

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

**PERFIL PROTEÔMICO DE *Acinetobacter junii* CULTIVADA EM**  
**PETRÓLEO E DIESEL**

**JÚLIO NINO DE SOUZA NETO**

Manaus/AM

2015

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

**JÚLIO NINO DE SOUZA NETO**

**PERFIL PROTEÔMICO DE *Acinetobacter junii* CULTIVADA EM**  
**PETRÓLEO E DIESEL**

Dissertação Apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como Parte dos Requisitos para Obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia, Área de Concentração: Agroflorestral.

**Orientador: Dr. Edmar Vaz de Andrade**

Manaus/AM

2015

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729p Souza Neto, Júlio Nino de  
Perfil proteômico de *Acinetobacter junii* cultivada em petróleo e diesel / Júlio Nino de Souza Neto. 2015  
117 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Edmar Vaz de Andrade  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Acinetobacter junii*. 2. Proteoma de bactéria. 3. Degradação de xenobióticos. 4. Microorganismo da Amazônia. I. Andrade, Edmar Vaz de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**JÚLIO NINO DE SOUZA NETO**

**PERFIL PROTEÔMICO DE *Acinetobacter junii* CULTIVADA EM  
PETRÓLEO E DIESEL**

Dissertação Apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como Parte dos Requisitos para Obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia, Área de Concentração: Agroflorestal.

**DEFESA DE DISSERTAÇÃO EM 25/02/2015**

**BANCA EXAMINADORA:**

**Titulares**

Dr. Edmar Vaz de Andrade — (Orientador/UFAM)

Dra. Marlene Teixeira De-Souza — (UnB)

Dra. Isabelle Bezerra Cordeiro — (UFAM)

**Suplentes**

Dr. Jorge Luis López-Lozano - (FMT - AM)

Dr. Hugo Valério Corrêa de Oliveira- (UEA)

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, na sua forma realmente verdadeira e que provavelmente ninguém saberia descrever, por mais essa conquista!

A minha amada família, Nivaldo, Izabel, Reinaldo, Joana, Neurilene, entre outros, que sempre estiveram ao meu lado dando apoio a minha carreira científica.

Ao meu orientador, Dr. Edmar Vaz de Andrade, por sua orientação, paciência e dedicação a este trabalho e que acima de tudo é meu grande amigo.

Ao Dr. José Odair Pereira e Dr. Spartaco Astolfi Filho. Meus sinceros agradecimentos pela confiança investida!

Aos meus amigos Maurício, Anita, Dina, Edson, Jefferson, Leissandra que me proporcionaram um bom ambiente de trabalho.

A Dra Solange Pires de Araújo na qual compartilhou dados referentes ao seu trabalho de tese que deu origem a esta pesquisa.

Aos pesquisadores Dr. Carlos Bloch, Dra Marlene Teixeira De-Souza , Dra Maura, Juliana, Beatriz, Marcelo e demais colega, por me proporcionar novas experiências na pesquisa.

A UFAM, CBA, UnB e EMBRAPA/CENARGEN pelas dependências utilizadas durante a execução desta pesquisa.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

E a todos que torceram por mim.

Muito Obrigado!

## EPÍGRAFE

"Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar"

**Chico Xavier**

## LISTA DE FIGURAS

TÍTULO DA FIGURA	PÁGINA
<b>Figura 1. Fluxograma das etapas desenvolvidas na pesquisa.</b> .....	41
<b>Figura 2. Localização de coleta de macrófita aquática.</b> <i>E. crassipes</i> foi coletada no Rio Negro, no porto de Manaus (área mostrada pela seta vermelha). A partir da superfície de suas folhas, <i>A. junii</i> SB132 foi isolada. A localização global é S 3°8'50.30" e W 59°57'22,20", com elevação de 39m (Araújo, 2014). A imagem foi obtida com o Google Earth 2014.....	43
<b>Figura 3. Atividade biodegradadora de <i>A. junii</i> SB132.</b> Fotos tiradas após 24h de cultivo em (A) diesel 1,3%, (B) petróleo bruto 1,3% e (C) em extrato de levedura 1,3%. O crescimento bacteriano é observado pela formação de turvação nos cultivos nas três fontes de carbonos citadas( substrato A, B e C). Foto: Souza-Neto.....	43
<b>Figura 4. Crescimento em meio sólido.</b> A bactéria foi cultivada por 24h a 30 °C, em meio sólido BH acrescido de petróleo bruto (A), diesel (B) e extrato de levedura (C), como únicas fontes de carbono e energia.....	52
<b>Figura 5. Coloração de cápsula.</b> A coloração foi realizada em células de colônias de <i>A. junii</i> SB132 com 24h. As fotos foram tiradas com aumento de 1000x em microscópio óptico. (A), células crescidas em petróleo bruto. (B), células crescidas em diesel. (C), células crescidas em extrato levedura. Na extremidade superior direita das imagens é mostrando aumento manual para melhor visualização da cápsula.....	53
<b>Figura 6. Coloração de Gram.</b> A coloração foi realizada em células de colônias de <i>A. junii</i> SB132 com 24h de cultivo em três condições. As imagens foram obtidas a partir de microscopia óptica (1000x). (A), células crescidas em petróleo bruto. (B), células crescidas em diesel. (C), células crescidas em extrato levedura. Na extremidade superior direita das imagens é mostrado aumento manual para visualização da morfologia e arranjo. ....	54
<b>Figura 7. Teste de viscosidade e coloração com agente fluorescente.</b> O teste de viscosidade e coloração com agente fluorescente (aumento de 200x) foram realizadas em células de colônias de <i>A. junii</i> SB132 com 24h de cultivo em meio	

mínimo com petróleo. (A), viscosidade observada pela liberação do conteúdo de DNA. (B), células com coloração verde indicando que a bactéria é Gram-negativa. 56

**Figura 8. Halos de inibição de crescimento de *A. junii* SB132 frente a antibióticos.** A bactéria foi submetida ao teste de sensibilidade utilizando multidiscos de antibióticos: CIP 5 (ciprofloxacina 5µg), GEN 10 (gentamicina 10µg), AMI 30 (amicacina 30µg), SUT 25 (sulfametoxazol-trimetoprim 25µg), CFO 30 (cefotaxima 30µg), CPM 30 (cefepime 30µg), CAZ 30 (ceftazidima 30µg), MER 10 (meropenem 10µg), AMP 10 (ampicilina 10µg), CLF 30 (cefalotina 30µg), CRX 30 (cefuroxima 30µg) e AMC 30 (amoxicilina-clavulanato 30µg). Os halos foram medidos com 24h de crescimento a 30 °C.....57

**Figura 9. Perfil plasmidial de *A. junii* SB132.** Os plasmídeos foram extraídos por lise alcalina e purificação em coluna cromatográfica de afinidade usando os kits QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) (1 e 2) e Large-Construct (Qiagen) (3). O perfil plasmidial foi obtido por eletroforese de agarose 0,5%, tensão de 0,5V/cm e temperatura de 4 °C. Foram aplicados nos poços (1,2 e 3) dos géis 30µL de amostra de plasmídeos extraídos. Marcadores de massa molecular foram 1 kb ladder (*New England Biolabs* - UK) NEB (M) e plasmídeos superenovelados (E) de *E. coli* ETEC H10407 (massas indicadas pela setas pretas). Pode-se identificar 9 banda (setas vermelhas) no gel que indicam a presença de plasmídeos. A faixa de tamanho dos plasmídeos foi de 94kb a 5kb.....60

**Figura 10. Espectro de proteínas ribossomais de *A. junii* SB132.** O espectro mostra os picos de proteínas no espectro MS de MALDI obtidos no modo automático do espectrômetro Microflex (*Bruker*). A identificação foi feita comparando o espectro obtido com o espectro disponível no banco de dados. As amostras foram analisadas com diversas réplicas e provenientes de três condições de cultivo (petróleo bruto, diesel e extrato de levedura). O eixo X apresenta a razão m/z e o eixo y, a intensidade dos picos.....63

**Figura 11. Curva de crescimento bacteriano.** A bactéria foi cultivada em extrato de levedura 1,3% ( ), petróleo bruto 1,3% ( ) e diesel 1,3% ( ) em triplicata. As absorbâncias ( $\lambda= 600\text{nm}$ ) expressas em escala logarítmica (eixo Y) foram obtidas em intervalos de 4h (eixo X) para todas as condições. As células para extração de proteínas foram coletadas com 24h de crescimento em todas as condições (indicado pela seta).....64



**Figura 12. Perfil protéico de *A. junii* SB132 em SDS-PAGE.** As proteínas foram extraídas com 24h de crescimento em (E) extrato de levedura 1,3%, (P) petróleo bruto 1,3% e (D) diesel 1,3%. Avaliou-se 5, 10 e 15µg de proteínas de cada condição. O sistema de eletroforese usado foi o *Hoefler SE 600 Ruby* (*Amersham Bioscience*). O gel foi corado com Azul de Comassie R-350 em *overnight*.....67

**Figura 13. Mapas proteômicos de *A. junii* SB132.** As proteínas foram extraídas com 24h de crescimento em (A-B) petróleo bruto 1,3%, (C-D) diesel 1,3% e (E-F) extrato de levedura 1,3%. À esquerda são mostrados os géis não editados e à direita os géis editados após detecção de *spots* pelo programa *Image Master Platinum*, versão 6.0 (*GE Healthcare*). Aplicou-se 250µg de proteínas em cada *strip* de 13 cm (3-11 NL) para a focalização isoeletrica (primeira dimensão) e o sistema usado para SDS-PAGE (segunda dimensão) foi o *Hoefler SE 600 Ruby* (*Amersham Bioscience*). O gel foi corado com azul de Comassie R-350. ....69

**Figura 14. Comparação entre os mapas proteômicos de *A. junii* SB132.** Os géis foram obtidos e analisados como descrito no item 4.10.2. (A-B) comparação entre os géis da condição de cultivo em petróleo bruto e extrato de levedura. (C-D) comparação entre os géis da condição de cultivo em diesel e extrato de levedura. (E-F) comparação entre os géis da condição de cultivo em petróleo bruto e diesel. Os pontos em verde representam os *spots* que se repetem nas condições comparadas e os pontos em vermelho representam os *spots* que são específicos de cada condição. As imagens foram analisadas pelo programa *Image Master Platinum*, versão 6.0 (*GE Healthcare*).....72

**Figura 15. Spots analisados por espectrometria de massa.** Os números indicam *spots* no gel 2-DE referência da condição de crescimento em petróleo bruto. O recorte foi feito manualmente usando ponteira P1000. As proteínas foram tripsinizadas e analisadas em espectrômetro de massa e no programa Mascot (*Matrix Science*) pela ferramenta PMF (*peptide mass fingerprinting*).....75

**Figura 16. Via catabólica proposta para degradação de Naftaleno em bactéria.** A naftaleno dioxigenase (pertencente a família Rieske) inicia a via atacando o anel aromático para formar *cis*-(1R, 2S)-dihydroxy-1,2-dihydronaphthalene. A seta vermelha indica a reação que a enzima catalisa (Reproduzido de Seo *et al.*, 2009).  
.....79

**Figura 17. Vias de biossíntese de piridoxina.** Os círculos indicam os substratos. Piridoxina é a forma ativa da vitamina B6. 1\* indica 3-hidroxi-4-fosfohidroxia-cetobutirato; 2\* indica glyceraldehyde-3-phosphate. O gene *pdxB* (seta vermelha) codifica para a enzima eritronato-4-fosfato desidrogenase que converte eritronato-4-fosfato a 3-hidroxi-4-fosfohidroxia-cetobutirato (Reproduzido de Tanaka *et al.*, 2005).  
.....80

**Figura 18. Via biossintética de ácidos graxos.** A enzima  $\beta$ -hidroxiacil-ACP desidratase (seta vermelha a esquerda da imagem e análoga a 3-hidroxi-decanoil-[acil-proteína-transportadora] desidratase) catalisa a reação de desidratação de  $\beta$ -hidroxiacil-ACP para enol acil-ACP, gerando uma ligação insaturada (reproduzido de Xu *et al.*, 2013).  
.....82

**Figura 19. Ação da proteína mutT na fidelidade da replicação do DNA.** A 8-oxoguanina formada por oxidação da guanina, pode parear com a base timina na primeira replicação. Na segunda replicação, a 8-oxoguanina inserida parea com citosina (mutação de trasversão) ou timina. A proteína mutT está indicada pela seta vermelha (reproduzido de Fowler e Schaaper, 1997).  
.....84

**Figura 20. Regulação da atividade de proteínas via transferência de grupo fosfato por proteína quinase.** De acordo com a proteína alvo, a fosforilação pode ativar ou inativar sua função. No caso da P1, sua função é ativada, no caso da P2 sua função é inativada (reproduzido de Duarte, 2010).  
.....85

**Figura 21. Representação esquemática do metabolismo do L-triptofano.** A pirrolina-5-carboxilato (P5C) pode ser convertida espontaneamente em glutamato semialdeído (GSA). A P5CI é reduzida a prolina (PRO) pela pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR) e GSA é convertida em glutamato pela pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (P5CDH). Alternativamente GSA pode ser convertida em ornitina pela ornitina aminotransferase (OAT) e participa das reações do ciclo da ureia. A seta vermelha indica a pirrolina-5-carboxilato redutase (reproduzido de Vieira, 2010).  
.....86

**Figura 22. Estrutura do locus CRISPR.** As sequências palindrômicas repetidas estão intercaladas por sequências espaçadoras. O número destas sequências espaçadoras pode variar muito com a cepa bacteriana da mesma espécie. A sequência líder se encontra a 400pb à frente do locus CRISPR. À frente também se

encontram os genes para proteínas Cas (reproduzido de Karginov e Hannon, 2010).  
.....87

**Figura 23. Funcionamento do sistema CRISPR.** Um vírus introduz seu DNA na bactéria. Esse DNA é ligado a um complexo entre Cas e um pequeno crRNA. Esta união inativa o DNA viral e assim é degradado. Este crRNA pequeno é originado do processamento de um crRNA maior por uma outra proteína Cas. Em paralelo com a inativação do DNA, uma outra proteína Cas reconhece o DNA viral, a partir do qual cria um novo segmento e o integra no *locus* CRISPR (reproduzido de Karginov e Hannon, 2010).....88

**Figura 24. Mecanismo de ativação de aminoácidos por uma aminoacil-tRNA sintetase da classe II.** Em laranja é mostrada a enzima. (1) A ativação do aminoácido em duas etapas: formação de um intermediário ligado à enzima, o aminoacil-AMP (adenilato proveniente do ATP); o grupo aminoacila é transferido do aminoacil-AMP para seu tRNA específico. (2) Pareamento do anticódon do aminoacil-tRNA com o códon no mRNA (reproduzido Lodish *et al.*, 2005). .....89

**Figura 25. Isomerização de uridina para pseudouridina ( $\psi$ ).** A esquerda são mostradas as famílias de pseudouridina sintetase e a direita é mostrado a reação de isomerização. A modificação ocorre na uridina que já se encontra no RNA. A seta vermelha indica a enzima pseudouridilato sintetase que tem como substrato o rRNA 23 S e o sítio de modificações (reproduzido de Hamm e Ferré-D'Amaré, 2006). .....90

**Figura 26. Sistema regulatório TonB-dependente.** Este sistema consiste de seis componentes: um receptor especializado localizado na membrana externa (OM) (transdutor TonB-dependente) (azul) , que interage com seu complexo protéico energizante TonB-ExbB-ExbD (laranja, rosa e amarelo), um fator anti-sigma localizado na membrana citoplasmática (CM) (vermelho) e um fator sigma (ECF $\sigma$ ) com função extracitoplasmática da subfamília ECF (verde) (reproduzido de Koebnik, 2005). .....92

**Figura 27. Via de  $\beta$ -oxidação.** O primeiro passo da  $\beta$ -oxidação (um ciclo de quatro reações enzimáticas) a acil-CoA desidrogenase insere uma ligação dupla entre o carbono  $\alpha$  e  $\beta$  via retirada de dois átomos de hidrogênio e transfere para o FAD, resultando no FADH<sub>2</sub> (reproduzido de Nelson e Cox, 2002). .....94

<b>Figura 28. Representação geral das vias para degradação de compostos aromáticos.</b> Pela via do $\beta$ -cetoadipato, uma dioxigenase cliva o anel aromático (catecol) e o produto formado são metabolizados por outras enzimas. As etapas que antecedem a formação do catecol são as reações periféricas, ou via superior, e as etapas que sucedem o catecol a partir da sua fissão, são as reações centrais, ou via inferior (reproduzido de Whitman, 2002). .....	95
<b>Figura 29. Via inferior para degradação de compostos aromáticos.</b> A enzima 4-oxalocronato tautomerase (mostrada pela seta vermelha) atua na isomerização do ácido 2-hidroximucônico (HMA) em 4-oxalocronato (OC) na rota do oxalocronato (reproduzido de Omokoko <i>et al.</i> , 2008). .....	95
<b>Figura 30. Via de degradação de 4-hidroxibenzoato.</b> As proteínas envolvidas na degradação de 4-hidroxibenzoato são reguladas pelas proteínas da família Crp/Fnr, AadR e HbaR em <i>Rhodopseudomonas palustris</i> (modificado de Eglund e Harwood, 2000). .....	97

## LISTA DE TABELAS

TÍTULO DA TABELA	PÁGINA
<b>Tabela 1. Teste de sensibilidade a antimicrobianos.</b> Os valores dos halos foram obtidos com 24h de crescimento de <i>A. junii</i> SB132 a 30°C. Multidiscos de antibióticos específicos para testes de bactéria Gram-negativa foram utilizados. Os parâmetros para estabelecimento do resultado (sensível, resistência intermediária e resistente) foram obtidos da <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (CLSI)/NCCLS (2005). ....	58
<b>Tabela 2. Confirmação taxonômica de <i>A. junii</i> SB132 por <i>biotyper</i>.</b> A bactéria foi cultivada em petróleo bruto 1,3%, diesel 1,3% e extrato de levedura 1,3% com crescimento de no máximo 24h. A identificação foi realizada em espectrômetro de massa Microflex ( <i>Bruker</i> ) em modo automático, com faixa de aquisição de 2.000 a 20.000 Da.....	62
<b>Tabela 3. Rendimento de proteínas.</b> A bactéria <i>A. junii</i> SB132 foi cultivada em extrato de levedura, petróleo bruto e diesel. As proteínas foram extraídas de células com crescimento de 24h a 30°C. A quantificação de proteínas foi realizada usando Kit <i>BCA Protein Assay Reagent Pierce</i> . ....	66
<b>Tabela 4. Análise de similaridade dos mapas proteômicos de <i>A. junii</i> SB132.</b> Os valores foram obtidos utilizando-se o software <i>Image Master Platinum 6.0</i> a partir dos géis referência comparados na Figura 14. Na tabela estão indicadas as condições de cultivo e a porcentagem de similaridade entre elas.....	73
<b>Tabela 5. Spots selecionados para análise por espectrometria de massa.</b> Foram selecionados <i>spots</i> comuns a todas as condições, <i>spots</i> presentes na condição de petróleo bruto e diesel, e <i>spots</i> presentes somente na condição de petróleo bruto. Os números indicam a identificação dos <i>spots</i> no gel e estes foram recortados com uma ponteira P1000. Foi utilizado somente o gel referência da condição crescimento em petróleo bruto. ....	74
<b>Tabela 6. Proteínas identificadas de <i>spots</i> comuns as condições de cultivo em petróleo bruto, diesel e extrato de levedura (constitutivas).....</b>	76
<b>Tabela 7. Proteínas identificadas de <i>spots</i> presentes nas condição de cultivo em petróleo bruto e diesel (diferenciais).....</b>	76

<b>Tabela 8. Proteínas identificadas de <i>spots</i> presentes nas condições de cultivo em petróleo bruto e diesel (diferenciais).....</b>	<b>77</b>
--	-----------

## RESUMO

O ambiente natural vem sofrendo elevados acúmulos de poluentes os quais não somente prejudicam o solo, as águas subterrâneas, rios, lagos, vias pluviais e o ar, mas também a saúde humana em virtude da formação de condições insalubres. Dentre os muitos efeitos, os derramamentos de petróleo e derivados acumulam no ambiente compostos xenobióticos que se tornam preocupantes pela sua persistência e seus efeitos nocivos à vida. Uma das soluções para esse problema é a biorremediação, uma ferramenta que utiliza microrganismos para degradação bioquímica desses compostos, transformando-os em substâncias menos, ou não tóxicas. Neste contexto, um estudo prévio isolou a bactéria *A. junii* SB132 de macrófitas do Rio Negro no porto de Manaus e confirmou sua identificação por morfologia e sequenciamento do gene 16S. Testes de biodegradação realizados em laboratório confirmaram a capacidade de esta bactéria degradar petróleo e diesel. O objetivo desta pesquisa foi identificar proteínas de *A. junii* SB132 envolvidas com vias de degradação de petróleo e diesel. Foram feitas análises de identificação usando proteínas ribossomais e análises fenotípicas como morfologia da bacteriana, perfil de sensibilidade a antibióticos e perfil plasmidial. A partir das proteínas extraídas de bactérias cultivadas em petróleo bruto 1,3%, diesel 1,3% e extrato de levedura 1,3%, foram feitos géis 2-DE e proteínas de *spots* similares e diferenciais foram identificadas por análise em espectrometria de massa e banco de dados no NCBI. A confirmação da identidade bacteriana foi obtida, bem como o perfil plasmidial. Estes dados revelaram que de fato a bactéria estudada nesta pesquisa é a *A. junii* e que esta possui plasmídeos com tamanhos de variam de 94.000pb a 5.000pb. As proteínas putativas identificadas estavam relacionadas a processos celulares como degradação de compostos xenobióticos, biossíntese de moléculas, reparo e proteção do DNA, proteínas transportadoras de membrana, sinalização celular e fatores de transcrição.

Palavras-chave: *Acinetobacter junii*, proteoma de bactéria, degradação de xenobióticos, microrganismo da Amazônia.

## ABSTRACT

Natural environment has suffered high accumulations of pollutants which not only affect the soil, groundwater, rivers, lakes, water courses and air, but also human health due to forming of unhealthy conditions. Among the many effects when crude oil and derivatives spill, the released xenobiotics to environment make worrisome because of its environmental persistence and harmful effects to life. One solution to this problem is bioremediation, a tool that uses microorganisms for biochemical degradation of these compounds, transforming them into less or non-toxic substances. In this context, a previous study isolated the bacteria *A. junii* SB132 from macrophytes of the Negro River bank located by the port of Manaus and confirmed its identity by morphology and 16S gene sequencing. Biodegradation tests performed in laboratory have confirmed the ability of this bacteria to degrade oil and diesel fuel. Therefore, the aim of this research was to identify proteins of *A. junii* SB132 related in degradation pathways of the crude oil and diesel fuel. Ribosomal proteins, phenotypic, bacterial morphology, sensitivity profile to antibiotics and plasmid profile analysis were obtained. Proteins extracted from bacterial grown in crude oil, diesel fuel and yeast extract, 1.3% respectively, were used for 2-DE gels and similar and differential proteins were identified by using mass spectrometry and database at NCBI. The identity bacterial was confirmed and the plasmid profile was taken. These data revealed that the bacteria studied in this research is the really *A. junii* specie and that this had plasmids with size ranging 94.000pb to 5.000pb. Identified putative proteins were related to cellular processes, such as degradation of xenobiotic compounds, biosynthesis of molecules, DNA repair and protection, membrane transport proteins, cell signaling and transcription factors.

Keywords: *Acinetobacter junii*, bacterial proteome, xenobiotic degradation, Amazon microorganism.



## SUMÁRIO

TÓPICOS	PÁGINA
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
2.1 BIORREMEDIAÇÃO .....	20
2.2 DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO.....	22
2.3 ORIGEM, COMPOSIÇÃO E IMPORTÂNCIA AMBIENTAL DO PETRÓLEO...24	
2.4 FISIOLOGIA E METABOLISMO BACTERIANO NA BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS .....	28
2.5 BIODEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO.....	31
2.6 BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS .....	32
2.7 CONSÓRCIO MICROBIANO.....	33
2.8 IMPORTÂNCIA BIOTECNOLÓGICA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Acinetobacter</i> .....	35
2.9 ANÁLISE PROTEÔMICA EM PROCESSOS DE BIODEGRADAÇÃO .....	37
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	40
3.1 GERAL.....	40
3.2 ESPECÍFICOS .....	40
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
4.1 MEIOS DE CULTURA.....	41
4.1.1 Substratos para crescimento bacteriano: petróleo bruto e diesel .....	42
4.2 AMOSTRA BACTERIANA .....	42
4.3 MORFOLOGIA DE COLÔNIAS E CELULAR.....	44
4.4 ANÁLISE DA NATUREZA QUÍMICA DO ENVELOPE BACTERIANO.....	44
4.5 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....	44
4.6 PERFIL PLASMIDIAL DE <i>A. junii</i> SB132.....	45
4.7 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA POR ESPCTROMETRIA DE MASSA.....	45

4.8 PERFIL DE CRECIMENTO BACTERIANO .....	46
4.8.1 Preparo de pré-inóculos e inóculos.....	46
4.8.2 Perfil de crescimento de <i>A. junii</i> SB132 .....	47
4.9 OBTENÇÃO DO EXTRATO PROTÉICO .....	47
4.10 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS POR ELETROFORESE .....	48
4.10.1 Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE).....	48
4.10.2 Eletroforese bidimensional (focalização isoeétrica e SDS-PAGE) .....	48
4.11 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	49
4.11.1 Preparo das amostras.....	49
4.11.2 Obtenção dos fragmentos trípticos .....	50
4.11.3 Obtenção dos espectros de massa.....	50
4.11.4 Identificação das proteínas .....	50
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
5.1 MORFOLOGIA DE COLÔNIAS E CELULAR.....	52
5.2 ANÁLISE DA NATUREZA QUÍMICA DO ENVELOPE BACTERIANO.....	55
5.3 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....	56
5.4 PERFIL PLASMIDIAL DE <i>A. junii</i> SB132 .....	59
5.5 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA .....	62
5.6 CURVA DE CRECIMENTO BACTERIANO .....	64
5.7 OBTENÇÃO DO EXTRATO PROTÉICO .....	66
5.8 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS POR ELETROFORESE .....	67
5.8.1 Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE).....	67
5.8.2 Eletroforese bidimensional (focalização isoeétrica e SDS-PAGE) .....	68
5.8.2.1 Perfil proteômico nas diferentes condições de cultivo .....	68
5.8.2.2 Expressão diferencial nos perfis proteômicos .....	71
5.9 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	74

5.9.1 Proteínas detectadas em todas as condições de cultivo .....	78
5.9.2 Proteínas detectadas somente nas condições de cultivo em petróleo bruto e diesel .....	84
5.9.3 Proteínas detectadas somente na condição de cultivo em petróleo bruto .	87
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>99</b>
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>101</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>102</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Com a revolução industrial (por volta de 1750), um novo elemento foi acrescentado às paisagens urbanas: as altas chaminés de tijolos lançando no ar a fumaça de carvão e que respondem atualmente por grande parte da poluição atmosférica. Após a revolução industrial, com a utilização do petróleo e da eletricidade, o mundo moderno começa a se configurar até ao ponto como conhecemos atualmente, com muitas pessoas concentradas nos centros urbanos. No início, os resíduos de carvão e outras substâncias eram simplesmente descartados no ambiente natural como o solo e a água, sem qualquer preocupação com os resultados de tais atos, resultando no que é observado nos dias atuais, na degradação ambiental (Anonymous. Instituto Unibanco e Fundação Victor Civita, 2003).

A poluição se refere à presença de resíduos sólidos, líquidos ou gasosos em quantidade acima do que o ambiente natural consegue se recuperar, perdendo uma ou mais características naturais e tornando-se impróprio para os seres vivos. Todas as diferentes formas de poluição afetam a composição e o equilíbrio da atmosfera, das águas, do solo e do subsolo, interferem na cadeia alimentar, alteram os mecanismos naturais de proteção do planeta, prejudicam as espécies animais e vegetais existentes e podem ameaçar sua reprodução (Amorim *et al.*, 2003).

Classificar os tipos de poluição é meramente organizacional, pois todos possuem impactos importantes na vida. No entanto, a poluição industrial tem deixado muitas cicatrizes na natureza, pelos grandes prejuízos e que a torna de grande importância em qualquer discussão sobre biorremediação. Grande parte dos compostos poluentes liberados permanece no ambiente por muito tempo, pois não desaparecem por mecanismos naturais e causam sérios transtornos ecológicos (Barbieri, 1997).

Dentre os compostos liberados no ambiente, os xenobióticos ganham um grande espaço como poluidores. Este é um produto químico que é estranho ao sistema biológico. Dentro desta classe estão os medicamentos (antibióticos, aspirina,  $\beta$ -bloqueadores, entre outros, que são xenobióticos em humanos porque o corpo humano não os produz, nem são parte da dieta normal), os pesticidas (fungicidas, herbicidas, nematocidas, demais biocidas), resíduos industriais que possam contaminar os produtos alimentares ou o ambiente, aditivos alimentares,

resíduos de antibióticos usados na produção de carne, detergentes e lubrificantes usados em máquinas processadoras de alimentos (Marco, 2009).

Os motivos pelos quais estes compostos xenobióticos são de grande importância estão relacionados aos efeitos nocivos à vida e a persistência no ambiente natural, características advindas da substituição incomum de algum elemento da molécula xenobiótica pelo cloro ou outro halogênio, presença de ligações químicas incomuns, anéis aromáticos altamente condensados e moléculas de altíssima massa molecular, entre outros (Silva e Fay, 2004). Por esses motivos, compostos que estão presentes no petróleo podem ser considerados como xenobióticos.

Portanto, os xenobióticos são químicos poluentes da biosfera e possuem estruturas moleculares e sequências de ligações químicas que podem não ser reconhecidas pelas enzimas degradativas existentes em organismos vivos. Desta forma esses compostos resistem à biodegradação, ou não são completamente metabolizados, resultando no acúmulo no ambiente (Silva e Fay, 2004). No entanto, mesmo com essas dificuldades, os microrganismos mostram-se mais capazes de lidar com tais moléculas por mecanismos adaptativos. Neste contexto, as técnicas moleculares existentes podem mostrar os efeitos dos xenobióticos sobre a adaptação, a diversidade e a evolução dos microrganismos. Além disso, podem elucidar rotas metabólicas utilizadas por esses na degradação de moléculas estranhas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação é um tratamento de ambiente contaminado baseado na degradação bioquímica dos contaminantes, ou substâncias tóxicas, por meio da atividade de microrganismos nativos, ou adicionados no local de contaminação, transformando-os em substâncias menos, ou não tóxicas (Andrade *et al.*, 2010; Bernoth *et al.*, 2000). Esta técnica pode ser empregada *ex situ*, na qual é feita a remoção física do material contaminado para o tratamento, e *in situ*, na qual é feito o tratamento no local de contaminação (Boopathy, 2000).

Dentre as técnicas de biorremediação, algumas podem ser mencionadas para exemplificar a aplicação *ex situ* e *in-situ*, tais como: *land farming* (sistema de tratamento de fase sólida e pode ser feito *in situ* ou *ex situ*); compostagem (processo de tratamento termofílico e aeróbio em que o material contaminado é misturado com um agente que dá volume; pode ser feita usando pilhas estáticas ou pilhas aeradas); biorreatores (biodegradação em um recipiente, ou reator, e podem ser usados para tratar líquidos, ou lamas); bioventilação (método de tratamento de solos contaminados por meio da injeção de oxigênio no solo e consequente estimulação da atividade microbiana); biofiltros (utilização de colunas microbianas de extração de ar para o tratamento de emissões atmosféricas); bioaugmentação (adição de culturas bacterianas para um meio contaminado; frequentemente usado em ambos os sistemas *in situ* e *ex situ*); bioestimulação (estimulação de populações microbianas que já existem nos solos, ou águas subterrâneas, fornecendo os nutrientes necessários); biorremediação intrínseca (atenuação natural do contaminante, na qual apenas o acompanhamento regular é feito); *pump and treat* (bombeamento das águas subterrâneas para a superfície do solo, seguido de tratamento e posterior reinjeção) (Boopathy, 2000).

Porém, deve ser salientado que a biorremediação, assim como outras técnicas de remediação, é dependente de vários fatores que devem ser revistos para que se tenha sucesso na aplicação desta técnica. Estes fatores incluem: condições físicas, químicas e biológicas do local contaminado, pois as interações dos microrganismos com o ambiente garante que estes utilizarão o poluente como fonte de carbono e energia; concentração e tipo de contaminante, pois a velocidade de degradação depende das espécies químicas que são mais, ou menos

susceptíveis ao arcabouço enzimático dos microrganismos; e o tempo requerido para a degradação, ou a remoção do composto alvo (Andrade *et al.*, 2010).

Os microrganismos mais utilizados em biorremediação são bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Destes, as bactérias são as mais empregadas e, por isso, são consideradas como o elemento principal em trabalhos que envolvem a biodegradação de poluentes (National Research Council, 1993). Logo, é necessário que os microrganismos certos sejam empregados, no momento e no lugar correto, e que os fatores ambientais sejam adequados para que o sistema enzimático dos microrganismos seja eficaz contra o poluente alvo.

Dentre os fatores que afetam a eficácia da biorremediação, a natureza do poluente, ou contaminante, é de grande impacto. Como exemplo, muitos compostos não são susceptíveis a biodegradação, como metais pesados, radionuclídeos e alguns compostos clorados. Além disso, o metabolismo microbiano pode produzir compostos tóxicos por degradação incompleta, soma-se a isso quando o procedimento de biorremediação se torna intensivo quando as condições não estão dentro do que é tolerado. Por isso, são exigidos estudos prévios em pequena escala. Portanto, é necessário que se façam as seguintes perguntas antes do emprego da biorremediação: o contaminante é biodegradável? A biodegradação ocorre naturalmente no sítio contaminado? As condições apropriadas para a biorremediação existem no local? Se os resíduos não forem completamente biodegradados, para onde eles vão? (Boopathy, 2000).

