



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

GENILTON DE OLIVEIRA CARDENES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Acinetobacter junii* SB132 NA
DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DO DIESEL.**

Manaus –AM

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

GENILTON DE OLIVEIRA CARDENES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Acinetobacter junii* SB132 NA
DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DO DIESEL.**

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

ORIENTADOR: Dr. EDMAR VAZ DE ANDRADE

CO-ORIENTADORA: Dra. ISABELLE BEZERRA CORDEIRO

Manaus-AM

2017

Ficha Catalográfica

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

C266a Cardenes, Genilton de Oliveira
Avaliação do potencial de acinetobacter junii SB132 na
degradação de hidrocarbonetos do diesel / Genilton de Oliveira
Cardenes. 2017
92 f.: il. color; 31 cm.

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

1. Acinetobacter junii. 2. Hidrocarbonetos. 3. Biorremediação. 4.
gc-ms. 5. Espectrometria de massas. I. Andrade, Edmar Vaz de II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

GENILTON DE OLIVEIRA CARDENES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Acinetobacter junii* SB132 NA
DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DO DIESEL.**

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

DEFESA DE DISSERTAÇÃO EM 26 / 10 / 2017

BANCA EXAMINADORA:

Titulares:

- Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade – (Presidente)
- Profa. Dra. Jerusa Araújo Quintão Arantes Farias – UFAM
- Profa. Dra. Giovana Anceski Bataglioni – UFAM

Suplentes:

- Profa. Dra. Enedina Nogueira de Assunção – UFAM
- Profa. Dra. Elen Bethen Pedraça dos Santos -UFAM

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as coisas realizadas que no seu maravilhoso intelecto foi proporcionando a mim.

À minha família, primeiramente aos meus pais, Arlindo Cardenes Ferreira e Gertrudes de Oliveira Cardenes que me ajudaram tanto emocionalmente como financeiramente durante toda minha vida, aos meus irmãos e primos que estão sempre ajudando e torcendo por mim.

Ao meu orientador Dr. Edmar Vaz de Andrade que mostrou ser muito mais que um excelente orientador, mas também como um segundo pai e verdadeiro amigo.

À minha inteligentíssima co – orientadora Isabelle Bezerra Cordeiro por todos os ensinamentos e ajuda crucial nessa etapa.

Aos amigos de laboratório, ao Julio Nino de Souza Neto pelos ensinamentos, paciência em ensinar e conselhos, ao Jeferson Ferreira do Santos e Filipe de Souza Mendes pela amizade, brincadeiras e auxílios, os amigos Maurício, Anita, Dina, Edson, Leissandra pela ótima companhia no ambiente de trabalho. A todos os outros colegas de laboratórios pela ajuda e amizade.

Ao prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen por toda ajuda e ensinamentos nos experimentos de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para essa etapa de minha vida.

EPÍGRAFE

O DNA é que manda!

