagem funcional de microrganismos degradadores. Estudos demonstraram que cepas do gênero *Bacillus* isoladas de aquíferos contaminados com diesel foram capazes de reduzir DCPIP com alta eficiência, especialmente quando cultivadas com hexadecano e outros n-alcenos (Lima et al 2020). De forma semelhante, Kubota et al. (2008) utilizaram o ensaio DCPIP para avaliar a atividade oxidativa de linhagens dos gêneros *Acinetobacter*, *Rhodococcus* e *Gordonia*, demonstrando que a descoloração do corante correspondia diretamente à capacidade das cepas em metabolizar diferentes frações de hidrocarbonetos, reforçando a aplicabilidade do método como ferramenta rápida e sensível na seleção de bactérias com potencial aplicação em processo de biorremediação.

Complementarmente, a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) oferece um método quantitativo e altamente resolutivo para mensurar a degradação de hidrocarbonetos específicos. No estudo de Lima et al. (2020), a cepa *Bacillus* sp. L30 demonstrou capacidade de degradar n-alcenos de C10 a C27 presentes no diesel, com redução expressiva das áreas de pico

cromatográfico após sete dias de cultivo. Essa análise permite não apenas confirmar a degradação, mas também revelar padrões de seletividade por tamanho de cadeia, como maior afinidade por alcanos de cadeia longa. Estudos como o de Mohanty e Mukherji (2008) reforçam essa abordagem ao demonstrar que culturas bacterianas de *Exiguobacterium aurantiacum* e *Burkholderia cepacia* foram capazes de degradar eficientemente alcanos na faixa de C9 a C26, e também houve uma forte correlação entre a abundância inicial dos alcanos e a taxa de biodegradação, destacando a sensibilidade da técnica na detecção de mudanças na distribuição dos n-alcanos ao longo do tempo. A GC-MS, portanto, não apenas quantifica a degradação, mas permite observar alterações no perfil composicional do diesel, como a assimetria na distribuição de n-alcanos residuais e a resistência relativa de compostos de cadeia muito longa (como C20–C25). Assim, a integração entre GC-MS e ensaios funcionais como DCPIP constitui uma abordagem robusta para a avaliação da eficiência biodegradação de cepas bacterianas aplicadas à biorremediação.

2.13 Especificidade metabólica de degradação microbiana

A capacidade dos microrganismos em degradar hidrocarbonetos está intimamente relacionada à sua especificidade metabólica, a qual determina os tipos de compostos que podem ser utilizados como fontes de carbono e energia. Essa especificidade depende de diversos fatores, incluindo a estrutura química dos hidrocarbonetos, a presença e regulação de vias metabólicas especializadas, bem como das condições ambientais em que os microrganismos estão inseridos. De modo geral, n-alcanos de cadeia linear tendem a ser mais facilmente biodegradados do que hidrocarbonetos ramificados, cíclicos ou aromáticos policíclicos (HPAs), devido à menor complexidade estrutural e maior acessibilidade enzimática desses compostos lineares (Varjani, 2017).

Diversas espécies bacterianas demonstram notável adaptação à degradação de classes específicas de hidrocarbonetos, mediada por conjuntos enzimáticos especializados. Por exemplo, *Alcanivorax borkumensis* é reconhecida por sua eficiência na degradação de n-alcanos presentes no petróleo, utilizando enzimas como as alcano hidroxilases, que iniciam o processo oxidativo (Schneiker et al., 2006). Em contraste, *Novosphingobium pentaromativorans* apresenta competência para degradar HPAs de alto peso molecular, devido à presença de genes que codificam enzimas como as dioxigenases, capazes de abrir os anéis aromáticos e viabilizar sua metabolização (Romine et al., 1999).

Essas especificidades ilustram como as rotas metabólicas microbianas são moldadas pela natureza dos compostos disponíveis no ambiente.

Em nível molecular, a estrutura das enzimas também exerce influência direta sobre a seletividade da degradação. Estudos mostram que pequenas variações na composição de aminoácidos das enzimas, especialmente nos canais de entrada do substrato, podem alterar significativamente a preferência por diferentes comprimentos de cadeia de alcanos. Resíduos com cadeias laterais maiores tendem a favorecer a oxidação de alcanos de cadeia curta, enquanto resíduos menores ampliam a compatibilidade com alcanos de cadeia longa, como os C12 ou superiores (Groves et al., 2023). Além disso, muitas bactérias possuem múltiplas variantes de monooxigenases com distintas preferências catalíticas, permitindo que um mesmo organismo atue sobre uma faixa diversa de substratos (Gunasekera et al., 2025). Essa flexibilidade é ampliada pela existência de variantes enzimáticas com eficiência máxima para comprimentos específicos de cadeia de carbono, embora também apresentem alguma atividade sobre compostos vizinhos (Naing et al., 2013).

Outro aspecto essencial na modulação da especificidade metabólica é a regulação da expressão gênica. A simples presença de genes catabólicos não garante sua atividade funcional, pois muitos desses genes são expressos apenas sob estímulos ambientais específicos, como a presença de hidrocarbonetos ou a limitação de outras fontes de carbono. Mecanismos regulatórios sofisticados, como os sistemas tipo *LuxR*, atuam como sensores e ativadores transcricionais, promovendo a expressão gênica apenas em contextos ecológicos favoráveis (Yu et al., 2020). Essa regulação confere uma vantagem adaptativa importante, evitando o gasto energético desnecessário com a produção de enzimas em ambientes desfavoráveis.

Paralelamente, a eficácia da degradação microbiana está condicionada à biodisponibilidade dos hidrocarbonetos no ambiente. Compostos hidrofóbicos tendem a se adsorver a partículas sólidas ou formar agregados que reduzem sua acessibilidade às células microbianas. Para contornar essa limitação, algumas bactérias produzem biossurfactantes, como rhamnolipídios e surfactinas, que aumentam a solubilidade dos hidrocarbonetos e facilitam sua captação e metabolização (Elayaperumal et al., 2025). Dessa forma, a produção de biossurfactantes se torna um mecanismo adicional de adaptação, integrando-se à especificidade metabólica.

Além disso, a presença de condições ambientais desafiadoras, como pH extremos, limitação de oxigênio ou escassez de nutrientes, pode induzir a ativação de vias

metabólicas específicas, ajustadas à degradação de compostos mais complexos. Em certos casos, a degradação ocorre via co-metabolismo, em que o microrganismo transforma um composto de forma incidental, enquanto utiliza outro como principal fonte de energia. Esse processo é especialmente comum na transformação de hidrocarbonetos recalcitrantes e ressalta a importância de consórcios microbianos, nos quais diferentes espécies contribuem com etapas complementares da degradação (Nzila, 2013).

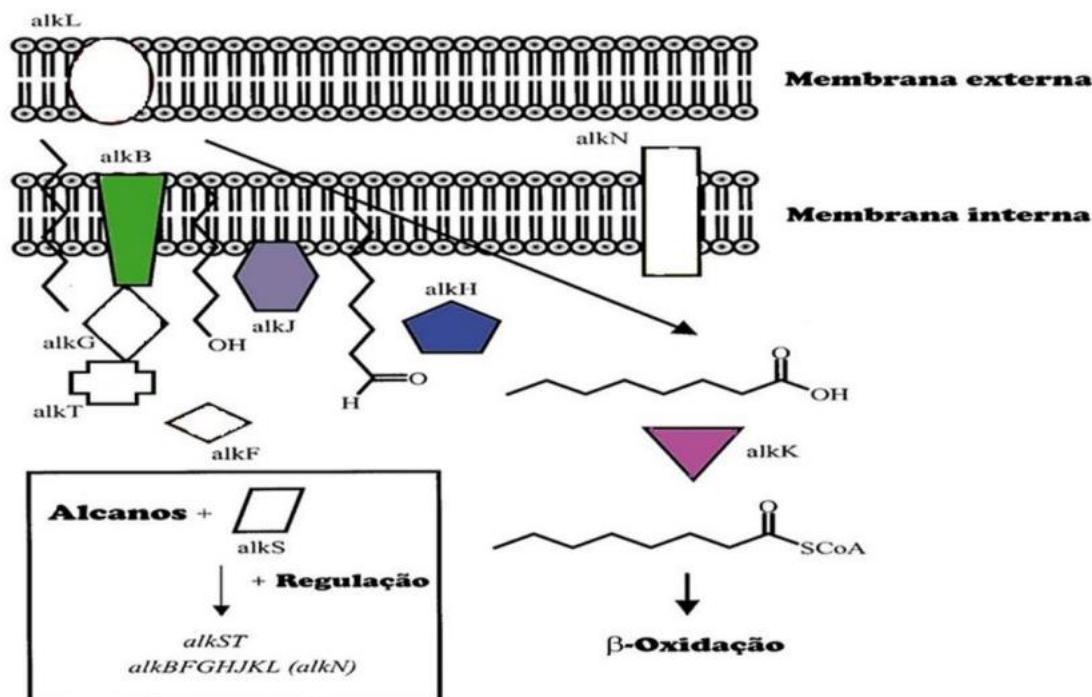
Logo, a especificidade metabólica de degradação microbiana não é um atributo fixo ou universal, mas sim um resultado dinâmico da interação entre genética, estrutura enzimática, regulação celular e condições ambientais. Essa seletividade adaptativa determina quais microrganismos podem prosperar em ambientes contaminados por hidrocarbonetos e molda a eficiência de estratégias de biorremediação baseadas em comunidades microbianas especializadas.

2.14 Estudos dos genes de degradação de alcanos

Os microrganismos empregam rotas metabólicas específicas para ativação e conversão dos alcanos em compostos mais oxidados, iniciando a degradação aeróbica. As enzimas monooxigenases desempenham papel central nesse processo ao catalisar a introdução de um átomo de oxigênio na molécula de alcano, formando álcoois primários. Esse passo inicial é essencial para que outros sistemas enzimáticos como álcool desidrogenases, aldeído desidrogenases e enzimas da β -oxidação completem a conversão do hidrocarboneto em intermediários do ciclo do ácido cítrico (Rabus e Widdel, 2001; Rojo, 2009). Dentre as monooxigenases, destacam-se várias classes especializadas como *AlkB* (monooxigenase de alcano dependente de ferro), *LadA* (monooxigenase de ligação à flavina), *AlmA* (monooxigenase de ligação a FAD) e o sistema citocromo *CYP P450* (Yang et al 2019).

A via de degradação de alcanos mais estudada é a descrita no plasmídeo OCT de *Pseudomonas putida* GPo1 (Figura 3), onde o gene *alkB* codifica uma monooxigenase de membrana integral com centro catalítico de ferro. A ativação do substrato depende de elétrons transferidos por duas proteínas solúveis: a rubredoxina (*AlkG*) e a rubredoxina redutase (*AlkT*), sendo esta última dependente de FAD e NADH (Van Beilen et al., 1992; Shanklin et al., 1994). A reação é altamente estereoespecífica e regiões específicas da molécula de alcano são oxidadas com eficiência, destacando o papel central do sistema *AlkB* na catálise seletiva (Shanklin et al., 1997; Bertrand et al., 2005).

Figura 3: Via de degradação de n-alcanos de cadeia média, mostrando a localização e funções das enzimas envolvidas no sistema alcano hidroxilase em *P. putida* Gp01.



Fonte: Adaptado de VAN HAMME et al. 2003.

Os sistemas enzimáticos *LadA*, *AlmA* e *CYP450* também desempenham papéis centrais na oxidação de hidrocarbonetos, catalisando a hidroxilação de alcanos e facilitando sua entrada nas vias de β-oxidação microbiana. Essas enzimas igualmente realizam a conversão inicial de alcanos em álcoois primários, que são subsequentemente transformados em aldeídos por ação de álcool desidrogenases, e então em ácidos graxos por aldeído desidrogenases. Os ácidos graxos resultantes são então ativados a acil-CoA e canalizados para o ciclo da β-oxidação, gerando acetil-CoA, que entra no ciclo do ácido cítrico, promovendo a completa mineralização do composto. Apesar de compartilharem essa função, *LadA*, *AlmA* e *CYP450* diferem significativamente quanto à estrutura proteica, tipo de cofator, localização celular (citoplasmática ou associada à membrana) e faixa de substratos preferida (de alcanos médios a muito longos), refletindo adaptações evolutivas distintas que ampliam a versatilidade ecológica dos microrganismos degradadores. Essas diferenças estruturais e funcionais entre *LadA*, *AlmA* e *CYP450* refletem trajetórias evolutivas independentes, permitindo que microrganismos colonizem e degradam uma ampla gama de hidrocarbonetos em diversos ambientes contaminados. A diversidade dessas monooxigenases destaca a importância de estudos integrativos para compreender e potencializar a biorremediação de poluentes orgânicos persistentes.

3 OBJETIVO GERAL

Estudar o potencial degradador das linhagens bacterianas Laprot 313, 314 e 316, isoladas de ambientes contaminados por óleo diesel, por meio de análises funcionais, genômicas e bioquímicas, com o objetivo de compreender os mecanismos moleculares envolvidos na degradação de hidrocarbonetos presentes em combustíveis fósseis, visando sua possível aplicação em processos de biorremediação.

3.1 Objetivos específicos

1- Realizar a identificação genômica das linhagens bacterianas Laprot 313, 314 e 316, com base em análises comparativas de similaridade filogenômica.

2- Realizar a anotação funcional dos genes envolvidos na degradação de hidrocarbonetos presentes nos genomas das cepas Laprot 313, 314 e 316.

3- Avaliar a capacidade degradadora de hidrocarbonetos das cepas Laprot 313, 314 e 316 por meio de ensaios bioquímicos e cromatográficos.

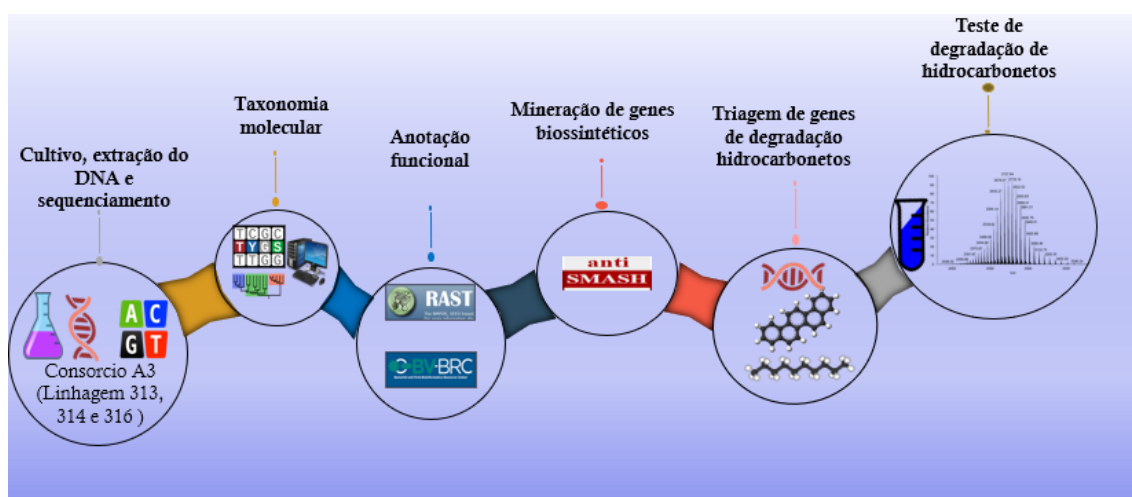
4 JUSTIFICATIVA

A identificação, mineração de genes biotecnológicos e anotação do genoma de três linhagens de bactérias degradadoras de diesel são essenciais para a exploração de seu potencial biotecnológico na biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos. Essas bactérias possuem mecanismos metabólicos especializados que facilitam a degradação de compostos tóxicos presentes no diesel, posicionando-as como candidatas ideais para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis. O estudo genômico dessas cepas permite a identificação de genes-chave e rotas metabólicas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos, o que pode possibilita a otimização de suas capacidades de degradação e a formulação de estratégias mais eficazes para a biorremediação ambiental.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Para melhor compreensão do desenho experimental, o fluxograma abaixo ilustra as principais etapas desenvolvidas nessa pesquisa.

Figura 4: Fluxograma da metodologia utilizada. A partir do cultivo das linhagens do consórcio, foram realizadas extrações de DNA genômico e sequenciamento. Após sequenciamento, seguiu-se para as etapas de taxonomia molecular e anotação funcional. Procedeu-se à mineração dos genes biossintéticos e triagem de genes relacionados à degradação de hidrocarbonetos, validando ao final, por espectrometria de massas, a capacidade das linhagens em degradar os hidrocarbonetos.



Fonte: autoria própria

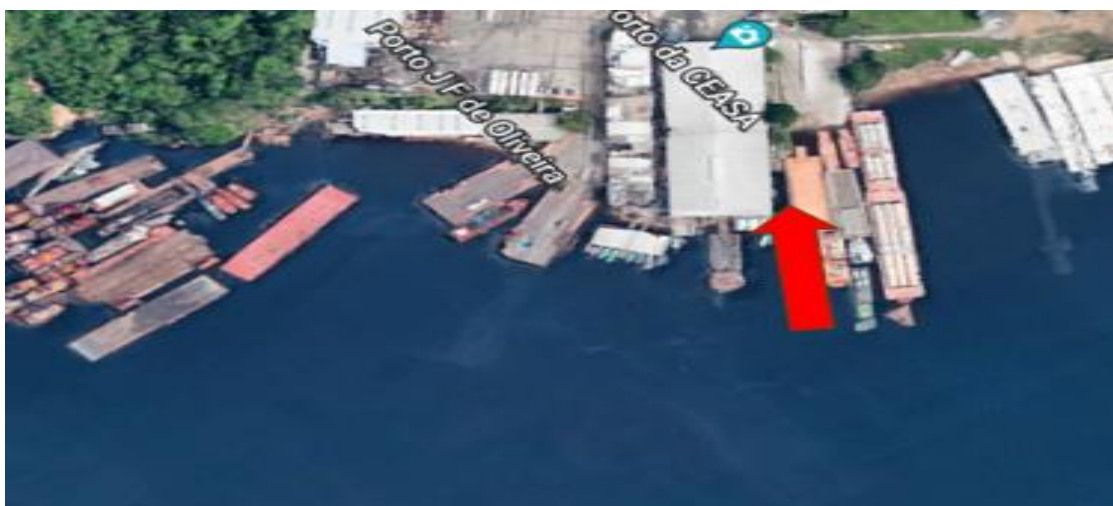
Nota: Da esquerda para direita, o fluxo exibe as metodologias utilizadas para cepas do consórcio A3 (Cepas Laprot 313, Laprot 314 e Laprot 316).

5.1. Obtenção das linhagens bacterianas

O consórcio designado A3 foi isolado das águas contaminadas com óleo diesel no Rio Negro no Porto do Ceasa, na cidade de Manaus (Santos, 2021), nas coordenadas 03°08'06.0 e W 59°56'20.0 (Figura 5). As três amostras bacterianas constituintes do consórcio A3 foram denominadas Laprot 313, Laprot 314 e Laprot 316. A escolha do consórcio A3 deu-se pela taxa de degradação do óleo diesel superior a 70 %, em apenas 7 dias por gravimetria, bem como outros parâmetros relacionados com a metabolização de combustíveis fósseis (Santos, 2021).

Todas as linhagens bacterianas foram cultivadas em meio Bushnell Haas (BH) suplementado com 1 % de diesel, e os frascos contendo as suspensões foram incubados a 30 °C, sob agitação a 150 rpm, para promover o crescimento. Após o cultivo, as linhagens foram armazenadas em meio BH soft.

Figura 5: Área de coleta de linhagens bacterianas, localizado no Porto do Ceasa, Rio Negro,



Manaus-AM, (após derramamento de óleo na região).

Fonte: Santos (2021)

Nota: Porto do Ceasa, Rio Negro, Manaus-AM, (após derramamento de óleo na região). Local de coleta do consórcio A3.

5.2. Extração de DNA genômico

As linhagens bacterianas Laprot 313, Laprot 314 e Laprot 316 foram cultivadas em meio LB sólido a 30° C por cerca de 16 h. Posteriormente, inóculos independentes das cepas foram realizados em 5 mL de meio LB líquido e mantidos *overnight* a 30° C e 150 rpm. As células bacterianas foram coletadas por centrifugação e o DNA genômico das cepas bacterianas foi extraído utilizando o *kit DNeasy® blood and tissue* (Qiagen, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, o DNA foi analisado em gel de agarose (0,8 %) e quantificado no *Qubit ® 2.0 fluorometer* (Life Technologies).

5.3. Sequenciamento e montagem do genoma

O DNA genômico foi sequenciado em colaboração com o pesquisador Dr. Gilvan Ferreira da Silva, coordenador do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Amazônia Ocidental. Utilizando a plataforma *Illumina* de 150 *pb paired-end*. O tratamento dos dados brutos, bem como a montagem foram realizados com o montador *SPAdes* (Prjibelski et al 2020). A qualidade do genoma foi analisada utilizando o servidor BV-BRC (*Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center*), combinando os dados e ferramentas dos recursos do *software* PATRIC (<https://www.patricbrc.org>) por uma análise abrangente do genoma.

5.4 Taxonomia molecular do consórcio A3

A identificação das linhagens LAPROT 313, LAPROT 314 e LAPROT 316 foi realizada no servidor TYGS (*Type Genome Server*) (Meier-Kolthoff e Göker, 2019), ([https:// tygs.dsmz.de/](https://tygs.dsmz.de/), acessado em 20 de julho de 2022). O servidor TYGS (Mukherjee et al., 2017) permitiu uma análise rápida de classificação e identificação genética, fornecendo valores de DDH e discrepâncias no percentual de G-C. O genoma foi submetido ao servidor, onde foi armazenado em sua base de dados. Após isso, o servidor seguiu um fluxograma de programas independentes que classificou as respectivas espécies e montou uma árvore filogenômica relacionando as espécies mais proximamente relacionadas. Na etapa seguinte, calculou-se a distância entre as espécies em uma etapa de comparação de genomas de espécies relacionadas com o genoma do usuário a partir do algoritmo MASH (Ondov et al., 2016). E por fim, realizou-se o alinhamento da sequência 16S rRNA do usuário com as sequências do banco de dados a partir do NCBI BLAST+ (Camacho et al., 2009) com o serviço *Pairwise SSU BLASter*.

As 50 espécies com as maiores pontuações do BLAST foram selecionadas para o cálculo da distância do GBDP (*Genome Blast Distance Phylogeny*). O serviço SSU *DISTANCE CALCULATOR* calcula a distância GBDP entre as sequências selecionadas de uma lista com as 50 espécies com as maiores pontuações do BLAST. Neste processo, o GBDP utilizou a fórmula d5 (Meier-Kolthoff et al., 2013) para seleção das 10 estirpes com as menores distâncias entre a sequência do genoma do usuário e os genomas do banco de dados, validando seus resultados com 100 *bootstraps*. Esta lista com as 10 estirpes foi utilizada para o cálculo de dDDH, com o serviço dDDH *Calculator* do programa *Genome Distance Calculator*. Os genomas foram considerados relacionados quando limiar foi igual ou acima de 70%. Em contrapartida, aqueles abaixo do limiar foram considerados distintos. A árvore filogenética foi obtida utilizando o serviço *Tree Builder*, no qual foi inferida a filogenia pelo método evolução mínima com o programa FastME versão 2.1.4 (Lefort; Desper; Gascuel 2015). Esse programa disponibiliza a árvore a partir do genoma completo e da sequência do gene 16S rRNA com o cálculo de valores σ para a relação entre semelhança de uma matriz de distância, além de um suporte para os ramos. Quanto menor o valor σ , maior a semelhança entre as espécies relacionadas. O valor de σ representa a medida de similaridade entre as espécies relacionadas com base em suas sequências genéticas (Holland et al 2002).

Para corroborar com os resultados de dDDH obtidos, uma análise genômica comparativa foi realizada para a identificação precisa e a classificação taxonômica de bactérias, no qual foram consideradas diversas análises genômicas, incluindo, *Average Nucleotide Identity* (ANI) que estima a identidade média de nucleotídeos entre dois conjuntos de dados genômicos, *Average Nucleotide Identity by BLAST* (ANIb) no qual o BLAST é utilizado para identificar regiões homólogas entre as sequências genômicas, *Average Nucleotide Identity by MUMmer* (ANIm) no qual o MUMmer assume a função de alinhamento, priorizando a identificação de regiões únicas em cada genoma e, em seguida, buscando similaridades entre elas, *Orthologous Average Nucleotide Identity* (OrtoANI) que calcula a identidade média considerando apenas alinhamentos de ortólogos recíprocos e *Average Amino acid Identity* (AAI) que compara a similaridade de sequências de aminoácidos entre proteínas codificadas por genes homólogos.

Para cada linhagem, o cálculo do ANI foi determinado utilizando a sequência genômica completa, oito genomas relacionados e um genoma distante. Os dez genomas foram carregados no pacote de software ([//www.ezbiocloud.net/sw/oat](http://www.ezbiocloud.net/sw/oat)) para realizar cálculos de genoma pareados do OrtoANI e o mapa de calor, calculados a partir do *software* OAT.

5.5 Mineração genômica e prospecção de produtos naturais com potencial aplicação biotecnológicas.

A identificação de *clusters* gênicos biossintéticos (BGCs) das linhagens bacterianas foram realizados com auxílio da plataforma AntiSMASH (*antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell*) versão 6.0 (Blin et al 2021). As sequências anotadas foram inseridas no *software* no modo (*relaxed*) no qual ocorre a detecção de *clusters* bem definidos contendo todas as partes necessárias, assim como *clusters* parciais. Os genes dos BGCs foram preditos identificando similaridade parcial com vias de biossíntese depositadas no banco de dados MIBiG (*Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster*) versão 2.0 (<https://mibig.secondarymetabolites.org/>), juntamente com o banco de dados InterPro (<http://https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Este é utilizado para identificar os domínios funcionalmente ligados à biossíntese de metabólitos secundários e inferência das possíveis funções (Mistry et al., 2020; Paysan-lafosse et al., 2022). Ambos os bancos de dados já estão integrados na plataforma AntiSMASH. Os BGCs foram classificados de acordo com a similaridade apresentada com vias de biossíntese já caracterizadas e disponíveis na base de dados *Minimum Information about a Biosynthetic Gene Cluster* (MIBiG), onde alta similaridade corresponde a ≥ 70 %, moderada similaridade é de 30 - 69 %, baixa similaridade é de 1 - 29 % e ausência de similaridade é igual 0 %. Os genes dos BGCs previamente preditos que demonstraram semelhança parcial com rotas de biossíntese armazenadas no banco de dados MIBiG, foram avaliados em relação à sintenia com o apoio do programa *clinker*, uma ferramenta baseada em Python e clustermap.js (Gilchrist e Chooi, 2021).

O banco de dados InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) foi utilizado para identificar os domínios funcionais relacionados à biossíntese de metabólitos secundários e inferir as possíveis funções (Mistry et al 2020; Paysan-Lafosse et al 2022). Após a análise, os resultados obtidos foram curados manualmente por comparação com a literatura relacionada, a fim de criar as relações e inferências necessárias para a previsão de vias metabólicas para biossíntese de metabólitos especializados.

5.6 Anotação funcional dos genomas

A anotação das sequências foi realizada por meio da ferramenta *Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center* (BV-BRC) (<https://www.bv-brc.org/>) (Brettin et al 2015), utilizando-se a opção de anotação do genoma, para fornecer anotações de características genômicas. Por meio desse *software*, foi possível acessar o número de pares de bases, conteúdo CG da cepa selecionada, bem como, a obtenção do número de proteínas hipotéticas e funcionais, com ação majoritária relacionada ao metabolismo e processamento da informação genética assim como a representação do genoma circular de cada cepa.

Para complementar a determinação de regiões codificantes e função gênica dos genomas dos isolados, os *contigs* de cada linhagem foram anotados seguindo o *pipeline* do servidor RAST (<https://rast.nmpdr.org/> acessado em 26/11/2022), usando a base de dados SEED *Viewer version 2.0*. (Aziz et al 2008). A predição de sequências foi feita no modo RAST, esquema de anotação Rast Clássico e FIGfam, versão 70, para agrupamento em subsistemas.

Para as duas plataformas acima empregadas na anotação funcional, inicialmente foi utilizado para a identificação do genoma *no taxonomy-ID* (NCBI), os resultados obtidos de identificação no banco de dados TYGS ([https:// tygs.dsmz.de/](https://tygs.dsmz.de/), acessado em 20 de julho de 2022), configurando para anotação o ID da linhagem mais relacionada.

5.7 Anotação das vias de degradação dos hidrocarbonetos

Foi realizado uma busca detalhada na base de dados BV-BRC utilizando palavras-chave relacionadas à degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, como "*Monoxygenase*", "*hydroxylase*", "*aromatic hydrocarbon degradation*", "*aromatic ring cleavage*", "*aromatic ring hydroxylation*", entre outras. Para cada gene identificado, as informações fornecidas foram analisadas, como nome do gene, organismo, função e vias metabólicas associadas. O banco de dados KEGG foi utilizado para complementar as informações obtidas no BV-BRC, buscando por vias metabólicas específicas relacionadas à degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos quando existentes.

Os resultados obtidos foram comparados com estudos científicos publicados na literatura para validar as informações encontradas e identificar possíveis genes adicionais relacionados à degradação de hidrocarbonetos aromáticos. Foram destacados os genes mais relevantes e suas implicações na degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, bem como possíveis aplicações biotecnológicas.

5.8 Análise de degradação dos hidrocarbonetos pelo consórcio A3 e suas linhagens isoladas 313, 314 e 316.

5.8.1 Análise de degradação utilizando DCPIP

Para confirmar a capacidade dos consórcios bacterianos de utilizarem o hidrocarbonetos de cadeias de carbono variadas foi utilizado diesel comercial, diesel puro, gasolina e petróleo como única fonte de carbono e energia, empregou-se a técnica do indicador redox, 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) (Hanson et al., 1993) para . Foi feito um pré-inóculo (5 mL) em meio BH/diesel (1%) para o consórcio e suas linhagens isoladas (30° C, 150 rpm, 48 h). Em seguida, em tubos de ensaio com capacidade para 40 ml foram adicionados para um volume total de 2 mL meio BH estéril, diesel (1 %) e pré-inóculo suficiente para absorbância inicial de 0,01 (OD 600nm) e DCPIP necessário para uma concentração final de 0,1 g.L⁻¹. Também foi preparado um controle contendo BH + DCPIP + diesel 1%. Os tubos então foram incubados a 30° C por 48 h a 150 rpm. O padrão de descoloração foi avaliado com a medição de absorbância em espectrofotômetro. Ensaio e controles foram feitos em triplicata.

5.8.2 Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

O sobrenadante da cultura foi obtido como descrito no item 5.8.1. para os períodos de 7 dias de cultivo e seu respectivo controles abióticos utilizados para extração dos hidrocarbonetos alifáticos. Em um funil de separação (125 mL) o sobrenadante foi misturado com 5 mL de hexano (Biotec, P.A.) (1: 10, v/v), posteriormente deixando a solução em repouso por 5 minutos, para logo após recuperar 1 mL do hexano para análise em GC-MS.

A temperatura para injeção das amostras foi de 280 °C, seguida de um aumento na taxa de aquecimento para 300 °C e posteriormente, com um decréscimo para 200 °C, seguido de um aumento para 300 °C. Foi utilizado hélio gasoso como o transportador. A aquisição de dados foi realizada utilizando a monitoramento de íons selecionado SIM (do inglês selected ion monitoring). Um volume de 10 µL de cada amostra foi injetado utilizando um injetor tipo *Split* (Souza et al., 2015).

A soma da área dos *n*-alcanos individuais detectados foi definida como a concentração de alcanos do óleo diesel.

A degradação dos *n*-alcanos do óleo diesel foi calculada de acordo com a equação:

$$R_d = \frac{D_c - D_s}{D_c} \times 100\%$$

Rd	Taxa de degradação de alcanos do óleo diesel
Dc	Concentração de <i>n</i> -alcanos do óleo diesel no controle abiótico
Ds	Concentração de <i>n</i> -alcanos do óleo diesel residual após cultivo bacteriano

As variáveis estão descritas acima e foram baseadas em trabalhos anteriores (Zhang et al., 2011; Deng et al., 2014). Todas as análises foram realizadas em triplicatas no Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), sob supervisão do técnico Filipe.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Montagem do genoma das linhagens Laprot 313, Laprot 314 e Laprot 316

A análise dos dados apresentados na Tabela 2, evidencia diferenças entre as linhagens Laprot 313, 314 e 316 quanto à montagem genômica, conteúdo GC, número de *contigs* e métricas de qualidade. O DNA genômico extraído das três linhagens apresentou boa qualidade, com rendimentos de 62 ng/μL (Laprot 313), 87 ng/μL (Laprot 314) e 65 ng/μL (Laprot 316). Os tamanhos dos genomas montados foram de 4.036.644 pb para Laprot 313, 6.453.879 pb para Laprot 314 e 6.838.744 pb para Laprot 316. Nenhuma das linhagens apresentou presença de plasmídeos, o que está de acordo com os perfis de eletroforese do DNA genômico, isentos de contaminação plasmidial (dados não mostrados).

Tabela 2. Dados gerais da montagem das cepas identificadas no consórcio A3

	Laprot 313	Laprot 314	Laprot 316
Contigs	60	558	56
Conteúdo do GC (%GC)	38,37	67,62	65,75
Plasmídeos	0	0	0
Contig L50	6	69	5
Comprimento do genoma	4.036.644 pb	6.453.879 pb	6.838.744 pb
Contig N50	176.061	25.740	712.779

Fonte: De autoria própria

Ainda na tabela 2, com relação ao número de *contigs*, Laprot 313 e 316 apresentaram montagens mais contínuas (60 e 56 *contigs*, respectivamente), enquanto Laprot 314 mostrou uma montagem bastante fragmentada (558 *contigs*). Considerando que genomas bacterianos de alta qualidade geralmente possuem menos de 100 *contigs*, os resultados de Laprot 313 e 316 indicam uma qualidade superior. O valor de N50, métrica que representa o menor *contig* entre os maiores que, juntos, compõem 50% do genoma, também reforça essa conclusão: Laprot 316 apresentou o maior valor (712.779 pb), seguido por Laprot 313 (176.061 pb), enquanto Laprot 314 obteve apenas 25.740 pb. Esses valores situam Laprot 313 e 316 dentro dos padrões internacionais de qualidade (N50 > 100 kbp) (Koren et al., 2017; Zhou et al., 2023), enquanto a montagem de Laprot 314 possivelmente foi prejudicada por fatores como a complexidade genômica ou limitações técnicas durante o sequenciamento.

Quanto ao conteúdo GC, todas as cepas apresentaram valores compatíveis com suas respectivas identificações taxonômicas. Laprot 313 exibiu um conteúdo GC de 38,37%, Laprot 314 (67,62%) e Laprot 316 (65,75%), dados característicos dos gêneros ao qual pertence (Chen et al., 2020). Reforçando os dados anteriores, Laprot 316 demonstrou o melhor desempenho geral, com L50 de 5 e N50 elevado, indicando uma montagem robusta e adequada para análises funcionais e comparativas. Por outro lado, os resultados de Laprot 314 (L50 = 69; N50 = 25.740 pb) revelam limitações em sua montagem, apontando para a necessidade de aprimoramentos metodológicos a fim de alcançar um nível de qualidade comparável ao das demais cepas analisadas.