Dados na literatura mostram a efetividade da utilização da biorremediação na recuperação de ambientes impactados, principalmente para derrames de petróleo. A recuperação do derramamento em 1989 na enseada de Prince William, Alaska, do Navio Exxon Valdez, foi o maior feito da biorremediação até hoje, pois todo óleo residual foi biodegradado por microrganismos nativos (por bioestimulação), após a adição de fertilizantes no local (Bragg *et al.*, 1994).

Derrames em condições experimentais trazem resultados que podem ser aplicados em uma condição real de poluição. Em um experimento de Delille *et al.* (2002), testou-se a eficiência da biorremediação em derrames de petróleo propositais em uma praia da ilha Grande-Terra, no Arquipélago de Kerguelen. O experimento mostrou que os pontos onde foram aplicados os “agentes da biorremediação” (microrganismos), o tempo de recuperação foi mais rápido em

relação aos pontos que não receberam esses agentes, mesmo que alguns resíduos remanescentes do petróleo tenham apresentado alta toxicidade. Produtos tóxicos podem ser extinguidos utilizando outros microrganismos que utilizam tais compostos tóxicos como fonte de carbono e energia, pois a liberação de um produto tóxico em uma condição real, seria mais danoso que o poluente primário.

Em um outro caso de uso experimental da biorremediação realizado por Aparna *et al.* (2010), um consórcio microbiano foi utilizado na descontaminação de sedimentos dragados do Lago de Gandigudem, o qual fica localizado no altamente industrializado distrito de Medak, no estado de Andhra Pradesh, Índia. Verificou-se neste estudo que a bioaugmentação e a bioestimulação foram requeridas para iniciar e sustentar a degradação dos contaminantes dos sedimentos do lago, mostrando que houve utilização dos contaminantes do sedimento pelo consórcio de microrganismos.

## **2.2 DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO**

Em virtude da dependência do mundo pelo petróleo e derivados, durante a exploração, o refino, o transporte e as operações de armazenamento, acontecem derramamentos acidentais, ocasionando a contaminação dos solos, rios, dentre outros ambientes naturais. Tais ocorrências vêm motivando a realização de pesquisas relacionadas à remediação de sítios contaminados (Aislabie *et al.*, 2004; Marín *et al.*, 2006).

Provavelmente, o primeiro derramamento de petróleo no mundo aconteceu em 1893 com o navio “Gluckauf”. Devido a uma névoa espessa, ele encalha. Após tentativas de desencalhar, ele afunda na Ilha do Fogo, Nova Iorque, causando a primeira “maré negra” por um navio-tanque. Entre 1886 a 1906, 99% do transporte de petróleo era feito por estes navios-tanques. Outros derramamentos de grandes proporções aconteceram e cada um trouxe sérios problemas ao ambiente natural e ao homem, pois estes estiveram envolvidos na recuperação destes ambientes (Carnero, 2012).

No Brasil, os derramamentos de petróleo são comuns e geralmente reportados e páginas eletrônicas (Rosa e Ordoñez, 2011; Bonis, 2011; Ritto, 2012). No entanto, muitos vazamentos de pequeno porte não são consideradas como



acidentes, pois a quantidade de óleo derramada é pequena. Tal fato é errôneo, visto que por serem menores, estes vazamentos não tem controle e tem um impacto ambiental muito grande.

Derramamentos de petróleo importantes aconteceram no Brasil. Em 2011 na Bacia de Campos, a petroleira norte-americana Chevron foi responsável por milhares de litros derramados, derramamento este que se assemelhou ao que aconteceu no Golfo do México (Greenpeace, 2011). Outro acidente importante aconteceu na bacia de Guanabara no ano de 2000. Um duto da Petrobrás que ligava a Refinaria Duque de Caxias (Reduc) ao terminal Ilha d'Água, na Ilha do Governador, rompeu-se provocando um vazamento de 1,3 milhão de litros de óleo combustível nas águas da baía. A mancha se espalhou por 40 km<sup>2</sup> (Ortiz, 2014). Outros derramamentos aconteceram no Brasil, também havendo grandes importâncias pelos impactos ambientais que causaram.

Por ser a segunda maior produtora terrestre de petróleo do Brasil, a região amazônica, como a várzea dos rios Urucu e Amazonas (rota de transporte do petróleo Coari-Manaus), está em constante risco de acidentes ambientais. Os estudos que avaliam os danos causados à vegetação e animais são escassos, sendo que um derramamento de petróleo teria consequências catastróficas dado o papel ecológico fundamental das espécies na reciclagem de carbono e nutrientes da várzea. Caso essas plantas sofram agressão por meio do derramamento de petróleo, uma série de efeitos diretos e indiretos pode modificar todo o ecossistema do local (Lopes, 2007).

No Amazonas, alguns eventos de derramamento de petróleo aconteceram e foram de grande impacto. Deve-se novamente ressaltar que eventos em pequena escala são importantes, mas que muitas vezes não são notificados. Em 2013, uma balsa tombou e causou o vazamento de óleo no Rio Negro, nas proximidades do Porto do São Raimundo, na Zona Oeste de Manaus. O acidente causou vazamento de aproximadamente 60 mil litros do óleo no local (Henriques, 2013). Em 27 de outubro de 1979, o petroleiro Gunvor MAERSK se incendiou e derramou 12.000 t de óleo combustível no rio Amazonas (Marinha do Brasil, <https://www.mar.mil.br/tm/download/anuario/1981/10428.pdf>).

Nas regiões urbanas, ruas, igarapés que cortam a cidade e águas subterrâneas, são afetadas pelos pequenos e vazamentos que acontecem. Estes

pequenos derramamentos são negligenciados, mas são de grande importância, pois afetam diretamente a saúde humana, principalmente quando estes compostos nocivos se diluem nas águas subterrâneas, que por sua vez, serão consumidos com a água dos poços artesianos. Igarapés são também o destino de muitos desejos humanos e resíduos sólidos.

Além dos impactos diretos do derramamento de petróleo sobre o ambiente natural e recursos naturais (a água, o solo, os animais e as plantas), a liberação de componentes constituintes do petróleo pode atingir grandes escalas e permanecer por tempos prolongados. Um exemplo é a liberação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPA) e benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos - isômeros: orto-, meta- e para-xileno (BTEX) que são extremamente perigosos.

### **2.3 ORIGEM, COMPOSIÇÃO E IMPORTÂNCIA AMBIENTAL DO PETRÓLEO**

Estima-se que aproximadamente 0,1% da matéria orgânica produzida pelos organismos fotossintéticos nos mares seja preservada nos sedimentos. Além disso, estima-se também que são produzidos aproximadamente 550 bilhões de matéria orgânica por ano pelos organismos fitoplanctônicos (PGT, 2010; Milani *et al.*, 2000). Dado estas quantidades de matéria orgânica nos sedimentos e condições físico-químico-biológicas adequadas, transformações ocorrem e geram-se produtos que se acumulam nestes sedimentos.

O processo de formação do petróleo ocorre pela diagênese da matéria orgânica acumulada nos sedimentos, na qual se inicia com a degradação da matéria orgânica por microrganismos (bactérias e fungos aeróbios e anaeróbios) que se encontram na região mais superficial dos sedimentos. As proteínas e carboidratos são os mais instáveis, enquanto que os lipídeos e lignina são mais resistentes. Os resíduos da degradação microbiana e moléculas mais resistentes passam por modificações químicas (perda de grupos funcionais e polimerização), que resultam na condensação e insolubilização da matéria orgânica. O produto final da diagênese da matéria orgânica é o querogênio, na qual é a fração insolúvel presente nas rochas sedimentares, e o betume, composto de hidrocarbonetos e não-hidrocarbonetos solúveis, sendo resultado de biopolímeros pouco alterados (PGT, 2000; Milani *et al.*, 2000).

À medida que acontece a subsidência da bacia sedimentar (lento abatimento) o querogênio é soterrado a maiores profundidades e com isso a temperatura e pressão aumentam. Como resposta às novas condições ambientais, há a liberação de grupo funcionais e heteroátomos do querogênio, perda de hidrocarbonetos alifáticos e cíclicos, e aromatização da matéria orgânica. Esta fase é chamada de catagênese na qual resulta a formação de óleos que dependendo do estágio de evolução térmica alcançado pela rocha geradora, a quantidade de óleo é gerada em quantidades significativas. O último estágio é chamado de metagênese onde a evolução térmica chega ao extremo e a matéria orgânica é representada por metano e um resíduo de carbonos que não dará origem a petróleo (PGT, 2000; Milani *et al.*, 2000).

Sendo assim, em função da sua formação, o petróleo é uma mistura complexa que contém vários compostos, na qual os hidrocarbonetos representam a fração majoritária, sendo que sua composição química e propriedades físicas variam de um campo petrolífero para outro. Devido, principalmente, à complexidade dessa mistura, normalmente o tratamento de áreas contaminadas por essas substâncias é bastante difícil e problemática (Andrade *et al.*, 2010).

O petróleo é constituído por uma mistura de hidrocarbonetos e, em menor quantidade, derivados orgânicos sulfurados, nitrogenados, oxigenados e organometálicos. Existem mais de dez mil hidrocarbonetos e outros componentes que formam o petróleo. Usando o sistema SARA (saturados-aromáticos-resinas-asfaltenos) os componentes do petróleo são divididos em: os saturados (15-60%), que correspondem aos ciclo-alcanos (naftênicos), alcanos ramificados e de cadeia linear (parafinas), como ciclo-hexano, *n*-decano, pristano, respectivamente; os aromáticos (3-30%) que são hidrocarbonetos mono e poliaromáticos, incluindo as formas alquiladas, como o benzeno, metil-naftaleno, benzo [a] pireno; as resinas que são hidrocarbonetos polares e heterocíclicos com N, S e O, que incluem os dibenzotiofeno, ácido naftênico (estrutura genérica de um ácido carboxílico alicíclico substituído com alquilo); e asfaltenos (em média 6%), estes são compostos grandes, heterocíclicos contendo N, S e O, com traços de metais pesados como o vanádio (McGenity, 2014; Zílio e Pinto, 2002).

Assim como o petróleo, seus derivados também possuem importância quanto ao seu impacto ambiental. Isso porque derivados de petróleo resultam do processo

de destilação fracionada do petróleo e isso não garante que moléculas alifáticas sejam separadas das moléculas aromáticas, ou moléculas tóxicas sejam separadas das não tóxicas. Então, os derivados de petróleo também possuem moléculas nocivas à vida e ao ambiente, como exemplo, a gasolina e o diesel.

De acordo com Zílio e Pinto (2002), as resinas e os asfaltenos, que são componentes policíclicos, de alto massa molecular, compreendendo átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio, são insolúveis em alcanos leves e, assim, precipitam com *n*-hexano. As resinas são mais solúveis, mas também são muito polares e fortemente retidas em sílica gel quando é realizada uma cromatografia líquida, a não ser que um solvente polar seja usado como fase móvel.

Em um ambiente contaminado por petróleo e seus derivados, alguns poluentes se destacam frente aos demais. Esses compostos são os BTEX, HPA, aromáticos heterocíclicos e aromáticos substituídos, nos quais são compostos de importância ambiental, liberados não somente em processos petrogênicos (petróleo e derivados), mas também em processos pirogênicos (processos de combustão) e biogênicos (biotransformados) (Seo *et al.*, 2009). Os compostos orgânicos voláteis (COV) também são importantes bem como os hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP). Os HPA, HTP e BTEX são os principais alvos em estudos de biorremediação em função da toxicidade, mobilidade e persistência no ambiente, o os COV por serem gasosos e poluírem o ar. Por isso, qualquer contaminação por petróleo oferece risco não somente com o contato direto (inalação de vapores como exemplo), mas também na sua presença em recurso que são utilizados pelo homem, como a água (Andrade *et al.*, 2010).

Quando comparados os compostos aromáticos com os alifáticos de mesmo tamanho, os primeiros são mais persistentes no ambiente e mais tóxicos do que o segundo, bem como são mais solúveis em água resultando em maior mobilidade. Por isso, se dá maior importância aos compostos aromáticos no que diz respeito à poluição ambiental. Prova disso são os BTEX que atingem mais rapidamente as águas de mananciais de abastecimento e apresentam uma toxicidade crônica mais significativa do que os hidrocarbonetos alifáticos (Tiburtius *et al.*, 2004).

Os hidrocarbonetos aromáticos são compostos orgânicos contendo um ou mais anéis benzênicos, arranjados de forma linear, angular ou em grupos, podendo apresentar substituições de um ou dois carbonos do anel aromático pelo enxofre,

nitrogênio ou oxigênio. Além de surgirem por derramamento direto de petróleo, também surgem no ambiente por processos naturais e por processos antropogênicos, como a queima de derivados de petróleo (gasolina, querosene, óleo diesel) e do alcatrão como subproduto do processamento industrial (efluentes petroquímicos, resíduos de refinarias e indústrias de embarcações), da queimada de florestas, da incineração de resíduos industriais, da exaustão de motores automobilísticos, da fumaça de cigarro e do tabaco, entre outros (Barbieri, 1997).

Os hidrocarbonetos monoaromáticos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) são constituintes do petróleo e derivados, gerados nas refinarias petroquímicas e possuem grande potencial de poluição por serem os compostos mais hidrossolúveis do petróleo (Mello, 2007). Devido aos problemas de vazamentos de gasolina de tanques subterrâneos, o BTEX tem contaminado solos e águas subterrâneas nesses locais. Estes eventos são gravíssimos quando se leva em consideração a toxicidade que eles possuem (Tiburtius *et al.*, 2004). De fato, o benzeno é considerado o mais preocupante dentre os BTEX para a saúde pública segundo a *International Agency for Research on Cancer – IARC*, órgão da Organização Mundial da Saúde, bem como outras agências importantes, pois é classificado no Grupo I, ou seja, é uma substância comprovadamente cancerígena e que também pode causar leucemia em seres humanos (Andrade *et al.*, 2010).

O estireno juntamente com BTEX faz parte do creosoto, contaminante do ambiente e que é constituído por cerca de 85 a 90% desses componentes aromáticos (Barbieri, 1997). O fenol é outro composto aromático resultado dos processos de refinamento de petróleo. Este composto é formado por um anel aromático ligado a um radical hidroxila e é amplamente usado na refinaria de petróleo e indústria petroquímica, indústria química e farmacêutica, e outras indústrias. Assim, a presença de fenol em águas residuais geralmente são advindos desses processos industriais e seu aumento representa um perigo ambiental (Marrot *et al.*, 2006).

Os HPA são os compostos prioritários em estudos ambientais pela ação mutagênica e tumoral em sistemas biológicos (Meire *et al.*, 2007). São formados por dois ou mais anéis benzênicos, constituídos exclusivamente por átomos de carbonos e hidrogênio, organizados de forma linear, angular ou agrupados. Sua origem vem da combustão incompleta de matéria orgânica, mas as maiores emissões têm sido

feitas a partir de processos industriais ligados a produção de aço e alumínio, exaustão de incineradores de rejeitos industriais, atividades petroquímicas, bem como derramamento de petróleo (Meire *et al.*, 2007).

## **2.4 FISILOGIA E METABOLISMO BACTERIANO NA BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS**

O metabolismo primário se refere ao uso de composto orgânico como substrato para obtenção de carbono e energia. Esse composto orgânico será um doador de elétrons e promoverá o crescimento e reprodução do organismo (microrganismos quimiorganotróficos). Esses e outros fatores, como presença ou ausência de receptores de elétrons, nutrientes, metabólitos ou substrato inibidores, condições de pH, temperatura, são os fatores limitantes do uso da biorremediação (Boopathy, 2000).

Compostos orgânicos podem ser metabolizados por fermentação, respiração ou co-metabolismo (Barreto, 2001). Portanto, a biodegradação pode ser aeróbia ou anaeróbia, requerendo oxigênio ou outro composto, quase sempre inorgânico, como acceptor final de elétrons. Durante o processo de biodegradação por respiração celular aeróbia, em um solo contaminado com um poluente, os microrganismos utilizam o oxigênio disponível (fator limitante) como acceptor final de elétrons. Quando este oxigênio é totalmente consumido, os microrganismos aerotolerantes e anaeróbios, utilizarão outros aceptores de elétrons disponíveis, exemplo: nitrato, manganês, ferro, sulfatos, dióxido de carbono, entre outros. Quando o dióxido de carbono é utilizado, formam-se ácidos orgânicos para gerar metano. Este processo é chamado de respiração celular anaeróbia (Andrade *et al.*, 2010; Tortora *et al.*, 2005).

A oxidação de hidrocarbonetos é catalisada, em sistemas biológicos, por diferentes classes de enzimas oxirredutoras (oxidases, desidrogenases, peroxidases e oxigenases/hidroxilases) (Halma, 2004). As oxidorredutases são as enzimas mais bem distribuídas e são mais diversas, e um grande número delas utiliza o oxigênio molecular como um substrato (oxigenases) ou como acceptor final de elétrons (oxidases). Estas enzimas possuem uma grande variedade de substratos e mostram alta régio, quimio e estéreo-especificidade (Nolan e O'Connor, 2008).

No metabolismo de hidrocarbonetos em condições de aerobiose, as oxigenases são as enzimas mais importantes. Estas iniciam o processo de oxidação pela ativação do composto orgânico, tornando-o susceptível a outras enzimas oxidativas, bem como fazem a clivagem oxidativa. As monooxigenases atuam em hidrocarbonetos alifáticos e certos hidrocarbonetos aromáticos e adicionam um átomo de oxigênio a partir do oxigênio molecular e o outro oxigênio é reduzido à água. As diooxigenases atuam em hidrocarbonetos aromáticos e adicionam um ou dois átomos de oxigênio a partir do oxigênio molecular (Widdel e Rabus, 2001).

As monooxigenases podem utilizar NADH ou NADPH como fonte potencial de elétrons para o substrato e estas enzimas podem ser heme-dependentes, flavina-dependentes, cobre-dependentes, ferro-dependentes sem grupo heme, pterina-dependentes, dependentes de outros co-fatores e independentes de co-fatores (Nolan e O'Connor, 2008; Pazmiño *et al.*, 2010). As diooxigenases são divididas em duas classes: diooxigenases ferro-enxofre heme-dependente e diooxigenase ferro-enxofre não heme-dependente (Rieske), sendo que neste último caso a maioria é dependente de NADH (Burton, 2003). Além disso, mesmo que a maioria das diooxigenases utilize um metal para auxiliar na ativação do oxigênio, um pequeno número de enzimas desse grupo tem sido isoladas que não requerem metal e nenhum outro co-fator orgânico (Bugg, 2003).

As vias de degradação de hidrocarbonetos são obtidas por meio de estudos com microrganismos que tem essa capacidade degradativa. Os microrganismos são cultivados no substrato de interesse, as proteínas são identificadas e as vias são estimadas. Além disso, proteínas novas podem ser identificadas. Estas informações ficam armazenadas em banco de dados de domínio público.

Como exemplo da aplicação, Seo (2009) afirma que o naftaleno tem sido utilizado como composto modelo para se verificar a habilidade de bactérias em utilizar HPA como fonte de carbono, visto que é o mais solúvel e o mais simples. O autor mostra a via de degradação deste composto, onde começa com a hidroxilação por uma diooxigenase (naftaleno diooxigenase), em um dos anéis do HPA, seguido por uma sequência de passos enzimáticos para a metabolização do composto aromático, até resultar em salicilato (um anel aromático com um grupo OH e um COOH na posição orto-). O salicilato é convertido em catecol na qual sofre fissão do

anel (orto ou meta clivagem) que dará origem a compostos que entrarão no ciclo de ácido cítrico.

Muitos microrganismos utilizam a via  $\beta$ -cetadipato para degradação de catecol (anel aromático com duas hidroxilas ligadas na posição orto-) na qual a chave deste processo é a clivagem do anel aromático pela catecol dioxigenase e geração de acetil CoA e succinato no final do processo. A clivagem intradiol acontece na ligação carbono-carbono entre os dois grupos hidroxilas (orto-clivagem), produzindo ácido mucônico, necessitando também de  $\text{Fe}^{3+}$ . A clivagem extradiol acontece na ligação carbono-carbono adjacente aos grupos hidroxilas (meta-clivagem), produzindo hidromuconaldeido (Pérez-Pantoja *et al.*, 2009; Bugg, 2003).

Para degradação de hidrocarbonetos alifáticos, Maeng *et al.* (1996), cita três vias para o ataque aos *n*-alcanos: via de oxidação monoterminal, na qual é mais representativo em espécies do gênero *Pseudomonas*; oxidação biterminal, presentes em muitos fungos e bactérias e ambos os grupos metil terminal do *n*-alcano são hidroxilados; e oxidação subterminal. Em todos esses casos, o ataque inicial é feito por uma monooxigenase (hidroxilação) para produzir um correspondente álcool primário, ou secundário, embora sejam outras as enzimas que participam nos passos posteriores da via.

A massa molecular de um hidrocarboneto afeta sua biodegradabilidade. Por exemplo, um HPA de alta massa molecular (4 ou mais anéis aromáticos) possui propriedades físico-químicas e recalcitrância diferentes dos HPA de baixa massa molecular. Desta forma, poucas bactérias têm sido isoladas capazes de utilizá-lo como única fonte de carbono. Além do mais, aumentam-se os sítios para ataque enzimático, levando a diversas vias e complexas reações que requerem diferentes tipos de enzimas. Então, a degradação de um HPA de alta massa molecular requer mais genes envolvidos, aumentando-se o potencial de novas, ou previamente conhecidas, enzimas e vias metabólicas. E mais, existe muita redundância de genes estruturais para degradação de HPA de alta massa molecular, na qual não estão organizados em operons como aqueles envolvidos na degradação de HPA de baixa massa molecular (Kim *et al.*, 2009).



## 2.5 BIODEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO

A maior parte dos componentes do petróleo (60% a 90%) é biodegradável. Entretanto, o restante (10% a 40%), em estado bruto ou refinado, é recalcitrante. No entanto, mesmo tratando-se de uma porção menor, isto representa toneladas de poluentes impactando ecossistemas e sendo bioacumulados e biomagnificados na cadeia trófica. O destino destes compostos, após um derramamento, irá depender da interação entre vários fatores, podendo-se destacar a degradação microbiana (Crapez *et al.*, 2002). Essa capacidade de degradação de hidrocarbonetos e utilização destes como fonte de carbono por microrganismos foi apresentada pela primeira vez por Zobeel em 1946, na qual também verificou que estes microrganismos eram bem distribuídos na natureza e que a degradação dependia principalmente da natureza química do poluente (Rosato, 1997).

No entanto, apenas após três grandes derrames de petróleo na década de 60 (naufrágio do Tanque Torrey Canyon na Inglaterra, Incidente de Santa Bárbara e o ocorrido na Flórida) é que se iniciaram as pesquisas focalizando os problemas da poluição ambiental e os destinos e consequências do derrame de petróleo (Rosato, 1997).

A biodegradação de petróleo por populações naturais de microrganismos é o primeiro mecanismo de eliminação de poluentes do ambiente. Alguns compostos são facilmente degradados, enquanto que outros persistem na natureza, visto que o petróleo é constituído e separado por frações: as parafinas, os cicloalcanos (compostos nafênicos), os aromáticos e uma porção asfáltica mais polar.

Entre os muitos microrganismos que são capazes de degradar hidrocarbonetos do petróleo, destacam-se as bactérias dos gêneros *Acidovorans*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Beijemickia*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Comomonas*, *Cycloclasticus*, *Flavobacterium*, *Goordona*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Neptunomonas*, *Nocardia*, *Pasteurella* (Crapez *et al.*, 2002), *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas* e *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Serratia*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, entre outros e vários gêneros de fungos como, *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Candida*, *Penicillium*, *Pleorotus*, *Trametes*, *Aspergillus* e *Chrysosporium*. Existem aqueles capazes de degradar compostos alifáticos

saturados, outros de degradam hidrocarbonetos aromáticos e alguns conseguem metabolizar ambos (Cury, 2002).

## 2.6 BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS

Os compostos aromáticos estão presentes na natureza fazendo parte, assim como outros, do ciclo global do carbono. Logo, já existe na natureza microrganismos que possuem o aparato enzimático necessário á degradação de compostos aromáticos.

Embora diversos hidrocarbonetos aromáticos sejam considerados recalcitrantes, muitos processos contribuem para a degradação destes compostos. Fatores abióticos como a volatilização, a lixiviação e a fotodegradação contribuem para a retirada desses compostos aromáticos da natureza. No entanto, o processo mais importante para a retirada dos hidrocarbonetos aromáticos do ambiente é a biodegradação (Barbieri, 1997).

Porém, os compostos de natureza aromática que o homem produz e causam danos ambientais como os pesticidas, detergentes, óleos, solventes, tintas ou explosivos, são os mais importantes quando se trata de poluição ambiental. Muitos desses compostos artificiais podem ser facilmente degradados pelos microrganismos que utilizam as mesmas enzimas necessárias para a degradação de compostos de ocorrência natural.

Alguns microrganismos comprovadamente crescem em culturas com compostos aromáticos como única fonte de carbono. Entre eles, *Pseudomonas putida* foi aclimatada para crescer e degradar fenol (até 1.000 mg/L) e catecol (até 500mg/L), pois em concentrações mais altas aumentava o período de latência (Kumar *et al.*, 2005). *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescense* (Agarry *et al.*, 2008) também foram testadas e degradaram fenol entre 100 e 500mg/L. Os microrganismos do gênero *Pseudomonas* são conhecidas por degradarem compostos aromáticos e são muito investigadas. Muitos outros microrganismos distribuídos nos vários grupos apresentaram capacidade de degradar compostos aromáticos (Silva *et al.*, 2009; Rigo *et al.*, 2010).

Existem trabalhos onde microrganismos degradam compostos aromáticos para utilizarem como fonte de energia; estes são testados tanto individualmente

como na forma de consórcio (Seo *et al.*, 2009; Barbieri, 1997). Partindo desses dados, verifica-se que o interesse por microrganismos que degradam poluentes tem aumentado, principalmente com o advento de técnicas de análise mais sofisticadas já disponíveis.

Três espécies de bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Rhodococcus* foram isoladas de solo contaminado em Beijing, China, e degradaram eficientemente gasolina, bem como produziram biosurfactantes. Outros compostos orgânicos como óleo diesel, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) também foram facilmente degradados por estas três bactérias (Lu *et al.*, 2006). Duas espécies bacterianas isoladas de águas residuais foram capazes de utilizar carbazole, composto aromático heterocíclico, como fonte de carbono, nitrogênio e energia. Essas bactérias foram identificadas como *Cryseobacterium sp.* e *Achromobacter sp.* As duas espécies em consórcio conseguem utilizar compostos similares ao carbazole, tal como fenantreno, naftaleno e imidazol (Guo *et al.*, 2008).

Três espécies de bactérias isoladas de solo contaminado foram capazes de utilizar óleo de máquina usado como única fonte de carbono. As espécies identificadas foram *Flavobacterium sp.*, *A. calcoaceticum* e *P. aeruginosa*. Os resultados mostraram que estas apresentaram melhor potencial de degradação quando a concentração de células aumentava no meio contendo o poluente. Estas bactérias apresentaram potencial para biorremediação *in situ* e *ex situ* (Mandri e Lin, 2007).

## 2.7 CONSÓRCIO MICROBIANO

É necessária uma grande diversidade de enzimas na degradação de uma grande diversidade de hidrocarbonetos, tais como os que constituem o petróleo. Uma prática rotineira é a utilização de consórcio microbiano para degradação de petróleo, devido à grande complexidade química deste composto. Compostos modelos também são utilizados para identificação de vias metabólicas, sendo uma prática mais favorável e menos dispendiosa quando se quer estudar os processos de biodegradação.

Até o momento, nenhum estudo identificou alguma espécie microbiana que fosse capaz de degradar sozinha todos os componentes do petróleo. Dessa forma, é

necessária a existência de consórcios microbianos, onde cada grupo de microrganismos é capaz de mineralizar um determinado composto para minimizar a complexidade dos processos metabólicos envolvidos na degradação (Maciel, 2004; Crapez *et al.*, 2002).

A diversidade química e o surgimento de intermediários tóxicos são os maiores empecilhos para utilização de um único microrganismo como agente da biorremediação. Por isso, para alguns casos, faz-se necessária a associação de um conjunto de microrganismos na qual anulam as deficiências e desvantagens de cada microrganismo individualmente.

O efeito do uso de consórcio de microrganismos para degradação completa de compostos hidrocarbonetos, não resulta apenas de um efeito aditivo das atividades individuais, mas sim um efeito sinérgico. O mecanismo envolvendo a biodegradação por um consórcio é muito complexo, mas é possível que alguma espécie remova metabólitos tóxicos resultado do metabolismo de outra espécie. Também é possível que uma segunda espécie degrade compostos que uma primeira consegue degradar parcialmente (Ghazali *et al.*, 2004).

A prova que a utilização de consórcio é eficaz na biodegradação de compostos poluentes são os resultados positivos dos artigos publicados em revistas científicas. Como exemplo, um experimento importante foi feito por Horowitz *et al.* (1975), na qual demonstra o significativo efeito do consórcio. Nesta pesquisa, o autor mostra que após exaustivo crescimento de uma cepa em petróleo bruto, o óleo residual suportou o crescimento de uma segunda e terceira cepa de bactéria, gerando novos compostos parafínicos do óleo residual.

No experimento de Rambeloarisoa *et al.* (1984), oito cepas bacterianas foram capazes de degradar intensivamente o petróleo bruto, mas que apenas cinco destas foram capazes de crescer isoladamente em uma variedade de hidrocarbonetos. Quando três cepas foram removidas do consórcio, a eficácia da degradação foi consideravelmente reduzida. Estes dados fornecem uma informação importante: cada membro do consórcio tem um papel significativo e pode depender da presença de outras espécies para sobreviver quando as fontes de energia são limitantes ou confinados a complexos de carbono.

Em um consórcio microbiano, seis bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Micrococcus*, isoladas de solos contaminados com hidrocarbonetos (petróleo e hidrocarbonetos individuais) na Malásia, foram capazes de crescer em petróleo bruto. Porém, quando testados individualmente *Bacillus spp.* não cresceu. Hidrocarbonetos individuais também foram usados como fonte de carbono, obtendo-se crescimento variado entre as espécies testadas (Ghazali *et al.*, 2004).

É importante destacar que a verificação da atividade degradativa de microrganismos em uma fonte de carbono qualquer deve ser avaliado cuidadosamente, bem como cada derrame de um poluente no ambiente natural. Essas observações apontam aos fatores que afetam a biorremediação para que a melhor condição de crescimento seja estudada e a melhor medida seja tomada quando no ambiente natural. Nesse contexto, o tópico a seguir descreve a importância biotecnológica das bactérias do gênero *Acinetobacter*, utilizadas no presente estudo.

## **2.8 IMPORTÂNCIA BIOTECNOLÓGICA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Acinetobacter***

O ambiente natural é a principal fonte de microrganismos que possuem potencial para biorremediação de ambientes impactados. A principal fonte de microrganismos com capacidade biodegradadora são os locais na qual foram expostos aos xenobióticos. Existem muitos mecanismos, que podem se combinar, para que comunidades microbianas possam se adaptar a presença de xenobióticos. Primeiras, as populações que toleram tal composto aumentam a população. Segundo, as células podem se adaptar sofrendo mutações de vários tipos. Terceiro, as bactérias podem adquirir informações genéticas a partir de populações filogeneticamente relacionadas, ou não, por transferência horizontal (Top e Springael, 2003).

Dentre as comunidades microbianas nos diferentes ecossistemas, tais como solo, água doce, águas residuais e resíduos sólidos, muitas cepas pertencem ao gênero *Acinetobacter*, tendo crescente interesse por estas no ponto de vista médico, ambiental e biotecnológico. Bactérias deste gênero são conhecidas por estarem envolvidas na biodegradação, na lixiviação (extração de uma substância de um

sólido através da sua dissolução em um líquido) e remoção de muitos compostos residuais orgânicos perigosos produzidos pelo homem. É também bem conhecido que algumas cepas de *Acinetobacter* produzem importantes bioprodutos (Abdel-El-Haleem, 2003).

As espécies do gênero *Acinetobacter* pertencem ao filo Proteobacteria, a classe gammaproteobacteria, a ordem Pseudomonadales e a família Moraxellaceae. Estas bactérias apresentam colônias encapsuladas e são geralmente não pigmentadas e mucoides. Estas são quimiorganotróficas e maioria pode crescer em meio mínimo com acetato, etanol, ou lactato, sendo que poucas podem crescer em meio mínimo com glicose (Hardy Diagnostics, 2015). O gênero compreende atualmente 17 espécies nomeadas válidas e 14 não nomeadas. Algumas espécies não relacionadas têm comum designação, enquanto que outras espécies parecem ser congruentes, mas tem diferentes nomes (Dijkshoorn e Nemeč, 2008).

As bactérias *Acinetobacter spp.* são oxidase-negativas, catalase-positivas, nitrato-negativas, não fermentadora de lactose em Ágar MacConkey, não-móveis, estritamente aeróbicas, Gram-negativas e aparecem como cocobacilos com arranjo diplococos ao microscópio. Elas podem usar muitas fontes de carbono para o seu crescimento, bem como podem ser cultivadas em meios relativamente simples, como o ágar nutriente e ágar soja triplicaseína (Hardy Diagnostics, 2015; Abdel-El-Haleem, 2003).