DEDICATÓRIA

Dedico ao meu pai e mãe, pela paciência que tiveram, apoio e ensinamentos que fizeram chegar onde estou.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Alguns derivados do petróleo pós-refino. O óleo diesel corresponde a 35 % da composição do petróleo. Fonte: ANEEL, 2008..... 22
- Figura 2: Composição de hidrocarbonetos de um óleo diesel comercial brasileiro. Adaptado de (KAIPPER 2003)..... 23
- Figura 3: Maior vazamento de petróleo que ocorreu no Golfo do México nos Estados Unidos em 2010; (B): Vazamento de 30 mil litros de óleo diesel em um igarapé em Nova Olinda do Norte, interior do Amazonas 2017. Fonte: G1 portal de notícias. 25
- Figura 4: Fluxograma das etapas realizadas nesta pesquisa. ESI-MS: Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray; GC-MS: Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas. 31
- Figura 5: (A) -Localização da área de coleta de macrófita aquática *Eichhornia crassipes* (área mostrada pela seta vermelha). A localização global é S 3°8'50.30" e W 59°57'22,20", com elevação de 39m. (B) -A partir da superfície de suas folhas, *A. junii* SB132 foi coletada. 32
- Figura 6: Cromatograma geral do diesel recuperado do controle abiótico. O espectro mostram os principais picos representando os hidrocarbonetos da classe de alcanos de diferentes tamanhos (7 a 23 de cadeia carbonica). 39
- Figura 7: Cromatograma geral sobreposto do diesel do controle abiótico (vermelho) com o após 14 dias de cultivo como fonte de carbono para *A. junii* SB132 (preto). Nota-se que os picos em preto referentes às amostras obtidas do crescimento em 14 dias estão menores que os picos vermelhos (controle), demonstrando a biodegradação desses alcanos por *A. junii* SB132. 40
- Figura 8: Degradação de alcanos totais do diesel pela *A. junii* SB132 por 14 dias. No 1º dia, ocorre 43 % de degradação, atingindo 58 % no 4º dia de crescimento, permanecendo na mesma taxa até o 14º dia. Em azul, taxa de degradação de alcanos

totais obtidos por experimentos de GC-MS e em verde, a taxa de crescimento bacteriano monitorada por Espectrofotometria UV-VIS. 41

Figura 9: Alcanos do óleo diesel que tiveram maior taxa de degradação por *A. junii* SB 132 durante cultivo de 14 dias a 30°C. Os alcanos de 12 carbonos foram os que apresentaram maior taxa de degradação (86 %), seguido pelos alcanos com cadeia de 18 carbonos (79 %). 42

Figura 10: (A) Cromatograma geral dos alcanos do óleo diesel do primeiro teste de recuperação. (B) Cromatograma geral alcanos do óleo diesel do segundo teste de recuperação. O padrão de tamanho dos picos cromatográficos foram mantidos nos dois experimentos. 43

Figura 11: (A) Cromatograma geral dos alcanos do óleo diesel referentes ao controle abiótico de 14 dias. (B) Cromatograma geral do controle abiótico previamente preparado antes da análise em GC-MS. O padrão de tamanhos dos picos cromatográficos em ambas as condições foram mantidos. 44

Figura 12: Anotação funcional das proteínas identificadas de acordo a categoria de componente celular. Pode- visualizar uma maior quantidade de proteínas no citoplasma (48 %), seguido do citosol (15 %), proteínas de membrana (10 %), complexo multienzimático de β -oxidação de ácidos graxos (4 %). 45

Figura 13: Anotação funcional das proteínas identificadas de acordo a categoria de Função Molecular. Foram identificadas 41 proteínas da classe oxidorredutases (25 %), 27 proteínas transferases (16 %), 18 proteínas ligases (11 %), 14 proteínas de classificação diversa (8 %), 11 proteínas liases (7%), 11 proteínas GTPases (7 %), 9 proteínas ATPases (5 %), 10 proteínas hidrolases (6 %), 7 proteínas não descritas (4 %), 6 proteínas Isomerases (4%), 6 proteínas ligantes de DNA (4 %), 5 proteínas chaperonas (3 %) e 2 proteínas quinases (1 %). 46

Figura 14: Anotação funcional das proteínas de acordo com a categoria de processos biológicos. Processos biossintéticos de moléculas como aminoácidos, nucleotídeos,

ácido graxos entre outras (34 %), oxidação de ácidos graxos (10 %), ciclo do ácido tricarboxílico (CAT) com desvio do glioxilato (CG) (11%), não descrito (5 %), Oxidação de alcanos (4 %), outros processos (40 %). 48

Figura 15: Proteínas da família OmpR (KdpD, KdpE, MtrB e MtrA) regulando genes em resposta a estresse osmótico na membrana celular. Fonte: (NIE et al., 2013). 50

Figura 16: Mapa integrativo de processos biológicos de proteínas de *A. junii* SB132 envolvidas na produção de ácidos graxos. O tamanho do nó indica a quantidade de proteínas associadas, e as cores mais escuras um maior suporte estatístico (P-value) para cada categoria. As setas vermelhas largas indicam os nós selecionados para obtenção das proteínas descritas na tabela 2. 51