Laprot 313 (3.335 CDS) e Laprot 316 (6.384 CDS) apresentam números alinhados com genomas bacterianos típicos de 3.000–7.000 CDS (Land et al 2015). A comparação entre os genomas das linhagens Laprot 313, 314 e 316 revela variações expressivas no número de CDS (regiões codificadoras de proteínas). A linhagem Laprot 313 apresenta 3.335 CDS, o que a coloca na faixa inferior dos genomas bacterianos típicos de vida livre (geralmente entre 3.000 e 7.000 CDS). Em contraste, as linhagens Laprot 314 e Laprot 316 exibem 6.375 e 6.384 CDS, respectivamente, valores próximos ao limite superior desse intervalo, indicando genomas mais complexo (Tabela 3).

Em relação aos genes de tRNA, observa-se uma pequena variação entre as linhagens, com Laprot 313 possuindo 63 tRNAs, Laprot 314 com 56, e Laprot 316 com 58. A quantidade de genes de tRNA está relacionada com a eficiência da tradução e pode influenciar a taxa de crescimento bacteriano. Embora não haja uma relação direta entre número de tRNAs e número de CDS, uma certa coerência entre a complexidade genômica e a variedade de tRNAs, assim, o número levemente superior de tRNAs em Laprot 313 pode ser reflexo de uma organização genômica mais otimizada, ainda que mais compacta. Já os genes de rRNA, responsáveis pela síntese ribossomal, apresentam variações modestas: 7 cópias em Laprot 313, 6 cópias em Laprot 316, e 5 cópias em Laprot 314. Em bactérias, um maior número de cópias de rRNA está geralmente associado a taxas de crescimento mais rápidas e maior capacidade de resposta a estímulos ambientais. As pequenas diferenças observadas aqui não sugerem grandes impactos funcionais, mas podem contribuir para distinções sutis entre as cepas (Roller et al., 2016).

As linhagens Laprot 313 e 314 não apresentaram regiões de repetição identificadas, enquanto a linhagem Laprot 316 possui 28 regiões repetitivas. Regiões repetitivas no genoma bacteriano geralmente correspondem a elementos genéticos

móveis, como transposons, inserções, sequências repetidas em tandem e elementos regulatórios (Antipov et al., 2019).

Tabela 3: Características dos genomas das cepas constituintes do consórcio A3, referente aos seus tRNAs, rRNAs e *repeat regions*.

	Laprot 313	Laprot 314	Laprot 316
CDS	3.856	6.3750	6.384
tRNA	63	56	58
rRNA	7	5	6
<i>Repeat regions</i>	0	0	28

Fonte: De autoria própria

6.2 Identificação filogenômica das linhagens Laprot 313, Laprot 314 e Laprot 316

Pela plataforma TYGS foi possível inferir a identificação genômica das três linhagens Laprot 313, Laprot 314, Laprot 316 (Tabela 4), e construir a árvore filogenética relacionando-as com as linhagens mais próximas. A delimitação de espécies com base nos valores d2 e d4 dDDH estabelece que valores iguais ou superiores a 70 % indicam a mesma espécie, enquanto valores abaixo sugerem uma nova espécie (Meier-Kolthoff et al., 2013).

Tabela 4: Identificação filogenômica das linhagens Laprot 313, Laprot 314 e Laprot 316.

Cepa	Identificação	dDDH (d0 in %)	■ dDDH (d2 in %)	dDDH (d4 in %)	dDDH (d6 in %)	Diferença do conteúdo G+C
Laprot 313	<i>Acinetobacter seifertii</i> NIPH 973	72,8	73,30	72,8	75,4	0,23
Laprot 314	<i>Achromobacter xylooxidans</i> NBRC 15126	87,9	90,70	90,5	91,1	0,09
Laprot 316	<i>Pseudomonas nicosulfuronedens</i> LAM1902T	64,3	●43,60	●41,6	59,8	0,96

Fonte: De autoria própria

Nota: Valores de digital *DNA-DNA hybridization* (dDDH) > 70 % considerado mesma espécie. (●) Valores indicativos de uma potencial nova espécie. (■) Fórmula calculada pelo GGDC. dDDH obtidos a partir da comparação dos isolados e espécies tipo estreitamente relacionadas, identificada pela ferramenta TYGS. A fórmula dDDH (d2) foi calculada utilizando o servidor GGDC 3.0 (MeierKolthoff et al., 2013). A fórmula dDDH (d2) e dDDH (d4) são os métodos de referência para a taxonomia bacteriana, permitindo a identificação precisa de espécies e subespécies (colunas destacadas laranja). Os acessos às plataformas foram realizados no período de março a abril de 2024.

A avaliação dos valores de hibridização de DNA-DNA digital (dDDH) utilizando a fórmula d2, calculados com o algoritmo GGDC (*Genome-to-Genome Distance Calculator*), e os valores d0, d4 e d6 obtidos por meio do TYGS (*Type Strain Genome Server*), demonstrou que somente a linhagem Laprot 316 atingiu o ponto de corte correspondente a uma espécie nova (<70 %), apresentando valores de dDDH (d2) de 43,60 % e dDDH (d4) de 41,6 % com a espécie tipo mais estreitamente relacionada *Pseudomonas nicosulfuronedens* LAM1902T, conforme ilustrado na Tabela 5. A linhagem Laprot 313 apresenta valor de dDDH (d2) de 73,30 % e dDDH (d4) de 72,8 % em relação à espécie tipo de *Acinetobacter seifertii* NIPH 973. A linhagem Laprot 314 apresentou valores de dDDH (d2) de 90,70 % e dDDH (d4) de 90,5 % em relação a espécie tipo *Achromobacter xylosoxidans* NBRC 15126. Considerando o ponto de corte, os valores apresentados confirmam que a linhagem Laprot 313 pertence à espécie *Acinetobacter seifertii*, a linhagem Laprot 314 pertence à espécie *Achromobacter xylosoxidans*.

A análise do conteúdo de G+C em todos os isolados revelou valores inferiores a 1 %, o que reforça a confiabilidade das identificações realizadas pelo TYGS. É importante salientar que uma discrepância no teor de G+C acima de 1% pode sugerir uma identificação menos confiável, uma vez que, tipicamente, o teor de G+C dentro de uma mesma espécie não varia além de 1%. Estudos têm enfatizado o teor de G+C como um marcador taxonômico crucial para diferenciar entre espécies distintas, especialmente quando a diferença entre as sequências genômicas supera 1%. Essas descobertas destacam a relevância do teor de G+C como um indicador fundamental na taxonomia molecular (Meier-Kolthoff; Klenk; Goker, 2014; Meier-Kolthoff; Goker, 2019).

Os resultados obtidos nas análises por Identidade Média de Nucleotídeos (ANI) e identidades médias de aminoácidos (AAI) (Tabela 5), confirmaram identificação filogenômica das cepas constituintes do consórcio A3 obtidas por dDDH e GGDC. As ferramentas ANIb e ANIm servem como ferramentas complementares ao dDDH, GGDC e ANI no delineamento de espécies microbianas. Embora dDDH, GGDC e ANI tenham sido métodos tradicionais para delimitação de espécies, ANIb, ANIm e AAI fornecem informações adicionais sobre a relação genômica e a identidade média de nucleotídeos, aumentando a precisão e a eficiência dos processos de identificação de espécies (Hu et al., 2022).

Tabela 5: Estudo comparativo de genomas utilizando ANI, ANIb e ANIm, OrthoANI, AAI das linhagens Laprot 313, Laprot 314, Laprot 316, com os respectivos genomas relacionados

Linhagem	ANI (%)	ANIb (%)	ANIm (%)	OrthoANI (%)	AAI (%)
Laprot 313	96,61	96,15	96,45	96,42	97,47
Laprot 314	98,98	98,30	98,98	98,96	98,82
Laprot 316	90,71	89,47	91,30	90,83	93,11

Fonte: De autoria própria

Nota: Estudo comparativo da linhagem **Laprot 313** com a espécie de referência *Acinetobacter seifertii* NIPH 973, linhagem **Laprot 314** com *Achromobacter xylosoxidans* NBRC 15126, **Laprot 316** com *Pseudomonas nicosulfuronedens* LAM1902. Identidade Média de Nucleotídeos (ANI), Blast+ (ANIb) e MUMmer (ANIm), Orthologous Average Nucleotide Identity (OrthoANI), Identidade Média de Aminoácidos (AAI). Como ponto de corte para pertencer à mesma espécie, valores (> 95%) para ANI, ANIb e ANIm, valores (> 95 %) OrthoANI; valores (> 95 %) Identidade Média de Aminoácidos (AAI); os acessos às plataformas foram realizados no período de março a abril de 2024.

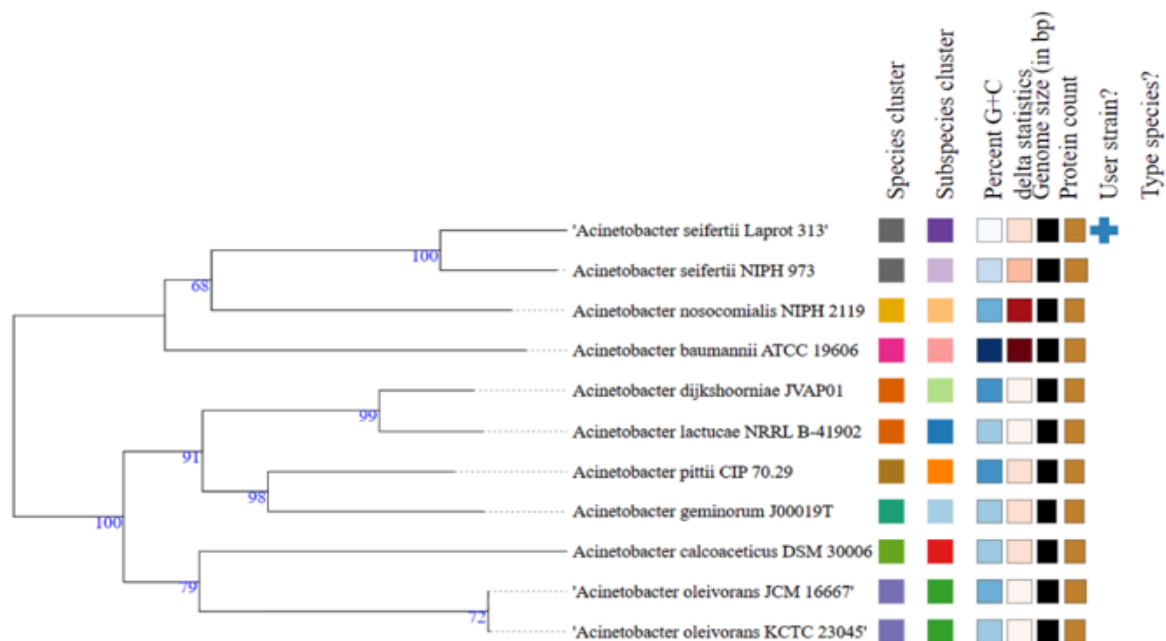
As análises filogenéticas da sequência do gene 16S rRNA continuam a ser fundamentais para a compreensão da sistemática procariótica. No entanto, muitas vezes não conseguem resolver de forma definitiva as relações evolutivas dentro de diversos grupos (Vandamme 1996; Rodriguez et al 2018; Duchêne 2021). Uma abordagem que se baseia apenas em uma fração dos genes dificilmente pode ser considerada um método filogenético verdadeiro em escala genômica (Dagan & Martin, 2006). Métodos baseados no genoma completo, como o GBDP (*Phylogeny Based on Genome Data*) foram desenvolvidos para fornecer informações sem precedentes sobre a árvore microbiana da vida (Meier-Kolthoff et al 2013; Henz et al 2005; Meier-Kolthoff et al 2014; Mukherjee et al 2017; Montero-Calasanz et al 2017; Patil et al 2013). Desta forma, os métodos de análise utilizados aqui indicam confiabilidade quanto a identificação filogenômica de *A. seifertii* Laprot 313, *A. xylosoxidans* Laprot 314 e *Pseudomonas* sp. Laprot 316.

A reconstrução da árvore filogenômica para as cepas do consórcio A3 foi obtida e está apresentada na figura 6. Conforme esperado, a linhagem Laprot 313 agrupou em um clado com a linhagem tipo *A. seifertii* NIPH 973 e a linhagem Laprot 314 formou clado irmão com a espécie tipo *A. xylosoxidans* NBRC15126, corroborando os resultados anteriores (Tabela 6). Para a linhagem Laprot 316 foi observada relação de clado não-irmãos com as espécies *P. nicosulfuronedens* LAM1902T, *P. nitritireducens* e *P. nitroreducens* NBRC 12694 WZBFD3-5A2. Este achado é notável, uma vez que implica a possibilidade de uma nova espécie pertencente ao gênero *Pseudomonas*. A existência de um clado distinto para a linhagem Laprot 316, separado das outras espécies do mesmo

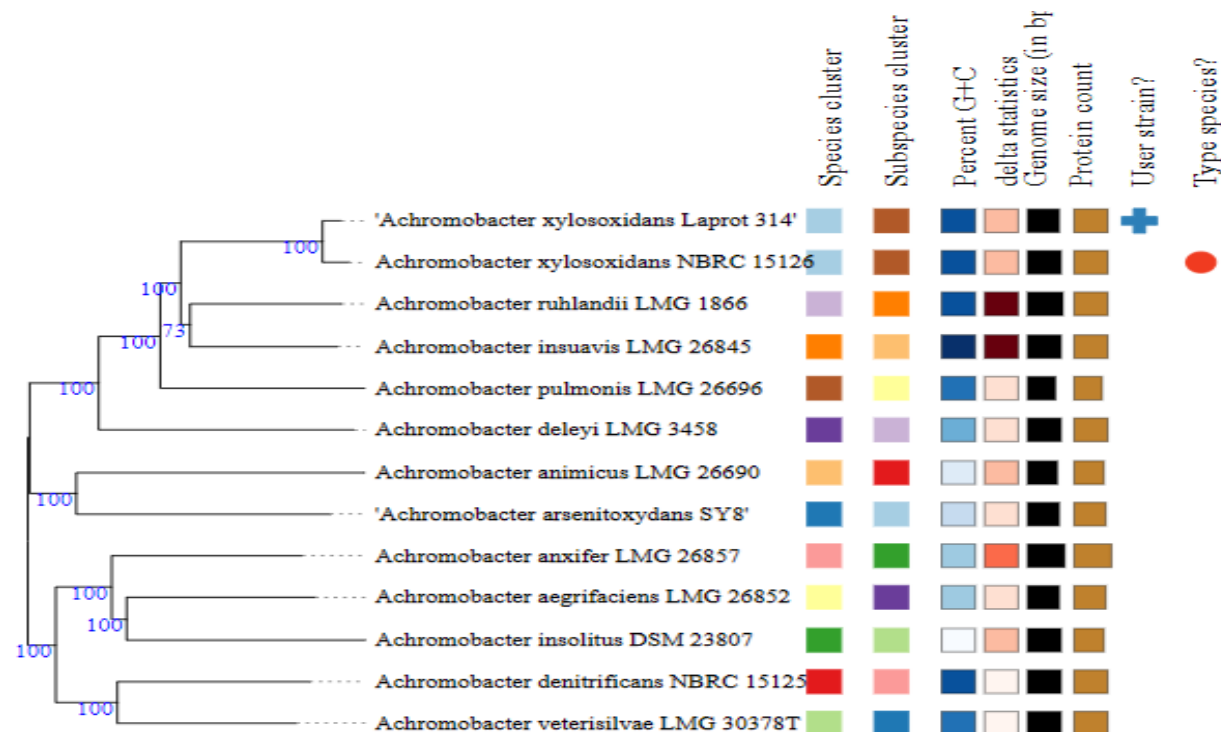
gênero, é um indicador forte de uma divergência evolutiva significativa (Rudra et al., 2022). A identificação de características únicas e distintas da linhagem Laprot 316 pode fornecer evidências adicionais para a existência de uma nova espécie dentro do gênero *Pseudomonas*. Contudo, é necessário realizar estudos adicionais para investigar a validade dessa hipótese e determinar se a linhagem Laprot 316, representa de fato, uma nova espécie dentro do gênero *Pseudomonas*.

Figura 6: Árvores filogenéticas utilizando a abordagem *Genome Blast Distance Phylogeny* (GBDP) com os genomas das amostras Laprot 313 (A), 314 (B) e 316 (C), identificadas respectivamente como *A. seifertii*, *A. xylosoxidans* e *Pseudomonas* sp.

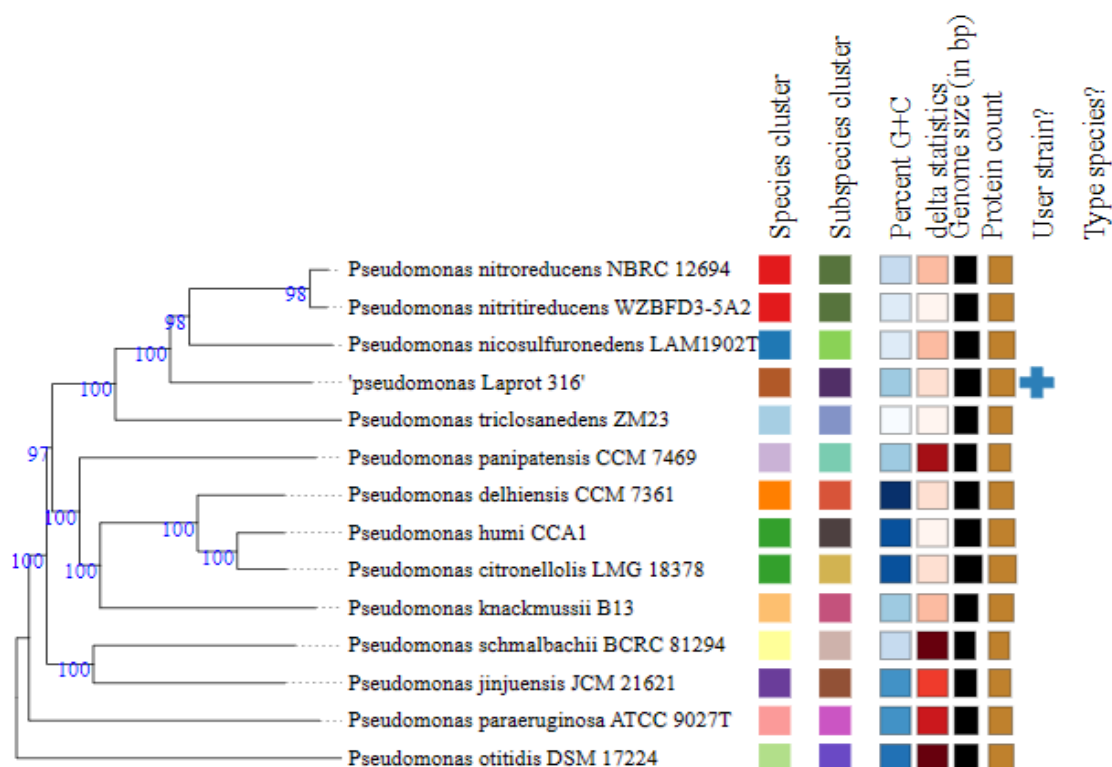
A. Árvore filogenômica da linhagem Laprot 313 identificada como *A. seifertii*.



B. Árvore filogenômica da linhagem Laprot 314 identificada como *A. xylosoxidans*.



C. Árvore filogenômica da linhagem Laprot 316 identificada como *Pseudomonas*.

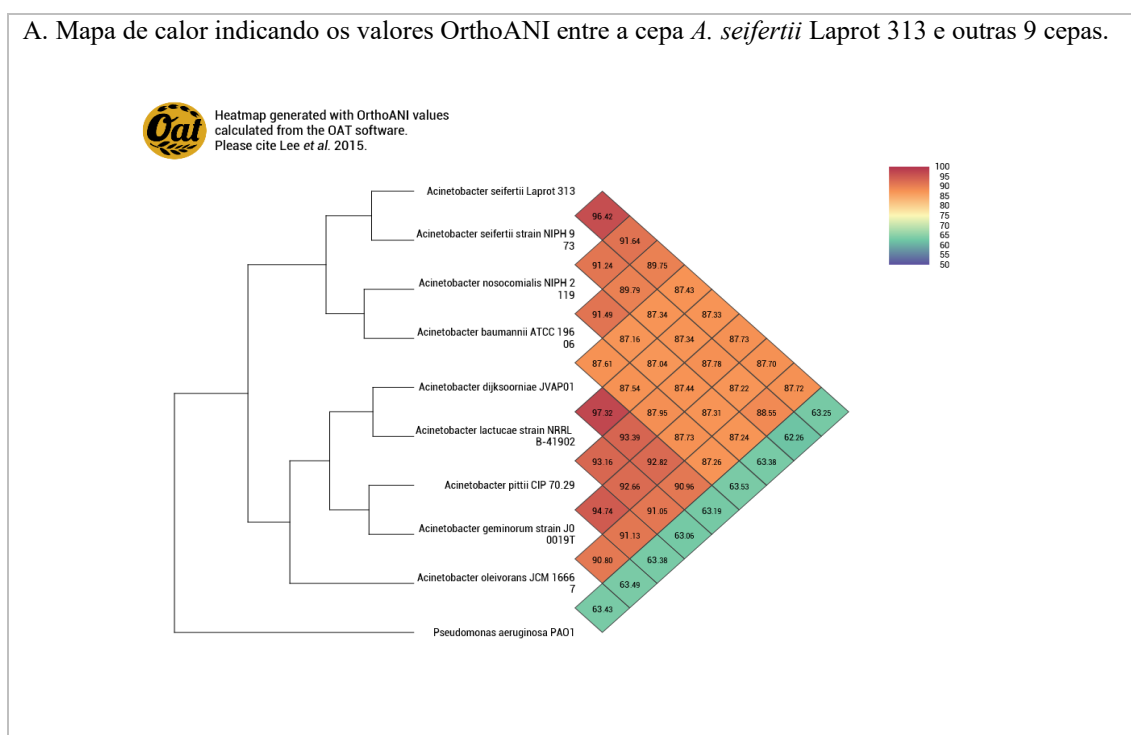


Fonte: De autoria própria

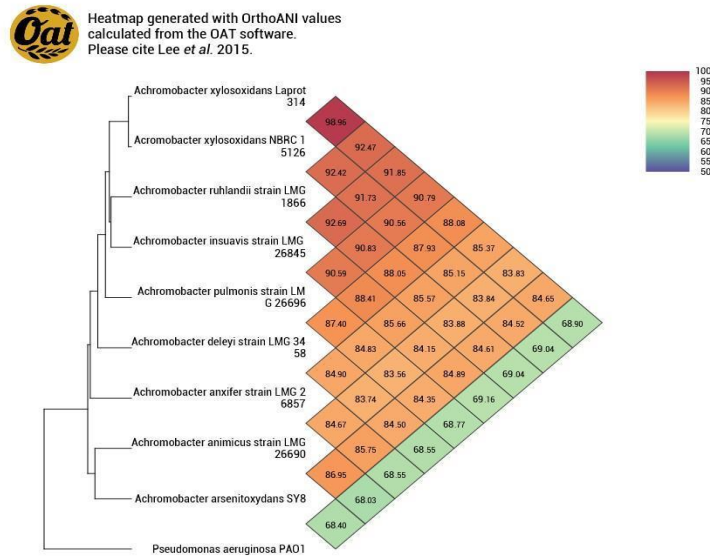
Nota: As árvores filogenéticas geradas pelo TYGS ilustram a relação entre as linhagens Laprot 313, 314 e 316 e as espécies de referência, utilizando o método FastME 2.1.6.1 do GBDP para inferência, com base nas distâncias calculadas a partir das sequências genômicas. Os comprimentos dos ramos são representados pela fórmula de distância GBDP d5. A variação de cores indica similaridades genéticas compartilhadas entre as linhagens. Essa representação permite o agrupamento das linhagens bacterianas de acordo com diferentes níveis taxonômicos, como espécie, subespécie, conteúdo de GC, valor δ , tamanho do genoma e número de proteínas (esquerda para direita, respectivamente). O símbolo de cruz destaca a posição da linhagem Laprot 313 (A), 314 (B) 316 (C) na árvore.

A análise de similaridade genômica pelo *software* OAT (Orthologous Average Nucleotide Identity Tool) revelou resultados significativos para as linhagens *A. seifertii*, *A. xylosoxidans* e a nova espécie de *Pseudomonas*, confirmando as espécies identificadas constituintes do consórcio A3 (Figura 7). As linhagens de *A. seifertii* LAPROT 313, *A. xylosoxidans* LAPROT 314 apresentaram um mapa de calor com valores de identidade nucleotídica média ortóloga (OrthoANI) acima de 95%. Esse nível elevado de similaridade, além de ser limiar para a identificação de espécies dentro de um gênero, indica uma alta homologia genética entre as cepas analisadas e seus respectivos genomas de referência, sugerindo que estas cepas possuem características genéticas bem conservadas dentro de seus gêneros.

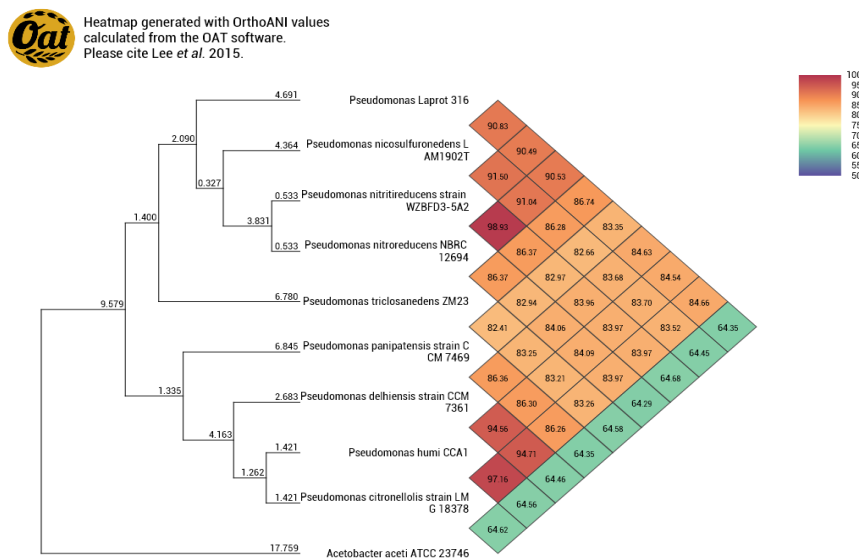
Figura 7: Mapa de calor indicando os valores OrthoANI (A) cepa *A. seifertii* Laprot 313; (B) cepa *A. xylosoxidans* Laprot 314; (C) cepa *Pseudomonas* Laprot 316. Para cada cepa a análise foi realizada comparando com 8 cepas relacionadas e uma distante.



B. Mapa de calor indicando os valores OrthoANI entre a cepa *A. xylosoxidans* Laprot 314 e outras 9 cepas.



C. Mapa de calor indicando os valores OrthoANI entre a cepa *Pseudomonas* Laprot 316 e outras 9 cepas.



Fonte: De autoria própria

Nota: Mapa de calor mostrando porcentagens médias de identidade de nucleotídeos por ortologia (OrthoANI) (A) entre a cepa *A. seifertii* Laprot 313 e 8 parentes próximos bem como uma estirpe que está mais distantemente relacionada; (B) entre a cepa *A. xylosoxidans* Laprot 314 e 8 parentes próximos bem como uma estirpe que está mais distantemente relacionada; (C) entre a cepa *Pseudomonas* Laprot 316 e 8 parentes próximos bem como uma estirpe que está mais distantemente relacionada. Valores em escala de cores indicam o percentual de similaridade entre os genomas, sendo o mais similar de cor vermelha, e o menos similar, de cor azul. Os valores numéricos nos ramos representam a distância genética intergenômica calculada pelo software *Orthologous Average Nucleotide Identity Tool* (OAT). O limite considerado para a mesma espécie é >95%.

Novamente, a cepa da nova espécie de *Pseudomonas* apresentou um valor de identidade abaixo de 95%, indicando uma menor homologia genética em relação às referências disponíveis. Esse resultado sugere que a cepa Laprot 316 representa uma nova linhagem dentro do gênero *Pseudomonas*, possivelmente com características metabólicas e fisiológicas únicas ainda não completamente descritas. A identidade abaixo do limiar de 95% é um indicativo de que a cepa pode ser considerada uma nova espécie, oferecendo uma oportunidade única para a descoberta de novas vias metabólicas e mecanismos de degradação de hidrocarbonetos.

As linhagens bacterianas identificadas pela análise genômica tem potencial significativo para a biorremediação ambiental. A espécie *A. seifertii* se destaca devido à sua reconhecida versatilidade metabólica e resistência a ambientes extremos, o que a torna apta para a biodegradação de diesel e a descontaminação de solos e águas afetados por derramamentos de hidrocarbonetos (Margaret et al., 2020). A identificação da linhagem 314 como *A. xylosoxidans* na análise filogenética destaca um gênero já conhecido por suas propriedades de biorremediação, incluindo a degradação de hidrocarbonetos e outros compostos tóxicos (Hong et al 2017). Apesar das informações genômicas existentes sobre *Achromobacter*, ainda faltam mais estudos aprofundados que explorem suas vias de degradação de hidrocarbonetos, a biossíntese de metabólitos secundários e as bases genéticas para sua adaptação ambiental.

A descoberta de uma nova espécie dentro do gênero *Pseudomonas* sugere a presença de características metabólicas inovadoras ainda inexploradas, ampliando o potencial para novas abordagens na degradação de compostos orgânicos complexos como o diesel. A caracterização detalhada dessa nova linhagem poderá oferecer informações importantes sobre novos mecanismos de biodegradação já que o gênero *Pseudomonas* engloba diversas espécies com notável habilidade em degradar compostos orgânicos complexos, incluindo hidrocarbonetos (Palleroni et al., 2010). Portanto, a identificação dessas linhagens e sua capacidade de degradação de diesel pelo consórcio bacteriano A3, aponta que futuras pesquisas podem elucidar novas vias metabólicas e estratégias para a biorremediação eficaz (Jakobsen et al 2013).

6.3 Anotação genômica de linhagens bacterianas do consórcio A3

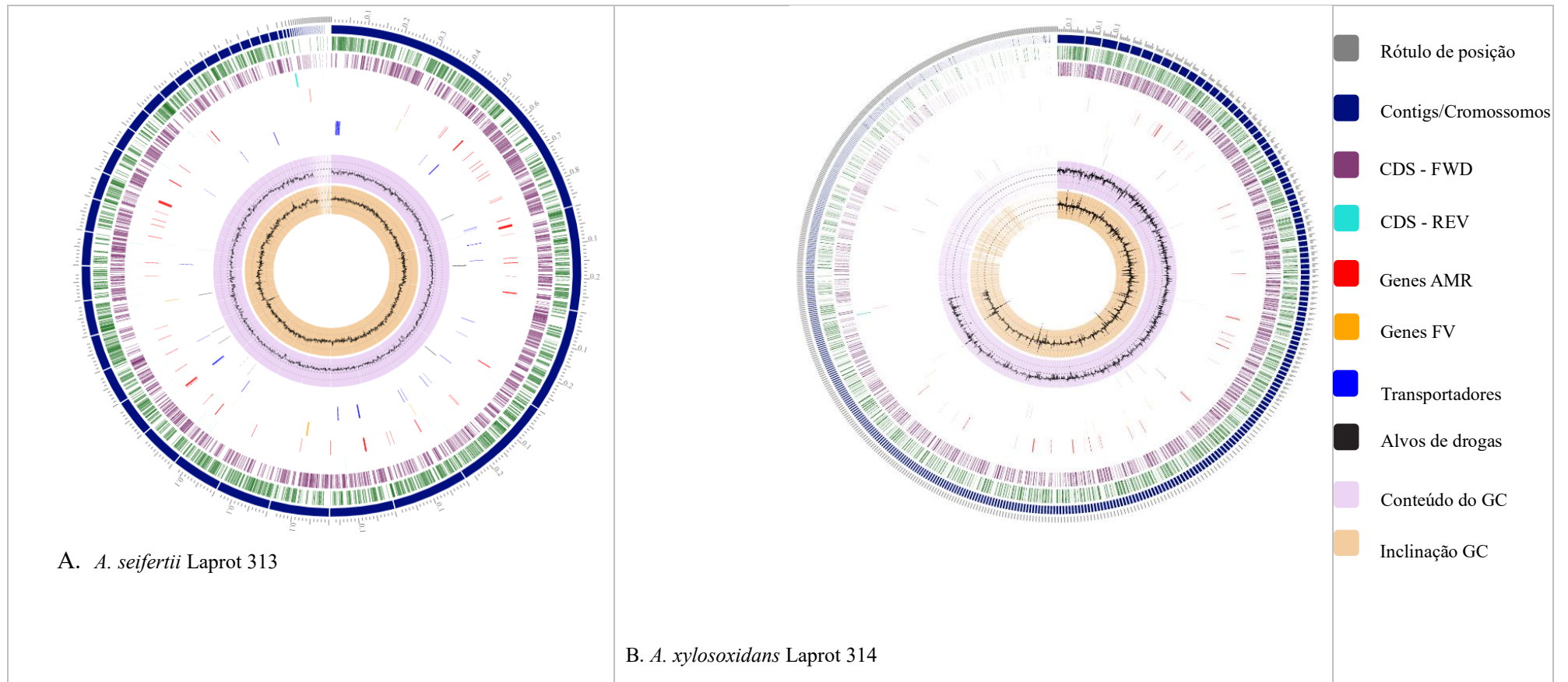
A anotação genômica das linhagens Laprot 313, Laprot 314 e Laprot 316, revelou dados interessantes, especialmente em relação à sua capacidade metabólica e potencial biotecnológico. A linhagem Laprot 316 apresentou o maior número de proteínas hipotéticas (1630), o que está em consonância com o fato de ela não atingir o ponto de corte de 70% de similaridade no DNA-DNA digital (dDDH) em relação à espécie tipo mais próxima (*Pseudomonas nicosulfuronedens*), sugerindo que se trata de uma espécie potencialmente nova. A grande quantidade de proteínas não caracterizadas pode indicar a presença de genes ainda não descritos funcionalmente, possivelmente associados a adaptações ecológicas ou a capacidades degradadoras inéditas. Por outro lado, a linhagem Laprot 313, filogeneticamente identificada como *Acinetobacter seifertii*, apresenta o menor número de proteínas hipotéticas (946), refletindo sua proximidade com uma espécie já bem estudada. Além disso, a menor quantidade de proteínas com atribuições funcionais (2910), números EC (955) e GO (823), quando comparada às outras cepas, pode indicar um genoma mais compacto e funcionalmente especializado. A linhagem Laprot 314, classificada como *Achromobacter xylosoxidans*, destacou-se por apresentar o maior número de proteínas com função atribuída (5109), com números elevados também nas categorias de proteínas com número EC (1360) e GO (1183). Esses dados sugerem um genoma mais complexo e versátil, com maior potencial de adaptação a diferentes condições ambientais e maior diversidade de vias metabólicas. Essa diversidade funcional pode ser vantajosa em ambientes heterogêneos (Gralka e Hallatschek 2019). Todas essas informações encontram-se reunidas na tabela 6, figura 8 e figura 9.