Estudos realizados focaram o isolamento e a caracterização da atividade de acinetobactérias sobre diversos compostos poluentes e xenobióticos. Estes estudos iniciam com isolamento do organismo de um local contaminado, ou não, até a caracterização da atividade biodegradadora. Os substratos normalmente empregados para os estudos em laboratório que utilizam acinetobactérias são fenol (Adav *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Cordova-Rosa *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2012), óleo de motor (Basuki *et al.*, 2011), diesel (Bhawsar *et al.*, 2012; Bento *et al.*, 2003), petróleo (Lal e Khanna, 1996), hidrocarbonetos alifáticos (Throne-Holst *et al.*, 2007; Koma *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2012), clorobenzoato, clorofenol, bifenil e bifenil clorados (Kim e Hao, 1999; Adriaens e Focht, 1991; Furukawa e Chakrabarty, 1982), lignina (Buchan *et al.*, 2001) e aminoácidos (Kim *et al.*, 2001). Por estarem envolvidas nesses processos de biodegradação, as acinetobactérias são ditas como

uma das principais degradadoras de *n*-alcanos no grupo das Gram-negativas, juntamente com as *Pseudomonas spp.* (Geißdörfer *et al.*, 1999).

Pesquisas aplicadas têm fornecido informações acerca do potencial para biorremediação das acinetobactérias. Enzimas envolvidas em processos de biodegradação já foram isoladas, como catecol dioxigenase de *A. radioresistens* (Briganti *et al.*, 1997). Genes de enzimas de *Acinetobacter sp.* de alcano hidroxilase, rubredoxina e rubredoxina redutase, envolvidos na degradação de *n*-alcanos de cadeia longa foram identificados (Throne-Holst *et al.*, 2007; Geißdörfer *et al.*, 1999). O gene de catechol 1,2-dioxygenase de *A. radioresistens* envolvidos na degradação de fenol, foram clonados (Caposio *et al.*, 2002). O proteoma de *Acinetobacter sp* crescida em benzoato como única fonte de carbono, foi obtido, na qual foram identificadas proteínas relacionadas a via do  $\beta$ -cetoadipato (Kim *et al.*, 2003).

## 2.9 ANÁLISE PROTEÔMICA EM PROCESSOS DE BIODEGRADAÇÃO

O proteoma é o conjunto completo de proteínas expressas em uma célula ou tecido, se alterando frente a diferentes condições e estímulos. Devido a essa natureza dinâmica, a proteômica investiga possíveis funções de proteínas, processos metabólicos e, na era pós-genômica, o controle da expressão gênica e seu impacto no metabolismo celular. Assim, diversas informações são geradas, como: quais proteínas são expressas, níveis e momentos de expressão destas proteínas, modificações pós-traducionais, respostas expressas pelas células em diferentes situações ou tratamentos, diferenças moleculares entre linhagens e interação gênica (Silva *et al.*, 2007).

Neste contexto, a proteômica pode ser usada como uma ferramenta para que se entendam os mecanismos de biodegradação de compostos poluentes. A caracterização das vias metabólicas envolvidas na degradação destes compostos poluentes pode possibilitar a construção de sistemas de biorremediação utilizando amostras bacterianas isoladas de diversos ambientes, principalmente ambientes contaminados, bem como a proposição de organismos geneticamente modificados, pela clonagem de genes específicos codificadores de enzimas de interesse para a biorremediação.

Os estudos envolvendo degradação de compostos poluentes, como por exemplo os HPA, são tradicionalmente realizados em partes, utilizando-se de ferramentas como a caracterização química de intermediários de vias metabólicas, caracterização de enzimas envolvidas, métodos de genética molecular tais como clonagem, sequenciamento e mutagênese por *knockout*. No entanto, esses estudos não mostram a resposta celular global, as interações entre as vias, bem como não identificam novos componentes-chave (Kim *et al.*, 2009). Em face disso, as abordagens funcionais e modernas, como a proteômica, trazem dados que serão muito úteis para o entendimento dos mecanismos de biodegradação

Na proposição de uma via metabólica, os dados proteômicos servem como confirmador do potencial genético de determinado microrganismo para degradação de um substrato de interesse. Um exemplo bem interessante desta aplicação é o microrganismo *Mycobacterium vanbaalenii*, um dos organismos degradadores de HPA de alta massa molecular mais estudados (quatro ou mais anéis aromáticos). Nos estudos iniciais deste microrganismo, os dados genômicos ainda não estavam disponíveis e uma reduzida quantidade de proteínas foi identificada (Khan *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2004b). Após a disponibilidade de dados genômicos, rotas metabólicas de degradação de HPA foram propostos por análise proteômica (Kim *et al.*, 2007; Kweon *et al.*, 2007).

Como no caso de *Mycobacterium vanbaalenii*, é importante que dados genômicos estejam disponíveis para que se tenha eficiência na identificação de uma grande quantidade de proteínas. Primeiro, porque dados proteômicos confirmam o que estava previsto no genoma, segundo que a segurança na identificação de proteínas individualmente é diminuída quando não se tem dados genômicos, pois dados genômicos de outros organismos aumentam os erros. Os bancos de dados genômicos são, então, tão importantes que sua falta gera um árduo trabalho para identificação de proteínas como na identificação por degradação de Edman, seguido de amplificação da sequência gênica, ou pelo sequenciamento espectrométrico por sequenciamento *de novo*.

Em estudos com *Acinetobacter sp.*, Kim *et al* (2003) encontrou proteínas envolvidas na degradação de benzoato, tais como  $\beta$ -ceto adipato succinil-CoA transferase, trealose phosphatase e catecol 1,2-dioxigenase, usadas na via do  $\beta$ -ceto adipato. Giuffrida *et al.* (2001), também propôs pela análise proteômica a



utilização de fenol e benzoato como fonte de carbono pela *A. radioresisten*, pela via do  $\beta$ -cetoadipato. Kahng *et al.* (2002), também propôs a via do  $\beta$ -cetoadipato usada pela *A. iwoffii* ao utilizar p-hidroxibenzoato como única fonte de carbono. Kim *et al.* (2004a), estudando a biodegradação de anilina, 3-metilanilina, 4-metilanilina, benzoato e p-hidroxibenzoato por *Pseudomonas sp.* K82, propôs três vias de biodegradação, a via CD2,3, a via do  $\beta$ -cetoadipato e a via PCD4,5.

As proteínas são separadas por eletroforese bidimensional (2-DE) e identificadas por espectrometria de massa (MS). A 2-DE é uma técnica que já era utilizada há bastante tempo, mas devido à sua baixa reprodutibilidade, ela passou a ser empregada apenas após seu melhoramento, com a utilização de gradiente de pH imobilizado (Görg, 2004). Com a relação a MS, esta técnica já era utilizada para estudos de moléculas inorgânicas pequenas, mas foi aperfeiçoada para estudos de moléculas maiores, como proteínas, sem que ocorra destruição destas durante o processo (Yates, 1998). O aperfeiçoamento da técnica de 2-DE e MS possibilitaram os avanços nos estudos de proteínas em larga escala e o surgimento do conceito de proteoma (Silva *et al.*, 2007).

Baseado nas questões da poluição do ambiente natural por componentes recalcitrantes e tóxicos presentes no petróleo e derivados, e seus efeitos na saúde humana, os estudos proteômicos são necessários para se obter melhor compreensão dos diversos processos celulares e proposição de vias metabólicas envolvidas na biodegradação de tais poluentes.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Identificar proteínas de *Acinetobacter junii* SB132 envolvidas com vias de degradação de petróleo e diesel.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar *A. junii* SB132 quanto a sua morfologia por métodos clássicos em microbiologia;
- 2) Obter o perfil de sensibilidade de *A. junii* SB132 a antimicrobianos;
- 3) Confirmar a identidade taxonômica de *A. junii* SB132 por espectrometria de massa;
- 4) Caracterizar *A. junii* SB132 genotipicamente quanto ao seu perfil plasmidial;
- 5) Obter a curva de crescimento de *A. junii* SB132 cultivada em diferentes substratos (petróleo bruto, diesel e extrato de levedura);
- 6) Obter os géis bidimensionais das proteínas extraídas de *A. junii* SB132 cultivadas em diferentes substratos (petróleo bruto, diesel e extrato de levedura);
- 7) Comparar os géis bidimensionais para determinação de pontos protéicos similares e diferenciais;
- 8) Identificar proteínas similares e diferenciais por espectrometria de massa e análise em bancos de dados, e verificar as vias metabólicas na qual as proteínas estão envolvidas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

As etapas realizadas nesta pesquisa estão mostradas abaixo na Figura 1.

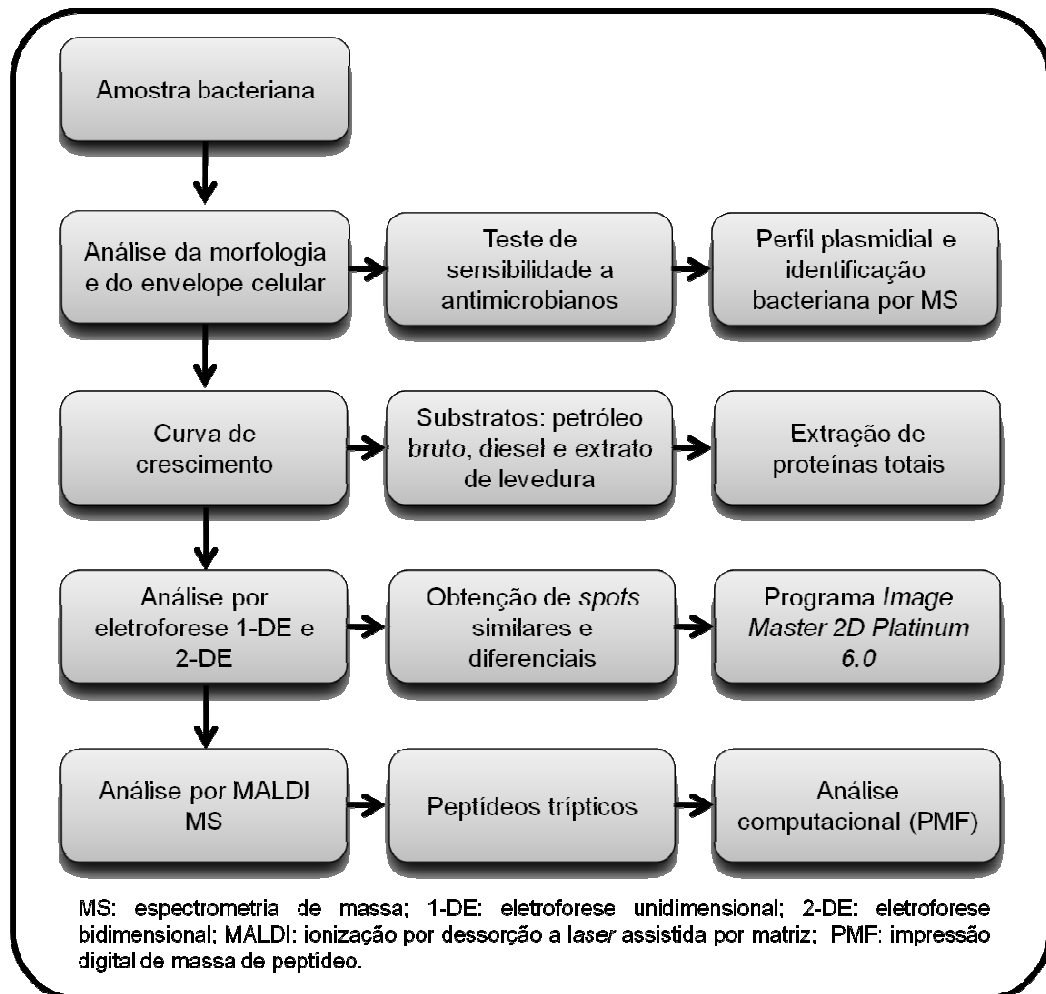


Figura 1. Fluxograma das etapas desenvolvidas na pesquisa.

### 4.1 MEIOS DE CULTURA

Para pré-inóculos foi utilizado o caldo Luria-Bertani (por litro - triptona 10g, extrato de levedura 5g e NaCl 5g) e para manutenção dos estoques de culturas preservadas foi utilizado LB (Luria-Bertani) semisólido (Ágar 0,75%) e BH (Bushnell-Haas) (*Difco*) semisólido (Ágar 0,75%) adicionados de petróleo 1,3%. Para obtenção perfil de crescimento e cultura para extração de proteínas, foi utilizado o caldo BH (*Difco*) (por litro - MgSO<sub>4</sub> 0,20g; CaCl<sub>2</sub> 0,02g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g; KNO<sub>3</sub> 1g; e FeCl<sub>3</sub> 0,05g) adicionados de petróleo bruto, diesel e extrato de levedura. Todos os meios foram autoclavados a 121°C por 15min a pressão de 1,5 atm para esterilização.

#### 4.1.1 Substratos para crescimento bacteriano: petróleo bruto e diesel

O petróleo bruto que foi utilizado em toda a análise foi gentilmente cedido pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. José Odair Pereira. Este petróleo é proveniente da província petrolífera de Urucu, sendo considerado um petróleo leve e de alta qualidade, com 44° API. Após análises por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-EM) feito com este petróleo bruto, verificou-se que este apresenta os seguintes componentes aromáticos: naftaleno/naf-D8, 2 e 1-metilnaftalenos, bifenil, dimentilnaftalenos, trimetilnaftalenos, metilfluorenos, fenantreno/fen-D10 e fluoranteno D10 (Araújo, 2014).

O Diesel foi obtido pela compra em um posto de gasolina da Petrobras, localizado na cidade de Manaus. Segundo especificações do produto, o diesel é formado pela união de frações de destilados de petróleo bruto (óleo diesel leve e pesado, nafta, querosene e gasóleo leve de vácuo). Estas são misturas complexas de petróleo, compostas primeiramente por hidrocarbonetos saturados (parafínicos e naftênicos), ou aromáticos, com cadeia carbônica composta de 9 a 30 átomos de carbono (Petrobrás, 2014).

#### 4.2 AMOSTRA BACTERIANA

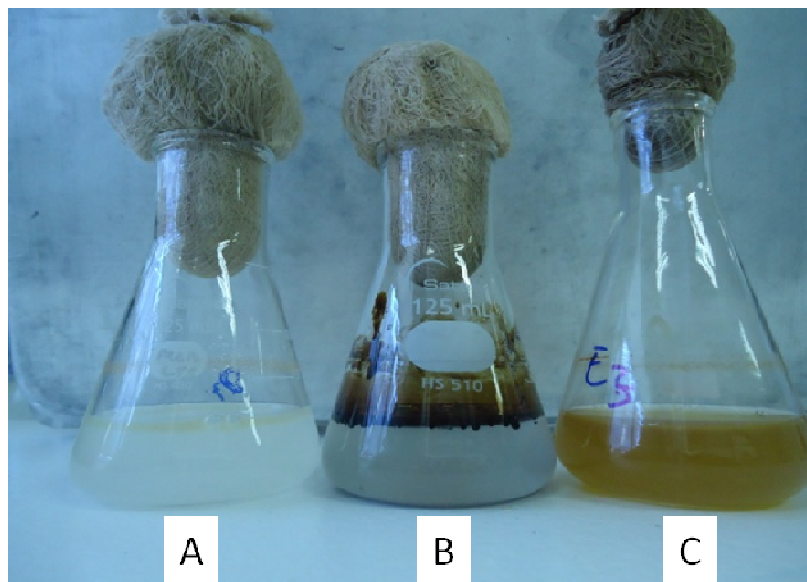
A bactéria *A. junii* SB132 foi isolada das folhas de *Eichhornia crassipes*(Mart.) Solms, Pontederiaceae (número de catalogação INPA 259.239) (Figura 2), por meio da capacidade de utilizar petróleo como única fonte de carbono (Figura 3) (Araújo, 2014). A identificação bacteriana foi realizada utilizando a morfologia do envelope celular e o sequenciamento de parte da região gênica 16S, obtendo-se identidade máxima de 99%, E-value de 0,0 e porcentagem de cobertura de 100% (Souza-Neto, 2013). Esta linhagem encontra-se preservada em glicerol 20% estéril a -80°C, LB-soft (LB com ágar 0,75%) e BH-soft com petróleo (BH, petróleo e ágar 0,75%) em temperatura ambiente. A preservação foi precedida de um crescimento em petróleo como única fonte de carbono.

Pela classificação do Ministério da Saúde (Souza *et al.*, 2006) espécies do gênero *Acinetobacter* são agrupadas na classe de risco biológico 2. Esta classe consiste de agentes biológicos que possuem moderado risco individual e limitado risco para a comunidade. Portanto, por procedimento padrão e pela classificação de

riscodeste organismo, todas as condições trabalhadas no laboratório foram mantidas adequadas quanto aos cuidados no manuseio, esterilidade e descontaminação dos materiais utilizados.



**Figura 2. Localização de coleta de macrófita aquática.** *E. crassipes* foi coletada no Rio Negro, no porto de Manaus (área mostrada pela seta vermelha). A partir da superfície de suas folhas, *A. junii* SB132 foi isolada. A localização global é S 3°8'50.30" e W 59°57'22,20", com elevação de 39m (Araújo, 2014). A imagem foi obtida com o Google Earth 2014.



**Figura 3. Atividade biodegradadora de *A. junii* SB132.** Fotos tiradas após 24h de cultivo em (A) diesel 1,3%, (B) petróleo bruto 1,3% e (C) em extrato de levedura 1,3%. O crescimento bacteriano é observado pela formação de turvação nos cultivos nas três fontes de carbonos citadas( substrato A, B e C). Foto: Souza-Neto.

### **4.3 MORFOLOGIA DE COLÔNIAS E CELULAR**

As células utilizadas para coloração foram crescidas em meio BH líquido e sólido (ágar 1,5%) acrescido de petróleo bruto 1,3%, diesel 1,3% e extrato de levedura 1,3%, crescidas por 24h. Após este tempo, as colônias foram visualizadas para verificação do formato e tamanho. A coloração para visualização de cápsula consistiu em misturar em uma lâmina uma colônia com 2 $\mu$ L de água destilada, seguido de adição de 2 $\mu$ L de tinta da China. Em seguida, deslizou-se sobre a mistura uma lamínula e deixada para secar ao ar. Em seguida, as células foram coradas com fucsina por 2 minutos. Para visualização da morfologia celular, a amostra bacteriana foi corada pelo método de coloração de Gram. A coloração de Gram consistiu em fixar uma colônia por calor, seguido de coloração com fucsina por 1,5 minuto e lavagem com água destilada. Todas as colorações foram visualizadas em microscópio óptico com aumento de 1000x.

### **4.4 ANÁLISE DA NATUREZA QUÍMICA DO ENVELOPE BACTERIANO**

Para verificação da natureza química do envelope bacteriano, utilizou-se a coloração com agente fluorescente e teste de viscosidade. Para coloração com agente fluorescente, uma colônia fixada por chama foi corada com laranja de acridina 97% por 2 minutos, enxaguada com água destilada, lavada com solução de álcool/acetona 1:1 por 10 segundos e corada com fluoresceína de sódio 0,002% por 2 minutos (Ciancaglioni e Sforza, 2002). As células coradas foram visualizadas em microscópio óptico com aumento de 1000x. Para o teste de viscosidade, com auxílio de um palito, colocou-se uma colônia em uma lâmina e adicionou-se uma gota de KOH 3% sobre elas. Deixou-se descansar por 1 minuto. Em seguida, misturou-se com um palito e verificou-se o aparecimento de viscosidade.

### **4.5 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS**

O teste de sensibilidade de *A. junii* a antibióticos foi realizado segundo as Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana (Anonymous. NCCLS, 2005), adequando-se algumas condições ao microrganismos-teste. De uma placa de bactérias crescidas por no máximo 24h, foram retiradas algumas colônias e ressuspendidas em solução salina 0,85% estéril. Mediu-se a densidade

celular em espectrofotômetro 625nm e ajustou-se o volume da suspensão para 0,1 de absorbância (equivalente a 0,5 *McFarland*). Mergulhou-se um palito com algo algodão estéril nesta suspensão de células por alguns instantes e retirou-se o excesso pressionado na parede do tubo. Em seguida, inoculou-se-se em uma placa (140mm de diâmetro) contendo meio Müller-Hinton sólido (70mL) por três vezes, girando a placa 60° a cada esfregaço. A placa foi deixada em repouso por 3 minutos a fim de absorver o excesso de umidade. Em seguida, com auxílio de uma pinça, foi colocado uma unidade de multidiscos de antibióticos (*Laborclin*) sobre o meio de cultura, pressionando-o suavemente para assegurar contato completo. A placa foi incubada a 30°C por 18 a 24h. Os halos foram medidos utilizando uma régua e considerou-se halo de inibição a área sem crescimento detectável a olho nu. Os diâmetros dos halos foram interpretados como resistentes, resistência intermediária e sensíveis.

#### **4.6 PERFIL PLASMIDIAL DE *A. junii* SB132**

As bactérias foram inoculadas em placas contendo meio LB e incubadas a 28°C por 24h. Uma colônia isolada foi inoculada em meio LB líquido e a cultura foi incubada a 30°C com agitação a 160 rpm, por 14h. A extração do DNA plasmidial foi realizada por lise alcalina e coluna de afinidade utilizando os kits QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) e Large-Construct (Qiagen). O DNA plasmidial obtido a partir das preparações foi analisado por eletroferese em gel de agarose 0,5% a 0,5 V/cm a 4°C. O marcador de massa molecular utilizado foi 1kb DNA Ladder (NEB) e a coloração com brometo de etídeo foi realizada com 12h de coloração e 24 de descoloração, após corrida do gel. O tampão utilizado foi o TAE (2,44g Tris-Base, ácido acético 0,57mL, EDTA 0,5M pH 8,0 10mL para 500mL).

#### **4.7 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA POR ESPCTROMETRIA DE MASSA**

Os inóculos foram preparados segundo o item 4.8.1 até atingir 24h de crescimento nas três condições de cultivo (petróleo bruto 1,3%, diesel 1,3% e extrato de levedura 1,3%), as células foram centrifugadas a 4000 rpm, a 4°C, por 15 minutos, para retirada de todo o meio de cultura e lavadas posteriormente com salina 0,15M. As células foram ressuspendidas com 200µL de água deionizada e foi

transferido 100µL da ressuspensão para um microtubo de 1,5mL. Foi adicionado 900µL de etanol 100%, seguido por centrifugação a 13000 rpm por 2 minutos. Após descarte do sobrenadante, as células foram deixadas para secar por alguns minutos em capela de exaustão. As células secas foram ressuspendidas, com auxílio de uma ponteira, com 300µL de solução aquosa de ácido fórmico a 70%, seguido por adição de 300µL de acetonitrila e homogeneizado no vórtice. As amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 13000 rpm. Do sobrenadante, foram aplicados em seis poços de placa de aço (especificação) para cada condição, 1µL de sobrenadante em cada poço e deixado a temperatura ambiente até secar. Em seguida, aplicou-se 1µL de matriz (10mg de CHCA, 500µL de acetonitrila, 100µL de TFA 3% e 400µL de água deionizada) em cada poço com amostra e esperou-se secar. As amostras foram analisadas no modo automático no Microflex (*Bruker*). Os resultados foram dados e escores sendo que valores entre 2300 a 3000 indicam alta probabilidade de identificação da espécie, e 2000 a 2999 indicam provável identificação da espécie.

## **4.8 PERFIL DE CRECIMENTO BACTERIANO**

### **4.8.1 Preparo de pré-inóculos e inóculos**

A partir de amostras bacterianas preservadas em BH semisólido acrescido de petróleo, com auxílio de uma alça de platina estéril, uma alçada de massa celular foi inoculada em 5mL meio LB caldo em tubos de ensaio com tampa rosqueável (10mL) e estes foram incubados por 16 a 24h, a 30°C, sob agitação de 140 rpm. Para preparo do inóculo, foi retirado 1mL da cultura de pré-inóculo e medida a densidade celular em espectrofotômetro a 600nm de comprimento de onda. Novamente, 1mL da cultura foi colocado em um microtubo de 1,5mL estéril e bem fechado, centrifugado a 10.000 rpm por 4min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensão em 1mL meio BH estéril e inoculado em 50mL de meio BH estéril de modo a obter uma densidade celular de 0,01 a 600nm. Ao meio foram adicionadas as fontes de carbono (petróleo 1,3%, diesel 1,3% e extrato de levedura 1,3%). Estes inóculos foram incubados por 16 a 24h, a 30°C. Este procedimento foi executado para todos os crescimentos de *A. junii* SB132.



#### 4.8.2 Perfil de crescimento de *A. junii* SB132

A densidade celular foi medida a cada 4h em culturas preparadas como descrito no item 4.8.1. A quantidade de cultura utilizada para as medidas foi de 1mL, fazendo diluições de 1/10 quando a densidade óptica atingiu o valor próximo de 1 para evitar erros de leitura. O experimento foi realizado utilizando-se de três frascos na qual se coletou os pontos de medida da densidade celular.

#### 4.9 OBTENÇÃO DO EXTRATO PROTÉICO

Extrato proteico foi obtido a partir de cultura bacteriana preparada como descrito no item 4.4.1. Células cultivadas por 24h foram centrifugadas a 4000 rpm, a 4°C, por 30min em tubos falcon de 50mL. O *pellet* das células foi lavado com 3mL de tampão Tris-HCl (50mM pH 7,5), centrifugado novamente a 4000 rpm, a 4°C, por 15min. Em seguida, 1mL de tampão de lise (7M ureia, 2M tiourea e 4% CHAPS, 50mM DTT) acrescido de 10% m relação a massa de células, 1% de solução tampão de anfólitos (IPG) com faixa de pH 3-11 e 1mM inibidor de serino e cisteíno proteases fenilmetilsulfonil frureto (PMSF), foram adicionados ao sedimento. As células foram lisadas utilizando sonicador (*Fisher 100 Sonic Dismembrator*) com três pulsos de 30s e intervalos de 30s em banho de gelo na potencia 1. As amostras foram incubadas no gelo por 1h e depois foram centrifugadas por 30min, a 12000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi distribuído em volumes de 100µL em microtubos de 1,5mL. Foi adicionado 5V de solução gelada de clorofórmio e metanol na proporção de 1:4, respectivamente. Em seguida, os tubos foram agitados em vórtice por 30s, centrifugados por 15min, a 12000 rpm, a 4°C e em seguida descartado o sobrenadante. O sedimento foi ressuspensão com 1mL de metanol e centrifugado novamente por 15min, a 12000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o excesso de metanol retirado com papel toalha por capilaridade. O procedimento de lavagem com metanol foi repetido mais duas vezes. O sedimento foi seco à temperatura ambiente e estocado a -20°C. Para a quantificação de proteínas foi utilizado o kit BCA (*Protein Assay Reagent Pierce*).

## 4.10 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS POR ELETROFORESE

### 4.10.1 Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE)

Para análise da qualidade das proteínas extraídas a eletroforese unidimensional foi realizada. Um tubo com *pellet* de massa quantificada foi solubilizado em 100µL de tampão desnaturante (Tris-HCl 0,2M pH 6,8; 4% (v/v) SDS; 4% (v/v) β-mercaptoetanol; 20% (v/v) glicerol; 0,1% (p/v) azul de bromofenol) e colocados por 5min a 100°C em banho de água. Após este procedimento, 5, 10 e 15µg de proteínas de cada condição foram aplicados em poços de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%). Utilizou-se tampão Tris-Glicina 1x pH 8,3 (Tris 0,025M; Glicina 0,192M, SDS 0,1%), tensão máxima de 500V, corrente elétrica no gel concentrador de 25mA e corrente elétrica no gel separador de 50mA por gel, usando o sistema *Hofer SE 600 Ruby (AmershamBioscience)*. Em seguida as proteínas foram fixadas no gel por 30min em solução fixadora (10% (v/v) de ácido acético; 40% (v/v) de metanol), seguido de coloração com azul de Comassie R-350 *overnight* e descorado com solução específica (etanol 25% e ácido acético 8%) e água deionizada. O gel foi digitalizado utilizando *Lab Scam 5.0*.

### 4.10.2 Eletroforese bidimensional (focalização isoeétrica e SDS-PAGE)

As amostras de proteínas foram dissolvida em solução de reidratação ( 1% de anfólitos (tampão IPG pH 3-11), ambos da *GE Healthcare*. Um volume que correspondeu a 250µg de proteínas, foi aplicado a uma *ImmobilineDryStrip* de 13cm (*GE Healthcare*, pH 3-11NL), reidratadas durante 10h e submetidas a focalização isoeétrica durante 12h em *EttanIPGphor II (AmershanBioscience)* a 20°C com uma tensão limite de 50mA/*strip*, com os seguintes passos: **1.** 150V/2h; **2.** 300V/2h; **3.** 1.000V/4h (gradiente); **4.** 8.000V/2h (gradiente); **5.** 8.000V/2h. Após focalização, as *strips* foram equilibradas em solução de equilíbrio I (ureia 6M, SDS 2%, glicerol 29,3%, Tris-HCl 1,5M pH 8,8 e DTT 0,5%) e posteriormente alquiladas com solução de equilíbrio II (ureia 6M, SDS 2%, glicerol 29,3%, Tris-HCl 1,5M pH 8,8 e iodoacetamida 2,5%), submetidas em seguida à separação pela massa molecular por SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 12%). A visualização foi realizada como descrito no item 4.10.1. Para as análises do perfil proteômico, os géis foram previamente digitalizados utilizando *LabScam 5.0*, seguido de análise no programa

*Image Master Platinum*, versão 6.0 (GE Healthcare), com os valores de *smooth* e *smooth*, igual a 100 e 2, respectivamente, realizando-se correções manuais. Foram obtidos no mínimo três géis com 70% de similaridade dentro de cada condição. Para cada condição, gel com maior número de *spots* foi considerado como gel referência. Os géis referência de cada condição experimental foram comparados entre si usando o programa *Image Master Platinum*, versão 6.0 (GE Healthcare), para verificação da similaridade e expressão diferencial.

## 4.11 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

### 4.11.1 Preparo das amostras

Os *spots* (pontos protéicos) selecionados foram categorizados em três grupos, de acordo com a fonte de carbono utilizada: específicos para petróleo bruto, detectados simultaneamente em petróleo bruto e diesel, e comuns às três condições de cultivo. Os *spots* selecionados foram retirados manualmente do gel, utilizando ponteiras novas estéreis tipo P1000 e colocadas em microtubos de 1,5mL. Aos tubos contendo os géis/*spots* foram adicionados 500µL de solução descorante (50% (v/v) de metanol; 2,5% (v/v) de ácido acético) seguido de incubação por 2h a temperatura ambiente. Descartou-se o descorante e repetiu-se o processo mais uma vez 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. Em cada etapa, acetonitrila foi descartada e os tubos foram deixados à temperatura ambiente para evaporação da acetonitrila restante (3 a 5min). Os géis/*spots* foram reduzidos com 30µL de solução contendo DTT (ditiotreitól10mM; bicarbonato de amônio 100mM) por 30min. A solução de DTT foi então removida e as amostras foram alquiladas com 30µL de solução contendo IAA (iodoacetamida50mM; 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 foi 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% foram novamente realizadas conforme descrito anteriormente e ao final as amostras foram mantidas a temperatura ambiente para evaporação da acetonitrila residual.

#### 4.11.2 Obtenção dos fragmentos tripticos

Para a digestão proteolítica *in gel*, os *spots* selecionados foram reidratados em 20µL de solução de tripsina (Promega) (20ng/µL) em tampão contendo 50mM de bicarbonato de amônio), em banho de gelo por 30min. Após este tempo, 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. Para a extração dos peptídeos do gel foi adicionado 20µL de solução de extração I (ácido fórmico 5%) e 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%) e incubado por 10min a temperatura ambiente. Novamente foi recuperado todo o volume e adicionado mais uma vez solução de extração II (ácido fórmico 5%; acetonitrila 50%) e incubado por 10min a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram liofilizadas e armazenadas a -20°C até sua aplicação no espectrômetro de massa.

#### 4.11.3 Obtenção dos espectros de massa

A análise por espectrometria de massa (MS) foi feita em espectrômetro Ultraflex III MALDI TOF/TOF (*Bruker Daltonics*) e no espectrômetro MALDI-TOF-TOF Autoflexspectrometer (*Bruker Daltonics*) no Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA. As amostras foram ressuspendidas em água deionizada e misturadas com matriz  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (10mg de CHCA, 500µL de acetonitrila, 100µL de TFA 3% e 400µL de água deionizada) na proporção de 1:3, 1:2 ou 1:1. As amostras foram aplicadas em triplicata na placa de MALDI (*Bruker Daltonics*) e deixadas para cristalizar em temperatura ambiente. A calibração externa foi feita utilizando padrões de peptídeos de massa conhecida de 1000–3200 Da (*Bruker Daltonics*): angiotensina II, angiotensina I, substância P, bombesina, ACTH clip 1-17, ACTH clip 18-39, somatostatina 28).

