

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**PROTEÍNAS DE *Bacillus pumilus* ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO
DE PETRÓLEO E DIESEL**

JEFFERSON FERREIRA DOS SANTOS

**Manaus – AM
2014**

**PROTEÍNAS DE *Bacillus pumilus* ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO
DE PETRÓLEO E DIESEL**

JEFFERSON FERREIRA DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGBiotec da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, como requisito para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Edmar Vaz de Andrade

**Manaus – AM
2014**

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo.

À Minha Família, pelo apoio e colaboração

Ao Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade, orientador e amigo, pela infinita paciência e sabedoria, sem o qual esse trabalho certamente não teria sido concluído.

Ao Prof. Dr. José Odair, pela espécie bacteriana disponibilizada para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho, pelo apoio junto ao CBA.

Aos Amigos Anita Souza, Júlio Neto, Maurício Leite e Dina, pela amizade e colaboração.

À Karol, pela ajuda em Espectrometria de Massas

E as instituições:

CNPq, Pela Bolsa de Mestrado.

CBA, pelo uso do equipamento de Espectrometria de Massas

UFAM, pela oportunidade em cursar um programa de Pós-Graduação e por toda a estrutura laboratorial disponibilizada por intermédio do Centro de Apoio Multidisciplinar – CAM.

DEICATÓRIA

Esse trabalho é dedicado ao meu pai e minha mãe, que não mediram esforços para que eu pudesse ter uma melhor educação.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação do petróleo de acordo com o teor de enxofre e grau API.....	14
Tabela 2. Composição total de hidrocarbonetos do petróleo.....	16
Tabela 3: Espécies dos gêneros <i>Pseudomonas</i> e <i>Bacillus</i> envolvidos de degradação de compostos de petróleo e diesel.....	34
Tabela 4. Espécies bacterianas identificadas por sequenciamento do gene responsável pela região de 16S do rRNA.....	40
Tabela 5. Comparação entre o crescimento de <i>B. pumilus</i> em petróleo, diesel e extrato de levedura.....	48
Tabela 6. Rendimento médio de proteína de <i>B. pumilus</i> em cada condição.....	55
Tabela 7. Níveis de similaridades apresentado pelas comparações entre os perfis de <i>B. pumilus</i>	61
Tabela 8. Identificação dos <i>spots</i> selecionados para espectrometria de massas.....	62
Tabela 9. Proteínas identificadas por Espectrometria de Massas.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação dos hidrocarbonetos.....	15
Figura 2. Casos de acidentes envolvendo derramamentos de petróleo.....	20
Figura 3. Transporte do Petróleo de Urucu até de Manaus.....	24
Figura 4: Perfil de crescimento de <i>B. pumilus</i>	52
Figura 5. Comparação entre a biomassa bacteriana produzida na diferentes fontes de carbono e o rendimento protéico obtido.....	56
Figura 6: Perfis proteômicos validados para <i>B. pumilus</i>	58
Figura 7. Comparação dos perfis de <i>B. pumilus</i> entre as diferentes fontes de carbono.....	60
Figura 8. <i>Spots</i> selecionados para Espectrometria de massas.....	63
Figura 9. Porcentagem de proteínas identificadas em cada classe.....	68
Figura 10. Modelo para desmontagem Complexo Pós-Terminação.....	70
Figura 11. Formação de ligações dissulfeto em proteínas.....	71
Figura 12. Reação promovida pela enzima <i>Methylated-DNA--protein-cysteine methyltransferase</i>	72
Figura 13. Transferência do grupo glicosídico por inversão ou retenção da estereoquímica anomérica em relação ao dador de açúcar.....	74
Figura 14: Degradação redutiva de corantes azo por azoredutases.....	77
Figura 15. Arquitetura molecular de transportadores ABC.....	81
Figura 16. Modelo esquemático da via secreção pós-traducional de proteínas em <i>Escherichia coli</i>	82
Figura 17. Representação esquemática de uma ATP sintase bacteriana.....	83
Figura 18. Mecanismo de ação das oxigenase na degradação de compostos aromáticos.....	86
Figura 19. Interconexões de vias metabólicas em <i>B. pumilus</i>	89
Figura 20. Proteína envolvidas na Resposta SOS em <i>B. pumilus</i> quando cultivo em xenobióticos.....	91

RESUMO

O consumo cada vez crescente dos combustíveis fósseis coloca o petróleo como um dos mais importantes produtos do consumo humano. Inegáveis avanços tecnológicos e até mesmo sociais são advindos da era “Pós-Petróleo”. Porém, esse consumo desenfreado tem gerado graves danos ambientais aos ecossistemas aquáticos e também terrestres. Alternativas viáveis capazes de promover a recuperação de áreas afetadas por esses compostos são sem dúvida de extrema importância diante do cenário atual. A biorremediação tem se mostrado bastante promissora nessa área. E cada vez mais novas tecnologia são agregadas a esse campo de investigação na tentativa de obter resultados mais conclusivos, melhorado assim, o entendimento global de como os microorganismos interagem na promoção da biorremediação. É justamente isso o que foi proposto nesse trabalho. O emprego da espectrometria (MS) de massa para identificação de proteínas de bactéria com capacidade de crescimento em xenobióticos. Inicialmente foi selecionada nas proximidades da Refinaria Isaac Sabbá (REMAN) a espécie *B. pumilus*, com potencial capacidade de crescer em petróleo e diesel. Após a realização de testes usando petróleo e diesel, separadamente, com fontes únicas de carbono, foi comprovada a capacidade de crescimento da espécie nesses xenobióticos. Melhor crescimento/produção de biomassa foi registrado nos cultivos tendo o diesel como fonte de carbono, bem como o melhor rendimento protéico. O perfil proteômico em petróleo, diesel e extrato de levedura foi determinado. As comparações entre tais perfis demonstrou diferenças bastante acentuadas entre eles. Para análise via espectrometria massas foram selecionados 96 spots de *B. pumilus* e identificados por *Peptide Mass Fingerprint* (PMF). Desse total de spots, 54 proteínas foram identificadas. Algumas delas com potencial envolvimento nos processos diretos de biorremediação apresentada por *B. pumilus*. Porém, mais estudos são necessário para efetiva comprovação dessas proteínas nas vias de degradação de xenobióticos.

Palavras-chave: *B. pumilus*; Biorremediação; Espectrometria de massas.

ABSTRACT

The ever increasing consumption of fossil fuels puts oil as one of the most important products of human consumption. Undeniable technological and even social breakthroughs are coming era of "post-oil" . But this unbridled consumption has led to serious environmental aquatic ecosystems and land damage. Viable alternatives that promote the recovery of areas affected by these compounds are undoubtedly of utmost importance given the current scenario. Bioremediation has proven very promising in this area . And increasingly, new technology are aggregated to this field of research in an attempt to obtain more conclusive results, thus improving the overall understanding of how microorganisms interact in promoting bioremediation. This is precisely what has been proposed in this work. The use of Mass Spectrometry (MS) for identification of proteins of bacteria capable of growth in xenobiotics. Initially was selected near the Refinaria Isaac Sabbá (REMAN) species *B. pumilus*, with the potential ability to grow in petroleum and diesel. After conducting tests using oil and diesel separately with unique carbon sources, was proven capacity for growth of the species in these xenobiotics. Better growth/biomass production was recorded in crops having diesel as finite carbon, as well as the best protein yield. The proteomic profile in petroleum, diesel and yeast extract was determined. Comparisons between these profiles showed very marked difference between them. For analysis via mass spectrometry were selected 96 spots of *B. pumilus* were selected and identified by Peptide Mass Fingerprint (PMF) . Of this total 54 protein spots were identified. Some with potential involvement in direct bioremediation processes by *B. pumilus*. However, further studies are necessary to effective proof of proteins in the pathways of degradation of xenobiotics.

Palavras-chave: *B. pumilus*; Bioremediation; Mass Spectrometry.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	COMPONENTES QUÍMICOS DO PETRÓLEO E DO DIESEL.....	13
2.2	POLUIÇÃO AMBIENTAL CAUSADA POR PETRÓLEO E DIESEL....	18
2.2.1	Contaminação de Solos por Petróleo e seus derivados.....	18
2.2.2	Contaminação de Ambientes aquáticos causados por Petróleo e seus derivados.....	20
2.2.3	Contaminação na Amazônia causados por Petróleo e seus derivados.....	22
2.3	DESPOLUIÇÃO DE PETRÓLEO E DIESEL.....	25
2.3.1	Biorremediação de Áreas contaminadas por diesel e Petróleo.....	26
2.3.2	Biorremediação por bactérias.....	30
2.3.3	Alguns gêneros de Bactérias envolvidas na degradação de petróleo e diesel.....	32
2.4	ESPECTROMETRIA DE MASSAS APLICADA A PROTEÔMICA.....	35
3.	OBJETIVOS.....	39
3.1	OBJETIVO GERAL	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	40
4.1.1	Coleta de espécies bacterianas com capacidade de biodegradação de petróleo.....	40
4.2	ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO DE PETROLEO E DIESEL.....	41
4.2.1	Pré-cultivos de <i>B. pumilus</i>	41
4.2.2	Ensaio de Biodegradação de Petróleo e diesel em escala piloto.....	41
4.2.3	Ensaio de Degradação de Petróleo e Diesel e Curva de Crescimento Bacteriano.....	42
4.3	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	42
4.3.1	Extração de Proteínas Totais.....	42
4.3.2	Quantificação de Extrato Protéico.....	43
4.4	ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D-PAGE).....	43
4.4.1	Isoeletrofocalização.....	43
4.4.2	Equilíbrio das Tiras de IPG.....	44
4.4.3	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de SDS (SDS-PAGE).....	44

4.5	FIXAÇÃO, COLORAÇÃO, DIGITALIZAÇÃO E ANÁLISE COMPUTACIONAL DOS GÉIS SDS-PAGE.....	45
4.6	ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	45
4.6.1	Seleção do <i>Spots</i>	45
4.6.2	Preparo das Amostras.....	46
4.6.3	Obtenção dos Espectros de Massa e Fragmentação de Peptídeos.....	47
4.6.4	Análise dos Espectros de Massa e Identificação das proteínas.....	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1.	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE BIORREMEDIAÇÃO DE <i>B. pumilus</i>	48
5.2.	PERFIL DE CRESCIMENTO DE <i>B. pumilus</i>	51
5.3.	RENDIMENTO PROTÉICO.....	55
5.4.	PERFIL PROTEÔMICO (2D-PAGE) DE <i>B. pumilus</i> CULTIVADO EM XENOBIÓTICOS E EM EXTRATO DE LEVEDURA	57
5.4.1	Comparação entre os perfis proteômicos de <i>B. pumilus</i>	59
5.5.	ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA <i>B. pumilus</i>	62
5.5.1	<i>Spots</i> Seleccionados.....	62
5.5.2	Proteínas Identificadas para <i>B. pumilus</i> na diferentes fontes de carbono.....	64
5.5.2.1	<i>Biossíntese de Proteínas</i>	68
5.5.2.2	<i>Manutenção e reparo do DNA</i>	71
5.5.2.3	<i>Formação de Biofilme e Revestimento Celular</i>	73
5.5.2.4	<i>Reguladores de Transcrição</i>	75
5.5.2.5	<i>Transcrição gênica</i>	76
5.5.2.6	<i>Degradação de Xenobióticos</i>	76
5.5.2.7	<i>Esporulação e Resposta a estresse</i>	79
5.5.2.8	<i>Transporte</i>	80
5.5.2.9	<i>Peptidases</i>	82
5.5.2.10	<i>Metabolismo Energético e Biossíntese da ATP</i>	82
5.5.2.11	<i>Biossíntese de aminoácidos e Nucleotídeos</i>	84
5.5.2.12	<i>Outras funções</i>	85
5.5.3	Proteínas relacionadas a capacidade de Biorremediação em <i>B. pumilus</i>	85
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	92
7.	REFERÊNCIAS.....	93

1. INTRODUÇÃO

O consumo cada vez mais elevado de petróleo e seus derivados têm provocado poluição e distúrbios ambientais também cada vez mais crescentes no mundo todo. Relatos dão conta de que nos últimos 40 anos quase 6 milhões de toneladas de óleo bruto ou derivados de petróleo foram derramados nos ecossistemas marinhos, sem contar com os derrames em terra firme. Por ser uma mistura bastante complexa que envolve mais de 600 tipos de hidrocarbonetos, além é claro de se tratar de uma mistura oleosa, a retirada desse material do solo e da água é uma tarefa muito difícil. Alguns deles de fácil remoção, sendo até voláteis, outros, porém, são mais difíceis de serem removidos e persistem por bastante tempo no ambiente. A presença de certos compostos de petróleo no solo ou na água tem efeito tóxico a esses ecossistemas e também aos seres humanos, sendo alguns deles até cancerígenos.

A presença de uma área de exploração e de refinarias de petróleo na Amazônia, embora necessárias, geram risco de poluição ambiental para os ecossistemas amazônicos. Ainda mais quando levamos em conta que o transporte do petróleo produzido na Província Petrolífera de Urucu no município de Coari é feita através do rio Solimões até a refinaria em Manaus. Nenhum incidente de grandes proporções aconteceu, porém relatos de envolvendo o acidentes com embarcações de pequeno e médio porte são mais frequentes. Nesses casos o combustível armazenado para o transporte acaba indo parar nos rios da região.

Processos relacionados ao tratamento de áreas afetadas pelo petróleo estão constantemente sendo avaliados e testados. Uma técnica que se mostra bastante promissora nessa área é a biorremediação, que emprega o uso de microorganismos aos processos de eliminação desses compostos. Diversos são os microorganismos capazes de proverem a biorremediação dos compostos de petróleo. Especial atenção tem sido dada aos fungos filamentosos e as bactérias. Vários são os gêneros de bactérias que se destacam nessa área, entre eles os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*. Ambos com algumas espécies com reconhecida capacidade de biorremediação.

Avanços cada vez mais significativos nos processos de biorremediação vêm sendo observados ao longo dos anos. O emprego de técnicas modernas de biologia

molecular a essa área, é um importante fator impulsionador desses avanços. Entre essas técnicas, as relacionadas a área de proteômica tem sido empregadas com bastante sucesso na determinação de via, rotas, ou processo metabólicos associados a degradação de xenobióticos de petróleo.

É justamente isso o que foi proposto neste trabalho, o emprego de técnicas proteômicas na determinação de enzimas envolvidas ou relacionadas a biodegradação do petróleo e também do diesel.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. COMPONENTES QUÍMICOS DO PETRÓLEO E DO DIESEL

O petróleo ocorre de forma natural, sendo formado por uma grande quantidade de compostos de origem orgânica e inorgânica, que por sua vez contribuem para torná-lo uma mistura complexa. Diversas são as teorias relacionadas a sua origem, contudo, a que possui maior aceitação é a teoria orgânica. Segundo essa teoria, organismos de tamanho microscópico constituintes do plâncton são sedimentados no fundo dos mares em camadas superpostas, que em um ambiente sem oxigênio fica sujeito a ação bactérias anaeróbicas. Carboidratos e proteínas são transformados, por essas bactérias, em substâncias gasosas solúveis em água e em um resíduo formado por gorduras e compostos estáveis lipossolúveis, como resinas, colesterol, etc., conhecido como sapropel. Esse resíduo é transformado em hidrocarbonetos líquidos e gasosos pela ação das bactérias após enormes períodos de tempo, associado à pressão e temperatura, bem como a catálise promovida pela argila, gerando assim aquilo que conhecemos como petróleo (Corrêa, 2003).

As características físicas do petróleo variam bastante, podendo ser escuros, densos e viscosos, com pouco gás, à tonalidades mais claras, com baixa densidade e viscosidade, com quantidade expressiva de gás. Apresentam ainda consistência oleosa e cheiro desagradável (Martins, 2005).

O tipo de hidrocarboneto encontrado em maior quantidade na mistura, a densidade do óleo e também a quantidade de enxofre presente são as principais características que servem para diferenciar os “tipos” de petróleo (Martins, 2005). Em relação a densidade, o petróleo pode ser classificado segundo uma gradação que vai de leve (menos densos) a pesado (mais densos). Essa classificação baseia-se nas normas do *American Petroleum Institute*, e, portanto recebe o nome de “grau API”. Nessa classificação a densidade é inversamente proporcional ao grau API, ou seja, quanto maior for a densidade do petróleo, menor será o seu grau API. São considerados leves os que apresentam API maior que 31°, médios os que apresentam API entre 24° a 31°, entre 23° a 10° API são considerados pesados e abaixo de 10° API estão os petróleos extrapesados. Óleos mais leves são formados em sua grande maioria por hidrocarbonetos alifáticos e, aqueles que apresentam

constituição em maior abundância de hidrocarbonetos aromáticos são mais densos (Peters e Moldowan, 1993). A classificação de densidade influencia diretamente o valor comercial do petróleo. Quanto menor o grau API menor o preço, isso por que óleos mais densos são incapazes de produzir derivados nobres, de elevado valor comercial, como a gasolina, o diesel e o GLP (Tavares, 2005)

A quantidade de enxofre presente no petróleo é usada para classificar como doce ou ácido. Quantidades maiores que 0,5% de enxofre classifica-os como ácidos e também reduzem seu valor comercial. Isso por que teores mais elevados de enxofre tornam o petróleo mais corrosivo e tóxico, e isso promove maiores gastos às refinarias durante o processo de obtenção dos derivados do petróleo (Martins, 2002).

O petróleo pode ainda ser classificado de acordo com o teor de enxofre e do grau API (Tabela 1). As características do petróleo influenciam diretamente na escolha das técnicas que serão empregadas para seu refino e quais serão os produtos que melhor poderão ser obtidos de um dado petróleo (Tavares, 2005).

Tabela 1. Classificação do petróleo de acordo com o teor de Enxofre e grau API (Tavares, 2005).

Categoria	% Enxofre	Grau API
Leve com baixo teor de enxofre	0 – 0,5	> 31
Pesado com médio teor de enxofre	0,35 – 1,1	> 24
Leve com elevado teor de enxofre	> 1,1	> 31
Médio com elevado teor de enxofre	> 1,1	24 – 31
Extrapesado como elevado teor de enxofre	> 0,7	0 - 23

A porcentagem de carbono varia entre 82 e 87% em quase todo tipo de petróleo, já o hidrogênio varia de 12 a 15%, independentemente das variações físicas ou químicas do óleo (Pedroti, 2007). O petróleo apresenta ainda, em menores proporções, nitrogênio e oxigênio além dos átomos de carbono e de hidrogênio (Solomons, 1996). Esses quatro elementos juntos formam mais de 600 compostos de hidrocarbonetos presentes no petróleo (Fetter, 1993), variando em composição e em complexidade.

Os hidrocarbonetos são basicamente divididos em dois grupos, os alifáticos e os aromáticos. Sendo constituídos basicamente por átomos de carbono e hidrogênio,

esses se encontram arranjados em vários tipos de configurações estruturais formando os mais variados compostos. O chamado THP (*Total Petroleum Hydrocarbons*) é o conjunto de todos os hidrocarbonetos que estão presentes em uma amostra de petróleo ou de seus derivados, considerando-se a soma dos compostos alifáticos e aromáticos (Weisman, 1998). Segundo Potter e Simmons (1998) os hidrocarbonetos alifáticos estão divididos em quatro classes: alcanos, alcenos, alcinos e cicloalcanos. Por sua vez, hidrocarbonetos aromáticos, estão divididos em monoaromáticos e poliaromáticos (Figura 1).

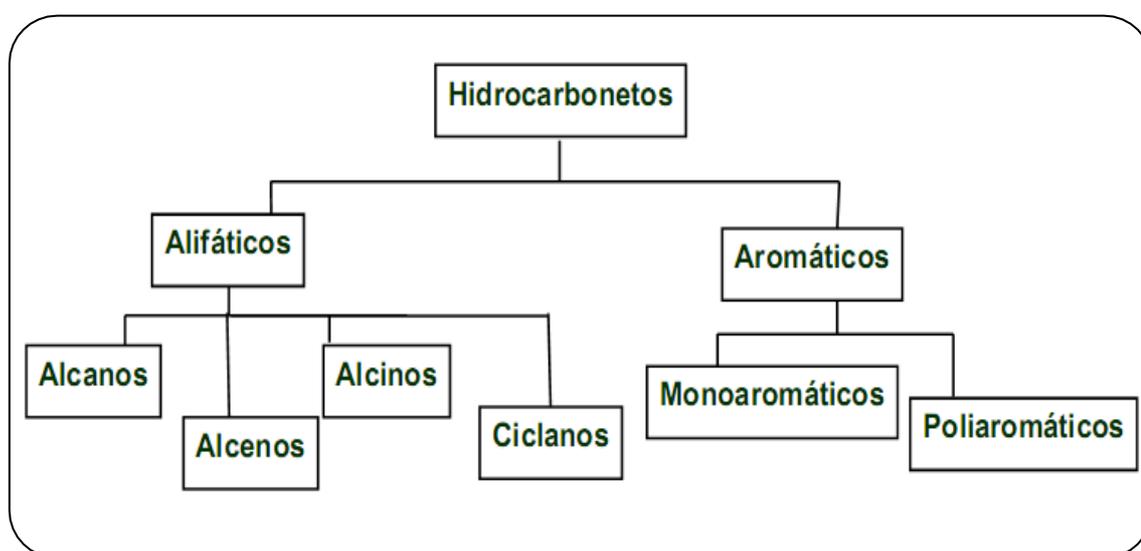


Figura 1: Classificação dos hidrocarbonetos (Potter e Simmons, 1998).

Os alcanos constituem a maior porção dos compostos presentes no petróleo (52%) (Tabela 2). Em segundo lugar aparecem os hidrocarbonetos aromáticos (24%), seguidos pelos compostos nitrogenados. Compostos oxigenados e sulfurados somam 16% de todos os compostos presentes e finalmente os asfaltenos, que somam 8%, formam a fração mais densa dos hidrocarbonetos de petróleo (Hadibarata e Tachibana, 2009).

Tabela 2. Composição total de hidrocarbonetos do petróleo (Hadibarata e Tachibana, 2009).

Fração	Porcentagem (%)
Alcanos	52
Aromáticos	24
NSO*	16
Asfalteno	8

*Compostos Nitrogenados, Sulfurados e Oxigenados

Alcanos formam cadeias com ligações simples sendo estas homogêneas e saturadas. Dependendo da quantidade de átomos de carbono presente nestas cadeias os alcanos podem estar na forma gasosa, líquida ou sólida. Contendo de 1 a 4 átomos de carbono são gases (metano, etano, propano e butano), os que apresentam entre 5 e 20 carbonos são líquidos e os que possuem mais de 20 carbonos são sólidos. Os alcenos possuem ligações duplas e os alcinos possuem pelo menos uma ligação tripla. Os hidrocarbonetos aromáticos são formados por anéis benzênicos. Os monoaromáticos presentes no petróleo que mais se destacam são o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno, que são chamados BTEXs (Andrade *et al.*, 2010). Estes não formam concentrações abundantes na maioria dos óleos brutos. Em sua maior proporção são produzidos durante o processo de destilação e são associados aos produtos do refino, como a gasolina, o querosene e o óleo diesel. Os que possuem em sua estrutura dois ou mais anéis benzênicos são chamados de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH), sendo estes considerados os componentes mais tóxicos do petróleo e estando associados a efeitos carcinogênicos. Outro agravante em relação aos PAHs é que, por possuírem baixo peso molecular, são bastante solúveis em água, o que contribui para aumentar o risco de contaminações (Andrade *et al.*, 2010).

Entre os derivados de petróleo o óleo diesel é amplamente utilizado em tratores, caminhões e equipamentos usados em mineração e dragagem, ou seja, é o mais usado em veículos de elevada potência (Braun *et al.*, 2003). Os hidrocarbonetos constituintes do óleo diesel são em sua maioria os saturados e os aromáticos, que são destilados em temperaturas que variam de 130 a 380°C (Menezes *et al.*, 2006). A variação na quantidade de hidrocarbonetos neste tipo de

combustível depende de dois fatores: processo de estocagem e do esquema de processamento do combustível. Porém, a temperatura influencia diretamente esses dois fatores, uma vez que, durante o processo de estocagem, dependendo da época do ano, as refinarias incluem um teor maior de componentes com elevada faixa de temperatura de ebulição (estações mais quentes) diminuindo nesse caso a probabilidade de incêndios acidentais. E quando as estações do ano proporcionam temperaturas mais frias o teor de compostos com baixa faixa de temperatura de ebulição são aumentados, já que risco de incêndio provocado pelo excessivo calor do ambiente é quase zero (Speight, 2006).

Dentre os hidrocarbonetos saturados presentes no óleo diesel os alcanos de 10 a 20 os átomos de carbono são os majoritários. Contudo, aparecem ainda nessa mistura cicloalcanos alquilados, tais como os alquilociclohexanos, os decahidronaftalenos e os perhidrofenantrenos, e também compostos naftênicos, cujo teor depende diretamente da quantidade desse composto no óleo cru e das misturas estocadas, e ainda os fatores envolvidos no processamento do óleo diesel (Speight, 2006).

Os alquilbenzenos, acenafthenos, fenantrenos, pirenos, naftalenos, tetralenos, bifeníis, indanos e crisenos representam os compostos aromáticos de maior proporção na constituição do óleo diesel (Speight, 2006), e entre estes os de maiores proporções são os diaromáticos que apresentam estrutura do tipo naftaleno. Além dos hidrocarbonetos, existem em menor quantidade compostos sulfurados, nitrogenados e oxigenados. Os compostos sulfurados presentes no diesel são de elevado peso molecular e suas estruturas apresentam um número maior de anéis aromáticos do que aqueles presentes na gasolina. Entre os compostos nitrogenados presentes temos as classes dos indóis, carbazóis, quinolinas, acridinas e fenantridinas. Os fenóis alquilados e os dibenzofuranos representam os compostos oxigenados presentes no óleo diesel (Speight, 2006).

A destilação do petróleo bruto é o principal processo na obtenção do óleo diesel. Por esse processo o petróleo é separado em GLP (gás liquefeito de petróleo), naftas, querosene de aviação, óleo diesel, gasóleo pesado e resíduo de vácuo. O processo de obtenção do óleo diesel é um tanto complexo, sendo que sua formulação é realizada por meio da mistura de diversas frações provenientes das etapas de destilação do petróleo bruto. As proporções destes componentes são

ajustadas de modo que o produto final esteja adequado as especificações legais de modo a garantir um bom desempenho dos motores (Goberstein, 2007).

2.2. POLUIÇÃO AMBIENTAL CAUSADA POR PETRÓLEO E DIESEL

A introdução no meio ambiente, de matéria ou outros elementos que promovam alterações em suas propriedades físicas, químicas ou biológicas, prejudicando ou simplesmente colocando em risco a "saúde" e a viabilidade da fauna e flora que interajam ou dependam dele, é entendido como poluição. A contaminação, por sua vez, ocorre quando a poluição resulta em prejuízos à saúde humana. Entre as principais fontes de contaminação do solo e das águas subterrâneas podem-se citar os vazamentos em dutos e tanques de armazenamentos subterrâneos de combustível ou mesmo derramamentos diretos do óleo bruto, atividades de mineração e uso de defensivos agrícolas (Alaburda e Nishihara, 1998).

2.2.1. Contaminação de Solos por Petróleo e seus derivados

Ao longo dos anos, o petróleo tem sido imposto como uma das principais fontes de energia, tanto que ele está entre os principais compostos orgânicos que, nos últimos decênios, têm sofrido aumento na sua produção e industrialização. Tudo isso graças ao advento da petroquímica, que além de produzir combustível, passou a ser imprescindível às facilidades e comodidades da vida moderna, assumindo uma importância cada vez maior na vida das pessoas. Do lençol de fibra sintética aos combustíveis, do plástico da escova de dente a goma de mascar, ele se faz presente no dia a dia em diversos momentos, sendo o componente básico de mais de seis mil produtos (Abadie, 1984). Se por um lado temos a exploração necessária do petróleo, por outro lado temos a crescente necessidade de manter o meio ambiente preservado. Essa questão polêmica constantemente é tema de discussões entre ambientalistas e a indústria petrolífera.

Além dos impactos ambientais causados pelos derrames de óleo bruto em terra firme durante o processo de exploração, transporte e refino, a comercialização dos produtos refinados (essencialmente os combustíveis) tem um papel também importante nesse cenário. Esses produtos oferecem riscos de contaminação dos solos pela forma como são distribuídos ao consumidor e como são armazenados. O

fato se agrava mais ainda se for levado em conta que a partir da década de 70, impulsionados pelo desenvolvimento econômico e mudanças sociais do país, houve um crescimento quase que exponencial do número de postos revendedores de combustíveis ou postos de gasolina. O vazamento de combustíveis dos tanques de armazenamento pode ocorrer devido a uma série de fatores, como um derramamento durante a operação de transferência de produto para o tanque; vazamentos no sistema devido à corrosão; falhas estruturais do tanque ou da tubulação conectada ao tanque ou então devido à instalação inadequada dos mesmos (Guedes *et al.*, 2010).

Um dos grandes problemas relacionado a questão da poluição por petróleo sem dúvida é a grande quantidade de produtos e substâncias químicas que são lançadas nos solos, águas subterrâneas, águas superficiais e ar (Seabra, 2001). A poluição do solo por petróleo remete à presença de substâncias tóxicas de classes químicas tais como VOC (*Volatile Organic Compounds*), hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos como BTX, óleos pesados, subprodutos do craqueamento dos derivados petroquímicos, elementos radionucleotídeos, metais pesados, solventes e compostos clorados, PAH, fenóis, ésteres, álcoois e produtos intermediários da indústria petroquímica. Todos esses compostos podem alterar de forma negativa a qualidade dos solos, podendo ainda afetar a vegetação que dele depende e ainda a qualidade de águas subterrâneas, o que pode representar diretamente risco para a saúde das pessoas que delas fazem uso (Rodriguez *et al.*, 2012).

As plantas sofrem com a contaminação, seja pelo contato direto, que veda a entrada dos estômatos, impedindo a respiração e a fotossíntese, essencial para elas, ou ainda pelo contato através do solo, que pode bloquear a absorção de nutrientes pelas raízes. Já os seres humanos e outros animais também sofrem com a ação desses poluentes, uma vez que eles não possuem enzimas que sejam capazes de promover a decomposição desses compostos. Se a ingestão ocorrer ela impedirá a absorção dos alimentos pelas mucosas do aparelho digestivo, sem contar que existem substâncias que são extremamente tóxicas ao organismo (Fellenberg, 1980).

Uma das principais preocupações relacionadas aos derrames de petróleo e combustíveis em terra firme é justamente a contaminação dos aquíferos e reservatórios de águas subterrâneas que são utilizados como fonte de abastecimento de água para consumo humano. O combustível que é derramado no solo, contendo centenas de compostos, em pouco tempo chega ao subsolo e se

apresenta como líquido de fase não aquosa (NAPL), isso em razão de sua baixa solubilidade em água. Ao entrarem em contato com a água, os compostos BTEXs irão sofrer um processo de dissolução parcial, atingindo assim todo o lençol freático e como consequência causa graves danos a saúde humana (Silva *et al.*, 2002).

2.2.2. Contaminação de Ambientes aquáticos causados por Petróleo e seus derivados

Do início da década de 1970 até o final de 2013, aproximadamente 10 mil acidentes envolvendo petróleo foram registrados pela Federação Internacional dos Proprietários de Navios Poluidores (ITOPF - *The International Tanker Owners Pollution Federation Limited*), que ocasionaram derramamento de aproximadamente 5,74 milhões de toneladas de petróleo e derivados em ecossistemas marinhos (Itopf, 2009). Apesar das evidências de que o número de derrames tem diminuído nas últimas décadas (Burgherr, 2007; Itopf, 2009), ainda são registrados alguns incidentes de grande escala como os que envolveram o navio petroleiro Prestige, na costa espanhola em 2002 (Franco *et al.*, 2006; Martínez-Gómez *et al.*, 2006) e, mais recentemente, o que causou a explosão de uma plataforma de extração de petróleo no Golfo do México em 2010 (Merhi, 2010; Harlow *et al.*, 2011).



Figura 2. Caso de acidentes envolvendo derramamentos de petróleo. A direita: "Mega Borg" derramou 20,5 milhões de galões de petróleo a 60 quilômetros ao sul-sudoeste de Galveston, Texas (EUA), após um acidente durante a transferência para outro navio-tanque de carga e posterior fogo. A esquerda: Em 13-15 julho, o ataque aéreo do Exército israelense na usina Libanês Jiyveh (30 km ao Sul de Beirute), causou vazamento de 15.000 toneladas de óleo bruto para o Mar Mediterrâneo

Existem também registros, nas últimas décadas, de outros vazamentos de subprodutos de petróleo, como gasolina e óleo diesel. Tais registros apontam

problemas em ambientes aquáticos continentais em diferentes países (Dou *et al.*, 1998; Soriano *et al.*, 2006; Katsumiti *et al.*, 2009). Há evidências indicando que em algumas áreas os riscos de derrames são mais acentuados do que em outras áreas do mundo. Isso devido ao aumento do consumo do petróleo e de seus subprodutos nessas áreas (Bowen e Depledge, 2006; Kirby e Law, 2010). Tais riscos estão relacionados, por exemplo, a vazamentos de tanques de armazenamento nos postos de combustíveis, pequenos derrames no processo de carga e descarga desses produtos. Além disso, resíduos da indústria petroquímica e resíduos domésticos derivados de petróleo também se caracterizam como importantes focos de contaminação crônica de rios e outros ecossistemas aquáticos (Pacheco e Santos, 2001; Meniconi *et al.*, 2002).