Figura 17: Esquema ilustrativo do sistema de sinalização quimiosensorial de *A. Dieselolei* B-5. A proteína CheY (em azul) descrita por WANG e SHAO, 2013 também foi identificada no presente trabalho em *A. junii* SB132. Modificado de WANG e SHAO, 2013. 53

Figura 18: As proteínas identificadas na via de degradação de alcanos em *A. junii* SB132. Alcano 1-monoxigenase (AlkB) (EC 1.14.15.3) (Uniprot D0SIU3), álcool desidrogenase dependente de ferro (EC 1.1.1.1) (Uniprot D0SLW7) e aldeído desidrogenase B (EC 1.2.1.-) (Uniprot D0SIK1). Fonte: Adaptado K.E.G.G. PATHWAY, 2017. 54

Figura 19: Via de degradação de *N*-alcanos de cadeia média, mostrando a localização e funções das enzimas envolvidas no sistema alcano hidroxilase em *P. putida* Gpo1. As figuras preenchidas representam as enzimas identificadas em *A. junii* SB132. Fonte: Adaptado de VAN HAMME et al. 2003 56

Figura 20: Via de oxidação terminal da degradação de *N*-alcanos. Em bactérias aeróbicas, o ataque inicial de alcanos sempre necessita de uma molécula de oxigênio como um co-substrato. A ativação dos alcanos pode ser feita pelas enzimas alcano 1-

monoxigenase para alcanos de C5 -C17, ou Citocromo P450 para alcanos C5-C10 destacadas em vermelho. Fonte: Modificado de ROJO, 2009. 57

Figura 21: Os sideróforos se ligam ao ferro fora da bactéria e transportam-o através da proteína Ton- β receptora dependente de sideróforo. O complexo de sideróforo-ferro no espaço periplasmático então é transportado através de um dos vários transportadores ABC para o citoplasma. Fonte: Modificado de ESKRA 2012. 58

Figura 22: Processo de β -oxidação ácidos graxos. Em (a), todas as quatro etapas que compreendem a β -oxidação dos ácidos graxos e em (b), uma exemplificação da quebra de ácidos graxos saturados de cadeia par, gerando ao final do processo, as moléculas de acetil-CoA. As quatro enzimas chaves nesses processos foram identificadas em *A. junii* SB132 e estão circuladas em vermelho. Fonte: NELSON e COX, 2014. 60

Figura 23: Ciclo do TCA e derivação do glioxilato. A derivação do glioxilato é realizada por isocitratoliase (A) e malato sintase (B). O succinato produzido via derivação do glioxilato é convertido em malato pela succinato desidrogenase (C). O malato é convertido em oxaloacetato pela malato desidrogenase (D) ou é utilizado pela enzima málica na gliconeogênese para produzir piruvato. O piruvato é então convertido por fosfoenolpiruvato sintase (F) para produzir fosfoenolpiruvato. Fonte: adaptado SABIROVA et al., 2006. 61

Figura 24: Produção de metabólitos a partir de acetil-CoA, via ciclo do ATC e derivação do glioxilato. O principal intermediário metabólico em células cultivadas com alcano é o malato, formado através da canalização de acetil-CoA para a derivação do glioxilato. Fonte: Modificado de SABIROVA et al., 2006. 62

Figura 25: Mapa integrativo de processos biológicos de proteínas de *A. junii* SB132 envolvidas biossínteses de aminoácidos (A), metabolismo de cofatores (B) e carboidratos (C). O tamanho do nó indica a quantidade de proteínas associados, e as cores mais escuras um maior suporte estatístico (P-value) para cada categoria. As setas vermelhas indicam o nós com os respectivos processos discutidos. 63