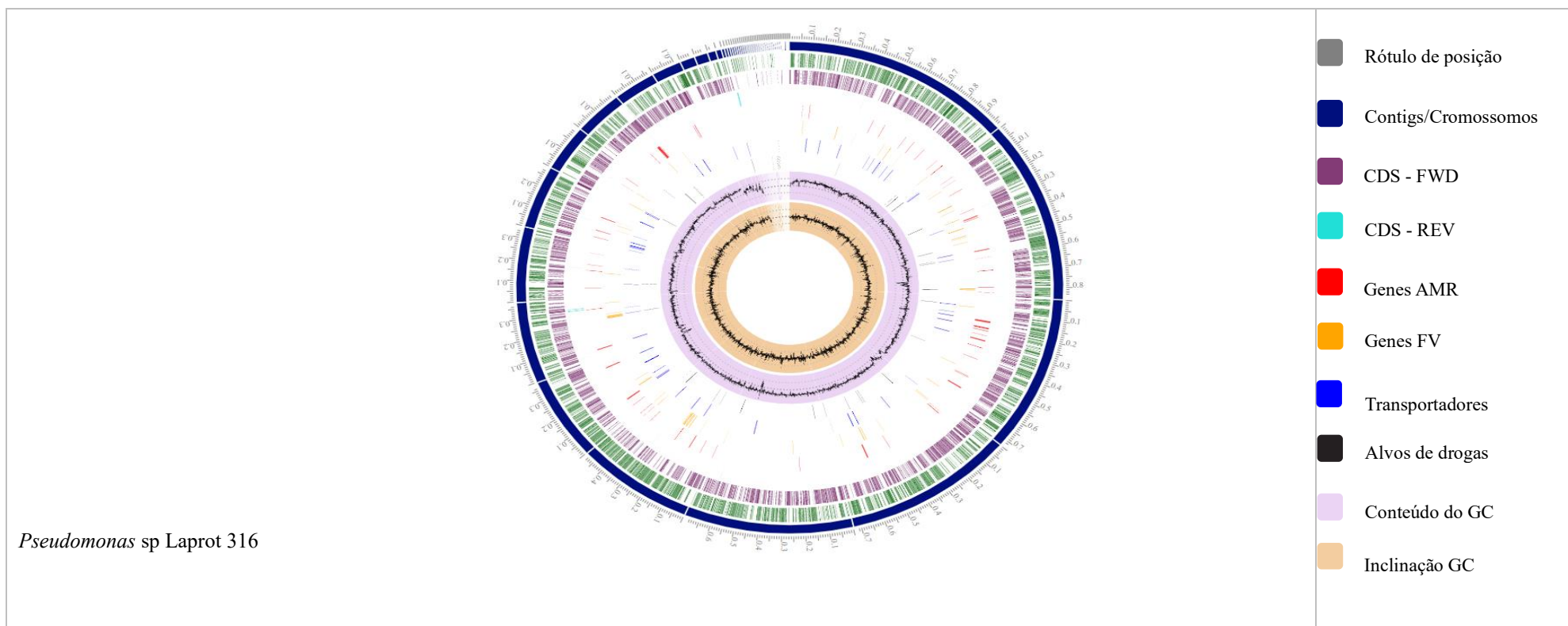
Tabela 6. Identificação de Proteínas dos genomas das cepas constituintes do consórcio A3

	<i>A. seifertii</i> Laprot 313	<i>A. xylooxidans</i> Laprot 314	<i>Pseudomonas</i> sp. Laprot 316
Proteínas hipotéticas	946	1.266	1.630
Proteínas com atribuições funcionais	2.910	5.109	4.754
Proteínas com atribuição de números EC	955	1.360	1.313
Proteínas com atribuições GO	823	1.183	1.125
Proteínas com atribuições de Pathway	739	1.046	984
Proteínas com atribuições da família específica de gênero PATRIC (PLfam)	3.690	5.977	5.963
Proteínas com atribuições da família de gênero cruzado PATRIC (PGfam)	3.732	6.200	6.028

Fonte: De autoria própria

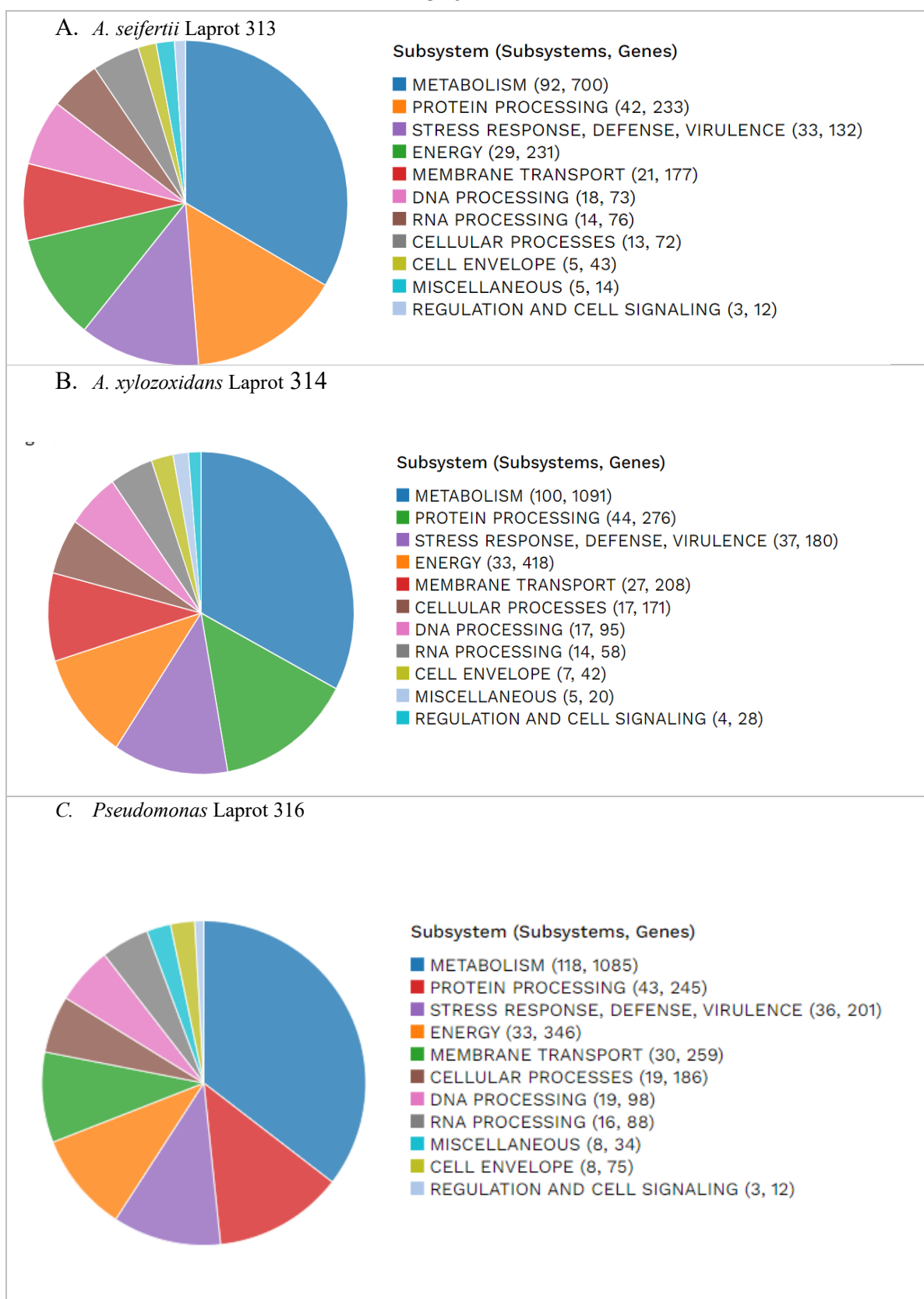
Figura 8: Diagrama circular ilustrando a distribuição da anotação dos genomas para as linhagens (A) *A. seifertii* Laprot 313, (B) *A. xylosoxidans* Laprot 314, (C) *Pseudomonas* sp Laprot 316.





Fonte: autoria própria

Figura 9: Classificação de subsistemas das linhagens Laprot 313, Laprot 314 e Laprot 316.



Fonte: De autoria própria.

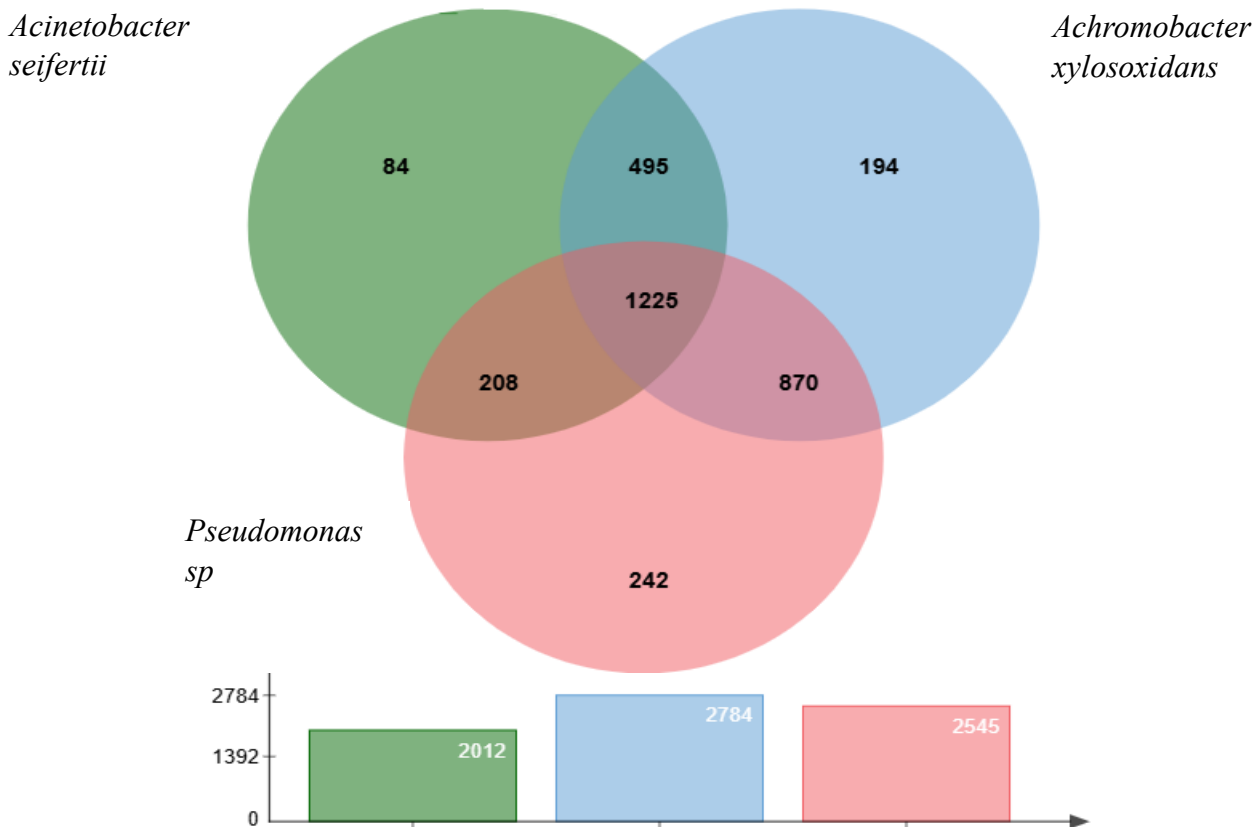
Diagrama de Venn

A análise comparativa entre as linhagens bacterianas *Acinetobacter seifertii* 313, *Achromobacter xylosoxidans* 314 e *Pseudomonas sp* 316 (Figura 10), revelou padrões distintos de compartilhamento e exclusividade de proteínas, refletidos na distribuição dos *clusters* ortólogos e singletons visualizados por meio de um diagrama de Venn. A linhagem 313 apresentou 3.750 proteínas totais, das quais 2.012 participam de *clusters* compartilhados e 1.482 são *singletons*, ou seja, não têm ortólogos detectáveis nas outras linhagens. Esse número relativamente elevado de proteínas exclusivas sugere a presença de elementos genômicos específicos, possivelmente relacionados à adaptação ambiental ou funções metabólicas diferenciadas, incluindo genes associados à degradação de hidrocarbonetos.

A linhagem 314 apresentou o maior número total de proteínas (6.202) e também a maior quantidade absoluta de *singletons* (2.816), o que pode indicar um genoma mais complexo ou a presença de ilhas genômicas, plasmídeos ou genes adquiridos por transferência horizontal. O número elevado de *clusters* compartilhados (2.784) reforça seu potencial de compartilhamento funcional com outras linhagens, mas a proporção de proteínas únicas também indica grande diversidade funcional, o que pode refletir uma ampla plasticidade metabólica. Já a linhagem 316 apresentou 5.813 proteínas totais, com 2.545 proteínas participando de *clusters* e 2.469 como *singletons*. Essa distribuição intermediária entre as linhagens 313 e 314 sugere que *Pseudomonas sp.* 316 compartilha parte significativa de seu repertório gênico com as outras duas linhagens, mas também mantém um conjunto considerável de proteínas exclusivas, que podem estar relacionadas a características adaptativas próprias do gênero *Pseudomonas*, conhecido por sua versatilidade catabólica e resistência ambiental.

O padrão geral observado no diagrama de Venn revela que, embora exista um núcleo funcional conservado entre as linhagens (representado pelos *clusters* ortólogos), uma fração significativa do conteúdo genômico é composta por proteínas únicas, o que indica diversidade funcional entre as linhagens. Essa diversidade pode estar associada a capacidades distintas na degradação de hidrocarbonetos, resistência a estressores ambientais e adaptação a diferentes microambientes. Estudos complementares de anotação funcional e análise de vias metabólicas específicas poderão elucidar com maior precisão o papel dessas proteínas únicas no contexto da biorremediação.

Figura 10: Diagrama de Venn representando a distribuição estimada de proteínas codificadas nos genomas das linhagens bacterianas 313 (*Acinetobacter seifertii*), 314 (*Achromobacter xylosoxidans*) e 316 (*Pseudomonas sp.*).



Nota: De autoria própria.

As áreas exclusivas de cada círculo representam os *singletons* — proteínas únicas identificadas apenas em uma das cepas — indicando componentes genéticos específicos possivelmente relacionados a nichos ecológicos distintos ou especializações metabólicas. As interseções entre dois círculos representam proteínas ortólogas compartilhadas entre pares de linhagens, enquanto a região central, comum às três, corresponde a aproximadamente 1.225 proteínas conservadas, sugerindo um núcleo funcional que pode incluir genes essenciais à sobrevivência, à manutenção celular e à degradação de compostos orgânicos, como hidrocarbonetos. Essa análise ilustra a diversidade genômica e o potencial metabólico diferencial entre os microrganismos, reforçando sua importância na biorremediação e na adaptação a ambientes contaminados.

6.4 Mineração genômica e prospecção de produtos naturais com potencial aplicação biotecnológicas

Nas análises pela plataforma antiSMASH, foi possível identificar *loci* biossintéticos abrangendo uma ampla gama de classes conhecidas de compostos metabólitos especializados. Para *A. seifertii* Laprot 313 foram identificadas 8 regiões de *clusters* biossintéticos (BGCs), para *A. xylosoxidans* Laprot 314, foram identificadas 9 regiões de BGCs e para *Pseudomonas* sp. Laprot 316 8 BGCs (Tabela 7).

Tabela 7: Identificação de clusters gênicos para síntese de metabólitos secundários do genoma do consórcio A3

Região genica	Classe	Cluster conhecido mais semelhante	Percentual Similaridade	Cepa
1.1	Betalactona	Plipastatina	15%	<i>A. seifertii</i> Laprot 313.
1.2	NRP	Propanochelin/Butanochelin/Pentanoichelin	22%	
9.1	RiPP	Berninamicina K/berninamicina J/berninamicina A/berninamicina B	13%	
13.1	NRP	Lagriene	4%	
18.1	NAPAA		0%	
24.1	RiPP		0%	
26.1	RiPP		0%	
32.1	NI-Sideróforos	Estafiloferrina	16%	
2.1	Ectoína	Ectoína	75%	<i>A. Xylosoxidans</i> Laprot 314
5.1	NAPAA			
15.1	Sacarídeo	Salecan	10%	
26.1	Resorcinol			
74.1	NI-Sideróforo	Alcaligina	87%	
112.1	Aril polieno	Aril polieno	16%	
124.1	Terpeno			
158.1	betalactona			

194.1	NRPS-lie, T1pks			
1.1	NAGGN			<i>Pseudomonas sp Laprot 316.</i>
1.2	RiPP			
3.1	RiPP			
3.2	Cofator redox	Lancadicina C	13%	
6.1	Butirolactona		xxx	
9.1	NRP	Pf-5 Pioverdina	4%	
9.2	Betalactona	Corinecina I, II e III	13%	
14.1	NRP- metalóforo	Azotobactina	41%	

Nota: De autoria própria.

As regiões que não apresentaram similaridade alguma com o banco de dados é um indicativo que estes resultados podem ser BGCs que possivelmente estão relacionados a vias de biossíntese de novas moléculas ou que pertencem a vias não caracterizadas de moléculas já conhecidas. Abaixo será dado ênfase para análise de sintenia para BGCs que apresentaram maior similaridade.

Ectoína

Para evitar os efeitos prejudiciais causados pela alta osmolaridade ambiental, alguns microrganismos halofílicos são capazes de equilibrar a pressão osmótica intra e extracelular acumulando grandes quantidades de pequenas moléculas orgânicas específicas chamadas solutos compatíveis, cujo acúmulo maciço não perturba o processo celular normal (Kempf e Bremer, 1998; Brown, 1976). A ectoína como representantes típicos de solutos compatíveis, não são apenas essenciais para que bactérias extremófilas sobrevivam em ambientes extremos, mas também amplamente utilizados nas indústrias cosmética e médica (Liu et al., 2021). Além de atuarem como agentes protetores osmóticos, a ectoína também é excelente estabilizadora bifuncional, protetor da pele e potencial fármaco para doenças, como o mal de Alzheimer e o sintoma da rinoconjuntivite (Pastor et al 2010; Salapatek et al 2011; Kanapathipillai et al 2005).

Um grupo de genes biossintéticos foi identificado com uma alta similaridade envolvido na produção do composto ectoína (Figura 11). Uma análise de sintenia atestou a existência de genes biossintéticos envolvidos em sua produção (Figura 12).

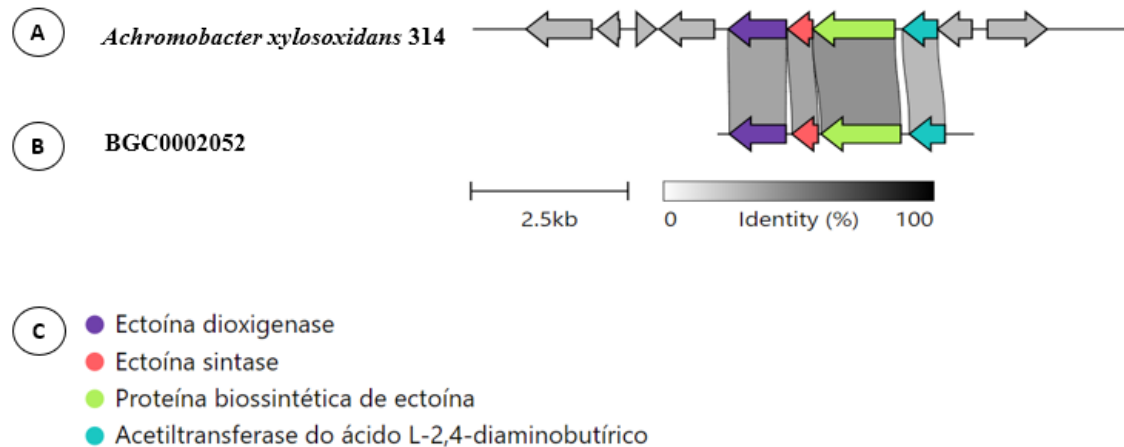
Figura 11: Predição de agrupamentos de genes biossintéticos da classe ectoína encontrada na região 2.1 de *A. xylosoxidans* Laprot 314 realizada no antiSMASH.



Nota: De autoria própria.

Diagrama esquemático de genes biossintéticos de metabólitos secundários. Os genes marcados com vermelho escuro, vermelho claro, azul e cinza são biossintéticos centrais, biossintéticos adicionais, relacionados ao transporte, reguladores e outros genes, respectivamente.

Figura 12: Sintenia de genes responsáveis pela síntese de ectoína.



Nota: De autoria própria.

Análise de sintenia para identificação dos genes presentes nos BGC responsáveis pela síntese de ectoína. (A) BGC de *A. xylosoxidans* Laprot 314 (B) BGC depositado no banco de dados MIBiG (BGC0002052). (C) Identificação dos genes que apresentam semelhanças. As linhas paralelas e verticais indicam a similaridade entre os genes de acordo com a escala. Os genes na cor cinza, representam genes não homólogos ou com função não conhecida. Figura gerada em Clinker (<https://cagecat.bioinformatics.nl/>). Acesso em: abril de 2024.

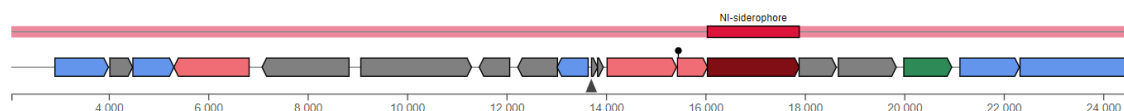
Alcaligina

Alcaligina é relatada como um sideróforo produzido pela cepa *Alcaligenes eutrophus* CH34 resistente a metais pesados. *A. eutrophus* demonstrou interagir com cádmio (Cd) e, conseqüentemente, afetar sua biodisponibilidade e toxicidade. A adição de alcaligina estimulou significativamente o crescimento na presença de Cd de um

derivado CH34 deficiente em alcaligina (Gilis et al., 1998). Usando ensaios de bioluminescência, esse efeito pode ser atribuído a uma diminuição na biodisponibilidade de Cd na presença de alcaligina. Dados sugerem que a alcaligina, além de sua função no fornecimento de ferro à célula, fornece uma proteção contra a toxicidade de metais pesados. Além disso, genes responsivos a metais envolvidos nesses mecanismos de resistência foram utilizados para o desenvolvimento de biossensores de metais, com base na fusão dos genes anteriores a um sistema repórter (Corbisier 1994).

Embora a concentração de metais pesados possa ser determinada a partir de uma amostra ambiental, a quantidade de metais, que estão biologicamente disponíveis, não pode ser determinada por análise química simples. Como os genes de resistência são induzidos em resposta à concentração biodisponível de metais pesados, os biossensores de metais baseados em genes de resistência podem ser usados para determinar a biodisponibilidade de metais pesados no ambiente. Portanto, bactérias que têm a capacidade de sintetizar alcaligina podem ser utilizadas como modelo para o estudo das interações entre a absorção de ferro mediada por sideróforos e a resistência a metais pesados. Um grupo de genes biossintéticos foi identificado com uma alta similaridade envolvido na produção do composto alcaligina pela *A. xylosoxidans* Laprot 314 (Figura 13 e Figura 14). Embora a produção deste metabólito requer confirmação, é indicativo do potencial do consórcio A3 também em processos de descontaminação de ambientes poluídos com metais pesados.

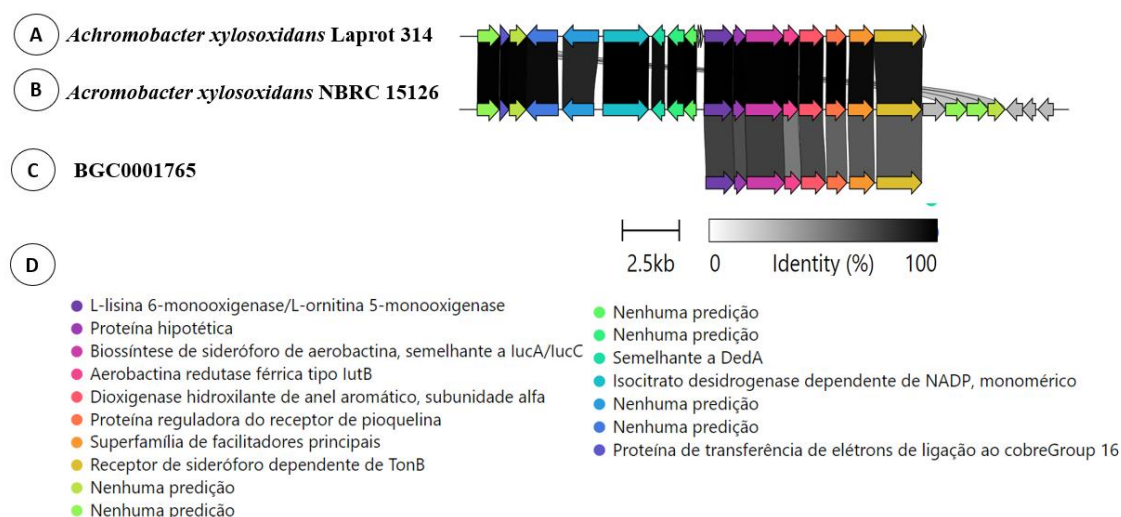
Figura 13: Predição de agrupamentos de genes biossintéticos da classe NI- sideróforos encontrada na região 74.1 de *A. xylosoxidans* Laprot 314 realizada no antiSMASH.



Nota: De autoria própria.

Diagrama esquemático de genes biossintéticos de metabólitos secundários. Os genes marcados com vermelho escuro, vermelho claro, azul e cinza são biossintéticos centrais, biossintéticos adicionais, relacionados ao transporte, reguladores e outros genes, respectivamente.

Figura 14: Sintenia de genes responsáveis pela síntese de alcaligina.



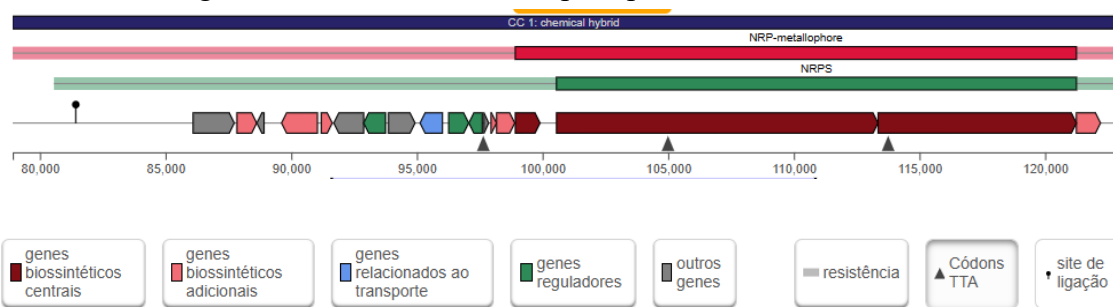
Nota: De autoria própria.

Análise de sintenia para identificação dos genes presentes nos BGC responsáveis pela síntese de alcaligina. (A) BGC de *A. xylosoxidans* Laprot 314 (B) Cepa tipo mais estreitamente relacionada. (C) BGC depositado no banco de dados MIBiG (BGC0001765). (D) Identificação dos genes que apresentam semelhanças. As linhas paralelas e verticais indicam a similaridade entre os genes de acordo com a escala. Os genes na cor cinza, representam genes não homólogos ou com função não conhecida. Figura gerada em Clinker (<https://cagecat.bioinformatics.nl/>). Acesso em: abril de 2024.

Azotobactina

Azotobactina é um composto fluorescente semelhante à pioverdina que serve como sideróforo. As porções hidroxamato, catecol e α -hidroxiácido da azotobactina conferem-lhe uma afinidade muito alta pelo Fe III, e o complexo Fe é absorvido pela bactéria (Wichard et al 2009). Um grupo de genes biossintéticos foi identificado com uma baixa similaridade envolvido na produção do composto azotobactina (Figura 15). Uma análise de sintenia atestou a existência de genes biossintéticos envolvidos na produção do composto, assim como também uma alta similaridade de cluster com a cepa tipo mais relacionada (Figura 16).

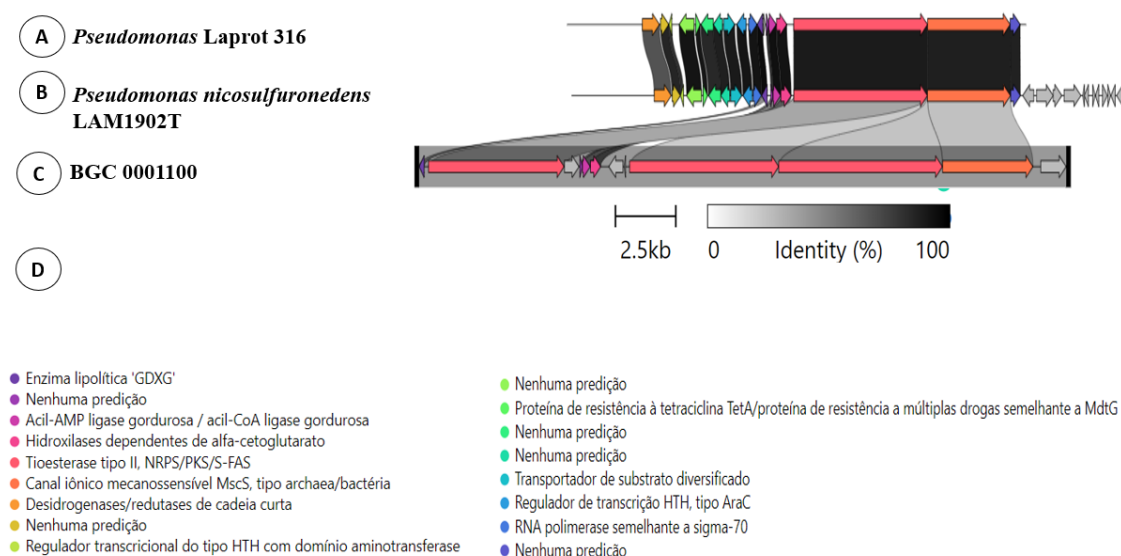
Figura 15: Predição de agrupamentos de genes biossintéticos da classe Azotobactina encontrada na região 14.1 de *Pseudomonas* sp. Laprot 316 realizada no antiSMASH.



Nota: De autoria própria.

Diagrama esquemático de genes biossintéticos de metabólitos secundários. Os genes marcados com vermelho escuro, vermelho claro, azul e cinza são biossintéticos centrais, biossintéticos adicionais, relacionados ao transporte, reguladores e outros genes, respectivamente.

Figura 16: Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Azotobactina.



Nota: De autoria própria.

Análise de sintenia para identificação dos genes presentes nos BGC responsáveis pela síntese de Azotobactina. (A) BGC de *Pseudomonas* sp. Laprot 316 (B) Cepa tipo mais estreitamente relacionada. (C) Identificação dos genes que apresentam semelhanças. As linhas paralelas e verticais indicam a similaridade entre os genes de acordo com a escala. Os genes na cor cinza, representam genes não homologos ou com função não conhecida. Figura gerada em Clinker (<https://cagecat.bioinformatics.nl/>).

Lancacidina C

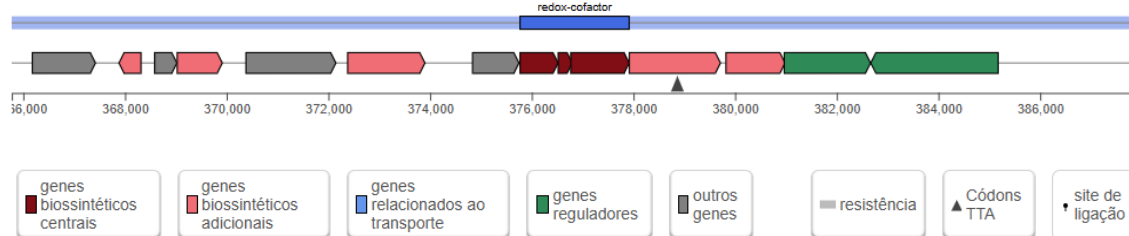
Atualmente, a humanidade enfrenta o problema da crescente disseminação da resistência aos antibióticos entre os microrganismos. Essa resistência a antibióticos pode levar à rápida disseminação de doenças infecciosas contra as quais os antibióticos mais conhecidos atualmente são ineficientes (Ventola CL 2015). Um aspecto fundamental para superar essa crise de resistência a antibióticos envolve a triagem de novos compostos naturais com atividade antibacteriana ou novos produtores de compostos naturais previamente identificados (Tistechok 2022).

Lancacidinas consistem em uma classe de metabólitos híbridos de policetídeos e peptídeos que apresentam uma estrutura heptadecana transanulada (17 membros). O primeiro congênere desta categoria é a Lancacidina C (Zheng et al 2017). Anteriormente demonstrado como antibióticos orais para animais infectados, as lancacidinas têm o potencial de fazer parte de uma nova geração de antibióticos para combater cepas patogênicas convencionais resistentes a macrólidos (Tsuchiya et al 1970). Eles mostram

fortes efeitos protetores em camundongos contra bactérias Gram-positivas, incluindo isolados clínicos quando administrados por via oral ou parenteral (Harada 1975). No entanto, as porções lábeis e densamente funcionalizadas dentro desta família de policetídeos complexos representam um desafio formidável para síntese química total e derivatização, impedindo assim o desenvolvimento medicinal para uso clínico (Zheng et al 2017).

Um grupo de genes biossintéticos foi identificado com uma baixa similaridade envolvido na produção do composto Lancacidina C (Figura 17). Uma análise de sintenia atestou a existência de genes biossintéticos envolvidos na produção do composto, assim como também uma alta similaridade de cluster com a cepa tipo mais relacionada (figura 18). A confirmação da produção lancacidina pela cepa *Pseudomonas* sp. Laprot 316 representa um impacto significativo para a inclusão de uma nova molécula com potencial antimicrobiano no cenário de combate às doenças.

Figura 17: Predição de agrupamentos de genes biossintéticos da classe cofator redox encontrada na região 3.2 de *Pseudomonas* sp. Laprot 316 realizada no antiSMASH.



Nota: De autoria própria.

Diagrama esquemático de genes biossintéticos de metabólitos secundários. Os genes marcados com vermelho escuro, vermelho claro, azul e cinza são biossintéticos centrais, biossintéticos adicionais, relacionados ao transporte, reguladores e outros genes, respectivamente.