Nos grandes centros urbanos, em que os níveis de poluição do ar são bastante acentuados, a introdução de compostos derivados do petróleo em ambientes aquáticos pode ser feita, como é o caso dos PAHs de origem pirogênica, através de processos de combustão que acontece no interior de veículos. Estes compostos são acumulados na atmosfera e quando ocorre o processo de precipitação atingem os lagos e rios da região (Veiga, 2003).

Ao entrar em contato com a água, o petróleo se espalha sobre a superfície formando uma fina película impedindo assim a troca de gases entre o ar e a água bem como a chegada de luz aos fitoplânctons e as algas, o que irá afetar diretamente as cadeias alimentares do fundo do mar e dos rios. Os animais aquáticos também sofrem seus efeitos, por exemplo, nos peixes e caranguejos a película de petróleo recobre as guelras e os órgãos respiratórios, o que prejudica a respiração dos mesmos e conseqüentemente provoca sua morte por asfixia (Fellenberg, 1980).

A maioria dos hidrocarbonetos de cadeia curta, incluindo os policíclicos aromáticos (PAH), presentes no petróleo e seus derivados, dado a sua volatilidade, possuem baixo tempo de permanência em ambientes aquáticos (Heath, 1995). Contudo, eles são considerados ainda os principais compostos relacionados a toxicidade do petróleo aos organismos aquáticos (Barron *et al.*, 2004; Hashim, 2010). Em relação a alguns derivados do petróleo, como por exemplo, a gasolina e o diesel, sua toxicidade está relacionada, principalmente, a presença de hidrocarbonetos voláteis monoaromáticos, conhecidos também como BTEX (Barron *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2010). Os hidrocarbonetos de cadeia longa, por sua vez, embora

persistam por mais tempo nesses ambientes, não considerados tão tóxicos quanto os outros mencionados anteriormente (Neff, 1979).

Após o contato do petróleo ou subproduto, como por exemplo o óleo diesel, com a água, três eventos principais acontecem. Primeiramente ocorre o processo de solubilização de compostos polares e de baixo peso molecular. Logo em seguida acontece a evaporação dos componentes voláteis presentes na superfície da água. Paralelamente a esse evento, o óleo derramado se emulsifica na água solubilizando parte do óleo derramado, formando a fração do petróleo solúvel em água ou a mesma fração solúvel de um derivado (Neff, 1985).

A fração do petróleo que se solubiliza ao entrar em contato com água, tornando-se assim biodisponível aos organismos aquáticos é uma mistura bastante complexa de PAH, BTEX, fenóis e compostos heterocíclicos contendo nitrogênio e enxofre (Saeed e Al-Mutairi, 1999; Edema et al., 2007). Aos organismos aquáticos isso pode acarretar vários distúrbios biológicos sérios (Heath, 1995). O contato se dá de forma direta, como por exemplo no caso dos peixes, pelo contato através das brânquias e da pele, ou pelo contato indireto, através da ingestão de alimento contaminado (Barron, 2003). O caso é ainda mais grave quando se trata da contaminação pelos derivados do petróleo. Existem evidências de que as frações solúveis de produtos refinados como a gasolina e o diesel comercial apresentam toxicidade até cinco vezes maior que a apresentada pelo óleo bruto (Rayburn *et al.*, 1996; Rodrigues *et al.*, 2010).

2.2.3. Contaminação na Amazônia causados por Petróleo e seus derivados

Os rios da Amazônia, além de importantes para a economia regional, são a principal via de transporte das populações locais. Dispondo de mais de 18.000 km de rios navegáveis, a Região Hidrográfica Amazônica é a maior do País, e concentra 60% da rede hidroviária nacional (MMA, 2006). No ano de 2012 foram movimentadas cerca de 10,7 bilhões de toneladas de carga por km útil, considerando apenas a Hidrovia do Madeira (5,4 bilhões) e a Hidrovia Solimões-Amazonas (5,3 bilhões), sendo que no trecho Coari-Manaus destaca-se o transporte de produtos químicos orgânicos (ANTAQ, 2012) Em relação a movimentação de pessoas, estima-se que por ano, uma média de 13,6 milhões de passageiros navegam pelos rios amazônicos (ANTAQ, 2013).

Os meios de transporte utilizados na região, por serem movidos por derivados de petróleo são possíveis fontes de contaminação. O risco ambiental está relacionado com possibilidade do combustível armazenado no tanque das máquinas, ou mesmo estocado para reabastecimento, ir parar nos rios e lagos. Dada a grande extensão territorial percorrida por essas embarcações, a quantidade de combustível transportado é da ordem de centenas a milhares de litros. Acidentes na região são pouco relatados, principalmente aqueles envolvendo embarcações de pequeno e médio porte. Segundo estimativas da Capitania Fluvial da Amazônia Ocidental somente nos estados do Amazonas, Acre, Rondônia e Roraima, foram registrados 646 acidentes nos últimos 6 anos (CFAOC, 2013).

A forma como esse combustível vem sendo comercializado às embarcações também oferece riscos de contaminação aos rios e lagos da região. Grandes quantidades do combustível ficam armazenadas em balsas ancoradas nos portos de praticamente todas as cidades da região. Qualquer vazamento, seja ele promovido pela corrosão do metal constituinte das balsas pela água, seja pela ação de outros agentes de risco, trará consequências graves aos ecossistemas locais (Guedes, 2010).

Os riscos de contaminação dos rios da região existem há bastante tempo, porém, foi só com a descoberta de petróleo na província petrolífera de Urucu, na década de 80, que a preocupação com a contaminação dos rios da bacia Amazônia ganhou maior repercussão. Tal província, localizada a cerca de 650 Km de Manaus, a margem esquerda do Rio Solimões, produz aproximadamente 60 mil barris de petróleo por dia. Esse óleo produzido é conduzido por oleoduto até o terminal da cidade de Coari e então transportado por balsas até a refinaria localizada em Manaus (Figura 3). Embora sejam seguidos rígidos protocolos de segurança para prevenir derramamento de óleo, esse tipo de transporte traz, não raras vezes, riscos para o ambiente e acidentes de todas as magnitudes podem ocorrer (Oliveira, 2010).

As consequências do derramamento de petróleo nos ecossistemas amazônicos são pouco conhecidas. Sabe-se, porém, que esse ambientes não estão livres de danos ambientais, e também, a exemplo de outros ecossistemas, não se recompõe facilmente diante de um dano de grandes proporções. Na ocorrência de um derreamento de óleo em rios da Amazônia o vento facilita a dispersão do óleo até as margens dos rios, acabando por contaminar mais de um ambiente. Temos ainda o caso dos ciclos de cheia e seca, que contribuem para que as proporções de

um derramamento sejam ainda ser mais negativas, principalmente durante a cheia, época em que parte da floresta esta submersa (Val, 1997).



Figura 3. Transporte do Petróleo até de Manaus. A – Província Petrolífera de Urucu; B – Terminal Fluvial da Transpetro no Rio Solimões; C- Cidade de Coari; D – Manaus.

Outro aspecto grave relacionado a presença dos compostos de petróleo em ambientes aquáticos, e agravados na região amazônica, é o efeito fotomodificador da radiação solar e ultravioleta. Isso por que a radiação solar nessa região é uma das maiores do planeta (Madronich *et al.*, 1998). Esse efeito está relacionado com a capacidade que os raios UVs têm de acentuar ou induzir efeitos tóxicos de determinados xenobióticos ambientais, incluindo o petróleo e os PAHs. No caso dos PAHs, a exposição a luz UV promove reações de fotossensitização (geração de um único átomo de oxigênio e de superóxidos) e fotomodificação (fotoxidação e/ou fotólises), gerando assim formas mais tóxicas desses compostos. Portanto, muitos dos PAHs podem não ser tóxicos sozinhos, mas revelaram toxicidade acentuada após fotólise ou fotomodificação. Isso foi o que concluiu os diversos estudos que avaliaram a radiação UV como fotomodificadora do petróleo e seus constituintes para organismos aquáticos (Wernersson, 2003; Hähhinen *et al.*, 2004; Choi e Oris, 2003; Barron *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2009).

Os PAHs são geralmente considerados os compostos do petróleo mais tóxicos para os organismos aquáticos. Isso por que muitos deles atuam diretamente

em nível genômico, provocando mutações e até câncer (Basu *et al.*, 2001; Gravato e Santos, 2002). Buscando estimar os principais efeitos da exposição de organismos aquáticos da Amazônia ao petróleo e seus derivados, alguns estudos foram conduzidos. Entre as espécies estudadas, estão o tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Matsuo *et al.*, 2006), o Acara-açu (*Astronotus ocellatus*) (Anjos, 2008), o Acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) e o Tamoatá (*Hoplosternum littorale*) (Brauner *et al.*, 1999), que são espécies tipicamente da Região Amazônica. Tais estudos mostraram que após exposição ao petróleo a capacidade respiratória dessas espécies ficou comprometida, bem como, o equilíbrio iônico e o comportamento.

Há relatos ainda de que peixes expostos ao petróleo e derivados, ou apenas à fração solúvel em água destes agentes, podem ter sua eficiência alimentar diminuída. Observou-se nesse caso aumento no consumo de alimento, porém baixa absorção dos nutrientes, o que sugere alteração direta no metabolismo energético (Olsen *et al.*, 2007) e conseqüentemente redução no crescimento desses peixes em decorrência da exposição aos compostos do petróleo. Foram relatados ainda distúrbios na habilidade respiratória, alterações hematológicas e prejuízos ao sistema imunológico (Gagnon e Holdway, 1999; Cohen *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2005). Alterações morfológicas, mensuradas por meio de técnicas histopatológicas, já foram descritas em animais coletados após a ocorrência de derramamento de derivados de petróleo (Katsumiti *et al.*, 2009).

Diante da notável problemática relacionada a poluição causada por petróleo, a busca de alternativa que promovam a recuperação de área já afetadas é um caminho que deve ser cada vez mais explorado.

2.3. DESPOLUIÇÃO DE PETRÓLEO E DIESEL

O fato do meio ambiente ser capaz de se regenerar naturalmente com o passar dos anos, de forma a reestabelecer o equilíbrio inicial à vida, não garante necessariamente a recuperação total dessas áreas. Contudo, em alguns casos duram até décadas para se regenerarem totalmente, dependendo essencialmente do tipo de fator que promoveu o desequilíbrio. Além do mais, tal habilidade não é ilimitada, ou melhor, pode sofrer desgastes com o passar dos anos afetando assim sua eficiência, ou mesmo pelo efeito cumulativo da deposição de poluentes. Ao

serem ultrapassados certos limites, a capacidade regenerativa do ambiente pode ser superada, dando lugar ao aparecimento de mudanças que são irreversíveis (Gomes, 1995).

Com o passar do tempo, a composição química dos combustíveis e/ou petróleo presentes nessas áreas sofrem diversos processos de mudança na sua composição química. Isso por que os hidrocarbonetos presentes nesses combustíveis e também no petróleo estão sujeitos a ação de processos naturais do meio ambiente, o que influencia diretamente na persistência, mobilidade e redução da massa desses contaminantes. A grande maioria desses compostos (cerca de 60% a 90%) é biodegradável. Contudo, o restante (cerca de 10% a 40%), seja ele em estado bruto ou refinado, é recalcitrante. Embora seja uma fração menor, em um derramamento de grandes proporções, isso ainda representa toneladas de poluentes que estarão impactando os ecossistemas e serão bioacumulados na cadeia trófica. O destino dessa fração restante sem dúvida é o aspecto mais relevante a respeito dos estudos que visam buscar alternativas para minimizar os impactos ambientais causados por petróleo e derivados (Crapez *et al.*, 2002)

A remediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados tem sido bastante estudada e avaliada nas últimas décadas. Contudo, tendo em vista a complexidade desses compostos e a dificuldade de remoção dos mesmos, enfrentam-se nessa área ainda muitos problemas. A maioria deles sempre relacionada ao tamanho da área impactada e associada a isso a escolha da estratégia com melhor eficiência e custo/benefício. Há basicamente duas estratégias de remediação de áreas contaminadas: *ex situ* e *in situ* (Boopathy, 2000; Ramsay *et al.*, 2000) Estratégias de descontaminação *ex situ* envolve a remoção de todo ou partes do material contaminado para um local diferente da área de origem e a posterior devolução desse material após o processo ser concluído. Porém, o esforço de transportar toda uma área contaminada para um local diferente faz dessa estratégia uma das mais caras, mais trabalhosas e conseqüentemente pouco utilizada. Por exemplo, em um local de testes nos EUA (Visalia, Califórnia) poluído com creosoto (um derivado do petróleo), o custo para se bombear e tratar toda a região contaminada era de US\$ 26.000,00 dólares por galão de creosoto e o tempo estimado para esse processo era de 3250 anos. A descontaminação *in situ*, ou seja, no local impactado, é a mais utilizada por apresentar menores custos e tempo de tratamento. A mesma área em Visalia, avaliada com uma técnica *in situ* (injeção de

vapor) apresentou custo estimado por galão de creosoto de US\$ 130,00 e o tempo de limpeza caiu para aproximadamente 3 anos (Nano *et al.*, 2003).

Diversos métodos têm surgido nos últimos anos. Alguns mais eficientes que outros e uns mais caros que outros, porém todos eles apresentam vantagens e desvantagens quando comparados entre si, tendo em vista a natureza da contaminação e as proporções do evento. A indústria petrolífera divide os métodos mais comumente usados em métodos físicos, químicos e biológicos (Khan *et al.*, 2004). Os tratamentos físicos envolvem a separação das fases do solo e contaminante. Já os tratamentos químicos se baseiam nas diferenças das propriedades químicas dos diversos componentes dos contaminantes e envolvem, geralmente, uma ou mais das seguintes reações químicas: neutralização, fotólise e/ou oxi-redução. As principais operações e/ou processos físicos e químicos utilizados em todo mundo para tratamento de resíduos sólidos são encapsulamento (estocagem), extração por solvente, neutralização, oxidação, vitrificação, dessorção térmica e incineração (Santos *et al.*, 2007).

Ao contrario de processos físicos e químicos, o tratamento biológico é considerado um método seguro, pois não afeta o equilíbrio ecológico, é eficiente e apresenta custos mais favoráveis. Baseia-se, essencialmente, na capacidade dos microrganismos de minimizar ou remover poluentes de hidrocarbonetos de petróleo do ambiente. Esse processo é denominado biorremediação (D'Annibale *et al.*, 2006).

2.3.1. Biorremediação de Áreas contaminadas por diesel e Petróleo

A biorremediação é um processo que envolve a utilização de microrganismos, sejam eles de ocorrência natural ou não, na degradação de compostos nocivos ao meio ambiente, visando transformar tais compostos em substâncias menos tóxicas ou atóxicas e assim promovendo a descontaminação do ambiente. Para que o processo de biorremediação aconteça de forma satisfatória é essencial a existência de microrganismos que sejam capazes de catabolizar as reações químicas necessárias para a degradação dos compostos. É necessário ainda, que os compostos contaminantes estejam disponíveis ao ataque dos microrganismos ou das enzimas produzidas por eles (Meneghetti, 2007).

A biorremediação pode ser classificada em três categorias distintas de acordo com o produto final gerado pela ação principal dos microrganismos, a saber: a) mineralização, onde compostos químicos orgânicos são transformados a compostos

químicos inorgânicos como dióxido de carbono, água e amônia; b) biotransformação, onde os compostos orgânicos químicos são transformados em estruturas menores e c) co-metabolismo, onde outro composto é metabolizado primeiramente ou simultaneamente a um composto específico (Dalton *et al.*, 1982).

Os microorganismos possuem a capacidade de se adaptarem, com mais facilidade que outros organismos, a situações extremas, o que conseqüentemente os tornam fisiologicamente versáteis. Isso faz com que uma mesma espécie consiga se desenvolver em ambientes totalmente diferentes (Martins, 2004). Essa característica torna-os aptos a metabolizar e frequentemente a mineralizar um grande número de moléculas orgânicas, fato que contribui significativamente para os empregos desses seres no processo de remediação de áreas contaminadas (Alexander, 1994). Em ambientes aquáticos, por exemplo, os microorganismos podem transformar quimicamente por meio da ação de enzimas específicas compostos contaminantes. Nesse processo, energia ou outro receptor de elétron do meio é liberado e oxigênio consumido. Conseqüente a presença desses receptores de elétrons, além de outros nutrientes tais como nitrogênio, fósforo, minerais traços, e é claro, a fonte de carbono, que nesse caso são os poluentes orgânicos, possibilitam o crescimento microbiano, o que culmina na conversão dos poluentes a produtos de oxidação que geralmente terminam em dióxido de carbono e água (Flathman *et al.*, 1994). Se esse processo acontece em um local onde o oxigênio disponível é escasso ou ausente, microorganismos anaeróbios se sobressaem e lideram as atividades de degradação. Para tal ação, utilizam como receptores de elétrons o nitrato, o íon férrico, o sulfato e o dióxido de carbono com menores transferências de energia, respectivamente (Martins, 2004).

O processo de biorremediação pode ser acelerado pela utilização das técnicas de bioestimulação e de bioaugmentação. A bioestimulação consiste em oferecer condições para que ocorra uma aceleração na reprodução microbiana e de suas atividades metabólicas. Isso é feito pela adição de oxigênio, água e nutrientes ao meio ambiente contaminado criando assim condições favoráveis para que os microorganismos presentes se desenvolvam com maior rapidez. A bioaugmentação consiste na introdução, no ambiente contaminado, de microorganismos específicos capazes de degradar o contaminante presente no meio e que sejam adaptados às condições ambientais (Deon *et al.*, 2012). Nessa técnica, uma avaliação prévia dos microorganismos presentes no ambiente é necessária para que sejam identificados

aquele que são capazes de degradar os contaminantes. As espécies que se apresentam potencialmente degradadores dos compostos presentes são então cultivadas e em seguida introduzidas no local onde aconteceu a contaminação, com o objetivo de aumentar a população microbiana, responsável pela degradação do óleo.

Na maioria das vezes, no tratamento de áreas contaminadas são utilizados os microorganismos que existem no próprio local. Todo o processo de biorremediação pode ser feito por uma única espécie em particular, o que é mais difícil de acontecer, ou pode ser feito pela interação de um grande número de espécies presentes no local. Estas atuam em conjunto, sendo que o produto que foi gerado por uma espécie será usado por outra para produzir um segundo composto que vai ser utilizado por outra bactéria e produzir outro composto e assim será até que o produto gerado não represente mais riscos ao meio ambiente (Ururahy *et al.*, 1998).

Algumas vantagens são conferidas a biorremediação em relação a outras técnicas de tratamento de áreas contaminadas. A primeira delas está relacionada a área de atuação. Tecnicamente, os microorganismos estariam presentes em todo o ambiente onde aconteceu o derramamento. Logo, a biodegradação estaria acontecendo em todos os lugares ao mesmo tempo, mesmo que a área do desastre seja relativamente grande. A aplicação de outras técnicas para recuperação de ambientes muito extensos torna-se muitas vezes inviáveis seja pelo custo, seja pelo tempo necessário para o tratamento de toda área afetada. Outra vantagem conferida a biorremediação, é que o elemento fundamental de trabalho são os microorganismos, que são altamente manipuláveis em laboratório, permitindo dessa forma, uma série de possíveis melhorias para facilitar o processo de biorremediação. Algumas delas poderiam ser: seleção de mutantes capazes de uma degradação mais eficiente; transferência de genes responsáveis pelas enzimas de degradação à microorganismos já ambientados no local. Outra característica relevante é o menor custo em relação às técnicas físico-químicas de recuperação de áreas contaminadas (Langenbach, 1994).

Embora microorganismos utilizem diferentes processos metabólicos para obter energia, são os heterotróficos os mais importantes usados na degradação de contaminantes orgânicos. Isso por que eles empregam a respiração para oxidar tais compostos como fonte de carbono e energia, seja por meio da fermentação, respiração aeróbica e anaeróbica. É justamente nesse princípio que se baseia todo o

processo de biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo: a utilização dos compostos orgânicos do petróleo como fonte de carbono e energia (Alexander, 1994).

Tratando-se especificamente da degradação de hidrocarbonetos de petróleo, os microrganismos capazes de realizarem esse processo estão amplamente distribuídos no solo e também em ambientes aquáticos. Contudo ainda é muito pequena a quantidade de microrganismos que reconhecidamente degradam hidrocarbonetos (Atlas, 1995).

Pelo fato de serem hidrofóbicos, os hidrocarbonetos de petróleo tendem a permanecer sorvidos na matriz do solo, o que diminui assim a sua disponibilidade ao ataque dos microrganismos e certamente limita sua biodegradação. Para contornar esse problema a adição de surfactante é uma alternativa que apresenta bons resultados. Sua adição na técnica de biorremediação apresenta efeitos positivos em relação à dessorção de compostos orgânicos hidrofóbicos sorvidos no solo, pois diminuem a tensão superficial e possui alta capacidade emulsificante, aumentando assim a solubilidade dos compostos orgânicos. Muitos surfactantes são produzidos naturalmente por bactérias, fungos e leveduras. Estes, como são produzidos por microrganismo recebem o nome de biossurfactantes, e são na realidade subprodutos metabólicos desses organismos (Nitschke e Pastore, 2002).

2.3.2. Biorremediação por bactérias

Uma porção de solo, ou ainda areia ou sedimentos dos oceanos pode conter quantidades significativas de bactérias que possuem capacidade de degradar hidrocarbonetos. Essa quantidade se torna ainda maior quando se trata de uma área que foi afetada pelo petróleo e seus derivados (Harayama *et al.*, 2004; Head *et al.*, 2006). A capacidade que muitas espécies de microrganismos possuem em usar compostos de petróleo como substrato de crescimento e assim degradando ou tornando-os menos tóxicos ao meio, pode ser explicada pela presença maciça de hidrocarbonetos em toda a biosfera. A exposição prolongada a tais compostos e a ausência de outras fontes de carbono mais acessíveis levou esse seres a se adaptarem a fim de utilizarem os hidrocarbonetos presentes no petróleo como fonte de carbono e energia (Boopathy, 2000; Ramsay *et al.*, 2000; Widdel e Rabus, 2001; Díaz, 2004; Mandri e Lin, 2007). Para que esse processo aconteça de forma satisfatória é preciso que as moléculas do petróleo sejam quebradas em compostos

mais simples, intermediários na via metabólica desses microorganismos (Van Hamme *et al.*, 2003; Ferguson *et al.*, 2007; Jacques *et al.*, 2007)

As bactérias apresentam crescimento acelerado, grande versatilidade metabólica, plasticidade genética e capacidade de se adaptarem rapidamente a variações do meio. Essas características as tornam adaptáveis a diferentes tipos de condições ambientais. Essencialmente elas necessitam apenas de energia, fonte de carbono e nutrientes como nitrogênio, potássio, enxofre, fósforo, cálcio e magnésio, e assim conseguem crescer e sobreviver às mais distintas adversidades (Martins, 2004).

Essa característica de fácil adaptabilidade faz das bactérias os microorganismos mais empregados na biorremediação de ambientes contaminados. Existem diversos trabalhos envolvendo bactérias na degradação de compostos de petróleo. Vias metabólicas, por exemplo, de degradação dos HAPs foram identificadas em diferentes espécies de bactérias. Esses estudos mostram ainda que a quebra de tais compostos aromáticos pode ser promovida de forma aeróbica e também de forma anaeróbica (Boopathy, 2000; Widdel e Rabus, 2001; Díaz, 2004; Jacques *et al.*, 2007). Embora essa degradação aconteça de forma satisfatória nos dois casos, existem relatos indicando que tal processo ocorre mais rapidamente quando na presença de oxigênio (Díaz, 2004).

A complexidade das estruturas químicas e o tamanho dos hidrocarbonetos de petróleo é diretamente proporcional a estabilidade química e a hidrofobicidade da molécula (Kanaly *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2005). Isto contribui para uma característica marcante do petróleo que é a sua baixa solubilidade em água, o que dificulta a ação das bactérias (Kanaly *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2005; Cameotra e Singh, 2009; Seo *et al.*, 2009). Logo, uma etapa essencial na degradação desses compostos é a obtenção de uma boa interação entre o óleo e a superfície celular das bactérias degradadoras, permitindo assim, que o transporte entre a membrana celular aconteça de forma eficiente.

Já em relação aos alcanos, outro grupo de compostos presentes no petróleo e derivados, também existem muitas bactérias capazes utilizá-los como fonte de carbono (Smits *et al.*, 2003; Wentzel *et al.*, 2007). Geralmente as bactérias que degradam esses compostos possuem uma versatilidade metabólica bastante acentuada e usam outros compostos como fonte de carbono (Margesin *et al.*, 2003; Harayama *et al.*, 2004), e frequentemente preferem degradar outros composto do

que os alcanos. Porém, existem espécies altamente especializadas na degradação de hidrocarbonetos, não utilizando outro composto como fonte de energia. Tais espécies são chamadas hidrocarbonoclásticas e desempenham um papel fundamental na remoção de hidrocarbonetos de ambientes poluídos (Harayama *et al.*, 2004; Head *et al.*, 2006; Yakimov *et al.*, 2007). Um exemplo interessante a esse respeito é a espécie *Alcanivorax borkumensis*. Essa espécie metaboliza exclusivamente alcanos lineares e ramificados, não sendo capaz de metabolizar outras substâncias como fonte de carbono, como por exemplo hidrocarbonetos aromáticos, aminoácidos, ácidos graxos e açúcares comuns (Yakimov *et al.*, 1998; Schneiker *et al.*, 2006).

A. borkumensis tem como hábitat o fundo dos mares e oceanos. Há uma hipótese de que na ausência de poluentes essas bactérias provavelmente vivam às custas dos alcanos produzidos pelos seres que habitavam o fundo dos mares, e continuamente liberavam tais compostos mesmo em baixas concentrações. Ao longo dos anos devido ao acúmulo natural de petróleo nesses locais, essa espécie se tornou o microorganismo presente mais prevalente, derivando daí o importante papel como biorremediador natural dessa espécie (Kasai *et al.*, 2002; Hara *et al.*, 2003; Harayama *et al.*, 2004; Yakimov *et al.*, 2007; McKEW *et al.*, 2007). Não são apenas as bactérias hidrocarbonoclásticas pertencentes ao gênero *Alcanivorax* que realizam esse processo natural de biorremediação. Os gêneros *Thalassolituus* (Yakimov *et al.*, 2004), *Oleiphilus* (Golyshin *et al.*, 2002) e *Oleispira* (Yakimov *et al.*, 2003) também participam da biodegradação de vazamentos de petróleo em diversos ambientes (McKew *et al.*, 2007; Coulon *et al.*, 2007).

2.3.3. Alguns gêneros de Bactérias envolvidas na degradação de petróleo e diesel

Desde a década de 1950, bactérias degradadoras de compostos do petróleo têm sido isoladas. Diversos foram os gêneros identificados, incluindo os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* (Crapez *et al.*, 2002; Jacques *et al.*, 2007; Mandri & Lin, 2007; Seo *et al.*, 2009).

Diversos estudos relatam o envolvimento do gênero *Pseudomonas* na degradação de vários compostos presentes no petróleo. Algumas das espécies desse gênero são *Pseudomonas sp.*, *P. putida*, *P. paucimobilis*, *P. vesicularis*, *P. fluorescens*, *P. stutzeri*, *P. saccharophilia* e *P. aeruginosa* (Seo *et al.*, 2009).

Contudo, como acontece com todas as espécies bacterianas usadas em biorremediação, nenhuma delas é capaz de degradar completamente o petróleo, uma vez que sua constituição envolve a presença de vários tipos de hidrocarbonetos. Porém essas espécies podem certamente serem usadas na formação de consórcios, com outros microrganismos de gêneros diferentes, cada um especializado em degradar uma ou várias frações do óleo (Crapez *et al.*, 2002; Jacques *et al.*, 2007).

Cepas diferentes da espécie *Pseudomonas sp.*, por exemplo, é capaz de degradar aproximadamente dez compostos do petróleo (Seo *et al.*, 2009). As cepas **C18**, **PP2**, **DLC-P11** degradam naftotiofeno e fenantreno (Denome *et al.*, 1993; Samanta *et al.*, 1999; Prabhu e Phale, 2003), a **B4** é responsável por degradar bifenil e clorobifenil (Chávez *et al.*, 2004), **HH69** consegue degradar dibenzofurano (Fortnagel *et al.*, 1990), já a cepa **CA10** degrada carbazole e dibenzo-p-dioxina clorada (Habe *et al.*, 2001), **NCIB 9816-4** usa como fonte de carbono fluorano, dibenzofurano, dibenzotiofeno (Resnick e Gibson, 1996) e finalmente a cepa **F247** consome fluorano (Grifoll *et al.*, 1995)

De acordo com Weissenfels e cols. (1990), as espécies *P. paucimobilis* e *P. vesicularis* conseguem utilizar como fonte de carbono fenantreno e fluorano respectivamente. Já a *P. putida* é responsável pela degradação de naftaleno e fenantreno (Balashova *et al.*, 1999), *P. fluorescens* degrada fenantreno, criseno e Benzo[a]pireno (Kanaly *et al.*, 2002), *P. stutzeri* e *P. saccharophilia* degradam pireno (Kazunga e Aitken, 2000) e *P. aeruginosa* também consegue degradar fenantreno (Romero *et al.*, 1998).

Estudos envolvendo a degradação de hidrocarbonetos de petróleo em ambientes com baixas temperaturas relatam a capacidade de espécies *Pseudomonas sp.* serem capazes de degradar tolueno e naftaleno em temperaturas variando de 5 a 25°C (Whyte *et al.*, 1997). Ainda, essa mesma espécie é responsável pela degradação de fenol, tolueno e anilina em temperaturas variando de 40° a 42° C (Lugowski *et al.*, 1997).

Quanto ao gênero *Bacillus*, relatos também indicam o envolvimento de várias espécies desse gênero na degradação compostos de petróleo. As mais citadas são *Bacillus sp.*, *B. cereus*, *B. stearothermophilus*, *B. oleovorans* e *B. subtilis* (Margesin e Schinner, 2001).

A espécie *B. stearothermophilus* sobrevive em altas temperaturas, e em teste envolvendo a degradação de petróleo mostrou-se capaz de degradar 80-89% do

óleo cru, cerca de 5gL^{-1} , depois de 5 dias em temperatura de 60°C (Sorkhoh et al, 1993) sendo que uma das vias de degradação que ela utiliza para isso é a do naftaleno. Outra espécie representante desse gênero que está envolvida na degradação de compostos de petróleo é o *B. cereus*, que reconhecidamente é capaz de metabolizar pireno (Kazunga e Aitken, 2000). A biorremediação de hidrocarbonetos clorados, tais como clorobenzoato e pentaclorofenol, pode ser feita por *B. subtilis* (Markl et al., 1999).

Quanto ao *Bacillus sp.*, bactéria capaz de sobreviver em temperaturas entre 40°C e 75°C , testes de degradação apontam que ela é responsável pela degradação completa de 5mM de fenol em temperaturas que variaram de $55\text{-}75^\circ\text{C}$. Na concentração de 10mM de fenol houve inibição do crescimento dessas bactérias (Mutzel et al., 1996).

Esses dados são resumidos na tabela 3, que apresenta espécies dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* com comprovada capacidade de degradação de compostos de petróleo e diesel.

Tabela 3: Espécies dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* envolvidos na degradação de compostos de petróleo e diesel.

Gênero	Espécie	Cepa	Composto degradado	Referência
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp.</i>	-	Fenol	Mutzel et al., 1996
	<i>B. cereus</i>	-	Pireno	Kazunga e Aitken, 2000
	<i>B. stearothermophilus</i>	-	80 – 89% de petróleo	Margesin e Schinner, 2001
	<i>B. subtilis</i>	-	Clorobenzoato; pentaclorofenol	Markl et al., 1999
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	C18, PP2, DLC-P11	Naftotiofeno; fenantreno	Denome et al., 1993; Samanta et al., 1999; Prabhu e Phale, 2003
		B4	Bifenil; clorobifenil	Chávez et al., 2004
		HH69	Dibenzofurano	Fortnagel et al., 1990
		CA10	Carbazole; dibenzeno-p-dioxina clorada	Habe et al., 2001
		NCIB	Fluorano;	Resnick e

	9816-4	dibenzofurano; dibenzotiofeno	Gibson, 1996
	F247	Fluorano	Grifoll <i>et al.</i> , 1994
<i>P. aeruginosa</i>	-	Fenantreno	Romero <i>et al.</i> , 1998
<i>P. fluorescens</i>	-	Fenantreno; criseno; Benzo[a]pireno	Kanaly <i>et al.</i> , 2002
<i>P. paucimobilis</i>	-	Fenantreno	Weissenfels <i>et al.</i> , 1990
<i>P. putida</i>	-	Naftaleno; Fenantreno	Balashova <i>et al.</i> , 1999
<i>P. saccharophilia</i>	-	Pireno	Kazunga e Aitken, 2000
<i>P. stutzeri</i>	-	Pireno	Kazunga e Aitken, 2000
<i>P. vesicularis</i>	-	Fluorano	Weissenfels <i>et al.</i> , 1990

2.4. ESPECTROMETRIA DE MASSAS APLICADA A PROTEÔMICA

As proteínas são responsáveis por uma grande quantidade de funções metabólicas e biológicas desempenhadas pelos organismos vivos. Suas funções variam desde o transporte e armazenamento de substâncias dentro das células até seu envolvimento em processos metabólicos mais complexos. Também comumente notável, é a capacidade que certas proteínas possuem em controlar funções importantes relacionadas ao próprio DNA, como é o caso das proteínas envolvidas na regulação da expressão gênica (Bradbury, 2000). Nos microorganismos a ação de tais proteínas é essencial para a sobrevivência da célula, uma vez que constantemente o meio em que elas se encontram sofrem variações em relação a temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes, concentração salina e pressão. Isso faz com que a expressão de proteínas específicas para uma dada condição seja ativada/desativada. Em se tratando de biorremediação, tais variações ambientais afetam consideravelmente o processo de biorremediação (Alexander, 1994).