Figura 26: Modelo proposto para biodegradação de alcanos do diesel pela *A. junii* SB132 a partir dos resultados obtidos nesta pesquisa. 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos componentes do petróleo pelo sistema S.A.R.A. Fonte: (MCGENITY, 2014; ZÍLIO e PINTO, 2002; ASHOORI et al., 2017)..... 21

Tabela 2: Proteínas que participam no processo de biossíntese de ácidos carboxílicos de acordo com as análises no plugin BinGO..... XI

LISTA DE ABREVIATURAS

ANP- Agência Nacional do Petróleo

HPAS- Hidrocarbonetos policíclico aromáticos

CENPES- Centro de Pesquisa e Desenvolvimento da Petrobrás

EPA- Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. Do inglês: United States Environmental Protection Agency

LB- Luria Bertani

BH-Bushnell Hass

GC- Cromatografia gasosa. Do inglês: Gas Chromatography

IEA- Agência Internacional de Energia. Do inglês: International Energy Agency.

CE– Refere-se ao número de carbono de um dado composto

ITRC- O Conselho de Tecnologia e Regulatório Interestadual Do inglês: The Interstate Technology & Regulatory Council

(GC-MS)- Comatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Do inglês: Gas Chromatography coupled to mass spectrometry

(ES-MS)- Espectrometria de massas com ionização por "electrospray". Do inglês: Electrospray Ionization Mass Spectrometry

KEGG: Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto. Do inglês: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

SDS- Dodecil Sulfato de Sódio. Do inglês: Sodium Dodecyl Sulfate

PAGE - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida. Do inglês: Polyacrylamide Gel Electrophoresis

RESUMO

Atualmente, a exploração industrial do petróleo bem como o uso de seus derivados vem crescendo cada vez mais devido à sua importância econômica para a sociedade. O petróleo é uma mistura complexa de vários compostos orgânicos, constituído principalmente por hidrocarbonetos. A ocorrência de contaminação do meio ambiente com estes compostos é agravada, pois, além da sua difícil degradação, o petróleo requer muitas etapas de processamento, desde a sua extração, transporte, refino até a armazenagem dos derivados, aumentando drasticamente a sua exposição ao meio ambiente. Uma alternativa para a degradação de hidrocarbonetos é o uso de bactérias e tal processo, nomeado biodegradação, depende das condições do ecossistema e do meio ambiente local. Com isso, a biorremediação é um processo de tratamento que utiliza microrganismos que degradam e transformam compostos orgânicos poluentes existentes nos ambientes contaminados em compostos menos complexos e geralmente mais facilmente degradáveis, podendo chegar até a sua mineralização. Neste estudo foi utilizada a bactéria *Acinetobacter junii* SB132 previamente isolada a partir de macrófitas aquáticas do Rio Negro nas proximidades da cidade de Manaus (AM). Sua capacidade de degradação de hidrocarbonetos foi avaliada fornecendo óleo diesel como única fonte de carbono. Os resultados obtidos pela técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de Massas (GC-MS) mostraram que os alcanos do óleo diesel foram degradados em média 58 % por *A. junii* SB132 após 4 dias de cultivo em meio mínimo a 30 °C. Os alcanos individuais de óleo diesel foram degradados entre 60% - 87%. A partir de proteínas extraídas dessa linhagem também foram feitas análises por ESI-MS que identificaram proteínas e rotas metabólicas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos como a via de degradação, especialmente de alcanos. Esse estudo sugere que essa linhagem bacteriana possui um grande potencial para biorremediação de ambiente contaminado por diesel.

Palavras chaves: *Acinetobacter junii*, Hidrocarbonetos, Biorremediação, GC-MS, espectrometria de massas, proteômica.