#### 4.11.4 Identificação das proteínas

Os espectros de massa MS foram analisados para identificação da proteína baseado na impressão digital de massa de peptídeo (*Peptide Mass Fingerprint - PMF*). Primeiramente, utilizou-se o programa PeakErazor (GPMW) para retirada

dos contaminantes da lista de picos gerada no programa FlexAnalysis v3.3 (*Bruker Daltonics*). Em seguida, a nova lista de picos foi analisada no programa Mascot ferramenta PMF (*Matrix Science* - 2014) para comparação no banco de dados. Os parâmetros selecionados na pesquisa do Mascot PFM foram: NCBI nr como banco de dados, enzima tripsina, 1 *missed cleavages*, outras proteobactérias como taxonomia, carbamidometilação da cisteína como modificações fixas, oxidação da metionina como modificações variáveis, valor de massa  $MH^+$  (monocarregado) e Peptidetol.± 1,2 Da (Mascot - disponível no site [http://www.matrixscience.com/cgi/search\\_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF](http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF)).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando os estudos ambientais se associam aos estudos moleculares, como a proteômica, é possível gerar informações acerca de quais proteínas estão envolvidas na degradação de poluentes, como os xenobióticos presentes no petróleo e derivados. Os dados obtidos nesta pesquisa revelam alguns possíveis processos celulares desempenhados pela *A. junii* SB132 quando cultivada em petróleo bruto, diesel e extrato de levedura.

A bactéria *A. junii* SB132 foi analisada quanto a sua morfologia celular, perfil de resistência a antimicrobianos e perfil plasmidial. A confirmação de sua taxonomia foi realizada, visto que é um dado importante para estudo de qualquer organismo, em especial aqueles que são visados em uma aplicação biotecnológica como, por exemplo, agente biorremediador, bem como a utilização de suas informações genéticas. Neste trabalho, o perfil proteômico de *A. junii* SB132 foi obtido com a identificação de proteínas envolvidas em processos de manutenção celular, degradação de petróleo e diesel.

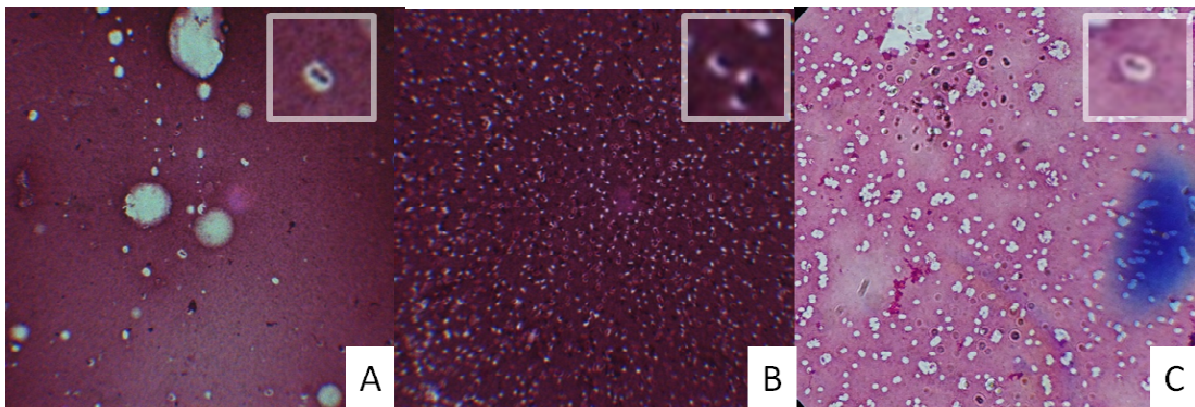
### 5.1 MORFOLOGIA DE COLÔNIAS E CELULAR

Os dados referentes à visualização da morfologia e tamanho de colônias (Figura 4), coloração de cápsula (Figura 5) e coloração simples de Gram (Figura 6) foram obtidos segundo os procedimentos descritos no Item 4.3.



**Figura 4. Crescimento em meio sólido.** A bactéria foi cultivada por 24h a 30°C, em meio sólido BH acrescido de petróleo bruto (A), diesel (B) e extrato de levedura (C), como únicas fontes de carbono e energia.

Como mostrado na Figura 4, foi observado que na condição de cultivo em extrato de levedura a bactéria apresentou colônias com tamanhos maiores em relação às observadas nas condições de petróleo bruto e diesel. Estes dados podem estar relacionados com a taxa de crescimento da bactéria. Como será descrito mais adiante, a taxa de crescimento em petróleo bruto e diesel é menor que em extrato de levedura.



**Figura 5. Coloração de cápsula.** A coloração foi realizada em células de colônias de *A. junii* SB132 com 24h. As fotos foram tiradas com aumento de 1000x em microscópio óptico. (A), células crescidas em petróleo bruto. (B), células crescidas em diesel. (C), células crescidas em extrato levedura. Na extremidade superior direita das imagens é mostrando aumento manual para melhor visualização da cápsula.

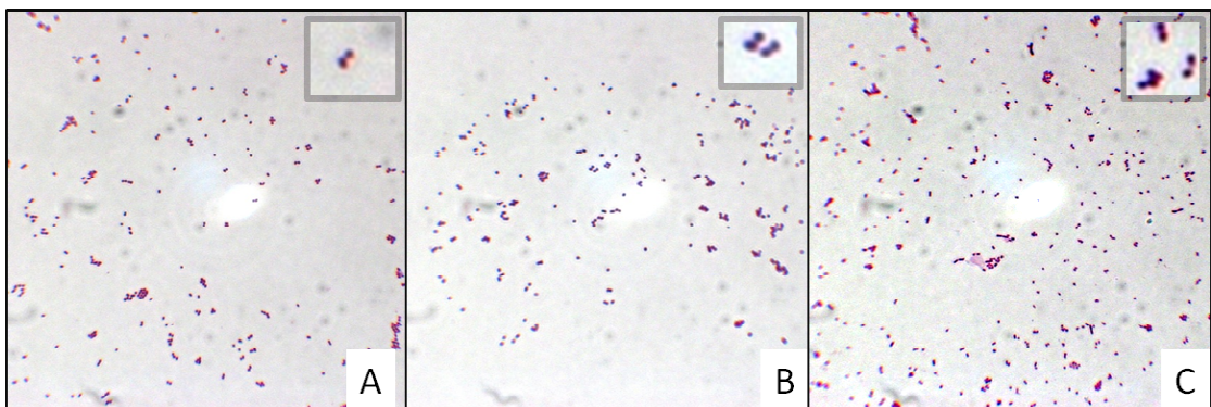
A Figura 5 mostra que nas três condições de cultivo (petróleo bruto, diesel e extrato de levedura), a bactéria apresentou cápsula. A presença de cápsula nas bactérias de gênero *Acinetobacter* tem disso reportada (Stratton, 1983). A cápsula é descrita como um fator de virulência e que pode permitir que os microrganismos que a possuem escapem dos mecanismos de defesa do hospedeiro. No entanto, a cápsula permite que as bactérias se fixem sobre superfícies no seu ambiente natural, podendo usá-la como fonte de nutrição, degradando-a quando os nutrientes estão em baixos níveis, também fornecem proteção contra desidratação e evitam que nutrientes se movimentem fora da célula (Totorá *et al.*, 2005).

Algumas proteínas podem estar associadas à cápsula para formarem complexos com atividade emulsificante. A produção de biossurfactantes é visto como um mecanismo que permite a absorção de substratos utilizados

como fonte de carbono e energia, tornando-os mais disponíveis, ou mais solúveis e evitando contato direto com o envelope celular.

A cápsula é importante para a efetiva colonização, aderência e prevenção a dessecação das células que o possuem. É descrito que *Acinetobacter* ADP1 tem uma mini cápsula e libera aproximadamente 50% do polissacarídeo no meio. Este exopolissacarídeo forma um complexo com proteínas e tem atividade emulsificante. Esta característica fornece uma vantagem nutricional porque promove a absorção de compostos hidrofóbicos (Barbe *et al.*, 2004). Outro microrganismo com característica similar é a *A. calcoaceticus*. Esta bactéria produz uma grande cápsula de polissacarídeo e que faz complexo com uma proteína. Este complexo se torna um efetivo agente emulsificante de alta massa molecular, proveniente desta associação (Abdel-El-Haleem, 2003).

Portanto, é possível que *A. junii* SB132 tenha sua atividade biodegradadora potencializada pela presença de cápsula, dado o papel que esta estrutura possui naturalmente. Mesmo que a cápsula esteja presente nas células cultivadas nas três condições (petróleo bruto, diesel e extrato de levedura), não é possível afirmar que há indução pelo substrato para a sua formação, pois todas as condições físicas e químicas nas quais as células estão expostas não foram testadas. Além disso, são necessários mais estudos para se verificar a localização dos genes que promovem a síntese da cápsula.



**Figura 6. Coloração de Gram.** A coloração foi realizada em células de colônias de *A. junii* SB132 com 24h de cultivo em três condições. As imagens foram obtidas a partir de microscopia óptica (1000x). (A), células crescidas em petróleo bruto. (B), células crescidas em diesel. (C), células



crescidas em extrato levedura. Na extremidade superior direita das imagens é mostrado aumento manual para visualização da morfologia e arranjo.

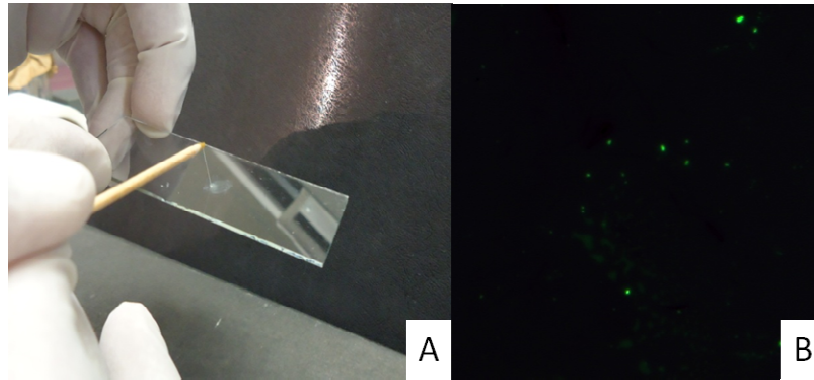
Os resultados da Figura 4, 5 e 6 foram necessários a fim de confirmar os dados taxonômicos, bem como verificar mudanças no formato das colônias, das células e do arranjo quando cultivadas em diferentes fontes de carbono, principalmente no cultivo em compostos xenobióticos.

De acordo com os resultados mostrados na Figura 6, *A. junii* SB132 apresentou a mesma morfologia celular nas três condições de cultivo (petróleo bruto, diesel e extrato de levedura). A bactéria possui majoritariamente formato de cocobacilo e arranjo majoritário de diplococobacilo. Contudo, células individualizadas também foram observadas.

Em um estudo para verificação da morfologia em diferentes condições de cultivo, Jean *et al.* (2008), verificaram que *Pseudomonas spp.* apresentou mudanças na morfologia sob influência de condições ambientais como temperatura, níveis de nutrientes e tempo de biodegradação de BTEX. Essas bactérias apresentaram arranjos filamentosos, aglomerados de pequenos bastonetes esféricos e bastonetes não agrupados. Estes dados da literatura mostram que quando as condições no ambiente de biodegradação mudam, pode haver alterações na morfologia do microrganismo para garantir melhor utilização das fontes de energia no seu ambiente.

## **5.2 ANÁLISE DA NATUREZA QUÍMICA DO ENVELOPE BACTERIANO**

Os dados referentes à verificação da natureza do envelope bacteriano (Figura 7) foram obtidos segundo os procedimentos descritos no Item 4.4.

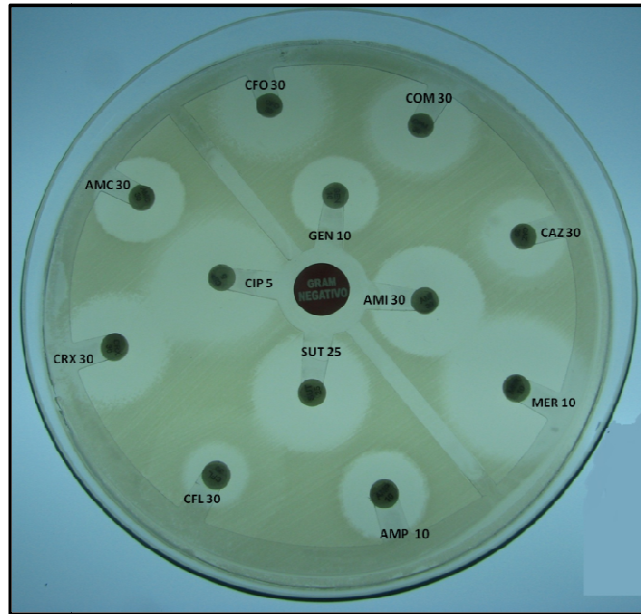


**Figura 7. Teste de viscosidade e coloração com agente fluorescente.** O teste de viscosidade e coloração com agente fluorescente (aumento de 200x) foram realizadas em células de colônias de *A. junii* SB132 com 24h de cultivo em meio mínimo com petróleo. (A), viscosidade observada pela liberação do conteúdo de DNA. (B), células com coloração verde indicando que a bactéria é Gram-negativa.

Os resultados mostrados na Figura 7 indicam que a bactéria é Gram-negativa e reforçam os dados moleculares (Souza-Neto, 2013) e espectrometria de massa que identificaram a espécie bacteriana, possuindo a membrana externa como diferença primária das bactérias Gram-positivas. O teste de viscosidade (Figura 7 A) é baseado na liberação do conteúdo de DNA (conteúdo viscoso) pelas bactérias Gram-negativas após exposição ao hidróxido de potássio. Bactérias Gram-positivas não liberam o conteúdo do DNA por possuírem a parede celular mais expressa e ausência de membrana externa. A coloração por fluorescência (Figura 7 B) também confirma a natureza do envelope celular. Bactérias coradas e Gram-negativas apresentam a fluorescência de cor verde, enquanto as que são coradas e Gram-positivas apresentam fluorescência de cor amarela.

### 5.3 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

O perfil de sensibilidade de *A. junii* SB132 foi obtido segundo o item 4.5. A Figura 8 mostra os halos de inibição de crescimento bacteriano quando os discos de antibióticos foram postos sobre o meio de cultura com células inoculadas e crescidas por 24h.



**Figura 8. Halos de inibição de crescimento de *A. junii* SB132 frente a antibióticos.** A bactéria foi submetida ao teste de sensibilidade utilizando multidiscos de antibióticos: CIP 5 (ciprofloxacina 5 $\mu$ g), GEN 10 (gentamicina 10 $\mu$ g), AMI 30 (amicacina 30 $\mu$ g), SUT 25 (sulfametoxazol-trimetoprim 25 $\mu$ g), CFO 30 (cefoxitina 30 $\mu$ g), CPM 30 (cefepime 30 $\mu$ g), CAZ 30 (ceftazidima 30 $\mu$ g), MER 10 (meropenem 10 $\mu$ g), AMP 10 (ampicilina 10 $\mu$ g), CLF 30 (cefalotina 30 $\mu$ g), CRX 30 (cefuroxima 30 $\mu$ g) e AMC 30 (amoxicilina-clavulanato 30 $\mu$ g). Os halos foram medidos com 24h de crescimento a 30 °C.

Como observado na Figura 8, nos halos de inibição não se observou crescimento de colônias dentro dos halos. Os halos formados a partir dos discos de AMC, AMP, SUT, GEN e AMI não apresentaram as bordas com crescimento celular discreto, enquanto que nos halos dos discos restantes houve crescimento celular discreto nas bordas. Esses crescimentos discretos nas margens das colônias foram observados, mas foram ignorados, seguindo orientação de norma da NCCLS (2005). Os valores de tamanhos de halos, bem como a classificação da sensibilidade estão dispostos na Tabela 1.

**Tabela 1. Teste de sensibilidade a antimicrobianos.** Os valores dos halos foram obtidos com 24h de crescimento de *A. junii* SB132 a 30°C. Multidiscos de antibióticos específicos para testes de bactéria Gram-negativa foram utilizados. Os parâmetros para estabelecimento do resultado (sensível, resistência intermediária e resistente) foram obtidos da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)/NCCLS (2005).

Tamanho do halo (mm)	Antimicrobianos	Concentração (µg/disco)	Sigla	Halo obtido (mm)	Resultado	Parâmetros para resultados		
						Resistente	Intermediário	Sensível
34	meropenem	10	MER	34	S	≤ 14	≥14 ≤15	≥ 16
30	ciprofloxacina	5	CIP	30	S	≤ 15	≥16 ≤ 20	≥ 21
26	sulfametoxazol-trimetoprim	25	SUT	26	S	≤ 10	≥11 ≤15	≥ 16
26	amicacina	30	AMI	26	S	≤ 14	≥15 ≤16	≥ 17
25	cefepime	30	CPM	25	S	≤ 14	≥15 ≤17	≥ 18
24	cefoxitina	30	CFO	24	S	≤ 14	≥15 ≤17	≥ 18
24	cefuroxima	30	CRX	24	S	≤ 14	≥15 ≤17	≥ 18
22	amoxicilina-clavulanato	30	AMC	22	S	≤ 13	≥14 ≤17	≥ 18
20	gentamicina	10	GEN	20	S	≤ 12	≥13 ≤14	≥ 15
19	ampicilina	10	AMP	19	S	≤ 13	≥14 ≤16	≥ 17
19	ceftazidima	30	CAZ	19	S	≤ 14	≥15 ≤17	≥ 18
13	cefalotina	30	CFL	13	R	≤ 14	≥15 ≤17	≥ 18

Na Tabela 1 e Figura 8 pode-se observar que a *A. junii* SB132 apresentou sensibilidade para a maioria dos antimicrobianos testados e resistência apenas a um antibiótico: cefalotina 30µg (13mm). Dentre os antibióticos na qual a bactéria foi sensível, o mais efetivo foi meropenem 10µg, enquanto que os antibióticos menos efetivos foram ampicilina 10µg (19mm) e ceftazidima 30µg (19mm). Os antibióticos restantes apresentaram efeito que variaram de 20 a 30 mm no tamanho dos halos, sendo, portanto, a bactéria sensível a tais antimicrobianos.

Mesmo que a avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos seja feita com amostras ambientais, é dada maior importância ao perfil de resistência aos antimicrobianos para as cepas isoladas de amostras clínicas, ou hospitalares. No Brasil, por exemplo, 3.728 cepas isoladas de infecções hospitalares (1997 a 1999) foram testadas contra uma variedade de antibióticos. Os resultados revelaram que 10% apresentaram resistência a carbapenems, 35% a tetraciclina, 44% a tobramicina e 50% a gentamicina. Cefalosporinas, de terceira e quarta geração, e quinolonas foram ativas contra menos de 40% das cepas (Oliveira, 2007).

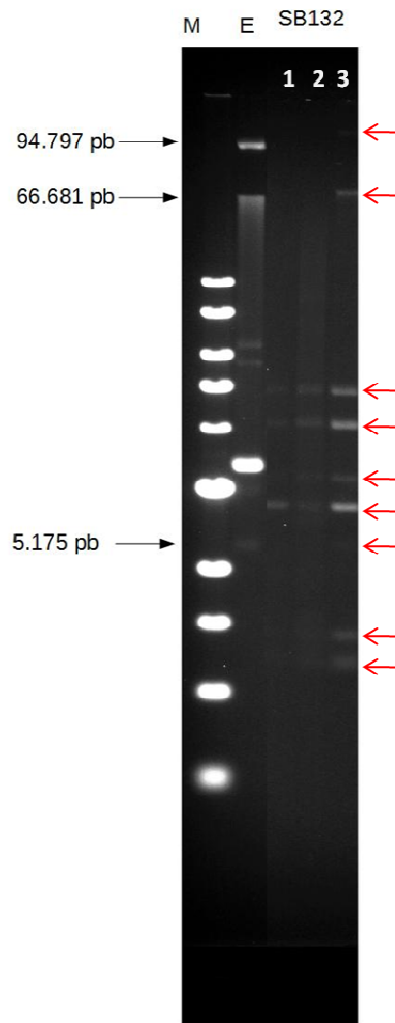
Em um estudo feito por Gales *et al.*, (2011), antibióticos foram testados contra 4.686 cepas do gênero *Acinetobacter* isoladas de sítios de infecções hospitalares. Os resultados mostraram que mais que 50% das bactérias foram resistentes a maioria dos antibióticos testados, sendo que apenas para os antibióticos polimixina B e colistina a minoria foi resistente (aproximadamente 0,9%).

Nos estudos realizados por Pontes *et al.*, (2006), cepas isoladas de sítios de infecção hospitalar foram mais resistentes a  $\beta$ -lactâmicos e aminoglicosídeos, e mais sensíveis às quinolonas e imipenem. Já no estudo feito por Sá e Hinrichsen (2009), os antimicrobianos que apresentaram maior eficácia sobre bactérias hospitalares do gênero *Acinetobacter* foram gentamicina e ciprofloxacino. Para os restantes dos antibióticos as bactérias apresentaram resistência média e alta.

Dados do genoma serão necessários para se verificar a existência de genes que estão relacionados à resistência a antimicrobianos, aos fatores de virulência, ou que gere um fenótipo que propicie o recebimento de DNA móveis e a invasão e permanência em um potencial hospedeiro. Além disso, é bom ficar claro que os dados de susceptibilidade a determinado antimicrobiano variam muito de microrganismo para microrganismo, bem como de ambiente para ambiente. Assim, espera-se que bactérias de ambientes hospitalares apresentem um perfil de sensibilidade e resistência a antimicrobianos diferente das bactérias ambientais.

#### **5.4 PERFIL PLASMIDIAL DE *A. junii* SB132**

O perfil plasmidial de *A. junii* SB132 obtido por lise alcalina e purificado por cromatografia de afinidade foi analisado em gel de agarose 0,5% em tampão TAE de acordo com o item 4.6. No gel foram observados 9 bandas (Figura 9).



**Figura 9. Perfil plasmidial de *A. junii* SB132.** Os plasmídeos foram extraídos por lise alcalina e purificação em coluna cromatográfica de afinidade usando os kits QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) (1 e 2) e Large-Construct (Qiagen) (3). O perfil plasmidial foi obtido por eletroforese de agarose 0,5%, tensão de 0,5V/cm e temperatura de 4°C. Foram aplicados nos poços (1,2 e 3) dos géis 30µL de amostra de plasmídeos extraídos. Marcadores de massa molecular foram 1 kb ladder (*New England Biolabs* - UK) NEB (M) e plasmídeos superenovelados (E) de *E. coli* ETEC H10407 (massas indicadas pela setas pretas). Pode-se identificar 9 banda (setas vermelhas) no gel que indicam a presença de plasmídeos. A faixa de tamanho dos plasmídeos foi de 94kb a 5kb.

Não é possível afirmar com precisão quantos plasmídeos diferentes em sequência. Isso porque um mesmo plasmídeo pode se encontrar em diferentes estados topológicos, do mais compactado ao menos compactado, podendo estar também relaxado e linearizado (por quebra mecânica durante a preparação). Desta forma, faz-se necessário que os plasmídeos sejam isolados e sequenciados para verificação de quais genes comportam.

Os plasmídeos expressam fenótipos acessórios em seus hospedeiros que conferem uma vantagem adaptativa a uma condição atípica, como por exemplo, atribuição de virulência, resistência a antimicrobianos e metais pesados, habilidade em catabolizar xenobióticos e outras fontes complexas, entre outros. No entanto, em muitas situações, transportar um plasmídeo só é benéfico se as condições ambientais são adequadas para que haja seleção positiva do plasmídeo que confere um dado fenótipo (Slater *et al.*, 2008). Porém, existem perfis plasmidiais complexos que são estáveis e que não precisa de seleção ambiental. Por isso, em um ambiente contaminado com poluentes, dentre as relações que os microrganismos apresentam, a transferência horizontal é uma das mais intrigantes (Barberio e Fani, 1998).

Vias catabólicas envolvidas com a degradação de diferentes compostos poluentes normalmente são codificadas por genes presentes em plasmídeos, embora estes possam estar localizados também no genoma cromossomal (Coral e Karagöz, 2005). Levando -se em condeção alguns estudos, pode confirmar que plasmídeos podem estar envolvidos nesta atividade é a perda da capacidade biodegradadora do poluente em repiques sucessivos em meios não seletivos, em bactéria citadas na literatura (Mirdamadian *et al.*, 2010).

No estudo de Mirdamadian *et al.* (2010) e Coral e Karagöz (2005), bactérias curadas e não curadas do gênero *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus* e *Micrococcus* curadas foram testadas quanto sua capacidade em degradar substratos poluentes preferenciais. Nas bactérias curadas, estas perderam a capacidade em degradar seus substratos juntamente com a perda de plasmídeos no seu perfil. Além do mais, houve deleção de plasmídeos, visualizada na mudança de deslocamento do plasmídeos na eletroforese.

A confirmação de que os genes plasmidiais também estão envolvidos na biodegradação de petróleo e diesel por *A. junii* SB132 deverá ser realizada. No entanto, é descrito na literatura que genes de biodegradação em *Acinetobacter spp.* estão distribuídos tanto em plasmídeos como no genoma cromossomal (organizados em operons ou distribuídos no cromossomo) (Decorosi *et al.*, 2006).

Estudos envolvendo a caracterização de plasmídeos em *Acinetobacter spp.* mostram que estes plasmídeos comportam genes de interesse. *A. venetianus* VE-CE tem a capacidade de crescer em diesel como sua única fonte de carbono e

energia. Estudos usando PCR, marcadores e *Southern blot* revelaram que os genes para degradação de alcanos, como os que codificam para alcano hidroxilase e rubredoxina, estão localizados nos cromossomos e nos plasmídeos (Decorosi *et al.*, 2006). Os plasmídeos pAV1 e pAV2 hospedados por esta bactéria foram sequenciados e proteínas putativas para aldeído desidrogenase e um gene semelhante a *alkL* foram identificados (Mengoni *et al.*, 2007).

## 5.5 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

A confirmação da identificação bacteriana foi realizada por espectrometria de massa (*Bruker Daltonics*) como descrito no item 4.7. (Tabela 2).

**Tabela 2. Confirmação taxonômica de *A. junii* SB132 por *biotyper*.** A bactéria foi cultivada em petróleo bruto 1,3%, diesel 1,3% e extrato de levedura 1,3% com crescimento de no máximo 24h. A identificação foi realizada em espectrômetro de massa Microflex (*Bruker*) em modo automático, com faixa de aquisição de 2.000 a 20.000 Da.

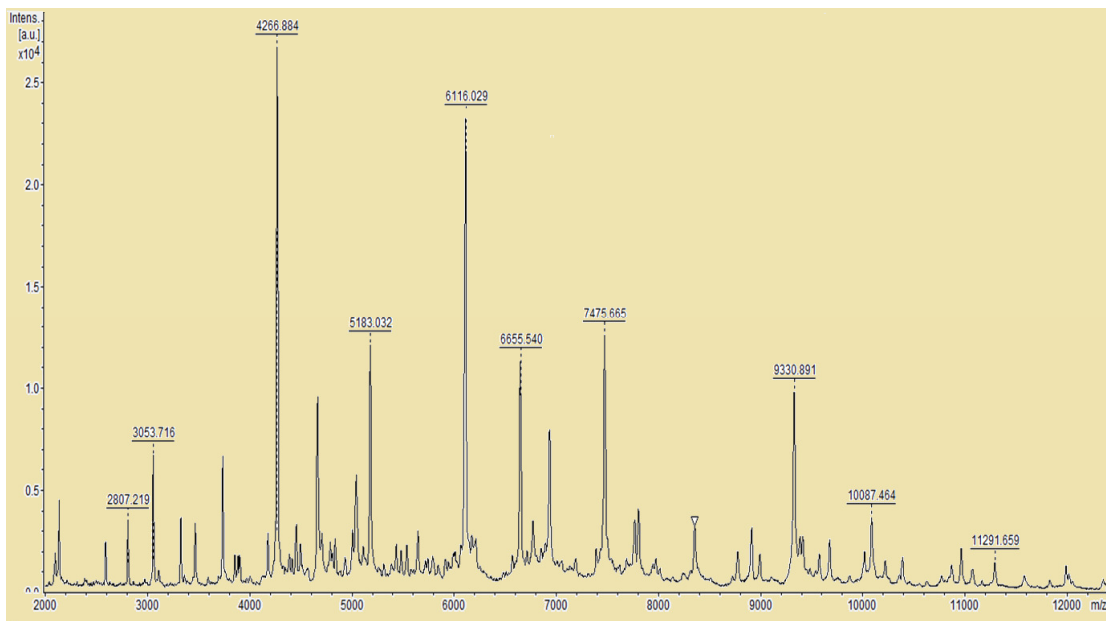
Organismo (melhor combinação)	Score	Organismo (segunda melhor combinação)	Score Valor	Condição de cultivo (substrato de crescimento)
<i>Acinetobacter junii</i>	2,349	<i>Acinetobacter junii</i>	2,334	petróleo bruto
<i>Acinetobacter junii</i>	2,315	<i>Acinetobacter junii</i>	2,275	petróleo bruto
<i>Acinetobacter junii</i>	2,198	<i>Acinetobacter junii</i>	2,163	petróleo bruto
<i>Acinetobacter junii</i>	2,318	<i>Acinetobacter junii</i>	2,27	diesel
<i>Acinetobacter junii</i>	2,306	<i>Acinetobacter junii</i>	2,26	diesel
<i>Acinetobacter junii</i>	2,154	<i>Acinetobacter junii</i>	2,139	diesel
<i>Acinetobacter junii</i>	2,366	<i>Acinetobacter junii</i>	2,238	extrato de levedura
<i>Acinetobacter junii</i>	2,391	<i>Acinetobacter junii</i>	2,291	extrato de levedura
<i>Acinetobacter junii</i>	2,193	<i>Acinetobacter junii</i>	2,16	extrato de levedura

Na Tabela 2, os escores entre 2,300 a 3,000 indicam alta confiabilidade na identificação da espécie. Os escores entre 2,000 a 2,999 indicam boa confiabilidade na identificação da espécie. Os de escores entre 1,700 a 1,999 indicam boa confiabilidade na identificação do gênero. Os escores de 0,000 a 1,699 indicam que a identificação não é confiável.



Os resultados mostrados na Tabela 2 confirmam os dados de morfologia e os dados do sequenciamento de parte do gene rRNA 16S. Os dados morfológicos indicaram que esta bactéria era Gram-negativa e formato cocobacilar, com arranjo diplococobacilo. Os dados moleculares apresentaram identidade máxima de 99%, *E-value* de 0,0 e porcentagem de cobertura de 100% (Souza-Neto, 2013). Desta forma, é seguro afirmar que esta bactéria é a *A. junii*.

É observado que o crescimento celular em diferentes meios de cultivo (petróleo bruto, diesel e extrato de levedura) não influenciou nos resultados de identificação bacteriana. Esta reprodutibilidade da metodologia em diferentes condições de cultivo é devido a medida de proteínas expressas constantemente, como as proteínas ribossomais, que gera distribuição padronizada de picos, principalmente na faixa de 4.000 a 12.000 Da (BrukerDaltonics, 2005). Assim, as diferenças nas sequências de aminoácidos das proteínas ribossomais geram uma impressão digital que diferencia cada espécie de microrganismo (Figura 10).



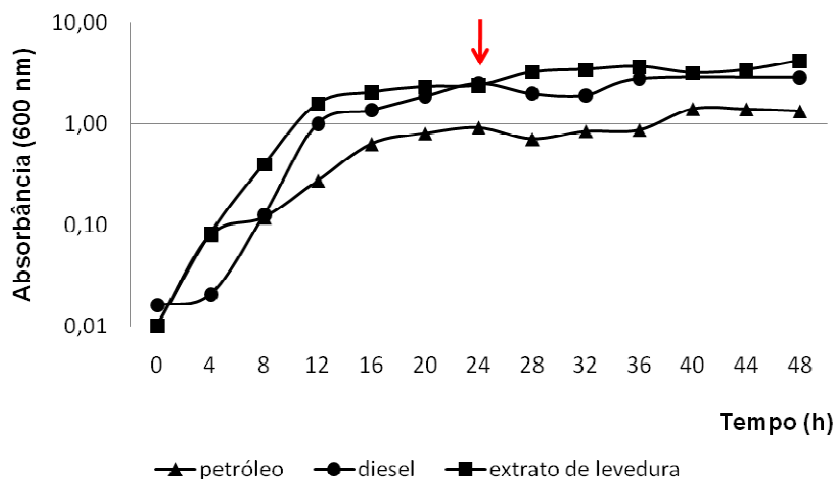
**Figura 10. Espectro de proteínas ribossomais de *A. junii* SB132.** O espectro mostra os picos de proteínas no espectro MS de MALDI obtidos no modo automático do espectrômetro Microflex (*Bruker*). A identificação foi feita comparando o espectro obtido com o espectro disponível no banco de dados. As amostras foram analisadas com diversas réplicas e provenientes de três condições de cultivo (petróleo bruto, diesel e extrato de levedura). O eixo X apresenta a razão m/z e o eixo y, a intensidade dos picos.

A confirmação da identidade taxonômica da bactéria é importante principalmente para sua definição como alvo nos estudos de biorremediação. Microrganismos ambientais são os mais aptos a realizarem atividades como a degradação de poluentes, pois muitos deles já metabolizam naturalmente moléculas análogas, ou adquirem esta capacidade em função de longas exposições (Silva e Fay, 2004).

Porém, dados da identificação não são únicas requeridas para a utilização do organismo *in situ* do organismo, como em um experimento de degradação. Dados do genoma são necessários, a fim de revelar genes envolvidos com a biodegradação, bem como genes relacionados à patogenicidade, para fins de comprovação de que seu uso em processos de biorremediação ambiental não acarreta riscos. Além disso, testes *in vivo* são muito úteis.

## 5.6 CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO

A curva de crescimento microbiano de *A. junii* SB132 foi obtido para as três condições de cultivo de acordo com o método descrito no item 4.8.2. (Figura 11).



**Figura 11. Curva de crescimento bacteriano.** A bactéria foi cultivada em extrato de levedura 1,3% (■), petróleo bruto 1,3% (▲) e diesel 1,3% (●) em triplicata. As absorbâncias ( $\lambda = 600\text{nm}$ ) expressas em escala logarítmica (eixo Y) foram obtidas em intervalos de 4h (eixo X) para todas as condições. As células para extração de proteínas foram coletadas com 24h de crescimento em todas as condições (indicado pela seta).