Algumas vias metabólicas de degradação de petróleo e seus derivados já são bastante conhecidas, como também as proteínas envolvidas, como as vias *alk* (c5 a c12 n-alcanos), *nah* (naftaleno; PAHs) (Whyte *et al.*, 1997) e *xyl* (tolueno; hidrocarbonetos aromáticos) (Nakai *et al.*, 1983). Contudo, informações mais

detalhadas a respeito das proteínas envolvidas nessas vias ainda são escassas. Apenas algumas poucas proteínas, até onde se sabe, estão envolvidas nesse processo. Outras podem estar envolvidas diretamente nessas vias de degradação, porém não foram descritas ainda. É preciso saber quais são e como interagem as proteínas e quais os genes ativados mediante a uma condição de poluição (Gilbert, 2001).

O termo proteoma foi cunhado para significar o conjunto de todas as proteínas que intervêm nos processos biológicos de uma espécie, expressas por um genoma. A análise de um proteoma é realizada por um conjunto de metodologias analíticas adotadas a fim de determinar características quantitativas e qualitativas de um proteoma. Essa caracterização com base na identificação das proteínas expressas pode ser consideravelmente complexa. Além de determinar o conjunto de proteínas presentes, que sozinha é uma tarefa bastante árdua, é preciso ainda determinar e caracterizar uma grande quantidade de isoformas geradas por modificações após o processo de tradução. E finalmente, devem ser verificadas também as interações que essas proteínas realizam entre si (Tyers e Mann, 2003; Aebersold e Mann, 2003). Diante disso, a espectrometria de massas (MS) se torna uma tecnologia indispensável na caracterização de um proteoma, mais especificamente no que diz respeito a identificação das proteínas presentes (Cantú *et al.*, 2008).

A técnica de MS consiste basicamente em identificar proteínas com base nas informações da relação entre massa e carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa (Aebersold e Mann, 2003). Um espectrômetro de massas possui uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados. Existem várias fontes de ionização empregadas em MS aplicada à análise proteômica, sendo que o MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) é uma delas (Karas e Hillenkamp, 1988). Sua função, como o próprio nome sugere, é ionizar (de maneira suave, preservando assim a estrutura polipeptídica) e também transferir as espécies ionizadas para a fase gasosa. Já os analisadores de massas, são responsáveis por separar os íons formados de acordo com suas relações m/z . Diversos analisadores de massas são comercialmente disponíveis, entre eles *Time-of-Flight* (TOF), que separa os íons de acordo com o tempo de voo seguindo o princípio básico de que os íons com massas menores deslocam-se mais rapidamente e os maiores mais lentamente. Uma vez separados, esses íons são

detectados por eletromultiplicadoras que constituem os detectores mais largamente usados, e então os resultados são transmitidos ao sistema de aquisição na forma de espectros para serem então interpretados (Cantú *et al.*, 2008).

Para essa interpretação, dois tipos de resultados são usados. O primeiro caso esses resultados trazem informação relativa à massa molecular dos peptídeos oriundos da digestão enzimática (*Peptide Mass Fingerprint* – PMF). A base dessa metodologia consiste na digestão prévia (antes de ser analisada no espectrômetro) da proteína a ser identificada por uma enzima proteolítica (por exemplo, a tripsina), o que faz com que sejam produzidos vários peptídeos dessa proteína. As massas desses peptídeos, determinadas com grande acuidade (0,1-0,5 Da) pelo espectrômetro de massa, é usada na identificação da proteína uma vez que elas formam uma espécie de impressão digital (PMF) da mesma. *Softwares* especiais permitem comparar o PMF, gerado pelo espectrômetro, da proteína de interesse com PMFs gerados teoricamente pelo computador. O *Software* faz uma digestão *in silico* em todas as sequências de proteínas depositadas em um banco de dados. Essa digestão teórica é feita com a mesma enzima usada na digestão feita na proteína de interesse, tendo com base o sítio de clivagem dessa enzima. E então após a comparação de todos os PMFs teóricos como o real, se a sequência da proteína buscada estiver depositada no banco de dados, o *software* identificará corretamente a proteína de interesse (Sousa *et al.*, 1999).

No segundo caso faz-se uso de resultados obtidos pela fragmentação de peptídeos individuais previamente detectados (Sadygov *et al.*, 2004). Nessa fragmentação um peptídeo maior é quebrado liberando seus aminoácidos e suas massas também detectadas pelos mesmos processos já mencionados. Isso resulta em uma espécie de sequenciamento de pequenas regiões da proteína quando esses dados são analisados por *software* específicos. O uso das pequenas sequências obtidas em conjunto com as informações de massas moleculares (PMF) constitui uma poderosa técnica de identificação de proteínas conhecida como *sequence tag* (Souza *et al.*, 1999) que pode certamente ser empregada na identificação de proteínas envolvidas no processo de biorremediação de composto de petróleo e seus derivados.

Existem milhares de relatos relacionados aos mais diversos processos de biorremediação de petróleo e seus derivados. Tais estudos apresentam as mais detalhadas descrições dos diversos gêneros e espécies envolvidos nesses processos.

Porém, são poucos os trabalhos que detalham o envolvimento das proteínas que atuam diretamente nesses processos. Diante disso, estudos empregando técnicas modernas de identificação de proteínas são cada vez mais necessários nessa área, uma vez que podem contribuir para elucidar o envolvimento das proteínas nas mais variadas vias de degradação dos compostos presente no petróleo e diesel.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Determinar perfil proteômico da espécie *B. pumilus* isoladas da Amazônia, cultivada em petróleo e diesel, visando a identificação de proteínas envolvidas em vias de degradação de xenobióticos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a viabilidade da espécie *B. pumilus* em degradar compostos de petróleo e diesel.
- Apresentar perfil de crescimento bacteriano para *B. pumilus* cultivadas em petróleo, diesel e extrato de levedura.
- Validar um perfil proteômico (2D-PAGE) para *B. pumilus* cultivadas em petróleo, diesel e extrato de levedura.
- Avaliar a expressão diferencial em *B. pumilus* em presença de petróleo, diesel e extrato de levedura.
- Identificar por espectrometria de massas proteínas de *B. pumilus* envolvidas na degradação de petróleo e diesel.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

4.1.1. Coleta de espécies bacterianas com capacidade de biodegradação de petróleo

As amostras de bactérias utilizadas nesse trabalho foram previamente coletadas na saída dos efluentes da refinaria da Petrobrás/Manaus-AM (REMAN) pela estudante de Doutorado Solange Pires de Araújo (PPGBIOTEC). Raízes, caule, folhas e flor de macrófitas aquáticas das espécies *Eichorniasp sp.*, *Cyperus sp.* e *Hymenachne sp.*, foram coletadas na tentativa de isolar espécies bacterianas endofíticas ou epifíticas dessas plantas com potencial de biorremediação de petróleo.

Para o isolamento das espécies bacterianas foi adotado protocolo baseado em seleção de microrganismos que crescem em petróleo como única fonte de carbono (dados não publicados de Araújo, S. P.). Várias colônias foram isoladas e conservadas em meio LB (Luria-Bertani) 0,75% de ágar em temperatura ambiente e também em glicerol 20% a -80°C. As amostras bacterianas foram identificadas por sequenciamento do gene responsável pela região de 16S do rRNA (Júlio Nino de Souza Neto) de acordo com o que é apresentado na tabela 4.

Tabela 4. Espécies bacterianas identificadas por sequenciamento do gene responsável pela região de 16S do rRNA. Adaptado de Neto (2013).

	Amostra	Espécie	Gram	Forma
1	SB41	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo	Bacilo
2	SB63	<i>Lysinibacillus fusiformes</i>	Positivo	Bacilo
3	SB121	<i>Lysinibacillus fusiformes</i>	Positivo	Bacilo
4	SB102	<i>Acinetobacter junii</i>	Negativo	Cocobacilo
5	SB132	<i>Acinetobacter junii</i>	Negativo	Cocobacilo
6	SB123	<i>Bacillus pumilus</i>	Positivo	Bacilo
7	SB139	<i>Bacillus pumilus</i>	Positivo	Bacilo

Para as os ensaio de biodegradação e etapas subsequentes deste trabalho foi selecionada a espécie *B. pumilus* (SB139) identificada anteriormente.

4.2. ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO DE PETROLEO E DIESEL

4.2.1. Pré-cultivos de *B. pumilus*

Para o uso nas etapas seguintes, amostras de *B. pumilus*, que estavam sendo conservadas em meio LB e ágar 0,75% em temperatura ambiente, foram plaqueadas em LB-ágar e incubadas a 30°C por 16h. Colônias bacterianas dessas placas foram então inoculadas em tubos de ensaio contendo 5mL meio LB caldo e incubadas por 16h a 30°C sob agitação de 140 rpm. Após o tempo de crescimento, foi retirado 1mL de cada cultura para medir as densidades celulares em espectrofotômetro a 600nm de comprimento de onda, e o restante de cada cultura foi centrifugado à 10000 rpm por 5min. O sobrenadante de cada cultura foi descartado e o *pellet* celular ressuscitado em solução salina (NaCl) 0,15M estéril em volume suficiente para que fosse obtido no final densidade celular igual a 1 com base na análise feita anteriormente no espectrofotômetro.

4.2.2. Ensaio de Biodegradação de Petróleo e diesel em escala piloto

A fim de confirmar a capacidade das espécies bacterianas selecionadas de conseguir crescer e se desenvolver em meio contendo petróleo e diesel como única fonte de carbono, foi realizado um pré-ensaio em menor escala. Nesse teste de biodegradação, bem como nos demais, foi adotado o meio mínimo BH (Bushnell e Haas, 1941) da Difco™, livre de qualquer fonte de carbono. Seu preparo foi feito de acordo com indicações do fabricante na concentração 3,27g.L⁻¹ em água destilada, o pH ajustado para 7,5 e em seguida autoclavado a 121°C por 15min a pressão de 1atm.

Para o teste de degradação de xenobiótico, foram adicionados 50µL da solução contendo as bactérias (item 3.2.1) em tubos de ensaio com 5mL de meio mínimo BH e então foram adicionados 66µL de petróleo ou de diesel. Estes testes foram realizados em triplicada. Como controle positivo foi usado extrato de levedura na concentração de 0,1% (v/v) como fonte de carbono. Os tubos foram então incubados a 30°C a uma rotação de 140 rpm. Para melhor aeração os tubos foram inclinados no início da incubação e permaneceram assim até o final do processo. O crescimento bacteriano foi acompanhado diariamente e o ensaio teve duração máxima de 72h.

4.2.3. Ensaio de Degradação de Petróleo e Diesel e Curva de Crescimento Bacteriano

Nessa etapa foram usados 50mL de meio BH em frascos Erlenmeyer de 125mL. O pré-inóculo de *B. pumilus* foi preparado seguindo os mesmos procedimentos adotados no item 3.2.2, sendo que a quantidade do mesmo adicionada aos Erlenmeyers com BH foi tanto quanto necessário para a obtenção de densidade celular no inóculo igual a 0,01 para medições em espectrofotômetro em comprimento de onda de 600nm. Quanto as fontes de carbono, foram usados 660µL de petróleo (1,3%) e também 660µL diesel (1,3%) separadamente. O controle positivo também foi feito com extrato de levedura na concentração final de 0,1% como fonte de carbono. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, inclusive o controle. Para determinação da curva de crescimento foram realizadas medições sucessivas da concentração celular a cada 6h nas mesmas condições feitas anteriormente, até a obtenção da fase estacionária da curva de crescimento. Essas medições foram feitas com de 1mL, sendo que diluições na proporção de 1:10 foram feitas a medida que a leitura indicava que a densidade estava se aproximando de 1, afim de minimizar erros de leitura relacionados a turbidez do meio de cultura.

4.3. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

4.3.1. Extração de Proteínas Totais

Cada cultura bacteriana exposta aos xenobióticos (petróleo e diesel) e, no caso dos controles positivos, extrato de levedura, foram cultivadas conforme descrito até que atingissem o final da fase exponencial, sendo que esse tempo variou de acordo coma a fonte de carbono usada. Após atingirem esse ponto, os 50mL de cultura foram centrifugadas a 4000 rpm a 20°C por 10min. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* das células ressuspendido em 3mL de tampão de lavagem (Tris-HCl 50mM pH 7,5). Uma nova centrifugação seguida de nova lavagem e finalmente outra centrifugação foi feita. Após da terceira centrifugação o *pellet* de células foi ressuspenso em 1mL de solução de lise (7M uréia, 2M tiouréia e 4% CHAPS, 50mM DTT e 50µL/mL de coquetel de inibidores de proteases). As células foram então lisadas em sonicador durante três ciclos de 30s, com intervalos de 10s

entre cada ciclo. Finalizada essa etapa as amostras permaneceram em banho de gelo por 60min e então foram centrifugadas por 30min a 12000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi recuperado e distribuídos em alíquotas com volumes de 100µL em microtubos de 1,5mL. A essas alíquotas foram adicionados 5x o volume (500 µL) de solução gelada de clorofórmio e metanol na proporção de (1:4) e então os tubos foram agitados em vórtex por 30s, seguido de centrifugação por 15min a 12000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de proteínas ressuspendido com 1mL de metanol. Essa etapa foi repetida mais duas vezes. Finalmente o *pellet* foi secado a temperatura ambiente e em seguida estocado a -20°C.

4.3.2. Quantificação de Extrato Protéico

Para a quantificação de proteínas uma alíquota de cada condição (petróleo, diesel e extrato) de ambas as bactérias foi utilizada, sendo que estas foram ressuspendida em 50µL ureia 3M. Apenas 1µL desse total foi utilizado, o qual foi misturado em 1mL da solução de quantificação (Reagente A e Reagente B na proporção de 1:50) do Kit BSA (*BCA Protein Assay Reagent Pierce*). As amostras foram então incubadas em banho seco a 37°C por 30min. Em seguida houve a leitura das amostras em espectrofotômetro a 562nm de comprimento de onda. Os dados obtidos foram então inseridos na fórmula geral da curva padrão preparada previamente obedecendo todos os critérios estabelecidos pelo fabricante.

4.4. ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D-PAGE)

4.4.1. Isoeletrofocalização

Para realização da isoeletrofocalização (IEF), primeira dimensão, 250µL de tampão de Reidratação (*DeStreak Rehydration Solution*; GE Healthcare) juntamente com 1% IPG buffer (pH 3-11) foram usados para ressuspender aproximadamente 250µg das proteínas que seriam analisadas na concentração final de 1µg/µL. Após 10min em temperatura ambiente as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 2min e então todo o volume (exceto o precipitado) foi adicionado no *Immobiline DryStrip Reswelling Tray* (GE Healthcare). Logo em seguida tiras de IPG (*immobilized pH gel*) foram devidamente colocadas sobre as amostras. As tiras de IPG apresentavam comprimento de 13cm (130x3x0,5mm; GE Healthcare) com gradiente de pH variando de 3 a 11. Posteriormente as tiras foram cobertas com

óleo mineral (*DryStrip Cover fluid / GE Healthcare*) e levadas ao focalizador *Ettan IPGphor II (GE Healthcare)* por 22 horas a 20°C. Nas 10 primeiras horas aconteceu a rehidratação das tiras de IPG e as 12 horas seguintes reservada a focalização isoelétrica. Essa etapa final ocorreu em cinco estágios diferentes onde houve a variação da voltagem aplicada às amostras. A focalização iniciou com voltagem de 150V e permaneceu assim por 2 horas, e então foi aumentada a 300V por mais 2 hora. Na etapa seguinte iniciou-se um gradiente de voltagem saindo do 300V até alcançar 1.000V ao final de 4 horas. Esse gradiente continuou na etapa seguinte até atingir 8.000V nas 2 horas seguintes. Essa voltagem foi mantida na etapa final por mais duas horas. Toda a focalização isoelétrica ocorreu com uma tensão limite de 50mA/tira de IPG. Ao final desse processo as tiras foram imediatamente equilibradas ou congeladas a -20° C até a realização da segunda dimensão.

4.4.2. Equilíbrio das Tiras de IPG

Previamente à SDS-PAGE, as tiras foram equilibradas em 2mL de tampão de equilíbrio (50mM Tris-HCl – pH 8,8; 6M Uréia; 30% (p/v) Glicerol; 2% (p/v) SDS e um traço de azul de bromofenol) e 50mM DTT (agente redutor) por 15 minutos sob leve agitação à temperatura ambiente. Em seguida as tiras foram equilibradas por mais 15 minutos, sob as mesmas condições, em tampão de equilíbrio acrescido de 50mM de Iodoacetamida.

4.4.3. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de SDS (SDS-PAGE)

Após o equilíbrio, as tiras de IPG foram posicionadas horizontalmente sobre o gel SDS-PAGE 12% com dimensões de 18cm x 16cm. Sobre as tiras foi acrescentado agarose 0,5% em tampão de corrida. Para que a frente de migração ficasse visível, foi acrescentado traços de azul de bromofenol à solução de agarose.

A segunda dimensão foi realizada em tampão de corrida (25mM Tris-base, 192mM glicina e 0,1% SDS) utilizando o sistema eletroforético *Hoefler SE 600 Ruby (GE Healthcare)*. Para que a passagem das proteínas da tira para o gel SDS-PAGE ocorresse de maneira suave e homogênea, a eletroforese foi desenvolvida a 25 mA/gel nos 20 minutos iniciais. O restante da corrida foi realizada a 50mA/gel a 500V e sendo interrompida quando a frente de migração estava a aproximadamente 1cm do limite inferior do gel. A duração total foi de aproximadamente 3 horas e 30

minutos. Todas as etapas e soluções utilizada no 2D-PAGE foram adaptadas e desenvolvidas a partir do protocolo fornecido pelo fabricante do aparelho (2-D Electrophoresis Principles and Methods, 2005).

4.5. FIXAÇÃO, COLORAÇÃO, DIGITALIZAÇÃO E ANÁLISE COMPUTACIONAL DOS GÉIS SDS-PAGE

Para a fixação das proteínas, os géis permaneceram durante 30min, em solução fixadora (10% (v/v) de ácido acético; 40% (v/v) de metanol). Foi utilizada a coloração com azul de Coomassie coloidal. Os géis ficaram submersos em aproximadamente 200mL de solução corante (8% sulfato de amônio, 0,8% ácido fosfórico, 0,08% Coomassie Blue G-250, 20% metanol) por um período de 16 a 20 horas. Para permanecerem apenas as marcações das bandas, os géis foram descorados em água destilada.

Os géis foram digitalizados no ImageScanner™ II (GE Healthcare) e analisados com o programa ImageMaster™ 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare) (Dowsey *et al.*, 2010). Os parâmetros definidos para a detecção dos *spots* no programa foram os seguintes: área mínima=5; *smooth*=2 e *saliência*=100.

4.6. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

4.6.1. Seleção do Spots

Os perfis de *B. pumilus* foram usados para identificação de proteínas por espectrometria de massas. Foram selecionados no total 96 *spots* dos três perfis proteômicos validados para *B. pumilus*. Esses *spots* foram tomados de acordo com sua ocorrência nos três perfis. Para essa seleção foi adotado como parâmetro as comparações feitas no software *ImageMaster Platinum*. Dessa forma os *spots* selecionados foram agrupados em 4 classes:

1ª) *spots* comuns aos três perfis: nesse caso foram tomados os *spots* que foram detectados em todos os três perfis de *B. pumilus*; (10 *spots* selecionados)

2ª) *spots* comuns a petróleo e diesel: aqueles de ocorrência nos perfis de petróleo e diesel a mesmo tempo; (20 *spots* selecionados)

3ª) *spots* exclusivos de petróleo: os que tiveram sua ocorrência registrada apenas no perfil validado para petróleo; (46 *spots* selecionados)

4^a) spots exclusivos de diesel: os que só apareceram na condição diesel; (20 spots selecionados)

4.6.2. Preparo das Amostras

Os *spots* de interesse foram retirados manualmente do gel utilizando ponteiros novas estéreis tipo P1000 e colocados em microtubos *ependorf* (1,5 ml). Aos tubos contendo os géis/*spots* foram adicionados 500µL de solução descorante (50% (v/v) de metanol; 2,5% (v/v) de ácido acético) e foram incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido uma vez mais até a completa descoloração dos géis/*spots*. Em seguida, foram submetidos a duas etapas de desidratação com 200µL de acetonitrila 100% por 5 minutos cada. A acetonitrila foi descartada e os tubos deixados à temperatura ambiente para evaporação da acetonitrila restante (3 a 5 min). Os géis/*spots* foram reduzidos com 30µL de solução de DTT (Ditiotreitol 10mM; bicarbonato de amônio 100mM) por 30min. A solução de DTT foi então removida e as amostras foram alquiladas com 30µL de solução IAA (Iodoacetamida 50mM; bicarbonato de amônio 100mM) por 30min em câmara escura a temperatura ambiente. Após a remoção da solução de IAA as amostras foram lavadas com 100µL de bicarbonato de amônio 100mM e incubadas por 10min. Essa solução foi então descartada e o gel desidratado com 200µL de acetonitrila 100% durante 5min e então reidratado com 200µL de bicarbonato de amônio 100mM por 10min. Duas desidratações com acetonitrila 100% aconteceram novamente e ao final as amostras foram mantidas a temperatura ambiente para evaporação da acetonitrila residual.

Para a digestão proteolítica *in gel*, os *spots* selecionados foram reidratados em 20µL de solução de tripsina (*Promega*) (20ng/mL em tampão contendo 50mM de bicarbonato de amônio). A reidratação ocorreu durante 30 minutos em banho de gelo. O excesso da solução de tripsina foi descartado e adicionado 20µL de bicarbonato de amônio 50mM. As amostras foram incubadas a 37°C por 16 horas.

A extração dos peptídeos do gel foi realizada adicionando-se 20µL de solução de extração I (ácido fórmico 5%) mantido por 5min a temperatura ambiente. Todo o volume foi recuperado para um novo tubo e ao gel foi adicionado 15µL de solução de extração II (ácido fórmico 5%; acetonitrila 50%) sendo incubado por 10min a temperatura ambiente. Novamente houve a recuperação de todo o volume e o passo anterior foi repetido mais uma vez. As amostras foram então liofilizadas e

armazenadas a -20°C até sua aplicação no espectrômetro de massas.

4.6.3. Obtenção dos Espectros de Massa e Fragmentação de Peptídeos

A análise por espectrometria de massas (MS) foi feita em espectrômetro MALDI-TOF Autoflex spectrometer (*Bruker Daltonics*) no Centro de Biotecnologia da Amazônia - CBA. Os peptídeos extraídos foram ressuspensos em 5µL de ácido fórmico 0,1% e misturados, na proporção de 3:2, a solução de matriz saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (10mg/ml em 0,1% TFA em 1:1 acetonitrila/metanol). Essa mistura foi aplicada na placa de MALDI (*Bruker Daltonics*) e deixada para cristalizar em temperatura ambiente.

Os espectros foram adquiridos em modo íon positivo usando uma voltagem de aceleração de 20kV, frequência de laser de 50Hz e faixa de aquisição entre 800 – 3200 Da. A calibração externa foi feita utilizando padrões de peptídeos de massa conhecida (angiotensina) e como calibrante interno foram utilizados picos de autólise da tripsina (842,50 Da e 2211,10 Da) quando presentes. Três peptídeos de cada amostra foram submetidos a fragmentação (MS/MS) nos mesmos parâmetros mencionados.

4.6.4. Análise dos Espectros de Massa e Identificação das proteínas

Os espectros das amostras foram obtidos por acúmulo de 200 tiros e analisados pelo *software FlexAnalysis v3.0 (Bruker Daltonics)*. O padrão de massas (PMF) obtido para cada amostra foi comparado com o padrão de massas gerado *in silico*, a partir do banco de dados do NCBIInr usando o programa MASCOT (www.matrixscience.com). Os parâmetros de busca foram os seguintes: Categoria *Firmicutes*, 0,3Da de tolerância, cisteínas carbamidometiladas e metioninas oxidadas. Os dados de probabilidade de combinação pelo escore, massa molecular, ponto isoelétrico, número de peptídeos equivalentes e porcentagem de cobertura dos peptídeos em relação à proteína foram combinados para identificação das proteínas. Os dados gerados na fragmentação foram usados para a obtenção de pequenas sequências dos peptídeos e usadas na confirmação das proteínas identificadas por PMF.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE BIORREMEDIAÇÃO DE *B. pumilus*

A espécie bacteriana *B. pumilus* foi avaliada como potencial degradadora de petróleo e diesel. Quando comparado ao crescimento na presença de extrato de levedura.

A melhor taxa de crescimento e também desenvolvimento foi observada no cultivo dessa espécie em diesel como fonte de carbono. O crescimento nessa condição foi bastante intenso, porém não houve pigmentação visível no meio de cultivo. O crescimento de *B. pumilus* em petróleo como fonte de carbono, embora não tenha atingido as mesmas proporções do que em diesel, foi também bastante satisfatório, uma vez que houve turbidez suficiente para indicar crescimento bacteriano. O crescimento observado em extrato de levedura foi levemente mais eficiente do que em petróleo. Nos dois casos, também não houve registros quanto a mudança da coloração do meio de cultivo que pudesse ser relacionada a pigmentação por parte dessa bactéria.

Tabela 5. Comparação entre o crescimento de *B. pumilus* em petróleo, diesel e extrato de levedura. Cultivo em meio BH, pH 7,5, a 30°C, sob agitação de 150 rpm durante 72. (-) – Sem crescimento visível; (-+) – Crescimento leve; (+) – Crescimento moderado; (++) Crescimento intenso;

Espécie	Fontes de Carbono	Tempo de Cultivo em dias			
		0	1	2	3
<i>B. pumilus</i>	Petróleo (1,3%)	-	-+	+	+
	Diesel (1,3%)	-	+	++	++
	Extrato de Levedura (0,1%)	-	+	+	+

Quanto a capacidade de biorremediação, o fato dessa espécie conseguir crescer em meio contendo xenobiótico (diesel ou petróleo) como única fonte de carbono, é um forte indicio da capacidade de metabolização desses compostos por tal espécie.

A utilização da espécie *B. pumilus* tem sido relatada em processos

envolvendo biorremediação de áreas contaminadas por petróleo e diesel. O crescimento de *B. pumilus* em petróleo e naftaleno sob condições aeróbias foi avaliado e os resultados indicaram que essas substâncias foram usadas como fonte de carbono e energia pelo microrganismo (Calvo *et al.*, 2004). Outro relato indica que quando essa espécie foi incubada em placas de Petri contendo areia (10 g), inóculo bacteriano (2%) e petróleo (1%) a 30°C por 20 dias, foi observado que a bactéria conseguiu degradar o petróleo bruto. Destaca-se ainda, que ao final do processo, o restante do óleo apresentava maior fluidez do que a descrita no início do experimento (Bueno *et al.*, 2010).

Também existem relatos que indicam a utilização de *B. pumilus* em processos biorremediação de compostos do diesel. Meyer (2011) observou percentual acima de 90% na biodegradação de tais compostos por um consórcio envolvendo *B. pumilus*. Essa espécie também foi indicada como uma das que apresentaram maior potencial para degradar *n*-hexadecano, que é um dos principais compostos do óleo diesel e é considerado um composto modelo para a biodegradação de hidrocarbonetos de cadeia longa (Costa, 2006).

Como já mencionado, a presença de biossurfactante aumenta o potencial de biorremediação de uma dada espécie. A produção de biossurfactante por *B. pumilus* é pouco mencionada na literatura atual. Os primeiros estudos envolvendo esse assunto foram reportados por Morikawa *et al.* (1992), que identificaram *B. pumilus* como um novo produtor de surfactina. Porém, em um estudo envolvendo a produção de surfactina por diversas espécies de *Bacillus* foi identificado que o biossurfactante produzido por *B. pumilus* é muito similar, porém não é idêntico, à surfactina. Isso foi concluído através da caracterização desse surfactante por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE). E ainda, na tentativa de verificar a presença do gene surfactina sintetase, indispensável para síntese de surfactina, uma reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada e apresentou resultados negativos para *B. pumilus* (Hsieh *et al.*, 2004). Esses dados foram refutados recentemente por um estudo que se avaliou a produção de biossurfactantes produzidos por cepas de *Bacillus* utilizando os processos de fermentação submersa (FS) e de fermentação no estado sólido (FES). Após feita a caracterização desse biossurfactante, ficou claro que *B. pumilus* produz surfactina, uma surfactina com massa molar de 103,5kDa (Surfactina A) (Bugay, 2009).

A surfactina é um dos biossurfactantes mais eficientes conhecidos, pois em

concentrações muito baixas ela reduz substancialmente a tensão superficial de certas misturas envolvendo compostos orgânicos e água (Fox e Bala, 2000; Wei *et al.*, 2003). Além dessa propriedade, a surfactina exibe uma excelente estabilidade em variações de pH, temperatura e força iônica (Desai e Banat, 1997). Uma grande variedade de isoformas e homólogos da surfactina foram encontrados. Ela se apresenta geralmente como heptapeptídeo cuja porção lipídica é comumente composta pelos tipos *n*, *iso* e *anteiso*, que podem variar de 12 a 16 átomos de carbono. O componente principal deste biosurfactante é o ácido 3-hidróxi-13- metil-tetradecanóico (Kluge *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 2008).

Quanto a infecções humanas causadas por *B. pumilus*, são muito raras. Apenas um relato de infecções cutâneas por essa espécie em 3 pastores, 2 dos quais eram membros da mesma família. As lesões pareciam ter uma morfologia semelhante à de lesões cutâneas de antraz. Após tratamento adequado todos eles foram curados. Os relatos indicam ainda que essas lesões não foram originalmente causada por *B. pumilus*, esse só apareceu alguns dias após a lesão ter acontecido (Tena *et al.*, 2007). Dois casos de bacteremias associadas a essa espécie em pacientes tratados na Divisão de Hematologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Uludag, foram também reportados (Ozkocaman *et al.*, 2006). Um incidente envolvendo três pessoas acometidas de intoxicação alimentar com arroz causada por *B. pumilus* também foi relatado. Ao se avaliar as causas dessa intoxicação, ficou claro que essa espécie produz um complexo de lipopeptídeos conhecidos como pumilacidina, sendo sua produção mais elevada a 15° C, que ocasionou o incidente. Também não foram reportadas vítimas fatais no evento (From *et al.*, 2007).

É indiscutível diante desses fatos que a espécie avaliada nesse trabalho apresenta grande potencial de biorremediação. Porém, os casos doenças que foram reportadas a elas associadas, acabam sendo um fator negativo quanto ao uso dessa espécie em processos de biorremediação. Mas, ainda assim, seu uso é bastante recomendado, seja para estudo como modelos de degradação de xenobióticos ou para uso efetivo dessa espécie na biorremediação. Sem contar que derrames de petróleo podem acontecer em ambientes inóspitos, onde a utilização dessa espécie não apresentaria o menor risco a saúde humana. Alguns relatos indicam a utilização eficaz dessa espécie na degradação de diversos compostos em ambientes extremos com altos ou baixos níveis de temperatura, pH, salinidade e pressão

atmosférica (Margesin e Schinner, 2001). Um outro aspecto favorável a proposição das amostras de *B. pumilus* estudada nesse trabalho em processos de biorremediação, é o fato dessa terem sido isoladas do ambiente, sendo portanto, integrante da microbiota ambiental.

5.2. PERFIL DE CRESCIMENTO DE *B. pumilus*

A taxa de crescimento bacteriano, definida como variação do número de células por unidade de tempo, apresenta variações distintas de acordo com o tempo de cultivo, tornando possível a divisão da curva de crescimento em quatro fases: fase *lag*; fase *log* ou exponencial; fase estacionária e fase de declínio ou de morte celular (Tortora *et al.*, 2000). O recurso habitual para o monitoramento e determinação dessas fases consiste em fazer medições da absorção ou dispersão da luz através de uma cultura em meio líquido por meio de equipamentos fotoelétricos (espectrofotômetros) em um determinado comprimento de onda e em intervalos de tempo regulares. Os dados obtidos de densidade ótica podem ser utilizados para construção de uma curva padrão de crescimento (Assis, 2007).

Com base nisso, foi determinado nessa etapa do trabalho o padrão de crescimento de *B. pumilus* na presença dos xenobióticos petróleo e diesel e também em extrato de levedura (figura 04)

Usando extrato de levedura como fonte de carbono, *B. pumilus* teve início da fase exponencial antes de 2h de cultivo e término em 6 horas de cultivo, sendo que nesse tempo a biomassa total registrada foi de 0,657 (OD₆₀₀) (figura 4A).