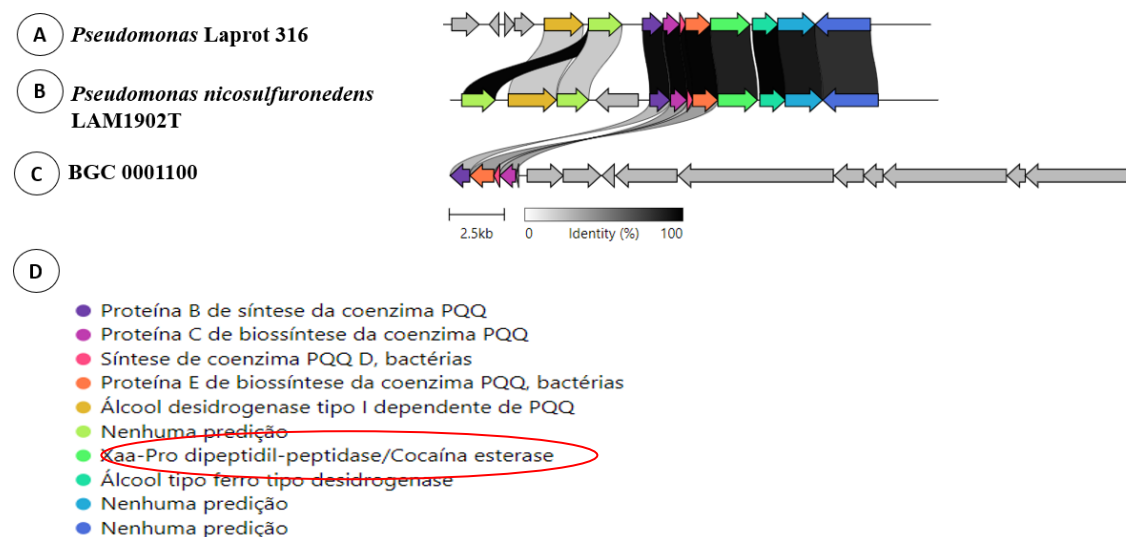
A identificação de um gene de cocaína esterase em um determinado cluster representa um resultado interessante (Figura 26). A cocaína esterase é uma enzima capaz de catalisar a hidrólise da cocaína, transformando-a em produtos não tóxicos. Essa propriedade torna a cocaína esterase uma candidata promissora para o desenvolvimento de tratamentos para pessoas intoxicadas com cocaína. A intoxicação por cocaína é um problema de saúde pública, associada a altas taxas de mortalidade devido a overdose. Terapias baseadas em cocaína esterase poderiam oferecer uma intervenção rápida e eficaz, reduzindo a concentração de cocaína no organismo e mitigando os efeitos tóxicos da droga (Narasimhan et al 2012)

Além do potencial terapêutico, a cocaína esterase também pode ser aplicada na detecção de cocaína ilícita. Dispositivos baseados nessa enzima poderiam ser utilizados

em ambientes forenses e de segurança para identificar a presença de cocaína de maneira precisa e eficiente. A especificidade da cocaína esterase para a cocaína a torna uma ferramenta ideal para a detecção de resíduos da droga em diversas superfícies e amostras biológicas, auxiliando no combate ao tráfico e uso ilegal de cocaína.

Portanto, a identificação do gene de cocaína esterase em um cluster de *Pseudomonas* sp. Laprot 316 abre novas possibilidades tanto para o tratamento de intoxicações quanto para a detecção de cocaína, oferecendo esperança para o desenvolvimento de tecnologias inovadoras que podem salvar vidas e melhorar a segurança pública.

Figura 18: Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Lancacidina C.



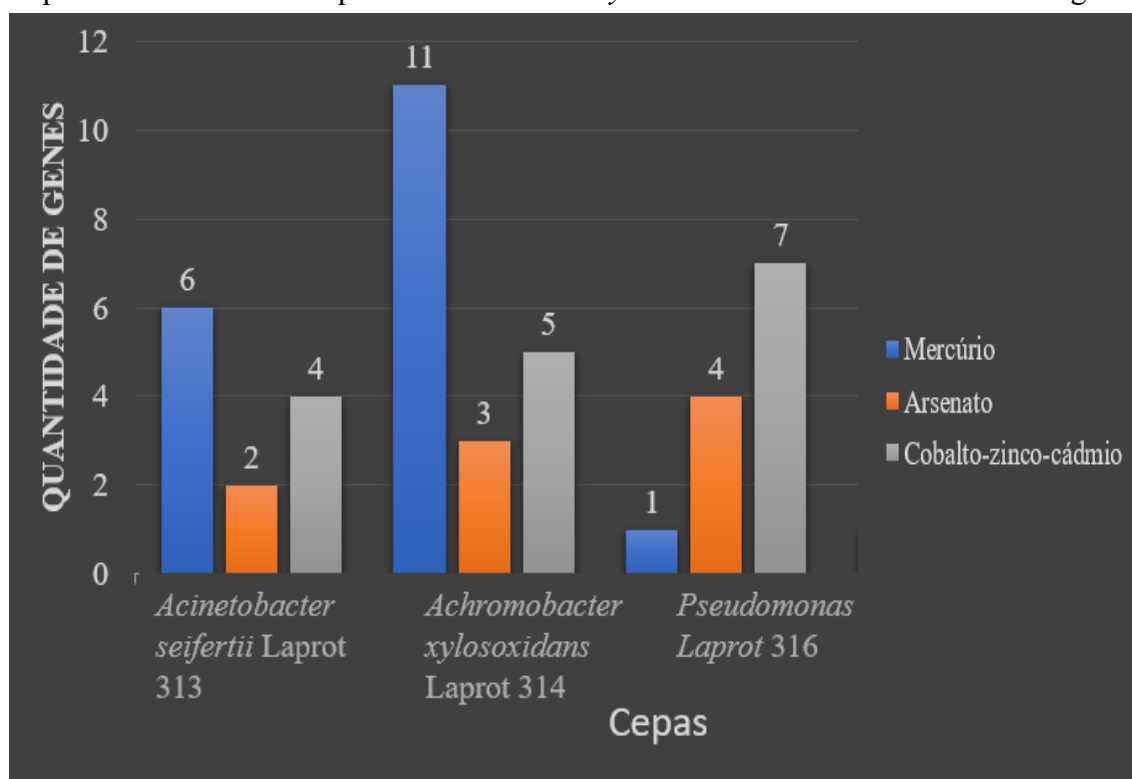
Nota: De autoria própria.

Análise de sintenia para identificação dos genes presentes nos BGC responsáveis pela síntese de lancacidina C. (A) BGC de *Pseudomonas* sp. Laprot 316. (B) Cepa tipo mais estreitamente relacionada. (C) Identificação dos genes que apresentam semelhanças. As linhas paralelas e verticais indicam a similaridade entre os genes de acordo com a escala. Os genes na cor cinza, representam genes não homólogos ou com função não conhecida. Figura gerada em Clinker (<https://cagecat.bioinformatics.nl/>).

6.5 Genes de degradação de metais pesados

Também foi realizada uma análise genética nas linhagens *Acinetobacter seifertii* Laprot 313, *Achromobacter xylosoxidans* Laprot 314 e *Pseudomonas* Laprot 316 com o objetivo de identificar genes relacionados à degradação de metais pesados. Os resultados demonstraram a presença de genes associados à degradação metais (mercúrio, cobalto, zinco, cádmio e arsenato) em todas as linhagens analisadas (Figura 19). No entanto, a linhagem *Achromobacter xylosoxidans* Laprot 314 destacou-se, apresentando o maior número de genes especificamente voltados para a degradação de mercúrio (11 genes). Esses dados são relevantes, dado o impacto ambiental do mercúrio, que é altamente tóxico e persistente nos ecossistemas. A presença de genes relacionados à degradação de metais pesados sugere um potencial biotecnológico promissor para a biorremediação de áreas contaminadas por esse metal pesado por essas bactérias.

Figura 19: Comparação das quantidades de genes relacionado à metabolização de metais pesados entre *A. seifertii* Laprot 313, *A. xylosoxidans* Laprot 314, *Pseudomonas* sp. Laprot 316. Observa-se que *Achromobacter xylosoxidans* tem maior número de genes



associados à degradação de mercúrio, seguido de *Acinetobacter seifertii* e *Pseudomonas* sp.

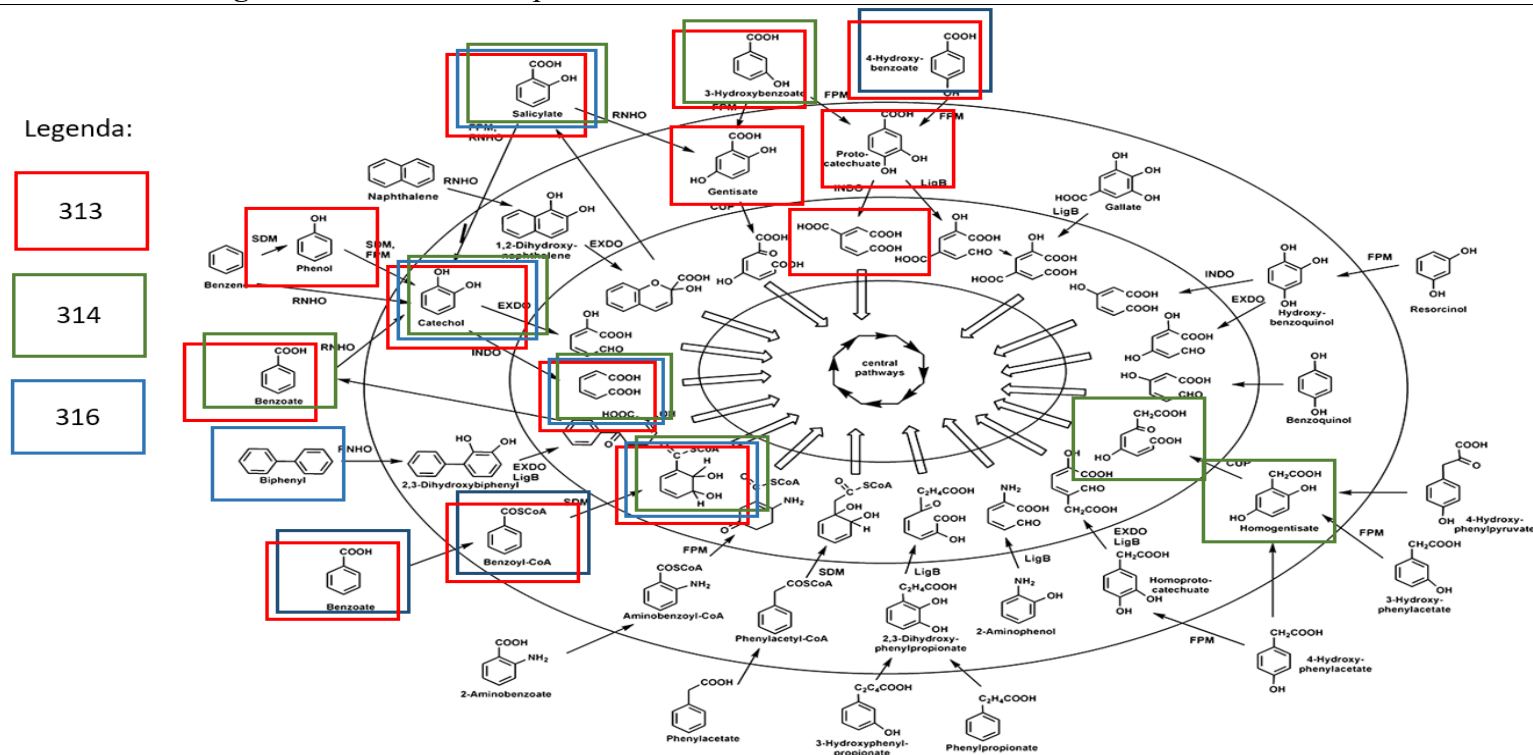
Nota: Autoria própria

6.6 Anotação funcional de genes especializados na degradação de combustíveis fósseis

6.6.1 Degradação de composto aromáticos

Os resultados obtidos para as linhagens *Acinetobacter seifertii* Laprot 313, *Achromobacter xylosoxidans* Laprot 314 e *Pseudomonas* Laprot 316 revelam um perfil genético diversificado para processos de degradação de hidrocarbonetos aromáticos. A detecção de genes associados à degradação de compostos aromáticos periféricos e intermediários (Figura 20) reforça o potencial dessas bactérias para atuar em ambientes contaminados por petróleo e seus derivados. Esses genes estão diretamente relacionados à capacidade de iniciar e conduzir rotas catabólicas que convertem compostos recalcitrantes em intermediários assimiláveis, resultando na detoxificação progressiva do ambiente. A presença de genes específicos ligados à degradação de salicilato, 3-hidroxibenzoato, 4-hidroxibenzoato, fenol e benzoato evidencia que cada linhagem possui um repertório metabólico particular, sugerindo estratégias adaptativas distintas frente a diferentes substratos aromáticos. Essa diversidade genética pode estar associada à especialização ecológica das cepas, refletindo a pressão seletiva imposta pelos contaminantes presentes em seus ambientes de origem. De forma comparativa, é possível inferir que *A. seifertii* Laprot 313 apresenta um conjunto mais amplo de genes envolvidos nas etapas iniciais da oxidação de hidrocarbonetos, o que pode explicar seu melhor desempenho nos ensaios de degradação. Já *A. xylosoxidans* Laprot 314 e *Pseudomonas* Laprot 316 parecem compartilhar rotas catabólicas complementares, o que sugere que, em consórcio, essas bactérias poderiam exibir sinergia metabólica.

Figura 20: Metabolismo periférico, intermediário e central de aromáticos.



Fonte: Adaptado de Vilchez-Vargas 2010.

Nota: O círculo externo mostra as moléculas intermediárias. O círculo interno em mostra as moléculas produtos de clivagem (perda do anel aromático) e desaromatização (cíclicas com perda de ressonância) que produzirão intermediários para o metabolismo central. Os Quadrados sinalizam as vias metabólicas previstas no genoma da cepa 313, 314 316.

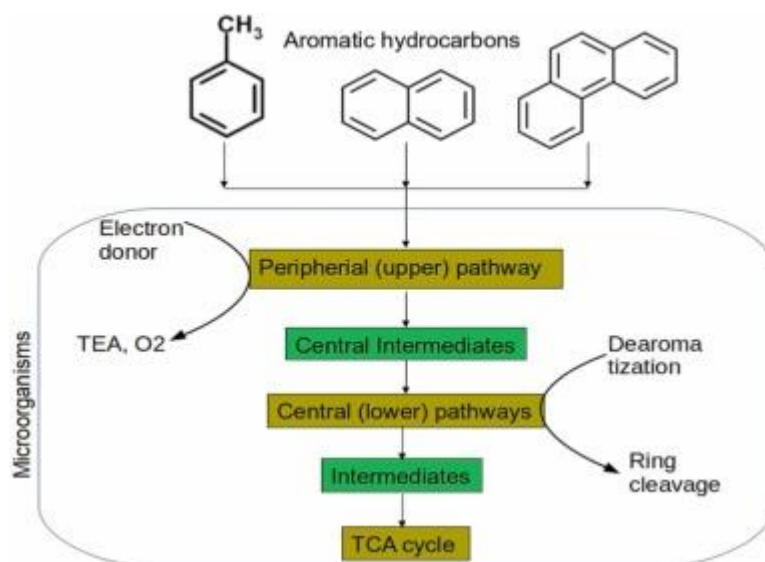
Várias proteínas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos aromáticos tiveram seus genes codificadores encontrados nos genomas das bactérias constituintes do consórcio A3. Estes resultados estão resumidos na tabela em anexo.

Os compostos aromáticos são frequentemente empregados em indústrias como petroquímica, têxtil, farmacêutica, plástica e de tintas. Eles podem ser liberados no meio ambiente por meio desses efluentes industriais (Mohammadi et al 2015). Dentre eles os BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) atraiu interesse particular. Essas substâncias, que são feitas de petróleo por meio de reforma catalítica, craqueamento e pirólise, são usadas como solventes e matérias-primas para produzir pesticidas, plásticos e tecidos sintéticos (Anjum et al 2019;). Os BTEX podem prejudicar o sistema nervoso central e o sistema respiratório, colocando em risco a saúde humana (Alharbi et al 2018). Outros compostos aromáticos conhecidos como HPAs são constituídos por dois ou mais anéis de benzeno ligados (Asghari et al 2020). Os HPAs podem ser subdivididos em HPAs leves (menos de 4 anéis de benzeno) e pesados (mais de 4 anéis de benzeno) com

base na quantidade de anéis de benzeno (Ahmed, 2021). A maioria dos HPAs, como benzo [a]pireno (BaP), fenantreno (PHE), pireno (PYR) e antraceno (ANT), são usados como precursores de pesticidas sintéticos, medicamentos, corantes, pigmentos e plásticos, etc. (Abdel-Shafy e Mansour 2016). Devido à alta toxicidade, potencial de bioacumulação e biodegradabilidade, acredita-se que os HPAs representem uma ameaça ao ecossistema e à saúde pública (Asghari et al 2020). Além disso, os BTEX, HPAs e compostos fenólicos foram identificados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) como substâncias potencialmente cancerígenas e poluentes prioritários (Thakurta et al 2018). Portanto, há uma necessidade urgente de abordagens para eliminar compostos aromáticos no ambiente natural e nas águas residuais.

A remoção de compostos aromáticos do ambiente poluído é um desafio considerável. Métodos tradicionais de remediação física e química, como adsorção, floculação e oxidação por substâncias químicas e extração por solvente, que normalmente resultam em subprodutos poluentes adicionais e aumentam a despesa do tratamento de resíduos (Mohammadi et al 2015; Senthilvelan et al 2014). As vias de degradação de compostos aromáticos podem ser divididas em centrais e periféricas. As vias centrais incluem processos que levam à incorporação de intermediários comuns do metabolismo, como o ciclo de Krebs e a glicólise, permitindo que os microrganismos convertam compostos aromáticos em produtos que podem ser utilizados para crescimento e energia. Por outro lado, as vias periféricas são mais específicas e muitas vezes envolvem a degradação de compostos aromáticos em etapas que não necessariamente se conectam diretamente às vias centrais (Chen et al 2014) (Figura 20).

Figura 21: Degradação aeróbica microbiana de hidrocarbonetos aromáticos.



Fonte: Kotoky et al 2022.

6.6.1.1 Via periférica de degradação de aromáticos

As oxigenases de bactérias são uma classe de enzimas oxidorredutases que facilitam a adição de oxigênio molecular aos compostos aromáticos. Essas oxigenases são classificadas como monooxigenases ou hidroxilases ou oxidases e dioxigenases de função mista. Assim, o primeiro passo da via aeróbica envolve a oxidação por monooxigenases ou por dioxigenases. As enzimas monooxigenases adicionam uma molécula de hidroxila ao composto quebrando a ligação oxigênio-oxigênio de O_2 e produzem H_2O como um subproduto. No entanto, as enzimas dioxigenases adicionam duas moléculas de oxigênio por di-hidroxilação redutiva do anel aromático, formando os cis-di-hidrodióis. Após a oxidação inicial por monooxigenases e dioxigenases, diferentes intermediários centrais, como protocatecuatos, catecóis, (hidroxi) benzoquinóis e gentisatos, são formados, pela adição do grupo hidroxila, geralmente na posição orto ou para (Fuchs et al 2011). Embora as vias metabólicas periféricas para diferentes HPAs sigam um plano de decomposição semelhante, o número de anéis aromáticos do composto original determina os intermediários formados e a eficiência cinética da via. Os compostos aromáticos policíclicos superiores são inicialmente degradados para os intermediários mono e diaromáticos.

6.4.1.2 Metabolismo de intermediários aromáticos centrais

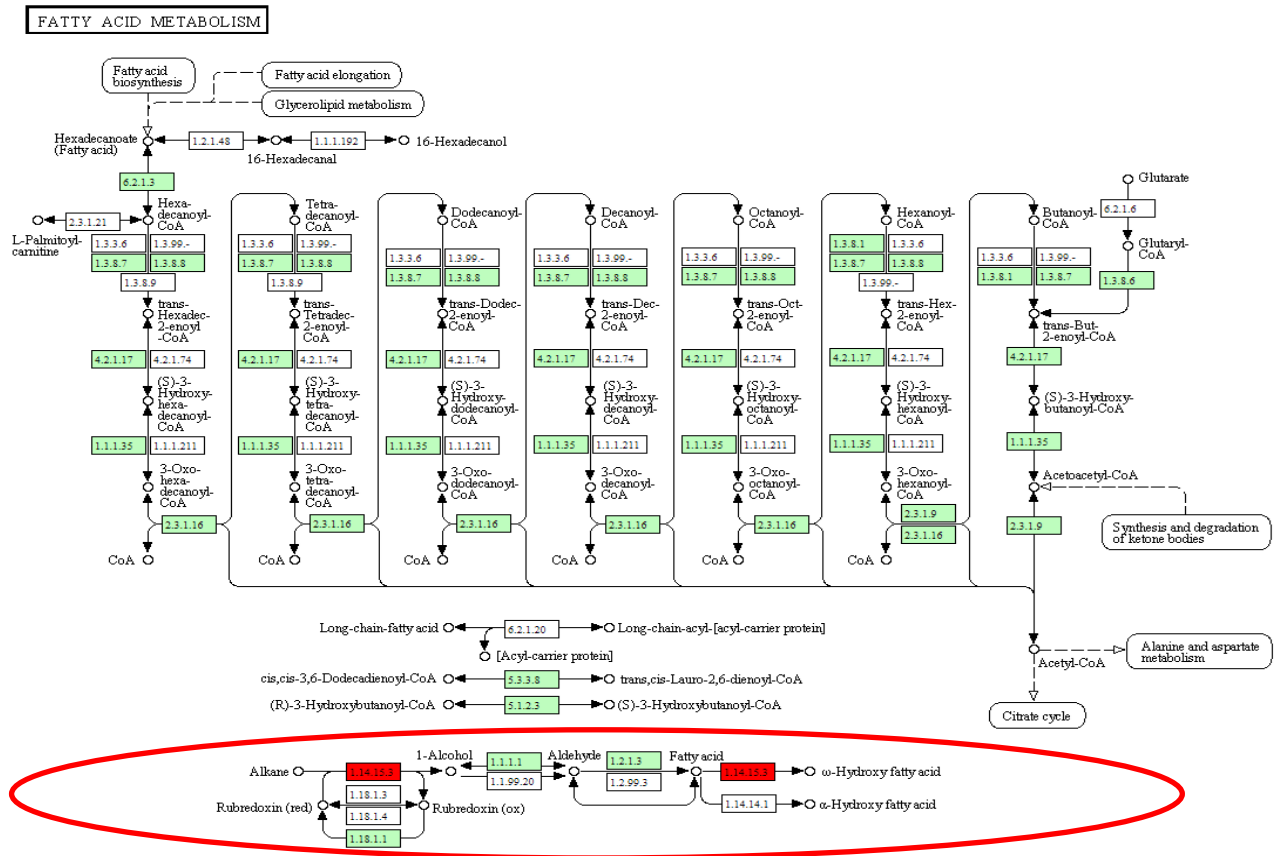
As vias centrais ou inferiores envolvem a desaromatização e a clivagem do anel de intermediários centrais formados na via superior para ácidos tricarboxílicos. Os intermediários centrais formados durante a degradação periférica de compostos aromáticos são geralmente catecol ou não-catecóis como protocatecuato, gentisato e homogentisato. Os catecóis têm grupos cis-diídrodióis e os não-catecóis são ácidos carboxílicos aromáticos substituídos por hidroxila. A primeira reação dessas vias centrais envolve a desaromatização dos intermediários centrais seguida por orto-, meta- ou para-clivagem por enzimas dioxigenases (Ladino-Orjuela et al., 2016). A via orto ou a via β -ceto adipato da degradação do catecol envolve a clivagem do anel entre dois grupos hidroxila, catalisada pela intradiol-dioxigenase catecol 1,2-dioxigenase para cis, cis - muconato (Setlhare et al., 2019). A meta-clivagem do catecol é catalisada adjacente a um grupo hidroxila pela extradiol-dioxigenase catecol 2,3-dioxigenase para semialdeído 2-hidroxi-mucônico (Suenaga et al 2014). A terceira via, a via de para-clivagem, é encontrada em ácidos carboxílicos aromáticos substituídos por hidroxila, onde a clivagem do anel ocorre entre o átomo de carbono substituído por carboxila e o átomo de carbono hidroxilado adjacente, como no gentisato pela 2,3-gentisato dioxigenase (Romero-Silva et al., 2013). O protocatecuato, outro intermediário central, pode sofrer três modos diferentes de degradação prescritos pela estrutura química: (1) clivagem intradiol produzindo ácido 3-carboxi-cis, cis-mucônico pela protocatecuato 3,4-dioxigenase de *P. putida*; (2) clivagem extradiol proximal produzindo semialdeído 2-hidroxi-5-carboximucônico catalisado pela protocatecuato 4,5-dioxigenase, melhor caracterizada na cepa SYK-6 de *Sphingobium* sp.; e (3) clivagem extradiol distal produzindo semialdeído 2-hidroxi-4-carboximucônico catalisado pela protocatecuato 2,3-dioxigenase, relatada na cepa JJ-1b de *Paenibacillus* sp. (Becker e Wittmann 2019). Esses intermediários são então metabolizados em ácido tricarboxílico que entra na via central do carbono.

6.7 Degradação de hidrocarbonetos alifáticos

Ao analisar as linhagens *Acinetobacter seifertii* Laprot 313 e *Pseudomonas* Laprot 316 na plataforma KEGG, foi possível identificar a presença da via completa de *alkB* (Figura 22 Circulo vermelho). Assim como a identificação completa da via de degradação de ácidos graxos o que é esperado já que durante o processo de degradação de n-alcanos, enzimas convertem estes componentes em intermediário como o acil-CoA. Um dos processos descritos em condições aeróbicas, inicia com hidroxilação da região N-terminal dos n-alcanos catalisada por alcano monooxigenase (EC NUMBER: 1.14.15.3), em seguida, a molécula resultante é oxidada pelas enzimas álcool desidrogenase (EC NUMBER: 1.1.1.1) e aldeído desidrogenase (EC NUMBER: 1.2.1.3), o ácido carboxílico resultante será substrato para a acil-CoA sintetase (EC NUMBER: 6.1.2.3), o acil-CoA resultante entra na via de β -oxidação (Wentzel et al 2007). Quatro reações catalisadas por enzimas constituem a primeira etapa da oxidação de ácidos graxos. Primeiro, a desidrogenação da acil-CoA graxo produz uma ligação dupla entre os átomos de carbono alfa e beta (C-2 e C-3) produzindo uma trans- Δ^2 -enoil-CoA, mediada pela enzima Acil-CoA desidrogenase (EC NUMBER: 1.3.8.7 e EC NUMBER: 1.3.8.6). Em seguida, ocorre uma reação de hidratação na ligação dupla de trans- Δ^2 -enoil-CoA para formar o estereoisômero L da β -hidroxil-CoA, catalisada pela Enoil-CoA hidratase (EC NUMBER: 4.2.1.17). No terceiro passo, a L- β -hidroxil-CoA é desidrogenada para formar β -cetoacil-CoA pela ação da β -hidroxil CoA desidrogenase (EC NUMBER: 1.1.1.35). O quarto e último passo do ciclo da β -oxidação é catalisada pela acil-CoA-acetil transferase (EC NUMBER: 2.3.1.16) mas comumente chamada de tiolase, que promove a reação de β -cetoacil-CoA com uma molécula de coenzima A livre para separar o fragmento de dois carbonos da extremidade carboxílica do ácido graxo original como acetil-CoA. O outro produto é tioéster de coenzima A do ácido graxo agora encurtado em dois átomos de carbono (Nelson e Cox, 2014). Todas enzimas foram identificadas no genoma de Laprot 313 e Laprot 316, assim podendo presumir que os alcanos assimilados convertidos a acil-CoA estão participando desta rota metabólica. A linhagem *A. xylosoxidans* 316 apresentou a via completa da beta oxidação porém não foi identificado os genes *alkB* (Figura 22 C)

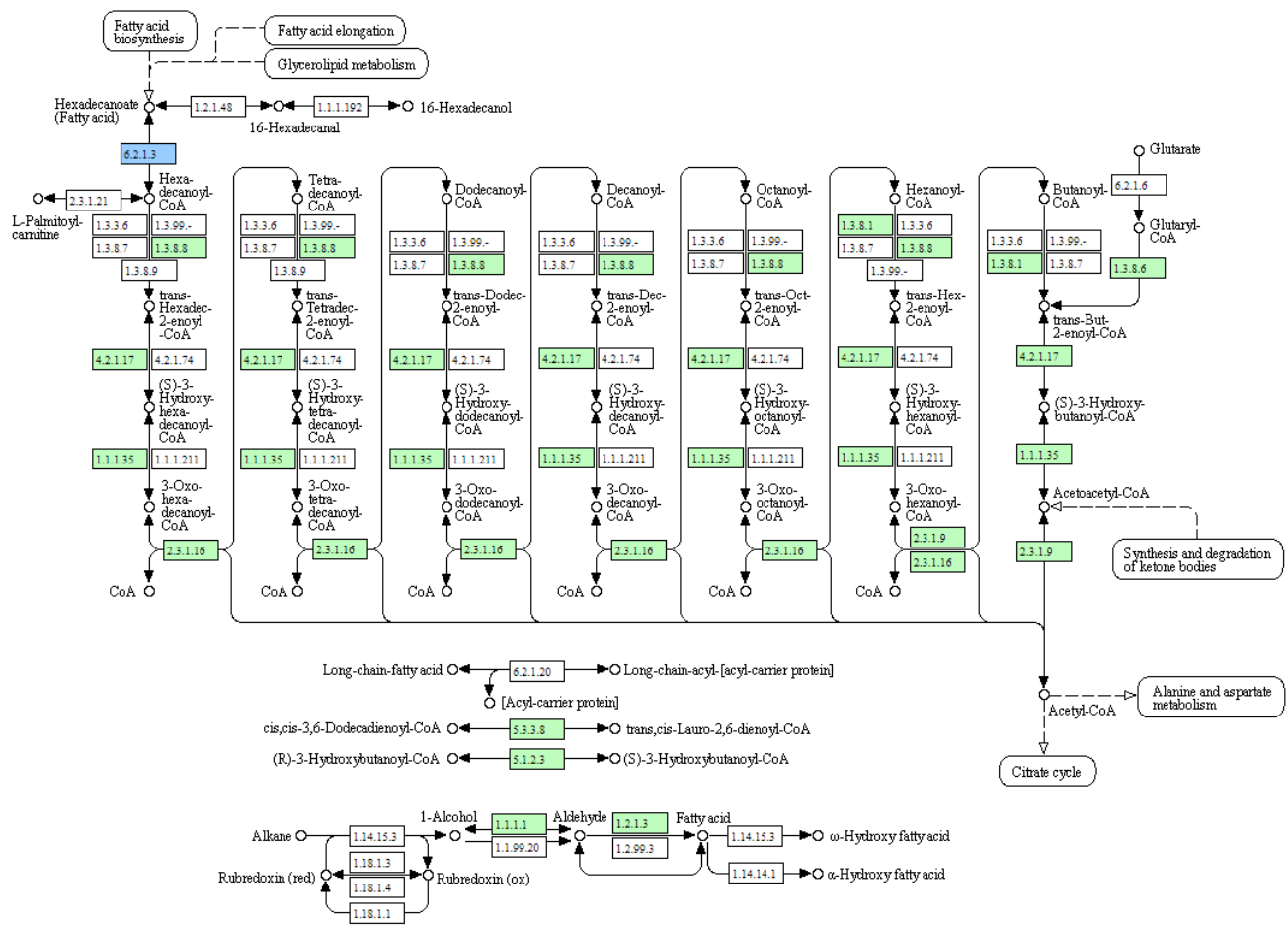
Figura 22: Genes identificados da via de degradação de alcanos e ácidos graxos. Inserir na legenda os itens A, B e C com suas respectivas linhagens.

A. *A. seifertii* Laprot 313



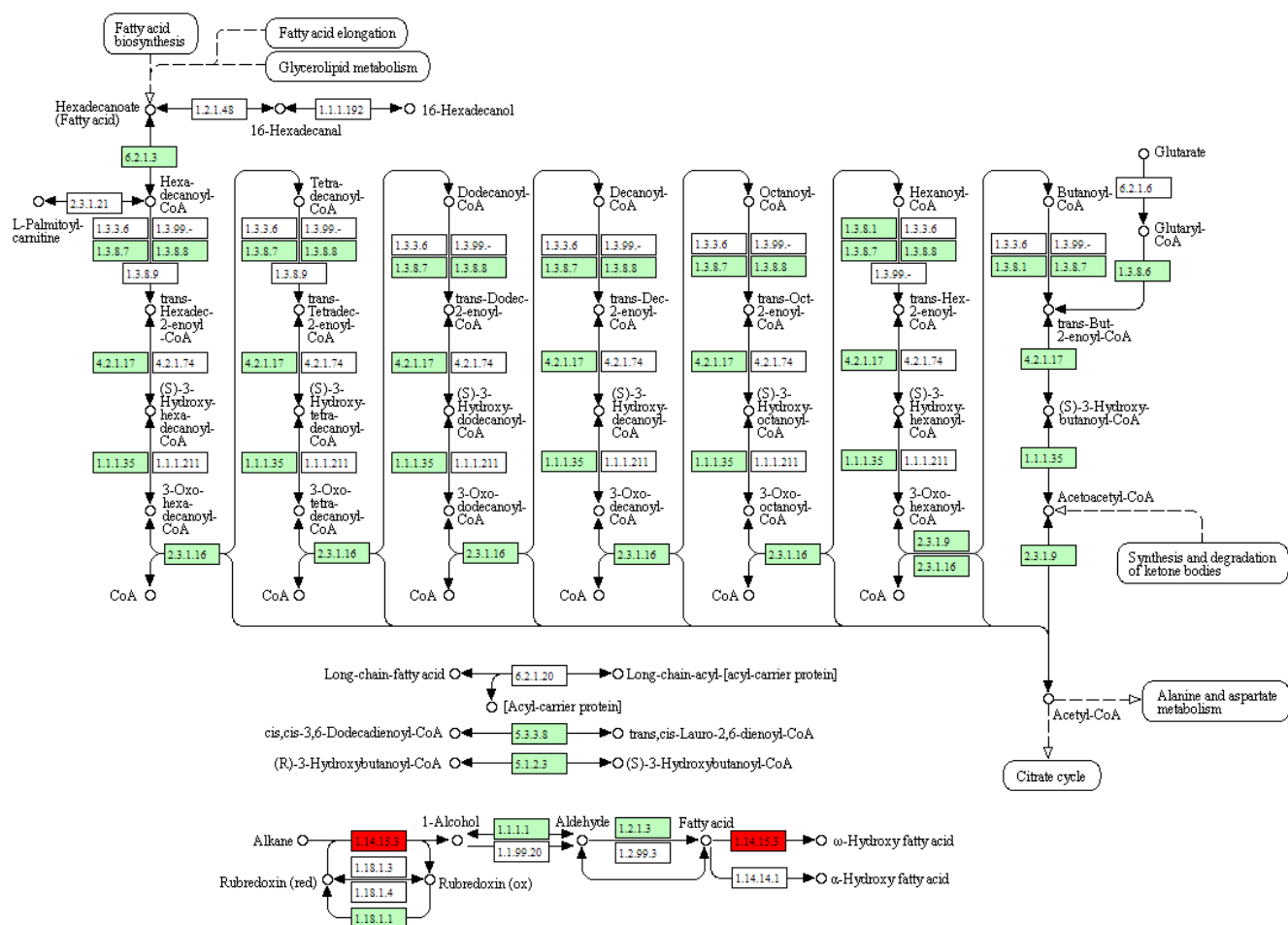
B. *A. Xylosoxidans* Laprot 314

FATTY ACID METABOLISM



C. Genes identificados na via de degradação de alcanos em *Pseudomonas sp.* Laprot 316

FATTY ACID METABOLISM



Fonte: de autoria própria

Nota: Ao analisar o genoma das linhagens 313, 314 e 316, observou-se uma diferença na presença do gene *alkB*, que codifica a enzima alceno monooxigenases, enquanto as linhagens A e C apresentaram o gene *alkB* EC NUMBER: 1.14.15.3 (destacado em vermelho), a cepa B não exibiu esse gene, apesar de possuir os demais genes da via metabólica de degradação de alcanos (destacados em verde).