No perfil de crescimento da Figura 11 o tempo total de medida para todas as condições de cultivo foi de 48h. Para a condição de diesel as medidas entre 36h às 48h não foram obtidas. No entanto, a ausência desses valores não prejudica os resultados. Além do mais, mesmo se considerar para todas as condições até 48h de crescimento, ainda assim é satisfatório.

O ponto estabelecido para extração de proteínas foi de 24h em todas as condições de cultivo (indicado por seta vermelha). As densidades celulares obtidas neste ponto foram 0,93, 2,55 e 2,43, para cultivos realizados em petróleo bruto, diesel e extrato de levedura, respectivamente. De acordo com os perfis de crescimentos obtidos para cada fonte de carbono, a *A. junii* SB132 apresentou melhor crescimento em extrato de levedura, quando comparada aos outros substratos (petróleo bruto e diesel). Com relação aos xenobióticos, a bactéria teve melhor crescimento em diesel.

É provável que nos tempos iniciais da curva de crescimento haja a indução de expressão de diferentes proteínas. Isso acontece em função das diferentes fontes de carbono que ativam outros fatores sigmas, que não a sigma 70, e grupos de genes diferentes são expressos. Por exemplo, em *P. alcaligenes*, genes envolvidos no catabolismo de compostos poluentes são dependentes de promotores que estão sob o controle do fator sigma 54. As vias de degradação de compostos aromáticos (gentisato 1,2 dioxigenase), enzimas do ciclo do ácido cítrico, enzimas do metabolismo do piruvato e gliconeogênese, são reguladas pelo fator sigma 54 (Zhao *et al.*, 2005; Ramos e Marques, 1997).

Além da indução de outros fatores sigmas nos tempos iniciais de crescimento, há também expressão de diferentes níveis de proteínas da mesma via metabólica, bem como regulação por diferentes fatores. Como exemplo, em *Burkholderia xenovorans* que utiliza três vias comuns no metabolismo de benzoato e uma via comum no metabolismo de benzoato e bifenil. A expressão de cada via para degradação de benzoato nesta bactéria depende do substrato e da fase de crescimento. Se a bactéria é cultivada em benzoato e bifenil e proteínas são expressas de certos pontos correspondentes às duas condições, o conteúdo de proteínas da mesma via nas duas condições de cultivo será igual, mas serão diferentes quanto à quantidade e o modo de regulação (Denef *et al.*, 2005).

É provável que diferentes enzimas sejam produzidas em diferentes pontos na fase de crescimento em função da composição dos substratos utilizados neste trabalho. Dessa forma, o petróleo e diesel, em suas composições, possuem moléculas menores e mais solúveis que podem ser substratos preferenciais para a bactéria, a compostos maiores e menos solúveis que perduram mais tempo no meio de cultura (Silva e Fay, 2004). O mesmo acontece para extrato de levedura, visto que este é um autolisado desidratado de leveduras, tendo fonte de nitrogênio e vitaminas, especialmente as do complexo B (Kasvi, 2013).

O petróleo e diesel apresentam compostos mais pesados, difíceis de serem quebrados e utilizados como fonte de carbono, como os HPA. Seria necessário mais tempo, em uma cultura, para que a bactéria pudesse utilizar tais compostos, caso possua esta capacidade. Quanto mais complexo o hidrocarboneto, mais sítios para ataque enzimáticos este possui, requerendo que a bactéria possua diversas vias complexas, com diversas enzimas.

### 5.7 OBTENÇÃO DO EXTRATO PROTÉICO

As células foram coletadas com 24h de crescimento bacteriano nas três condições de cultivo (seta na Figura 11). Quando comparados os rendimentos de proteínas extraídas, observa-se uma relação de causalidade entre quantidade de proteínas e densidade celular (Tabela 3).

**Tabela 3. Rendimento de proteínas.** A bactéria *A. junii* SB132 foi cultivada em extrato de levedura, petróleo bruto e diesel. As proteínas foram extraídas de células com crescimento de 24h a 30°C. A quantificação de proteínas foi realizada usando Kit *BCA Protein Assay Reagent Pierce*.

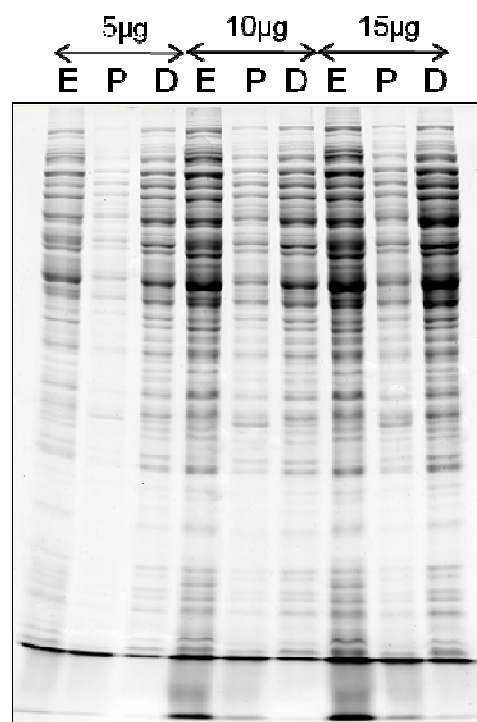
Condição de cultivo	Proteínas totais (mg/L)
Petróleo 1,3%	18,7
Diesel 1,3%	27,2
Extrato de levedura 1,3%	38

Pode-se afirmar que a quantidade de proteínas é diretamente proporcional a densidade celular. Para cada condição de crescimento no ponto de 24h, os valores de abs a 600 nm foram 0,93 para petróleo bruto, 2,55 para diesel e 2,43 para extrato de levedura. Assim, obteve-se melhor rendimento de proteínas na condição de extrato de levedura com 38mg/L, seguido pela condição de diesel com 27,2mg/L e petróleo bruto com 18,7mg/L. Estes resultados corroboram que *A. junii* SB132 tem preferência em utilizar extrato de levedura como fonte de carbono, sendo este dado esperado. No entanto, quando comparados os dois substratos de interesse (petróleo bruto e diesel), *A. junii* SB132 teve preferência em utilizar diesel.

## 5.8 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS POR ELETROFORESE

### 5.8.1 Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE)

O perfil protéico de *A. junii* cultivada em petróleo, diesel e extrato de levedura foi avaliado por eletroforese unidimensional (Figura 12).



**Figura 12. Perfil protéico de *A. junii* SB132 em SDS-PAGE.** As proteínas foram extraídas com 24h de crescimento em (E) extrato de levedura 1,3%, (P) petróleo bruto 1,3% e (D) diesel 1,3%. Avaliou-se 5, 10 e 15µg de proteínas de cada condição. O sistema de eletroforese usado foi o *Hoefler SE 600 Ruby* (*Amersham Bioscience*). O gel foi corado com Azul de Coomassie R-350 em *overnight*.

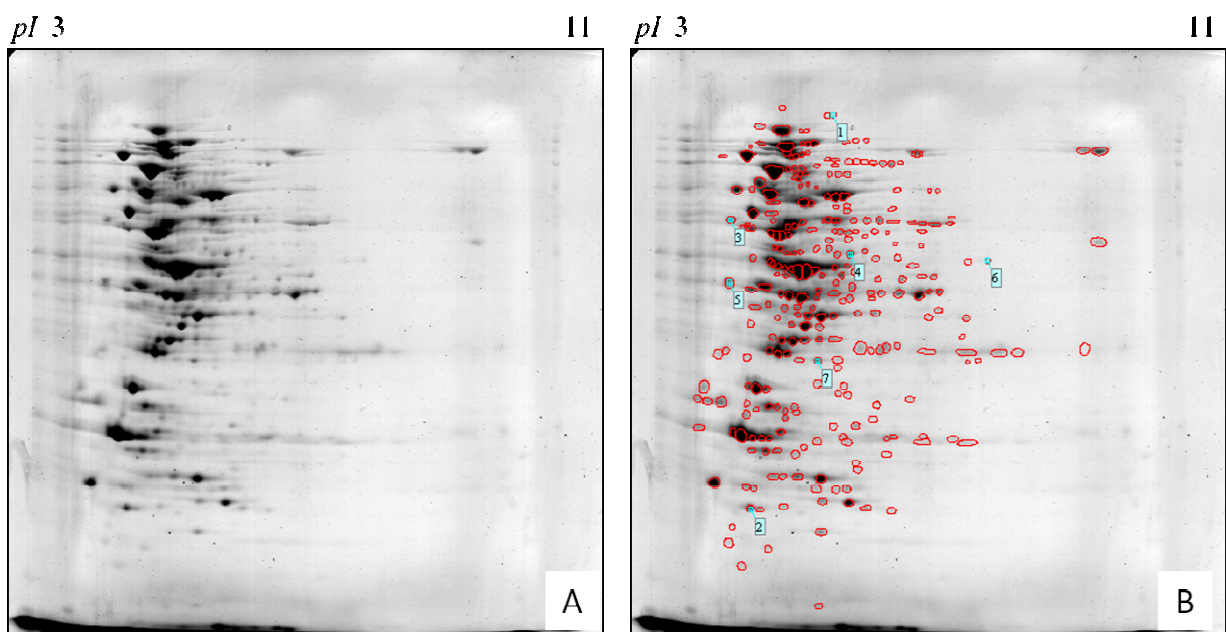
Pode-se visualizar na Figura 12 que para as três condições de cultivo (extrato de levedura, petróleo bruto e diesel) os extratos protéicos se encontram íntegros e livres de interferentes, uma vez que é possível a visualização de bandas nítidas, ao invés de arrastes. Outro aspecto importante é a diversidade de proteínas presentes, sendo que nas três condições, as proteínas de maior massa são mais abundantes. Mesmo sem a presença de um padrão de massa molecular, pela concentração do gel de poliacrilamida (12%), pode-se inferir a que a massa molecular das proteínas visualizadas varia entre 15 e 150 kDa.

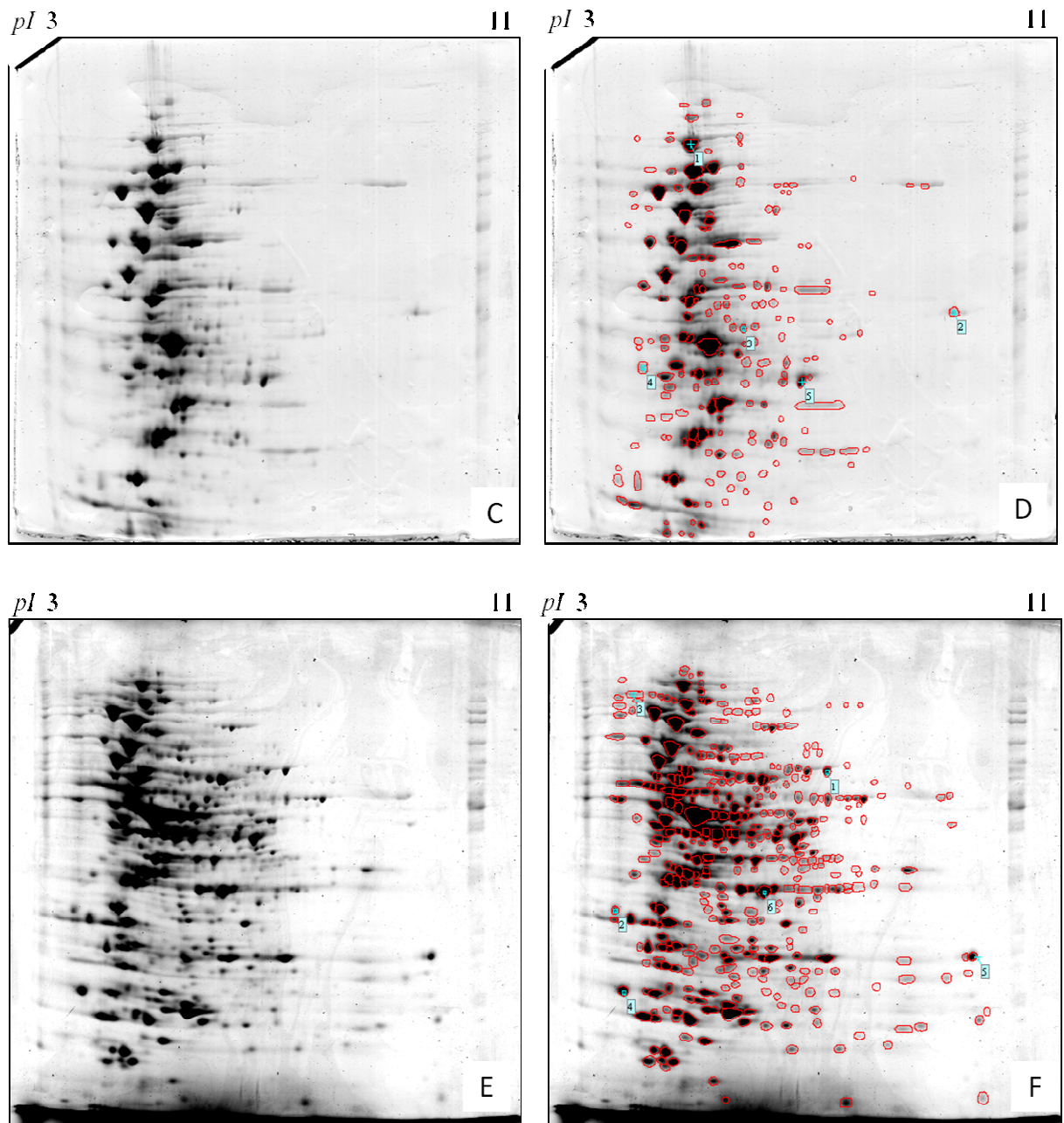
A avaliação prévia, por eletroforese unidimensional, das proteínas extraídas é importante para averiguar a qualidade da extração, bem como sua quantificação. Caso todos os parâmetros estejam dentro das conformidades, o próximo passo é avaliar a expressão de proteínas por eletroforese bidimensional.

## 5.8.2 Eletroforese bidimensional (focalização isoeétrica e SDS-PAGE)

### 5.8.2.1 Perfil proteômico nas diferentes condições de cultivo

Na Figura 13 são apresentados os resultados obtidos pela análise de proteínas de *A. junii* SB132 por eletroforese bidimensional (focalização isoeétrica e SDS-PAGE) para as três condições de cultivo, de acordo com o método descrito no item 4.10.2.





**Figura 13. Mapas proteômicos de *A. junii* SB132.** As proteínas foram extraídas com 24h de crescimento em (A-B) petróleo bruto 1,3%, (C-D) diesel 1,3% e (E-F) extrato de levedura 1,3%. À esquerda são mostrados os géis não editados e à direita os géis editados após detecção de *spots* pelo programa *Image Master Platinum*, versão 6.0 (*GE Healthcare*). Aplicou-se 250 $\mu$ g de proteínas em cada *strip* de 13 cm (3-11 NL) para a focalização isoelétrica (primeira dimensão) e o sistema usado para SDS-PAGE (segunda dimensão) foi o *Hoefler SE 600 Ruby* (*Amersham Bioscience*). O gel foi corado com azul de Comassie R-350.

Os géis bidimensionais referências na Figura 13 apresentaram similaridade superior a 70% quando comparados com outros géis da mesma condição (géis não mostrados). Os índices de similaridades obtidos foram 70,1 e 70,4% para extrato de levedura, 70,2 e 70,8% para petróleo bruto e 74,9 e 79,8% para diesel. O número de pontos protéicos marcados nos géis referência foram 400, 288 e 188, para extrato de levedura, petróleo bruto e diesel, respectivamente.

As proteínas dos géis se encontram, em sua maioria, na extremidade positiva, ou seja, pontos isoelétricos (*pI*) mais baixos. Esse perfil reflete a característica do conjunto de proteínas da bactéria estudada nesta condição (*strip* 3-11 NL), possuindo proteínas mais ácidas, uma vez que em outros estudos com bactérias do mesmo gênero, observou-se o mesmo padrão. Como exemplo, quando *Acinetobacter sp.* KS-1 foi cultivada em benzoato como única fonte de carbono, foram observados 350 *spots*, dentre estes, 200 se encontraram na extremidade positiva (Kim *et al.*, 2003). E mais, quando cultivada *A. Iwoffii* K24 em anilina como única fonte de carbono, observaram-se em gel 2-DE aproximadamente 370 *spots*, sendo que a maioria destas estavam na extremidade positiva, indicando que estas proteínas eram ácidas (Kim *et al.*, 2001).

Provavelmente os resultados seriam diferentes em relação à quantidade de proteínas se as *strips* com comprimentos maiores e faixa de *pH* maior fossem utilizadas, pois revelariam proteínas além do limite de *pI* de 3 a 11 e maior resolução das proteínas já presentes nesta condição. Além disso, proteínas menos abundantes poderiam aparecer visto que pela quantidade de proteínas usada nestes estudos nos géis 2-DE (250µg), estas proteínas menos abundantes não aparecem.

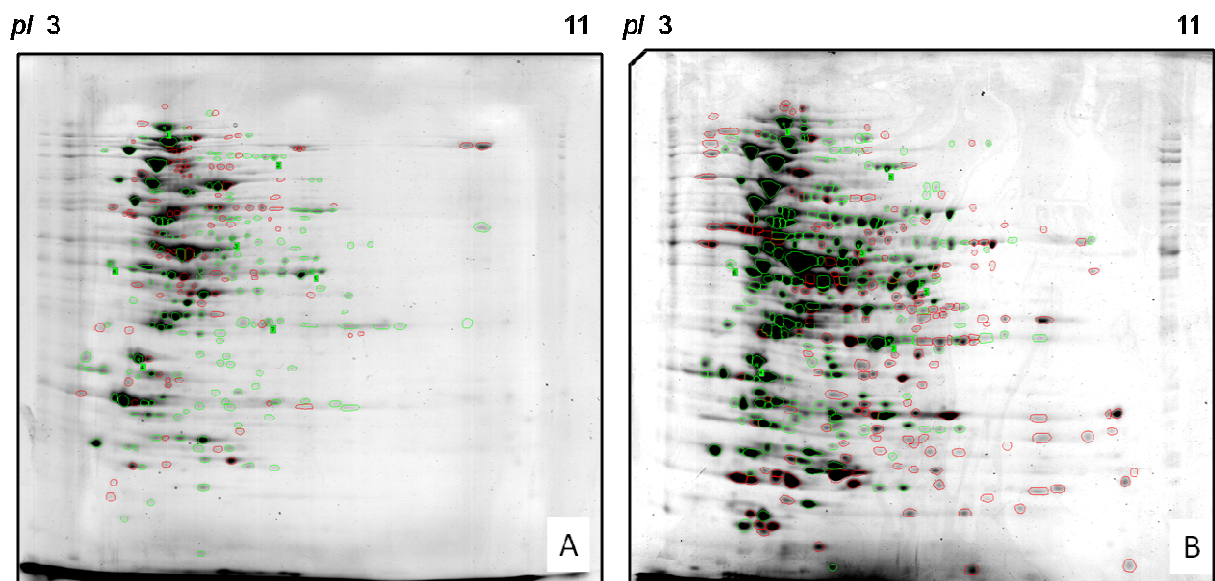
Menos pontos protéicos foram obtidos para petróleo bruto e diesel quando comparados com a condição de extrato de levedura, e este resultado pode estar relacionado com a natureza do substrato. As moléculas presentes no petróleo e diesel são majoritariamente hidrocarbonetos em série homóloga. Dessa forma, as transformações químicas que acontecem não variam muito e muitas enzimas são utilizadas em vários substratos dentro desta série, como exemplo, a hidroxilação terminal de hidrocarbonetos alifáticos por monooxigenases (Throne-Holst *et al.*, 2007). No entanto, dados do metaboloma são necessários para confirmar esta estimativa.

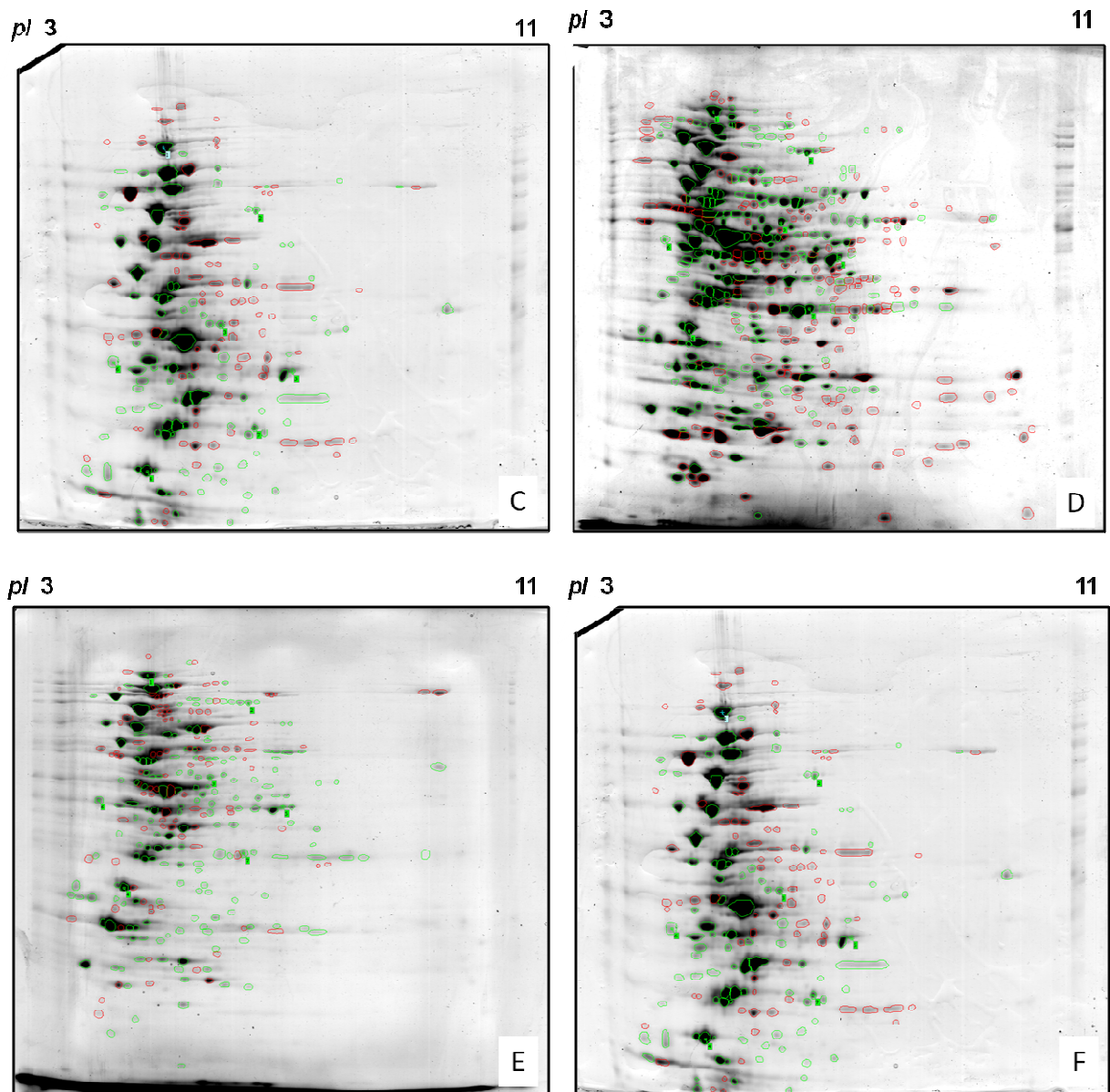


Os géis da mesma condição de cultivo (não mostrados) podem ser considerados semelhantes e podem representar, por razoabilidade, o proteoma de *A. junii* SB132. Essa razoabilidade (Gasnier, 2014) se refere à princípios teóricos, ou de experiência, que três géis são suficientes para representar o proteoma da bactéria estudada. Um maior número de géis não garante que haja validação externa da pesquisa por representatividade, mas é razoável supor que três géis satisfaçam e garantem segurança quanto aos dados obtidos.

### 5.8.2.2 Expressão diferencial nos perfis proteômicos

Na Figura 14 e Tabela 4 são apresentados os resultados obtidos da análise comparativa dos géis bidimensionais referência de *A. junii* SB132. Foram comparadas as três condições de cultivo de acordo com o método descrito no item 4.10.2.





**Figura 14. Comparação entre os mapas proteômicos de *A. junii* SB132.** Os géis foram obtidos e analisados como descrito no item 4.10.2. (A-B) comparação entre os géis da condição de cultivo em petróleo bruto e extrato de levedura. (C-D) comparação entre os géis da condição de cultivo em diesel e extrato de levedura. (E-F) comparação entre os géis da condição de cultivo em petróleo bruto e diesel. Os pontos em verde representam os *spots* que se repetem nas condições comparadas e os pontos em vermelho representam os *spots* que são específicos de cada condição. As imagens foram analisadas pelo programa *Image Master Platinum*, versão 6.0 (*GE Healthcare*).

**Tabela 4. Análise de similaridade dos mapas proteômicos de *A. junii* SB132.** Os valores foram obtidos utilizando-se o software *Image Master Platinum 6.0* a partir dos géis referência comparados na Figura 14. Na tabela estão indicadas as condições de cultivo e a porcentagem de similaridade entre elas.

<b>Condições</b>	<b>Petróleo bruto 1,3%</b>	<b>Diesel 1,3%</b>
<b>Extrato de levedura 1,3%</b>	52,9%	35,0%
<b>Petróleo bruto 1.3%</b>	-	46,2%

Na Figura 14 e a Tabela 4 são mostradas as similaridades entre as condições de cultivo na qual apresentaram valores abaixo 70%. Com um índice de similaridade de 52,9% entre géis da condição de extrato de levedura e petróleo bruto, estes apresentaram 182 *spots* comuns, 235 *spots* presentes somente na condição de extrato de levedura e 121 *spots* presentes somente na condição de petróleo bruto. Com um índice de similaridade de 35,0% entre géis da condição de extrato de levedura e diesel, estes apresentaram 103 *spots* comuns, 102 *spots* somente da condição de diesel e 314 *spots* somente da condição de extrato de levedura. Com um índice de similaridade de 46,2% entre géis da condição de petróleo bruto e diesel, estes apresentaram 110 *spots* comuns, 193 *spots* somente da condição de petróleo bruto e 95 *spots* somente da condição em diesel.

Nos géis analisados, pontos protéicos específicos indicam proteínas diferencialmente expressas. O seu estudo é importante por representarem potenciais participantes no processo de biodegradação de xenobióticos. Somado a isso, vias associadas às adaptações da bactéria para crescimento no meio utilizado (petróleo, diesel ou extrato de levedura) também podem ser reveladas pela identificação dos pontos protéicos exclusivos.

Pontos protéicos comuns a todas as condições são importantes, pois revelam proteínas expressas por genes constitutivos (mantenedores). Estas são proteínas que participam de vias metabólicas essenciais, ou de rotina a qualquer fonte de carbono, como por exemplo, a via glicolítica ou o ciclo de Krebs. Portanto, a presença destas enzimas é esperada.

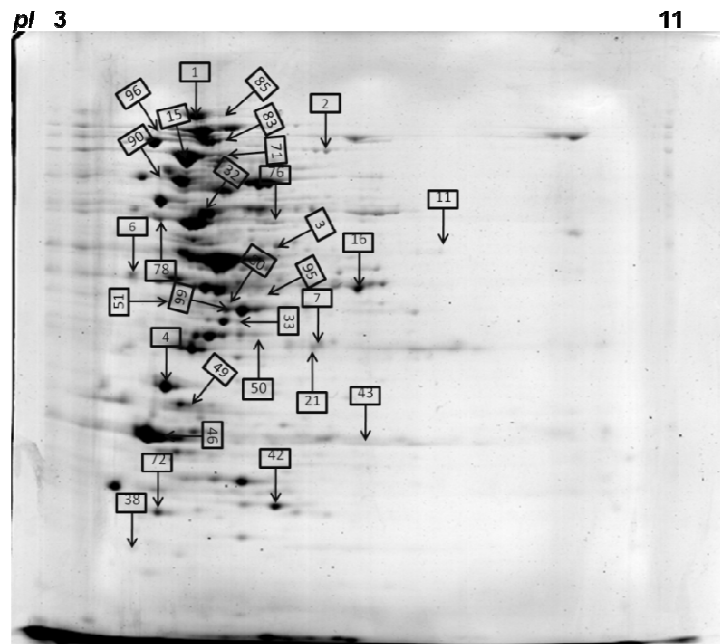
## 5.9 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

A fim de induzir a expressão diferencial de proteínas, *A. junii* SB132 foi cultivada em petróleo bruto, diesel e extrato de levedura separadamente como únicas fontes de carbono. A análise comparativa dos géis 2-DE foram realizadas para as três condições de cultivo (Figura 14). Mesmo que uma grande quantidade de proteínas tenha sido observada em gel, obteve-se apenas resultados de uma pequena quantidade *spots*, conseqüentemente uma pequena quantidade de proteínas fora identificada por espectrometria de massa e por análise em banco de dados (Tabela 6, 7 e 8). Na Tabela 5 são apresentados os *spots* selecionados para recortes dos géis de acordo com o método descrito no item 4.11.1.

**Tabela 5. *Spots* selecionados para análise por espectrometria de massa.** Foram selecionados *spots* comuns a todas as condições, *spots* presentes na condição de petróleo bruto e diesel, e *spots* presentes somente na condição de petróleo bruto. Os números indicam a identificação dos *spots* no gel e estes foram recortados com uma ponteira P1000. Foi utilizado somente o gel referência da condição crescimento em petróleo bruto.

<b>Petróleo bruto</b>	<b>Petróleo bruto / Diesel</b>	<b>Petróleo bruto / Diesel / Extrato de levedura</b>
37-100	17-36	1-16

Dos 100 *spots* selecionados para identificação por espectrometria de massa, foram obtidos resultados conclusivos de 30. Entre estes, 15 *spots* tiveram seus resultados como proteínas hipotéticas e os 15 restantes como proteínas putativas. Dentre todas as proteínas putativas identificadas, 4 foram detectadas em todas as condições de cultivo, 3 foram detectadas somente na condição de petróleo bruto e diesel, e 8 foram exclusiva da condição de petróleo como fonte de carbono (Figura 15). Proteínas hipotéticas são aquelas que foram determinadas computacionalmente, ou seja, são preditas por ferramentas de identificação de genes durante a análise do genoma, mas sua função e papel biológico não foram determinados (Rambabu *et al.*, 2012).



**Figura 15. Spots analisados por espectrometria de massa.** Os números indicam *spots* no gel 2-DE referência da condição de crescimento em petróleo bruto. O recorte foi feito manualmente usando ponteira P1000. As proteínas foram tripsinizadas e analisadas em espectrômetro de massa e no programa Mascot (*Matrix Science*) pela ferramenta PMF (*peptide mass fingerprinting*).

Os estudos proteômicos associados à biorremediação são importantes porque podem mostrar a resposta celular global das bactérias frente a determinado poluente. Diversas bactérias são estudadas, entre as mais importantes são as *Pseudomonas spp.* Estas bactérias mesmo tendo representantes que são conhecidas como patógenos oportunistas, possuem representantes com grande potencial para biodegradação (Kim *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2005). Da mesma forma, *Acinetobacter spp.* são descritas como uma das principais biodegradadoras de *n*-alcanos do grupo de Gram-negativas (Abdel-El-Haleem, 2003).

Proteínas provenientes de *spots* comuns em todas as condições, presentes somente na condição de petróleo bruto e diesel, e presentes somente na condição de petróleo bruto (Tabela 6, 7 e 8) foram identificadas e suas funções celulares e moleculares foram dadas (itens 5.4.1, 5.4.2 e 5.4.3).