O uso do petróleo como fonte carbono por *B. pumilus* promoveu o crescimento em nível exponencial com início da fase exponencial entre 6h e 12h de cultivo e término em 48 horas, sendo a biomassa total registrada para esse período igual a 0,517 (OD₆₀₀). Após a fase exponencial o crescimento ficou praticamente estagnado até 60 horas, logo após foi observado novamente crescimento. Esse evento é um forte indicativo do crescimento diáuxico apresentado pela espécie *B. pumilus* quando utiliza petróleo como fonte de carbono (figura 4B). A fase exponencial para os cultivos que utilizaram diesel como fonte de carbono teve início entre 6h e 12h de cultivo e término em 54h. Foi verificado nesse período produção de biomassa igual a 2,28 (OD₆₀₀)

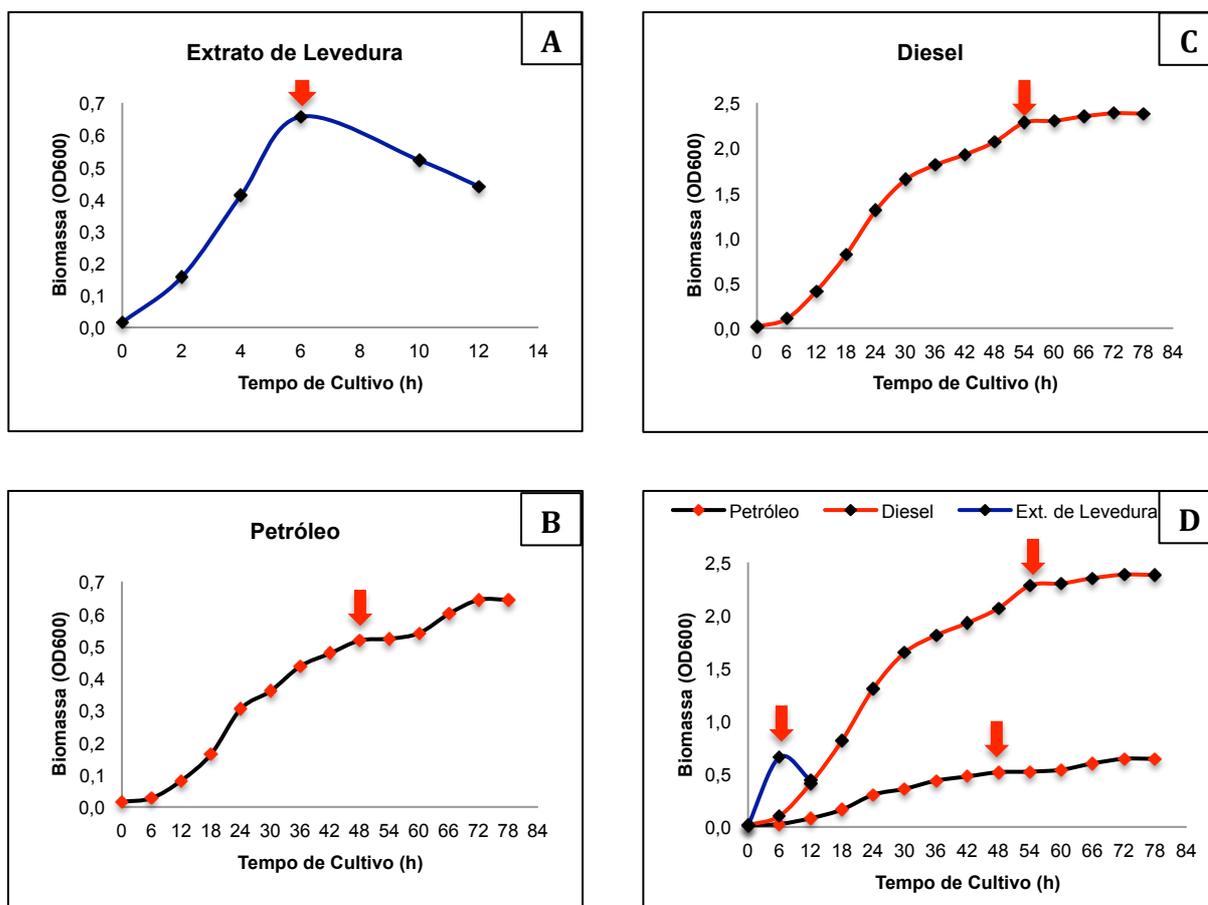


Figura 4: Perfil de crescimento de *B. pumilus* em Extrato de Levedura (A), Petróleo (B), Diesel (C) e Comparação entre as três condições (D). Cultivo feito em meio BH, pH 7,5, a 30°C, sob agitação de 150 rpm. (A) coleta de pontos realizados a cada 2h. (B e C) coleta de pontos realizados a cada 6h.

Ao comparar o crescimento de *B. pumilus* na presença de xenobióticos e extrato de levedura observa-se que em diesel o crescimento foi cerca de 4,5x mais eficiente do que em petróleo (OD₆₀₀ 0,517) e cerca de 3,5x mais eficiente do que em extrato de levedura (OD₆₀₀ 0,657). Na comparação petróleo e extrato de levedura, a vantagem foi registrada para a utilização de extrato de levedura como fonte carbono, que se mostrou 1,2x mais eficiente do que o petróleo na produção de biomassa de *B. pumilus*. Quanto ao início da fase exponencial nas condições, foi observado início praticamente simultâneo para petróleo e diesel (6 horas) e em um tempo inferior a 2 horas para extrato de levedura. Em nenhuma das três fontes de carbono foi observado alteração na coloração do meio que sugerisse a produção de pigmento pela espécie.

Diversas espécie do gênero *Bacillus* têm sido descritas com capacidade de

produzir uma grande variedade de pigmentos (Hullo *et al.*, 2001). Em *B. subtilis* o pigmento produzido apresenta cor marrom (Khaneja *et al.*, 2010) e outras cores também foram documentadas. Outros exemplos incluem um *B. megaterium* que produz pigmento vermelho (Mitchell *et al.*, 1986), pigmento vermelho e cinza para *B. atrophaeus* (Nakamura, 1989; Fritze e Pukall, 2001). A pigmentação variando de amarelo a laranja foi encontrado em várias espécies, incluindo, *B. indicus* (Suresh *et al.*, 2004), *B. cibi* (Yoon *et al.*, 2005) *B. vedderi* (Agnew *et al.*, 1995), *B. jeotgali* (Yoon *et al.*, 2001) *B. okuhidensis* (Li *et al.*, 2002), *B. clarkii* (Nielsen *et al.*, 1995), *B. pseudofirmus* (Nielsen *et al.*, 1995) e *B. firmus* (Ruger e Koploy, 1980). O *B. pumilus* por sua vez produz um pigmento de cor de laranja avermelhado, solúvel em água (Khaneja *et al.*, 2010). Porém sua produção é um processo extremamente regulado, pois depende da fase de crescimento, temperatura e do meio (Manzo *et al.*, 2013).

Em um trabalho envolvendo a produção de pigmentos em *B. pumilus*, detectou-se uma forte indução de pigmento, apenas 8-10 horas depois que as células entraram na fase estacionária de crescimento em 37°C em meio LB. Embora a cepa (SF214) tenha sido descrita como mesófila e a sua temperatura ótima de crescimento 37°C, a máxima produção do pigmento foi observada a 25°C. Em comparação com células cultivadas em 25°C, uma ligeira diminuição da produção de pigmento foi observada a 30°C, ao passo que mais de 2 vezes e cerca de 6 vezes a diminuição da síntese foi observada a 37°C e a 42°C, respectivamente (Manzo *et al.*, 2013).

Embora haja indicativo da produção de pigmento a 30°C, esse evento com já mencionado, não foi verificado neste trabalho, o que indica que a presença de xenobiótico pode ter interferido nesse processo. Os cultivos usando extrato de levedura como fonte de carbono não foram monitorados tempo suficiente após o fim da fase exponencial, conforme sugerido por Manzo e cols. (2013), para que se detectasse a presença de pigmento.

Quanto aos tempos de atingimento do fim da fase exponencial Bueno e cols. (2010) defendem que o máximo crescimento das espécies do gênero *Bacillus* ocorre em 12 horas. Após esse período o crescimento permanece constante (fase estacionária) até 72 horas, com posterior declínio. Esse comportamento não foi observado para essa *B. pumilus* em nenhuma das três condições avaliadas neste trabalho.

O crescimento de *B. pumilus*, linhagens 133S-B e NI 114R-O, em meio

mineral com diesel (1%) foi avaliado em por Rodríguez-Rodríguez e cols. (2012) durante 10 dias. De acordo com os autores foram observados aumentos constantes nos níveis de produção de surfactantes por essa espécie, chegando a atingir níveis máximos de emulsificação acima de 60%. Como essas taxas de emulsificação se mantiveram crescentes, isso é um indicio de que o crescimento bacteriano se manteve ao longo de todo o experimento, havendo ao final células ativas produtoras de biossurfactante. Os níveis de emulsificação de óleo diesel por *B. pumilus* (L4) foram também avaliados por Bento e cols. (2005) e foi observado níveis próximos de 50% após 7 dias de experimento. Estes resultados indicam mais uma vez que essa bactéria conseguem utilizar o diesel como fonte de carbono e são capazes de produzir biossurfactante por vários dias após o inicio do cultivo. Dados relativos a biomassa bacteriana e período da transição de fases de crescimento não foram relatados nesses experimentos.

Para o crescimento de *B. pumilus* (28-11) em meio contendo petróleo (0,1%) como fonte carbono Calvo e cols. (2004) identificaram mudança da fase exponencial para estacionária em apenas 24 horas após o inicio do cultivo. Em comparação com os dados apresentados nesse trabalho isso é um indicativo de que a concentração de petróleo (1,3%) influenciou diretamente na mudança de fases, uma vez que o mesmo evento no nosso caso só foi observado um dia depois (48h).

De acordo Schlegel (1997), muitas espécies bacterianas apresentam crescimento diáuxico. Em face ao esgotamento de um dado composto/nutriente que a bactéria vinha utilizando, ela passa a utilizar um segundo composto presente no meio, necessitando para essa transição de um período de adaptação que muitas vezes reflete redução nas taxas de multiplicação celular. Neste trabalho o crescimento de *B. pumilus* em diesel (30h) não foi totalmente interrompido, e portanto, não sendo considerado um evento de diauxia. Porém, em petróleo (48h) o crescimento foi interrompido por 12h, o que sugere maior necessidade de adaptação por parte da bactéria para metabolizar o novo composto.

Ainda relacionado ao diauxismo apresentado por *B. pumilus* cultivado da em petróleo (60h) esse comportamento pode estar diretamente relacionado aos níveis de produção de surfactina. Segundo Slivinski *et al.*, (2012), um aumento significativo na produção desse biossurfactante ocorre entre 30-40 horas do inicio do cultivo dessa espécie em meio líquido, atingindo produção máxima em 50-60 horas. Temperaturas de cultivo em torno de 25-30°C contribuem também para o aumento

na produção de surfactina nesse período. Isso sugere que para os nossos ensaios em petróleo, quando as células começariam a entrar na fase estacionária (60h de cultivo), coincidindo com a escassez do composto que elas vinham utilizando como fonte de carbono, uma maior produção de surfactina estimulou novamente o crescimento ao facilitar a utilização de outros xenobióticos à ação desses microorganismos, promovendo assim o crescimento diáuxico observado em nosso experimento.

5.3. RENDIMENTO PROTÉICO

O rendimento de proteínas totais para a espécie *B. pumilus* cultivadas em petróleo, diesel e extrato de levedura foi avaliada e os resultados obtidos estão descritos na tabela 6. O rendimento protéico obtido foi de 0,017, 0,009mg e 0,022mg.mL⁻¹ na presença extrato de levedura, petróleo e diesel, respectivamente, como fonte de carbono. O que demonstra que o rendimento protéico de *B. pumilus* foi cultivado na presença de diesel foi cerca de 2,4 x maior que em petróleo e 1,3x maior do em extrato de levedura. O rendimento em extrato de levedura foi quase 2,0x maior do em petróleo.

Tabela 6. Rendimento médio de proteína de *B. pumilus* em cada condição. Cultivo feito em meio BH, pH 7,5, a 30°C, sob agitação de 150 rpm.

Espécie	Condição	Rend. (mg)*	mg.mL ⁻¹ **	Cultivo(h) ***
<i>B. pumilus</i>	Ext. Levedura (0,1%)	2,540	0,017	06
	Petróleo (1,3%)	1,328	0,009	48
	Diesel (1,3%)	3,240	0,022	54

(*) – Rendimento médio protéico para cultivos em 150mL de meio de cultura; (**) - Rendimento médio protéico em mg por mL de meio de cultura; (***) – Final da fase exponencial onde foi feita extração.

A comparação de rendimento protéico com a quantidade de biomassa produzida para *B. pumilus* (figura 5B) indica que quanto maior a biomassa produzida maior rendimento protéico. Porém, os dados não sugerem rendimento diretamente proporcional a quantidade de biomassa, uma vez que por exemplo, para condição diesel que produziu biomassa cerca de 3,5x maior que na condição extrato de levedura, o rendimento protéico foi apenas aproximadamente 1,3x. O mesmo é observado para extrato de levedura e petróleo com diferenças em relação a biomassa de apenas 1,3x, porém com diferença no rendimento protéico de

aproximadamente 2x.

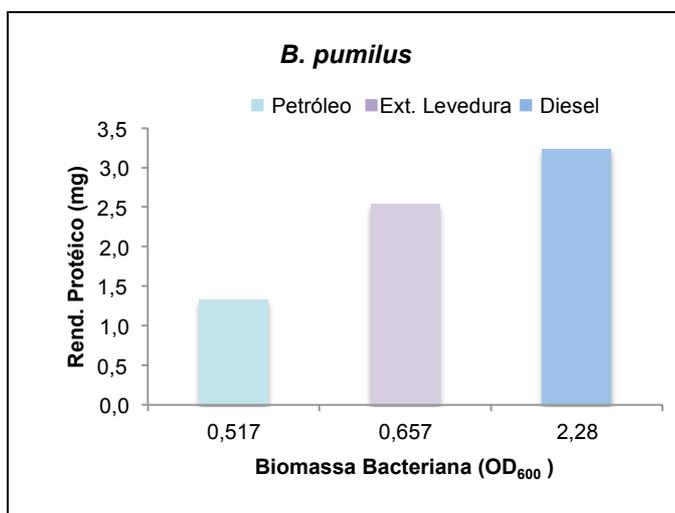


Figura 5. Comparação entre a biomassa bacteriana produzida na diferentes fontes de carbono e o rendimento protéico obtido em *B. pumilus*. Os dados se referem ao rendimento bruto obtido em 150mL de meio de cultura. A dosagem de proteínas totais foi realizada por meio Kit BSA (*BCA Protein Assay Reagent Pierce*). Tempo de cultivo de 6, 48 e 54h para *B. pumilus* em extrato de levedura, petróleo e diesel respectivamente.

A produção de proteínas totais de *B. pumilus* em diesel 1% também foi avaliada por Meyer (2011). Os resultados mostraram que a produção de proteínas, em 54 h, foi de aproximadamente $0,04\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Estes dados são quase duas vezes superior ao observado para *B. pumilus* ($0,022\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) nos nosso experimentos.

Dados relacionados ao rendimento protéico de *B. pumilus* em petróleo não foram encontrados. Porém o crescimento dessa espécie em $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de pireno, composto presente tanto em diesel quanto em petróleo, mostrou produção de cerca de $1,2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ já no primeiro dia de cultivo, sofrendo pouca variação ao longo de mais três dias (Khanna *et al.*, 2012). Para outras espécies do gênero *Bacillus* são relatados algumas informações a respeito de biomassa total produzida utilizando-se petróleo como fonte de carbono. Por exemplo, *B. subtilis* consegue produzir cerca de $0,6\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteínas quando incubado com 2% de petróleo a 55°C por 72h (Das e Mukherjee, 2006). *B. methylotrophicus* produz cerca de $0,4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteínas a 35°C , por 48h, 2% de petróleo (Chandankere *et al.*, 2014) Esses resultados demonstram que a produção de biomassa bacteriana é influenciada pela concentração do óleo presente no meio de cultivo, tempo e temperatura de incubação, além é claro da habilidade em utilizar o petróleo como fonte de carbono.

5.4. PERFIL PROTEÔMICO (2D-PAGE) DE *B. pumilus* CULTIVADO EM XENOBIÓTICOS E EM EXTRATO DE LEVEDURA

O perfil validado de *B. pumilus* para essa condição de extrato de levedura apresentou 159 *spots* (figura 6A). Ao analisarmos esse perfil, percebe-se padrão de distribuição das proteínas ao longo do gradiente de pH restritas a faixa 3-7. Quanto a massa molecular, percebe-se uma ausência de proteínas menores (10-30kDa), pois como se observa no gel todas elas, exceto por algumas poucas, estão concentradas praticamente na metade superior do gel, o que demonstra que tais proteínas tem tamanhos variando de 40-120kDa. Alguns *spots* se apresentam em níveis de intensidade maior do que a maioria, indicando produção em maior escala das proteínas presentes nesses *spots*.

O perfil de *B. pumilus* em diesel (figura 6B) apresentou um total de 154 *spots*. A análise do perfil validado dessa condição revela que as proteínas expressas por tal bactéria também estão restritas a faixa de pH 3-7. Quanto ao tamanho, é observado distribuição em faixas que variam entre 10 -120kDa.

Para o perfil de *P. pumilus* em petróleo apresentou 223 *spots* (figura 6C). A análise demonstra a presença de uma quantidade bastante significativa de *spots* com intensidade mais elevada. Quanto ao perfil de migração em relação ao gradiente de pH percebe-se a maioria das proteínas centradas em uma faixa bem mais restrita de pH (4-6), contudo é possível verificar a presença de proteínas em toda a faixa do gradiente de pH, indicando uma maior versatilidade dessas proteínas quanto as suas zonas de pl. O padrão de migração quanto a massa molecular revela a presença de proteínas de todos os tamanho, variando de 10 a 120kDa, e em quantidades bastante semelhantes.

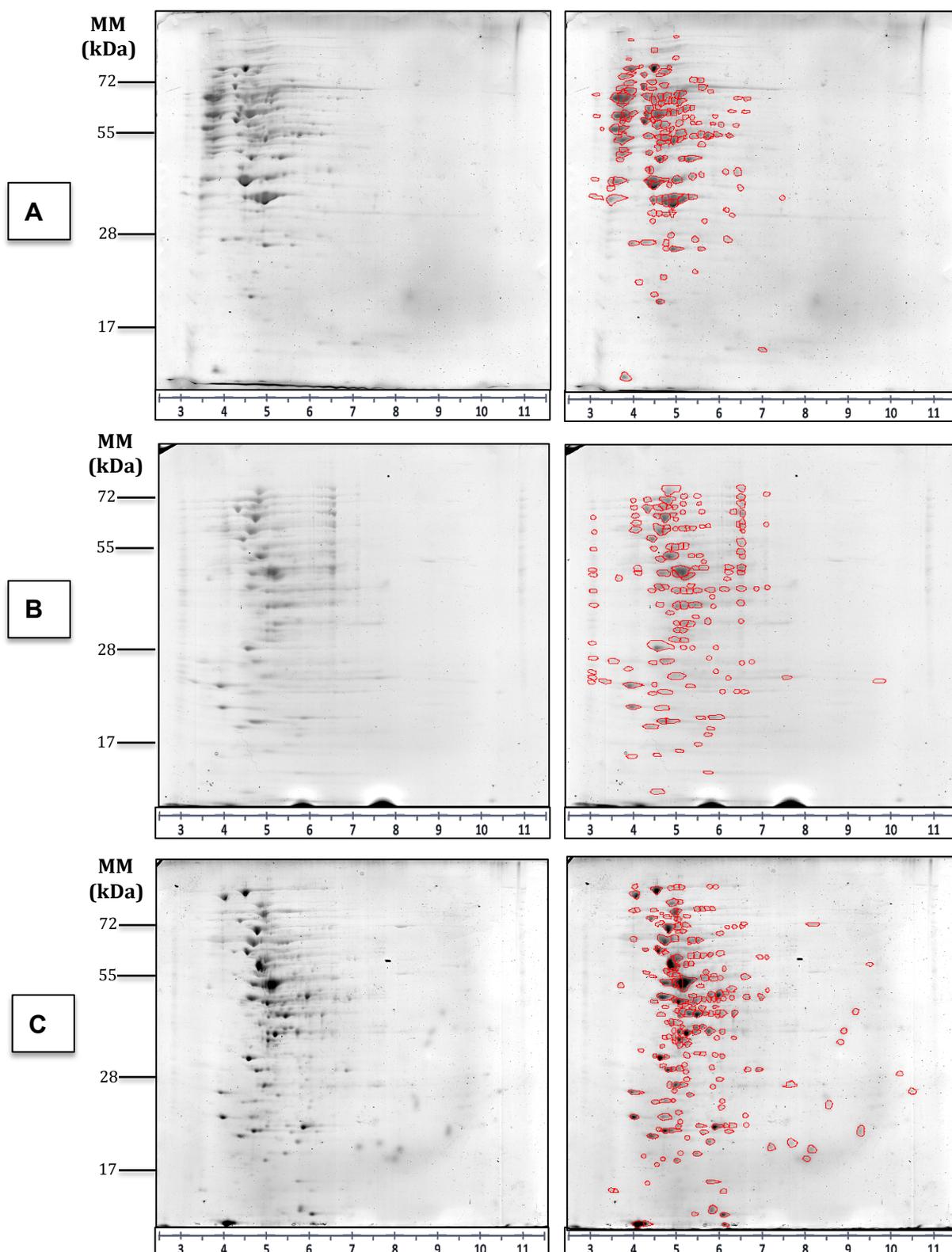


Figura 6: Perfis proteômicos validados para *B. pumilus*: (A) Extrato de Levedura; (B) Diesel; (C) Petróleo. Para todas as condições foram usados 250 μ g de proteínas; Primeira dimensão feita em faixa de pH 3-11; Segunda dimensão em SDS-PAGE 12%; coloração em azul de Comasse blue G-250; géis editados no software *ImageMaster Platinum 6.0* estão representados à direita na figura.

5.4.1. Comparação entre os perfis proteômicos de *B. pumilus*

Os perfis proteômicos validados para essa espécie também foram submetidos a comparações entre si a fim de que fossem determinadas semelhanças e diferenças entre o padrão de migração das proteínas entre as condições. Inicialmente foram feitas as comparações entre o perfil extrato de levedura como os perfis de petróleo e diesel, e finalmente a comparação entre os perfis de petróleo e diesel.

A primeira comparação (figura 7A), feita entre os perfis extrato de levedura (159 *spots*) e diesel (154 *spots*), indicam diferenças bastante visíveis no padrão de migração das proteínas nesses géis. Enquanto que no gel de diesel temos proteínas distribuídas quanto a massa molecular de forma mais ampla no gel (no sentido vertical) , no perfil extrato de levedura nota-se a ausência de proteínas como massas moleculares menores, restringindo a distribuição basicamente a parte superior do gel. A migração quanto ao pI em ambos os casos mostra praticamente todas proteínas reclusas a faixa de pH 3-7. Quanto a intensidade dos *spots* o perfil para extrato de levedura se destaca, com alguns *spots* apresentando intensidade acima da média. No perfil para diesel também percebe-se alguns *spots*, embora menor número, com notável intensidade. A similaridade entre os dois perfis foi avaliada em 32,9%, o que indica que entre os *spots* presentes o *software* considerou que apenas 50 deles eram comuns aos dois géis.

Em relação a comparação do perfil proteômico de extrato de levedura (159 *spots*) com o perfil de petróleo (figura 7B), a análise revelou similaridade igual a 36,4%, ou seja, apenas 57 *spots* foram indicados com comuns as duas condições. A diferença quanto a quantidade de *spots* presentes nos dois géis também chama a atenção. O perfil para diesel apresenta cerca de 66 *spots* a mais quando comparado ao perfil obtido para a condição extrato de levedura. Quanto ao pI observa-se um padrão parecido, a maioria das proteínas confinadas a faixa de 3-7, como diferencial de que para o gel de petróleo é possível verificar *spots* na faixa de 8-11, ainda que em pequenas quantidades. A distribuição quanto a massa molecular dessas proteínas segue basicamente aquilo que já foi descrito anteriormente para a comparação como gel de diesel. *Spots* com maiores intensidades são observados nas duas condições com destaque para o perfil de petróleo. Tais *spots* nessa condição aparecem distribuídos verticalmente por quase todo o gel.

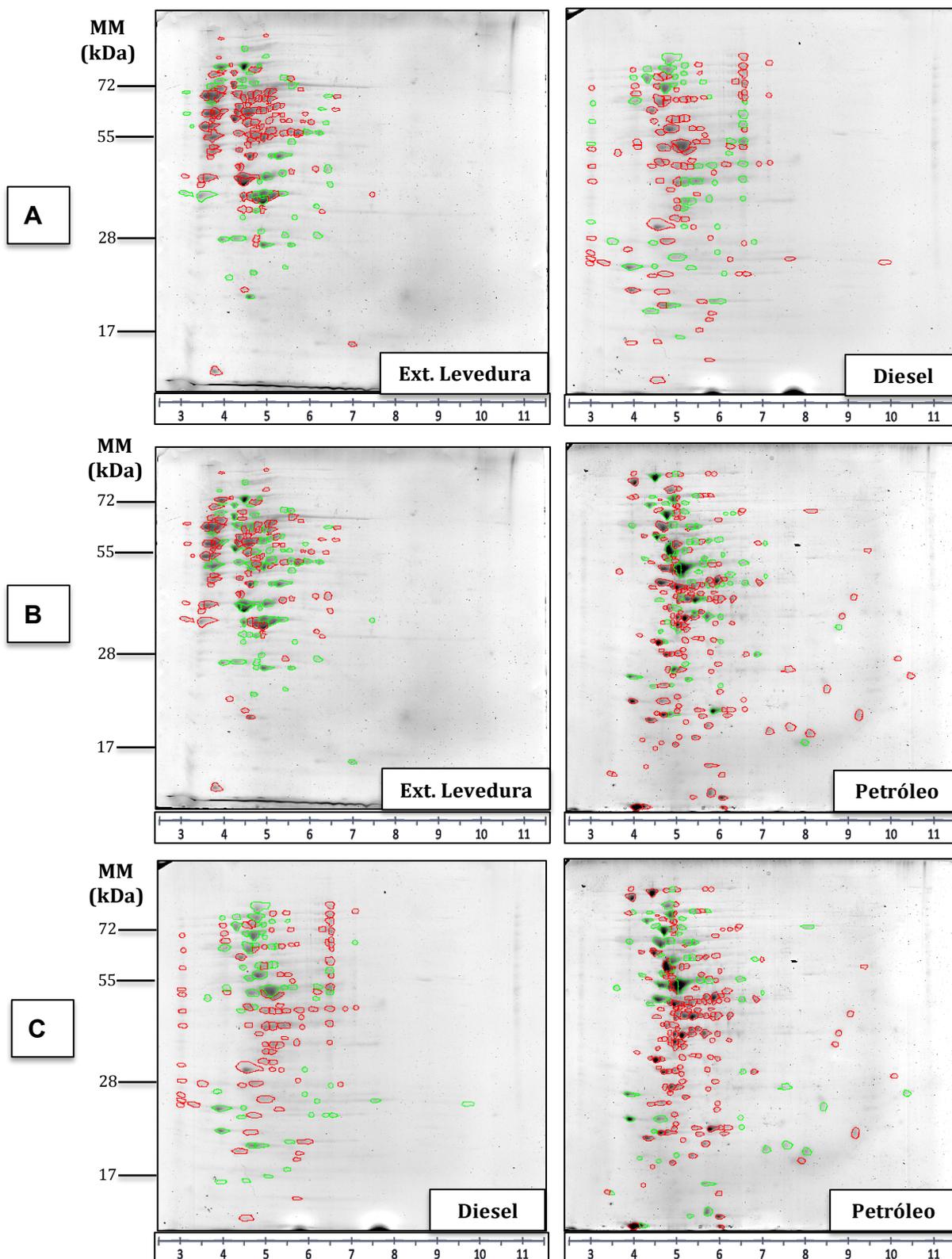


Figura 7. Comparação dos perfis de *B. pumilus* entre as diferentes fontes de carbono. (A) – Extrato de Levedura x Diesel; (B) – Extrato de levedura x Petróleo; (C) – Diesel x Petróleo. Spots destacados em verde foram considerados comuns as duas condições e em vermelho exclusivos de cada condição. O software utilizado foi o *ImageMaster Platinum 6.0*.

Para a comparação entre os perfis de diesel (154 *spots*) e petróleo (223 *spots*), a similaridade determinada foi de 30,7%, portanto, 68 *spots* considerados comuns as duas condições. A diferença entre o número de *spots* apresentado pelos dois perfis foi de quase 70, sendo o perfil para petróleo o que apresentou maiores quantidades. A análise quanto ao padrão de migração em relação a massa molecular revela um padrão de distribuição muito parecido para os dois perfis. Em relação ao pl, verifica-se a presença de alguns *spots* na faixa 8-11 para perfil de petróleo e também a quantidade de *spots* na faixa de pH igual 3-4 é bem maior no perfil de diesel do que em petróleo.

No quesito intensidade dos *spots* o perfil validado para petróleo se sobressai em relação ao perfil de diesel. Aproximadamente 18 *spots* com intensidade mais elevada é vista no perfil de petróleo e apenas 8 com intensidade maior são observados no perfil de diesel. A maioria desses *spots* mais intensos foram marcados como exclusivos para a condição em que eles aparecem, indicando mais uma vez expressão diferencial para essas duas condições. Resumo de todas as comparações que foram realizadas, bem como a quantidade de *spots* presentes em cada condição podem ser verificado na tabela 7.

Tabela 7. Níveis de similaridades apresentado pelas comparações entre os perfis de *B. pumilus*. Níveis de similaridades obtidos pelo *software ImageMaster Platinum 6.0*. Comparações para mesma espécie em fontes de carbono diferente.

Condição	Nº de Spots	<i>B. pumilus</i>		
		Extrato de Levedura	Diesel	Petróleo
Extrato de Levedura	159	-	32,9%	36,4%
<i>B. pumilus</i> Diesel	154	-	-	30,7%
Petróleo	223	-	-	-

5.5. ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA *B. pumilus*

A análise por Espectrometria de Massas para a identificação das proteínas presentes nos perfis validados foi feita com 96 *spots* da espécie *B. pumilus*.

5.5.1. *Spots* Seleccionados

Na tabela 8 é apresentado o total de *spots* seleccionados para cada uma das quatro condições, bem como as marcações definidas para diferenciação entre eles.

Tabela 8. Identificação dos *spots* seleccionados para espectrometria de massas. Adotado como parâmetro para classificação (ocorrência no perfil) a comparações obtidas pelo *ImageMaster Platinum 6.0*.

Identificação do <i>spot</i>	Ocorrência nos perfis	Total seleccionado
01 a 10	Comuns a todos	10
11 a 30	Comuns a Petróleo e Diesel	20
31 a 76	Exclusivos de Petróleo	46
77 a 96	Exclusivos de Diesel	20
Total de <i>spots</i> seleccionados		96

Os *spots* classificados como “comuns a todos” (observados em todas as condições experimentais) foram recortados do gel que corresponde ao perfil de extrato de levedura, os “comuns a petróleo e diesel” e os “exclusivos de petróleo” foram recortados do gel do perfil de petróleo e finalmente os *spots* classificados como “exclusivos de diesel” foram recortados do gel do perfil de diesel. Os *spots* seleccionados podem se visualizados na figura 8.

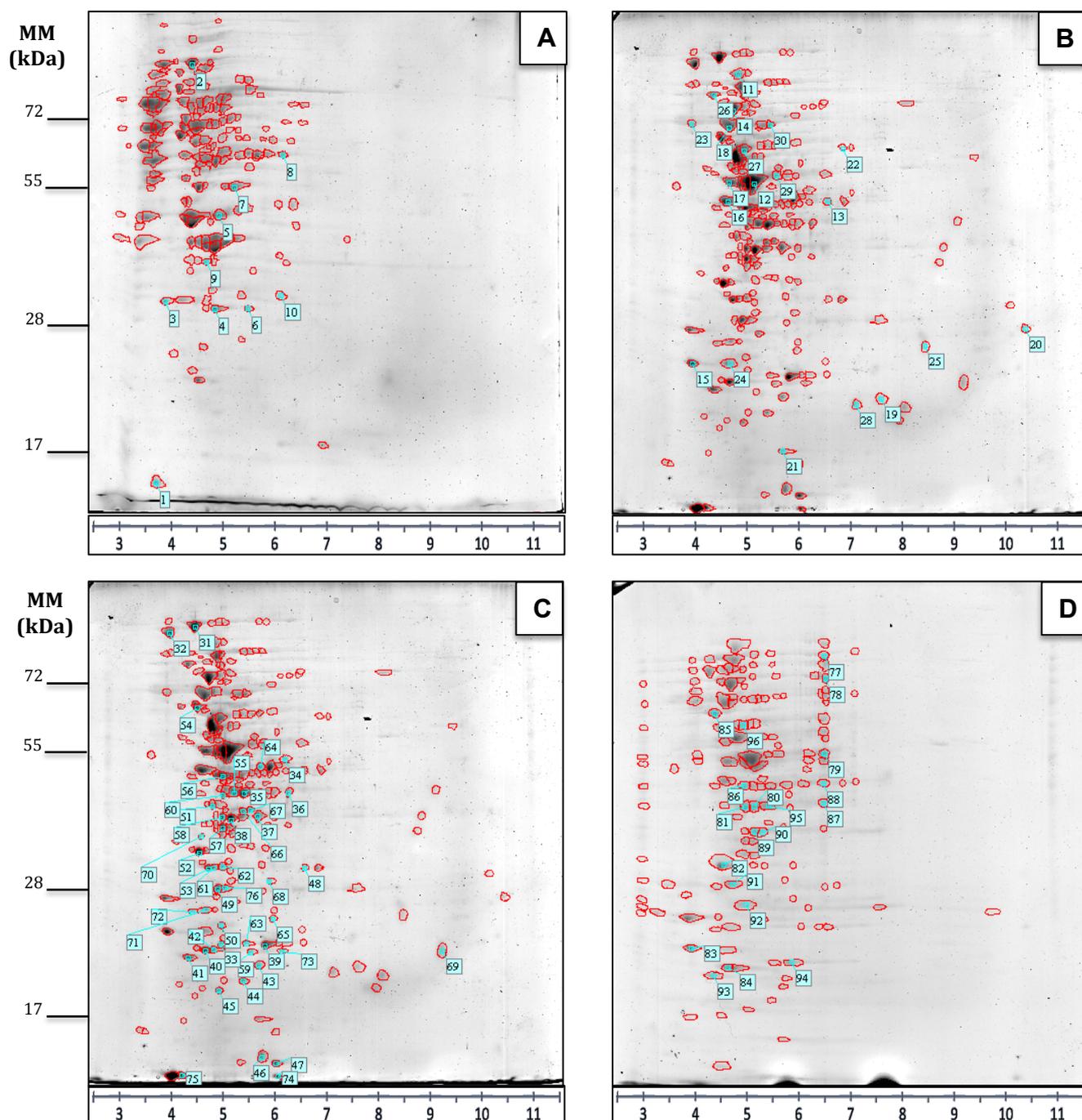


Figura 8. Spots selecionados para Espectrometria de massas. (A) Spots comuns a todos; (B) Spots comuns a petróleo e diesel; (C) Spots exclusivos de petróleo; (D) Spots exclusivos de diesel.