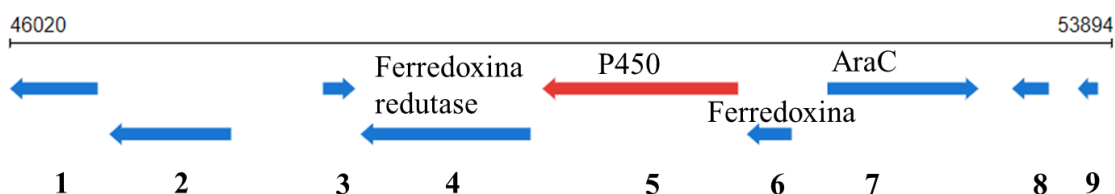
A alceno monooxigenase (*alkB*) desempenha um papel fundamental na hidroxilação de alcanos, etapa crucial para a degradação desses compostos. A ausência desse gene na linhagem *A. xylosoxidans* sugere que essa linhagem pode utilizar vias alternativas ou enzimas diferentes para iniciar o processo de degradação de hidrocarbonetos alifáticos. Embora a linhagem 314 não possua o gene *alkB*, a presença dos demais genes da via metabólica indica que essa linhagem é capaz de degradar alcanos por meio de outras enzimas ou rotas metabólicas. A identificação do gene *alkB* nas linhagens 313 e 316 reforça a importância dessa enzima na degradação de alcanos e evidencia a diversidade genética entre as linhagens.

A análise revelou também a presença de outras monooxigenases como, *CYP* 450(citocromo p450 hidroxilase) na linhagem 313 (Figura 23), *ladA* (monooxigenase

flavina-dependente) para linhagem 313 e 316 (Figura 24), e a *almA* (monooxigenases de ligação a FAD) apenas na linhagem 314 (Figura 25). Vale ressaltar que, apesar de esses genes terem sido preditos, não foram categorizados em subsistemas devido à ausência dessa classificação nos bancos de dados.

Enzimas do citocromo P450 hidroxilase são uma superfamília de proteínas contendo heme-tiolato nomeadas em homenagem ao estado característico do complexo reduzido ligado ao monóxido de carbono (CO) que exibe uma banda máxima de absorção UV-visível a 450 nm, devido ao grupo de ferro heme estar ligado à apoproteína por meio de uma cisteína conservada axial (Guengerich 2018). As enzimas CYP são proteínas P450 de classe I que requerem a presença de um sistema de proteína de entrega de elétrons (ferredoxina e proteína ferredoxina redutase). As enzimas do citocromo P450 da família CYP153 são as primeiras enzimas P450 solúveis que exibem especificamente atividade de hidroxilação em direção à posição terminal de alcanos (Scheps et al 2011). Várias linhagens bacterianas que degradam os alcanos C5 – C10 contêm alceno hidroxilases que pertencem a uma família distinta citocromo P450 hidroxilase (Rojo 2009).

Figura 23: Cluster onde foi identificado o gene CYP (citocromo P450 hidroxilase) na linhagem Laprot 313

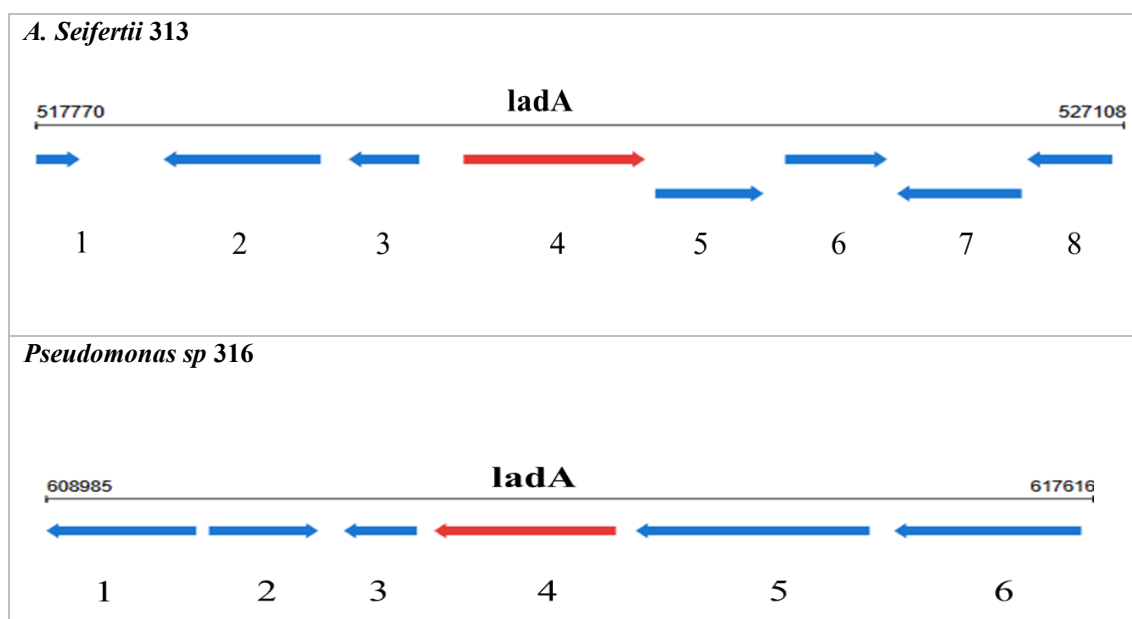


Fonte: autoria própria

Nota: 1- Regulador transcricional, família AcrR; 2-Proteína hipotética; 3- Proteína do elemento móvel; 4- Ferredoxina redutase; **5- citocromo P450 hidroxilase**; 6- Ferredoxina 2Fe-2S; 7- Regulador transcricional, família AraC; 8- Proteína de função desconhecida DUF208 e 9- Proteína do elemento móvel.

As linhagens 313 e 316 apresentaram um gene (*ladA*) para hidroxilase de alceno de cadeia longa. Esta enzima oxida os alcanos C 15 – C 36, gerando os álcoois primários correspondentes (Feng et al., 2007). A estrutura cristalina da *ladA* foi identificada, revelando que a *ladA* pertence à família da luciferase bacteriana, que é uma oxigenase dependente de flavina de dois componentes (Li et al 2008). Acredita-se que a *ladA* oxide alcanos por um mecanismo semelhante ao de outras monooxigenases de flavoproteína, e sua capacidade de reconhecer e hidroxilar alcanos cadeias longas provavelmente resulta da maneira como captura o alceno (Li et al 2008).

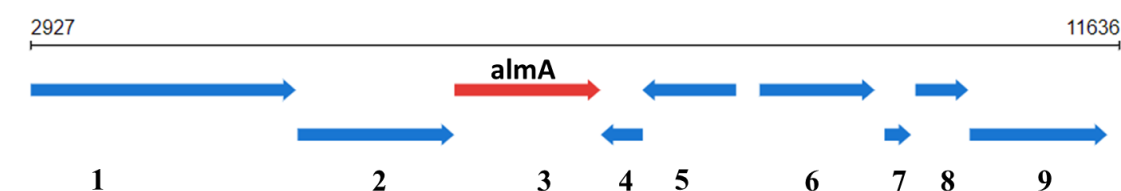
Figura 24: *Cluster* onde foi identificado o gene *ladA* (monooxigenase flavina-dependente) nas linhagens Laprot 313 e 316.



Fonte: autoria própria

Nota: **A (Laprot 313):** 1- Proteína hipotética; 2- Proteína E da membrana externa; 3- Regulador transcricional, família AcrR; **4- Monooxigenase de ligação à flavina**; 5- Hidrolase, família de dobras alfa/beta; 6- Fitoil-CoA dioxigenase; 7- Canal de potássio osmossensível histidina quinase KdpD; 8- Regulador de resposta transcricional de dois componentes, família LuxR. **B: (Laprot 316):** 1- Enoil-CoA hidratase; 2- Regulador transcricional, família LysR; 3- Nitroreductase; **4- Monooxigenase de ligação à flavina**; 5- Helicase de DNA dependente de ATP RecQ; 6- Fosfoenolpiruvato carboxiquinase.

Figura 25: *Cluster* onde foi identificado o gene *almA* (Monooxigenases de ligação a FAD (*almA*)) na linhagem 314



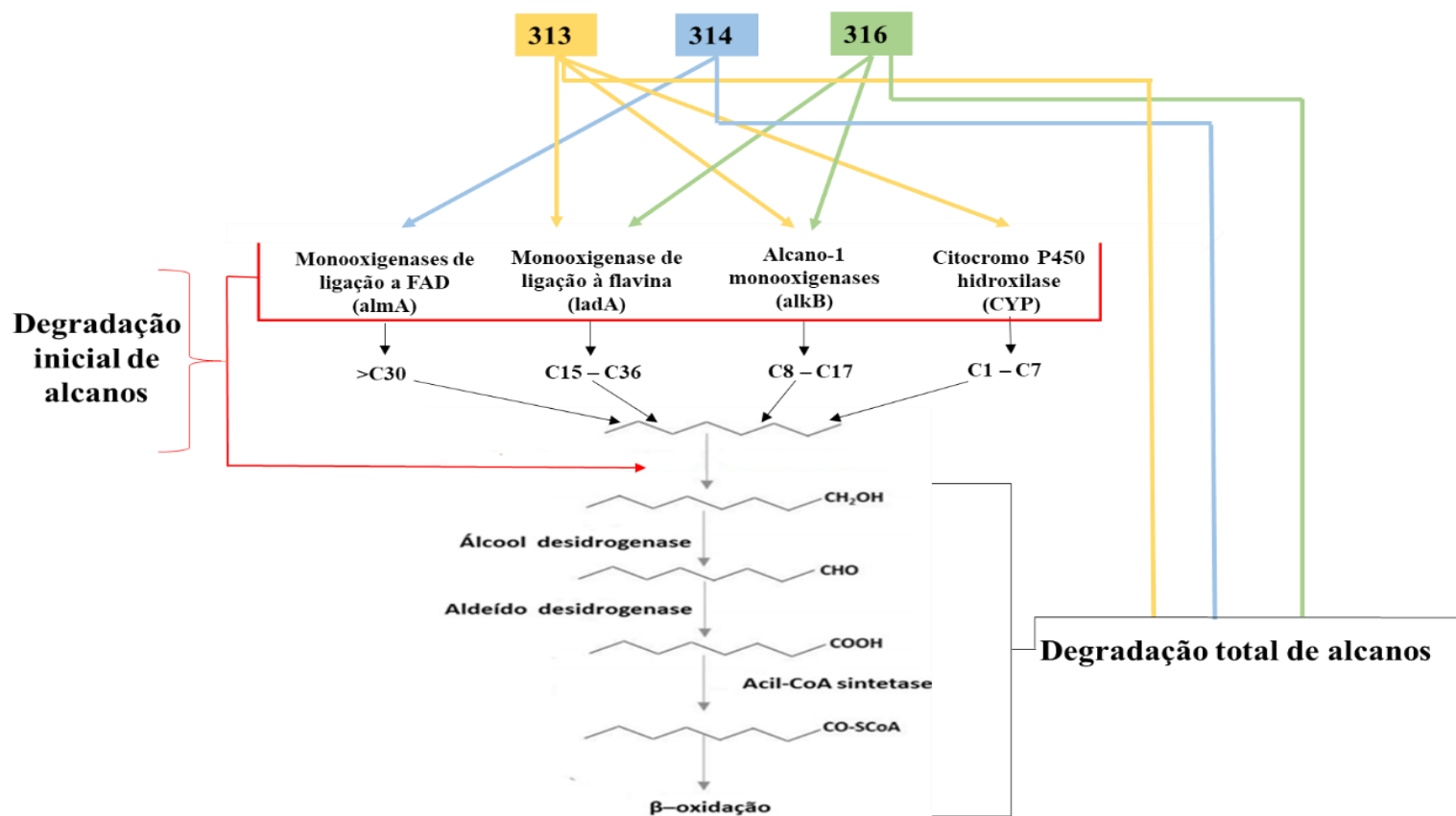
Fonte: autoria própria

Nota: 1-Receptor dependente de TonB; 2- Proteína hipotética; **3- Monooxigenase flavina dependente**; 4- Proteína putativa da membrana interna; 5- Proteína transportadora de aminoácidos de cadeia ramificada *azlC*; 6- Aminoácido aminotransferase de cadeia ramificada; 7- proteína não caracterizada; 8- alternativa Diidrofolato redutase e 9- Hidrolase, família de dobras alfa/beta funcionalmente acoplada à fosforibulquinase.

Biorremediação é uma técnica que utiliza organismos vivos, como bactérias, para degradar ou neutralizar contaminantes ambientais. Dentro desse contexto, consórcios bacterianos, que são comunidades de diferentes espécies bacterianas trabalhando em conjunto, têm se mostrado particularmente eficazes. Isso se deve à sinergia entre as

diferentes capacidades metabólicas das linhagens que compõem o consórcio. Neste cenário, linhagens bacterianas com diversas monoxigenases, como CYP, *alkB*, *ladA* e *almA*, desempenham papéis cruciais na degradação de hidrocarbonetos, especificamente alcanos. As monoxigenases são enzimas que catalisam a incorporação de um átomo de oxigênio em moléculas orgânicas, um passo inicial essencial na biodegradação de muitos compostos, incluindo os alcanos. Diferentes monoxigenases têm diferentes especificidades e mecanismos de ação, proporcionando uma cobertura ampla e eficiente na degradação de uma variedade de alcanos. Nesse contexto, o co-metabolismo é um fenômeno importante, onde a degradação de um composto é facilitada pela presença de outro composto que serve como fonte primária de carbono e energia. Dentro de um consórcio bacteriano, diferentes linhagens podem utilizar diferentes hidrocarbonetos como substratos primários, enquanto degradam co-metabolicamente outros contaminantes presentes. Isso é essencial em ambientes poluídos com uma mistura complexa de hidrocarbonetos, onde a diversidade metabólica das linhagens no consórcio garante uma degradação mais eficiente e completa dos contaminantes. A interação sinérgica entre as espécies bacterianas com diferentes monoxigenases permite que o consórcio atue em uma ampla gama de alcanos, desde os de cadeia curta até os de cadeia longa (Figura 26). Cada linhagem contribui com sua especialidade enzimática, resultando em uma degradação mais rápida e eficiente dos contaminantes. Por exemplo, enquanto uma linhagem pode iniciar a degradação de um alcano de cadeia longa, outra pode completar o processo degradando os intermediários formados.

Figura 26: Predição de degradação de alcanos pelas linhagens *Acinetobacter seifertii* Laprot 313, *Achromobacter xylosoxidans* Laprot 314 e *Pseudomonas* Laprot 316



Fonte: Autoria própria

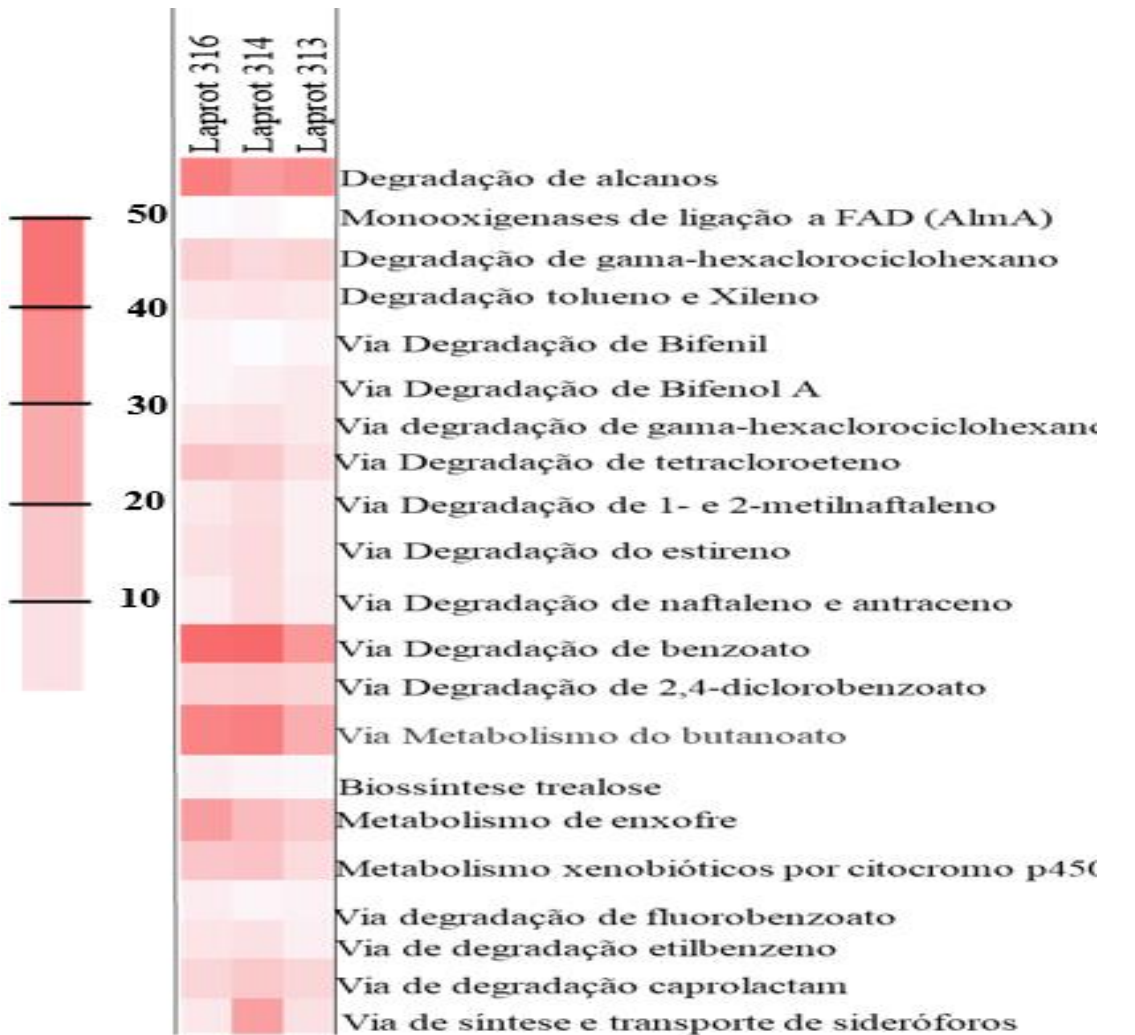
Nota: alcanos são degradados por meio de uma sucessão de etapas de oxidação que levam à beta-oxidação e, consequentemente, à entrada da acetil coenzima A (acetil-CoA) no ciclo do ácido cítrico. A primeira etapa de oxidação é a hidroxilação terminal inicial das cadeias de alcano, que pode ser realizada por enzimas pertencentes a diferentes famílias, geralmente dependendo do comprimento da cadeia de alcano.

6.8 Distribuição genômica de vias de degradação de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos: abordagem baseada em mapa de calor"

A identificação de variados genes de degradação para hidrocarbonetos aromáticos intermediários como catecol, gentisato, protocatecol, homogentisato e benzoil-CoA nas linhagens *Acinetobacter seifertii* Laprot 313, *Achromobacter xylosoxidans* Laprot 314 e *Pseudomonas sp* Laprot 316, demonstra a complexidade e a adaptabilidade dos microrganismos na degradação desses compostos. A degradação de hidrocarbonetos aromáticos não é uma tarefa simples, e a eficiência desse processo muitas vezes depende da interação entre diferentes microrganismos. A utilização de consórcios microbianos, como os formados pelas linhagens 313, 314 e 316, tem se mostrado eficaz na degradação de hidrocarbonetos, isso se deve à sinergia entre as diferentes linhagens, que podem complementar as deficiências metabólicas umas das outras, aumentando a taxa de degradação e a diversidade de substratos que podem ser utilizados como fonte de carbono e energia. Essa diversidade metabólica enriquece o entendimento sobre os processos biológicos de degradação, mas também oferece um caminho promissor para a aplicação de biotecnologia na remediação ambiental. Investir na pesquisa e no desenvolvimento dessas linhagens pode ser a chave para enfrentar os desafios impostos pela contaminação por hidrocarbonetos, promovendo um futuro mais sustentável.

A identificação de genes envolvidos na degradação de hidrocarbonetos no genoma das linhagens *Acinetobacter seifertii* Laprot 313, *Achromobacter xylosoxidans* Laprot 314 e *Pseudomonas* Laprot 316, fornece uma compreensão profunda dos diferentes papéis dessas linhagens no consórcio. Esses resultados são resumidos na Figura 27. A hidroxilação inicial de alcanos é realizada por diferentes bactérias, entre estas, as hidroxilases do grupo alcano (família *alkB*, *ladA* e CYP153), os genes relacionados a essas vias são mais abundantes nas linhagens, o que se faz coerente, considerando que, segundo Kaipper et al. (2003), 75% do óleo diesel é constituído por hidrocarbonetos alifáticos. A análise do mapa de calor também revelou uma predominância significativa de genes associados às vias de degradação do benzoato e do butanoato. A via de degradação do benzoato é particularmente relevante, pois o benzoato é um intermediário central na biodegradação de muitos hidrocarbonetos aromáticos, incluindo tolueno e xilenos. Além disso, a via de degradação do butanoato, desempenha um papel importante na conversão de ácidos graxos para compostos que prosseguirão via ciclo de Krebs.

Figura 27: Mapa de calor da identificação de genes envolvidos na degradação de alcanos e HPAs.



Fonte: Autoria própria
A barra de escala vermelha representa o número de genes para cada via identificada.

6.9 Avaliação da Atividade Degradação de alcanos por Redução de DCPIP

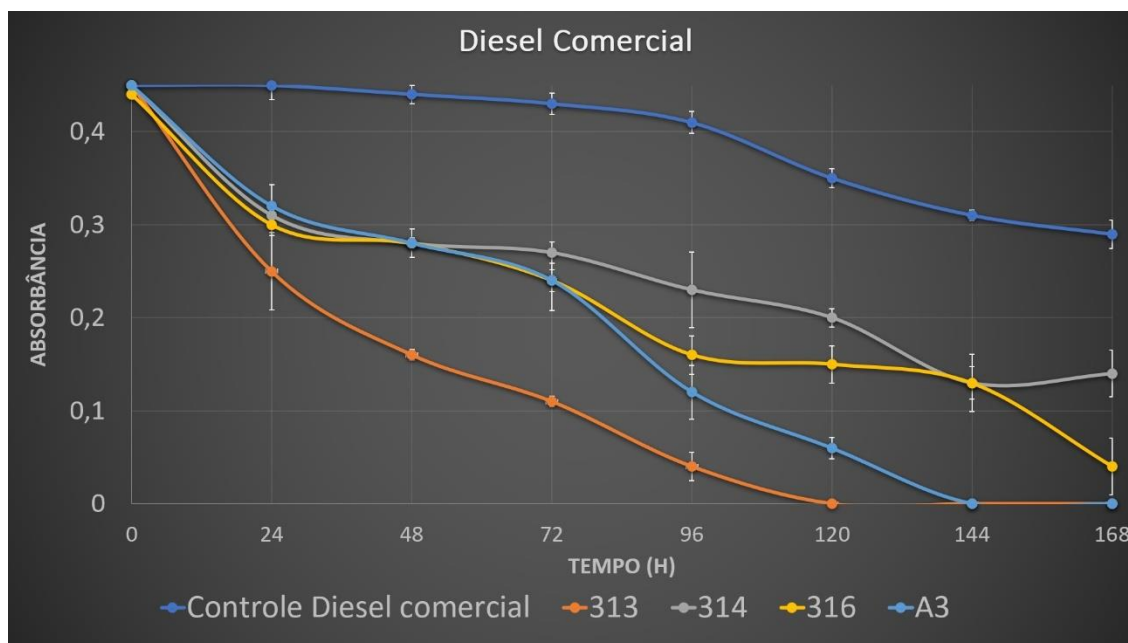
A redução do indicador redox DCPIP é uma metodologia consolidada para monitorar a atividade metabólica de microrganismos durante a degradação de hidrocarbonetos, uma vez que sua descoloração é proporcional à transferência de elétrons durante a oxidação de compostos orgânicos (Singh et al., 2014; Sarkar et al., 2020). Nesta pesquisa, o consórcio A3 composto por *Acinetobacter seifertii* 313, *Achromobacter xylosoxidans* 314 e *Pseudomonas* sp. 316 e suas linhagens isoladas foram avaliados quanto à capacidade de degradação de diferentes frações de hidrocarbonetos: Diesel

comercial (C11–C23) (Figura 28), Diesel puro (C11–C23) (Figura 29), Gasolina (C5–C12) (Figura 30), e Petróleo cru (C1–C78) (Figura 31).

6.9.1. Redução do DCPIP utilizando Diesel Comercial (C11–C23) como substrato

No substrato diesel comercial, a linhagem *A. seifertii* 313 apresentou o melhor desempenho, atingindo absorvância zero no quinto dia de cultivo, evidenciando completa redução do DCPIP e, portanto, alta taxa de degradação. O consórcio A3 alcançou o mesmo nível no sexto dia, enquanto *Pseudomonas* sp. 316 e *A. xylosoxidans* 314 não conseguiram atingir absorvância zero após sete dias de incubação. A ordem de eficiência de degradação foi: 1º lugar – 313, 2º – A3, 3º – 316, e 4º – 314. O destaque da linhagem 313 pode ser atribuído à presença combinada dos genes *alkB*, *ladA* e *cyp*, conferindo-lhe versatilidade para atuar sobre hidrocarbonetos de cadeia média e longa (Rojo, 2009; Nie et al., 2014).

Figura 28: Ensaio de redução de DCPIP para avaliação da atividade de degradação do consórcio A3 e das linhagens isoladas *Acinetobacter seifertii* 313, *Achromobacter xylosoxidans* 314 e *Pseudomonas* sp. 316 utilizando diesel comercial com substrato.



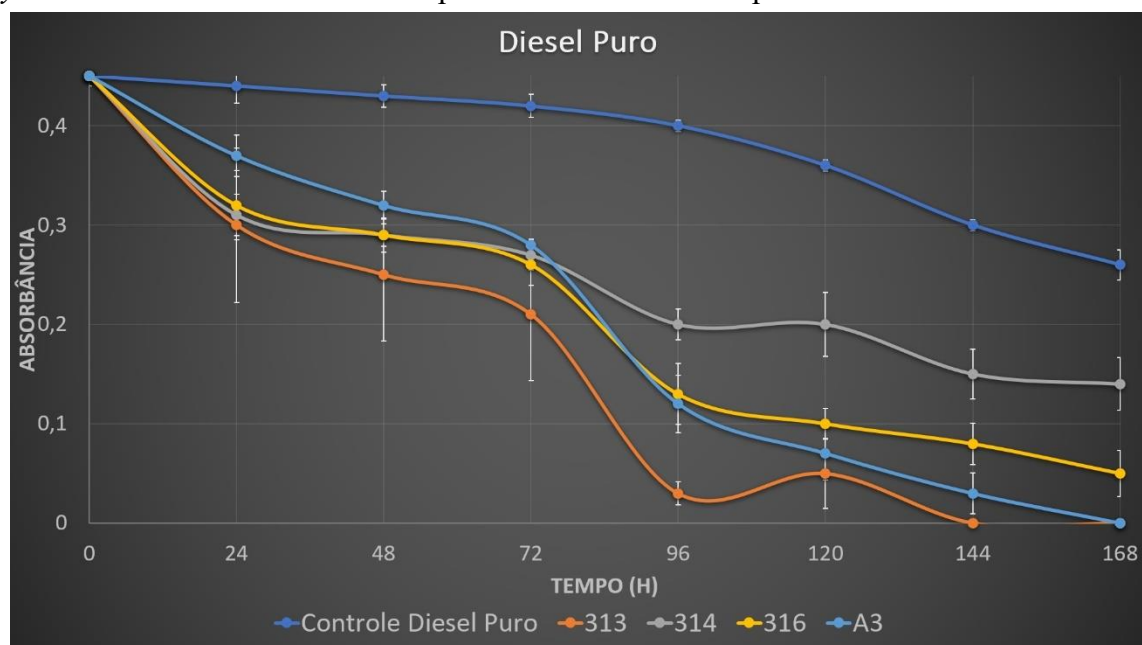
Fonte: Autoria própria

6.9.2 Redução do DCPIP utilizando Diesel Puro (C11–C23) como substrato.

Resultados similares foram observados no diesel puro. A linhagem 313 novamente se sobressaiu, atingindo absorvância zero no sexto dia, seguida pelo consórcio A3, que zerou a absorvância apenas no sétimo dia. As linhagens 314 e 316, por sua vez,

não conseguiram alcançar esse nível dentro do período experimental. A sequência de desempenho manteve-se: 1º – 313, 2º – A3, 3º – 316, 4º – 314. A menor eficiência da linhagem 314 é coerente com seu perfil enzimático restrito ao gene *almA*, que atua preferencialmente sobre alcanos de cadeia longa (WANG & SHAO, 2014), apresentando, portanto, degradação mais lenta. É importante destacar que o diesel comercial apresenta em sua formulação uma adição obrigatória de 13% de biodiesel (CNPE, 2025), o que o diferencia do diesel puro utilizado nos testes. Essa composição mista tende a aumentar a biodisponibilidade dos compostos, especialmente nas fases iniciais do cultivo, devido à presença de ésteres metílicos de ácidos graxos que são, em geral, mais facilmente metabolizados por diversos microrganismos. Esse fator pode explicar por que as amostras cultivadas com diesel comercial degradaram mais rapidamente em comparação ao diesel puro, reforçando o papel da composição do substrato na dinâmica da biodegradação microbiana (SILVA et al., 2018).

Figura 29: Ensaio de redução de DCPIP para avaliação da atividade de degradação do consórcio A3 e das linhagens isoladas *Acinetobacter seifertii* 313, *Achromobacter xylosoxidans* 314 e *Pseudomonas* sp. 316 utilizando Diesel puro como substrato.



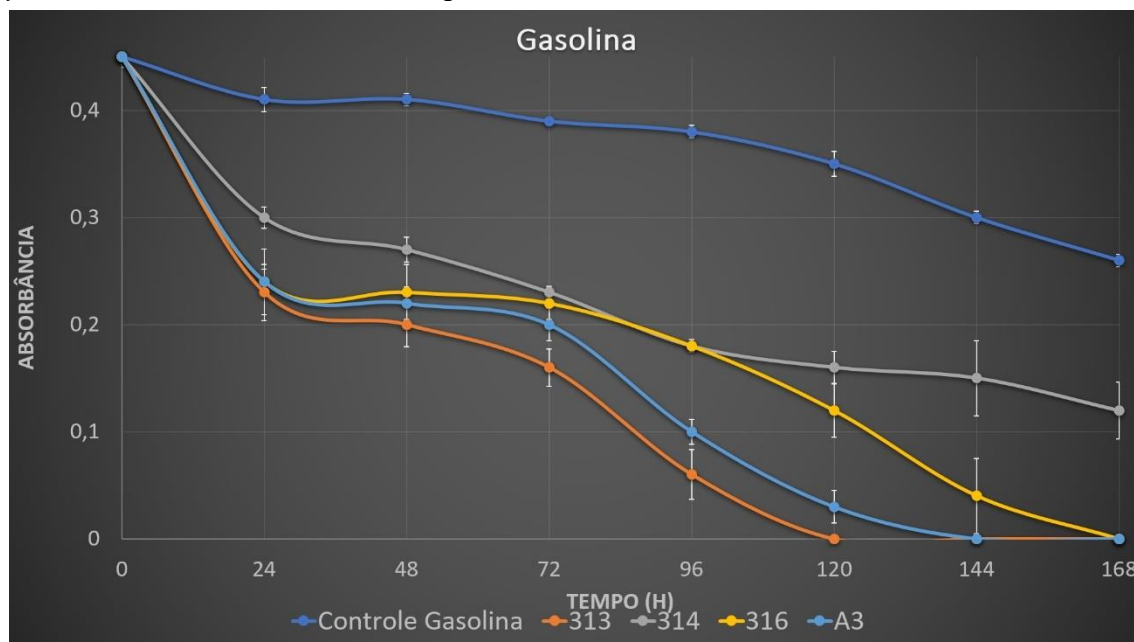
Fonte: Autoria própria

6.9.3 Redução do DCPIP utilizando Gasolina (C5–C12) como substrato.

Na gasolina, composta majoritariamente por hidrocarbonetos de cadeia curta, a linhagem 313 mais uma vez demonstrou elevada atividade, zerando a absorbância no quinto dia. O consórcio A3 atingiu absorbância zero no sexto dia, enquanto a linhagem

316 o fez apenas no sétimo dia. A linhagem 314 não conseguiu completar a redução do DCPIP em sete dias, reforçando sua baixa eficiência sobre substratos mais voláteis e biodisponíveis. A sequência de desempenho foi: 1º – 313, 2º – A3, 3º – 316, 4º – 314. A presença do gene *alkB* em 313 e 316, associado à degradação de alcanos de cadeia curta e média (C5–C16), pode justificar o desempenho favorável dessas linhagens (Van beilen & Funhoff, 2007).

Figura 30: Ensaio de redução de DCPIP para avaliação da atividade de degradação do consórcio A3 e das linhagens isoladas *Acinetobacter seifertii* 313, *Achromobacter xylosoxidans* 314 e *Pseudomonas* sp. 316 utilizando Gasolina como substrato.