**Tabela 6. Proteínas identificadas de spots comuns as condições de cultivo em petróleo bruto, diesel e extrato de levedura (constitutivas).**

n°	Spot	Quantidade total de íons	Íons processados	Íons combinados (matched)	Proteína putativa	Taxonomia	Cobertura (%)	NCBI nr	Score	Mr	pI teórico	pI experimental	Função celular
1	1	11	6	6	Domínio de proteína Rieske	<i>Bordetella holmesii</i> 35009	16	gi 585211633	67	43609	5,15	4,9	Metabolismo de compostos aromáticos
2	2	3	2	2	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter baumannii</i> 1178044	27	gi 589417156	36	5799	4,18	6,6	
3	3	8	7	6	MULTISPECIES: eritronato-4-fosfato desidrogenase	<i>Pseudomonas</i> sp.	18	gi 517755102	60	41811	4,92	6	Biossíntese de piridoxina
4	4	29	25	8	Proteína hipotética	<i>Polaromonas</i> sp. CF318	65	gi 495142791	68	22117	9,45	4,5	
5	6	18	15	9	3-hidroxicetona-[acil-proteína - transportadora] desidratase	<i>Gilliamella apicola</i>	24	gi 597810687	60	19589	7,1	4,1	Biossíntese de ácidos graxos
6	7	8	8	6	Proteína hipotética	<i>Thioalkalivibrio</i> sp. ALJ24	28	gi 517765186	58	19961	4,34	6,5	
7	11	23	20	15	Proteína hipotética	<i>delta proteobacterium</i> PSCGC 5342	12	gi 654513613	73	77778	9,11	8,1	
8	15	14	11	8	Proteína de reparo de DNA mutT	<i>Rhizobium</i> sp. CCGE 510	24	gi 494908545	59	20284	9,87	4,8	Mecanismos de reparo do DNA
9	16	17	13	8	Proteína hipotética	<i>Pseudomonas savastanoi</i>	40	gi 488616946	67	12024	6,9	7	

**Tabela 7. Proteínas identificadas de spots presentes nas condições de cultivo em petróleo bruto e diesel (diferenciais).**

n°	Spot	Quantidade total de íons	Íons processados	Íons combinados (matched)	Proteína putativa	Taxonomia	Cobertura (%)	NCBI nr	Score	Mr	pI teórico	pI experimental	Função celular
10	21	14	12	8	Família de proteínas glicosiltransferase	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>punicae</i> str. LMG 859	21	gi 372553304	67	29078	8,72	6,4	Biossíntese de carboidratos
11	32	19	16	12	Proteína quinase	<i>Morganella morganii</i>	20	gi 701206914	75	40485	8,67	5,1	Sinalização celular
12	33	8	7	6	Pirrolina-5-carboxilato redutase	<i>Rhodobacteraceae bacterium</i> KLH11	38	gi 496032829	68	9431	4,83	5,5	Metabolismo de aminoácidos

Tabela 8. Proteínas identificadas de spots presentes nas condições de cultivo em petróleo bruto e diesel (diferenciais).

n°	Spot	Quantidade total de íons	Íons processados	Íons combinados (matched)	Proteína putativa	Taxonomia	Cobertura (%)	NCBINr	Score	Mr	pl teórico	pl experimental	Função celular
13	38	16	14	5	4-oxalocrotonate tautomerase	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 375	34	gi 496319036	51	8402	5,71	4	Metabolismo de xenobióticos
14	42	14	12	8	Família de proteínas associadas a CRISPR	<i>Acinetobacter baumannii</i> 983759	14	gi 588137226	59	39879	7,68	6	Mecanismo de defesa
15	43	12	10	6	Proteína hipotética	<i>Burkholderia pseudomallei</i> MSHR338	65	gi 529453182	63	4589	8,2	7,1	
16	46	13	10	8	Serine-tRNA ligase	<i>Candidatus Accumulibacter</i> sp. SK-02	12	gi 668682954	62	48194	5,82	4,5	
17	49	12	10	6	Proteína hipotética	<i>Methylomarinum vadi</i>	38	gi 670486936	59	9881	9,69	4,9	
18	50	11	8	8	23S rRNA pseudouridylate synthase C	<i>Halomonas boliviensis</i>	17	gi 494176346	70	35504	10,12	5,8	Metabolismo de RNA
19	51	11	10	8	Serina peptidase	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10	gi 489276655	60	50716	5,82	4,6	Metabolismo das proteínas
20	71	12	11	9	Transdutor de energia TonB	<i>Methylosarcina lacus</i>	21	gi 635649973	72	33737	9,31	5,3	Proteínas de membrana tansdutora de sinais
21	72	30	27	14	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter parvus</i>	57	gi 490814253	73	12679	10,19	4,4	
22	76	12	11	5	Proteína hipotética	<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM471	39	gi 494884538	57	7753	6,06	6	
23	78	8	7	5	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	36	gi 490861904	54	7105	5,3	4,4	
24	80	16	14	11	MULTISPECIES: acil-CoA desidrogenase	<i>Ralstonia</i>	21	gi 502317623	69	47086	6,74	5,4	Metabolismo de lipideos
25	83	15	13	7	Família de reguladores transcricionais Crp/Fnr	<i>Sphingobium</i> sp. Ant17	25	gi 593809235	53	27355	6,9	5,3	Fatores de trascrição
26	85	21	19	9	Proteína hipotética	<i>Aeromonas</i> sp. 4287D	41	gi 696656920	65	12004	5,5	5,3	
27	90	15	13	8	Proteína hipotética	<i>Pseudomonas amygdali</i>	30	gi 492084080	62	23481	9,18	4,4	
28	95	14	13	8	Proteína hipotética	<i>Aeromonas</i> sp. AE235	28	gi 696630635	60	25274	11,62	5,8	
29	96	4	4	4	Proteína hipotética	<i>Pantoea</i> sp. GM01	27	gi 495163406	56	10338	8,04	4,4	
30	99	18	16	7	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter bouvetii</i>	43	gi 491149639	49	16783	6,41	5,3	

### 5.9.1 Proteínas detectadas em todas as condições de cultivo

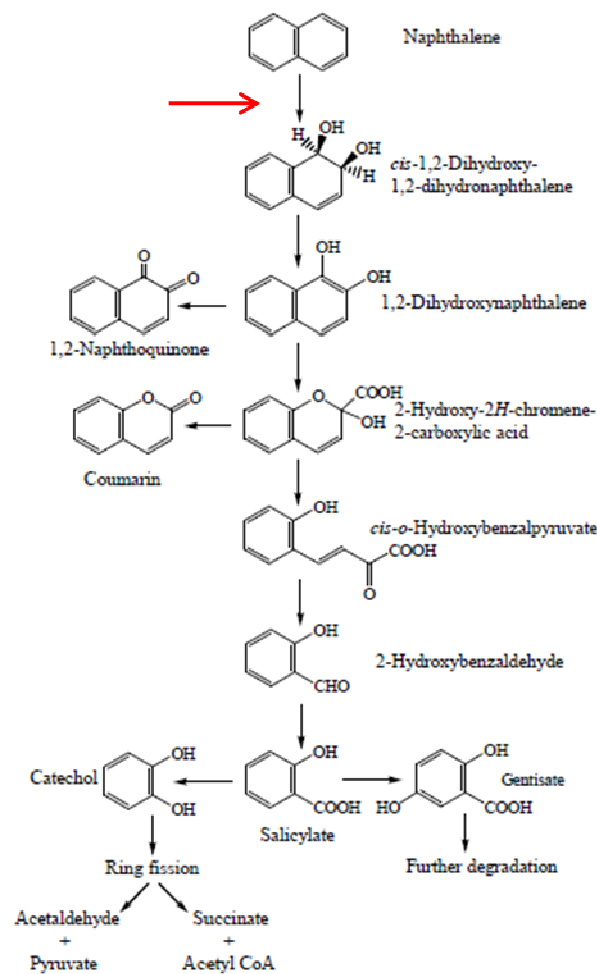
#### a) Dominio catalítico da proteína Rieske

A degradação de hidrocarbonetos aromáticos é realizada por um conjunto de enzimas na qual seus produtos são utilizados como fonte de carbono e energia. Dentre estas, as Rieske são uma família de enzimas importantes envolvidas na degradação desses compostos, como benzoato, benzeno, tolueno, fitalato, naftaleno e bifenil. As enzimas Rieske usualmente catalisam a incorporação de dois átomos de oxigênio no anel aromático para formar areno-*cis*-diidrodiol, seguido de uma reação de desidrogenação usualmente catalisada por uma outra enzima, a *cis*-diidrodiol desidrogenase (Pérez-Pantoja *et al.*, 2009).

As enzimas Rieske possuem um alto potencial de redução e são majoritariamente dependente de NADH. As reações que catalisam são a *cis*-hidroxilação, clivagem de anel aromático e hidroperoxidação. Os substratos variam de arenos (tolueno, naftaleno) a carboxilatos (benzoato e fitalato). Estas enzimas incluem as dioxigenases que clivam anéis aromáticos, tais como as catecol dioxigenases, que incorporam ambos os átomos do oxigênio molecular em carbonos adjacentes gerando *cis*-diidrodiol que poderá ser mais oxidado pela clivagem do anel aromático e produtos que servirão como fonte de carbono e energia no ciclo de Krebs (Burton, 2003).

Abaixo é mostrado a via metabólica de degradação de naftaleno, um composto modelo utilizado em estudos de biodegradação (Figura 16). Na via metabólica mostrada, a naftaleno dioxigenase atua na primeira etapa de conversão do naftaleno para *cis*-(1R, 2S)-diidroxí-1,2-diidronaftaleno. Outras enzimas estão envolvidas no processo de degradação, cada uma realizando suas reações específicas até que surjam intermediários que serão utilizados como fonte de carbono e energia.



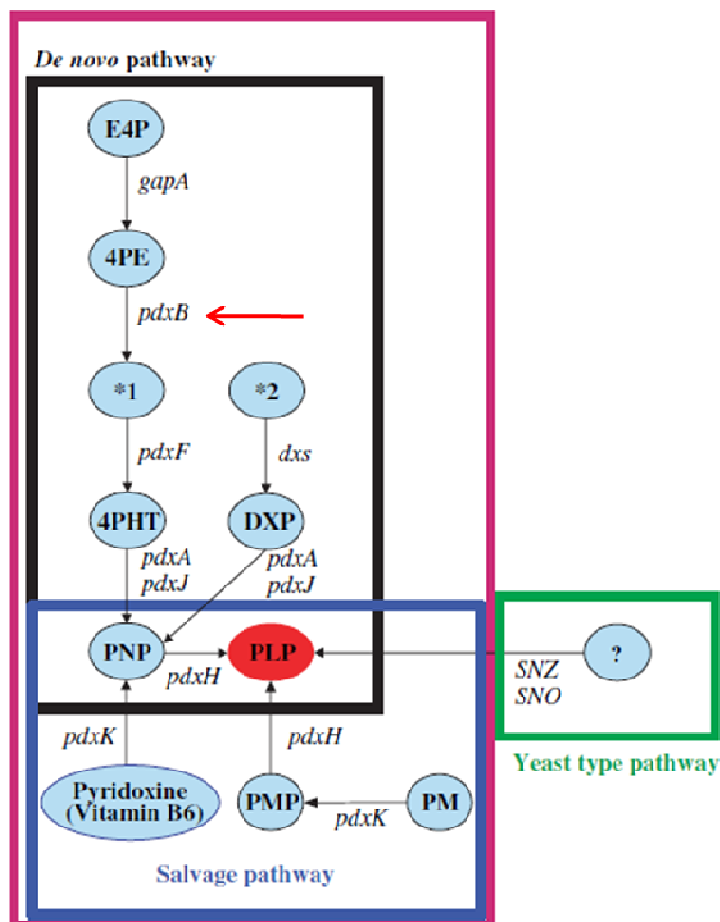


**Figura 16. Via catabólica proposta para degradação de Naftaleno em bactéria.** A naftaleno dioxigenase (pertencente a família Rieske) inicia a via atacando o anel aromático para formar *cis*-(1R, 2S)-dihydroxy-1,2-dihydronaphthalene. A seta vermelha indica a reação que a enzima catalisa (Reproduzido de Seo *et al.*, 2009).

É importante destacar que nesta pesquisa apenas o domínio Rieske foi identificado, visto que estas enzimas são multicomponentes, possuindo outros domínios com funções de transportadores de elétrons (Pérez-Pantoja *et al.*, 2009). Além disso, o fato de domínio catalítico Rieske ter sido identificado nas três condições de cultivo indica que ela é expressa constitutivamente. Estudos para verificação da atividade enzimática desta proteína deverão ser realizados, afim de confirmar sua expressão pela *A. junii* SB132. Métodos de genética molecular poderão ser empregados associados aos métodos bioquímicos para caracterização da sua atividade.

## b) Proteína eritronato-4-fosfato desidrogenase

A eritronato-4-fosfato desidrogenase é uma enzima que participa da biossíntese de piridoxina, a forma ativa da vitamina B6. Foram descritas três vias para biossíntese de piridoxina em bactérias e fungos. Na *Escherichia coli* foram descritas duas vias: a via *de novo* e a via de salvamento. Estas duas vias codificadas por dez genes, compartilham apenas um gene (*pdxH*). Na via *de novo* o anel da piridina é gerado a partir do D-eritrose-4-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato. Por outro lado, a via de salvamento a piridoxina é gerada sem o anel de piridina. Uma outra via pouco descrita está presente apenas em fungos (Tanaka *et al.*, 2005) (Figura 17).



Pathways discovered in bacteria Pathway discovered in yeast

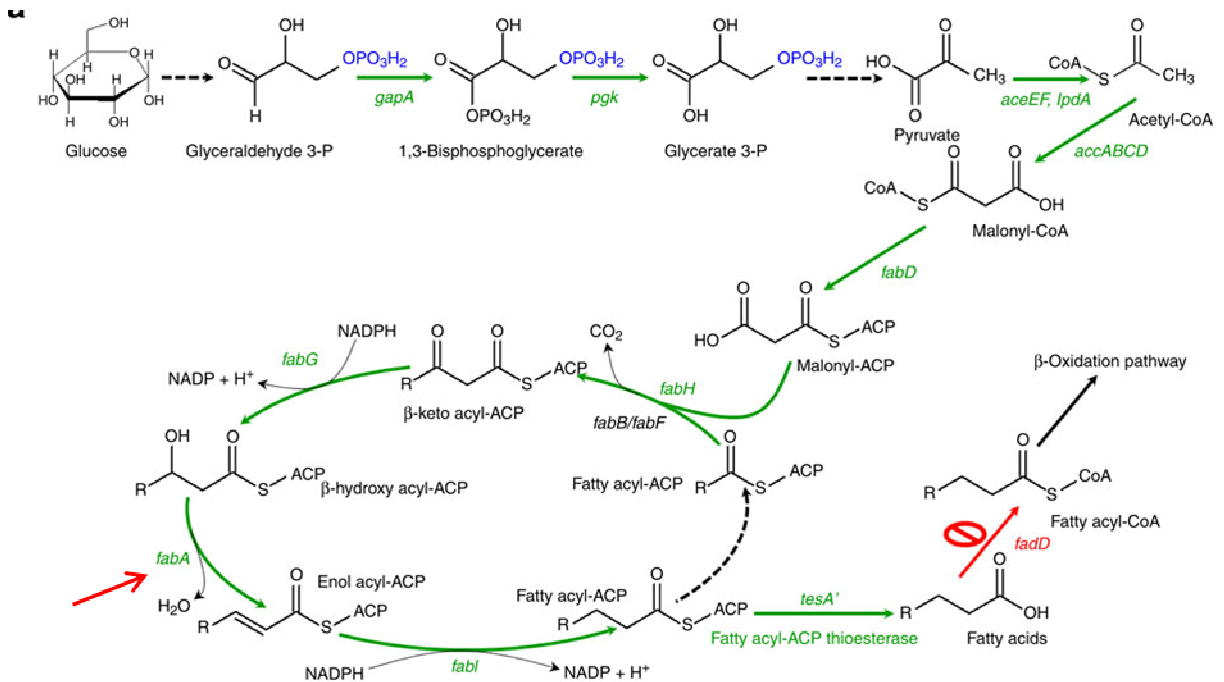
**Figura 17. Vias de biossíntese de piridoxina.** Os círculos indicam os substratos. Piridoxina é a forma ativa da vitamina B6. 1\* indica 3-hidroxi-4-fosfohidroxia-cetobutirato; 2\* indica gliceraldeído-3-phosphate. O gene *pdxB* (seta vermelha) codifica para a enzima eritronato-4-fosfato desidrogenase que converte eritronato-4-fosfato a 3-hidroxi-4-fosfohidroxia-cetobutirato (Reproduzido de Tanaka *et al.*, 2005).

Esta proteína pertence a família de enzimas Pdx (PdxA, PdxB, PdxF, PdxH, PdxJ e GapB) que em bactérias está restrita a classe das  $\gamma$ -proteobactéria e estão envolvidas na síntese de piridoxal-5'-fosfato (piridoxina), a forma ativa da vitamina B6. Esta enzima é codificada pelo gene *pdxB* e pertence à superfamília 2-hidroxiácido desidrogenase específica para D-isômeros. Em uma das etapas na biossíntese de vitamina B6, o eritronato-4-fosfato (4PE) é transformado em 4-hidroxi-L-treonina-4-fosfato (4PHT) pelas enzima eritronato-4-fosfato desidrogenase (PdxB) e fosfoserina aminotransferase (PdxF/SerC) (Ha *et al.*, 2006).

A vitamina B6 é essencial para organismos vivos, pois são utilizadas por muitas enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos e aminoácidos. Esta vitamina também desempenha um papel contra fotosensibilização em fungos. A maioria dos organismos unicelulares e plantas sintetizam esta vitamina (Tanaka *et al.*, 2005). A presença desta enzima indica que a bactéria está produzindo esta vitamina durante seu crescimento nas três condições de cultivo (petróleo bruto, diesel e extrato de levedura).

### **c) 3-hidroxidecanoil-[acil-proteína-transportadora] desidratase**

A biossíntese e a oxidação de lipídeos ocorrem por vias totalmente distintas e são catalisadas por conjuntos diferentes de enzimas. No entanto, as sequências de reações enzimáticas para biossíntese é a mesma em procariotos e em eucariotos. Durante as etapas, logo após a condensação e redução do grupo carbonila, uma enzima chamada  $\beta$ -hidroxiacil-ACP desidratase catalisa uma reação de desidratação que resulta em dupla ligação. Esta dupla ligação será posteriormente reduzida para continuar o processo de biossíntese de ácidos graxos em quatro passos (Nelson e Cox, 2002) (Figura 18).



**Figura 18. Via biossintética de ácidos graxos.** A enzima  $\beta$ -hidroxiacil-ACP desidratase (seta vermelha a esquerda da imagem e análoga a 3-hidroxi-decanoil-[acil-proteína-transportadora] desidratase) catalisa a reação de desidratação de  $\beta$ -hidroxiacil-ACP para enol acil-ACP, gerando uma ligação insaturada (reproduzido de Xu *et al.*, 2013).

Dessa forma, 3-hidroxi-decanoil-[acil-proteína-transportadora] desidratase é uma enzima análoga a  $\beta$ -hidroxiacil-ACP desidratase. Esta enzima é necessária para a introdução de insaturação *cis* em ácidos graxos. Catalisa a desidratação de (3R)-3-hidroxi-decanoil-ACP para E-(2)-decanoil-ACP e então sua isomerização a Z-(3)-decanoil-ACP. Pode catalisar a reação de desidratação de  $\beta$ -hidroxiacil-ACPs com comprimento de cadeia saturada de até 16:0, sendo mais ativa em cadeia de comprimento intermediário. É inativa na desidratação de longas cadeias insaturadas  $\beta$ -hidroxiacil-ACP (<http://www.uniprot.org/uniprot/P0A6Q3>).

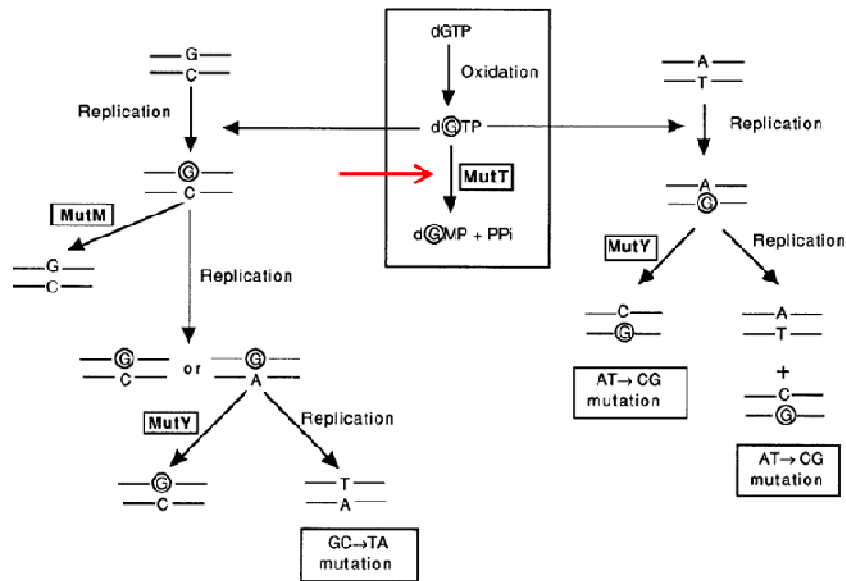
De maneira hipotética, pode-se inferir por dados da literatura que a fonte de carbono necessária para a biossintese de lipídeos poderá ser os *n*-alcanos e os carboidratos presentes nas amostras (Wentzel *et al.*, 2007; Nelson e Cox, 2002). Os *n*-alcanos fornecem moléculas de acil-CoA que poderão ser convertidos em malonil-CoA, sendo estes últimos utilizados na biossintese de lipídeos como mostrado na Figura 18.

Por ser uma proteína do metabolismo constitutivo, esta enzima desempenha funções acopladas ao crescimento celular. A biossíntese de membrana celular é necessária para acompanhar com crescimento celular durante as divisões celulares. Por isso, esta enzima foi encontrada em células cultivadas nas três condições de cultivo.

#### **d) Proteína de reparo *mutT***

O maior requerimento para as células é replicar seu DNA com alta fidelidade. Para isto, as células possuem uma grande parcela de genes envolvidos nestes mecanismos de fidelidade. A principal abordagem para estudar a participação de genes neste processo é estudar os genes mutadores. Os genes mutadores são aqueles em que seu produto é parte de um sistema de reparo. Logo, uma mutação que retire a função deste gene, interfere nos mecanismos de reparo do DNA. Nesta classificação, o gene *mutT* é considerado como um gene mutador .

A proteína *mutT* descrita para *E. coli* é uma importante participante em evitar erros na replicação do DNA. Um alelo *mutT* inativo gera uma especificidade mutacional: mutações de transverso (A-T para C-G) são aumentadas. O papel biológico da proteína *mutT* é prevenir o pareamento inadequado entre A-G durante a replicação, especificamente o pareamento errado entre uma base A com uma forma oxidada da guanina, 8-oxoguanina, que resulta quando a forma oxidada está disponível para a DNA polimerase. *MutT* é parte de um elaborado sistema de defesa que protege contra os efeitos mutagênicos de guaninas oxidadas (Fowler e Schaaper, 1997)(Figura 19).



**Figura 19. Ação da proteína mutT na fidelidade da replicação do DNA.** A 8-oxoguanina formada por oxidação da guanina, pode parear com a base timina na primeira replicação. Na segunda replicação, a 8-oxoguanina inserida para com citosina (mutação de transversão) ou timina. A proteína mutT está indicada pela seta vermelha (reproduzido de Fowler e Schaaper, 1997).

A manutenção da informação genética é crucial durante os processo de replicação. Desta forma, a proteína mutT poderá ser expressa constitutivamente em função do seu papel de proteção do DNA. Logo, o cultivo em qualquer condição de crescimento pode não afetar tal expressão, podendo esta expressão ser afetada por outros fatores que estejam atuando sobre as três condições de cultivo, como temperatura, vibração, entre outros.

## 5.9.2 Proteínas detectadas somente nas condições de cultivo em petróleo bruto e diesel

### a) Glicosiltransferases 25 família de proteínas

As glicosiltransferases são enzimas que catalisam a transferência de grupamentos açúcar para formar as ligações glicosídicas, sendo enzimas centrais na biossíntese de dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Glicosiltransferases podem ser classificadas como enzimas de retenção ou de inversão de acordo com a estereoquímica do substrato e o produto da reação. Por analogia com as glicosidases, existem dois principais resultados estereoquímicos

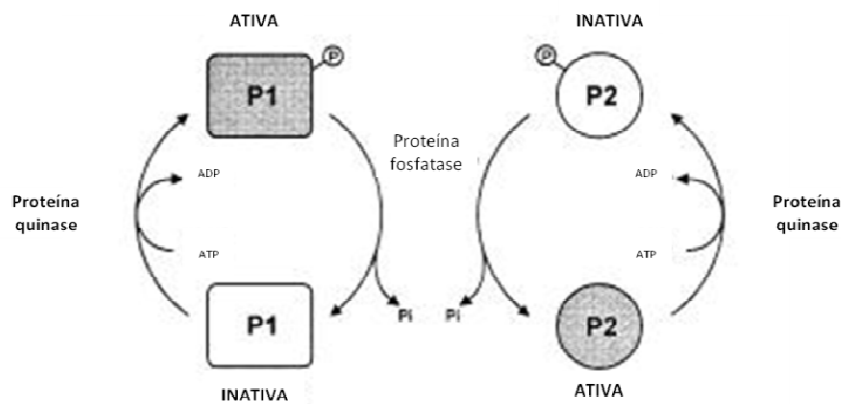
para glicosiltransferase: inversão da configuração anomérica ou retenção da configuração anomérica (Carbohydrate Active Enzyme - <http://www.cazy.org/GlycosylTransferases.html>).

Inicialmente o processo de glicosilação estava restrito aos eucariotos no processo de glicosilação de proteínas alterando assim a resistência proteolítica, solubilidade de proteínas, estabilidade, estrutura local e imunogenicidade. Hoje sabe-se que o processo de glicosilação também está presente nos procaríotos e já está sendo estudado, principalmente em *Campylobacter jejuni*. Estas proteínas glicosiladas em bactérias normalmente são proteínas secretadas, ou proteínas de superfície, sendo estas envolvidas com as interações entre as bactérias e interações das bactérias com o ambiente (Tabish *et al.*, 2011).

O processo de glicosilação bacteriana (tais como biossíntese de glicolipídeos, glicoproteínas e polissacarídeos) tem sido estudado extensivamente, mesmo que a maioria ainda permanece pouco caracterizada (Zhu *et al.*, 2013).

## b) Proteína quinase

Estas proteínas são enzimas que catalisam a reação de fosforilação de proteínas pela transferência de um grupo fosforila de ATP para treonina, serina ou tirosina. Estes efeitos de fosforilação são responsáveis por estímulos extracelulares e intracelulares, que fornecem um mecanismo altamente eficiente para o controle da atividade de proteínas (Silva *et al.*, 2009) (Figura 20).

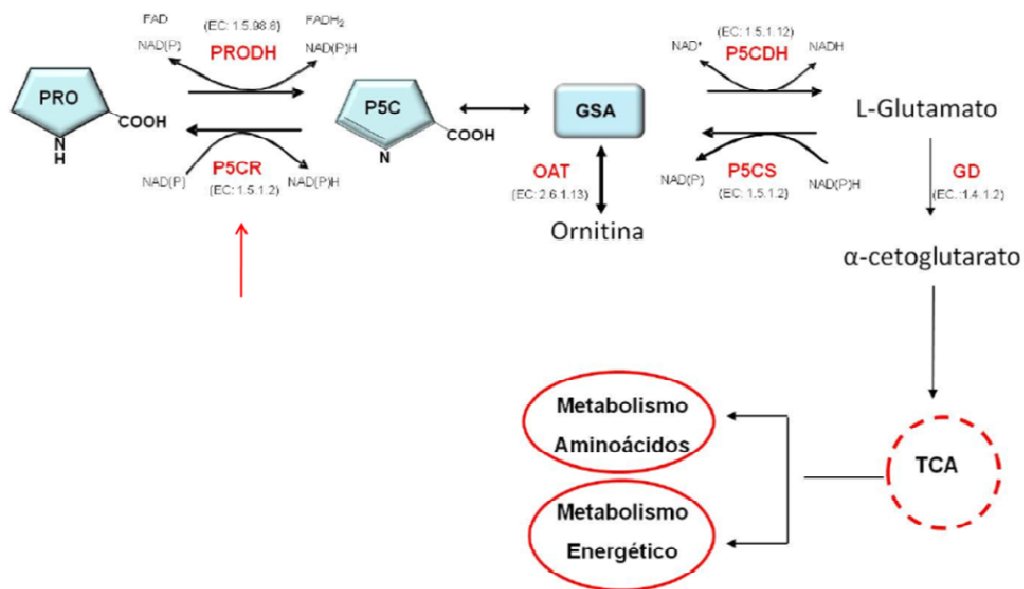


**Figura 20. Regulação da atividade de proteínas via transferência de grupo fosfato por proteína quinase.** De acordo com a proteína alvo, a fosforilação pode ativar ou inativar sua função. No caso da P1, sua função é ativada, no caso da P2 sua função é inativada (reproduzido de Duarte, 2010).

A fosforilação de proteínas promove um dos principais meio de transdução de sinais celulares, e como tal, tem sido utilizado pela maioria dos organismos de todo os domínios da vida. Pesquisas extensivas tem sido realizadas para descobrir a existência de uma localização específica de sítios de fosforilação de proteínas como uma maneira de entender a função e a regulação protéica (Chou *et al.*, 2012).

### c) Pirrolina-5-carboxilato redutase

Esta é uma enzima mantenedora que catalisa a última etapa da biossíntese de prolina. Pode utilizar NAD e NADP, mas tem alta afinidade por NAD (<http://www.uniprot.org/uniprot/P32322>) (Figura 21).



**Figura 21. Representação esquemática do metabolismo do L-triptofano.** A pirrolina-5-carboxilato (P5C) pode ser convertida espontaneamente em glutamato semialdeído (GSA). A P5C é reduzida a prolina (PRO) pela pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR) e GSA é convertida em glutamato pela pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (P5CDH). Alternativamente GSA pode ser convertida em ornitina pela ornitina aminotransferase (OAT) e participa das reações do ciclo da ureia. A seta vermelha indica a pirrolina-5-carboxilato redutase (reproduzido de Vieira, 2010).

A biossíntese de prolina tem duas rotas de formação. A primeira envolve dois passos enzimáticos, a primeira realizada em bactérias pela  $\gamma$ -glutamil quinase e  $\gamma$ -glutamil fosfato redutase sobre a glutamato. Estas duas enzimas estão fusinadas nas plantas e animais, chamada pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CS). Em

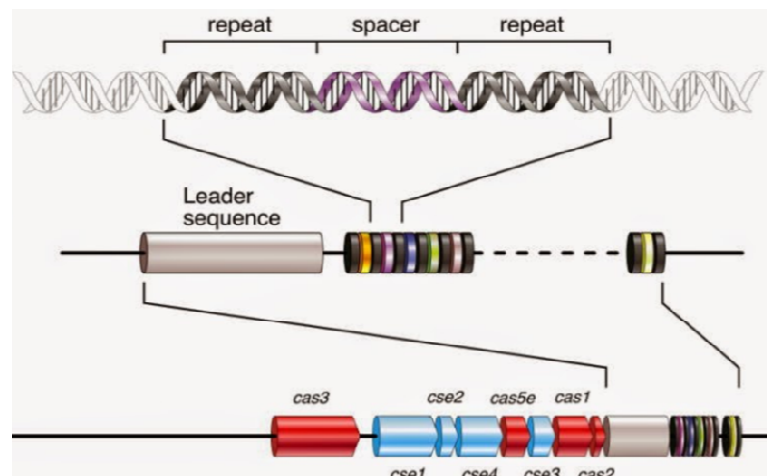


bactérias, na primeira reação surge o  $\gamma$ -glutamil fosfato e na segunda reação surge a glutamato semi-aldeído (GSA). A outra rota de biossíntese de prolina inicia com a onitina até GSA pela enzima onitina aminotransferase, enzima dependente de piridoxal-5-fosfato (piridoxina) (Vieira, 2010).

### 5.9.3 Proteínas detectadas somente na condição de cultivo em petróleo bruto

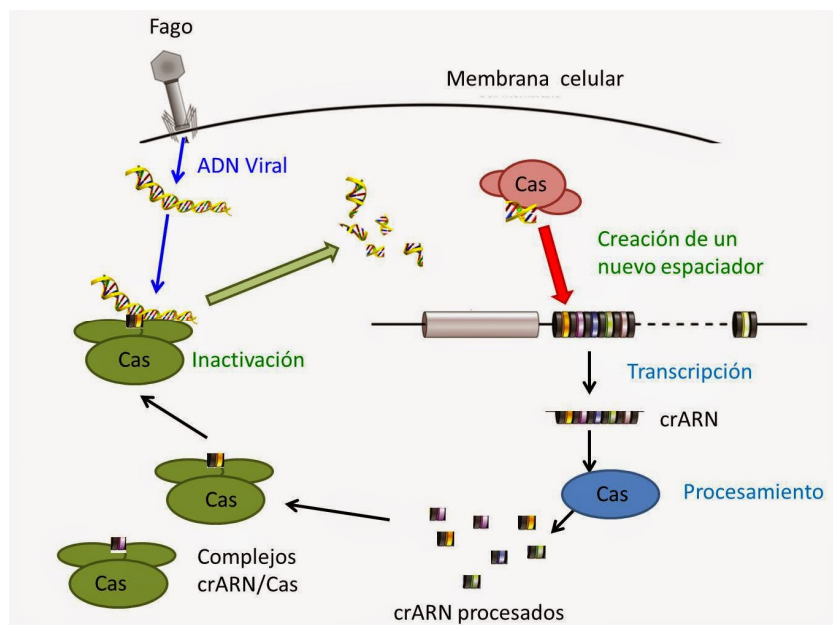
#### a) Família de proteínas associadas a CRISPR

O sistema CRISPR-Cas é um mecanismo de defesa em procarionotos contra elementos genéticos estranhos. Os elementos chave deste mecanismo de defesa são as proteínas Cas e o CRISPR RNA. As repetições palindrômicas curtas interspaçadas agrupadas regularmente (CRISPR) são uma família de repetições direta no DNA separadas por sequências espaçadoras não repetitivas que são encontradas na maioria dos genomas de bactérias e arqueas. Este mecanismos de defesa parecem oferecer resistência contra elementos genéticos móveis (vírus, elementos transponíveis e plasmídeos conjugativos). O agrupamento de CRISPR contém sequências complementares a antecedentes de elementos móveis e sequências de DNA-alvo invasoras. Estes agrupamento é transcrito e processado em CRISPR RNA (crRNA) (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR021124>) (Figura 22).



**Figura 22. Estrutura do locus CRISPR.** As sequências palindrômicas repetidas estão intercaladas por sequências espaçadoras. O número destas sequências espaçadoras pode variar muito com a cepa bacteriana da mesma espécie. A sequência líder se encontra a 400pb à frente do locus CRISPR. À frente também se encontram os genes para proteínas Cas (reproduzido de Karginov e Hannon, 2010).