5.5.2. Proteínas Identificadas para *B. pumilus* na diferentes fontes de carbono.

Para identificação das proteínas, como proposto em Material e Métodos, foram utilizados o PMF (MS) e a fragmentação de peptídeos. Contudo, por problemas relacionados ao equipamento, os resultados obtidos para a fragmentação não foram conclusivos. Portanto, a identificação das proteínas foi realizada apenas por PMF. Diversos trabalhos usam apenas PMF para identificação de proteínas, inclusive alguns relacionados a identificação de proteínas envolvidas na degradação de xenobióticos (Navarro-Llorens *et al.*, 2005; Deneff *et al.*, 2006; Agulló *et al.*, 2007; Patrauchan *et al.*, 2008).

Dos 96 *spots* selecionados para identificação por espectrometria de massas 57 *spots* apresentaram resultados positivos na identificação de proteínas. Desse total 54 proteínas foram identificadas, sendo que em três casos foi observado que dois *spots* estavam relacionados a mesma proteína. Essas proteínas identificadas foram agrupadas de acordo com as funções desempenhadas por elas. Elas foram agrupadas em 13 grupos funcionais distintos: Biossíntese de Proteínas, Manutenção e Reparo de DNA, Formação de Biofilme e Revestimento Celular, Reguladores de Transcrição, Transcrição gênica, Esporulação e Resposta a estresse, Transporte, Peptidases, Metabolismo Energético e Biossíntese da ATP, Biossíntese de aminoácidos e Nucleotídeos e Outras Funções (tabela 9). São apresentados também dados a respeito de massa molecular e pI (experimental e teórico) e o *spots* correspondente o perfil proteômico de *B. pumilus* ao qual ela esta associada.

Tabela 9. Proteínas identificadas por Espectrometria de Massas. Identificação por PMF (*Peptide Mass Fingerprint*), banco de dados das buscas MASCOT/SwissProt. Parâmetros das buscas: banco de dados para espécie *B. subtilis*; tolerância de 0,3Da; cisteínas carbamidometiladas e metioninas oxidadas.

Spot	Proteínas Identificadas	Massa (kDa) e pI				Ocorrência nos perfis
		Experimental		Teórico		
Biossíntese de Proteínas						
2	Fator de Elongação G	76,74	4,80	76,47	4,81	Comum a todos
9	Fator de Elongação Ts	24,31	5,20	32,20	5,31	Comum a todos
20	50S Proteína robossomal L1	24,97	9,38	24,94	9,37	Comum a Petróleo e Diesel
34	Cisteinil-tRNA sintase	50,84	5,26	53,60	5,27	Exclusivo de Petróleo
37	Aspartil/glutamil-tRNA Amidotransferase subunidade B	53,40	5,00	53,42	5,00	Exclusivo de Petróleo
50	Fator de reciclagem de Ribossomos	20,75	5,64	20,84	5,35	Exclusivo de Petróleo
69	50S proteína robossomal L21	11,55	9,85	11,14	9,73	Exclusivo de Petróleo
84	Protein-disulfide isomerase	22,73	4,83	26,82	4,61	Exclusivo de Diesel
92	16S rRNA metiltransferase GidB	26,68	6,03	27,05	6,62	Exclusivo de Diesel
54, 85	Trigger factor	49,78	4,68	47,52	4,40	Comum a Petróleo e Diesel
Manutenção e Reparo de DNA						
10	Methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase	18,79	6,75	18,40	6,16	Comum a todos
41	Proteína RecA	37,71	5,05	37,73	5,05	Exclusivo de Petróleo
62	Proteína recombinase RecR	22,23	4,87	21,99	5,13	Exclusivo de Petróleo
48	DNA-3-metiladenina glicosilase	35,78	8,24	38,79	5,99	Exclusivo de Petróleo
67	DNA polimerase IV	44,72	9,30	45,75	8,68	Exclusivo de Petróleo
13	Ribonuclease HIII	34,16	9,67	33,38	9,43	Comum a Petróleo e Diesel
29	Exodeoxiribonuclease VII subunidade maior	50,17	6,74	50,87	9,26	Comum a Petróleo e Diesel
Formação de Biofilme e Revestimento Celular						
11	Glicosiltransferase	35,46	4,86	35,32	4,95	Comum a Petróleo e Diesel
53	UDP-N-acetilglucosamina 1-carboxiviniltransferase	46,78	5,55	46,53	5,40	Exclusivo de Petróleo

82	Fosfato aciltransferase	37,00	8,71	35,75	5,69	Exclusivo de Diesel
87	Penicillin-binding protein	65,59	8,74	65,71	8,65	Exclusivo de Diesel
25, 76	N-acetilmuramico ácido 6-fosfato eterase	32,85	5,50	32,42	5,80	Comum a Petróleo e Diesel
Reguladores de Transcrição						
3	Família LacI de reguladores de transcrição (LacR)	37,60	5,52	37,23	5,42	Comum a todos
28	Família MarR de reguladores de transcrição	18,96	9,19	16,97	7,69	Comum a Petróleo e Diesel
57	Família LysR de reguladores de transcrição	36,59	6,73	35,00	5,97	Exclusivo de Petróleo
60	Phosphate starvation-induced protein	35,51	6,14	35,46	6,42	Exclusivo de Petróleo
68	Família LuxR de reguladores de transcrição	24,00	5,92	24,35	5,54	Exclusivo de Petróleo
73	Família TetR de reguladores de transcrição	21,93	5,09	22,18	6,46	Exclusivo de Petróleo
75	Família XRE de reguladores de transcrição	7,54	6,21	8,77	8,10	Exclusivo de Petróleo
Transcrição gênica						
77	DNA-directed RNA polimerase subunit beta	133,63	5,06	133,96	4,94	Exclusivo de Diesel
Degradação de Xenobióticos						
6	FMN-dependente NADH-azoredutase	22,96	5,17	23,01	5,36	Comum a todos
7	Acetoína dehidrogenase AcoB	24,56	6,55	24,27	6,20	Comum a todos
38	Dioxigenase	37,80	5,40	38,54	5,61	Exclusivo de Petróleo
55	Butirato quinase	39,85	5,77	40,77	5,73	Exclusivo de Petróleo
Esporulação e Resposta a estresse						
8	Sporulation-specific protease YabG	33,46	9,00	33,89	6,95	Comum a todos
71	N-acetilmuramoil-L-alanine amidase	27,13	5,95	27,27	9,20	Exclusivo de Petróleo
93	Peroxiredoxina YgaF	18,21	5,89	17,85	5,71	Exclusivo de Diesel
21	Phage-like element PBSX protein XkdX	6,29	4,50	6,79	4,48	Comum a Petróleo e Diesel
Transporte						
12	ABC transporter ATP-binding protein	65,78	6,92	65,85	6,59	Comum a Petróleo e Diesel
31	Subunidade SecA da Proteína translocase	91,34	6,80	95,34	5,44	

Peptidases						
17	Peptidase T	45,53	4,73	45,73	5,00	Comum a Petróleo e Diesel
22	Dipeptidase PepV	51,30	4,85	51,75	5,02	Comum a Petróleo e Diesel
Metabolismo Energético e Biossíntese da ATP						
18	Mannitol-1-fosfato 5-dehidrogenase	41,20	5,70	40,72	5,03	Comum a Petróleo e Diesel
63, 72	Defosfo-CoA quinase	22,00	5,05	22,73	5,44	Exclusivo de Petróleo
80	Xylose isomerase	50,30	5,75	50,41	5,77	Exclusivo de Diesel
27	F0F1 ATP synthase subunit alpha	55,23	5,49	54,648	5,29	Comum a Petróleo e Diesel
Biossíntese de aminoácidos e Nucleotídeos						
24	Glutamina amidotransferase subunidade PdxT	21,60	5,14	21,47	5,53	Comum a Petróleo e Diesel
33	Fosforibosilaminoimidazole- succinocarboxamide Synthase	26,76	5,24	27,68	5,21	Exclusivo de Petróleo
58	Acetilglutamato quinase	34,59	5,55	27,73	4,65	Exclusivo de Petróleo
61	ATP fosforibosiltransferase subunidade catalítica	23,72	4,72	23,40	4,76	Exclusivo de Petróleo
89	1-pirrolina-5-carboxilato dehidrogenase	56,56	5,50	56,37	5,25	Exclusivo de Diesel
95	Acetolactato sintase subunidade catalítica	62,72	5,32	62,82	5,34	Exclusivo de Diesel
Outras Funções						
52	Porfobilinogénio deaminase	35,10	5,28	34,23	5,54	Exclusivo de Petróleo
66	4-difosfocitidil-2-C-meetil-D-eritritol quinase	32,31	6,02	31,81	6,67	Exclusivo de Petróleo

Ao agruparmos todas as proteínas de acordo com suas funções, podemos verificar maior proporção das proteínas identificadas pertencentes a classe *Biossíntese de proteínas* (19%). A classe *Manutenção e reparo de DNA e Regulação de Transcrição* também se destacam com 13% de todas as proteínas identificadas em cada classe. *Biossíntese de aminoácidos e nucleotídeos* somam 11%. Para *Degradação de Xenobióticos*, *Esporulação e Resposta ao Estresse* e *Metabolismo energético e Biossíntese de ATP* foram identificadas 7% de todas as proteínas para cada uma das condições. Para *Transporte*, *Peptidases* e *Outras funções* tivemos 4% em cada uma delas, e finalmente 2% das proteína identificadas estavam associadas a *Transcrição Gênica* (Figura 9). Passamos a descrever cada uma delas.

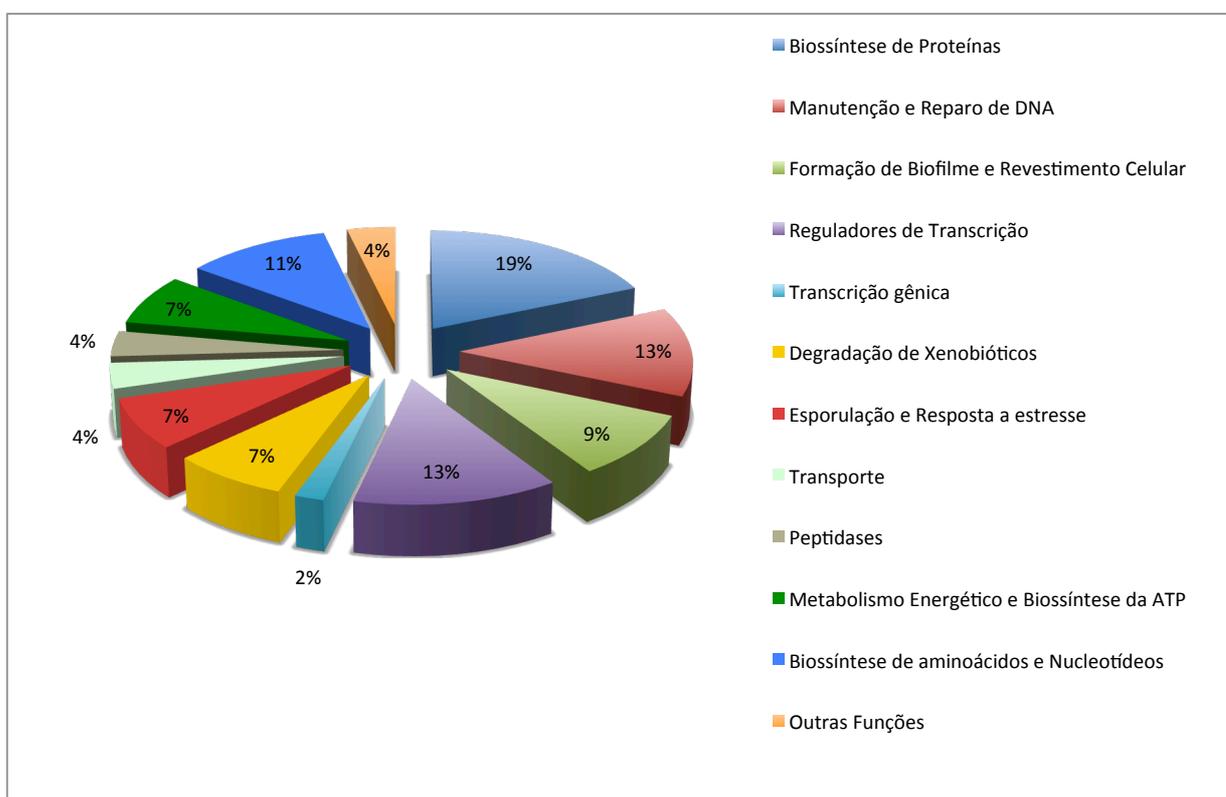


Figura 9. Porcentagem de proteínas identificadas em cada classe.

5.5.2.1. Biossíntese de Proteínas

Foram identificadas 10 proteínas envolvidas na biossíntese de outras proteínas. Desse total, 4 eram relacionadas aos ribossomos, 2 fatores de alongação, 2 proteínas responsáveis pela síntese de tRNAs e 2 responsáveis por modificações

pós-traducionais nas proteínas.

Os **fatores de elongação G** (EF-G) e **Ts** (EF-Ts) atuam no processo de síntese protéica. Juntos eles promovem a translocação ribossomal dependente de GTP durante o alongamento da tradução. O EF-G reage com GTP e aminoacil-tRNA para formar um complexo aminoacil-tRNA-EF-G-GTP. O aminoacil-tRNA é, então, transferido para o sítio A do ribossomo, e o complexo EF-G-GDP é liberado juntamente como fosfato inorgânico. A reutilização de EF-G depende da participação do fator EF-Ts, que desloca o GDP ligado ao EF-G e forma o complexo EF-G-EF-Ts. Quando este complexo encontra um GTP, forma-se um complexo EF-G-GTP, liberando EF-Ts. EF-G-GTP liga outro aminoacil-tRNA e repete o ciclo (Blank *et al.*, 1995).

As **proteínas ribossomais 50S (L1 e L21)** vinculam-se diretamente ao 23S rRNA para formação do complexo ribossomal (Nevskaya *et al.*, 2005). Sabe-se também que as proteínas L1 regulam a sua própria expressão, por ligação aos seus mRNAs, assim, agem também como repressoras de tradução (Köhler *et al.*, 1998). L1 medeia a regulação automática de seus genes por ligação próximo a sequência Shine-Dalgarno do mRNA do operon L11 que codifica as proteínas ribossomais L1 e L11 (Nevskaya *et al.*, 2005).

A proteína **16S rRNA metiltransferase GidB** está relacionado ao processo de resistência aos aminoglicosídeos. Os aminoglicosídeos são antibióticos que atuam diretamente no processo de biossíntese de proteínas causando erros graves de tradução e inibição do processo de translocação do rRNA sob o mRNA (Liou *et al.*, 2014). Estes antibióticos bactericidas ligam-se as regiões altamente conservada do 16S rRNA na subunidade 30S e interferem na decodificação do mRNA. A resistência aos aminoglicosídeos é mediada por uma variedade de mecanismos (Magnet e Blanchard, 2005), entre eles, a metilação ou substituição das bases para diminuição ou perda da afinidade do antibiótico (Liou *et al.*, 2006). A resistência aos aminoglicosídeos por metilação ribossomal foi observado em uma ampla gama de organismos gram-negativos e confere resistência de alto nível para todos aminoglicosídeo disponíveis para o tratamento de infecções sistêmicas, exceto estreptomicina (Wachino e Arakawa, 2012).

Já os **Fatores de Reciclagem de Ribossomos** (RRF) são responsáveis pela separação dos ribossomos do mRNA e do tRNA ao final da biossíntese de proteínas e podem aumentar a eficiência da tradução através da reciclagem de ribossomos de

uma rodada de tradução para outra (Hirokawa *et al.*, 2005). A síntese de proteína é composta de iniciação, alongação e terminação. A reciclagem acontece logo em seguida a essa última etapa, e é catalisada pelos RRFs que desmontam o Complexo Pós-Terminação (PoTC), em mRNA, tRNA e ribossomos (Kiel *et al.*, 2007) e então promovem o reaproveitamento dos ribossomos em outra rodada de tradução. Na figura 10 é ilustrado esse processo de forma detalhada.

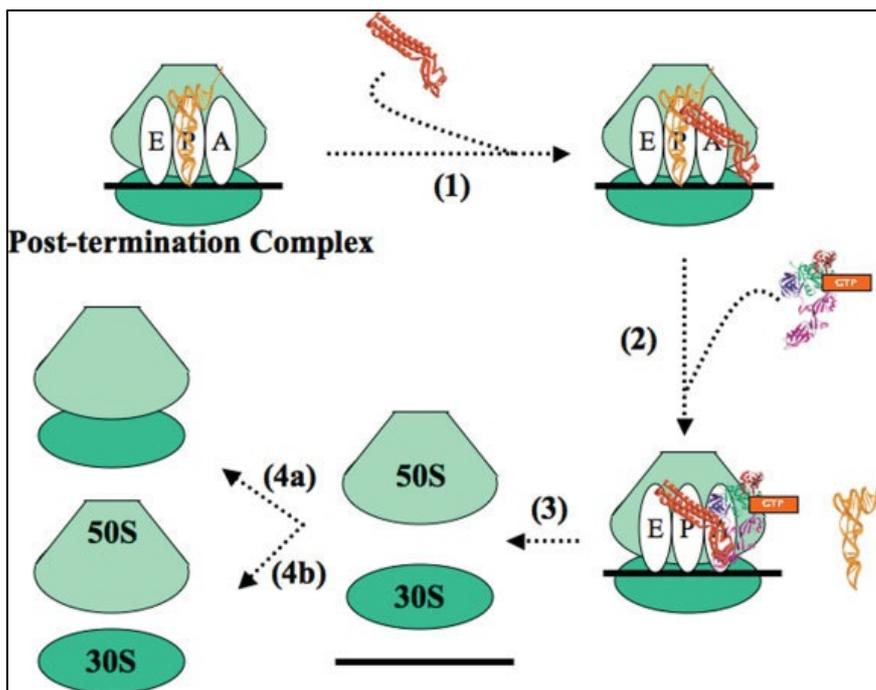


Figura 10. Modelo para desmontagem Complexo Pós-Terminação. Na etapa 1, o RRF se liga ao sítio A do ribossomo de forma ortogonal ao tRNA. Na etapa 2, EF-G se liga, causando uma mudança na posição do RRF e liberando o tRNA. Pela ação da EF-G e RRF, o mRNA é liberado na etapa 4 em suas subunidades 30S e 50S. As subunidades permanecem divididas na ausência de IF-3 (4b), mas na presença de Mg^{2+} as subunidades voltam a se juntar como 70S (4a) (Kiel *et al.*, 2007).

Quanto as **proteínas relacionadas ao tRNAs** identificadas nesse trabalho elas estão envolvidas na síntese de cisteinil-tRNA(cis), aspartil-tRNA(asp) e glutamiltRNA(glu). Já a proteína de modificações pós-traducionais **Protein-disulfide isomerase**, catalisa a formação de ligações dissulfeto nativas de cadeias peptídicas a partir de qualquer forma reduzida ou dissulfureto unidas aleatoriamente. Assim, tióis situados em partes distantes da cadeia polipeptídica podem ser unidos para formar as ligações dissulfeto nativas. A cadeia polipeptídica tem que ser dobrada,

pelo menos em alguma extensão, para que ocorra a conformação nativa da proteína (Kajino *et al.*, 2000).

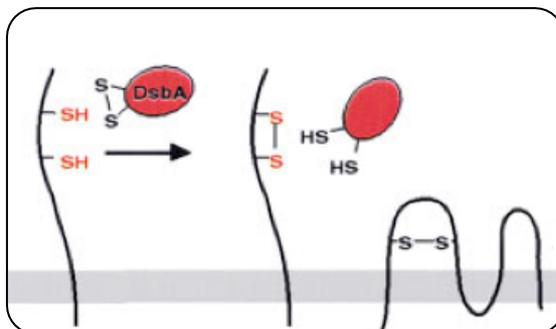


Figura 11. Formação de ligações dissulfeto em proteínas. Adaptado de Huppa e Ploegh (1998).

As proteínas **Trigger factor** geralmente estão localizadas no citosol, associadas às subunidades 50S dos ribossomos. Isso levou à Idéia de que essas proteínas, localizadas perto do local de síntese de proteínas, estariam diretamente envolvidas no dobramento de cadeias de polipeptídeos nascentes, apoiando a Idéia de que *Trigger factor* é um catalisador de dobras ligado aos ribossomos (Göthel *et al.*, 1997).

5.5.2.2. **Manutenção e reparo do DNA**

Além da **DNA polimerase IV** que replica o DNA e apresenta um importante papel de revisora de DNA no sentido 3'→5' (Wagner e Nohmi, 2000), foram identificadas outras proteínas com igual capacidade de fazer reparos no DNA. Algumas agem de modo muito específico, como é o caso da **Methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase**. Esta proteína está envolvida na defesa celular contra os efeitos biológicos de O⁶-metilguanina (O6-MEG) no DNA. O reparo na guanina metilada (figura 12) é feita por estequiometria, transferindo o grupo alquila da posição O⁶ da guanina para um resíduo de cisteína da própria enzima. Esta é uma reação de suicídio, pois a enzima é inativada irreversivelmente (Lim *et al.* 2000).

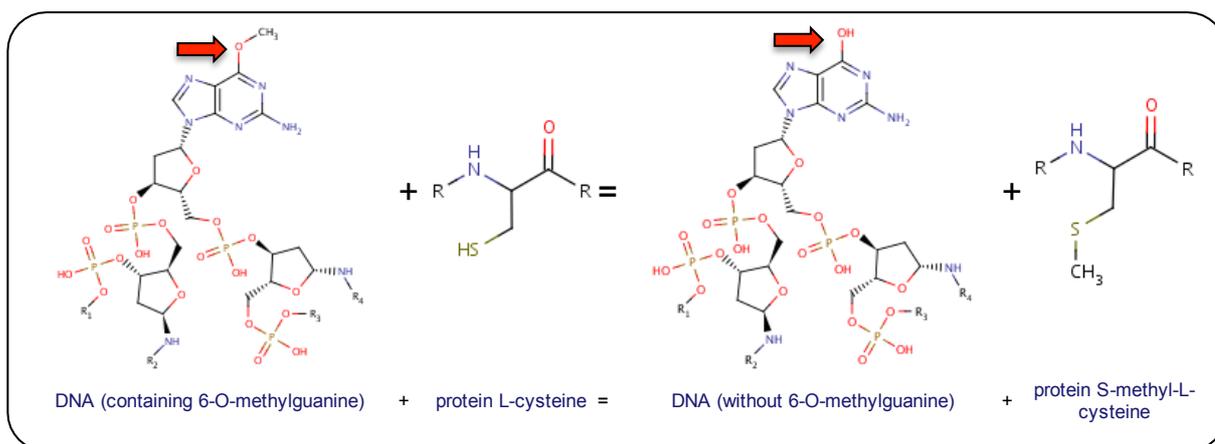


Figura 12. Reação promovida pela enzima *Methylated-DNA--protein-cysteine methyltransferase*. Fonte: Enzyme Database – BRENDA (2014).

A **DNA-3-metiladenina glicosilase**, por sua vez, está envolvida na resposta adaptativa a danos no DNA causados por agentes alquilantes. Ela catalisa especificamente a hidrólise da ligação N-glicosídica da desoxirribose para excisar 3-metiladenina e 7-metilguanina do polímero de DNA danificado pela alquilação (Rubinson *et al.*, 2008).

As **Ribonucleases H** (RNase H) hidrolisam a cadeia de RNA de híbridos de RNA-DNA na presença de cátions bivalentes durante o processo de replicação, transcrição ou simplesmente durante o reparo do DNA e são amplamente presentes em todos os três reinos. RNase de procaríotos são divididos em três grupos, RNase HI, HII e HIII, codificados por *rnhA*, *rnhB* e *rnhC*, respectivamente (Liang *et al.*, 2007).

Exodeoxiribonucleases são proteínas homólogas as APE, que são endonucleases específicas para reparos em regiões do DNA que perderam bases nitrogenadas (sítios APs). Estima-se que mais de 10.000 bases púricas estão perdidas em uma célula a cada dia. Os sítios APs gerados, são potencialmente mutagênicos e citotóxico. Esses sítios são especificamente corrigido pelas endonucleases AP, elas inicialmente reconhecem sítio e então clivam o esqueleto fosfodiéster imediatamente a 5' do sítio AP, deixando livre uma extremidade de nucleótidos 3' - hidroxila e uma desoxirribose 5'-fosfato como terminais (Miyamoto *et al.*, 2013).

A **proteína RecA** é bem conhecida por seu papel na catálise de troca fitas de DNA durante a recombinação homóloga, processo no qual um fragmento de DNA de cadeia simples (ssDNA) é inserido em uma região homóloga de DNA fita dupla

(dsDNA) e um outro ssDNA é liberado. Isso faz da proteína um importante agente de reparo de DNA, visto que recombinação homóloga tem um papel central nesse processo. Onde uma dada região do DNA que necessita de reparo pode ser excisado e trocado por outro fragmento homólogo sem danos. Esta função é essencial para a manutenção da integridade do genoma (Chen *et al.*, 2008)

Uma RecA se liga a DNA fita simples de forma dependente do ATP, então outros monômeros de RecA ligam-se rapidamente em um processo de extensão altamente cooperativo para formar uma nucleoproteína de filamento helicoidal (Sharma *et al.*, 2012). O filamento RecA-ssDNA liga-se a um dsDNA num local secundário com uma ligação fraca e tenta identificar uma região que corresponda à sequência da molécula de ssDNA. Ao encontrar a região de homologia, as fitas são trocadas libertando uma dupla fita reparada e o ssDNA defeituoso (Bianco *et al.*, 1998). A **proteína Recombinase RecR** desempenha essencialmente o mesmo papel (Ayora *et al.*, 1997).

5.5.2.3. **Formação de Biofilme e Revestimento Celular**

Para esse grupo funcional foram identificadas 5 proteínas que estão diretamente envolvidas ou participam da formação do biofilme ou revestimento celular. Entre elas, temos a **Glicosiltransferase**. Esta proteína age como doador de uma unidade de monossacárido (doador glicosídico) para um aceitador de glicosídeo (figura 13) (Schuman *et al.*, 2013). Os substratos aceitadores utilizados por glicosiltransferases são comumente outros açúcares, mas pode também ser lípidos, proteínas, ácidos nucléicos, antibióticos, ou outra molécula pequena. Embora a transferência de glicosídeo ocorra mais frequentemente ao oxigênio, pode também ocorrer ao azoto (formação de glicoproteínas ligadas a N), enxofre (a formação de Tioglicosídeos em plantas) e de carbono (antibióticos C-glicosídeo) (Lairson *et al.*, 2008) o que gera uma infinidade de produtos oriundo da ação dessas proteínas. Recentemente sua atividade foi relacionada a produção de componentes do exopolissacarídeo (EPS) da matriz extracelular durante a formação do biofilme. O EPS é responsável pela adesão de cadeias de células em feixes, e necessário para manutenção do biofilme (Kearns *et al.*, 2005).

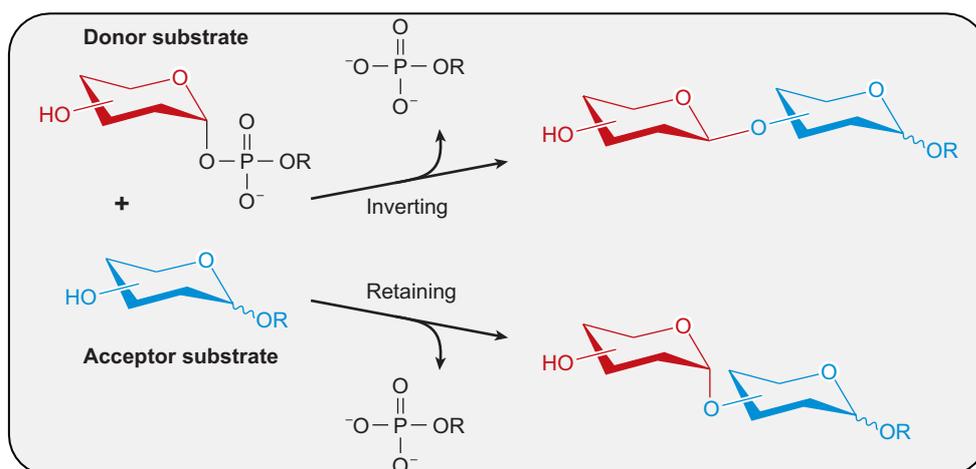


Figura 13. Transferência do grupo glicosídico por inversão ou retenção da estereoquímica anomérica em relação ao dador de açúcar (Lairson *et al.*, 2008).

Quanto a **Proteína de Ligação à Penicilina (PBP)**, ***N*-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase** e ***UDP-N*-acetylglucoamine 1-carboxyvinyltransferase**, apresentam funções que estão interligadas e às associa a processo ligados a polimerização de peptídeoglicanos (mureína), um constituinte da parede celular de bactérias gram-negativas. Os peptídeoglicanos são formado por dois tipos de açúcares (o ácido *N*-acetilmurâmico e a *N*-acetilglucosamina) e alguns aminoácidos (Vollmer *et al.*, 2008), e confere rigidez à parede celular de bactérias, determina sua forma e lhe confere proteção. As proteínas de ligação à penicilina catalisam a polimerização (transglicosilação) e a ligação entre as cadeias de glicanos (transpeptidação) (Sauvage *et al.*, 2008). Quanto ao ***N*-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase**, este atua na conversão do ácido 1,6-anidrido-*N*-acetilmurâmico em *N*-acetilglucosamina-6-fosfato (Uehara *et al.*, 2005), um intermediário de *N*-acetilglucosamina, que por sua vez pode ser usada na formação dos glicanos pela ação de PBPs (Sauvage *et al.*, 2008) ou sofrer ação de ***UDP-N*-acetylglucoamine 1-carboxyvinyltransferase**. Em ocorrendo a segunda opção, a *enzima* irá adicionar a essa molécula fosfoenolpiruvato e torná-la em *UDP-N*-acetyl-3- O-(1-carboxyvinyl)-*D*-glucosamine que via atuar no crescimento celular. Quanto a ***Phosphate acyltransferase***, esta Participa na formação de ácido fosfatídico, o precursor para os fosfolípidos da membrana (Paoletti *et al.*, 2007).

5.5.2.4. **Reguladores de Transcrição**

Nesse grupo foram adicionadas 7 proteínas, muitas delas identificadas como uma família de proteínas, que estão associadas a regulação da expressão de genes que codificam uma proteína ou grupo de proteínas com funções distintas. A primeira delas, o **regulador *lacR* transcrpcionais da família *LacI***, regula negativamente a expressão do gene *ganA* (*lacA*) que codifica para a beta-galactosidase (Weickert e Adhya, 1992). Por sua vez, a **Família *MarR* de reguladores transcrpcionais** é responsável pela regulação de genes relacionados a múltipla resistência a antibióticos (Alekhun e Levy, 1999).

A **Família *LysR* de reguladores transcrpcionais** representa o tipo mais abundante de reguladores no reino procariótico. Os membros desta família têm uma estrutura conservada com um motivo hélice-volta-hélice de ligação ao DNA na sua porção N-terminal e um domínio de ligação ao co-indutor no C-terminal. Apesar de conservação considerável tanto estrutural e funcionalmente, reguladores de transcrição do tipo *LysR* (LTTRs) regulam a um conjunto diversificado de genes, incluindo aqueles envolvidos na virulência, metabolismo, *quorum sensing* e motilidade (Maddocks e Oyston, 2008)

***Phosphate starvation-induced protein* (*pho*)** pertence a família de genes *pho* quem respondem à limitação de fosfato pela ativação da transcrição dos genes pertencentes a regulação de fosfato. Os produtos desses genes estão envolvidos no transporte e utilização de várias formas de fosfatos combinados ou fosfato livre. O produto do gene *PhoB* é o ativador da transcrição do regulador *pho*. Respondendo a limitação de fosfato, o produto do gene *phoR* é fosforilado com ATP e atua como uma proteína quinase para a proteína *PhoB* ativador. Fosforilada *PhoB* se liga a uma sequência que contém os promotores do regulador *pho*, e ativa a transcrição com RNA-polimerase. Os genes reguladores *pho* incluem *phoA*, *phoE*, *phoH* (Kim *et al.*, 1993; Antelmann *et al.*, 2000).