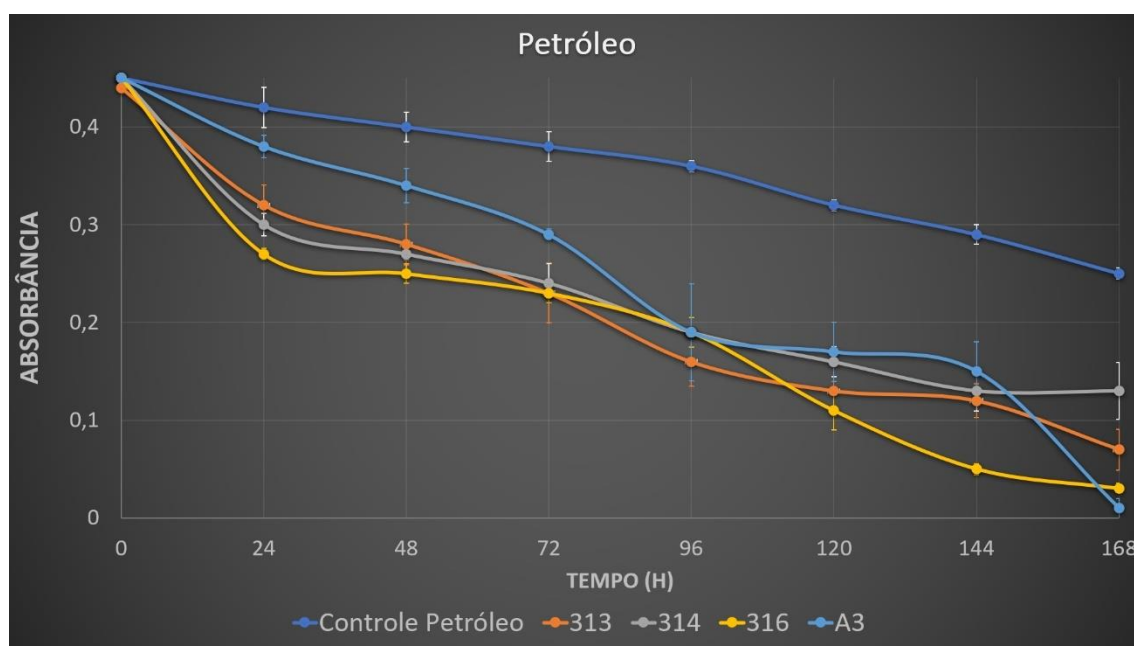
Fonte: Autoria própria

6.9.4 Redução do DCPIP utilizando Petróleo Bruto (C1–C78) como substrato

No caso do petróleo, os resultados foram distintos. Até o terceiro dia, as linhagens 313, 314 e 316 apresentaram níveis de degradação semelhantes entre si, todos superiores à atividade observada no consórcio A3. A partir do quinto dia, a cepa 316 superou as demais isoladas, atingindo os maiores índices de degradação, ao final de sete dias, o consórcio A3 apresentou a maior redução de DCPIP, seguido por 316, 313 e, por último, 314. Nenhuma das amostras isoladas alcançou absorbância zero, embora o consórcio A3 e a cepa 316 tenham se aproximado desse valor. Esse padrão sugere que, em substratos mais complexos e heterogêneos como o petróleo, a diversidade metabólica do consórcio se torna mais vantajosa, possivelmente por permitir ações cooperativas e complementares entre vias de degradação.

A avaliação por DCPIP mostrou correlação clara entre a diversidade de genes catabólicos e a eficiência na degradação de diferentes frações de hidrocarbonetos. A cepa 313, com três sistemas oxidativos distintos (*alkB*, *ladA* e *cyp*), demonstrou desempenho superior em praticamente todos os substratos, exceto no petróleo cru, onde a ação cooperativa do consórcio A3 se destacou. Já a limitação funcional da cepa 314, restrita ao gene *almA*, resultou em desempenho consistentemente inferior. Esses achados reforçam a importância de considerar tanto a diversidade enzimática quanto a sinergia entre linhagens na formulação de consórcios microbianos eficazes para biorremediação.

Figura 31: Ensaio de redução de DCPIP para avaliação da atividade de degradação do consórcio A3 e das linhagens



isoladas *Acinetobacter seifertii* 313, *Achromobacter xylosoxidans* 314 e *Pseudomonas* sp. 316 utilizando petróleo com substrato

Fonte: Autoria Própria

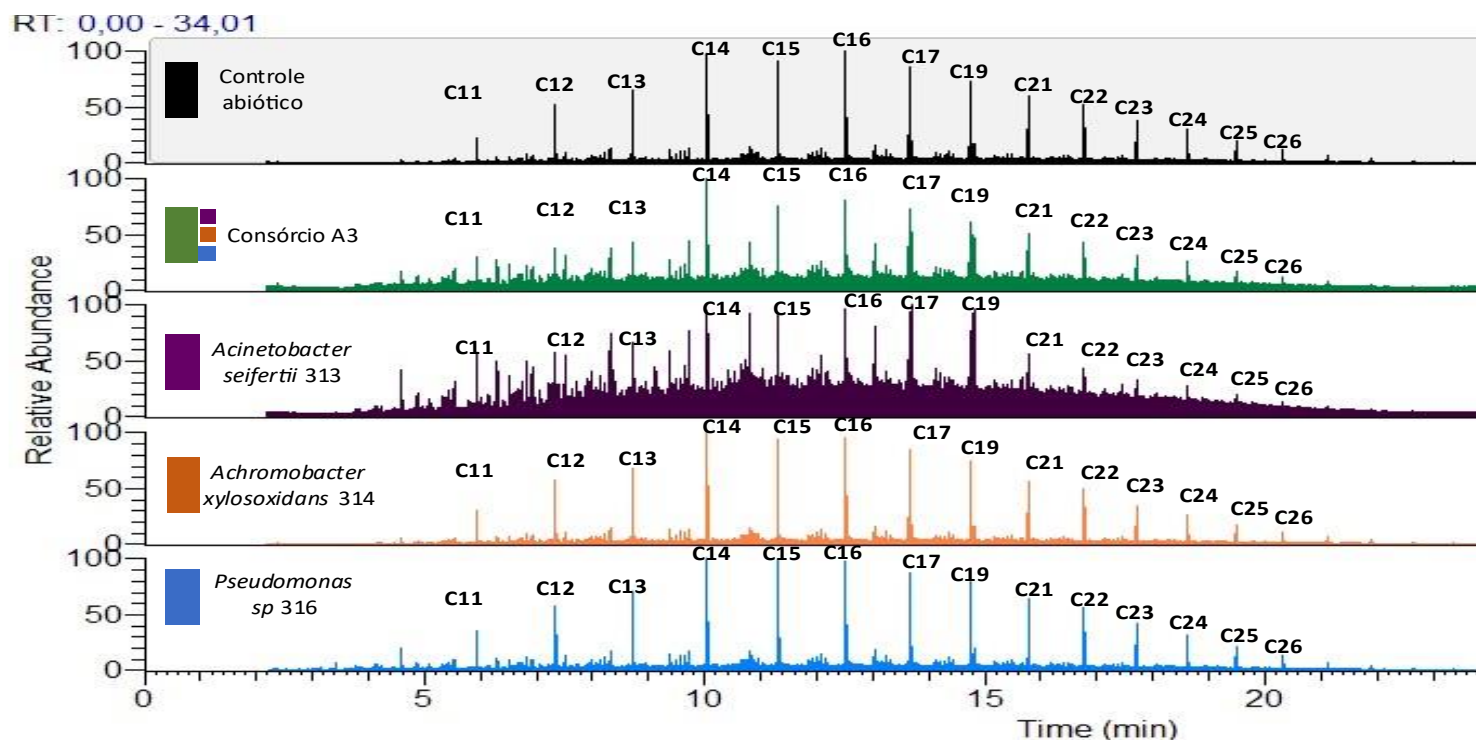
6.10 Degradação de alcanos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometrias de massas (GCMS)

Neste estudo, por meio de análises de GC-MS, foi avaliado o consórcio bacteriano A3 composto por *Acinetobacter seifertii* 313, *Achromobacter xylosoxidans* 314 e *Pseudomonas* sp. 316 bem como o desempenho individual de cada uma dessas linhagens em cultivos puros. Estudamos a degradação do óleo diesel devido à sua complexidade química e ao impacto ambiental que pode causar, e também o mesmo ser o derivado obtido em maior quantidade, a partir da destilação do petróleo, correspondendo a 35 %

da composição do petróleo (ANEEL, 2008). Investigar sua degradação é fundamental para desenvolver estratégias eficazes de remediação.

A análise por cromatografia gasosa revelou que tanto o consórcio A3 e cultivos puro das linhagens 313, 314 e 316 apresenta um nível de ruído inferior ao observado na linhagem 313 isoladamente (Figura 32). Embora a combinação de diferentes linhagens possa oferecer vantagens sinérgicas na degradação de compostos complexos, a presença de organismos com menor capacidade degradação pode acabar diminuindo a eficácia conjunta do consórcio. Um exemplo disso é a cepa 314, que possui apenas o gene *almA*, associado à degradação de alcanos de cadeia longa. No entanto, sua atividade pode ser menos eficiente quando comparada às enzimas codificadas pelos genes *alkB* e *ladA*. Entre cultivo das linhagens puras analisadas, a 313 se destacou por apresentar o maior nível de ruído no cromatograma, o que sugere uma intensa atividade degradação. Essa linhagem abriga os genes *cyp*, *alkB* e *ladA*, responsáveis por codificar enzimas chaves para a degradação de hidrocarbonetos (Ho, 2020). A presença combinada desses genes indica uma ampla capacidade de atuação sobre diversos compostos presentes no diesel, o que resulta na formação de uma grande variedade de metabólitos observados como ruídos no cromatograma. Segundo Wang (2022), relata que a presença desses genes está fortemente correlacionada com a degradação de hidrocarbonetos. Em contraste, a linhagem 314 apresenta o menor nível de ruído, reforçando a ideia de uma atividade degradação mais limitada. A restrição pode estar relacionada a presença unicamente do gene *almA* responsável em degradação de alcanos de cadeias mais longas. Estudos indicam que linhagens com repertórios genéticos mais restritos tendem a apresentar menor eficácia na degradação completa desses compostos (Rojas et al., 2023). Já a linhagem 316 ocupa uma posição intermediária. Com os genes *alkB* e *ladA*, ela exibe um nível ruído um pouco maior que a 314, sinalizando uma capacidade degradação a mais, embora inferior à da linhagem 313. A ausência do gene *cyp* pode ser um dos fatores para esse resultado, especialmente na degradação de compostos aromáticos presentes no diesel, o que reforça a importância de um conjunto genético diversificado para um desempenho degradação mais abrangente.

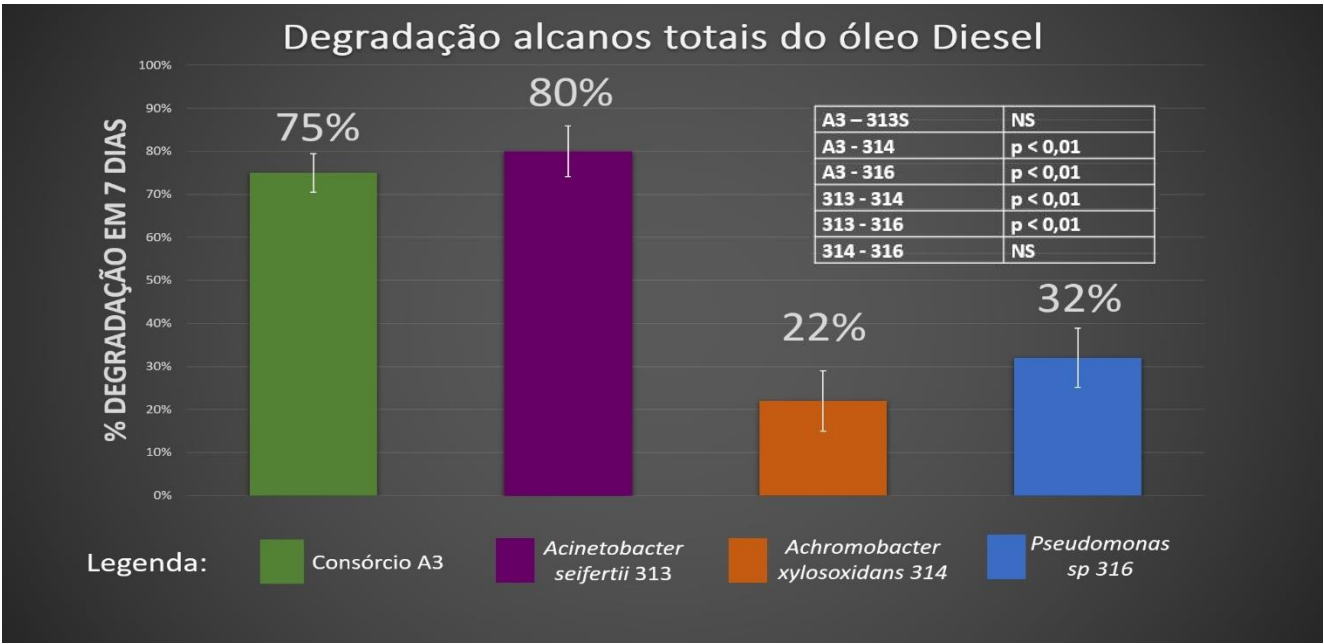
Figura 32: Cromatograma obtido após 7 dias de cultivo das amostras do consórcio A3 e das linhagens isoladas *Acinetobacter seifertii* 313, *Achromobacter xylosoxidans* 314 e *Pseudomonas* sp. 316 na presença de diesel como substrato.



Fonte: Autoria própria

O consórcio degradou 75% dos alcanos presentes no diesel, entretanto, a linhagem 313 isolada apresentou uma taxa de degradação superior, alcançando 80%. As linhagens 314 e 316, quando isoladas, degradaram 22% e 32% dos alcanos, respectivamente (Figura 33). A maior eficiência da linhagem 313 isolada pode ser atribuída à presença de genes como *CYP*, *AlkB* e *ladA* que codificam enzimas chaves envolvidas na oxidação de alcanos. A redução na eficiência de degradação observada no consórcio pode ser resultado de interações antagonistas entre as linhagens, embora consórcios bacterianos possam apresentar sinergismo na degradação de compostos complexos, a competição por recursos e a produção de metabólitos inibitórios podem comprometer o desempenho coletivo. Por exemplo, a produção de biossurfactantes por umas das linhagens pode alterar a disponibilidade de hidrocarbonetos, afetando a atividade de outras bactérias no consórcio (Schleheck 2003).

Figura 33: Degradação de alcanos totais do óleo diesel pelo consórcio A3 e suas linhagens constituintes.



Fonte: Autoria própria

Nota: Teste de comparações múltiplas de Tukey para a degradação de diesel (%) por diferentes bactérias. Diferenças significativas ($p < 0,01$) indicam variações estatisticamente relevantes entre os grupos, enquanto "ns" indica ausência de diferença significativa

Esses resultados indicam que a linhagem 313, apresenta uma capacidade significativamente superior de degradação de diesel, conforme demonstrado pelos ensaios com DCPIP e espectrometria de massas. Essa evidência destaca não apenas o potencial individual da linhagem 313, mas também levanta considerações importantes sobre a dinâmica do consórcio microbiano como um todo. Consórcios microbianos são formados com o objetivo de aproveitar as capacidades complementares e sinérgicas entre diferentes microrganismos, maximizando a eficiência de processos complexos como a biorremediação. Com tudo, o sucesso desse tipo de abordagem depende fundamentalmente do conhecimento detalhado das propriedades de cada espécie envolvida. Espécies com metabolismos eficientes para determinados compostos podem atuar como linhagens dominantes do consórcio, enquanto outras podem contribuir com funções acessórias, como a degradação de subprodutos, a produção de biossurfactantes ou a promoção do crescimento microbiano por meio de interações cooperativas. Um exemplo claro dessa dinâmica foi demonstrado em um estudo no qual consórcios compostos por *Pseudomonas* spp. e *Pseudarthrobacter* sp. foram os gêneros dominantes nos consórcios degradadores de fenantreno (Naloka et al., 2024).

A linhagem 313 apresenta um genoma consideravelmente menor em comparação às linhagens 314 e 316, o que pode estar diretamente associado à sua elevada taxa de degradação observada tanto na análise por DCPIP quanto por GC-MS. A menor complexidade genômica da linhagem 313 pode conferir vantagens metabólicas expressivas, como uma maior eficiência na expressão de genes relacionados à degradação de compostos orgânicos, especialmente hidrocarbonetos.

Genomas menores geralmente estão associados a uma organização mais enxuta e funcional, com menor carga de elementos genéticos redundantes ou reguladores que podem retardar respostas celulares. Isso permite que a célula direcione seus recursos de forma mais eficaz para processos essenciais, como crescimento e catabolismo. No contexto da degradação, essa eficiência metabólica pode se traduzir em uma resposta mais rápida e direta aos substratos presentes no meio, resultando em maior consumo de compostos e consequente aumento da taxa de degradação. Além disso, o crescimento celular acelerado da Linhagem 313 também pode ser uma consequência do seu genoma mais simples. Com menos genes a serem transcritos e traduzidos, a célula reduz o custo energético associado à manutenção do genoma e pode alocar mais energia para divisão celular e produção de enzimas degradadoras. Assim, a menor complexidade do genoma da Linhagem 313 pode favorecer sua adaptação a ambientes contaminados, mas também pode ser considerada um fator determinante para sua elevada performance na degradação de poluentes, conforme evidenciado pelos ensaios realizados.

Essa interpretação está em consonância com o relato de Chuckran et al., (2021), que demonstram a relação entre o tamanho do genoma de bactérias e suas estratégias metabólicas, abordando que o tamanho do genoma das bactérias de vida livre pode ser reduzido por um processo denominado racionalização genômica, em que a limitação de nutrientes seleciona genomas menores como forma de reduzir o custo de reprodução, assim como genomas simplificados estão associados a uma série de características que também reduzem os custos reprodutivos, mais notavelmente um menor conteúdo de GC (que reduz as necessidades de nitrogênio e é menos dispendioso de sintetizar), menos genes reguladores (especificamente aqueles que codificam fatores σ), regiões espaçadoras intergênicas menores.

Os genes de tRNA desempenham papel central no processo de tradução proteica, sendo responsáveis por transportar aminoácidos durante a síntese de proteínas. Um repertório mais amplo de tRNAs pode favorecer uma tradução mais eficiente e rápida, especialmente quando o perfil de tRNAs corresponde bem à frequência de códons

utilizada nos genes da cepa (Ran e Higgs, 2012). Isso é particularmente vantajoso em situações que exigem rápida produção de proteínas funcionais, como enzimas envolvidas na degradação de compostos orgânicos complexos, incluindo hidrocarbonetos do diesel. Essa combinação de genoma menor, com um conjunto de tRNAs relativamente completo, sugere que a Linhagem Laprot 313 está geneticamente preparada para crescer rapidamente e responder de forma eficaz à presença de substratos complexos, como os hidrocarbonetos presentes no diesel.

No caso do consórcio A3, a linhagem 313 claramente se destaca por sua habilidade de degradar alcanos alifáticos presentes no diesel, sugerindo que ela desempenha um papel central no processo de degradação de hidrocarbonetos, no entanto, a presença das linhagens 314 e 316 não deve ser desconsiderada, já que elas podem oferecer funções auxiliares, como a modulação do ambiente microbiano ou a degradação de frações específicas do que não são metabolizadas pela 313.

Ainda é necessário continuar investigando o desempenho do consórcio bacteriano A3, composto pelas linhagens *Acinetobacter seifertii* 313, *Achromobacter xylosoxidans* 314 e *Pseudomonas* sp. 316, visando compreender as possíveis sinergias e limitações que emergem da interação entre esses microrganismos. Nesse contexto, o estudo individual das linhagens torna-se uma ferramenta essencial para prever possíveis interações negativas dentro do consórcio, como competição por nutrientes, produção de compostos inibitórios ou ineficiência na partilha de subprodutos metabólicos fatores que podem comprometer o desempenho coletivo na degradação de hidrocarbonetos. Dentre as linhagens avaliadas, torna-se fundamental investigar de forma isolada a linhagem *Acinetobacter seifertii* 313, uma vez que os dados obtidos indicam que essa bactéria apresenta um desempenho superior na degradação de alcanos do diesel quando cultivada isoladamente, em comparação ao seu desempenho dentro do consórcio. Essa observação sugere que as interações com as demais linhagens podem estar limitando seu potencial degradativo.

A elevada eficiência do gênero *Acinetobacter* na degradação de diesel é amplamente documentada na literatura. Por exemplo, *Acinetobacter pittii* ED1 foi capaz de degradar 68,61% do diesel em apenas sete dias, atingindo mais de 90% após 21 dias de incubação. Da mesma forma, *Acinetobacter* sp. Y2 alcançou taxas de degradação de até 80% em 10 dias (Dohare, 2024; Luo, 2013; Ho, 2020). Esses dados reforçam o papel de *Acinetobacter* como um grupo funcionalmente dominante na biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos. Diante disso, torna-se imprescindível

aprofundar a compreensão dos mecanismos moleculares e enzimáticos que conferem à linhagem 313 essa alta capacidade de degradação. Esse entendimento mecanicista permitirá não apenas confirmar sua contribuição específica, mas também otimizar a formulação do consórcio, ajustando a proporção das linhagens ou selecionando novos parceiros microbianos que potencializem ainda mais o desempenho coletivo, a investigação aprofundada da cepa 313 representa um passo estratégico tanto para o aprimoramento do consórcio A3 quanto para o avanço das estratégias microbianas aplicadas à biorremediação de áreas impactadas por derramamentos de diesel.

6.10.1 Especificidade de degradação de n-Alcanos por Bactérias Isoladas

A degradação de n-alcanos por microrganismos ocorre por vias metabólicas bem caracterizadas, geralmente iniciadas pela oxidação terminal catalisada por monooxigenases e alcano-hidroxilases, cuja atividade está diretamente relacionada à especificidade pelo comprimento da cadeia dos alcanos (Rojo, 2009). Essa preferência varia conforme a expressão gênica, a composição da membrana celular, a adaptação e a disponibilidade de substrato. Neste estudo, os dados indicam que o consórcio A3 e as linhagens isoladas *Acinetobacter seifertii* 313, *Achromobacter xylosoxidans* 314 e *Pseudomonas* sp. 316 apresentaram maior eficiência na degradação de alcanos de cadeia intermediária a longa (C18–C26). Esse padrão é consistente com relatos anteriores sobre microrganismos adaptados a ambientes contaminados com petróleo, nos quais predominam hidrocarbonetos de alto peso molecular. Os resultados sugerem que a afinidade enzimática e a adaptação fisiológica dessas bactérias favorecem a utilização de alcanos médio e longos como fonte de carbono.

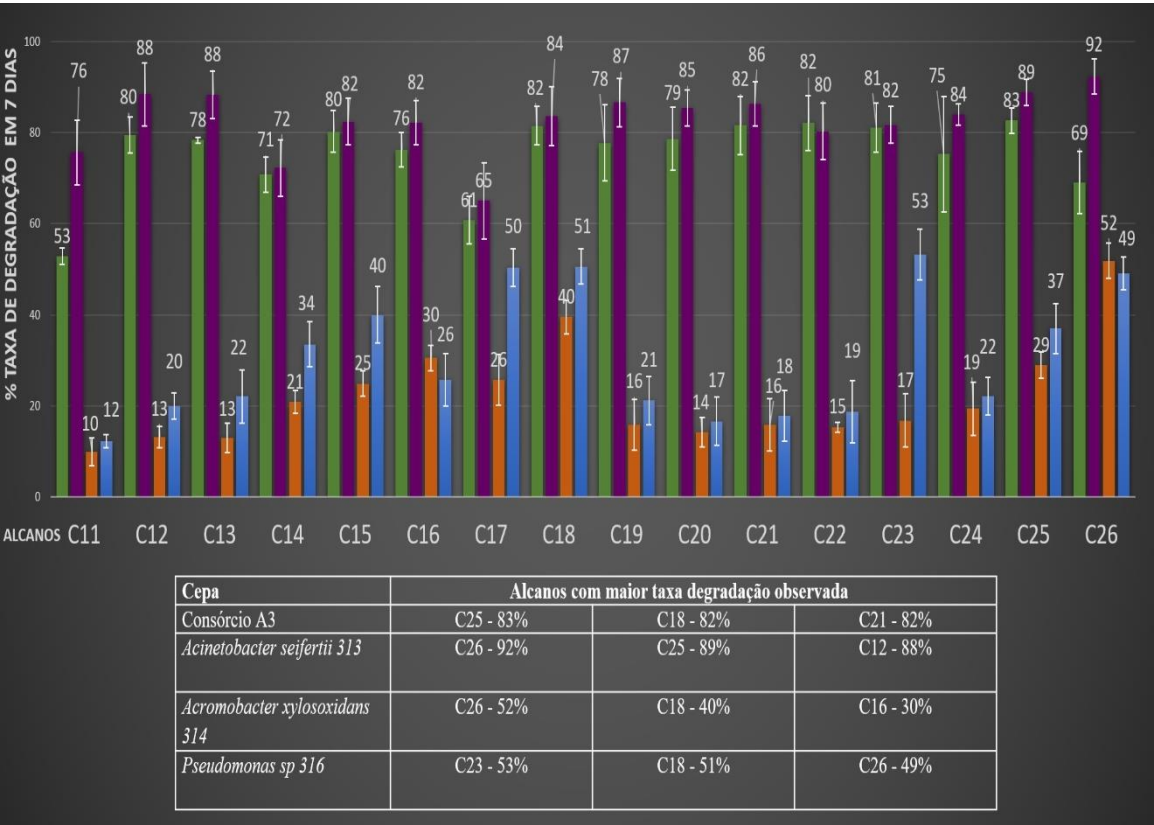
A análise dos perfis de degradação revelou que o consórcio A3 demonstrou elevada eficiência na degradação dos alcanos C25 (83%) e C18/C21 (82%), evidenciando um comportamento sinérgico entre as linhagens que o compõem. Essa eficiência pode ser explicada pela complementaridade metabólica, em que uma bactéria inicia a degradação do composto e outras consomem os intermediários gerados, otimizando o processo de mineralização (Prince et al., 2010; Jain et al., 2020). Tal estratégia é frequentemente observada em consórcios microbianos aplicados à biorremediação de hidrocarbonetos complexos. Entre as linhagens isoladas, *Acinetobacter seifertii* 313 destacou-se pela elevada degradação dos alcanos de cadeia longa C26 e C25 (acima de 89%). Esse desempenho está de acordo com a literatura sobre *Acinetobacter* spp., que possuem alcano-hidroxilases do tipo *AlkB*, especialmente eficazes em substratos de 16 a 26

carbonos (WHYTE et al., 2002). A atividade significativa sobre C12 também sugere que essa linhagem expressa múltiplos sistemas enzimáticos com diferentes especificidades de substrato.

Achromobacter xylosoxidans 314, embora menos estudada em biorremediação, apresentou preferência por alcanos de cadeia longa, como C26, além de atividade sobre C18 e C16. Essa tendência pode estar relacionada à menor eficiência enzimática frente a substratos de cadeia curta, favorecendo o metabolismo de compostos mais longos. Estudos anteriores já relataram sua presença em ambientes contaminados por petróleo (Abdel-Megeed et al 2018).

Por fim, *Pseudomonas* sp. 316 demonstrou elevado desempenho na degradação dos alcanos C23, C18 e C26, o que está em consonância com a capacidade metabólica amplamente documentada do gênero *Pseudomonas*. Essa bactéria possui genes como *alkB* e *ladA*, que codificam alcano-hidroxilases com alta afinidade por alcanos de cadeia média a longa (Van Beilen & Funhoff, 2007). Além disso, sua habilidade na formação de biofilmes e no transporte de compostos hidrofóbicos facilita a absorção e metabolização dos hidrocarbonetos.

Figura 34: Degradação de n-alcanos com diferentes comprimentos de cadeia.



Fonte: Autoria própria

A degradação de n-alcenos com diferentes comprimentos de cadeia está diretamente relacionada às propriedades físico-químicas dos compostos e às estratégias fisiológicas adotadas pelos microrganismos. Alcanos de cadeia média (C12–C16) tendem a ser mais biodisponíveis, pois apresentam maior solubilidade relativa e difundem-se com mais facilidade através da membrana celular. No entanto, sua maior volatilização pode reduzir a concentração disponível ao longo de experimentos prolongados. Por outro lado, alcanos de cadeia longa (C18–C26) são mais hidrofóbicos e, portanto, menos acessíveis sem a presença de mecanismos especializados, como a produção de biossurfactantes e a formação de biofilmes, processos bem estabelecidos em gêneros como *Pseudomonas* e *Acinetobacter* (Cameotra e Makkar 2004). Em relação à preferência por alcanos pares ou ímpares, não foi identificado um padrão estereoquímico consistente, o que está de acordo com estudos anteriores que também não observaram seletividade significativa (Yassine et al., 2014).

7 CONCLUSÃO

A presente pesquisa apresentou uma abordagem integrada de identificação, caracterização genômica, funcional e experimental de três linhagens bacterianas isoladas de ambientes contaminados por hidrocarbonetos: *Acinetobacter seifertii* (313), *Achromobacter xylosoxidans* (314) e *Pseudomonas sp.* (316). As análises realizadas demonstraram o potencial biotecnológico dessas linhagens para aplicação em processos de biorremediação, especialmente em áreas impactadas por derramamentos de diesel e petróleo, com destaque para a performance superior das linhagens 313.

A partir das análises genômicas, foi possível observar que as três linhagens possuem uma ampla variedade de genes associados à degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, com ênfase para os sistemas monooxigenases *alkB*, *ladA*, *almA* e *CYP450*, fundamentais na etapa inicial de oxidação dos compostos hidrofóbicos. A distribuição e diversidade desses genes reforçam a especialização metabólica das linhagens, evidenciada também pela análise funcional via anotação automática em plataformas como RAST e KEGG, que destacaram rotas completas para degradação aeróbica de alcanos e compostos aromáticos. A análise filogenômica pela plataforma TYGS revelou que as linhagens 313 e 314 estão bem delimitadas dentro de suas respectivas espécies, mas a linhagem 316, do gênero *Pseudomonas*, apresentou baixa identidade ANI e valores de dDDH abaixo de 70% em relação às espécies tipo mais próximas, indicando tratar-se de uma potencial nova espécie. Esse dado é sustentado não

apenas pelas evidências filogenômicas, mas também pelo número elevado de proteínas exclusivas (*singletons*) observadas na análise comparativa, que apontam para uma diversificação genômica compatível com linhagens adaptadas a nichos ecológicos particulares.

Do ponto de vista experimental, os testes de degradação realizados com DCPIP e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas mostraram que a linhagem 313 (*A. seifertii*) obteve desempenho superior em relação às demais, degradando de forma eficiente alcanos de C11 a C26, com destaque para a degradação de alcanos longos como C25 e C26, normalmente mais recalcitrantes. A cepa 314 demonstrou taxas menor enquanto a cepa 316 apresentou resultados intermediários. Esses dados confirmam não apenas a viabilidade das linhagens como agentes degradadores, mas também sugerem vantagens na combinação de consórcio dessas linhagens para maximizar a eficiência em condições ambientais complexas.

Como perspectivas futuras, destaca-se a necessidade de avançar na caracterização funcional de proteínas exclusivas, em especial as identificadas na linhagem, 316, que podem representar novas enzimas ou rotas metabólicas não descritas. Além disso, há um potencial promissor na aplicação de genes de degradação de hidrocarbonetos no desenvolvimento de biossensores microbianos para monitoramento ambiental em tempo real. No entanto, para isso, é essencial a caracterização de elementos regulatórios e promotores, bem como realizar validações em condições ambientais reais.

Este estudo evidencia o valor das análises genômicas aliadas a testes experimentais para o entendimento aprofundado da biodegradação de hidrocarbonetos. As linhagens 313, 314 e 316 demonstram potencial diferenciado, sendo a linhagem 313 a mais promissora em desempenho acima do próprio consórcio A3, enquanto a linhagem 316 apresenta singularidade filogenômica com potencial biotecnológico inexplorado. Esses achados abrem caminho para aplicações práticas na remediação de áreas contaminadas e para o desenvolvimento de ferramentas bioengenheiradas mais eficazes para o monitoramento e mitigação da poluição por derivados de petróleo.

8 REFERENCIAS

Abdel-Megeed, A., et al. (2018). Hydrocarbon degradation by *Achromobacter* species isolated from petroleum-contaminated environments. *Egyptian Journal of Petroleum*, 27(4), 1291–1296.

Abdel-Shafy A. B. Mandal., H.I.; Mansour, M.S. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Pet.* 2016, 25, 107–123.

Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL). Atlas de energia elétrica do Brasil / Agência Nacional de Energia Elétrica, 2008.

Ahmed, I.; Zia, MA; Afzal, H.; Ahmed, S.; Ahmad, M.; Akram, Z.; Sher, F.; Iqbal, HMN. Socioeconomic and environmental impacts of biomass valorization: a strategic boost for a sustainable bioeconomy. *Sustainability* 2021, 13, 4200. Akhbarizadeh, R.; Moore, F.; Keshavarzi, B.; Moeinpour, A. Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons risk assessment in coastal water and sediments of Khark Island, SW Iran. *Mar. Pollut. Bull.* 2016, 108, 33–45.

Akinsemolu, A.; Onyeaka, H.; Fagunwa, O.; Adenuga, A.H. Toward a Resilient Future: The Promise of Microbial Bioeconomy. *Sustainability* 2023, 15, 7251. <https://doi.org/10.3390/su15097251>

Alharbi O.M.L. , A.A. Basheer, R.A. Khattab, I. Ali. Health and environmental effects of persistent organic pollutants. *J. Mol. Liq.*, 263 (2018), pp. 442–453, 10.1016/j.molliq.2018.05.029

Alori, E. T.; Gabasawa, A. I.; Elenwo, C. E.; Agbeyegbe, O. O. “Bioremediation techniques as affected by limiting factors in soil environment.” *Frontiers in Soil Science*, 2: 937186, 2022. DOI: 10.3389/fsoil.2022.937186.

Anjum H. , K. Johari, N. Gnanasundaram, M. Ganesapillai, A. Arunagiri, I. Regupathi, M. Thanabalan. A review on adsorptive removal of oil pollutants (BTEX) from wastewater using carbon nanotubes. *J. Mol. Liq.*, 277 (2019), pp. 1005–1025, 10.1016/j.molliq.2018.10.105

Antipov D, Raiko M, Lapidus A, Pevzner PA. Plasmid detection and assembly in genomic and metagenomic data sets. *Genome Res.* 2019 Jun;29(6):961–968. doi: 10.1101/gr.241299.118. Epub 2019 May 2. PMID: 31048319; PMCID: PMC6581055.

Asghari S. , F. Rajabi, R. Tarrahi, S.Y. Salehi-Lisar, S. Asnaashari, Y. Omid, A. Movafeghi. Potential of the green microalga *Chlorella vulgaris* to fight against fluorene contamination: evaluation of antioxidant systems and identification of intermediate biodegradation compounds. *J. Appl. Phycol.*, 32 (1) (2020)

Aziz, Ramy K; Bartels, Daniela; A Best, Aaron; Dejongh, Matthew; Disz, Terrence; A Edwards, Robert; Formsma, Kevin; Gerdes, Svetlana; Glass, Elizabeth M; Kubal, Michael. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *Bmc Genomics*, [S.L.], v. 9, p. 1–75, 8 fev. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.

Barbosa J.R. , R. N. de Carvalho Junior. Food sustainability trends - how to value the açaí production chain for the development of food inputs from its main bioactive ingredients? *Trends in Food Science and Technology*, 124 (2022), pp. 86–95, 10.1016/j.tifs.2022.04.005

Barzegar, G., Jorfi, S., Sanaei, D. *et al.* Bioremediation of diesel-contaminated saline soil and enhancement of microbial salinity tolerance by a biosurfactant-producing *Bacillus subtilis* AHV-KH11 and external surfactant application: bio-toxicity assessment. *Sci Rep* 15, 20673 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-06954-2>

Becker J. , C. Wittmann. A field of dreams: lignin valorization into chemicals, materials, fuels, and health-care products *Biotechnol. Adv.*, 37 (2019), Article 107360, 10.1016/j.biotechadv.2019.02.016

Bell, EL; Finnigan, W.; França, SP; Verde, AP; Hayes, MA; Hepworth, LJ; Lovelock, SL; Niikura, H.; Osuna, S.; Romero, E.; et al. Biocatálise. *Nat. Rev. Métodos Primers* 2021 , 1 , 46.