A reação de defesa envolvendo CRISPR é dividida em três estágios: o primeiro, o estágio de adaptação, o DNA invasor é clivado e um fragmento é selecionado para ser integrado em um novo espaço no *locus* CRISPR, onde é estocado como uma sequência idêntica para futuros ataques por este invasor. No segundo estágio, o estágio de expressão, o CRISPR RNA (pré-RNA) é processado para gerar os crRNAs maduros. O terceiro estágio, o estágio de interferência, proteína Cas, junto com crRNAs, identificam e degradam o invasor (Brendel *et al.*, 2014) (Figura 23).

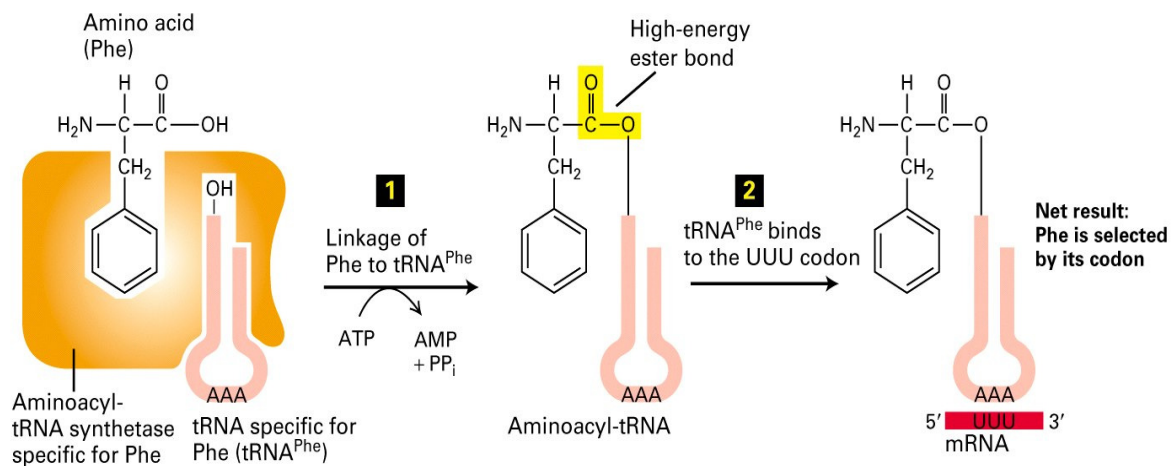


**Figura 23. Funcionamento do sistema CRISPR.** Um vírus introduz seu DNA na bactéria. Esse DNA é ligado a um complexo entre Cas e um pequeno crRNA. Esta união inativa o DNA viral e assim é degradado. Este crRNA pequeno é originado do processamento de um crRNA maior por uma outra proteína Cas. Em paralelo com a inativação do DNA, uma outra proteína Cas reconhece o DNA viral, a partir do qual cria um novo segmento e o integra no *locus* CRISPR (reproduzido de Karginov e Hannon, 2010).

O sistema CRISPR-Cas tem sido classificado em três classes. No CRISPR-Cas tipo I e III, o crRNA maduro é geralmente gerado por um membro da família Cas6. Ao passo que no sistema III a proteína Cas6 atua sozinha, em alguns sistemas da classe I ela é parte do complexo de proteínas Cas conhecidas como Cascade (complexo para defesa contra vírus associadas a CRISPR). A proteína Cas6 é necessária para produção de crRNA, enquanto que as proteínas Cas adicionais que formam o complexo Cascade são necessários para estabilidade do crRNA (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR021124>).

## b) Serina-tRNA sintetase

Aminoacil-tRNA sintetase, também conhecida como aminoacil-tRNA ligase, catalisa o ataque de um aminoácido para sua molécula de tRNA transportador cognata, em uma reação altamente específica em duas etapas. As 20 aminoacil-tRNA sintetases são divididas em duas classes, I e II. A serina-tRNA sintetase pertence à classe II, juntamente com as enzimas dos aminoácidos alanina, asparagina, ácido aspartico, glicina, histida, lisina, fenilalanina, prolina e treonia (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR015866>) (Figura 24).



**Figura 24. Mecanismo de ativação de aminoácidos por uma aminoacil-tRNA sintetase da classe II.** Em laranja é mostrada a enzima. (1) A ativação do aminoácido em duas etapas: formação de um intermediário ligado à enzima, o aminoacil-AMP (adenilato proveniente do ATP); o grupo aminoacila é transferido do aminoacil-AMP para seu tRNA específico. (2) Pareamento do anticódon do aminoacil-tRNA com o códon no mRNA (reproduzido Lodish *et al.*, 2005).

Em reações catalisadas pela classe I de aminoacil-tRNA sintetase, o grupo aminoacil é acoplado ao 2'-hidroxil do tRNA, enquanto que na reação da classe II, o sítio 3'-hidroxil é preferido. No caso de serina-tRNA sintetase, por ser do tipo II, esta transfere o aminoacil do aminoacil-AMP diretamente para o resíduo adenilato 3' do tRNA no grupo hidroxila 3' (Nelson e Cox, 2012).

### c) 23S rRNA pseudouridilato sintase C

As pseudouridilato sintases são enzimas que catalisam a reação de isomerização de uridina para pseudouridina ( $\Psi$ ) em uma variedade de moléculas de RNAs e podem funcionar como chaperonas. Existem quatro famílias distintas de pseudouridinas sintetases que não compartilham similaridade de sequência, mas compartilham a mesma dobra do domínio catalítico e sítio de ligação a uracil (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR006225>).

Dentre estas a família de pseudouridilato sintase, RsuA e RluC/RluD contém um motivo adicional de ligação a RNA  $\alpha$ -L na região N-terminal. RluC e RluD são enzimas homólogas, e da mesma família, a qual cada uma converte para pseudouridina três bases uridina específicas no rRNA 23S de *E. coli*: U-955, U-2504e U-2580 no caso de RluC e U-1911, U-1915 e U-1917 no caso de RluD. A perda de RluC tem pouco efeito fenotípico, mas a perda de RluD resulta em reduzida taxa de crescimento (Mizutani *et al.*, 2004) (Figura 25).

Name	Substrate RNA	Modification Site	Catalytic As
TruD family			
TruD	tRNA	13	Asp80
TruA family			
TruA	tRNA	38, 39, 40	Asp60
TruB family			
TruB	tRNA	55	Asp48
HsuA family			
RsuA	16S rRNA	516	Asp102
RluB	23S rRNA	2605	Asp110
RluE	23S rRNA	2457	Asp69
RluF	23S rRNA	2604	Asp107
RluA family			
RluA	23S rRNA	746	Asp64
RluC	23S rRNA	955, 2504, 2580	Asp144
RluD	23S rRNA	1911, 1915, 1917	Asp139
TruC	tRNA	65	Asp54

**Figura 25. Isomerização de uridina para pseudouridina ( $\Psi$ ).** A esquerda são mostradas as famílias de pseudouridina sintetase e a direita é mostrado a reação de isomerização. A modificação ocorre na uridina que já se encontra no RNA. A seta vermelha indica a enzima pseudouridilato sintetase que tem como substrato o rRNA 23 S e o sítio de modificações (reproduzido de Hamm e Ferré-D'Amaré, 2006).

Uma notável característica da uridilato sintetase é a especificidade de substrato. A enzima reconhece seu substrato no contexto de RNAs. Isto é necessário para evitar depleção de uridinas livres que também são precursoras de

timidina na síntese do DNA (pseudouridina não pode ser convertida em timidina por metilação) (Hamm e Ferré-D'Amaré, 2006).

#### **d) Serina peptidase**

As peptidases, peptídeo-hidrolases ou proteases são enzimas hidrolíticas que clivam ligações peptídicas de proteínas ou de peptídeos. Estas enzimas são ubíquas nos seres vivos e representam cerca de 2% do total de proteínas presentes em todos os organismos, participando de vias metabólicas e de vias de sinalização celular. Além disso, muitos microrganismos secretam estas peptidases a fim de degradar proteínas externamente cujos os produtos servem como fonte de carbono e energia (Santos, 2010).

Em 1960 foi elaborado uma classificação que leva em consideração o centro ativo das peptidases. As carboxipeptidases são subdivididas em serina, metalo e cisteína carboxipeptidases. As endopeptidases são subdivididas em serina, cisteína, aspártico, metalo e treonina endopeptidase. Existem aquelas em que ainda não constam no sistema de classificação em função do mecanismo não suficientemente elucidado (Santos, 2010).

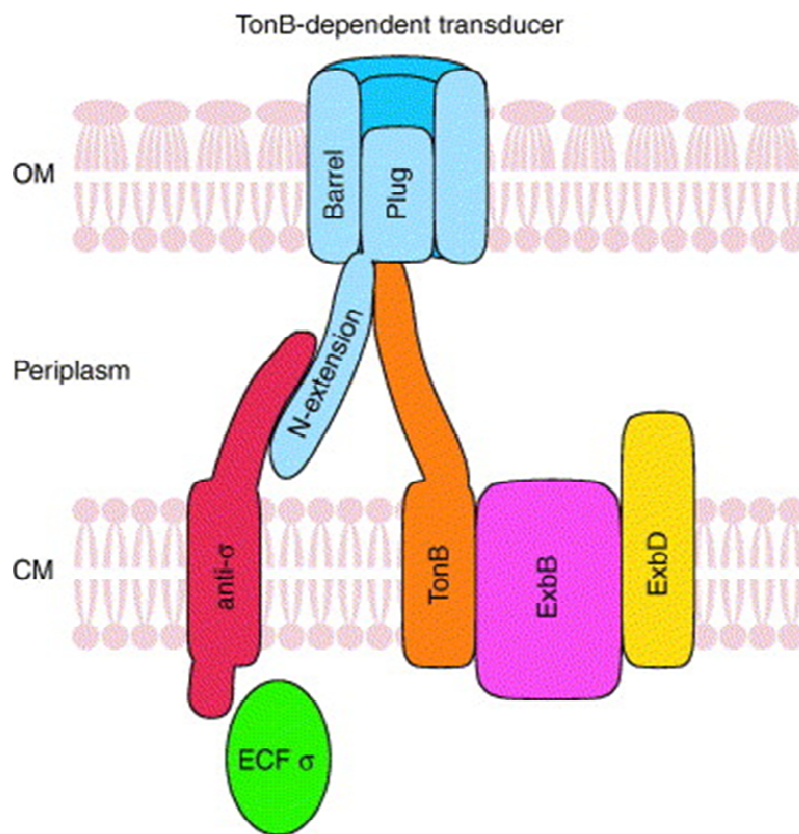
As serinas endopeptidases e carboxipeptidases possuem no seu centro catalítico o aminoácido serina. Estas enzimas estão envolvidas em grandes processos biológicos. Em bactérias, ajuda a digerir a matéria orgânica (por exemplo, carne em decomposição) (Neitzel, 2010).

#### **e) Transdutor de energia TonB**

As bactérias Gram-negativas possuem o envelope contendo duas membranas, a interna e a externa, a qual é separada por espaço periplásmico aquoso. A membrana fosfolipídica padrão forma a membrana interna, fornecendo a barreira de permeabilidade rica em proteínas que geram e utilizam íons para apoiar diversos processos essenciais. Já a membrana externa, sendo singular, é uma bicamada assimétrica, com a face interior blindada por fina camada de oligossacarídeos ancorados em lipídeos. Esta membrana carregada dificulta a passagem de moléculas potencialmente perigosas solúveis em membranas típicas,

enquanto permite a passagem de pequenas moléculas nutrientes hidrofílicas via canais aquosos fornecidos pelas proteínas porinas residentes na membrana externa (Tortora *et al.*, 2005).

Dessa forma, a membrana externa serve como uma barreira de difusão, permitindo que bactérias Gram-negativas explorem uma variedade de nichos que são tóxicos para organismos faltando uma defesa similar. A maior complicação nesta arquitetura é a separação da membrana externa com as fontes de energia celulares padrão. Assim, os processos da membrana externa dependentes de energia devem contar com outros sítios para transdução de energia (Brinkman e Larsen, 2008) (Figura 26).



**Figura 26. Sistema regulatório TonB-dependente.** Este sistema consiste de seis componentes: um receptor especializado localizado na membrana externa (OM) (transdutor TonB-dependente) (azul) , que interage com seu complexo protéico energizante TonB-ExbB-ExbD (laranja, rosa e amarelo), um fator anti-sigma localizado na membrana citoplasmática (CM) (vermelho) e um fator sigma ( $ECF\sigma$ ) com função extracitoplasmática da subfamília ECF (verde) (reproduzido de Koebnik, 2005).

O sistema TonB é um sofisticado sistema que detecta sinais externos à célula bacteriana e os transmite através das duas membranas até o citoplasma, levando a

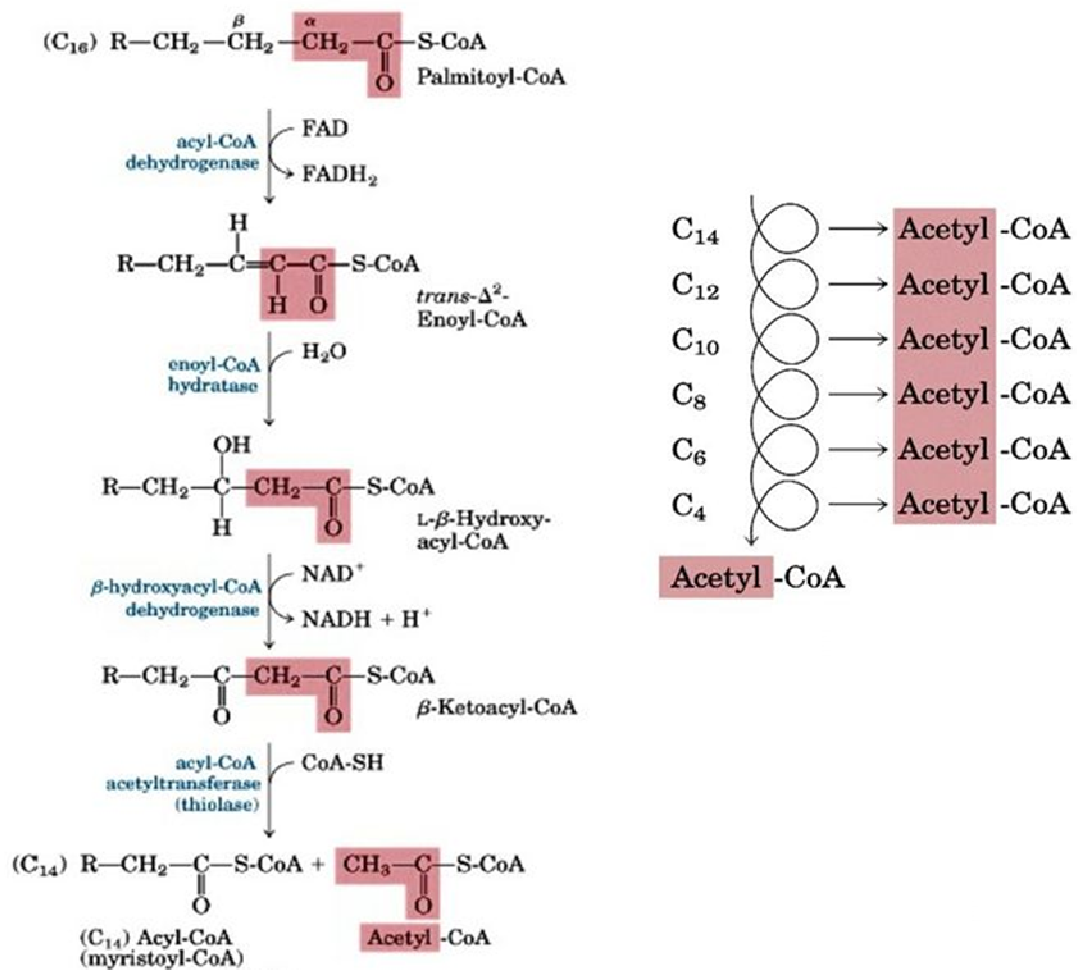
ativação da transcrição de genes alvo. Este sistema é comumente encontrado em bactérias ambientais, mas raramente encontrados e patógenos de humanos e animais (Koebnik, 2005).

A proteína TonB, assim como TolA, são transdutores de energia que acoplam o potencial eletroquímico iônico da membrana citoplasmática a apoiar os processos dependentes de energia na membrana externa no envelope de bactérias Gram-negativas. A transferência de energia destes transdutores é facilitada pelo complexo de energia-colheita, a qual são heteromultímeros de proteínas de membrana citoplasmática com homologia a proteínas de bombeamento de prótons do motor flagelar (Brinkman e Larsen, 2008).

#### **f) Acil-CoA desidrogenase**

Durante o processo de degradação de *n*-alcanos, enzimas convertem estes componentes em intermediário como o acil-CoA. Um dos processos descritos em condições de aerobiose inicia com hidroxilação da região N-terminal dos *n*-alcanos catalisada por uma monooxigenase (hidroxilação subterminal também são descritas). Em seguida, a molécula resultante é mais oxidada pelas enzimas álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase. O ácido carboxílico resultante será substrato para a acil-CoA sintetase. O acil-CoA resultante entra na via de  $\beta$ -oxidação (Wentzel *et al.*, 2007).

A enzima acil-CoA desidrogenase está envolvida no primeiro passo de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos. O primeiro passo da oxidação produz uma dupla ligação entre os carbonos  $\alpha$  e  $\beta$  (C2 e C3), liberando um trans- $\Delta^2$ -enoil-CoA. Esta nova dupla ligação tem uma configuração trans (não natural). Este passo é catalisado por isoenzimas acil-CoA desidrogenases que recebem nomes diferentes dependendo do tamanho da cadeia de ácido graxo: 12 a 18 carbonos (LCAD), 4 a 14 carbonos (MCAD) e 4 a 8 carbonos (SCAD). Estas enzimas têm o FAD como grupo prostético. Os elétrons removidos do acil-CoA desidrogenase são transferidos para o FAD e a forma reduzida os transfere imediatamente para um transportador de elétrons (Nelson e Cox, 2002) (Figura 27).



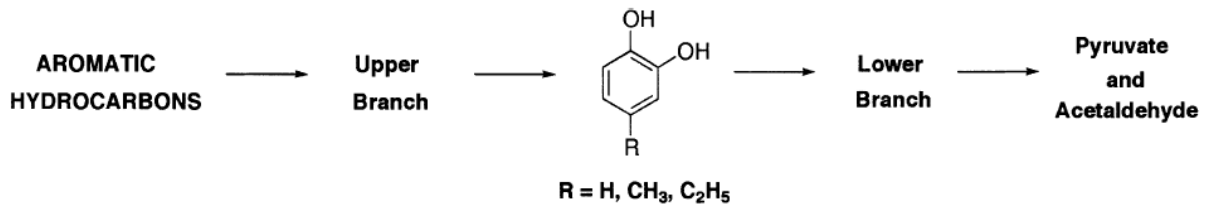
**Figura 27. Via de  $\beta$ -oxidação.** O primeiro passo da  $\beta$ -oxidação (um ciclo de quatro reações enzimáticas) a acil-CoA desidrogenase insere uma ligação dupla entre o carbono  $\alpha$  e  $\beta$  via retirada de dois átomos de hidrogênio e transfere para o FAD, resultando no  $FADH_2$  (reproduzido de Nelson e Cox, 2002).

É provável que hidrocarbonetos aromáticos alifáticos, como  $n$ -alcanos, estão sendo metabolizados. É descrito que compostos mais simples são mais fáceis de serem metabolizados, em função dos poucos passos enzimáticos que são necessário para o surgimento de intermediários que podem entrar no ciclo do ácido cítrico. Por isso,  $n$ -alcanos são mais preferencialmente metabolizados que componentes aromáticos (Silva e Fay, 2004). Desta forma, a presença da enzima acil-CoA desidrogenase indica que moléculas de ácidos graxos estão sendo formadas e sendo utilizadas para produção de energia via  $\beta$ -oxidação, pois os compostos alifáticos são os mais abundantes em petróleo e em diesel (Crapez *et al.*, 2002).



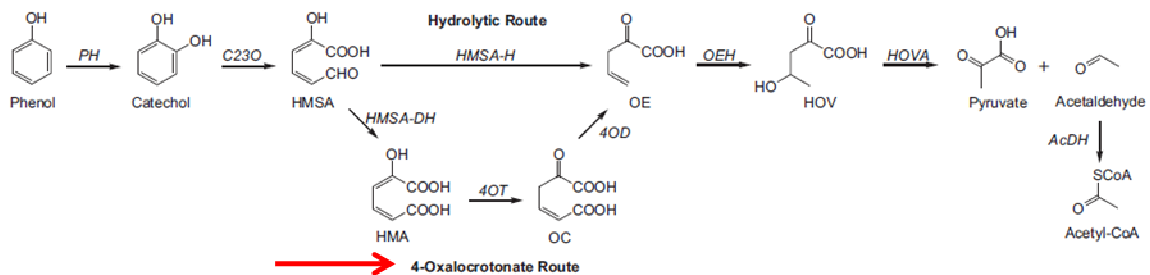
### g) 4-oxalocrotonato tautomerase

As reações enzimáticas que antecedem a etapa de fissão do anel aromáticos são chamadas de reações periféricas, ou via superior. As reações que acontecem após a fissão do anel aromático, pela via do *meta*-clivagem ou pela via *orto*-clivagem ( $\beta$ -ceto adipato), são as reações da via inferior, ou reações centrais (Figura 28). As reações periféricas são ditas como as mais importantes, pois normalmente as enzimas participantes são codificadas por genes plasmidiais, já a via inferior possui enzimas que são mais comuns (Whitman, 2002; Silva e Fay, 2004).



**Figura 28. Representação geral das vias para degradação de compostos aromáticos.** Pela via do  $\beta$ -ceto adipato, uma dioxigenase cliva o anel aromático (catecol) e o produto formado são metabolizados por outras enzimas. As etapas que antecedem a formação do catecol são as reações periféricas, ou via superior, e as etapas que sucedem o catecol a partir da sua fissão, são as reações centrais, ou via inferior (reproduzido de Whitman, 2002).

Dependendo da molécula aromática, após a fissão do anel aromático, a partir do catecol, cinco passos enzimáticos são necessários para que resulte em intermediários que poderão ser utilizados no ciclo do ácido cítrico, sendo que a 4-oxalocrotonato tautomerase é uma dessas enzimas (Figura 29).



**Figura 29. Via inferior para degradação de compostos aromáticos.** A enzima 4-oxalocrotonato tautomerase (mostrada pela seta vermelha) atua na isomerização da ácido 2-hidroximucônico (HMA) em 4-oxalocrotonato (OC) na rota do oxalocrotonato (reproduzido de Omokoko *et al.*, 2008).

Como exemplo dado na Figura 29, o fenol é convertido em catecol na primeira reação por meio de uma hidroxilação (fenol monooxigenase). O catecol sofre fissão extradiol gerando o ácido 2-hidroxi-6-semialdeído (HMSA). A clivagem catalisada pela 2,3-dioxigenase até o surgimento subsequente de piruvato e acetil-CoA é referido como *meta*-via. O HMSA é convertido em 2-oxopentano-4-dienoato em três etapas pela rota 4-oxalocronato catalisada pela HMSA desidrogenase (HMSA-HD), 4-oxalocronato tautomerase (4OT) e 4-oxalocronato descarboxilase (4OD), respectivamente, ou em uma etapa na via hidrolítica catalisada pela HMSA hidrolase (Omokoko *et al.*, 2008).

A presença desta proteína indica que a bactéria está expressando diferencialmente esta enzima e utilizando a via *meta*-clivagem, visto que foi específica da condição de crescimento em petróleo bruto. As outras enzimas participantes desta via podem estar sendo expressas, porém não foram detectadas. Além do mais, por fazer parte da via inferior de degradação de compostos aromáticos, isso fornece indícios que componentes aromáticos variados podem estar sendo utilizados como fonte de carbono e seus produtos direcionados a esta via de degradação central.

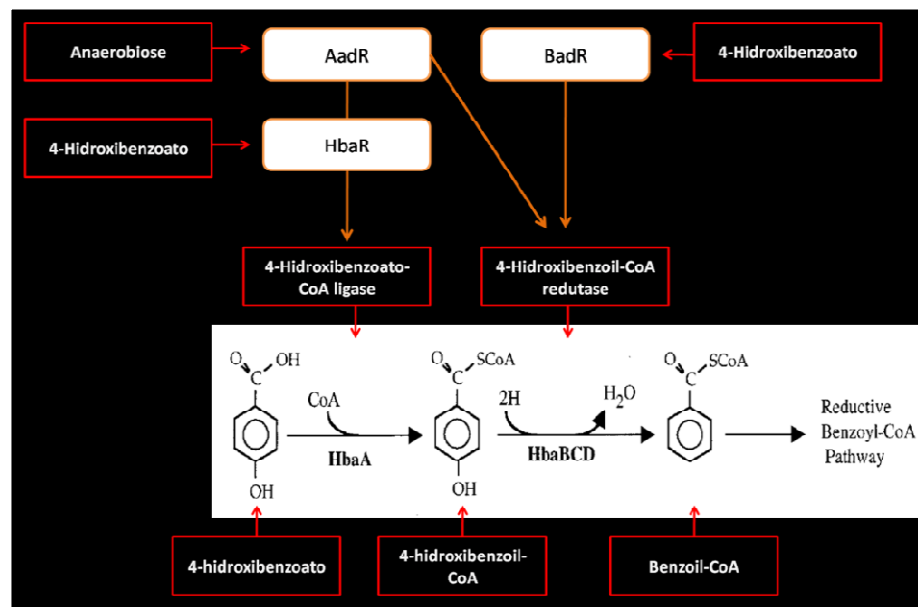
Por serem descritas como grandes biodegradadoras de compostos derivados de petróleo é provável que estas estejam expressando uma variedade de proteínas que nesta pesquisa não foram detectadas. No entanto, dados da literatura mostram que proteínas participantes da via do  $\beta$ -cetoadipato foram identificadas em bactérias deste gênero. No estudo do proteoma de *Acinetobacter* sp K-S1 cultivada em benzoato como única fonte de carbono, foram descritas proteínas que participavam de vias de degradação de compostos aromáticos, como o  $\beta$ -cetoadipato, como 1,2-dioxigenase e  $\beta$ -cetoadipato succinil-CoA transferase (Kim *et al.*, 2003).

Giuffrida *et al.* (2001), identificou por análise proteômica uma variedade de proteínas envolvidas na degradação de fenol e benzoato, bem como proteínas envolvidas na manutenção celular. Algumas destas proteínas identificadas foram a álcool desidrogenase, chaperona de 60kDa, fenolhidrolase  $\beta$ -componente, chaperona de 60kDa GroEL, entre outras. Kahng *et al.* (2002), estudando biodegradação de *p*-hidroxi-benzoato detectou subunidades de protocatecuato 3,4-dioxigenase, a *pcG* e *pcaH*.

## h) Família de regulador de transcrição Crp/Fnr

Os organismos dependem de uma rede de reguladores para orquestrar a transcrição de genes em resposta a mudanças internas e externas a fim de otimizar o metabolismo e garantir a sobrevivência. Dentre estes reguladores, as proteínas da família Crp/Fnr regulam várias vias metabólicas em bactérias e funcionam tipicamente na resposta a mudanças ambientais. Seus nomes foram dados após as descobertas dos seus dois representantes em *E. coli*: Crp (proteína receptora de cAMP) e Fnr (proteína reguladora de fumarato e nitrato redutase) (Zhou *et al.*, 2011).

Estas proteínas normalmente funcionam como ativadores transcricionais e já foram descritas regulando diversas funções, entre elas a metabolização de compostos aromáticos. Como exemplo, no estudo feito por Eglan e Harwood (2000), descobriram que o regulador HbaR, juntamente com o regulador AadR, pertencente a família Crp/FnR, está envolvida na regulação de enzimas envolvidas na degradação anaeróbica de 4-hidroxibenzoato (Figura 30).



**Figura 30. Via de degradação de 4-hidroxibenzoato.** As proteínas envolvidas na degradação de 4-hidroxibenzoato são reguladas pelas proteínas da família Crp/Fnr, AadR e HbaR em *Rhodospseudomonas palustris* (modificado de Eglan e Harwood, 2000).

A formação de benzoil-CoA é a primeira etapa da degradação anaeróbica de hidrocarbonetos aromáticos e é catalisada pela enzima 4-hidroxibenzoato-CoA ligase. Em seguida é dehidroxilada pela enzima 4-hidroxibenzoato-CoA redutase,

produzindo benzoil-CoA. Essas duas enzimas são reguladas pela proteína ativadora da transcrição AadR e pela proteína reguladora de degradação anaeróbica de 4-hidroxibenzoato HbaR. A AadR funciona como um sensor de oxigênio e ativa a expressão de gene de HbaR, bem como regula a taxa de transcrição do gene de 4-hidroxibenzoil-CoA redutase. HbaR quando ligada ao indutor 4-hidroxibenzoato funciona como ativador para a expressão da enzima 4-hidroxibenzoato-CoA ligase (Egland e Harwood, 2000).

O exemplo dado acima demonstra o papel destas proteínas reguladoras na expressão de genes que respondem a uma mudança ambiental. Devido a grande complexidade do substrato usado nesta pesquisa (petróleo bruto, diesel e extrato de levedura) é provável que muitas proteínas desta família Crp/Fnr sejam expressas em função do seu papel importante na ativação de genes importantes quando a bactéria é submetida ao crescimento em xenobióticos como fonte de carbono.

## 6. CONCLUSÕES

A caracterização de *A. junii* SB132 revelaram a natureza do envelope bacteriano. A bactéria é Gram-negativa, formato cocobacilar e arranjo majoritário diplococobacilo. Além disso, pela morfologia de colônica a única diferença observada foi o tamanho destas nas três condições de cultivo (petróleo bruto, diesel e extrato de levedura). Estes dados completam os dados obtidos por análise prévia do sequenciamento de parte do gene rDNA 16S que teve alta similaridade de sequência com uma espécie de *A. junii* deposita no CNBI. Além disso, *A. junii* apresentou cápsula, sendo esta estrutura descrita para as espécies deste gênero e que podem estar associadas aos processo de assimilação de compostos orgânicos.

Os dados sobre perfil antimicrobiano mostraram que *A. junii* SB132 foi sensível a maioria dos antimicrobianos testados, sendo diferente quanto a esta sensibilidade a maioria das cepas advindas de amostras clínicas estudadas. No entanto, são necessários dados de anotação genômica para verifica quais genes comportam e quais estão relacionados aos processos de patogenicidade, entre outros genes.

Dados de espectrometria de massa confirmaram com alta confiabilidade que a bactéria em estudo é a *A. junii*. Nesta análise, o cultivo nas três condições (petróleo bruto, diesel e extrato de levedura) não mostrou efeito na identificação da espécie, corroborando com dados fornecidos pelo fabricante.

Os dados genotípicos do perfil plasmidial de *A. junii* SB132 apresentou nove bandas em gel, com plasmídeos de tamanhos que variaram de 94.000pb a 5.000pb. Estes plasmídios deverão ser sequenciados para verificação de quais genes comportam, principalmente a verificação de genes envolvidos com a degradação de xenobióticos.

O cultivo de *A. junii* SB132 em petróleo bruto, diesel e extrato de levedura deu informações quanto a sua curva de crescimento. Houve uma relação entre o perfil da curva de crescimento e quantidade de proteínas extraídas, portanto no cultivo em extrato de levedura foi possível extrair maior quantidade de proteínas. No entanto, quando comparado os cultivos da cepa em petróleo bruto e diesel, esta apresentou maior conteúdo de proteínas.

A fim de se obter o perfil proteômico em gel, as proteínas extraídas de células crescidas por 24h foram analisadas por eletroforese 2-DE. Os géis referências foram obtidos com similitude superior a 70%. Houve maior quantidade de *spots* do gel de proteínas da condição de cultivo em extrato de levedura (400 *spots*). Quando comparadas as condições de petróleo bruto e diese, estes apresentaram 288 e 188 *spots*, respectivamente.

A fim de se verificar expressão diferencial e constitutiva, os géis 2-DE referenciais foram comparados. Foi observado que tais géis apresentaram pouca similaridade, sendo tal resultado o esperado. Quando comparados os géis das condições de petróleo bruto e diese, estas apresentaram uma similaridade de aproximadamente 46%.

Proteínas constitutivas e diferenciais foram identificadas por análise em espectrometria de massa e comparação com banco de dados. A metade das proteínas analisadas apresentaram resultados como proteínas hipotéticas. No entanto, para as proteínas identificadas, estas estão envolvidas com funções como degradação de compostos xenobióticos, biossíntese de moléculas, reparo e proteção do DNA, proteínas transportadoras de membrana, sinalização celular e fatores de transcrição.

## 7. PERSPECTIVAS

A bactéria *A.junii* SB132 se mostra como importante fonte de informações dos processos de degradação de poluentes. Assim, seu estudo poderá desvendar muito dos processos celulares envolvidos na biodegradação de compostos presentes em combustíveis derivados do petróleo e que são importantes no contexto ambiental.

O sequenciamento do genoma desta bactéria deverá ser realizado a fim de se obter as informações contidas nas sequências de DNA deste organismo. Estes dados serão úteis na proposição de organismos geneticamente modificados, caso *A. junii* não seja utilizada como agente biorremediador em função da importância médica que espécies deste gênero estão ganhando por estarem envolvidas com crescentes casos de patologias.