A **Família *LuxR* de reguladores transcrpcionais** atua na regulação do a *quorum sensing* (QS), que é uma forma de sinalização célula-célula. As bactérias podem secretar moléculas de sinal chamadas auto-indutor (AI). Quanto maior a densidade de células, maior a concentração AI na população de células bacterianas. Vários genes alvo continuam a ser regulados até que a concentração de AI atinja um limiar. Genes de proteases, polissacarídeo extracelular (EPS), bioluminescência,

biossíntese de antibióticos, formação biofilme, mobilidade, plasmídeo de transferência conjugal, e a produção de virulência, são alguns dos que são regulados nesse processo. Estes acontecimentos são essenciais para a sobrevivência das bactérias e a sua propagação (Chen e Xie, 2011).

Quanto ao **regulador TetR**, pertence a família de genes *tet*, cujos produtos de gênicos conferem resistência a tetraciclina (Ramos *et al.*, 2005). A **família de reguladores transcrpcionais XRE** foi identificado como o principal repressor transcricional que mantém o sistema conjugação pLS20 desligado (Singh *et al.*, 2013).

5.5.2.5. *Transcrição gênica*

Apenas uma proteína foi identificada como sendo associado a processo de transcrição gênica. A **DNA-directed RNA polymerase subunit beta**, ou simplesmente subunidade β da RNA polimerase (RNAP), está diretamente ligada aos processo de formação do mRNA. RNAP é uma enzima extremamente complexa que pode ser pensada como mecanismo de expressão gênica. Energia, sob a forma de trifosfatos do lado do núcleo da enzima, alimenta a síntese do polímero de RNA complementar ao molde de DNA (Helmann, 2009)

RNAP bacteriana é uma enzima de subunidades múltiplas, e consiste de um núcleo da polimerase que contém as subunidade β e β' , duas subunidades α e um fator de especificidade dissociável conhecido como sigma (σ) (Paget e Helmann, 2003). Enquanto a RNAP núcleo ($\beta\beta'\alpha_2$) é competente para o alongamento e terminação da transcrição, a iniciação transcrição requer a subunidade σ associada. O complexo σ + núcleo é chamado holoenzima. Muitas bactérias contêm vários tipos de fator de σ , e, portanto, múltiplas espécies de holoenzima (Gruber e Gross, 2003).

5.5.2.6. *Degradação de Xenobióticos*

Nesse grupo de proteínas foram incluídas aquelas com alguma capacidade ou característica que as relacione de forma direta ou indireta a metabolização de compostos xenobióticos.

A primeira proteína incluída nesse grupo foi a **FMN-dependente NADH-azoredutase** que é uma azoredutase que requer NADH e um mononucleótido flavina (FMN) para sua atividade. As enzimas que catalisam a redução de grupos azo são denominadas azoredutases. Utilizando um doador de elétrons, azoredutase

podem descolorir corantes azo resultando em aminas aromáticas, por clivagem redutora de ligações azo (figura 14) (Liu *et al.*, 2009).

Corantes azo são caracterizados por uma ou mais ligações R1-N=N-R2, e são utilizados em vários produtos de consumo, incluindo produtos alimentares, cosméticos, produtos farmacêuticos, tecidos e papel, dos quais mais de 500 contêm aminas aromáticas potencialmente cancerígenas em sua formulação química (Chen *et al.*, 2005). Além disso, causam poluição pois são liberados no meio ambiente como efluentes e apresentam durabilidade prolongada (Nakanishi *et al.*, 2001)

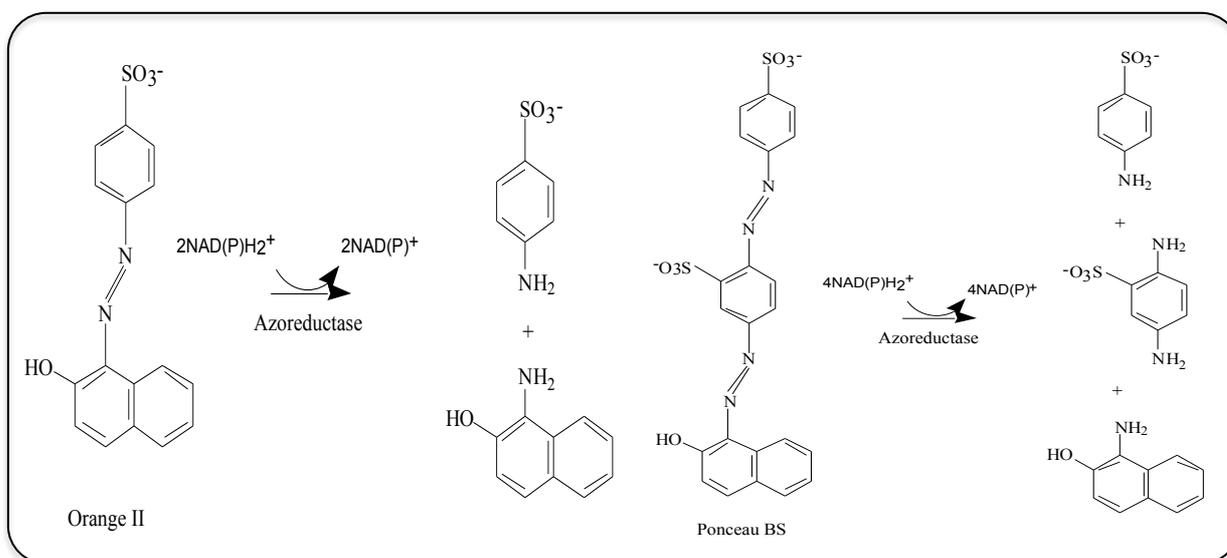


Figura 14: Degradação redutiva de corantes azo por azoredutases (Chen, 2006).

As proteínas com atividade azoredutase foram identificadas e caracterizadas a partir de uma grande variedade de bactérias, tais como *Pigmentiphaga kullae* K24, *Xenophilus azovorans* KF46F, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus sp.* OY1-2, *Pseudomonas aeruginosa* e *Rhodobacter sphaeroides*. Há pelo menos dois tipos diferentes de azoredutases bacterianas: as que requerem flavina e aquelas que não requerem. Como a introdução de compostos azo no meio ambiente deve-se principalmente às atividades humanas, a redução de corantes azo podem não ser a principal função dessas enzimas (Liu *et al.*, 2009)

A proteína **Acetoína dehidrogenase AcoB** atua promovendo o crescimento e esporulação na presença de acetoína ou butanodiol. Está envolvida diretamente na metabolização destes compostos quando utilizados como fonte de carbono (Grundy

et al., 1994). 2,3-butanodiol ou simplesmente butanodiol é um líquido inodoro, incolor e transparente, à temperatura normal, e amplamente utilizado na indústria química, alimentícia, de combustível, aeronáutica e outros. Metil-etil-cetona, o produto de desidratação de butanodiol pode ser utilizado para resinas, tintas e outros solventes; butanodiol pode ainda ser convertido a 1,3-butadieno, o qual pode ser utilizado para a borracha sintética, poliéster e poliuretano (Syu, 2001). Butanodiol é um combustível altamente valioso, comparável com outros combustíveis líquidos como o etanol e metanol, pode ser convertido em um aditivo de combustível eficaz (Ge *et al.*, 2011).

Acetoína é um produto derivado de butanodiol, a partir da dehidrogenação deste, e possui alto valor, que pode ser utilizado não só em produtos lácteos, mas também em produtos cosméticos, produtos farmacêuticos, e a síntese química (Sun *et al.*, 2012). Muitas espécies de bactérias são capazes de degradar acetoína, e algumas das vias catabólicas têm sido elucidadas. A degradação de acetoína prossegue através do ciclo de 2,3-butanodiol, em que a acetoína é um intermediário e é finalmente convertido em acetato. O ciclo 2,3 - butanodiol completo não é essencial para a degradação de acetoína em algumas bactérias. Em vez disso, acetoínas podem ser catabolizadas por uma clivagem oxidativa e convertido em acetaldeído e acetil coenzima A (Deng *et al.*, 1994).

Outra enzima que foi identificada tem participação no ciclo do 2,3 – Butanodiol: a **Butirato quinase**. Essa enzima está envolvida diretamente na formação de Butirato, atua especificamente fazendo a conversão de butiril-CoA (2 moléculas de acetil-CoA condensadas e reduzidas) em Butirato (butanoato), com a formação intermédia de Butiril-fosfato (Butanoil-P) (Walter *et al.*, 1993). Essa via é semelhante à formação de acetato a partir de acetil-CoA e leva à produção de energia na forma de ATP. Butanoato e Butanoil fosfato são intermediários da via de degradação de 2,3-butanodiol (Louis *et al.*, 2004)

E finalmente a última enzima identificada nesse grupo representa uma família de proteínas, as **Dioxigenases**. Essa família de enzimas extracelulares é capaz de oxidar substratos pela inserção de átomos de oxigênio molecular nos mesmos. São secretadas por microrganismos como fungos, leveduras ou bactérias e desempenham um papel importante na degradação de compostos aromáticos (Jacques *et al.*, 2007b). No metabolismo bacteriano dos HAPs, a oxigenação inicial é realizada por uma enzima intracelular dioxigenase que tem a função de reconhecer

o HAP e adicionar dois átomos de oxigênio, quebrando a estabilidade devido a ressonância do anel aromático. Esta importante enzima do ciclo biogeoquímico do carbono no planeta é constituída de três componentes, uma oxigenase terminal, uma ferredoxina e uma ferredoxina redutase dependente de NADPH, que, conjuntamente, formam uma cadeia curta de transporte de elétrons (Mishra *et al.*, 2001).

5.5.2.7. Esporulação e Resposta a estresse

Foram associadas a essa função 4 proteínas, sendo 2 envolvidas no processo de esporulação e 2 que estão relacionadas a respostas ao estresse celular. A primeira delas **N-acetilmuramoil-L-alanine amidase**, codificada pelo gene CwIC, pertence a família das autolisinas, que estão envolvidas em alguns processos biológicos importantes, como a separação de células, o volume da parede celular, a competência para a transformação genética, formação do flagelo e esporulação, todas essas atividades de certa forma relacionadas ou associadas a parede celular (Mishima *et al.*, 2005). O produto gênico de CwIC é capaz de hidrolisar paredes celulares. Sua principal função é a lisar o peptidoglicano da parede celular mãe, desempenhando um papel importante durante a esporulação (Smith e Foster, 1995).

Quanto a proteína **Sporulation-specific protease YabG**, dados indicam que que ela atua especificamente na esporulação, sendo associada na composição do revestimento dos esporos (Takamatsu *et al.*, 2000). A formação de esporos envolve uma série de alterações temporal e espacialmente ordenados na morfologia celular e a expressão de genes. Em resposta à fome ou outras condições de estresse a bactérias inicia um processo de desenvolvimento da formação de um septo assimétrico que divide a bactéria em dois compartimentos, a célula mãe e forespore (Hong *et al.*, 2009). A inativação do gene yabG resulta em mudanças na composição da proteína de revestimento de esporos, mas não afetam a resistência deste, ao calor, clorofórmio e lisozima (Takamatsu *et al.*, 2000).

A **Peroxirredoxina YagF**, pertence a uma família de enzimas ubíquas antioxidantes, que catalisam a redução de hidroperóxidos, conferindo, assim, resistência ao estresse oxidativo. Peroxirredoxinas (Prxs) são divididas em três classes: 2-Cys Prxs típicas; 2-Cys Prxs atípicas, e 1-Cys Prxs. Todas as Prxs partilham o mesmo mecanismo catalítico de base, em que uma cisteína do sitio ativo (a cisteína peroxidatic) ataca diretamente um hidroperóxido, levando à formação de

um ácido sulfênico (S-hydroxycisteína) (Wood *et al.*, 2003). O segundo passo da reação da peroxidase, que consiste na regeneração da cisteína, distingue as três classes de Peroxirredoxina. Para 2-Cys Prxs típica, na segunda etapa, o ácido sulfênico no sítio ativo da enzima é atacado por uma cisteína específica localizada na extremidade C-terminal da segunda subunidade da enzima, para formar uma ligação dissulfeto intersubunidades, que é então reduzido por uma tiorredoxina, completando o ciclo catalítico. Na 2-Cys Prxs atípica, tanto a cisteína peroxidática e a cisteína que faz ataque ao ácido sulfênico, estão no mesmo polipeptídeo, sua reação forma uma ligação de dissulfeto intracadeia. Para finalizar a reação também é usada uma tiorredoxina como um doador de elétrons (Seo *et al.*, 2000). Já 1-Cys Prxs, contém apenas a cisteína peroxidática, de modo a que o ácido sulfênico é atacado diretamente por uma molécula redutora (Wood *et al.*, 2003).

Finalmente, a **Phage-like element PBSX protein XkdX** pertence a uma família de pequenas proteínas de fago (aproximadamente 50 aminoácidos), presente em pelo menos 12 regiões fago e profago do genoma de bactérias gram-negativas. Muitas espécies de *Bacillus* possuem esse mecanismo de defesa. A expressão deste elemento é iniciada por agentes que induzem a resposta SOS associado a uma condição de estresse e resulta em lise celular com a libertação concomitante de partículas de fagos semelhantes (Krogh *et al.*, 1996).

5.5.2.8. **Transporte**

Foram identificadas apenas 2 proteínas envolvidas diretamente no transporte celular. Entre elas, a **ABC transporter ATP-binding protein**, que pertence a família ABC. A maior parte dos membros desta família de proteínas tem função de transportadores ativos dependentes de ATP (Davidson *et al.*, 2008). A unidade funcional típica é composta por um par de domínios de ligação a ATP e um conjunto de domínios transmembrana (TMD) (figura 15). Os TMDs determinam a especificidade para o tipo de molécula transportada, e os domínios de ligação a ATP fornecem a energia para mover a molécula através da membrana. As bactérias utilizam genes ABC para mover uma ampla variedade de compostos para dentro e para fora da célula. Importadores específicos são encontrados em açúcares, íons metálicos, aminoácidos e vitaminas. Além disso, algumas cepas patogênicas liberam

toxinas, tais como colicinas e hemolisinas, através de um transportador ABC (Locher, 2009).

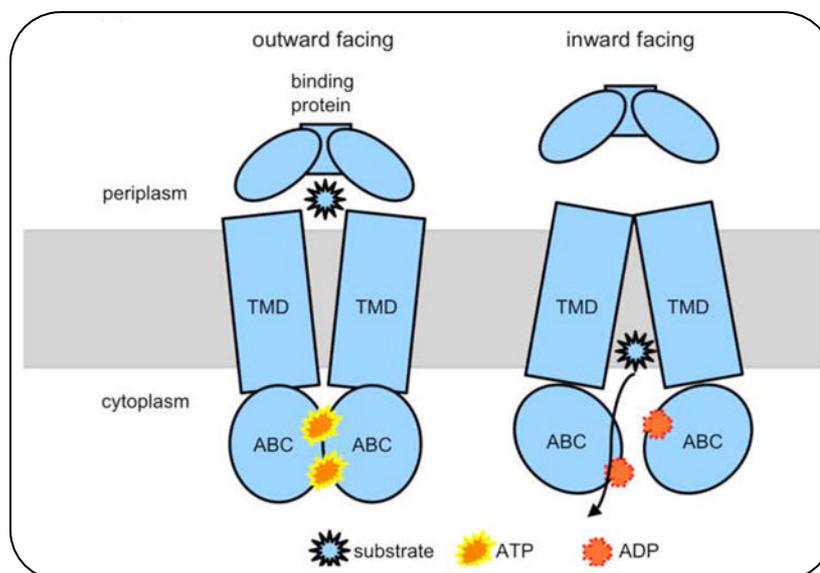


Figura 15. Arquitetura molecular de transportadores ABC. Uma representação esquemática da organização modular de transportadores ABC, compostos por dois domínios de transmembrana (TMD) e dois domínios ABC. O componente proteico de ligação aos importados também é mostrado. Dois estados conformacionais do transportador ABC, voltados para o exterior e para o interior são mostrados, de forma a ilustrar esquematicamente o mecanismo de acesso alternado de transporte (Rees *et al.*, 2009).

A **Subunidade SecA da Proteína translocase** é parte integrante de um complexo protéico que também atua no processo de transporte através das membranas. Ela é parte do complexo translocase de proteínas Sec. Interage com as subunidades Y, E, G, D e F, formando o complexo SecA-SecYEG-SecDF (Figura 16) para formação de canal de membrana (Kobayashi *et al.*, 2000). SecA tem um papel central no acoplamento e hidrólise de ATP para a transferência de proteínas para dentro ou para fora das membranas da membrana celular. Serve como um motor molecular ATP conduzido a translocação gradual de cadeias de polipeptídeos através da membrana. (Schatz e Dobberstein, 1996).

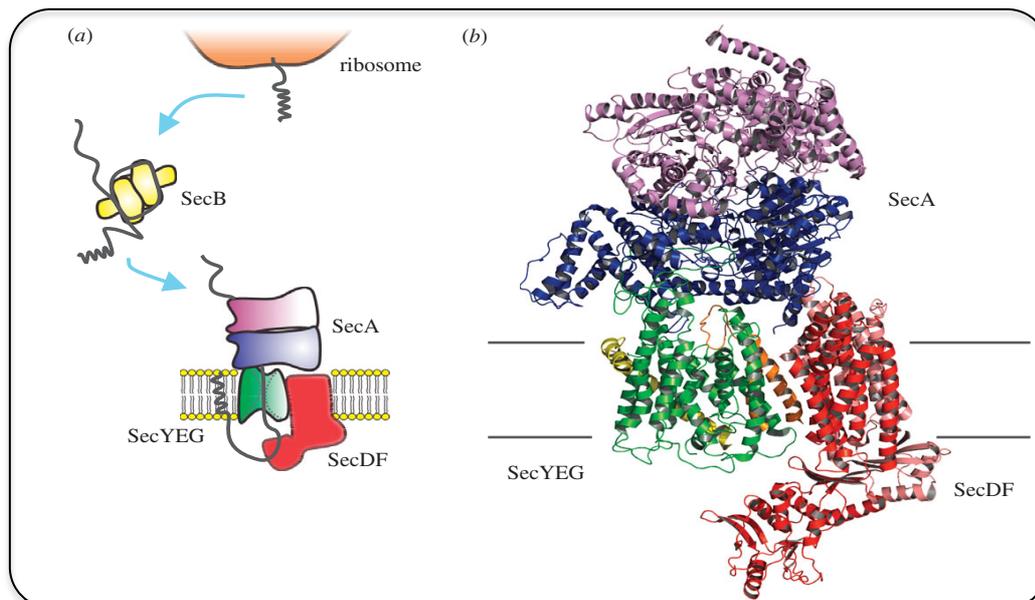


Figura 16. Modelo esquemático da via secreção pós-traducional de proteínas em *Escherichia coli*. (a) pré-proteínas sintetizadas no ribossomo (laranja) são capturados em um estado desdobrado pela SecB (amarelo) e levada para o dímero SecA (lilás/roxo) ligado a proteína que é o canal de translocação SecYEG (verde). SecA funciona um motor de proteínas dependente de ATP que dirige a translocação gradual do pré-proteínas através do canal SecYEG. Estágios tardios da translocação da proteína são apoiados por heterodímero SecDF (vermelho). (b) modelo estrutural da Sec-translocase. A segunda cópia da SecA (roxo) está ancorado na promotor monomérico (azul), que esta associado com SecYEG (verde / amarelo / laranja) e SecDF (vermelho/rosa) (Nijeholt e Driessen, 2012).

5.5.2.9. *Pepitidasas*

Duas proteínas com capacidade de degradar peptídeos também foram identificadas. Ambas pertencem a classe das aminopeptidasas que catalisam a liberação de resíduos de aminoácidos a partir de N-terminal dos peptídeos. A maior parte dessas enzimas são conhecidos por serem metaloenzimas (enzimas dependentes de íons metálicos). A **peptidase T** promove a quebra ligações peptídicas partir da região N-terminal dos tripeptídeos (Savijoki e Palva, 2000) enquanto que a **Dipeptidase PepV** realiza o mesmo processo porém, em dipeptídeos (Christensen *et al.*, 1999).

5.5.2.10. *Metabolismo Energético e Biossíntese da ATP*

Envolvidas diretamente no metabolismos energético foram identificadas 4 proteínas. A primeira delas a **Mannitol-1-fosfato 5-dehidrogenase**, é responsável

pela conversão de D-mannitol 1-phosphate na presença de NAD^+ em D-frutose 6-phosphate, NADH e H^+ , intermediários da via glicolítica (Krahulec *et al.*, 2011). **Defosfo-CoA quinase** atua no final na biossíntese de acetil-CoA. Catalisa a fosforilação do grupo 3'-hidroxila de defosfocoenzima A para formar coenzima A (Leonardi *et al.*, 2005). **Xylose isomerase** catalisa reversivelmente a reação de isomerização entre D-xilose e D-xilulose, também é possível converter a D-glicose em D-frutose, portanto a enzima é frequentemente referida como a glicose isomerase (Dmytruk *et al.*, 2008).

F_0F_1 ATP sintase subunidade alfa é uma das 8 proteínas que compõem o complexo de ATP sintase bacteriano. ATP sintases bacterianas possuem dois domínios, os domínios F_1 e F_0 (figura 17). No citoplasma está localizado domínio F_1 que contém três subunidades catalíticas (duas α e uma β) e subunidades únicas γ , δ e ϵ . O domínio F_0 incorporado à membrana é composto de uma subunidade a , duas subunidades b e múltiplas subunidades c . A síntese de ATP pelas sintases de ATP é energizada por gradientes eletroquímicos de H^+ ou de Na^+ através da membrana.

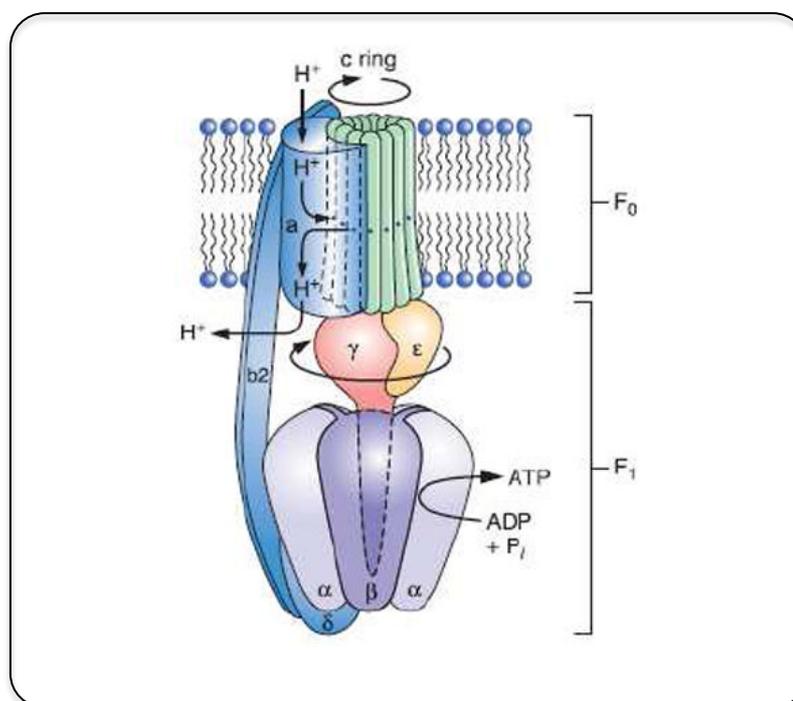


Figura 17. Representação esquemática de uma ATP sintase bacteriana. Domínio citoplasmático F_1 contém as subunidades catalíticas α e β e subunidades γ , δ e ϵ . O domínio F_0 fica acoplado a membrana celular contém subunidades a , b e c (Hicks *et al.*, 2010).

5.5.2.11. *Biossíntese de aminoácidos e Nucleotídeos*

Foram categorizadas 6 proteínas envolvidas na biossíntese de aminoácidos. Entre elas **Glutamina amidotransferase subunit PdxT**, uma das duas subunidades da enzima responsável pela conversão de glutamina em glutamato e amônia (List *et al.*, 2012). Como a amônia livre resultante dessa quebra é altamente reativa e pode facilmente difundir-se através das membranas celulares, as glutaminas amidotransferase (GAT) atuam para evitar a toxicidade potencial da amônia, ao catalisar também a entrega direta dessa amônia reativa aos substratos aceitadores para a biossíntese de nucleótidos de purina e pirimidina, coenzimas, aminoácidos, e açúcares (Hart e Power-Lee, 2008).

Phosphoribosilaminoimidazolesuccinocarboxamide synthase catalisa a oitava etapa da biossíntese de novas purinas. A ação dessa enzima consiste na conversão de ATP, L-aspartato e 5-aminoimidazol-4-carboxiribonucleotídeo (CAIR) em 5-aminoimidazol-4-(N-succinilcarboxamida) ribonucleótido (SAICAR), ADP e fosfato (Nelson *et al.*, 2005). **Acetilglutamato quinase** um membro da família das aminoácidos quinases, catalisa a segunda reação de síntese da arginina. Catalisa a transferência reversível do grupo g-fosforilo de ATP a um grupo carboxilato ou carbamato, resultando na síntese de um anidrido acilfosfato (Ramon-Maiques *et al.*, 2002; Mizuno *et al.*, 2007). **ATP fosforibosiltransferase subunidade catalítica** é uma das subunidades da ATP-fosforibosil (ATP-PRT), que é a primeira enzima da via biossintética da histidina e catalisa a condensação de ATP e 5-fosforibosil- α -1-pirofosfato (PRPP) para formar N'-5'-fosforibosil-ATP(PR-ATP). Os dez passos via biossintética histidina estão presente apenas em bactérias, fungos e plantas (Lohkamp *et al.*, 2004). **1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (P5CDH)** catalisa a oxidação dependente de NAD^+ de glutamato semi-aldeído para o glutamato, o qual é o passo final do catabolismo da prolina. A enzima P5CDH é amplamente distribuída em eucariotas e bactérias. Nos eucariotos, está localizada na matriz mitocondrial (Luo *et al.*, 2013). **Acetolactato sintase subunidade catalítica**, é uma das subunidades da acetolactato sintase (ALS) que catalisa o primeiro passo na síntese dos BCAAs principais (Isoleucina, Valina e Leucina). Em microrganismo, Val e Leu são sintetizadas por uma via comum, que começa com a formação de 2-acetolactato a partir de duas moléculas de piruvato (Yoon *et al.*, 2003). Isoleucina é

sintetizado num percurso paralelo envolvendo três ou mais enzimas que começam com a formação de 2-acetohidroxiacetato de piruvato e 2-cetobutirato (Sikdar e Kim, 2010).

5.5.2.12. Outras funções

Porfobilinogénio deaminase é uma transferase que catalisa a polimerização por etapas de quatro moléculas de porfobilinogénio em um tetrapirrol linear 1-hidroximetilbilano. Tetrapirrol são estruturas do tipo Heme (anel de porfirina), nos microorganismos geralmente esta associado formação de pigmentos (Bung *et al.*, 2014).

4-difosfocitidil-2-C-meetil-D-eritritol quinase participa na biossíntese de difosfato isopentenil e difosfato de dimetilalil. Estes isômeros são os precursores universal de cinco carbonos de isoprenóides, uma família diversificada e importante de produtos naturais que inclui esteróis, triterpenos, e ubiquinonas, e componentes de macromoléculas, tais como os grupos prenilo de proteínas preniladas e tRNA ipentenilado. Os isoprenóides contribuem para muitas funções biológicas, incluindo o transporte de elétrons na respiração e fotossíntese, sinalização a base de hormônios, a apoptose, a meiose, a clivagem de proteínas e degradação. Além disso, eles proporcionam os componentes estruturais importantes das membranas das células (Miallau *et al.*, 2003).

5.5.3. Proteínas relacionadas a capacidade de Biorremediação em *B. pumilus*.

Passamos a analisar agora o envolvimento de algumas proteínas identificadas envolvidas de maneira direta ou indireta nos processos de biorremediação.

A primeira, e certamente a mais importante dentre as proteínas identificadas, é a Dioxigenase. Tal enzima foi detectada a partir do gel de petróleo, por tanto foi marcada como exclusiva de petróleo. Essa enzima participa ativamente na degradação de compostos aromáticos (Williams e Sayers, 1994). As Dioxigenases pertencem ao grupo das oxigenases, grupo com diferente classes de enzimas, sendo as hidrolases e oxidoredutases as mais importante utilizadas nas vias de degradação de compostos aromático. As oxidoredutases são enzimas complexas, usualmente, compostas por multicomponentes protéicos, que requerem cofatores

como o NADH, e são, na maioria das vezes, utilizadas em varias etapas da biocatálise de compostos aromáticos (Díaz *et al.*, 2001).

Em geral, as vias metabólicas bacterianas de degradação aeróbica de hidrocarbonetos aromáticos podem ser dividida em três etapas (figura 18).

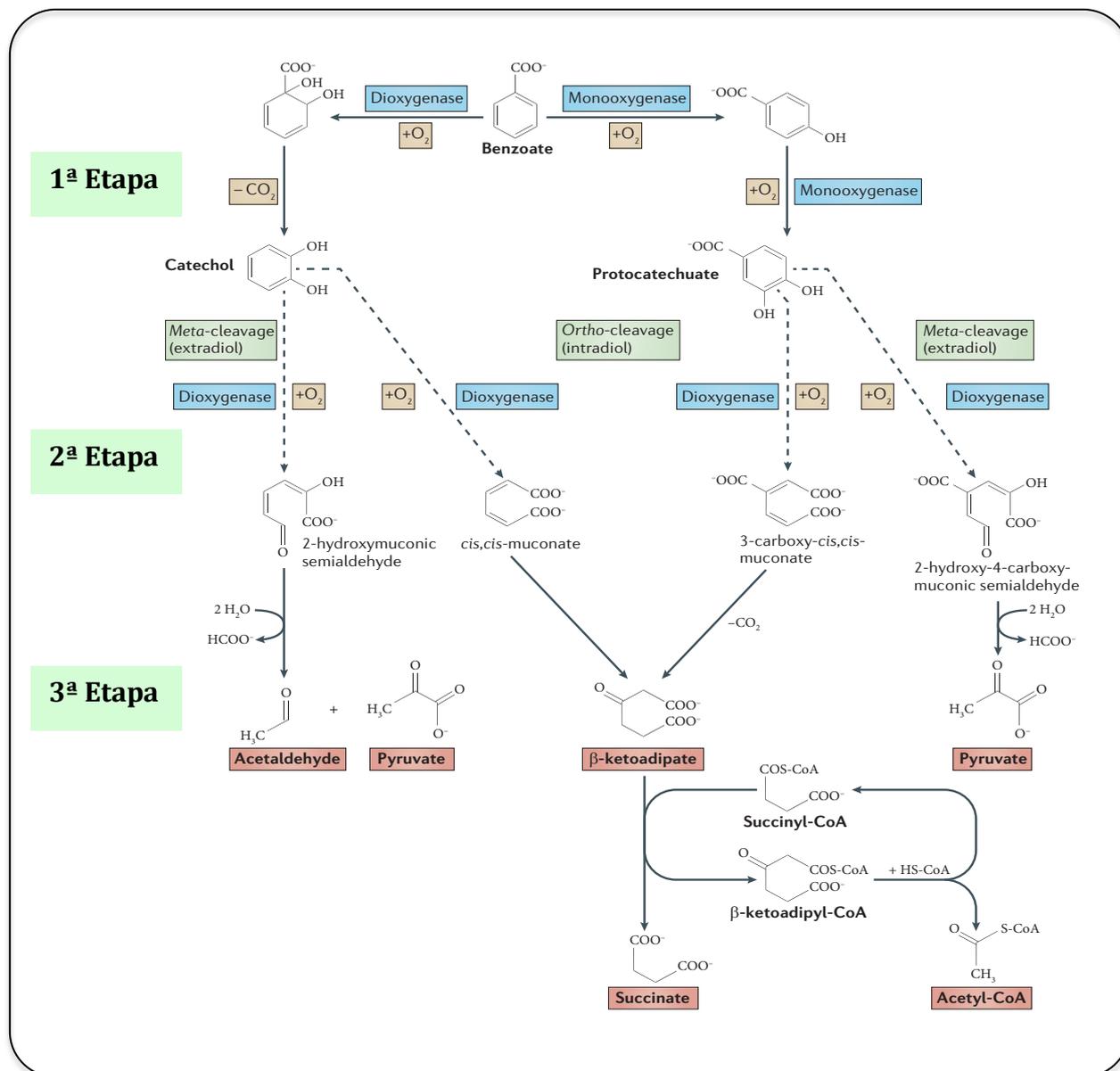


Figura 18. Mecanismo de ação das oxigenase na degradação de compostos aromáticos. 1ª Etapa: Conversão do benzoato por mono ou dioxigenase; 2ª Etapa: Abertura do anel aromático por dioxigenases; 3ª Etapa: Reações subsequentes para produção de intermediários do metabolismo central. Adaptado de Fuchs e *col.* (2011).

1ª Etapa: o substrato aromático é transformado num metabolito di-hidroxiaromático (tipicamente um catecol). Tal composto é obtido através da introdução de grupos hidroxilo por mono ou dioxigenases. Como todos compostos monoaromáticos do grupo BTEX são derivados do benzeno, a quebra do anel aromático é uma etapa comum a todas as vias de degradação desses compostos (Díaz, 2004).