- Bergamo D. , O. Zerbini, P. Pinho, P. Moutinho. The Amazon bioeconomy: Beyond the use of forest products. *Ecological Economics*, 199 (2022), Article 107448, 10.1016/j.ecolecon.2022.107448
- Bertrand E. M., Sakai R., Rozhkova-Novosad E. A., Moe L. A., Fox B. G., Groves J. T., et al. (2005). Reaction mechanisms of non-heme diiron hydroxylases characterized in whole cell. *J. Inorg. Biochem.* 99, 1998–2006 10.1016/j.jinorgbio.2005.06.020
- Beyer, J.; Trannum, H.C.; Bakke, T.; Hodson, P.V.; Collier, T.K. Environmental effects of the Deepwater Horizon oil spill: A review. *Mar. Pollut. Bull.* 2016, 110, 28–51.
- Biobased Terephthalic Acid Technologies: A Literature Review. *Industrial Biotechnology* 2014 10:2, 91-105
- Blin K, Shaw S, Kloosterman AM, Charlop-Powers Z, van Wezel GP, Medema MH, Weber T. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Res.* 2021 Jul 2;49(W1):W29-W35. doi: 10.1093/nar/gkab335. PMID: 33978755; PMCID: PMC8262755.
- BRASIL. Conselho Nacional de Política Energética (CNPE). Resolução CNPE Nº 8, de 25 de fevereiro de 2025. Fixa o teor obrigatório de biodiesel no diesel comercial em atendimento à Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, n. 124, p. 119, 2 jul. 2025. Seção 1. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=480398>. Acesso em: 5 nov. 2025.
- Breitwieser, M.; Thomas-Guyon, H.; Huet, V.; Sagerup, K.; Geraudie, P. Spatial and temporal impacts of the Skjervøy harbour diesel spill on native population of blue mussels: A sub-Arctic case study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018, 153, 168–174.
- Brettin T, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Olsen GJ, Olson R, Overbeek R, Parrello B, Pusch GD, Shukla M, Thomason JA 3rd, Stevens R, Vonstein V, Wattam AR, Xia F. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci Rep.* 2015 Feb 10;5:8365. doi: 10.1038/srep08365. PMID: 25666585; PMCID: PMC4322359.
- Broring, N. Laibach, M. Wustmans. Innovation types in the bioeconomy. *J. Clean. Prod.*, 266 (2020).
- Brown AD. Microbial water stress. *Bacteriol Rev.* 1976;40:803–846. doi: 10.1128/BR.40.4.803-846.1976.
- Bugge M.M., T. Hansen, A. Klitkou. What is the bioeconomy? A review of the literature. *Sustainability*, Vol. 8.7 (2016), p. 691
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics.* 2009 Dec 15;10:421. doi: 10.1186/1471-2105-10-421. PMID: 20003500; PMCID: PMC2803857.
- Cameotra, S. S., & Makkar, R. S. (2004). Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Current Opinion in Microbiology*, 7(3), 262–266. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.04.006>
- Chen DW, Zhang Y, Jiang CY, Liu SJ. Benzoate metabolism intermediate benzoyl coenzyme A affects gentisate pathway regulation in *Comamonas testosteroni*. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Jul;80(13):4051–62. doi: 10.1128/AEM.01146-14. Epub 2014 Apr 25. PMID: 24771026; PMCID: PMC4054210.
- Chen et al. Enhanced biodegradation of crude oil by constructed bacterial consortium comprising salt-tolerant petroleum degraders and biosurfactant producers *Int. Biodeterior. Biodegradation* (2020).
- Kour, D. et al. Beneficial microbiomes for bioremediation of diverse contaminated environments for environmental sustainability: present status and future challenges. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **28**, 24917–24939 (2021).

- Chuckran, P. F.; Hungate, B. A.; Schwartz, E.; Dijkstra, P. Variation in genomic traits of microbial communities among ecosystems. *FEMS Microbes*, v. 2, p. xtab020, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsmc/xtab020>
- Chun, J.; Oren, A.; Ventura, S.; Stackebrandt, E.; Staley, J. T.; De Vos, P.; et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 68, n. 1, p. 461–466, 2018. DOI: 10.1099/ijsem.0.002516. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002516>. Acesso em: 3 nov. 2025.
- Coa B., Nagarajar K., Loh K. C. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009;85(2):207–228. doi: 10.1007/s00253-009-2192-4
- Coa, F.; Voordouw, G.; Voordouw, J. K. Biocatalytic potential of hydrocarbon-degrading bacteria: from genes to applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 82, p. 855–867, 2009. DOI: 10.1007/s00253-008-1788-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1788-9> . Acesso em: 3 nov. 2025
- European Commission, Directorate-General for Research and Innovation. A sustainable bioeconomy for Europe: strengthening the link between economy, society and environment: updated bioeconomy strategy, Publications Office. 2018. Available online: <https://data.europa.eu/doi/10.2777/792130> (accessed on December 8, 2022).
- Corbisier P, Ji G, Nuyts G, Mergeay M, Silver S. luxAB gene fusions with the arsenic and cadmium resistance operons of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *FEMS Microbiol Lett.* 1994 Jun 15;110(2):231-8. doi: 10.1111/j.1574-6968.1993.tb06325.x. PMID: 8349095.
- Costa francisco de assis, carlos nobre, carolina genin, caroline medeiros rocha frasson, danilo araújo fernandes, harley silva, iara vicente, inaiê takaes santos, rafael feltran-barbieri, raul ventura neto e ricardo folhes. bioeconomy for the amazon: concepts, limits, and trends for a proper definition of the tropical forest biome. wri brasil 2022.
- Cruz, G. F. Da; Marsiaoli, A. J. *Processos naturais de biodegradação do petróleo em reservatórios*. Química Nova, v. 35, n. 8, p. 1628-1634, 2012. DOI: 10.1590/S0100-40422012000800024.
- Curimbaba T.F.S. , L.D. Almeida-Junior, A.S. Chagas, A.E.V. Quaglio, A.M. Herculano, L.C. Di Stasi. Prebiotic, antioxidant and anti-inflammatory properties of edible Amazon fruits. *Food. Bioscience*, 36 (2020), Article 100599, 10.1016/J.FBIO.2020.100599
- Dagan, T. & Martin, W. The tree of one percent. *Genome Biol.* 7, 118 (2006).
- Delunardo, F.A.C.; Paulino, M.G.; Medeiros, L.C.C.; Fernandes, M.N.; Scherer, R.; Chippari-Gomes, A.R. Morphological and histopathological changes in seahorse (*Hippocampus reidi*) gills after exposure to the water-accommodated fraction of diesel oil. *Mar. Pollut. Bull.* 2020, 150, 110769.
- DENG, M.-C.; LI, J.; LIANG, F.-R.; YI, M.; XU, X.-M.; YUAN, J.-P.; PENG, J.; WU, C.-F.; WANG, J.-H. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter* sp. HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the Daya Bay, southern China. *Marine Pollution Bulletin*, v. 83, n. 1, p. 79-86, 2014. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2014.04.018.
- Devine R, McDonald HP, Qin Z, Arnold CJ, Noble K, Chandra G, Wilkinson B, Hutchings MI. Re-wiring the regulation of the formicamycin biosynthetic gene cluster to enable the development of promising antibacterial compounds. *Cell Chem Biol.* 2021 Apr 15;28(4):515-523.e5. doi: 10.1016/j.chembiol.2020.12.011. Epub 2021 Jan 12. PMID: 33440167; PMCID: PMC8062789.
- Dimitris I. Collias, Angela M. Harris, Vidhu Nagpal, Ian W. Cottrell, and Mikell W. Schultheis

Dohare S, Rawat HK, Bhargava Y, Kango N. Characterization of Diesel Degrading Indigenous Bacterial Strains, *Acinetobacter pittii* and *Pseudomonas aeruginosa*, Isolated from Oil Contaminated Soils. *Indian J Microbiol.* 2024 Jun;64(2):749-757. doi: 10.1007/s12088-024-01317-3. Epub 2024 May 29. PMID: 39011005; PMCID: PMC11246406.

Donner, M.; de Vries, H. Innovative business models for a sustainable circular bioeconomy in the French agri-food sector. *Sustainability* 2023, 15, 5499.

Duchêne, DA (2021). *Filogenômica*. *Curr. Biol.* 31, R1177–R1181. doi: 10.1016/j.cub.2021.07.039

Ehis-Eriakha CB, Chikere CB, Akaranta O. Functional Gene Diversity of Selected Indigenous Hydrocarbon-Degrading Bacteria in Aged Crude Oil. *Int J Microbiol.* 2020 Jul 30;2020:2141209. doi: 10.1155/2020/2141209. PMID: 32802067; PMCID: PMC7414327.

Ejaekel, U.; Ezedelius, J.; Ewilkes, H.; Musat, F. Anaerobic degradation of cyclohexane by sulfate-reducing bacteria from hydrocarbon-contaminated marine sediments. *Front. Microbiol.* 2015, 6, 116.

Elayaperumal, S. et al., 2025. Eco-friendly biosurfactant solutions for petroleum hydrocarbon cleanup in aquatic ecosystems. *Sustainable Chemistry for the Environment*.

Feng L., Wang W., Cheng J., Ren Y., Zhao G., Gao C., et al. (2007). Genome and proteome of long-chain alkane-degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep subsurface oil reservoir. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 5602–5607

Freitas L.C. , J.R. Barbosa, A.L.C. da Costa, F.W.F. Bezerra, R.H.H. Pinto, R. N. de Carvalho Junior. From waste to sustainable industry: How can agro-industrial wastes help in the development of new products?. *Resources, Conservation and Recycling*, 169 (2021),. Article 105466, 10.1016/J.RESCONREC.2021.105466

Fuchs, G., Boll, M. & Heider, J. Microbial degradation of aromatic compounds: from one strategy to four. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 803–816 (2011).

Genilloud Olga. Natural products discovery and potential for new antibiotics, *Current Opinion in Microbiology*, Volume 51, 2019, Pages 81-87, ISSN 1369-5274, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.012>.

Georgescu-Roegen. *The Entropy Law and the Economic Process*. Harvard University Press, Boston (1971)

Gilchrist CLM, Chooi YH. clinker & clustermap.js: automatic generation of gene cluster comparison figures. *Bioinformatics.* 2021 Aug 25;37(16):2473-2475. doi: 10.1093/bioinformatics/btab007. PMID: 3345976

Gilis A, Corbisier P, Baeyens W, Taghavi S, Mergeay M, van der Lelie D. Effect of the siderophore alcaligin E on the bioavailability of Cd to *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 1998 Jan;20(1):61-8. doi: 10.1038/sj.jim.2900478. PMID: 9523457.

Giri, B.S.; Geed, S.; Vikrant, K.; Lee, S.S.; Kim, K.H.; Kailasa, S.K.; Vithanage, M.; Chaturvedi, P.; Rai, B.N.; Singh, R.S. Progress in bioremediation of pesticide residues in the environment. *Environ. Eng. Res.* 2021, 26, 200446.

Gralka Matti e Hallatschek Oskar (2019) A heterogeneidade ambiental pode influenciar a genética populacional das expansões de distribuição *eLife* 8:e44359. <https://doi.org/10.7554/eLife.44359>

GRAND VIEW RESEARCH. Bioremediation Market Size, Share & Trends Analysis Report By Type, By Technology, By Service, By Region, And Segment Forecasts, 2025 - 2030. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/bioremediation-market-report>. Acesso em: 6 jun. 2025.

Groves, John T.; Feng, Liang; Austin, Rachel N. “Structure and Function of Alkane Monooxygenase (AlkB)”. *Accounts of Chemical Research*, v. 56, n. 24, 2023. DOI:10.1021/acs.accounts.3c00590.

Guengerich F.P.. Mechanisms of cytochrome P450-catalyzed oxidations. ACS Catal. 2018; 8 (31105987): 10964-10976. doi:10.1021/acscatal.8b03401

GUNASEKERA, T. S.; et al. Metabolic characterization of alkane monooxygenases and associated catabolic systems in *Pseudomonas aeruginosa* adapted to fuel-polluted environments. *Journal of Bacteriology*, 2025. DOI disponível.

Guo, X., Zhang, J., Han, L. et al. Structure and mechanism of the alkane-oxidizing enzyme AlkB. Nat Commun 14, 2180 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37869-z>

Hanif, M.; Produção de biodiesel a partir de matérias-primas não comestíveis usando catalisador nanomagnético Fe/SnO₂ ecologicamente correto. Sci. Rep. 2022 , 12 , 16705.

Hansen, B.H.; Salaberria, I.; Read, K.E.; Wold, P.A.; Hammer, K.M.; Olsen, A.J.; Altin, D.; Øverjordet, I.B.; Nordtug, T.; Bardal, T.; et al. Developmental effects in fish embryos exposed to oil dispersions—The impact of crude oil micro-droplets. Mar. Environ. Res. 2019, 150, 104753.

Hanson, K. G.; Desai, J. D.; Desai, A. J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology Techniques*, v. 7, n. 10, p. 745–748, 1993. DOI: 10.1007/BF00152624. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00152624>. Acesso em: 3 nov. 202

HARADA SETSUO . Studies on Lankacidine-Group (T-2636) Antibiotics. VI. Chemical Structures of Lankacidin-Group Antibiotics. II. 1975 Volume 23 Issue 10 Pages 2201-2210

Henz, S. R., Huson, D. H., Auch, A. F., Nieselt-Struwe, K. & Schuster, S. C. Whole-genome prokaryotic phylogeny. Bioinformatics 21, 2329–2335 (2005).

Ho, M.T., Li, M.S.M., McDowell, T. et al. Characterization and genomic analysis of a diesel-degrading bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* CA16, isolated from Canadian soil. BMC Biotechnol 20, 39 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00632-z>.

Ho, MT, Li, MSM, McDowell, T. et al. Caracterização e análise genômica de uma bactéria degradadora de diesel, *Acinetobacter calcoaceticus* CA16, isolada de solo canadense. BMC Biotechnol 20 , 39 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00632-z>

Holland, B. R., Huber, K. T., Dress, A. & Moulton, V. δ plots: a tool for analyzing phylogenetic distance data. Mol. Biol. Evol. 19, 2051–2059 (2002).

Hong YH, Ye CC, Zhou QZ, Wu XY, Yuan JP, Peng J, Deng H, Wang JH. Genome Sequencing Reveals the Potential of *Achromobacter* sp. HZ01 for Bioremediation. Front Microbiol. 2017 Aug 9;8:1507. doi: 10.3389/fmicb.2017.01507. PMID: 28848520; PMCID: PMC5552670.

Hu S, Li K, Zhang Y, Wang Y, Fu L, Xiao Y, Tang X e Gao J (2022) Novos insights sobre os valores limite da análise de sequência multi-locus, identidade média de nucleotídeos e hibridização digital de DNA-DNA em Delineando Espécies de *Streptomyces* . Frente. Microbiol. 13:910277. doi: 10.3389/fmicb.2022.910277

Imam A, Kanaujia PK, Ray A, Suman SK. Removal of Petroleum Contaminants Through Bioremediation with Integrated Concepts of Resource Recovery: A Review. Indian J Microbiol. 2021 Sep;61(3):250-261. doi: 10.1007/s12088-021-00928-4. Epub 2021 Mar 9. Erratum in: Indian J Microbiol. 2023 Mar;63(1):159. doi: 10.1007/s12088-023-01072-x. PMID: 34294990; PMCID: PMC8263831.

Imron, M.F.; Kurniawan, S.B.; Ismail, N.I.; Abdullah, S.R.S. Future challenges in diesel biodegradation by bacteria isolates: A review. J. Clean. Prod. 2020, 251, 119716

INTERNATIONAL TANKER OWNERS POLLUTION FEDERATION. **2019 Oil tanker spill statistics**. Londres: ITOPF, 2020. Disponível em: <https://www.itopf.org/news-events/news/2019-oil-tanker-spill-statistics-published/>

Interstate Technology & Regulatory Council (ITRC). *Petroleum Hydrocarbons (PHC) Site Characterisation and Monitoring Guidance*. ITRC-TPHRISK-1, Philadelphia: ITRC, 2022. Disponível em: <https://projects.itrcweb.org/PetroleumVI-Guidance/Content/Appendix%20C.%20Chemistry%20of%20Petroleum.htm>. Acesso em: 03 nov. 2025.

Nikolova C.; Gutierrez T. *Biosurfactants and Their Applications in the Oil and Gas Industry: Current State of Knowledge and Future Perspectives*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, v. 9, art. 626639, 2021.

KUPPUSAMY, S.; MADDELA, N. R.; MEGHARAJ, M.; VENKATESWARLU, K. Total petroleum hydrocarbons: environmental fate, toxicity, and remediation. Berlin: Springer, 2020. DOI: 10.1007/978-3-030-24035-6. Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-030-24035-6>

Jafarabadi, A.R.; Bakhtiari, A.R.; Aliabadian, M.; Toosi, A.S.; Ali, R.J.; Alireza, R.B.; Mansour, A.; AmirHossein, S.T. Spatial distribution and composition of aliphatic hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbons and hopanes in superficial sediments of the coral reefs of the Persian Gulf, Iran. *Environ. Pollut.* 2017, 224, 195–223

Jain, A., Jain, R., & Meena, R. M. (2020). Microbial consortia and its role in hydrocarbon degradation: A review. *Biotechnology Reports*, 28, e00580. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00580>

Jakobsen T. H., Hansen M. A., Jensen P. O., Hansen L., Riber L., Cockburn A., et al. (2013). Complete genome sequence of the cystic fibrosis pathogen *Achromobacter xylosoxidans* NH44784-1996 complies with important pathogenic phenotypes. *PLoS ONE* 8:e68484 10.1371/journal.pone.0068484

JERIN, I.; RAHI, M. S.; SULTAN, T.; ISLAM, M. S.; SAJIB, S. A.; HOQUE, K. M. F.; REZA, M. A. Diesel degradation efficiency of *Enterobacter* sp., *Acinetobacter* sp., and *Cedecea* sp. isolated from petroleum waste dumping site: a bioremediation viewpoint. *Archives of Microbiology*, v. 203, n. 8, p. 5075-5084, out. 2021. DOI: 10.1007/s00203-021-02469-2

Joshi, S.; Robles, A.; Aguiar, S.; Delgado, AG A ocorrência e ecologia do alongamento da cadeia microbiana de carboxilatos em solos. *ISME J.* 2021 , 15 , 1907–1918.

Kanapathipillai M, Lentzen G, Sierks M, Park CB. Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's beta-amyloid. *FEBS Lett.* 2005;579:4775–4780. doi: 10.1016/j.febslet.2005.07.057.

Kebede Lencho, Getu Segni Tulu, Robert Tama Lisinge,. Diesel-fueled public transport vehicles and air pollution in Addis Ababa, Ethiopia: Effects of vehicle size, age and kilometers travelled. *Atmospheric Environment: X. Volume* 13. 2022. 100144. ISSN 2590-1621. <https://doi.org/10.1016/j.aecoa.2021.100144>.

Kempf B, Bremer E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol.* 1998;170:319–330. doi: 10.1007/s002030050649.

Khalid, FE; Lim, ZS; Sabri, S.; Gomez-Fuentes, C.; Zulkharnain, A.; Ahmad, SA Biorremediação de água marinha contaminada com diesel por bactérias: uma revisão e análise bibliométrica. *J. Mar. Sci. Eng.* 2021 , 9 , 155. <https://doi.org/10.3390/jmse9020155>

Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H.-P. & Göker, M. Highly parallelized inference of large genome-based phylogenies. *Concurr. Comput.* 26, 1715–1729 (2014).

Koren, S.; Phillippy, A. M. *One chromosome, one contig: complete microbial genomes from long-read sequencing and assembly*. *Curr Opin Microbiol*, v. 23, p. 110-120, 2015.

Koren, S.; Walenz, B. P.; Berlin, K.; Miller, J. R.; Phillippy, A. M. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Research*, v. 27, n. 5, p. 722–736, 2017. DOI: 10.1101/gr.215087.116.

Kotoky Rhitu, Naoto Ogawa, Piyush Pandey,. The structure-function relationship of bacterial transcriptional regulators as a target for enhanced biodegradation of aromatic hydrocarbons, *Microbiological Research*, Volume 262, 2022, 127087, ISSN 0944-5013, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127087>.

Kubota, K.; Miyamoto, H.; Yamada, T.; Murai, T.; Kawasaki, H. Evaluation of hydrocarbon degradation ability of bacterial isolates using 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP) assay. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 105, n. 4, p. 401–404, 2008. DOI: 10.1263/jbb.105.401. Disponível em: <https://doi.org/10.1263/jbb.105.401> . Acesso em: 3 nov. 2025.

Kuppan, N.; Padman, M.; Mahadeva, M.; Srinivasan, S.; Devarajan, R. “A comprehensive review of sustainable bioremediation techniques: Eco friendly solutions for waste and pollution management.” *Waste Management Bulletin*, v. 2, n. 3, p. 154-171, 2024. DOI: 10.1016/j.wmb.2024.07.005

Ladino -Orjuela G. , E. Gomes, R. da Silva, C. Salt, J.R. Parsons. Metabolic pathways for degradation of aromatic hydrocarbons by bactéria W.P. de Voogt (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 237, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Springer International Publishing, Cham (2016), pp. 105-121, 10.1007/978-3-319-23573-8_5

Land, M., Hauser, L., Jun, SR. et al. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Funct Integr Genomics* 15, 141–161 (2015). <https://doi.org/10.1007/s10142-015-0433-4>

Lefort V, Desper R, Gascuel O. FastME 2.0: A Comprehensive, Accurate, and Fast Distance-Based Phylogeny Inference Program. *Mol Biol Evol.* 2015 Oct;32(10):2798-800. doi: 10.1093/molbev/msv150. Epub 2015 Jun 30. PMID: 26130081; PMCID: PMC4576710.

Li H., Wang X.-L., Mu B.-Z., et al. Detecção molecular, quantificação e distribuição de bactérias degradadoras de alceno em água de produção de campos petrolíferos de baixa temperatura. *Biodegradação e Biodegradação Internacional*. 2013;76:49–57. doi: 10.1016/j.ibiod.2012.06.007.

Li L., Liu X., Yang W., Xu F., Wang W., Feng L., et al. (2008). Estrutura cristalina da alceno monooxigenase de cadeia longa (LadA) em complexo com coenzima FMN: revelando a alceno hidroxilase de cadeia longa. *J. Mol. Biol.* 376 453–465

Li, J.; De Toledo, R.A.; Shim, H. Multivariate optimization for the simultaneous bioremoval of BTEX and chlorinated aliphatic hydrocarbons by *Pseudomonas plecoglossicida*. *J. Hazard. Mater.* 2017, 321, 238–246.

Lima, T. M.; Procópio, L. C.; Brandão, F. D.; Carvalho, A. M. X.; Tavares, R. P.; Leite, S. G. F. Biodegradation of diesel oil by *Bacillus* strains isolated from contaminated aquifers. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 51, n. 2, p. 731–740, 2020. DOI: 10.1007/s42770-019-00185-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00185-z> . Acesso em: 3 nov. 2025

Liu, M., Liu, H., Shi, M. et al. Microbial production of ectoine and hydroxyectoine as high-value chemicals. *Microb Cell Fact* 20, 76 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01567-6>.

Liu, T.; Klammsteiner, T.; Dregulo, AM; Kumar, V.; Zhou, Y.; Zhang, Z.; Awasthi, MK Black soldier fly larvae for organic manure recycling and their potential for a circular bioeconomy: a review. *Sci. Total Environ.* 2022, 833, 155122.

Liu, Y.; Liu, Y.; Li, N.; Lou, Y.; Zhao, X. Effect of oil spill stress on fatty acid stable carbon isotope composition of *Ulva pertusa*. *Sci. Total. Environ.* 2019, 649, 1443–1451.

Lonestar College. History of Biotechnology. 2022. Available online: <https://www.lonestar.edu/history-of-biotechnology.htm> (accessed December 8, 2022).

Long, X.-E.; Niu, G.; Xu, X.; Zhang, Y.; Dang, Z. *Co-selection of antibiotic and heavy metal resistance in petroleum-contaminated soils and potential bacterial responses*. *Science of the Total Environment*, v.

782, art. 146801, 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.146801. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146801>. Acesso em: 3 nov. 2025.

Luo, Q., Zhang, JG., Shen, XR. et al. Isolation and characterization of marine diesel oil-degrading *Acinetobacter* sp. strain Y2. *Ann Microbiol* 63, 633–640 (2013). <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0513-9>

Maglione, G.; Zaccagnini, P.; Tredici, A.; Mazzarella, C. U.; D'Angelo, L.; Guerriero, D.; Módenes, A. Microbes' role in environmental pollution and remediation: a bioeconomy-focus approach. *AIMS Microbiology*, v. 10, n. 3, p. 723-755, 2024. DOI: 10.3934/microbiol.2022008.

WYSZKOWSKI, M.; WYSZKOWSKA, J.; BOROWIK, A.; KORDALA, N. Sewage sludge as a tool in limiting the content of trace elements in *Avena sativa* L. on the soil polluted with diesel oil. *Materials*, Basel, v. 14, n. 14, art. 4003, 17 jul. 2021. DOI: 10.3390/ma1414400

Margareth Ho T, Li MSM, McDowell T, MacDonald J, Yuan ZC. Characterization and genomic analysis of a diesel-degrading bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* CA16, isolated from Canadian soil. *BMC Biotechnol.* 2020 Jul 25;20(1):39. doi: 10.1186/s12896-020-00632-z. PMID: 32711499; PMCID: PMC7477861.

Mehariya S, A.K. Patel, P.K. Obulisamy, E. Punniyakotti, J.W.C. Wong. Co-digestion of food waste and sewage sludge for methane production: current status and perspective. *Front. Microbiol.*, 265 (2018), pp. 519-531

Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H.-P. & Göker, M. Taxonomic use of DNA G+C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 352–356 (2014).

MEIER-KOLTHOFF, Jan P.; GÖKER, Markus. TYGS is an automated highthroughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications*, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 12182-2019, 16 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>

MEIER-KOLTHOFF, Jan P; AUCH, Alexander F; KLENK, Hans-Peter; GÖKER, Markus. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *Bmc Bioinformatics*, [S.L.], v. 14, p. 1-14, 21 fev. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>

MISTRY, Jaina; CHUGURANSKY, Sara; WILLIAMS, Lowri; QURESHI, Matloob; SALAZAR, Gustavo A; SONNHAMMER, Erik L L; TOSATTO, Silvio C e; PALADIN, Lisanna; RAJ, Shriya; RICHARDSON, Lorna J. Pfam: the protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research*, [S.L.], v. 49, n. 1, p. D412-D419, 30 out. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkaa913>.

Mohamadkhani A. Gene Cluster Analysis of Marine Bacteria Seeking for Natural Anticancer Products. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 29 Aug 2021, Vol. In Press, Issue In Press. DOI: 10.5812/jjnpp.104665

Mohammadi S. , A. Kargari, H. Sanaeepur, K. Abbassian, A. Najafi, E. Mofarrah. Phenol removal from industrial wastewaters: a short review. *Desalination Water Treat.*, 53 (8) (2015), pp. 2215-2234,

Mohanty, S. S.; Mukherji, S. Biodegradation rate of diesel range n-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 15, n. 5, p. 453–458, 2008. DOI: 10.1007/s11356-008-0018-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-008-0018-1> . Acesso em: 3 nov. 202

Montero-Calasan, M. C. et al. Genome-scale data call for a taxonomic rearrangement of Geodermatophilaceae. *Front. Microbiol.* 8, 1–15 (2017).

Mukherjee, S. et al. 1,003 reference genomes of bacterial and archaeal isolates expand coverage of the tree of life. *Nat. Biotechnol.* 35, 676–683 (2017).

Naing, S. H.; Parvez, S.; Pender-Cudlip, M.; Groves, J. T.; Austin, R. N. Substrate specificity and reaction mechanism of purified alkane hydroxylase from the hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis* (AbAlkB). *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 121, p. 46–52, 2013. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2012.12.012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23337786/>. Acesso em: 03 nov. 2025.

Naloka, K., Kuntaveesuk, A., Muangchinda, C. et al. *Pseudomonas* and *Pseudarthrobacteria* are the main actors in the synergistic biodegradation of phenanthrene at low temperatures. *Science Representative* 14, 11976 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-62829-y>

Narasimhan D, Woods JH, Sunahara RK. Bacterial cocaine esterase: a protein-based therapy for cocaine overdose and addiction. *Future Med Chem.* 2012 Feb;4(2):137-50. doi: 10.4155/fmc.11.194. PMID: 22300094; PMCID: PMC3290992.

NATTASSHA, R.; HANDAYATI, Y.; SIMATUPANG, TM; SIALLAGAN, M. Compreender a implementação da economia circular na cadeia de abastecimento agro-alimentar: o caso de um produtor indonésio de fertilizantes orgânicos. *Agricultura e Segurança Alimentar*, v. 9, pág.10, 2020. DOI: 10.1186/s400

Nduko, JM; Taguchi, S. Microbial production of biodegradable lactate-based polymers and oligomeric building blocks from renewable and waste resources. *Frente. Bioeng. Biotecnologia.* 2021, 8, 618077.

NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NIE, Y.; CHI, C. Q.; QIN, Y. L.; HE, J.; LIU, H. C.; LIU, L. X.; YANG, Y.; WU, X. L. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. *Scientific Reports*, v. 4, p. 4968, 2014. DOI: 10.1038/srep04968.

Nies, D. H. *Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes*. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 27, n. 2–3, p. 313–339, 2003. DOI: 10.1016/S0168-6445(03)00048-2. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00048-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00048-2). Acesso em: 3 nov. 2025.

NOVA ONE ADVISOR. Bioremediation Market Size, Share & Trends Analysis Report By Type, By Technology, By Service, By Region, And Segment Forecasts, 2023 - 2032. Disponível em: <https://www.novaoneadvisor.com/report/bioremediation-market>. Acesso em: 6 jun. 2025.

Nzila, A. Update on the cometabolism of organic pollutants by bacteria. *Environmental Pollution*, v. 178, p. 474–482, 2013. DOI: 10.1016/j.envpol.2013.03.042. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.03.042>. Acesso em: 3 nov. 2025.

Ondov B.D., STARRETT, G.J., SAPPINGTON, A., KOSTIC, A., KOREN, S., BUCK, C.B. and PHILLIPPY, A.M., 2019. Mash screen: highthroughput sequence containment estimation for genome discovery. *Genome Biology*, vol. 20, no. 1, p. 232. <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-019-1841-x>. PMID:31690338.

Onyeaka, H.; Ekwebelem, O.C. A Review of Recent Advances in Engineering Bacteria for Enhanced CO₂ Capture and Utilization. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2022, 20, 4635–4648

Pal, S.; Hait, A.; Mandal, S.; Roy, A.; Sar, P.; Kazy, S.K. Crude oil degrading efficiency of formulated consortium of bacterial strains isolated from petroleum-contaminated sludge. *3 Biotech* 2024, 14, 220.

Palazzolo AME, Simons CLW, Burke MD: The natural productome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017, 114:5564-5566.

Palleroni, NJ, Pieper, DH, Moore, ERB (2010). Microbiology of hydrocarbon-degrading *Pseudomonas*. In: Timmis, KN (eds) *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_129

Pančić, M.; Köhler, E.; Paulsen, M.L.; Toxværd, K.; Lacroix, C.; Le Floch, S.; Hjorth, M.; Nielsen, T.G. Effects of oil spill response technologies on marine microorganisms in the high Arctic. *Mar. Environ. Res.* 2019, 151, 104785.

Pastor JM, Salvador M, Argandona M, Bernal V, Reina-Bueno M, Csonka LN, Iborra JL, Vargas C, Nieto JJ, Canovas M. Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production. *Biotechnol Adv.* 2010;28:782–801. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.06.005.

Patel A.K. , N. Vaisnav, A. Mathur, R. Gupta, D. Tuli. Whey waste as potential feedstock for biohydrogen production. *Renew. Energ.*, 98 (2016), pp. 221-225

Patel Anil Kumar, Reeta Rani Singhania, Frank Paolo Jay B. Albarico, Ashok Pandey, Chiu-Wen Chen, Cheng-Di Dong. Organic wastes bioremediation and its changing prospects. *Science of The Total Environment*. Volume 824. 2022. 153889. ISSN 0048-9697. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153889>.

Patil, K. R. & McHardy, A. C. Alignment-free genome tree inference by learning group-specific distance metrics. *Genome Biol. Evol.* 5, 1470–1484 (2013).

PAYSAN-LAFOSSÉ, Typhaine; BLUM, Matthias; CHUGURANSKY, Sara; GREGO, Tiago; PINTO, Beatriz Lázaro; SALAZAR, Gustavo A; BILESCHI, Maxwell L; BORK, Peer; BRIDGE, Alan; COLWELL, Lucy. InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, [S.L.], v. 51, n. 1, p. 418-427, 9 nov. 2022. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkac993>.

Peixoto N.M. Araujo, H.S. Arruda, D.R.P. Marques, W.Q. de Oliveira, G.A. Pereira, G.M. Pastore. Functional and nutritional properties of selected Amazon fruits: A review. *Food Research International*, 147 (2021), Article 110520, 10.1016/J.FOODRES.2021.110520

Peixoto R. S., Vermelho A. B., Rosado A. S. Petroleum-degrading enzymes: bioremediation and new prospects. *Enzyme Research*. 2011;7:18. doi: 10.4061/2011/475193.

Pérez-Vázquez, A.; Urionabarrenetxea, E.; Artetxe, U.; Rutkoski, C. F.; Gómez-Sagasti, M. T.; García-Velasco, N.; Zaldívar, B.; Anza, M.; Epelde, L.; Garbisu, C.; Becerril, J. M.; Soto, M. Integrative assessment of in situ combined bioremediation strategies applied to remediate soils spilled with sewage sludges. *Frontiers in Enviro*

Santos-Beneit, F. “What is the role of microbial biotechnology and genetic engineering in medicine?” *MicrobiologyOpen*, v. 13, n. 2, 2024. DOI: 10.1002/mbo3.1406.

Português Bian, B.; Bajracharya, S.; Xu, J.; Pant, D.; Saikaly, PE.. Bioresour. Microbial electrosynthesis from CO₂: Challenges, opportunities and perspectives in the context of the circular bioeconomy. *Technol.* 2020 , 302 , 122863.

Prince, R. C., McFarlin, K. M., Butler, J. D., Febbo, E. J., & Wang, F. C. (2010). The primary biodegradation of dispersed crude oil in the sea. *Chemosphere*, 90(2), 521–526. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.08.020>

PRJIBELSKI, Andrey; ANTIPOV, Dmitry; MELESHKO, Dmitry; LAPIDUS, Alla; KOROBENNIKOV, Anton. Using SPAdes De Novo Assembler. *Current Protocols In Bioinformatics*, [S.L.], v. 70, n. 1, p. 1-29, jun. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cpbi.102>.

Pye CR, Bertin MJ, Lokey RS, Gerwick WH, Roger G, Linington RG: Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017, 114:5601-5606

Rajasekhar, B.; Nambi, I.M.; Govindarajan, S.K. Human health risk assessment for exposure to BTEXN in an urban aquifer using deterministic and probabilistic methods: A case study of Chennai city, India. *Environ. Pollut.* 2020, 265, 114814.