Estudos mais apurados do proteoma de *A. junii* SB132 deverão ser realizados utilizando técnicas mais robustas, como a proteômica shotgun de proteínas intracelulares, extracelulares. Da mesma forma, os dados do metaboloma também deverão ser obtidos para verificação de quais transformações químicas estão ocorrendo durante o processo de biodegradação de petróleo e diesel.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-El-Haleem, D. 2003. *Acinetobacter*: environmental and biotechnological applications. *African Journal of Biotechnology*, 2: 71-74.
- Adav, S.S.; Chen, m.y.; Lee, D.J.; Ren, N.Q. 2007. Degradation of phenol by *Acinetobacter* strain isolated from aerobic granules. *Chemosphere*, 67: 1566–1572.
- Adriaens, P.; Focht, D.D. 1991. Cometabolism of 3,4-dichlorobenzoate by *Acinetobacter* sp. strain 4-CB1. *Applied and Environment Microbiology*, 57(1):173-179.
- Agarry, S.E.; Solomon, B.O.; Layokun, S.K. 2008. Kinetics of batch microbial degradation of phenols by indigenous binary mixed culture of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescence*. *African Journal of Biotechnology*, 14: 2417-2423.
- Aislabe, J.M.; Balks, M.R.; Foght J.M.; Waterhouse, E.J. 2004. Hydrocarbon spills on Antarctic soils: effects and management. *Environmental Science & Technology*, 38:1265-1274.
- Amorim, W.; Albuquerque, R.N.; Costa, P.C.; Santos, O.V.; Mello, J.S.; Monção, G. S.; Cabral, P.R.L.; Marcelino, K.S.; Silva, M.; Amorim, V.M. 2003. Poluição. Série 1. Programa de educação ambiental: Geama, 24p.
- Andrade, J.A.; Augusto, F.; Jardim, I.C.S. 2010. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética Química*, 35(3): 17 – 43.
- Aparna, C.; Saritha, P.; Himabindu, V.; Alok B.; Anjaneyulu, Y. 2010. Evaluation of bioremediation effectiveness on sediments Contaminated with industrial wastes. *international journal of environmental sciences*, 1(4): 607-620.
- Araújo, S.P. 2014. *Produção de inóculo microbiano, obtido de macrófitas aquáticas na Amazônia, com potencial de degradação de hidrocarbonetos de petróleo*. Tese de doutorado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 157p.
- Barbe, V.; Vallenet, D.; Fonknechten, D.; Kreimeyer, A.; Oztas, A.; Laurent Labarre, Cruveiller, S.; Robert, C.; Duprat, S.; Wincker, P.; Ornston, L.N.; Weissenbach, J.; Marlière, P.; Cohen, G.N.; Médigue, C. 2004. Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally



- transformation competent bacterium. *Nucleic Acids Research*, 32(19): 5766–5779.
- Barbeiro, C.; Fani, R. 1998. Biodiversity of an *Acinetobacter* population isolated from activated sludge. *Res. Microbiol*, 149: 665-673.
- Barbieri, S.M. 1997. Biodegradação de compostos aromáticos. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. Microbiologia ambiental. Jaguariúna. Embrapa-CNPMA, p. 211-242.
- Barreto, D. 2001. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). Investigação para remediação. In.: Manual de gerenciamento de áreas contaminadas, (<http://www.cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas/manual-de-gerenciamento-de-ACs/7->). Acesso em 22/03/14.
- Basuki, W.; Syahputra, K.; Suryani, A.T.; Pradipta, I. 2011. Biodegradation of used engine oil by *Acinetobacter junii* TBC 1.2. *Indonesia Journal of Biotechnology*, 16(2): 132-138.
- Bento, F.M.; Camargo, F.A.O.; Okeke, B.; Frankenberger-Júnior, W.T. 2003. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Brazilian of journal microbiology*, 34(1): 65-68.
- Bernoth, I.; Firth, I.; Mcallister, P.; Rhodes, S. 2000. Biotechnologies for remediation and pollution control in the mining industry. *Minerals and Metallurgical Processing*, 17: 105-111.
- Bhawsar, S.D.; Chopade, B.A.; Cameotra, S.S. 2012. Degradation of Diesel by *Acinetobacter* genospecies Isolated from Rhizosphere of Wheat. *Journal of Advances in Developmental Research*, 3(1): 70-76.
- Bonis, G. 2011. Ninguém fiscaliza as operadoras de petróleo, (<http://www.cartacapital.com.br/politica/ninguem-fiscaliza-as-operadoras-de-petroleo>). Acesso em 02/03/2014.
- Boopathy, R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74: 63-67.
- Bragg, J.R.; Pince, R.C.; Harner, E.J.; Atlas, R.M. 1994. Effectiveness oil of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. *Nature*, 368: 413-418.

- Brendel, J.; Stoll, B.; Lange, S.J.; Sharma, K.; Lenz, C.; Stachler, A.E.; Maier, L.K.; Richter, H.; Nickel, L.; Schmitz, R.A.; Randau, L.; Allers, T.; Urlaub, H.; Backofen, R.; Marchfelder, A. 2014. A complex of Cas proteins 5, 6, and 7 is required for the biogenesis and stability of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-derived RNAs (crRNAs) in *Haloferax volcanii*. *Journal Of Biological Chemistry*, 289(10) 7164–7177.
- Briganti, F.; Pessione, P.; Giunta, C.; Scozzafava, A. 1997. Purification, biochemical properties and substrate specificity of a catechol 1,2-dioxygenase from a phenol degrading *Acinetobacter radioresistens*. *FEBS Letters*, 416: 61-64.
- Brinkman, K.K.; Larsen, R.A. 2008. Interactions of the energy transducer TonB with noncognate energy-harvesting complexes. *Journal Of Bacteriology*, 190(1): 421–427.
- Bruker Daltonics, 2005. Microorganism identification and classification based on MALDI-TOF MS fingerprinting with MALDI biotyper. *Application Note # MT-80*, ([http://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/literature/literature-room-mass-spec.html?eID=dam\\_frontend\\_push&docID=38446](http://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/literature/literature-room-mass-spec.html?eID=dam_frontend_push&docID=38446)). Acesso em 25/01/2015.
- Buchan, A.; Neidle, E.L.; Moran, M.A. 2001. Diversity of the Ring-Cleaving Dioxygenase Gene *pcaH* in a Salt Marsh Bacterial Community. *Applied and Environment Microbiology*, 67(12): 5801–5809. Doi: 10.1128/AEM.67.12.5801–5809.2001.
- Bugg, T.D.H. 2003. Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron*, 59: 7075–7101. Doi:10.1016/S0040-4020(03)00944-X.
- Burton, S.G. 2003. Oxidizing enzymes as biocatalysts. *Trends in Biotechnology*, 21(12): 543-549. Doi:10.1016/j.tibtech.2003.10.006.
- Caposio, P.; Pessione, E.; Giuffrida, G.; Conti, A.; Landolfo, S.; Giunta, C.; Gribaudo, G. 2002. Cloning and characterization of two catechol 1,2-dioxygenase genes from *Acinetobacter radioresistens* S13. *Research in Microbiology*, 153: 69–74.
- Carbohydrate Active Enzyme. GlycosylTransferase family classification (<http://www.cazy.org/GlycosylTransferases.html>). Acesso em 02/01/2015.

- Carnero, G.B. 2012. Mareias negras, ([http://www.cetmar.org/documentacion/mareias\\_negras.htm#b](http://www.cetmar.org/documentacion/mareias_negras.htm#b)). Acesso em 20/01/2014.
- Chou, M.F.; Prusic, S.; Lubner, J.M.; Church, G.M.; Husson, R.N.; Schwartz, D. Using bacteria to determine protein kinase specificity and predict target substrates. *PLoS ONE*, 7(12): e52747. doi:10.1371/journal.pone.0052747.
- Ciancaglini, P.F.E.; Sforza, G.R. 2002. Differential Fluorescent Staining Method for Detection of Bacteria in Blood Cultures, Cerebrospinal Fluid and Other Clinical Specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 21:373–378.
- Coral, G.; Karagöz, S. 2005. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading bacteria from petroleum refinery soil. *Annals of Microbiology*, 55(4): 255-259.
- Cordova-Rosa, S.M.; Dams, R.I.; Cordova-Rosa, E.V.; Radetski, M.R.; Corrêa, A.X.R.; Radetski, C.M. 2009. Remediation of phenol-contaminated soil by a bacterial consortium and *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from an industrial wastewater treatment plant. *Journal of Hazardous Materials*, 164: 61–66.
- Crapez, M.A.C.; Borges, A.L.N.; Bispo, M.G.S.; Pereira, D.C. 2002. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. *Ciência hoje*, 30(179): 32-37.
- Cury, J. C. 2002. *Atividade microbiana e diversidade metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo*. Dissertação de mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo. 95p.
- Decorosi, F.; Mengoni, A.; Baldi, F.; Fani, R. 2006. Identification of alkane monooxygenase genes in *Acinetobacter venetianus* VE-C3 and analysis of mutants impaired in diesel fuel degradation. *Annals of Microbiology*, 56 (3): 207-214.
- Delille, D.; Delille, B.; Pelletier, E. 2002. Effectiveness of bioremediation of crude oil contaminated subantarctic intertidal sediment: the microbial response. *Microbial ecology*, 44:118-126.
- Denef, V.J.; Patrauchan, M.A.; Florizone, C.; Park, J.; Tsoi, T.V.; Verstraete, W.; Tiedje, J.M.; Eltis, L.D. 2005. Growth Substrate- and Phase-Specific Expression

of biphenyl, benzoate, and C1 metabolic pathways in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Journal of Bacteriology*, 187(23): 7996–8005.

Duarte, D.P. 2010. EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CRISTALIZAÇÃO DE UMA SER THR QUINASE Inls, (<http://www.ebah.com.br/content/ABAAABNvkAH/expressao-purificacao-cristalizacao-ser-thr-quinase-Inls>). Acesso em 17/02/2015.

Dijkshoom, L.; Nemeč, A. 2008. The diversity of the genus *Acinetobacter*. In: Gerischer, Y. (Ed.). *Acinetobacter: molecular microbiology*. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom, p. 1-34.

Egland, P.G.; Harwood, C.S. 2000. HbaR, a 4-hydroxybenzoate sensor and FNR-CRP superfamily member, regulates anaerobic 4-Hydroxybenzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris*. *Journal of Bacteriology*, 182(1): 100-106.

Fowler, R.G.; Schaaper, R.M. 1997. The role the *mutT* gene of *Escherichia coli* in maintaining replication fidelity. *FEMS Microbiology Reviews*, 21: 43-54.

Furukawa, K.; Chakrabarty, M. 1982. Involvement of Plasmids in Total Degradation of Chlorinated Biphenyls. *Applied And Environmental Microbiology*, 44(3): 619-626.

Gales, A.C.; Jones, R.N.; Sader, H.S. 2011. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006–09). *Journal Antimicrob Chemother*, 66: 2070–2074.

Gasnier, T.R. 2014. A condução da análise em Ciências Biológicas I - Base Conceitual ([http://www.intertropi.ufam.edu.br/docs/apostila\\_conducao\\_da\\_pesquisa\\_cap1a4.pdf](http://www.intertropi.ufam.edu.br/docs/apostila_conducao_da_pesquisa_cap1a4.pdf)). Acesso em 20/05/2014.

Geißdörfer, W.; Kok, R.G.; Ratajczak, A.; Hellingwerf, K.J.; Hillen, W. 1999. The genes *rubA* and *rubB* for alkane degradation in *Acinetobacter sp.* strain ADP1 are in an operon with *estB*, encoding an esterase, and *oxyR*. *Journal of Bacteriology*, 81(14): 4292–4298.

- Ghazali, F.; Rahman, R.; Salleh, A.; Basari, M. 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54:61–67.
- Giuffrida, M.G.; Pessione, E.; Mazzoli, R.; Dellavalle, G.; Barello, C.; Conti, A.; Giunta, C. 2001. Media containing aromatic compounds induce peculiar proteins in *Acinetobacter radioresistens*, as revealed by proteome analysis. *Electrophoresis*, 22(9): 1705-11.
- Görg, A. 2004. 2-D Electrophoresis: principles and methods. Handbooks from GE Healthcare, Munich, 166p.
- Greenpeace. 2011. O tamanho do estrago, (<http://www.greenpeace.org/brasil/pt/Noticias/Petroleo-nada-transparente/>). Acesso em 20/01/14.
- Guo, W.; Li, D.; Tao, Y.; Gao, P.; Hu, J. 2008. Isolation and description of a stable carbazole-degrading microbial consortium consisting of *Chryseobacterium sp.* NCY And *Achromobacter sp.* NCW. *Current Microbiology*, 57: 251–257.
- Ha, J.Y.; Lee, J.H.; Kim, K.H.; Kim, D.J.; Lee, H.H.; Kim, H.K.; Yoon, H.J.; Suh, S.W. 2006. Overexpression, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of erythronate-4-phosphate dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Cryst.*, F62: 139–141
- Halma, N. 2004. *Síntese e caracterização de ferroporfirinas imobilizadas em hidróxidos duplos lameres: estudo de diferentes estratégias de imobilização e investigação da atividade catalítica*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 75p.
- Hamma, T.; Ferré-D’Amar, A.R. 2006. Pseudouridine synthases. *Chemistry & Biology*, 13: 1125–1135.
- Hardy Diagnostics. 2015. Acinetobacter, ([https://catalog.hardydiagnostics.com/cp\\_prod/Content/hugo/Acinetobacter.htm](https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/Acinetobacter.htm)) . Acesso em 11/03/2015.
- Henriques, C. 2013. Balsa tomba e causa vazamento de óleo no Rio Negro, no Amazonas, (<http://g1.globo.com/am/amazonas/noticia/2013/03/balsa-tomba-e->

causa-vazamento-de-oleo-no-rio-negro-no-amazonas.html). Acesso em 21/01/2014.

Horowitz, A.; Gutnick, D.; Rosenberg, E. 1975. Sequential Growth of Bacteria on Crude Oil. *Applied Microbiology*, 30(1): 10-19.

Instituto Unibanco e Fundação Victor Civita. 2003. Meio ambiente: conhecer para preservar. As fábricas e a poluição ambiental. *Encarte Unibanco*, 13: 1-4.

Interpro. Proteín Sequence Analysis and Classification. CRISPR-associated protein, Cas5 (IPR021124) (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR021124>). Acesso em 03/01/2015.

Interpro. Proteín Sequence Analysis and Classification. Pseudouridine synthase, RluC/RluD (IPR006225) (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR006225>). Acesso em 04/01/2015.

Interpro. Proteín Sequence Analysis and Classification. Serine-tRNA synthetase, type1, N-terminal (IPR015866) (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR015866>). Acesso em 03/01/2015.

Jean, J.S.; Lee, M.K.; Wang, S.M.; Chattopadhyay, P.; Maity, J.P.; Liu, C.C. 2008. Effects of inorganic nutrient levels on the biodegradation of benzene, toluene, and xylene (BTX) by *Pseudomonas spp.* in a laboratory porous media sand aquifer model. *Bioresource Technology*, 99(16): 7807–7815.

Kahng, H.Y.; Cho, K.; Song, S.Y.; Kim, S.J.; Leem, S.H.; Kim, S.I. 2002. Enhanced detection and characterization of protocatechuate 3,4-dioxygenase in *Acinetobacter lwoffii* K24 by proteomics using a column separation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295: 903–909.

Karginov, F.V.; Hannon, G.J. 2010. The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Mol Cell*, 37(1): 1-7. doi:10.1016/j.molcel.2009.12.033.

Kasvi, 2013. Instruções de uso extrato de levedura, ([http://www.kasvi.com.br/pdf/576738637bedbbda8c88ba6b2642a3f4\\_arquivo.pdf](http://www.kasvi.com.br/pdf/576738637bedbbda8c88ba6b2642a3f4_arquivo.pdf)). Acesso em 2/07/2014.

Khan, A.A.; Wang, R.F.; Cao, W.W.; Doerge, D.R.; Wennerstrom, D.; Cerniglia, C.E. 2001. Molecular Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression of Genes Encoding a Polycyclic Aromatic Ring Dioxygenase from *Mycobacterium sp.*

- Strain PYR-1. *Applied and Environment Microbiology*, 67(8): 3577–3585. Doi: 10.1128/AEM.67.8.3577–3585.2001.
- Kim, M.H.; Hao, O.J. 1999. Cometabolic degradation of chlorophenols by *Acinetobacter* species. *Water Research*, 33(2): 562-574.
- Kim, S.I.; Yoo, Y.C.; Kahng, H.Y. 2001. Complete nucleotide sequence and over expression of *cat1* gene cluster, and roles of the putative transcriptional activator CatR1 in *Acinetobacter Iwoffii* K24 capable of aniline degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288(1): 645-649.
- Kim, S.I.; Song, S.Y.; Kim, K.W.; Ho, E.M.; Oh, K.H. 2003. Proteomic analysis of the benzoate degradation pathway in *Acinetobacter* sp. KS-1 *Research in Microbiology*, 154: 697–703.
- Kim, S.I.; Kim, J.Y.; Yun, S.H.; Kim, J.H.; Leem, S.H.; Lee, C. 2004a. Proteome analysis of *Pseudomonas* sp. K82 biodegradation pathways. *Proteomics*, 4: 3610–3621. Doi: 10.1002/pmic.200400977.
- Kim, S.J.; Jones, R.C.; Cha, C.J.; Kweon, O.; Edmondson, R.D.; Cerniglia, C.E.: 2004b. Identification of proteins induced by polycyclic aromatic hydrocarbon in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and de novo sequencing methods. *Proteomics*, 4: 3899- 3908.
- Kim, S.I.; Park, S.H.; Kim, J.W.; Leem, S.H.; Shin, D.J.; Kim, S.H.; Lee, D.H.; Kahng, H.Y. 2007. Peptide mass fingerprinting- and 2-DE/MS-based analysis of the biodegradation potential for monocyclic aromatic hydrocarbons in *Pseudomonas* sp. *Biotechnol Lett*, 29:1475-1481.
- Kim, S.J.; Kweon, O.; Cerniglia, C.E. 2009. Proteomic applications to elucidate bacterial aromatic hydrocarbon metabolic pathways. *Current Opinion in Microbiology*, 12: 301–309.
- Koebnik, R. 2005. TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception or the rule? *TRENDS in Microbiology*, 13(8): 343-347.
- Koma, D.; Hasumi, F.; Yamamoto, E.; Ohta, T.; Chung, S.Y.; Kubo, M. 2001. Biodegradation of long-chain n-paraffins from waste oil of car engine by *Acinetobacter* sp. *Journal of bioscience and bioengineering*, 91(1): 94-96.

- Kumar, A.; Kumar, S.; Kumar, S.; 2005. Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochemical Engineering Journal* 22: 151–159.
- Kweon, O.; Kim, S.J.; Jones, R.C.; Freeman, J.P.; Adjei, M.D.; Edmondson, R.D.; Cerniglia, C.E. 2007. A polyomic approach to elucidate the fluoranthene degradative pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Journal Bacteriology*, 189(13):4635-4647.
- Lal, B.; Khanna, S. 1996. Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*. *Microbiology & Molecular Genetics Unit*, 81(4): 355-362.
- Lodish, H.; Darnell, J.; E.; Baltimore, D. 2005. *Biologia Celular e Molecular*, 5ª edição. Artmed Editora SA. Porto Alegre, Brasil.
- Lopes, A. 2007. *Respostas de herbáceas aquáticas amazônicas ao petróleo cru de Urucu (Coari-Am)*. Dissertação de mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas das Amazônia / Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 129p.
- Lu, S.J.; Wang, H.Q.; Yao, Z.H. 2006. Isolation and characterization of gasoline-degrading bacteria from gas station leaking-contaminated soils. *Journal of Environmental Sciences*, 18: 969-972.
- Maciel, B. M. 2004. *Estudos prospectivos de microrganismos de solo de landfarm com potenciais aplicações em estratégias de biorremediação de áreas contaminadas por petróleo*. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz. 77p.
- Maeng, J.H.; Sakai, Y.; Tani, Y.; Kato, N. 1996. Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of n-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *Journal Bacteriology*, 178(13):3695-3700.
- Mandri, T.; Lin, J. 2007. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African Journal of Biotechnology*, 6: 023-027.



- Marco, M.P. 2009. Immunodetection of Xenobiotics, (<http://www.ffn.ub.edu/ritort/masterte2012-2013/pmarco12.pdf>). Acesso em 20/01/14.
- Marín, J.A.; Moreno, J.L.; Hernández, T.; García, C. 2006. Bioremediation by composting of heavy oil refinery sludge in semiarid conditions. *Biodegradation*, 17: 251-261.
- Marinha do Brasil. Processo n° 10.428, (<https://www.mar.mil.br/tm/download/anuario/1981/10428.pdf>). Acesso em 02/07/2014.
- Marrot, B.; Barrios-Martinez, A.; Moulin, P.; Roche, N. 2006. Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an immersed membrane bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 30: 174–183.
- McGenity, T.J. 2014. Hydrocarbon biodegradation in intertidal wetland sediments. *Current Opinion in Biotechnology*, 27: 46–54. Doi: 10.1016/j.copbio.2013.10.010.
- Meire, R.O.; Azeredo, A.; Torres, J.P.M. 2007. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Oecol. Bras.*, 11: 188-201.
- Mello, J.M.M. 2007. *Biodegradação dos compostos BTEX em um reator com biofilme*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina. 151p.
- Mengoni, A.; Ricci, S.; Brilli, M.; Baldi, F.; Fani, R. 2007. Sequencing and analysis of plasmids pAV1 and pAV2 of *Acinetobacter venetianus* VE-C3 involved in diesel fuel degradation. *Annals of Microbiology*, 57(4) 521-526.
- Milani, E.J.; Brandão, J.A.S.L.; Zalán, P.V.; Gamboa, L.A.P. 2000. Petróleo na margem continental brasileira: geologia, exploração, resultados e perspectivas. *Brazilian Journal of Geophysics*, 18(3): 351-396.
- Mirdamadian, S.H.; Emtiazi, G.; Golabi, M.H.; Ghanavati, H. 2010. Biodegradation of petroleum and aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from petroleum-contaminated soil. *J Pet Environ Biotechnol*, 1(1): 1-5. doi:10.4172/2157-7463.1000102.

- Mizutani, k.; Machida, Y.; Unzai, S.; Park, S.Y.; Tame, J.R.H. 2004. Crystal structures of the catalytic domains of pseudouridine synthases RluC and RluD from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 43: 4454-4463.
- National Research Council, 1993. In situ bioremediation: when does it work? (<http://www.nap.edu/catalog/2131.html>). Acesso em 20/01/14.
- Neitzel, J.J. 2010. Enzyme Catalysis: the serine proteases. *Nature Education*, 3(9):1-21.
- Nelson, D. L.; Cox, M.M. 2002. Lehninger: Princípios de Bioquímica. 3ª edição. Editora Sarvier, São Paulo, SP, Brasil. ISBN: 85-7378-125-4.
- Nolan, L.C.; O'Connor, K.E. 2008. Dioxygenase- and monooxygenase-catalysed synthesis of cis-dihydrodiols, catechols, epoxides and other oxygenated products. *Biotechnology Letters*, 30(1):1879–1891. Doi: 10.1007/s10529-008-9791-5.
- Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana - NCCLS. (2005). *Padronização dos Testes de sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão; Norma Aprovada*. 8.ed. M2-18. Wayne: NCCLS, v.23. n.1.
- Oliveira, M.S. 2007. *Tratamento de infecções causadas por Acinetobacter spp. resistentes a carbapenem*. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo. São Paulo. 99p.
- Omokoko, B.; Jäntges, U.K.; Zimmermann, M.; Reiss, M.; Hartmeier, W. 2008. Isolation of the phe-operon from *G. stearothermophilus* comprising the phenol degradative meta-pathway genes and a novel transcriptional regulator. *BMC Microbiology*, 8: 1-10. Doi: doi:10.1186/1471-2180-8-197.
- Ortiz, F. 2014. Baía de Guanabara: vazamento da Petrobras completa 14 anos, (<http://www.oeco.org.br/reportagens/28021-baia-de-guanabara-vazamento-da-petrobras-completa-14-anos>). Acesso em 21/02/2014.
- Pazmiño, D.E.T.; Winkler, M.; Glieder, A.; Fraaije, M.W. 2010. Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. *Journal of Biotechnology*, 146: 9–24.
- Pérez-Pantoja, González, B.; Pieper, D.H. 2009. *Aerobic Degradation of Aromatic Hydrocarbons*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 40p.

- Petrobras, 2014. Oleo diesel, (<http://www.br.com.br/wps/portal/portalconteudo/produtos/paralocomotivas/oleo-diesel/> e <http://www.br.com.br/wps/wcm/connect/f78b9f804df359d990f0dd73cb9b3dc7/fispq-oleodiesel-s10.pdf?MOD=AJPERES>). Acesso em 02/07/2014.
- Petroleum Geoscience Technology (PGT). 2010. Geologia do petroleo, ([https://albertowj.files.wordpress.com/2010/03/geologia\\_do\\_petroleo.pdf](https://albertowj.files.wordpress.com/2010/03/geologia_do_petroleo.pdf)). Acesso em 06/03/2013.
- Pontes, V.M.O.; Menezes, E.A.; Cunha, F.A.; Ângelo, M.R.F.; Salviano, M.N.C.; Oliveira, I.R.N. 2006. Perfil de resistência de *Acinetobacter baumannii* a antimicrobianos nas unidades de terapia intensiva e semi-Intensiva do Hospital Geral de Fortaleza. *RBAC*, 38(2): 123-126.
- Rambabu,R.; Peri, S.R.; Allam, A.R. 2012. Computational analysis and function prediction of a hypothetical protein 1RW0. *International Journal of Computational Bioinformatics and In Silico Modeling*, 1(5): 58-62.
- Rambeloarisoa, E.; Rontani, J.F.; Giusti, G.; Duvnjak, Z.; Bertrand, J.C. 1984. Degradation of crude oil by a mixed population of bacteria isolated from sea-surface foams. *Marine Biology*, 83(1): 69-81.
- Ramos, J.L.; Marqués, S. 1997. Transcriptional control of the *Pseudomonas* Tol plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. *Annu. Rev. Rev. Microbiol*, 51:341–72.
- Rigo, M.; Monte-Alegre, R.; Vidal Bezerra, J. R. M. V.; Coelho, N.; Bastos, R. G. 2010. Catechol biodegradation kinetics using *Candida parapsilopsis*. 53: 481-486.
- Ritto, C. 2012. Chevron identifica novo vazamento no Campo do Frade, (<http://veja.abril.com.br/noticia/economia/chevron-identifica-novo-vazamento-no-campo-de-frade>). Acesso em 02/03/2014.
- Rosa, P.; Ordoñez, R. 2011. Petrobras derramou em 2010 quase dobro de óleo da Chevron, (<http://oglobo.globo.com/economia/petrobras-derramou-em-2010-quase-dobro-de-oleo-da-chevron-3332275>). Acesso em 02/03/2014.

- Rosato, Y.B. 1997. Biodegradação de petróleo. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. *Microbiologia ambiental*. Jaguariúna. Embrapa-CNPMA, Cap. 14, p. 307-334.
- Sá, C.S.L.C.; Hinrichsen, S.M.L. 2009. Perfil de resistência de *Acinetobacter* a antimicrobianos em unidades de terapia intensiva no nordeste, Brasil. XVII Congresso de Iniciação Científica. UFPE. 4p.
- Santos, A.F.D. 2010. Identificação e caracterização de peptidases secretadas pela bactéria halofílica *Halobacillus blutaparonensis*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 75p.
- Seo, J.S.; Keum, Y.S.; Li, Q.X. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. *International Journal of Environmental Research*. Public Health, 6: 278- 309.
- Silva, C.M.M.S.; Melo, I.S.M.; Fay, E.F. 2004. Biotransformação de agrotóxicos e biorremediação. In: Silva, C.M.M.S.; Fay, E.F. *Agrotóxicos e meio ambiente*. 1.ed. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica, Cap. 4, p. 145-192.
- Silva, A.M.S.; Corrêa, G.C.; Reis, E.M. 2007. Proteômica – uma abordagem funcional do estudo do genoma. *Saúde Ambiente em Revista*, 2(2): 1-10.
- Silva, H. H. B.; Schneider, A. L. S.; Wisbeck, E.; Furlan, S. A. 2009. Biodegradation of 2,4 dichlorophenol by *Pleurotus ostreatus* DSM 1833. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52: 1563-1570.
- Slater, F.R.; Bailey, M.J.; Tett, A.J.; Turner, S.L. 2008. Progress towards understanding the fate of plasmids in bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol*, 66: 3–13.
- Souza-Neto, J.N.; Araújo, S.P.; Batista, I.H.; Pereira, J.O.; Andrade, E.V. 2013. 2014. Proteomic Analysis of Petroleum Degrading Bacteria. *BMC Proceedings*, 2014, 8:(4):p240.
- Souza, J.; Pamplona, M.R.S.; Sousa, L.A.A.; Araújo, L. 2006. Classificação de risco dos agentes biológicos. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Ciência e Tecnologia. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 36p.

Ministério da Saúde,

- Stratton, M.D. 1983. Topics in clinical microbiology: *Acinetobacter*, (<http://www.jstor.org/discover/10.2307/30142555?sid=21106137063413&uid=2&uid=2134&uid=70&uid=3737664&uid=4>). Acesso em 25/01/2015.
- Sun, J.Q.; Xu, I.; Tang, Y.Q.; Chen, F.M.; Wua, X.L. 2012. Simultaneous degradation of phenol and n-hexadecane by *Acinetobacter* strains. *Bioresource Technology*, 123: 664–668.
- Tabish, S.; Raza, A.; Nasir, A.; Zafar, S.; Bokhari, H. 2011. Analysis of glycosylation motifs and glycosyltransferases in Bacteria and Archaea. *Bioinformation* 6(5): 191-195.
- Tanaka, T.; Tateno, Y.; Gojobori, T. 2005. Evolution of vitamin B6 (pyridoxine) metabolism by gain and loss of genes. *Mol. Biol. Evol.*, 22(2):243–250.
- Throne-Holst, M.; Wentzel, A.; Ellingsen, T.E.; Kotlar, H.K.; Zotchev, S.B. 2007. Identification of novel genes involved in long-chain n-alkane degradation by *Acinetobacter* sp. strain DSM 17874. *Applied environmental microbiology*, 73(10): 3327–3332.
- Tiburtius, E.R.L.; Peralta-Zamoral, P.; Leal, E.S. 2004. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Quim. Nova*, 27: 441-446.
- Top, E.M.; Springael, D. 2003. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, 14: 262–269.
- Tortora, G. J.; Funke, B.R.; Case, C.L. 2005. *Microbiologia*. 8ª ed. Porto Alegre: Ed. Artmed. 920p.
- Uniprot. P32322 - P5CR1\_HUMAN - Pyrroline-5-carboxylate reductase 1, mitochondrial (<http://www.uniprot.org/uniprot/P32322>). Acesso em 02/01/2015.
- Uniprot. P0A6Q3 - FABA\_ECOLI - 3-hydroxydecanoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase. (<http://www.uniprot.org/uniprot/P0A6Q3>). Acesso em 01/01/2015.
- Vieira, L.P. 2010. *Caracterização molecular e bioquímica da prolina desidrogenase de Trypanossoma cruzi, um possível alvo terapêutico*. Tese de doutorado, Univerisidade de São Paulo, São Paulo, 69p.

- Wang, R.F.; Wennerstrom D.; Cao, W.W.; Khan, A.A.; Cerniglia, C.E. 2000. Cloning, expression, and characterization of the katG gene, encoding catalase–peroxidase, from the polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Mycobacterium sp.* strain PYR-1. *Appl Environ Microbiol*, 66(10):4300-4304.
- Wang, Y.; Tian, Y.; Han, B.; Zhao, H.; Bi, J.; CAI, B. 2007. Biodegradation of phenol by free and immobilized *Acinetobacter sp.* strain PD12. *Journall of Environmental Sciences* 19: 222-225.
- Wentzel, A.; Ellingsen, T.E.; Kotlar, H.K.; Zotchev, S.B.; Throne-Holst, M. 2007. Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76:1209–1221. Doi 10.1007/s00253-007-1119-1
- Whitman, C.P. 2002. The 4-oxalocrotonate tautomerase family of enzymes: how nature makes new enzymes using a  $\beta$ – $\alpha$ – $\beta$  structural motif. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 402: 1–13.
- Widdel, F.; Rabus, R. 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Environmental biotechnology*, 12: 259–276.
- Xu, P.; Gu, Q.; Wang, W.; Wong, L.; Bower, G.W.B.; Collins, C.H.; Koffas, M.A.G. 2013. Modular optimization of multi-gene pathways for fatty acids production in *E. coli*. *Nature comunication*. doi: 10.1038/ncomms2425.
- Yates, J.R. 1998. Mass Spectrometry and the Age of the Proteome. *Journal of Mass Spectrometry*, 33: 1-19.
- Zhao, B.; Yeo, C.C.; Poh, C.L. 2005. Proteome investigation of the global regulatory role of  $\sigma$ <sub>54</sub> in response to gentisate induction in *Pseudomonas alcaligenes* NCIMB 9867. *Proteomics*, 5(7): 1868–1876.
- Zhou, A.; Chen, Y.I.; Zane, G.M.; He, Z.; Hemme, C.L.; Joachimiak, M.P.; Baumohl, J.K.; He, Q.; Fields, M.W.; Arkin, A.P.; Wall, J.D.; Hazen, T.C.; Zhou, J. Functional characterization of Crp/Fnr-type global transcriptional regulators in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4): 1168–1177.
- Zhu, F.; Wu, R.; Zhang, H.; Wu, H. Structural and biochemical analysis of a bacterial glycosyltransferase. *Methods Mol Biol*, 1022: 29–39. doi:10.1007/978-1-62703-465-4\_3.

Zílio, E.L.; Pinto, U.B. 2002. Identificação e distribuição dos principais grupos de compostos presentes nos petróleos brasileiros. *Boletim Técnico Petrobras*, 45(1): 21-25.