2ª Etapa: consiste na abertura do anel do catecol por dioxigenases. Estas enzimas catalisam a adição de oxigênio molecular ao anel, quebrando uma das ligações carbono-carbono (Williams e Sayers, 1994). A quebra do anel pode ocorrer em duas posições distintas: entre os grupos hidroxilo (quebra intradiol ou orto) ou adjacente a um dos grupos hidroxilo (quebra extradiol ou meta). As dioxigenases que fazem a adição intradiol são enzimas cujo cofactor é Fe^{3+} , e as dioxigenases que fazem a adição extradiol, que são enzimas dependentes de Fe^{2+} , produzem o semialdeído (Harayama *et al.*, 1992).

3ª Etapa: Na terceira e última fase do catabolismo dos hidrocarbonetos aromáticos, o produto resultante da abertura do anel é convertido em intermediários do metabolismo central, tais como acetil-CoA e piruvato.

Diante de tudo isso é indiscutível o papel dessa proteínas identificada em *B. pumilus* para os processo de biorremediação envolvendo petróleo.

Compostos nitroaromáticos são poluentes cuja toxicidade é geralmente resultado de sua redução enzimática a espécies mais reativas. Há um grande interesse em nitrorredutases contendo flavina devido seu papel central na minimização da toxicidade desses compostos, podendo dessa forma, serem empregadas em biorremediação. Um exemplo do seu papel biorremediador é a capacidade dessa enzima reduzir o nitro-benzeno. Por meio de um cofator flavina mononucleótido (FMN), uma nitrorredutase consegue reduzir nitro-benzeno a hidroxilamina e esta, podendo ser reduzida a nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) ou outros nicotinamidas (Haynes *et al.*, 2001).

Alguns estudos têm indicado que a atividade azoredutase e nitrorredutase pode ser desempenhada por uma mesma enzima. Foram estudadas azoredutases e nitrorredutases de três cepas de *Clostridium* e uma de *Eubacterium*. Ambas as enzimas foram produzidas constitutivamente em cada uma das bactérias e a comparação de azoredutases e nitrorredutases mostrou que ambas tinham

mobilidades electroforéticas idênticas em géis de poliacrilamida e reagiu com o anticorpo contra a azoredutase. Além disso, compostos nitroaromáticos inibiram competitivamente a atividade azoredutase. O que demonstrou que a redução de ambos os compostos, nitroaromáticos e corantes azo, foram realizadas pela mesma enzima (Rafii e Cerniglia, 1995). A capacidade de redução de composto nitroaromáticos também é conformada por Prosser e *col.* (2010) e ainda por Ryan e *col.* (2011).

No que diz respeito a azoredutase identifica a *B. pumilus* foi verificado que e que ele necessita de um cofator flavina mononucleótido (FMN) assim como as nitrorredutases, o que só reforça ainda mais que essa enzima pode atuar na degradação de composto nitroaromáticos que podem estar presente em petróleo e diesel.

Outra enzima que pode ter papel para a metabolização de composto xenobióticos identificada em *B. pumilus* foi a acetoína dehidrogenase. Essa enzima participa na conversão da acetoína em acetil-CoA, componente principal do ciclo do ácido cítrico (TCA). Embora acetoína seja um produto normal da fermentação alcoólica de açúcares em muitas bactérias, inclusive *B. pumilus* (Xu *et al.*, 2009), nas nossas condições de cultivo, isso é considerado um evento atípico, uma vez que não havia inicialmente açúcar disponível para que a fermentação alcoólica acontecesse. No processo de fermentação alcoólica sob condições normais, duas moléculas de piruvato são condensados em acetolactato por meio da acetolactato sintase (ALS), acetolactato por sua vez é convertido em acetoína por meio da enzima acetolactato descarboxilase (ALDC) (Xiao e Xu, 2007). Esse processo pode se observado na figura 19.

Havendo uma fonte de 2,3-butanodiol disponível, acetoína pode gerada rapidamente pela ação da enzima butanodiol dehidrogenase. Existem evidências do uso de 2,3-Butanodiol como aditivo em combustíveis (Ge *et al.*, 2011). Se considerarmos ainda que estrutura de 2,3-Butanodiol ($C_4H_{10}O_2$) é de um típico hidrocarboneto, e ainda que o petróleo é formado por mais de 600 hidrocarbonetos diferentes (Fetter, 1993), imaginar que esse composto também esta presente no petróleo não é algo impossível.

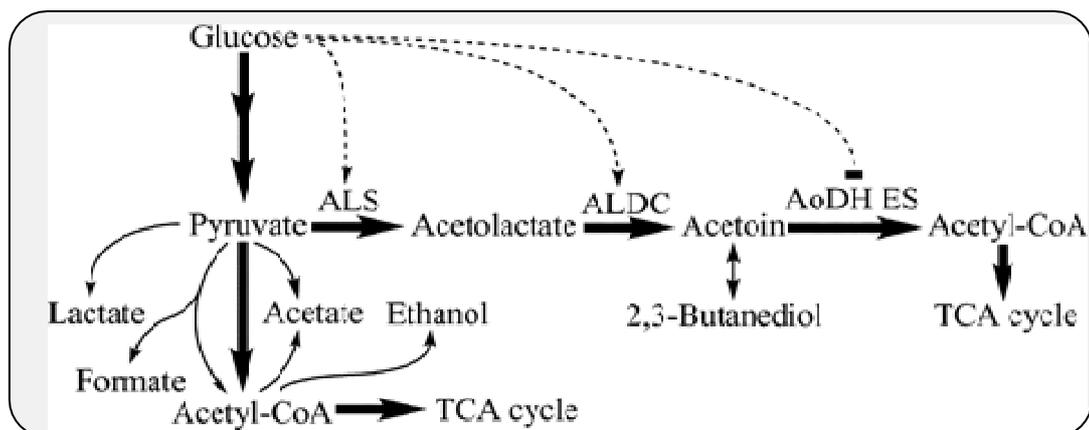


Figura 19. Interconexões de vias metabólicas em *B. pumilus*. Setas em negrito ou simples indicam os fluxos metabólicos dominantes ou menores, respectivamente. As linhas pontilhadas com setas ou extremidades sem corte indicam transcrição de ativação ou repressão caminhos, respectivamente. ALS, acetolactato sintetase; ALDC, descarboxilase-acetolactato; AoDH ES, enzima acetoína dehidrogenase (Xiao *et al.*, 2010).

Outra proteína que pode influenciar a capacidade de biorremediação de *B. pumilus* é a **glicosiltransferase**, relacionada a produção de componentes do exopolissacarídeo (EPS) da matriz extracelular durante a formação de biofilme (Kearns *et al.*, 2005). A formação de biofilme tem mostrado um importante papel na otimização do processo de biorremediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo, visto que favorece a agregação das bactérias ao mesmo tempo que confere proteção (Satpute *et al.*, 2010). Os biofilmes são tipicamente constituídos por água, microrganismos e exopolissacarídeo (EPS), partículas retidas e substâncias dissolvidas e adsorvidas. A água é a fração mais significativa da massa total do biofilme, podendo variar entre 70 a 95% da massa total do biofilme (Xavier *et al.*, 2003). Se estivermos considerando um processo de biorremediação de óleos, como é o nosso caso, essa quantidade de água de certa forma favorece o desenvolvimento bacteriano ao evitar que excessos de xenobióticos possam provocar morte celular.

A quantidade de proteína envolvida no reparo de DNA é um ponto também interessante. Embora não esteja associadas diretamente aos processos de biorremediação, essas proteínas desempenham papéis importantes na manutenção do perfeito funcionamento da célula ao garantir que o DNA esteja livre de mutações graves. A integridade do DNA é constantemente desafiada por ataques químicos de

metabolitos endógenos e agentes ambientais. A modificação química de nucleotídeos de DNA por alquilação, oxidação, deaminação, ou hidrólise produz lesões mutagênicas ou citotóxicas que podem resultar em morte celular (Lehmann *et al.*, 2006).

Bactérias sob condições de estresse, afim de se adaptar e sobreviver a essas tensões, desenvolveram sistemas de resposta globais que resultam em mudanças radicais na expressão gênica e metabolismo celular. Estas respostas são controladas pelos reguladores principais, que incluem: fatores sigma alternativos; genes repressores; e moléculas inorgânicas. As vias de resposta a condições de estresse se sobrepõem, e são induzidas em várias extensões de acordo com as condições ambientais. Incluem desde privação nutricional (formação de esporos) até o aumento na quantidade de enzimas para correção de erros. O resultado é que, sob uma variedade de condições de estresse, as bactérias são induzidas a alterações genéticas (Foster, 2007). Porém, não antes de esgotarem todas as possibilidades no combate a essas condições de estresse.

Crescimento em xenobióticos é sem dúvida uma condição que desencadeia essa resposta. Ao compararmos a quantidade de proteína ligada a essa resposta SOS das células bacterianas, e aqui incluímos as proteínas envolvidas no reparo de DNA, esporulação e fatores de transcrição apenas, verifica-se que 34% de todas as proteínas identificadas estão de certa forma envolvidas em garantir a adaptação e crescimento em xenobióticos. Aos 9 processos restantes determinados na tabela de identificação das proteínas (tabela 9) restam 66% de todas as proteínas que foram identificadas.

De maneira geral podemos associar a capacidade de biorremediação de *B. pumilus* a cerca de 54% das proteínas identificadas, indicadas como responsáveis pela *Resposta SOS*, a saber, elas pertencem as classes: *Manutenção e Reparo de DNA*; *Formação de Biofilme e Revestimento Celular*; *Reguladores de Transcrição*; *Degradação de Xenobióticos*; *Esporulação e Resposta a estresse*; e *Transporte* (figura 20). Obviamente que, para a efetiva comprovação ou não do envolvimento dessas proteínas nesse processo, mais estudos a respeito do assunto é necessário.

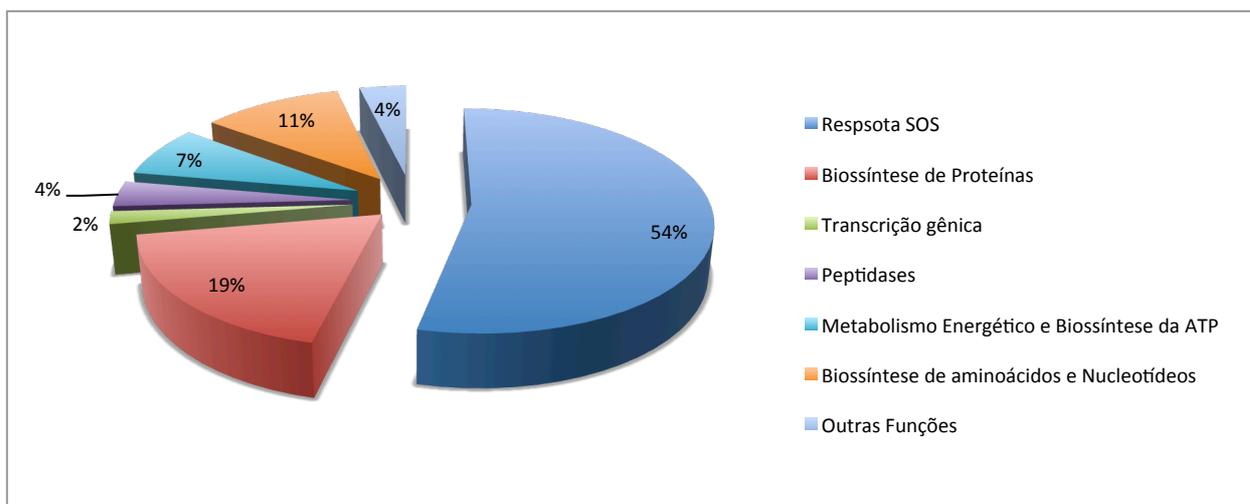


Figura 20. Proteína envolvidas na Resposta SOS em *B. pumilus* quando cultivo em xenobióticos

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A capacidade de biorremediação de compostos de petróleo e diesel para a espécie *B. pumilus* foi confirmada nesse trabalho. Os cultivos dessa espécie em xenobióticos apresentaram crescimento e produção de biomassa mais do que suficiente para que fossem estabelecidos os perfis proteômicos inicialmente aqui propostos. A comparação dos perfis da espécie em fontes de carbono diferentes apresentaram diferenças relevantes, o que é um forte indicativo de que essa espécie usa mecanismos de adaptação distintos para crescer nesses xenobióticos. A técnica de espectrometria de massa se mostrou eficiente na identificação de proteínas a partir de dos perfis definido para *B. pumilus*, tendo sido identificadas 54 proteínas na diferentes condições de cultivos. De uma forma mais geral tentou se estabelecer vínculo entre algumas proteínas encontradas e a capacidade de biorremediação de *B. pumilus*. Contudo, para determinação do efetivo emprego dessas proteínas nas vias de degradação de compostos de petróleo e diesel, mais estudos são necessários. Portanto, esse é um dos pontos quanto as nossas perspectivas a respeito desse trabalho. O emprego de espectrometria de massas para identificação de proteínas por meio da abordagem MS/MS também é um ponto interessante que buscaremos desenvolver, assim como o emprego de *B. pumilus* em consórcio com outras espécies visando a determinação de maiores taxa de degradação de petróleo e diesel.

7. REFERÊNCIAS

- ABADIE, E. Petróleo e seus derivados. Rio de Janeiro: Petrobrás/DIVEN/SEM-RIO, 1984. 122p.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422:198-207, 2003.
- AGNEW, M. D.; KOVAL, S. F.; JARRELL, K. F. Isolation and characterisation of novel alkaliphiles from bauxite-processing waste and description of *Bacillus vedderi* sp. nov., a new obligate alkaliphile. *Systematic and Applied Microbiology*, 18:221–230, 1995.
- AGULLÓ, L.; CÁMARA, B.; MARTÍNEZ, P.; LATORRE, V.; SEEGER, M. Response to (chloro) biphenyls of the polychlorobiphenyl-degrader *Burkholderia xenovorans* LB400 involves stress proteins also induced by heat shock and oxidative stress. *FEMS Microbiology Letters*, 267:167-175, 2007.
- ALABURDA, J., NISHIHARA, L. Presença de compostos de nitrogênio em águas de poços. *Revista Saúde Pública*, 32(2):160-165, 1998.
- ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Alteration of the repressor activity of MarR, the negative regulator of the *Escherichia coli* MarAB locus, by multiple chemicals *in vitro*. *Journal of Bacteriology*, 181(15):4669–4672, 1999.
- ALEXANDER, M. **Introduction to Soil Microbiology**. 12^a ed. New York: John Wiley & Sons, 1994.
- ANDRADE, J. de A., AUGUSTO, F., JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética Química*, 35(3), 17-43, 2010.
- ANJOS, N. A. **Marcadores Moleculares em *Astronotus ocellatus* para o monitoramento ambiental de áreas susceptíveis a impactos causados pela indústria de petróleo**. Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, 2008. 160p.
- ANTAQ - Agência Nacional de Transportes Aquaviários. **Caracterização da Oferta e da Demanda do Transporte Fluvial de Passageiros na Região Amazônica**. Brasília: ANTAQ, 2012. 102p.
- ANTAQ - Agência Nacional de Transportes Aquaviários. **Indicadores do transporte de cargas: tonelada útil transportada (t) e tonelada quilômetro útil (TKU) 2012**. Brasília: ANTAQ, 2013. 50p.
- ANTELMANN, A.; SCHARF, C.; HECKER, M. Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis. *Journal of Bacteriology*, 182(16):4478–4490, 2000.
- ASSIS, A. A. R. de. **Estudo de *Mycobacterium phlei* (ATCC 11758) como agente**

- agregante para hematita e quartzo.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
- ATLAS, R. M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, 31(4):178-182, 1995.
- AYORA, S.; STIEGE, A. C.; LURZ, R.; ALONSO, J. C. *Bacillus subtilis* 168 RecR protein-DNA complexes visualized as looped structures. *Molecular Genetics & Genomics*, 254:54 – 62, 1997.
- BALASHOVA, N. V.; KOSHELEVA, I. A.; GOLOVCHENKO, N. P.; BORONIN, A. M. Phenanthrene metabolism by *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains. *Process Biochemistry*, 35:291-296, 1999.
- BARAÚNA, R. A.; CIPRANDI, A.; SANTOS, A. V.; CAREPO, M. S. P.; GONÇALVES, E. C.; SCHNEIDER, M. P. C.; SILVA, A. Proteomics analysis of the effects of cyanate on *Chromobacterium violaceum* metabolism. *Genes*, 2:736-747, 2011.
- BARRON, M. G. **Bioaccumulation and Bioconcentration in Aquatic Organisms.** In: HOFFMAN, D. J., B. A. RATTNER, G. A. BURTON, CAIRNS, J. Handbook of Ecotoxicology. 2nd. New York: Lewis Publishers, 2003, p.1290.
- BARRON, M. G., CARLS, M. G., HEINTZ, R., RICE, S. D. Evaluation of Fish Early Life-Stage Toxicity Models of Chronic Embryonic Exposures to Complex Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Mixtures. *Toxicological Sciences*, 78:60 – 67, 2004.
- BARRON, M. G., CARLS, M. G., SHORT, J.W., RICE, S. D., HEINTZ, R. A., RAU, M., Di GIULIO, R. Assessment of the phototoxicity of weathered Alaska North Slope crude oil to juvenile pink salmon. *Chemosphere*, 60:105-110, 2005.
- BARRON, M. G., PODRABSKY, T., OGLE, S., RICKER, R. W. Are aromatic hydrocarbons the primary determinant of petroleum toxicity to aquatic organisms? *Aquatic Toxicology*, 46(3-4):253-268, 1999.
- BASU, N., BILLIARD, S., FRAGOSO, N., OMOIKE, A., TABASH, S., BROWN, S., HODSON, P. Ethoxyresorufin-O-deethylase induction in trout exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(6):1244-1251, 2001.
- BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. DE O.; OKEKEB, B. C.; FRANKENBERGER Jr, W. T. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbial Research*, 160:249-255, 2005.
- BIANCO, P. R; TRACY, R. B.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. DNA strand exchange proteins: a biochemical and physical comparison. *Frontiers in Bioscience*, 3:570-603, 1998.
- BLANK, J.; GRILLEBECK, N. W.; KREUTZER, R.; SPRINZL, M. Overexpression and purification of *Thermus thermophilus* elongation factors G, Tu and Ts from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 6:637-645, 1995.

- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74:63-67, 2000.
- BOWEN, R. E., DEPLEDGE, M. H. Rapid assessment of marine pollution (RAMP). *Marine Pollution Bulletin*, 53:541–544, 2006.
- BRADBURY, J. Proteomics: The next step after genomics. *The Lancet*, 356:50-50, 2000.
- BRAUN, S., APPEL, L. G., SCHMAL, M. A poluição gerada por máquinas de combustão interna movidas à diesel - a questão dos particulados. Estratégias atuais para a redução e controle das emissões e tendências futuras. *Química Nova*, 27:472-482, 2003.
- BUENO, S. M.; SILVA, A. N. DA; GARCIA-CRUZ, C. H. Estudo da produção de biosurfactante em caldo de fermentação. *Química Nova*, 33(7):1572-1577, 2010.
- BUGAY, C. **Biosurfactantes produzidos por *Bacillus* sp.: estudos de produção e caracterização**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, 2009.
- BUNG, N.; PRADHAN, M.; SRINIVASAN, H.; BULUSU, G. Structural insights into *E. coli* porphobilinogen deaminase during synthesis and exit of 1-hydroxymethylbilane. *PLOS Computational Biology*, 10(3):1-16, 2014.
- BURGHERR, P. In-depth analysis of accidental oil spills from tankers in the context of global spill trends from all sources. *Journal of Hazardous Materials*, v.140, p. 245–256, 2007.
- BUSHNELL, L. D.; HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 41(5):653-673, 1941.
- CALVO, C.; TOLEDO, F. L.; GONZÁLEZ-LÓPES, J. Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. *Journal of Biotechnology*, 109(3):255-262, 2004.
- CAMEOTRA, S. S., SINGH, P. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. *Microbial Cell Factories*, 8(16), 2009.
- CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Química Nova*, 31(3):669-675, 2008.
- CHANDANKERE, R.; YAO, J.; CAI, M.; MASAKORALA, K.; JAIN, A.K.; CHOI, M. M. F. Properties and characterization of biosurfactant in crude oil biodegradation by bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa. *Fuel*, 122:140–148, 2014.
- CHÁVEZ, F. P., LÜNSDORF, H., JEREZ, C. A. Growth of polychlorinated-biphenyl-degrading bacteria in the presence of biphenyl and chlorobiphenyls generates oxidative stress and massive accumulation of inorganic polyphosphate.

- Applied and Environmental Microbiology*, 70:3064-3072, 2004.
- CHEN, H. Recent Advances in Azo Dye Degrading Enzyme Research. *Current Protein and Peptide Science*, 7:101-111, 2006.
- CHEN, H.; HOPPER, S. L.; CERNIGLIA, C. E. Biochemical and molecular characterization of an azoreductase from *Staphylococcus aureus*, a tetrameric NADPH-dependent flavoprotein. *Microbiology*, 151:1433–1441, 2005.
- CHEN, J.; XIE, J. Role and regulation of bacterial LuxR-like regulators. *Journal of Cellular Biochemistry* 112:2694–2702, 2011.
- CHEN, Z.; YANG, H.; PAVLETICH, N. P. Mechanism of homologous recombination from the RecA–ssDNA/dsDNA structures. *Nature*, 453(22):489-496, 2008.
- CHOI, J., ORIS, J. T. Assessment of the toxicity of anthracene photo-modification products using the topminnow (*poeciliopsis lucida*) hepatoma cell line (PLHC-1). *Aquatic Toxicology*, 75:243-251, 2003.
- CHRISTENSEN, J. E.; DUDLEY, E. G.; PEDERSON, J. A.; STEELE, J. L. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76:217–246, 1999.
- COHEN, A., GAGNON, M., NUGEGODA, D. Alterations of metabolic enzymes in Australian Bass, *Macquaria novemaculeata*, after exposure to petroleum hydrocarbons. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 49(2):200-205, 2005.
- COHEN, A., NUGEGODA, D., GAGNON, M. M. Metabolic responses of fish following exposure to two Different oil spill remediation techniques. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48(3):306-310, 2001.
- CORRÊA, O. L. S. Petróleo: noções sobre exploração, perfuração, produção e microbiologia. Rio de Janeiro. Interciência, 2003. 104p.
- COSTA, S. P. **Biodegradabilidade de n-hexadecano por bactérias livres e imobilizadas em quitosana**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 2006.
- CRAPEZ, M. A. C., BORGES, A. L. N., BISPO, M. G. S., PEREIRA, D. C. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. *Ciência Hoje*, 30(179):32-37, 2002.
- D'ANNIBALE, A., ROSETTO, F., LEONARDI, V., FEDERICI, F., PETRUCCIOLI, M. Role of autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 28–36, 2006.
- DALTON, H., STIRLING, D. I.; QUAYLE, J. R. Co-metabolism. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B (Biological Sciences)*, 297(1088), 481-496, 1982.

- DAS, K.; MUKHERJEE, A. K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, 98(7): 1339–1345, 2007.
- DAVIDSON, A. M.; DASSA, E.; ORELLE, C.; CHEN, J. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(2):317-364, 2008.
- DENEFF, V. J.; KLAPPENBACH, J. A.; PATRAUCHAN, M. A.; FLORIZONE, C.; RODRIGUES, J. L.; TSOI, T. V.; VERSTRAETE, W.; ELTIS, L. D.; TIEDJE, J. M. Genetic and genomic insights into the role of benzoate-catabolic pathway redundancy in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:585-595, 2006.
- DENG, W.-L.; CHANG, H.-Y.; PENGI, H.-L. Acetoin catabolic system of *Klebsiella pneumoniae* CG43: sequence, expression, and organization of the aco operon. *Journal of Bacteriology*, 176(12):3537-3535, 1994.
- DENOME, S. A., STANLEY, D. C., OLSON, E. S., YOUNG, K. D. Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* Strains: Complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. *Journal Bacteriological*, 175:6890-690, 1993.
- DEON, M. C., ROSSI, A. de, Dal'MAGRO, C., REINEHR, C. R., COLLA, L. M. Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através de bioaugmentação e atenuação natural. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, 33(1):73-82, 2012.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1):47- 64, 1997.
- DÍAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology*, 7:173–180, 2004.
- DÍAZ, E.; FERRÁNDEZ, A.; PRIETO, M. A.; GARCÍA, J. L. Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(4):523–569, 2001.
- DMYTRUK, O. V.; VORONOVSKY, A. Y.; ABBAS, C. A.; DMYTRUK, K. V.; ISHCHUK, O. P.; SIBIRNY, A. A. Overexpression of bacterial xylose isomerase and yeast host xylulokinase improves xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Research*, 8:165–173, 2008.
- DOU, L., ZHU, Y., YANG, T., XU, S., PING, X. Origins of heavy oils in the Eriian Basin, ne China. *Marine and Petroleum Geology*, v.15, 8, p.769- 781, 1998.
- DOWSEY, A. W.; ENGLISH, J. A.; LISACEK, F.; MORRIS, J. S.; YANG, G-. Z.; DUNN, M. J. Image analysis tools and emerging algorithms for expression proteomics. *Proteomics*, 10:4226–4257, 2010.

- EDEMA, N. E., OKOLOKO, E. G., AGBOGIDI, M. O. Physico-chemical characteristics of the water-soluble fraction of Ogini Well-Head crude oil and the effects on *Pistia Stratiotes* Linn (Water Lettuces), 2(6):633- 638, 2007.
- FELLENBERG, G. **Introdução aos problemas da poluição ambiental**. São Paulo: EPU, 1980.
- FERGUSON, A. S., HUANG, W. E., LAWSON, K. A., DOHERTY, R., GIBERT, O., DICKSON, K. W., WHITELEY, A. S., KULAKOV, L. A., THOMPSON, I. P., KALIN, R. M., LARKIN, M. J. Microbial analysis of soil and groundwater from a gasworks site and comparison with a sequenced biological reactive barrier remediation process. *Journal of Applied Microbiology*, 102:1227-1238, 2007.
- FETTER, C. W. **Contaminant Hydrogeology**. New York: Macmillan College Publishing, 1993. 458p.
- FLATHMAN, P. E., JERGER, D. E., EXNER, J. H. **Biorremediation: Field Experience**. Lewis Publishers, 1994. 548p.
- FORTNAGEL, P., HARMS, H., WITTICH, R.-M., KROHN, S., MEYER, H., SINNWELL, V., WILKES, H., FRANCKE, W. Metabolism of dibenzofuran by *Pseudomonas* sp. strain HH69 and the mixed culture HH27. *Applied and Environmental Microbiology*, 56:1148-1156, 1990.
- FOSTER, P. Stress-Induced Mutagenesis in Bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 42(5): 373–397, 2007.
- FRANCO, M. A., VIÑAS, L., SORIANO, J. A., ARMAS, D. de, GONZÁLEZ, J. J., BEIRAS, R., SALAS, N., BAYONA, J.M., ALBAIGÉS, J. Spatial distribution and ecotoxicity of petroleum hydrocarbons in sediments from the Galicia continental shelf (NW Spain)after the Prestige oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, 53:260–271, 2006.
- FRITZE, D.; PUKALL, R. Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51:35–37, 2001.
- FROM, C.; HORMAZABAL, V.; GRANUM, P. E. Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice. *International Journal of Food Microbiology*, 115:319–324, 2007.
- FUCHS, G.; BOLL, M.; HEIDER, J. Microbial degradation of aromatic compounds- from one strategy to four. *Nature Reviews Microbiology*, 9:803-816, 2009.
- GAGNON, M. M., HOLDWAY, D. A. Metabolic Enzyme Activities in Fish Gills as Biomarkers of Exposure to Petroleum Hydrocarbons. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 44, n. 1, p. 92-99, 1999.
- GE, L.; WU, X.; CHEN, J.; WU, J. A New Method for Industrial Production of 2,3-Butanediol. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2:335-336, 2011.
- GILBERT, W. Rumo ao proteoma. *Ciência Hoje*, 29(173):8-11, 2001.

- GOBERSTEIN, M. **Guia de referência técnica: aplicação em vapor**. São Paulo: Spirax Sarco, 2007.
- GOLYSHIN, P. N., CHERNIKOVA, T. N., ABRAHAM, W. R., LUNSDORF, H., TIMMIS, K. N., YAKIMOV, M. M. Oleiphilaceae fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52:901–911, 2002.
- GOMES, G. M., SOUZA, H. R., MAGALHNÃES, A. R. **Desenvolvimento sustentável no Nordeste**. Brasília: IPEA, 1995. 372p.
- GRAVATO, C., SANTOS, M. A. Liver phase I and phase II enzymatic induction and genotoxic responses of β -naphthoflavone water-exposed sea bass. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 52(1):62-68, 2002.
- GRIFOLL, M., SELIFONOV, S. A., CHAPMAN, P. J. Evidence for a novel pathway in the degradation of fluorine by *Pseudomonas* sp. strain F274. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:2438-2449, 1995.
- GRUBER, T. G.; GROSS, C. A. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annual Reviews Microbiology*, 57:441–466, 2003.
- GRUNDY, F. J.; TURINSKY, A. J.; HENKIN, T. M. Catabolite regulation of *Bacillus subtilis* acetate and acetoin utilization genes by CcpA. *Journal of Bacteriology*, 176(15):4527, 1994.
- GUEDES, C. L. B., CORRER, C. J., LOBO, I., ABI-SAAB, O. J. G. Tratamento de Solo Contaminado com Petróleo Utilizando Tensoativos e Peróxido de Hidrogênio. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, 31(2):87-100, 2010.
- HABE, H., CHUNG, J. S., LEE, J. H., KASUGA, K., YOSHIDA, T., NOJIRI, H., OMORI, T. Degradation of chlorinated dibenzofurans and dibenzo-p-dioxins by two types of bacteria having angular dioxygenases with different features. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 3610-3617, 2001.
- HADIBARATA, T. TACHIBANA, S. Microbial degradation of crude oil by fungi pre-grown on wood meal. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry*. 2:317-322, 2009
- KHAN, F. I., HUSAIN, T., HEJAZI, R. An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management*, 71:95–122, 2004.
- HARA, A., SYUTSUBO, K., HARAYAMA, S. *Alcanivorax* which prevails in oil-contaminated seawater exhibits broad substrate specificity for alkane degradation. *Environmental Microbiology*, 5(9):746–753, 2003.
- HARAYAMA, S., KASAI, Y., HARA, A. Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Current Opinion in Biotechnology*, 15:205–214, 2004.
- HARAYAMA, S.; KOK, M.; NEIDLE, E. L. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annual Reviews Microbiology*, 46:565-601, 1992.

- HARLOW, W. F., BRANTLEY, B. C., HARLOW, R. M. BP initial image repair strategies after the Deepwater Horizon spill. *Public Relations Review*, 37(1):80-83, 2011.
- HART, E. J.; POWERS-LEE, S. G. Mutation analysis of carbamoyl phosphate synthetase: Does the structurally conserved glutamine amidotransferase triad act as a functional dyad? *Protein Science*, 17:1120–1128, 2008.
- HASHIM, A. A. Effect of Sublethal Concentrations of Fuel Oil on the Behavior and Survival of Larvae and Adults of the Barnacle *Balanus amphitrite* amphitrite (Darwin). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 10:499-503, 2010.
- HAYNES, C. A.; KODER, R. L.; MILLER, A.-F.; RODGERS, D. W. Structures of nitroreductase in three states: effects of inhibitor binding and reduction. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(13):11513–11520, 2002.
- HEAD, I. M., JONES, D. M., RÖLING, W. F. M. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 4:173-182, 2006.
- HEATH, A. G. *Water Pollution and Fish Physiology*. 2nd Ed. Lewis Publishers, 1995.
- HELMANN, J. D. RNA polymerase: A nexus of gene regulation. *Methods* 47(1):1–5, 2009
- HICKS, D. B.; LIU, J.; FUJISAWA, M.; KRULWICH, T. A. F₁F₀-ATP synthases of alkaliphilic bacteria: lessons from their adaptations. *Biochim Biophys Acta*, 1797(8):1362–1377, 2010.
- HIROKAWA, G.; NIJMAN, R. M.; RAJ, V. S.; KAJI, H.; IGARASHI, K.; KAJI, A. The role of ribosome recycling factor in dissociation of 70S ribosomes into subunits. *RNA*, 11:1317–1328, 2005.
- HONG, H. A.; TO, E.; FAKHRY, S.; BACCIGALUPI, L.; RICCA, E.; CUTTING, S. M. Defining the natural habitat of *Bacillus* spore-formers. *Research in Microbiology*, 160: 375-379, 2009.
- HSIEH, F. C.; LI, M. C.; LIN, T. C.; KAO, S. S. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. *Current Microbiology*, 49:186-191, 2004.
- HULLO, M.- F.; MOSZER, I.; DANCHIN, A.; MARTIN-VERSTRAETE, I. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *Journal of Bacteriology*, 183: 5436–5430, 2001.
- HUPPA, J. B.; PLOEGH, H. L. The eS-Sence of –SH in the ER. *Cell*, 92:145–148, 1998.
- ITOPF. The International Tanker Owners Pollution Federation Limited - **Oil tanker spill statistics:2009**. p.1-8, 2009. Disponível em: <http://www.itopf.com>. Acesso em: 28/08/2013.
- JACQUES, R. J. S., BENTO, F. M., ANTONIOLLI, Z. I., CAMARGO; F. A. O.

- Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, 37(4):1192-1201, 2007.
- JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O. Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência e Natura*, 29 (1):7-24, 2007.
- KAJINO, T.; OHTO, C.; MURAMATSU, M.; OBATA, O.; UDAKA, S.; YAMADA, Y.; TAKAHASHI, H. A Protein Disulfide Isomerase Gene Fusion Expression System That Increases the Extracellular Productivity of *Bacillus brevis*. *Applied And Environmental Microbiology*, 66(2):638–642, 2000.
- KANALY, R. A., BARTHA, R., WATANABE, K., SHIGEAKI, H. Rapid mineralization of benzo[a]pyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 10, p. 4205-4211, 2000.
- KANALY, R. A.; HARAYAMA, S.; WATANABE, K. *Rhodanobacter* sp. Strain BPC-1 in a benzo[a]pyrene-mineralizing bacterial consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5826- 5833, 2002.
- KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 Dalton. *Analytical Chemistry*, 60:2299-2301, 1988.
- KASAI, Y., KISHIRA, H., SASAKI, T., SYUTSUBO, K., WATANABE, K., HARAYAMA, S. Predominant growth of *Alcanivorax* strains in oil-contaminated and nutrient-supplemented sea water. *Environmental Microbiology*, 4:141–147, 2002.
- KATSUMITI, A., DOMINGOS, F., AZEVEDO, M., DA SILVA, M., DAMIAN, R., ALMEIDA, M., DE ASSIS, H., CESTARI, M., RANDI, M., RIBEIRO, C., FREIRE, C. An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish (*Cathorops spixii*) after the Vicuña Oil Spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 152,(1):209-222, 2009.
- KAZUNGA, C.; AITKEN, M. D. Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:1917-1922, 2000.
- KEARNS, D. B.; CHU, F.; BRANDA, S. S.; KOLTER, R.; LOSICK, R. A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 55(3): 739–749, 2005.
- KHANEJA, R.; PEREZ-FONS, L.; FAKHRY, S.; BACCIGALUPI, L.; STEIGER, S.; TO, E.; SANDMANN, G.; DONG, T. C.; RICCA, E.; FRASER, P. D.; CUTTING, S. M. Carotenoids found in *Bacillus*. *Journal of Applied Microbiology*, 108:1889–1902, 2010.
- KHANNA, P.; GOYAL, D.; KHANNA, S. Characterization of pyrene utilizing bacillus spp. from crude oil contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology* 43(2): 606-617, 2012.
- KIEL, M. C.; KAJI, H.; KAJI, A. Ribosome recycling: an essential process of protein synthesis. *Biochemistry And Molecular Biology Education*, 35(1):40–44, 2007.

- KIM, J., PARK, Y., CHOI, K. Phototoxicity and oxidative stress responses in *Daphnia magna* under exposure to sulfathiazole and environmental level ultraviolet B irradiation. *Aquatic Toxicology*, 91:87-94, 2009.
- KIM, S.-K.; MAKINO, K.; AMEMURA, M.; SHINAGAWA, H.; NAKATA, A. Molecular analysis of the *phoH* gene, belonging to the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 175(5):1316-1324, 1993.
- KIRBY, M. F., LAW, R. J. Accidental spills at sea – Risk, impact, mitigation and the need for co-ordinated post-incident monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, 60:797–803, 2010.
- KLUGE, B.; VATER, J.; SALNIKOW, J.; ECKART, K. Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *FEBS Letters*, 231(1):107-110, 1988.
- KOBAYASHI, H.; OHASHI, Y.; NANAMIYA, H.; ASAI, K.; KAWAMURA, F. Genetic analysis of SecA-SecY interaction required for spore development in *Bacillus subtilis*. *EMS Microbiology Letters*, 184:285-289, 2000.
- KÖHRER, C.; MAYER, C.; NEUMAIR, O.; GRÖBNER, P.; PIENDL, W. Interaction of ribosomal L1 proteins from mesophilic and thermophilic Archaea and Bacteria with specific L1-binding sites on 23S rRNA and mRNA. *European Journal of Biochemistry*, 256:97-105, 1998.
- KRAHULEC, S.; ARMAO, G. C.; KLIMACEK, M.; NIDETZKY, B. Enzymes of mannitol metabolism in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* – kinetic properties of mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase and mannitol 2-dehydrogenase, and their physiological implications. *FEBS Journal*, 278:1264–1276, 2011.
- LAIRSON, L. L.; HENRISSAT, B.; DAVIES, G. J.; WITHERS, S. G. Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. *Annual Reviews of Biochemistry*, 77:521–555, 2008.
- LANGENBACH, T. **Biodegradação de xenobiótico: potencialidades e limites.** In: ARAUJO, R. S., HUNGRIA, M. *Microrganismos de importância agrícola.* Brasília: EMBRAPA-CNPAP, Documentos 44, 1994. 236p
- LEHMANN, I.; BARNES, D.; FERRO, W.; FUCHS, R.; HOEIJMAKERS, J.; KANAAR, R.; LEON MULLENDERS, L.; van ZEELAND, B. DNA repair: From molecular mechanism to human disease. *DNA Repair*, 5:986–996, 2006.
- LEONARDI, R.; ZHANG, Y.-M.; ROCK, C. O.; JACKOWSKI, S. Coenzyme A: Back in action. *Progress in Lipid Research*, 44:125–153, 2005.
- LI, Z.; KAWAMURA, Y.; SHIDA, O.; YAMAGATA, S.; DEGUCHI, T.; EZAKI, T. *Bacillus okuhidensis* sp. nov., isolated from the Okuhida spa area of Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52:1205–1209, 2002.
- LIANG, R.; LIU, X.; PEI, D.; LIU, J. Biochemical characterization and functional

- complementation of ribonuclease HII and ribonuclease HIII from *Chlamydomonas reinhardtii* AR39. *Microbiology*, 153:787–793, 2007.
- LIM, I. K.; PARK, T. J.; PAIK, W. K. Phosphorylation of methylated-DNA–protein-cysteine S-methyltransferase at serine-204 significantly increases its resistance to proteolytic digestion. *Biochemical Journal*, 352:801–808, 2000.
- LIU, G. F.; YOSHIZAWA, S.; COURVALIN, P.; GALIMAND, M. Aminoglycoside Resistance by ArmA-mediated Ribosomal 16 S Methylation in Human Bacterial Pathogens. *Journal of Molecular Biology*, 359:358–364, 2006.
- LIOY, V. S.; GOUSSARD, S.; GUERINEAU, V.; YOON, E. J.; COURVALIN, P.; GALIMAND, M.; GRILLOT-COURVALIN, C. Aminoglycoside resistance 16S rRNA methyltransferases block endogenous methylation, affect translation efficiency and fitness of the host. *RNA*, 20:1–10, 2014.
- LIST, F.; VEGA, M. C.; RAZETO, A.; HÄGER, M. C.; STERNER, R. ; WILMANN, M. Catalysis uncoupling in a glutamine amidotransferase bienzyme by unblocking the glutaminase active site. *Chemistry & Biology*, 19:1589–1599, 2012.
- LIU, G.; ZHOU, J.; FU, Q. S. WANG, J. The *Escherichia coli* azoreductase azor is involved in resistance to thiol-specific stress caused by electrophilic quinones. *Journal of Bacteriology*, 191(20):6394–6400, 2009.
- LIU, X. Y.; YANG, S. Z.; MU, B. Z. Isolation and characterization of a C-12-lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* HSO 121. *Journal of Peptide Science*, 14(7):864-875, 2008.
- LOCHER, K. P. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 364:239–245, 2009.
- LOHKAMP, B.; McDERMOTT, G.; CAMPBELL, S. A. COGGINS, J. R.; LAPTHORN, A. J. The Structure of *Escherichia coli* ATP-phosphoribosyltransferase: Identification of Substrate Binding Sites and Mode of AMP Inhibition. *Journal of Molecular Biology*, 336:131–144, 2004.
- LOUIS, P.; DUNCAN, S. H.; McCRAE, S. I; MILLAR, J.; JACKSON, M. S. FLINT , H. J. Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. *Journal of Bacteriology*, 186(7):2099-2106, 2004.
- LUGOWSKI, A. J.; PALAMTEER, G. A.; BOOSE, T. R.; MERRIMAN, J. E. **Biodegradation process for detoxifying liquid streams**. Patente US5656169, 1997.
- LUO, M.; SINGH, R. K.; TANNER, J. J. Structural determinants of oligomerization of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase: identification of a hexamerization hot spot. *Journal of Molecular Biology*, 425:3106–3120, 2013.
- MADDOCKS, S. E.; OYSTON, P. C. F. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*, 154:3609–3623, 2008.

- MADRONICH, S., MCKENZIE, R. L., BJÖRN L.O., CALDWELL, M. M. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 46:5-19, 1998.
- MAGNET, S.; BLANCHARD, J. S. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chemical Reviews*, 105:477-497, 2005.
- MANDRI, T., LIN, J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu- Natal, South Africa. *African Journal of Biotechnology*, 6(1), 023-027, 2007.
- MANZO, N.; DI LUCCIA, B.; ISTICATO, R.; D'APUZZO, E.; FELICE, M. de; RICCA, E. Pigmentation and sporulation are alternative cell fates in *Bacillus pumilus* SF214. *Plos One*, 8(4):1-12, 2013.
- MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56:650-663, 2001.
- MARKL, H.; ANTRANIKIAN, G.; BECKER, P.; MARKOSSIAN, S. **Aerobic biodegradation of aromatic compounds having low water solubility using *Bacillus thermoleovorans* strain DSM 10562**. Patente US5965431, 1999.
- MARTINS, C. **Introdução da Concorrência e Barreiras à Entrada na Atividade de Refino de petróleo no Brasil**. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002. 96p.
- MARTINS. B. A. D. **Avaliação da cinética de biodegradação do etanol em concentrações mínimas necessárias dos nutrientes nitrogênio e fósforo**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2005. 96p.
- MATSUO, A. Y. O., WODDIN, B. R., REDDY, C. M., VAL, A. L., STEGEMAN, J. J. Humic substances and crude oil induce cytochrome P450 1A expression in the Amazonian fish species *Colossoma macropomum* (tambaqui). ***Environmental Science & Technology***, 40:2851-2858, 2006.
- McKEW, B. A., COULON, F., OSBORN, A. M., TIMMIS, K. N., MCGENITY, T. J. Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK. *Environmental Microbiology*, 9:165-176, 2007.
- MENEGHETTI, L. R. R. **Biorremediação na descontaminação de solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel**. Passo Fundo: UPF, 2007.
- MENEZES, E. W. de, SILVA, R. da, CATALUÑA, R., ORTEGA, R. J.C. Effect of ethers and ether/ethanol additives on the physicochemical properties of diesel fuel and on engine tests. *Fuel*, 85: 815-822, 2006.
- MENICONI, M. F. G., GABARDO, I. T., CARNEIRO, M. E. R., BARBANTI, S. M., SILVA, G. C., MASSONE, C. G. Brazilian Oil Spills Chemical Characterization-Case Studies. *Environmental Forensics*, 3(3-4):303-321, 2002.
- MERHI, Z. O. Gulf Coast oil disaster: impact on human reproduction. *Fertility and*

Sterility, 94(5):1575-1577, 2010.

MEYER, D. D. **Avaliação da biodegradabilidade de misturas de diesel e de biodiesel (b0, b20 e b100) em dois solos com diferentes granulometrias.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

MIALLAU, L.; ALPHEY, M. S.; KEMP, L. E.; LEONARD, G. A.; MCSWEENEY, S. M.; HECHT, S.; BACHER, A.; EISENREICH, W.; ROHDICH, F.; HUNTER, W. H. Biosynthesis of isoprenoids: Crystal structure of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase. *PNAS*, 100(16):9173–9178, 2003.

MISHIMA, M.; SHIDA, T.; YABUKI, K. KATO, K.; SEKIGUCHI, J.; KOJIMA, C. Solution structure of the peptidoglycan binding domain of *Bacillus subtilis* cell wall lytic enzyme cwIC: characterization of the sporulation-related repeats by NMR. *Biochemistry*, 44:10153-10163, 2005.

MITCHELL, C.; IYER, S.; SKOMURSKI, J. F.; VARY, J. C. Red pigment in *Bacillus megaterium* spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 52:64–67, 1986.

MIYAMOTO, S.; NAOE, C.; TSUNODA, M.; NAKAMURA, K. T. Crystallization and preliminary X-Ray diffraction analysis of exodeoxyribonuclease III from *Crenarchaeon sulfolobus* tokodaii strain 7. *Crystal Structure Theory and Applications*, 2:155-158, 2013.

MIZUNO, Y.; MOORHEAD, G. B. G.; NG, K. K.-S. Structural Basis for the Regulation of N-Acetylglutamate Kinase by PII in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(49):35733–35740, 2007.

MMA – Ministerio do Meio Ambiente. **Caderno setorial de recursos hídricos: transporte hidroviário.** Brasília: MMA, 2006. 120p.

MORIKAWA, M.; ITO, M.; IMANAKA, T. Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus* A-I, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, psf-1. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74(5):255-261, 1992.

MUTZEL, A.; REINSCHIED, U. M.; ANTRANIKIAN, G.; MÜLLER, R. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* strain, that degrades phenol and cresols as sole carbon source at 70 °C. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46:593–596, 1996.

NAKAI, C.; KAGAMIYAMA, H.; NOZAKI, M.; NAKAZAWA, T.; INOUE, S.; EBINA, Y.; NAKAZAWA, A. Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene on the TOI plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *The Journal of Biological Chemistry*, 258:2923-2928, 1983.

NAKAMURA, L. K. Taxonomic relationship of black- pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39:295–300, 1989.

NAKANISHI, M.; YATOME, C.; ISHIDA, M.; KITADE, Y. Putative ACP phosphodiesterase gene (*acpD*) encodes an azoreductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276:46394-46399, 2001.

- NANO, G.; BORRONI, A., ROTA, R. Combined slurry and solid-phase bioremediations of diesel contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, B100:79-94, 2003.
- NEVSKAYA, N.; TISHCHENKO, S.; GABDOULKHAKOV, A.; NIKONOVA, E.; NIKONOV, O.; NIKULIN, A.; PLATONOVA, O.; GARBER, M.; NIKONOV, S.; PIENDL, W. Ribosomal protein L1 recognizes the same specific structural motif in its target sites on the autoregulatory mRNA and 23S rRNA. *Nucleic Acids Research*, 33(2):478:485, 2005.
- NAVARRO-LLORENS, J. M.; PATRAUCHAN, M. A; STEWART, G, R.; DAVIES, J. E.; ELTIS, L. D.; MOHN, W. W.; Phenylacetate catabolism in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: a central pathway for degradation of aromatic compounds. *Journal of Bacteriology*, 187:4497-4504, 2005.
- NEFF, J. M. Polycyclic aromatic hydrocarbon in the aquatic environment: sources, fates and biological effects. London: Applied Science Publishers, 1979.
- NEFF, J. M. **Polycyclic aromatic hydrocarbons**. In: RAND, G. M. AND S. R. PETROCELLI. *Fundamentals Aquatic Toxicology*. Bristol, PA: Taylor & Francis, 1985, p.416-454.
- NELSON, S. W.; BINKOWSKI, D. J.; HONZATKO, R. B.; Fromm, H. J. Mechanism of action of *Escherichia coli* phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthetase. *Biochemistry*, 44: 766-774, 2005.
- NIELSEN, P.; FRITZE, D.; PRIEST, F. G. Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species. *Microbiology*, 141:1745–1761, 1995.
- NIJEHOLT, J. A. L.; DRIESSEN, A. J. M. The bacterial Sec-translocase: structure and mechanism. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 367:1016-1028, 2012.
- OLIVEIRA, C. P. F. **Biomarcadores moleculares, genotóxicos e enzimáticos de efeitos do petróleo em tambaqui (*Colossoma macropomum*): subsídios para o monitoramento ambiental na amazônia**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Amazonas, 2010. 158p.
- OLSEN, G. H., SVA, E., CARROLL, J., CAMUS, L., DE COEN, W., SMOLDERS, R., ØVERAAS, H., HYLLAND, K. Alterations in the energy budget of Arctic benthic species exposed to oil-related compounds. *Aquatic Toxicology*, 83(2):85-92, 2007.
- OZKOCAMAN, V.; OZCELIK, T.; ALI, R.; OZKALEMKAS, F.; OZKAN, A.; OZAKIN, C.; AKALIN, H.; URSAVAS, H.; COSKUN, F.; ENER, B.; TUNALI, A. *Bacillus* spp. among hospitalized patients with haematological malignancies: clinical features, epidemics and outcomes. *Journal of Hospital Infection*, 64:169-176, 2006.
- PACHECO, M., SANTOS, M. A. Tissue distribution and temperature- dependence of *Anguilla anguilla* L. EROD activity following exposure to model inducers and relationship with plasma cortisol, lactate and glucose levels. *Environment International*, 26(3):149-155, 2001.

- PAGET, M. S. B.; HELMANN, J. D. The σ^{70} family of sigma factors. *Genome Biology*, 4(1), 2003.
- PAOLETTI, P.; LU, Y.-J.; SCHUJMAN, G. E. MENDOZA, D.; ROCK, O. R. Coupling of fatty acid and phospholipid synthesis in *Bacillus subtilis*, *Journal of Bacteriology*, 189(16): 5816–5824, 2007.
- PATRAUCHAN, M. A.; FLORIZONE, C.; EAPEN, S.; GÓMEZ-GIL, L.; SETHURAMAN, B.; FUKUDA, M.; DAVIES, J.; MOHN, W. W.; ELTIS, L. D. Roles of ring-hydroxylating dioxygenases in styrene and benzene catabolism in *Rhodococcus jostii* RHA1. *Journal of Bacteriology*, 190:37-47, 2008.
- PEDROTI, G. I. **Ensaio de biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados do petróleo em solos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, 2007. 120p.
- PELEGRINE, D. H. G.; GOMES, M, T. M. S. Whey proteins solubility curves at several temperatures values. *Ciência e Natura*, 30 (1):17 - 25, 2008.
- POTTER, T. L., SIMMONS, K. E. **TPH Series Volume 2: Composition of Petroleum Mixtures Composition of petroleum mixtures**. Amherst Scientific Publishers, 1998. 102p.
- PRABHU, Y., PHALE, P. S. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61:342-351, 2003.
- PROSSER, G. A.; COPP, J. N.; SYDDALL, S. P.; WILLIAMS, E. M.; SMAILL, J.B.; WILSON, W. R.; PATTERSON, A. V.; ACKERLEY, D. F. Discovery and evaluation of *Escherichia coli* nitroreductases that activate the anti-cancer prodrug CB1954. *Biochemical Pharmacology*, 79:678–687, 2010.
- RAFII, F.; CERNIGLIA, C. E. Reduction of azo dyes and nitroaromatic compounds by bacterial enzymes from the human intestinal tract. *Environmental Health Perspectives*, 103(5):17-19, 1995.
- RAMÓN-MAIQUES, S.; MARINA, A.; GIL-ORTIZ, F.; FITA, I; RUBIO, V. Structure of acetylglutamate kinase, a key enzyme for arginine biosynthesis and a prototype for the amino acid kinase enzyme family, during catalysis. *Structure*, 10:329–342, 2002.
- RAMOS, J. L.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; MOLINA-HENARES, A. J.; TERÁN, W.; WATANABE, K.; ZHANG, X.; GALLEGOS, M. T.; BRENNAN, R.; TOBES, R. The TetR Family of Transcriptional Repressors. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 69(2):326–356, 2005.
- RAMSAY, M.A., SWANNELL, R.P.J., SHIPTON, W.A., DUKE, N.C., HILL, R. T. Effect of biorremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 41(7):413-419, 2000.

- RAYBURN, J. R., GLAS, P. S., FOSS, S. S., FISHER, W. S. Characterization of grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) embryo toxicity tests using the water-soluble fraction of number 2 fuel oil. *Marine Pollution Bulletin*, v.32, 12, p.860-866, 1996
- RAZA, Z. A.; KHAN, M. S.; KHALID, Z. M.; REHMAN, A. Production of biosurfactant using different hydrocarbons by *Pseudomonas aeruginosa* EBN-8 mutant. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, 61c:87-94, 2006.
- REES, D. R.; JOHNSON, E. LEWINSON, O. ABC transporters: The power to change, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10(3): 218–227, 2009.
- RESNICK, S. M., GIBSON, D. T. Regio- and stereospecific oxidation of fluorene, dibenzofuran, and dibenzothiophene by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816-4. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:4073-4080, 1996.
- RODRIGUES, R. V., MIRANDA-FILHO, K. C., GUSMÃO, E. P., MOREIRA, C. B., ROMANO, L. A. AND SAMPAIO, L. A. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *Science of the Total Environment*, 408:2054–2059, 2010.
- RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E.; ZÚÑIGA-CHACÓN, C.; BARBOZA-SOLANO, C. Evaluation of growth in diesel fuel and surfactants production ability by bacteria isolated from fuels in Costa Rica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 32(2):116-120, 2012.
- RODRIGUEZ, C. P., OLIVEIRA, S. M. B. de, NASCIMENTO, C. A. O. do. A influência das características dos solos na remediação de locais contaminados através de processos oxidativos avançados com persulfato e reagente de fenton. *Águas Subterrâneas*. 26(1):131-141, 2012.
- ROMERO, M. C.; CAZAU, M. C.; GIORGIERI, S.; ARAMBARRI, A. M. Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream. *Environmental Pollution*, 101, 355-359, 1998.
- RUBINSON, E. H.; METZ, E. H.; O'QUIN, J.; EICHMAN, B. F. A New arotein architecture for processing alkylation damaged DNA: the crystal structure of DNA glycosylase AlkD. *Journal of Molecular Biolog*, 381:13–23, 2008.
- RUGER, H. -J.; KOPLOY, J. A. C. DNA base composition of halophilic and nonhalophilic *Bacillus firmus* strains of marine origin. *Microbial Ecology*, 6:141–146, 1980.
- RYAN, A.; KAPLAN, E.; LAURIERI, N.; LOWE, E.; SIM, E. Activation of nitrofurazone by azoreductases: multiple activities in one enzyme. *Scientific Reports*, 1(63):1-5, 2011.
- SADYGOV, R. G.; COCIORVA, D.; YATES, J. R. Large-scale database searching using tandem mass spectra: Looking up the answer in the back of the book. *Nature Methods*, 1(3):195-202, 2004.

- SAMANTA, S. K., CHAKRABORTI, A. K., JAIN, R. K. Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 53, p. 98-107, 1999.
- SANTOS, R. M., LEITE, S. G. F., SOBRAL, L. G. S., RIZZO, A. C. L. Remediação de solo contaminado por petróleo em biopilhas – ecala piloto. 4º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo – PDPetro, Campinas – SP, 2007.
- SATPUTE, S. K.; BANAT, I. M.; DHAKEPHALKAR, P. K. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnology Advances*, 28: 436–450, 2010.
- SAUVAGE, E.; KERFF, F.; TERRAK, M.; AYALA, J. A.; CHARLIER, P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 32:234–258, 2008.
- SAVIJOKI, K.; AIRI PALVA, A. Purification and molecular characterization of a tripeptidase (PepT) from *Lactobacillus helveticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2):794-800, 2000.
- SCHNEIKER, S., MARTINS DOS SANTOS, V. A., BARTELS, D., BEKEL, T., BRECHT, M., BUHRMESTER, J., CHERNIKOVA, T. N., DENARO, R., FERRER, M., GERTLER, C., GOESMANN, A., GOLYSHINA, O. V., KAMINSKI, F., KHACHANE, A. N., LANG, S., LINKE, B., McHARDY, A. C., MEYER, F., NECHITAYLO, T., PÜHLER, A., REGENHARDT, D., RUPP, O., SABIROVA, J. S., SELBITSCHKA, W., YAKIMOV, M. M., TIMMIS, K. N., VORHÖLTER, F. J., WEIDNER, S., KAISER, O., GOLYSHIN, P. N. Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Nature Biotechnology*, 24:997–1004, 2006.
- SCHUMAN, B.; EVANS, S. V. ; FYLES, T. M. Geometric attributes of retaining glycosyltransferase enzymes favor an orthogonal mechanism. *PLOS One*, 8(8):1-9, 2013.
- SEABRA, P.N. **Uso da biorremediação em áreas impactadas pela indústria de petróleo**. II Workshop sobre Biodegradação. Campinas, SP, 2001.
- SEO, J., KEYN, Y., LI, Q. X. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 6, p. 278-309, 2009.
- SEO, M. S.; KANG, S. W.; KIM, K.; BAINES, I. C.; LEE, T. H.; RHEE, S. G. Identification of a New Type of Mammalian Peroxiredoxin That Forms an Intramolecular Disulfide as a Reaction Intermediate. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(27):20346–20354, 2000.
- SHARMA, R.; DAVIES, A. G.; WÄLTI, C. Nanoscale programmable sequence-specific patterning of DNA scaffolds using RecA protein. *Nanotechnology*, 23, 2012.
- SIKDAR, M. S. I.; KIM, J.-S. Expression of a gene encoding acetolactate synthase

- from rice complements two ilvH mutants in *Escherichia coli*. *Australian Journal of Crop Science*, 4(6):430-436, 2010.
- SILVA, R. L. B., BARRA, C. M., MONTEIRO, T. C. do N., BRILHANTE, O. M. Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis consequências para a saúde pública no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, 18(6):1599-1607, 2002.
- SINGH, P. K.; RAMACHANDRAN, G.; RAMOS-RUIZ, R. PEIRÓ-PASTOR, R.; ABIA, D.; WU, L. J.; MEIJER, W. J. J. Mobility of the native *Bacillus subtilis* conjugative plasmid pLS20 is regulated by intercellular signal. *PLOS Genetics*, 9(10):1-13, 2013.
- SMITH, T.; FOSTER, S. J. Characterization of the involvement of two compensatory autolysins in mother cell lysis during sporulation of *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Bacteriology*, 177(13):3855–3862, 1995.
- SOLMONS, T. W. G. *Organic Chemistry*. New York: John Wiley, vol. 1, 1996. 777p.
- SORIANO, J. A., VIÑAS, L., FRANCO, M. A., GONZÁLEZ, J. J., ORTIZ, L., BAYONA, J. M., ALBAIGÉS, J. Spatial and temporal trends of petroleum hydrocarbons in wild mussels from the Galician coast (NW Spain) affected by the Prestige oil spill. *Science of the Total Environment*, 370(1):80-90, 2006.
- SORKHOH, N. A.; IBRAHIM, A. S.; GHANNOUM, M. A.; RADWAN, S. S. High-temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil-polluted Kuwait desert. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39:123–126, 1993.
- SOUSA, M. V.; FONTES, W.; RICART, C. A. O. Análise de proteomas: o despertar da era pós-genômica. *Biociência*, 2(7):12-14, 1999.
- SPEIGHT, J. G. **The Chemistry and Technology of Petroleum**. 4 ed. Boca Raton, CRC Press: Taylor & Francis Group, 2006. 955p.
- SUN, J.-A.; ZHANG, L.-Y.; RAO, B. SHEN, Y.-L.; WEI, D.-Z. Enhanced acetoin production by *Serratia marcescens* H32 with expression of a water-forming NADH oxidase. *Bioresource Technology* 119:94–98, 2012.
- SURESH, K.; PRABAGARAN, S. R.; SENGUPTA, S.; SHIVAJI, S. *Bacillus indicus* sp. nov., an arsenic-resistant bacterium isolated from an aquifer in West Bengal, India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54:1369–1375, 2004.
- SYU, M.-J. Biological production of 2,3-butanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55:10-18, 2001.
- TAVARES, M. E. E. **Análise do Refino no Brasil: estado e perspectivas - uma análise "cross-section"**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005. 384p.

- TAKAMATSU, H.; KODAMA, T.; IMAMURA, A.; ASAI, K.; KOBAYASHI, K.; NAKAYAMA, T.; OGASAWARA, N.; WATABE, K. The *Bacillus subtilis* yabG gene is transcribed by SigK RNA Polymerase during sporulation, and yabG mutant spores have altered coat protein composition. *Journal of Bacteriology*, 182(7):1883–1888, 2000.
- TENA, D MARTÍNEZ-TORRES, J. A.; PÉREZ-POMATA, M. T; SÁEZ-NIETO, J. A.; RUBIO, V.; BISQUERT, J. Cutaneous infection due to *Bacillus pumilus*: report of 3 cases. *Clinical Infectious Diseases*, 44:e40–e42, 2007.
- TORTORA, G.J. FUNKE, B.R., CASE, C.L. Microbiologia. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827p.
- TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. *Nature*, 422:193-197, 2003.
- UEHARA, T.; SUEFUJI, K.; VALBUENA, N.; MEEHAN, B.; DONEGAN, M.; PARK, J. T. Recycling of the anhydro-n-acetylmuramic acid derived from cell wall murein involves a two-step conversion to n-acetylglucosamine-phosphate. *Journal of Bacteriology*, 187(11):3643–3649, 2005.
- URURAHY, A. F. P., PEREIRA JR, N., MARINS, M. D. M. Desempenho de um biorreator do tipo CSTR no processo de degradação de borra oleosa. Boletim Técnico da Petrobrás. v. 41, p. 125-132, 1998.
- VAL, A.L. **Efeitos do petróleo sobre a respiração de peixes da Amazônia.** In: MARTOS, H. L.; MAIA, N. B. (Eds). Indicadores Ambientais. Sorocaba, São Paulo: Pontifícia Universidade Católica, p.109-119, 1997.
- VAN HAMME, J. D. SINGH, A., WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4):503-549, 2003.
- VEIGA, I. G. **Avaliação da Origem dos Hidrocarbonetos em Sedimentos Superficiais de Manguezais da Região Norte da Baía de Todos os Santos, Bahia.** Dissertacao de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2003.
- VOLLMER, W.; BLANOT, D.; PEDRO, M. A. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32:149–167, 2008.
- WACHINOA, J-. I.; ARAKAWA, Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: An update. *Drug Resistance Updates*, 15:133–148, 2012.
- WAGNER, J.; NOHMI, T. *Escherichia coli* DNA Polymerase IV Mutator Activity: Genetic Requirements and Mutational Specificity. *Journal Of Bacteriology*, 182(16):4587–4595, 2000.
- WALTER, K. A.; NAIR, R. V.; CARYB, J. W.; BENNETTC, J. N.; PAPOUTSAKIS, E. T. Sequence and arrangement of two genes of the butyrate-synthesis pathway of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Genes*, 134:105-111, 1993.

- WEI, Y. H.; WANG, L. F.; CHANG, J. S.; KUNG, S. S. Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(2):174- 178, 2003.
- WEICKERT, M. J.; ARDHYA, S. A Family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(22): 15869-15874, 1992.
- WEISMAN, W. **Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Environmental Media.** Massachusetts: Amherst Scientific Publishers, 1998. 98p.
- WEISSENFELS, W. D.; BEYER, M.; KLEIN, J. Degradation of phenanthrene, fluorene, and fluoranthene by pure bacterial cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 132, 479-484, 1990.
- WENTZEL, A., ELLINGSEN, T. E., KOTLAR, H. K., ZOTCHEV, S. B., THRONEHOLST, M. Bacterial metabolism of long- chain n-alkanes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76:1209–1221, 2007.
- WERNERSSON, A. Predicting petroleum phototoxicity. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 54: 355-365, 2003.
- WHYTE, L. G.; BOURBONNIÈRE, L.; GREER, C. W. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:3719–3723, 1997.
- WIDDEL, F., RABUS, R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 259-276, 2001.
- WILLIAMS, P. A.; SAYERS, J. R. The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. *Biodegradation*, 5:195-217, 1994.
- WOOD, Z. A.; SCHRÖDER, E.; HARRIS, J. R.; POOLE, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 28:32-40, 2003.
- XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J. S.; van LOOSDRECHT, M. C. M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilms. *Boletim de Biotecnologia*, 76:3-13, 2003.
- XIAO, Z.; QIAO, S.; MA, C.; XU, P. Acetoin production associated with the increase of cell biomass in *Bacillus pumilus* ATCC 14884. *African Journal of Microbiology Research*, 4(18):1997-2003, 2010.
- XIAO, Z.; XU, P. Acetoin Metabolism in Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 33:127–140, 2007.
- XU, P.; XIAO, Z.; DU, Y.; WEI, Z. Acetoin high-yield *Bacillus pumilus* strain. Patent US2009/0215152A1, 2009.

- YAKIMOV, M. M., GIULIANO, L., DENARO, R., CRISAFI, E., CHERNIKOVA, T. N., ABRAHAM, W. R., LUENSDORF, H., TIMMIS, K. N., GOLYSHIN, P. N. *Thalassolituus oleivorans* General nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54:141–148, 2004.
- YAKIMOV, M. M., GOLYSHIN, P. N., LANG, S., MOORE, E. R., ABRAHAM, W. R., LUNSDORF, H., TIMMIS, K. N. *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(2):339–348, 1998.
- YAKIMOV, M. M., TIMMIS, K. N., GOLYSHIN, P. N. Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 18:257–266, 2007.
- YAKIMOV, M. M.; GIULIANO, L.; GENTILE, G.; CRISAFI, E.; CHERNIKOVA, T. N.; ABRAHAM, W. R.; Heinrich LÜSDORF, H.; TIMMIS, K. N; GOLYSHIN, P. N. *Oleispira antarctica* gen. nov., sp. nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 779–785, 2003.
- YOON, J. H.; KANG, S. S.; LEE, K. C.; KHO, Y. H.; CHOI, S. H.; KANG, K. H.; PARK, Y. H. *Bacillus jeotgali* sp. nov., isolated from jeotgal, Korean traditional fermented seafood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51:1087–1092, 2001.
- YOON, J. H.; LEE, C. H.; OH, T. K. *Bacillus cibi* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55:733–736, 2005.
- YOON, J.-M.; YOON, M.-Y.; KIM, Y. T.; CHOI, J.-D. Characterization of two forms of acetolactate synthase from barley. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36(5):456-461, 2003.
- YU, S. H., KE, L., WONG, Y. S., TAM, N. F. Y. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environment International*, 31:149-154, 2005.