- Ramos Nunes, J.; Veloso Da Costa, L.; Viana Vieira, V.; Lima Brandão, M. L. Challenges in the Identification of Environmental Bacterial Isolates from a Pharmaceutical Industry Facility by 16S rRNA Gene Sequences. *DNA*, v. 5, n. 3, art. 33, 2025. DOI: 10.3390/dna5030033. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2673-8856/5/3/33>. Acesso em: 03 nov. 2025.
- Ran, W.; Higgs, P. G. Contributions of speed and accuracy to translational selection in bacteria. *PLoS ONE*, v. 7, n. 12, e51652, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051652>
- Reis P. E. A. C. M dos. A Bioeconomy-Driven Special Economic Zone in the Amazon Region. *Handbook of Research on Special Economic Zones as Regional Development Enablers*. 2022
- Renuka, R., Ragunathan, R. & Johnney, J. Production and characterisation of surfactant produced by *Bacillus subtilis* and its anti microbial study. *Asian J. Res. Biochem.* **15** (2), 124–135 (2025)
- Rodriguez-R, LM, Gunturu, S., Harvey, WT, Rosselló-Mora, R., Tiedje, JM, Cole, JR, et al. (2018). O servidor web Microbial Genomes Atlas (MiGA): análise taxonômica e de diversidade genética de Archaea e Bactérias em todo o genoma. *Ácidos Nucleicos Res.* **46**, W282–W288. doi: 10.1093/nar/gky467.
- Rojas-Vargas, J.; Castelán-Sánchez, H. G.; Pardo-López, L. Hadeg: A curated hydrocarbon aerobic degradation enzymes and genes database. *Computational Biology and Chemistry*, v. 107, p. 107966, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2023.107966>
- Rojo F. (2009). Alkane degradation by bacteria. *Environ. Microbiol.* **11** 2477–2490.
- Roller BR, Stoddard SF, Schmidt TM. Exploiting rRNA operon copy number to investigate bacterial reproductive strategies. *Nat Microbiol.* 2016 Sep 12;1(11):16160. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.160. PMID: 27617693; PMCID: PMC5061577.
- Romero-Silva M. J. , V. Méndez, L. Agulló, M. Seeger. Genomic and functional analyses of the gentisate and protocatechuate ring-cleavage pathways and related 3-hydroxybenzoate and 4-hydroxybenzoate peripheral pathways in burkholderia xenovorans LB400 *PLoS ONE*, **8** (2013), Article e56038, 10.1371/journal.pone.0056038
- Romine, M. F. et al. Complete genome sequence of *Sphingomonas aromaticivorans* F199, a bacterium able to degrade aromatic compounds. *Journal of Bacteriology*, v. 181, n. 19, p. 5755–5769, 1999.
- Rosenfeld Tomas, Benno Pokorny, Jacques Marcovitch, Peter Poschen, BIOECONOMY based on non-timber forest products for development and forest conservation - untapped potential or false hope? A systematic review for the BRAZILIAN amazon. *Forest Policy and Economics*. Volume 163. 2024. 103228. ISSN 1389-9341. <https://doi.org/10.1016/j.forpol.2024.103228>.
- Rudra, B.; Duncan, L.; Shah, A. J.; Shah, H. N.; Gupta, R. S. Phylogenomics studies and molecular markers reliably demarcate two distinct clades of *Pseudomonas aeruginosa* strains: proposal to transfer the strains from an outlier clade to a novel species *Pseudomonas paraeruginosa* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 72, n. 11, p. 005542, 2022. DOI: 10.1099/ijsem.0.005542
- Salapatek A, Bates M, Bilstein A, Patel D. Ectoin (R), a novel, non-drug, extremophile-based device, relieves allergic rhinoconjunctivitis symptoms in patients in an environmental exposure chamber model. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127:AB202. doi: 10.1016/j.jaci.2010.12.803.
- Salvador, R.; Barros, M. V.; Donner, M.; Brito, P.; Halog, A.; de Francisco, A. C. How to advance regional circular bioeconomy systems? Identifying barriers, challenges, drivers and opportunities. *Sustainable Production and Consumption*, v. 32, p. 248-269, 2022. DOI:10.1016/j.spc.2022.04.025.
- SANTOS, Jefferson Ferreira dos. Sinergismo entre cepas de um consórcio bacteriano degradador de diesel isolado do Rio Negro. 2021. 197 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus (AM), 2021.

Saradha Devi, G.; Vaishnavi, S.; Srinath, S.; Dutt, B.; Rajmohan, K.S. Chapter 19—Energy Recovery from Biomass Using Gasification. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*; Varjani, S., Pandey, A., Gnansounou, E., Khanal, S.K., Raveendran, S., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020; pp. 363–382.

SARDI SULVARÁN, A. E.; SANDRINI-NETO, L.; DA S. PEREIRA, L.; SILVA DE ASSIS, H.; MARTINS, C. C.; LANA, P. D. C.; CAMUS, L. Oxidative stress in two tropical species after exposure to diesel oil. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. 23, n. 20, p. 20952–20962, 2016. DOI: 10.1007/s11356-016-7280-2. Acesso em: 3 nov. 2025.

Sarıkoç, S. Fuels of the Diesel-Gasoline Engines and Their Properties. In *Diesel and Gasoline Engines*; IntechOpen: London, UK, 2020; pp. 1–16.

Sarkar, J.; Mandal, S.; Kundu, S. S.; Das, D.; Mukherjee, A.; Chakraborty, R. Accelerated bioremediation of petroleum refinery sludge through biostimulation and bioaugmentation of native microbiome. *Science of The Total Environment*, v. 727, p. 138–149, 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138149. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/341139848>. Acesso em: 5 nov. 2025

Satam, H. et al. “Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends, Applications and Challenges.” 2023.

Scheps, D., Malca, SH, Hoffmann, H., Nestl, BM, and Hauer, B. (2011). Regioselective omega-hydroxylation of medium-chain n-alkanes and primary alcohols by CYP153 enzymes from *Mycobacterium marinum* and *Polaromonas* sp. strain JS666. *Org. Biomol. Chem.* 9, 6727–6733.

Schleheck, D.; Lechner, M.; Schonenberger, R.; Suter, M.J.F. & Cook, A.M. Desulfonation and degradation of disulfodiphenyl ethercarboxylates from linear alkyldiphenyl ethersulfonate surfactants. *Apply. Environment. Microbiol.*, 69:938-944, 2003.

Schneiker, S. et al. *Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium Alcanivorax borkumensis*. *Nature Biotechnology*, v. 24, n. 8, p. 997–1004, 2006. DOI: 10.1038/nbt1232. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt1232>. Acesso em: 3 nov. 2025.

Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 2014. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu153. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>. Acesso em: 3 nov. 2025.

Senthilvelan, T., Kanagaraj, J., Panda, R.C. et al. Biodegradation of phenol by mixed microbial culture: an eco-friendly approach for the pollution reduction. *Clean Techn Environ Policy* 16, 113–126 (2014). <https://doi.org/10.1007/s10098-013-0598-2>

Setlhare B. , A. Kumar, M.P. Mokoena, A.O. Olaniran. Catechol 1,2-dioxygenase is an analogue of homogentisate 1,2-dioxygenase in pseudomonas chlororaphis strain UFB2 *Int. J. Mol. Sci.*, 20 (1) (2019), p. 61, 10.3390/ijms20010061

Shanklin J. , E. Whittle, B.G. Fox. Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry*, 33 (43) (1994), pp. 12787-12794

SHANKLIN, J; ACHIM C; SCHMIDT, H; FOX, B. G; MÜNCK E. Mössbauer studies of alkane ω -hydroxylase: Evidence for a diiron cluster in an integral-membrane enzyme, *Proceeding of the National Academy of Science of the United State of America*, 1997.

Sharma, P.; Pandey, A.K.; Kim, S.H.; Singh, S.P.; Chaturvedi, P.; Varjani, S. Critical review on microbial community during in-situ bioremediation of heavy metals from industrial wastewater. *Environ. Technol. Innov.* 2021, 24, 101826.

Singh, A.; Kumar, R.; Pandey, K. D. Bacterial biodegradation of hydrocarbons: an overview. *International Journal of Environmental Research*, v. 8, n. 3, p. 917–928, 2014. DOI: 10.1007/s41742-014-0026-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25696926/>. Acesso em: 5 nov. 2025

Singh, R. Microbial biotransformation: a process for chemical changes. *J. Bacteriol. Mycol. Open Access* 2017, 4, 47–51.

Singh, R.; Langyan, S.; Rohtagi, B.; Darjee, S.; Khandelwal, A.; Shrivastava, M.; Singh, A. Production of biofuels options by contribution of effective and suitable enzymes: Technological developments and challenges. *Mater. Sci. Energy Technol.* 2022, 5, 294–310.

Stamets, La Dena Che'. Best mycorestoration practices for habitat restoration of small land parcels. 2012. 139 f. Dissertação (Mestrado em Estudos Ambientais) – The Evergreen State College, Olympia, 2012. Disponível em: <https://collections.evergreen.edu/files/original/3dc68e16a3640be714424e5932b1f363775c850d.pdf>. Acesso em: 6 jun. 2025.

Stancu, M.M. Characterization of new diesel-degrading bacteria isolated from freshwater sediments. *Int Microbiol* 26, 109–122 (2023). <https://doi.org/10.1007/s10123-022-00277-2>

Suenaga H. , S. Mizuta, K. Miyazaki, K. Yaoi. Diversity of extradiol dioxygenases in aromatic-degrading microbial community explored using both culture-dependent and culture-independent approaches. *FEMS Microbiol Ecol.*, 90 (2014), pp. 367-379, 10.1111/1574-6941.12390

Tarekegn, M.M.; Salilih, F.Z.; Ishetu, A.I. Microbes used a tool for bioremediation of heavy metals from the environment. *Cogent Food Agric.* 2020, 6, 1783174.

Tatusova, T.; Dicuccio, M.; Badretdin, A.; Cleversley, R.; Pakkala, D.; Lansingh, S. et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. 14, p. 6614–6624, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkw569. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw569> . Acesso em: 3 nov. 2025.

Thakurta Sohini. Mukesh Aakula. Jitamanyu Chakrabarty. Susmita Dutta. Guha. Bioremediation of phenol from synthetic and real wastewater using *Leptolyngbya* sp.: a comparison and assessment of lipid production. Published: 31 March 2018. Volume 8, article number 206, (2018)

Tistechok S, Stierhof M, Myronovskyi M et al (2022b) Furaquinocins K and L: novel naphthoquinone-based meroterpenoids from *Streptomyces* sp. *Je* 1–369. *Antibiotics* (Basel).11(11):1587.10.3390/antibiotics11111587

Toxic and Priority Pollutants under the Clean Water Act. Available online: <https://www.epa.gov/eg/toxic-and-priority-pollutants-under-clean-water-act> (accessed on 5 November 2020).

Tsuchiya K, Yamazaki T, Takeuchi Y, Oishi T. Studies on T-2636 antibiotics. IV. In vitro and in vivo antibacterial activity of T-2636 antibiotics. *J Antibiot* (Tokyo). 1971 Jan;24(1):29-41. doi: 10.7164/antibiotics.24.29. PMID: 4395750.

Ugochukwu, U.C.; Ochonogor, A. Groundwater contamination by polycyclic aromatic hydrocarbon due to diesel spill from a telecom base station in a Nigerian City: Assessment of human health risk exposure. *Environ. Monit. Assess.* 2018, 190, 249.

Ugochukwu, U.C.; Ochonogor, A.; Jidere, C.M.; Agu, C.; Nkoloagu, F.; Ewoh, J.; Okwu-Delunzu, V.U. Exposure risks to polycyclic aromatic hydrocarbons by humans and livestock (cattle) due to hydrocarbon spill from petroleum products in Niger-delta wetland. *Environ. Int.* 2018, 115, 38–47.

United States Environmental Protection Agency (USEPA) Method 8015D: Non-Halogenated Organics Using GC/FID. Revision 4. Washington, DC, USA: United States Environmental Protection Agency; 2003.

Valli M. , H.M. Russo, V. da S. Bolzani. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, Vol. 90, Academia Brasileira de Ciencias (2018), pp. 763-778, 10.1590/0001-3765201820170653

Van Beilen JB, Eggink G, Enequist H, Bos R, Witholt B (1992) DNA sequence determination and functional characterization of the OCT-plasmid-encoded alkJKL genes of *Pseudomonas oleovorans*. *Mol Microbiol* 6:3121–3136

Van Beilen, J. B., & Funhoff, E. G. (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 13–21. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0748-0>

Van Beilen, J. B.; Funhoff, E. G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 74, p. 13–21, 2007. DOI: 10.1007/s00253-006-0748-0. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0748-0>. Acesso em: 3 nov. 2025.

Van Hamme J.D.; Singh, A.; Ward, O.P. Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003, 67, 503–549

Vandamme, P. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60, 407–438 (1996).

VARJANI, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, v. 223, p. 277–286, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.10.037.

Vaugahn Cf. Scott, *The State and Fate of Tropical Rainforests*, junho 2015.

Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T.* 2015 Apr;40(4):277-83. PMID: 25859123; PMCID: PMC4378521

Vilchez-Vargas, R.; Junca, H.; Pieper, D. H. Metabolic networks, microbial ecology and ‘omics’ technologies: towards understanding in situ biodegradation processes. *Environmental Microbiology*, v. 12, n. 12, p. 3089-3104, 2010. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02340.x. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02340.x> . Acesso em: 3 nov. 2025.

Vivien F.D., M. Nieddu, N. Befort, R. Debref, M. Giampietro. The hijacking of the bioeconomy. In, vol. 159, *Ecological Economics* (2019), pp. 189-197

Wang, Q. et al. (2022). Exploring Microbial Communities and Functional Genes in Oil Reservoirs Using Metagenomic Approaches. *Bioengineering*, 10(3), 347. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10030347>

Wang, Wanpeng; Shao, Zongze. Enzymes and genes involved in aerobic alkane degradation. *Frontiers in Microbiology*, v. 4, art. 116, 2013. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00116. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2013.00116/full>. Acesso em: 5 nov. 2025.

Wentzel, A; Ellingsen, T. E; Kotlar, H. K; Zotchev, S. B; Throne-Holst M. Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007.

Wichard Thomas. Jean-Philippe Bellenger. François M. M. Morel. Anne M. L. Kraepiel. Role of the Siderophore Azotobactin in the Bacterial Acquisition of Nitrogenase Metal Cofactors. *Environmental Science & Technology*. 2009

Widdel, F.; Rabus, R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, n. 3, p. 259–276, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11404104/> . Acesso em: 03 nov. 2025

Wyszkowski, M., Wyszkowska, J., Borowik, A. et al. Contamination of Soil with Diesel Oil, Application of Sewage Sludge and Content of Macroelements in Oats. *Water Air Soil Pollut* 231, 546 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04914-2>

Xu, X.; Liu, W.; Tian, S.; Wang, W.; Qi, Q.; Jiang, P.; Jiang, P.; Gao, X.; Li, F.; Li, H.; et al. Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: A perspective analysis. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 2885.

YANG, H.; KIM, G.; CHO, K. S. Bioaugmentation of diesel-contaminated soil with *Pseudomonas* sp. DTF1. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 20, n. 11, p. 12499–12510, 2023. DOI: 10.1007/s13762-023-04846-4

YANG, R., ZHANG, G., LI, S., MOAZENI, F., LI, Y., WU, Y., ... WU, X. (2019). Degradation of crude oil by mixed cultures of bacteria isolated from the Qinghai-Tibet plateau and comparative analysis of metabolic mechanisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(2), 1834–1847. doi.org/10.1007/s11356-018-3718-z

Yassine, M. M., Harir, M., Dabek-Zlotorzynska, E., & Schmitt-Kopplin, P. (2014). Structural characterization of organic aerosol using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: Aromaticity equivalent approach. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 28, 2445–2454

Yu, Z.; Hu, Z.; Xu, Q.; Zhang, M.; Yuan, N.; Liu, J.; Meng, Q.; Yin, J. The LuxI/LuxR-Type Quorum Sensing System Regulates Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons via Two Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 15, art. 5548, 2020. DOI: 10.3390/ijms21155548. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21155548>. Acesso em: 03 nov. 2025.

Zhang, Z.; Hou, Z.; Yang, C.; Ma, C.; Tao, F.; Xu, P. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 5, p. 4111–4116, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.12.064. (Publicado online 22 dez. 2010). Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.064> . Acesso em: 03 nov. 2025

Zhao, X.; Liu, W.; Fu, J.; Cai, Z.; O'Reilly, S.E.; Zhao, D. Dispersion, sorption and photodegradation of petroleum hydrocarbons in dispersant-seawater-sediment systems. *Mar. Pollut. Bull.* 2016, 109, 526–538.

Zheng Kuan . Defeng Shen. Ran Hong. Biomimetic Synthesis of Lankacidin Antibiotics. *Journal of the American Chemical Society*. 2017.

Zhou X, Lei D, Tang J, Wu M, Ye H, Zhang Q. Whole genome sequencing and analysis of fenvalerate degrading bacteria *Citrobacter freundii* CD-9. *AMB Express*. 2022 May 6;12(1):51. doi: 10.1186/s13568-022-01392-z. PMID: 35523901; PMCID: PMC9076782.

Zhou, C.; McCarthy, S. A.; DURBIN, R. YaHS: yet another Hi-C scaffolding tool. *Bioinformatics*, v. 39, n. 1, btac808, 2023. DOI: 10.1093/bioinformatics/btac808

9 ANEXO

Lista de genes relacionados ao metabolismo de composto aromáticos

<i>Acinetobacter seifertii</i> Laprot 313.			
Category	Subcategory	Subsystem	Role
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Quinate degradation	3-dehydroshikimate dehydratase
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Quinate degradation	3-dehydroquininate dehydratase II (EC 4.2.1.10)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Quinate degradation	3-dehydroquininate dehydratase I (EC 4.2.1.10)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Quinate degradation	Quinate/shikimate dehydrogenase [Pyrroloquinoline-quinone] (EC 1.1.99.25)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Salicylate ester degradation	Salicylate hydroxylase (EC 1.14.13.1)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Benzoate degradation	Benzoate 1,2-dioxygenase beta subunit (EC 1.14.12.10)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Benzoate degradation	1,2-dihydroxycyclohexa-3,5-diene-1-carboxylate dehydrogenase (EC 1.3.1.25)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Benzoate degradation	Benzoate 1,2-dioxygenase alpha subunit (EC 1.14.12.10)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Benzoate degradation	Benzoate 1,2-dioxygenase, ferredoxin reductase component
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Benzoate degradation	benzoate MFS transporter BenK
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Benzoate degradation	benABC operon transcriptional activator BenR
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Benzoate degradation	benzoate-specific porin
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Benzoate degradation	Benzoate transport protein
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	p-Hydroxybenzoate degradation	4-hydroxybenzoate transporter
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	p-Hydroxybenzoate degradation	P-hydroxybenzoate hydroxylase (EC 1.14.13.2)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Phenol hydroxylase	Phenol hydroxylase, P3 oxygenase component DmpN (EC 1.14.13.7)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Phenol hydroxylase	Phenol hydroxylase, assembly protein DmpK
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Phenol hydroxylase	Phenol hydroxylase, P2 regulatory component DmpM (EC 1.14.13.7)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Phenol hydroxylase	Phenol hydroxylase, P4 oxygenase component DmpO (EC 1.14.13.7)

Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Phenol hydroxylase	Phenol hydroxylase, P1 oxygenase component DmpL (EC 1.14.13.7)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Phenol hydroxylase	Phenol hydroxylase, FAD- and [2Fe-2S]-containing reductase component DmpP
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Chloroaromatic degradation pathway	3-oxoadipate CoA-transferase subunit B (EC 2.8.3.6)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Chloroaromatic degradation pathway	Beta-ketoadipyl CoA thiolase (EC 2.3.1.-)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Chloroaromatic degradation pathway	Beta-ketoadipate enol-lactone hydrolase (EC 3.1.1.24)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Chloroaromatic degradation pathway	3-oxoadipate CoA-transferase subunit A (EC 2.8.3.6)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Salicylate and gentisate catabolism	Gentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.4)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Salicylate and gentisate catabolism	Maleylacetoacetate isomerase (EC 5.2.1.2)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Salicylate and gentisate catabolism	Fumarylacetoacetase (EC 3.7.1.2)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Salicylate and gentisate catabolism	Putative n-hydroxybenzoate hydroxylase
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Salicylate and gentisate catabolism	4-hydroxybenzoate transporter
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Salicylate and gentisate catabolism	Fumarylacetoacetate hydrolase family protein
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Salicylate and gentisate catabolism	Salicylate hydroxylase (EC 1.14.13.1)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	Muconolactone isomerase (EC 5.3.3.4)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	3-oxoadipate CoA-transferase subunit B (EC 2.8.3.6)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	Beta-ketoadipate enol-lactone hydrolase (EC 3.1.1.24)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	3-oxoadipate CoA-transferase subunit A (EC 2.8.3.6)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	Muconate cycloisomerase (EC 5.5.1.1)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	Catechol 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.1)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	Pca regulon regulatory protein PcaR
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	3-oxoadipate CoA-transferase subunit B (EC 2.8.3.6)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	Beta-ketoadipate enol-lactone hydrolase (EC 3.1.1.24)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	Protocatechuate 3,4-dioxygenase beta chain (EC 1.13.11.3)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	3-oxoadipate CoA-transferase subunit A (EC 2.8.3.6)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	dicarboxylic acid transporter PcaT

Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase (EC 5.5.1.2)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	Beta-ketoadipyl CoA thiolase (EC 2.3.1.-)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	PhaK-like protein
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	Protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha chain (EC 1.13.11.3)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	4-carboxymuconolactone decarboxylase (EC 4.1.1.44)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Gentisate degradation	Gentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.4)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Gentisate degradation	4-hydroxybenzoate transporter
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Gentisate degradation	Fumarylacetoacetate hydrolase family protein
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Gentisate degradation	Maleylacetoacetate isomerase (EC 5.2.1.2)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Gentisate degradation	putative 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Gentisate degradation	Putative n-hydroxybenzoate hydroxylase
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Aromatic Amin Catabolism	Monoamine oxidase (1.4.3.4)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Aromatic Amin Catabolism	Nitritotriacetate monooxygenase component B (EC 1.14.13.-)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Aromatic Amin Catabolism	Phenylacetaldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.39)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Aromatic Amin Catabolism	Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3), PaaZ

<i>Achromobacter xylosoxidans</i> Laprot 314			
Category	Subcategory	Subsystem	Role
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	3-oxoadipate CoA-transferase subunit A (EC 2.8.3.6)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	Beta-ketoadipate enol-lactone hydrolase (EC 3.1.1.24)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	3-oxoadipate CoA-transferase subunit B (EC 2.8.3.6)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	Muconate cycloisomerase (EC 5.5.1.1)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	mandelate racemase/muconate

			lactonizing enzyme family protein
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	Muconolactone isomerase (EC 5.3.3.4)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit A (EC 2.8.3.5)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit B (EC 2.8.3.5)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Salicylate and gentisate catabolism	Putative n-hydroxybenzoate hydroxylase
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Salicylate and gentisate catabolism	Fumarylacetoacetase (EC 3.7.1.2)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Salicylate and gentisate catabolism	Maleylacetoacetate isomerase (EC 5.2.1.2)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Salicylate and gentisate catabolism	Maleate cis-trans isomerase (EC 5.2.1.1)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Salicylate and gentisate catabolism	Salicylate hydroxylase (EC 1.14.13.1)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Salicylate and gentisate catabolism	salicylate esterase
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Salicylate and gentisate catabolism	Fumarylacetoacetate hydrolase family protein
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Salicylate and gentisate catabolism	Gentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.4)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Homogentisate pathway of aromatic compound degradation	Fumarylacetoacetase (EC 3.7.1.2)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Homogentisate pathway of aromatic compound degradation	Maleylacetoacetate isomerase (EC 5.2.1.2)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Homogentisate pathway of aromatic compound degradation	Transcriptional regulator, IclR family
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Homogentisate pathway of aromatic compound degradation	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (EC 1.13.11.27)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Homogentisate pathway of aromatic compound degradation	Homogentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.5)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Homogentisate pathway of aromatic compound degradation	Aromatic-amino-acid aminotransferase (EC 2.6.1.57)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	N-heterocyclic aromatic compound degradation	Isoquinoline 1-oxidoreductase beta subunit (EC 1.3.99.16)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	N-heterocyclic aromatic compound degradation	Isoquinoline 1-oxidoreductase alpha subunit (EC 1.3.99.16)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Central meta-cleavage pathway of aromatic compound degradation	3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase (EC 1.13.11.15)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Central meta-cleavage pathway of aromatic compound degradation	5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.60)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Central meta-cleavage pathway of aromatic compound degradation	2-oxo-hepta-3-ene-1,7-dioic acid hydratase (EC 4.2.-.-)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Central meta-cleavage pathway of aromatic compound degradation	2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase (EC 3.7.1.9)

Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Central meta-cleavage pathway of aromatic compound degradation	2-polyprenylphenol hydroxylase and related flavodoxin oxidoreductases
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	Beta-ketoadipyl CoA thiolase (EC 2.3.1.-)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit A (EC 2.8.3.5)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit B (EC 2.8.3.5)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	3-oxoadipate enol-lactone hydrolase/4-carboxymuconolactone decarboxylase
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	4-carboxymuconolactone decarboxylase (EC 4.1.1.44)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	Pca regulon regulatory protein PcaR
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	3-oxoadipate CoA-transferase subunit B (EC 2.8.3.6)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	3-oxoadipate CoA-transferase subunit A (EC 2.8.3.6)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	Beta-ketoadipate enol-lactone hydrolase (EC 3.1.1.24)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase (EC 5.5.1.2)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Benzoate transport and degradation cluster	benzoyl-CoA-dihydrodiol lyase (BoxC)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Benzoate transport and degradation cluster	Benzoate transport, ATPase component
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Benzoate transport and degradation cluster	Benzoate transport, ATP binding protein
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Benzoate transport and degradation cluster	Benzoate transport, extracellular ligand-binding receptor
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Benzoate transport and degradation cluster	Benzoyl-CoA oxygenase component B
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Benzoate transport and degradation cluster	Regulatory protein of benzoate catabolism
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Benzoate transport and degradation cluster	Benzoate-CoA ligase (EC 6.2.1.25)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Benzoate transport and degradation cluster	P-hydroxylaminobenzoate lyase
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Benzoate transport and degradation cluster	Shikimate kinase I (EC 2.7.1.71)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Benzoate transport and degradation cluster	Benzoyl-CoA oxygenase component A

Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Benzoate transport and degradation cluster	Methylglutaconyl-CoA hydratase (EC 4.2.1.18)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Benzoate transport and degradation cluster	Benzoate transport related protein
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Benzoate transport and degradation cluster	benzoate degradation ring-cleavage hydrolase
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Benzoate transport and degradation cluster	Benzoate transport, inner-membrane translocator
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Benzoate transport and degradation cluster	2-oxo-hepta-3-ene-1,7-dioic acid hydratase (EC 4.2.-.-)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Aromatic Amin Catabolism	3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase (EC 1.13.11.15)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Aromatic Amin Catabolism	Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3), PaaZ
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Aromatic Amin Catabolism	Nitrilotriacetate monooxygenase component B (EC 1.14.13.-)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Aromatic Amin Catabolism	Phenylacetaldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.39)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Gentisate degradation	Maleylacetoacetate isomerase (EC 5.2.1.2)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Gentisate degradation	Gentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.4)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Gentisate degradation	putative 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Gentisate degradation	Fumarylacetoacetate hydrolase family protein
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Gentisate degradation	Putative n-hydroxybenzoate hydroxylase
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Chloroaromatic degradation pathway	Beta-ketoadipyl CoA thiolase (EC 2.3.1.-)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Chloroaromatic degradation pathway	3-oxoadipate CoA-transferase subunit B (EC 2.8.3.6)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Chloroaromatic degradation pathway	Beta-ketoadipate enol-lactone hydrolase (EC 3.1.1.24)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Chloroaromatic degradation pathway	3-oxoadipate CoA-transferase subunit A (EC 2.8.3.6)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Salicylate ester degradation	salicylate esterase
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Salicylate ester degradation	Salicylate hydroxylase (EC 1.14.13.1)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Benzoate degradation	benzoate MFS transporter BenK
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Benzoate degradation	Ortho-halobenzoate 1,2-dioxygenase beta-ISP protein OhbA

Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Benzoate degradation	Ortho-halobenzoate 1,2-dioxygenase alpha-ISP protein OhbB
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Benzoate degradation	Ring hydroxylating dioxygenase, alpha subunit (EC 1.14.12.13)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Benzoate degradation	Benzoate transport protein
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Quinate degradation	3-dehydroquinate dehydratase II (EC 4.2.1.10)

<i>Pseudomonas</i> Laprot 316			
Category	Subcategory	Subsystem	Role
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Gentisate degradation	Putative n-hydroxybenzoate hydroxylase
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Gentisate degradation	putative 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Gentisate degradation	Maleylacetoacetate isomerase (EC 5.2.1.2)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Gentisate degradation	Fumarylacetoacetate hydrolase family protein
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Gentisate degradation	4-hydroxybenzoate transporter
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Gentisate degradation	Gentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.4)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Aromatic Amin Catabolism	4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase, reductase component (EC 1.6.8.-)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic	Aromatic Amin Catabolism	Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3), PaaZ

	Compounds - no subcategory		
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory	Aromatic Amin Catabolism	Nitrilotriacetate monooxygenase component B (EC 1.14.13.-)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit B (EC 2.8.3.5)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	Protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha chain (EC 1.13.11.3)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	4-carboxymuconolactone decarboxylase (EC 4.1.1.44)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	Pca regulon regulatory protein PcaR
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	3-oxoadipate CoA-transferase subunit A (EC 2.8.3.6)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	Protocatechuate 3,4-dioxygenase beta chain (EC 1.13.11.3)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	Beta-ketoadipate enol-lactone hydrolase (EC 3.1.1.24)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit A (EC 2.8.3.5)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	Beta-ketoadipyl CoA thiolase (EC 2.3.1.-)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	PhaK-like protein

Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase (EC 5.5.1.2)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	3-oxoadipate CoA-transferase subunit B (EC 2.8.3.6)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	dicarboxylic acid transporter PcaT
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Central meta-cleavage pathway of aromatic compound degradation	2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate hydrolase (EC 3.7.1.-)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Central meta-cleavage pathway of aromatic compound degradation	Acetaldehyde dehydrogenase, acetylating, (EC 1.2.1.10) in gene cluster for degradation of phenols, cresols, catechol
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Central meta-cleavage pathway of aromatic compound degradation	4-oxalocrotonate tautomerase (EC 5.3.2.-)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Central meta-cleavage pathway of aromatic compound degradation	5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate delta-isomerase (EC 5.3.3.10)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Central meta-cleavage pathway of aromatic compound degradation	2-polyprenylphenol hydroxylase and related flavodoxin oxidoreductases
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	N-heterocyclic aromatic compound degradation	Isoquinoline 1-oxidoreductase beta subunit (EC 1.3.99.16)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	N-heterocyclic aromatic compound degradation	Isoquinoline 1-oxidoreductase alpha subunit (EC 1.3.99.16)

Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Homogentisate pathway of aromatic compound degradation	Aromatic-amino-acid aminotransferase (EC 2.6.1.57)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Homogentisate pathway of aromatic compound degradation	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (EC 1.13.11.27)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Homogentisate pathway of aromatic compound degradation	Homogentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.5)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Homogentisate pathway of aromatic compound degradation	Transcriptional regulator, lclR family
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Homogentisate pathway of aromatic compound degradation	Maleylacetoacetate isomerase (EC 5.2.1.2)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Homogentisate pathway of aromatic compound degradation	Fumarylacetoacetase (EC 3.7.1.2)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Salicylate and gentisate catabolism	Gentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.4)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Salicylate and gentisate catabolism	Maleylacetoacetate isomerase (EC 5.2.1.2)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Salicylate and gentisate catabolism	Fumarylacetoacetase (EC 3.7.1.2)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Salicylate and gentisate catabolism	Putative n-hydroxybenzoate hydroxylase
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Salicylate and gentisate catabolism	4-hydroxybenzoate transporter

Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Salicylate and gentisate catabolism	Fumarylacetoacetate hydrolase family protein
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Salicylate and gentisate catabolism	salicylate esterase
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Salicylate and gentisate catabolism	Salicylate hydroxylase (EC 1.14.13.1)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	Muconate cycloisomerase (EC 5.5.1.1)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	3-oxoadipate CoA-transferase subunit A (EC 2.8.3.6)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	Beta-ketoadipate enol-lactone hydrolase (EC 3.1.1.24)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	3-oxoadipate CoA-transferase subunit B (EC 2.8.3.6)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit A (EC 2.8.3.5)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit B (EC 2.8.3.5)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	Catechol 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.1)
Metabolism of Aromatic Compounds	Metabolism of central aromatic intermediates	Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	Muconolactone isomerase (EC 5.3.3.4)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Salicylate ester degradation	salicylate esterase

Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Salicylate ester degradation	Salicylate hydroxylase (EC 1.14.13.1)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Quinate degradation	3-dehydroquinate dehydratase II (EC 4.2.1.10)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Quinate degradation	Quinate/shikimate dehydrogenase [Pyrroloquinoline-quinone] (EC 1.1.99.25)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Chloroaromatic degradation pathway	3-oxoadipate CoA-transferase subunit B (EC 2.8.3.6)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Chloroaromatic degradation pathway	Beta-ketoadipyl CoA thiolase (EC 2.3.1.-)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Chloroaromatic degradation pathway	3-oxoadipate CoA-transferase subunit A (EC 2.8.3.6)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Chloroaromatic degradation pathway	Beta-ketoadipate enol-lactone hydrolase (EC 3.1.1.24)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	p-Hydroxybenzoate degradation	P-hydroxybenzoate hydroxylase (EC 1.14.13.2)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	p-Hydroxybenzoate degradation	4-hydroxybenzoate transporter

Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Benzoate degradation	benzoate-specific porin
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Benzoate degradation	Benzoate transport protein
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Benzoate degradation	Benzoate 1,2-dioxygenase, ferredoxin reductase component
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Benzoate degradation	benABC operon transcriptional activator BenR
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Benzoate degradation	1,2-dihydroxycyclohexa-3,5-diene-1-carboxylate dehydrogenase (EC 1.3.1.25)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Benzoate degradation	Benzoate 1,2-dioxygenase alpha subunit (EC 1.14.12.10)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	Benzoate degradation	Benzoate 1,2-dioxygenase beta subunit (EC 1.14.12.10)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	n-Phenylalkanoic acid degradation	3-ketoacyl-CoA thiolase (EC 2.3.1.16)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	n-Phenylalkanoic acid degradation	3-hydroxybutyryl-CoA epimerase (EC 5.1.2.3)

Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	n-Phenylalkanoic acid degradation	Enoyl-CoA hydratase (EC 4.2.1.17)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	n-Phenylalkanoic acid degradation	Delta(3)-cis-delta(2)-trans-enoyl-CoA isomerase (EC 5.3.3.8)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	n-Phenylalkanoic acid degradation	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase (EC 6.2.1.3)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	n-Phenylalkanoic acid degradation	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (EC 1.1.1.35)
Metabolism of Aromatic Compounds	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds	n-Phenylalkanoic acid degradation	enoyl-CoA hydratase, R-specific