ABSTRACT

Industrial exploitation of petroleum as well as the use of its derivatives has been growing due to its importance for society. Petroleum is a complex mixture of several organic compounds, mainly hydrocarbons compounds. The occurrence of contamination of the environment with these components is worrisome because in addition to its difficult degradation, oil requires many stages of processing, from its extraction, transportation, refining to the storage of the derivatives, dramatically increasing its exposure to the environment. An alternative to hydrocarbons degradation is the use of bacteria, by process called biodegradation, that depends ecosystem conditions and the local environment. Thus, bioremediation is a treatment process that uses microorganisms that degrade and transform existing organic pollutants in less complex and generally more easily degradable compounds, which can even reach mineralization. In this study we used the *Acinetobacter junii* SB132 bacterium previously isolated from aquatic macrophytes of Rio Negro near the city of Manaus (AM). Its hydrocarbon degradation capacity was tested in presence of diesel oil as the only carbon and energy source. In this work, the results obtained by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) showed that the alkanes of the diesel oil were degraded on average 58% by *A. junii* SB132 at 30 °C after 4 days of culture. The individual alkanes of diesel oil were degraded between 60 % -87 %. Proteomic study revealed proteins and metabolic pathway of *A. junii* SB132 involved in the degradation of hydrocarbons, specially alkanes. This study suggests that this degrading bacterial lineage of hydrocarbons has a great potential for bioremediation of the environment contaminated by diesel.

Keywords: *Acinetobacter junii*, Hydrocarbons, Bioremediation, GC-MS, mass spectrometry, proteomics.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Petróleo	20
2.1.1. Petróleo: descrição e composição.	20
2.1.2. Refino do petróleo.....	21
2.2 Óleo Diesel	22
2.3 Ambientes contaminados por petróleo e diesel	24
2.4 Biorremediação.....	25
2.4.1 Biorremediação por atuação microbiana e suas vantagens	26
2.4.2 Fatores intervenientes na eficiência na biodegradação de petróleo e seus derivados	26
2.5 Degradação de hidrocarbonetos pelo gênero <i>Acinetobacter</i>	27
2.6 Produção de biossurfactantes.....	28
2.7 Espectrometria de massas aplicada a proteoma.....	28
2.8 Espectrometria de massas aplicada a de biodegradação de hidrocarbonetos.	29
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo Geral.....	30
3.2 Objetivos Específicos	30
4.MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Coleta da linhagem <i>A. junii</i> SB132 com capacidade de biodegradação de óleo diesel.	32
4.2 Cultivo de <i>A. junii</i> SB132.....	33
4.3 Análise de degradação dos hidrocarbonetos por <i>A. junii</i> SB 132 utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).	34
4.3.1Extração dos hidrocarbonetos alifático do óleo diesel.	34
4.3.2 Avaliação da recuperação da extração de alcanos do óleo diesel.	35
4.4 Análises proteômicas de <i>A. junii</i> SB132.....	36

4.4.1 Obtenção do extrato protéico.	36
4.4.2 Quantificação do extrato proteico.	36
4.4.3 Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE).....	37
4.4.4 Recorte das bandas e digestão das amostras.	37
4.4.5 Espectrometria de massas para identificação das proteínas.....	37
4.5 Montagem da rede biológicas das proteínas identificadas.....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Degradação dos hidrocarbonetos por <i>A. junii</i> SB132 utilizando (GC-MS).....	39
5.1.1 Perfil de hidrocarbonetos alifáticos saturados constituintes do óleo diesel. ..	39
5.1.2 Degradação dos hidrocarbonetos pela <i>A. junii</i> SB132 durante os diferentes dias de cultivo.....	40
5.1.3 Teste de recuperação dos alcanos do óleo diesel	43
5.2 Análises proteômicas por ES-MS dos extratos protéico de <i>A. junii</i> SB132 crescida por 4 dias.....	45
5.2.1 Anotação funcional das proteínas identificadas de <i>A. junii</i> SB132.....	45
5.2.2 Proteínas identificadas em <i>A. junii</i> SB132 encontram-se envolvidas em diversos processos biológicos.	48
5.3 <i>A. junii</i> SB132 expressa proteínas que participam da captação, degradação e na resposta ao estresse de hidrocarbonetos.....	49
5.4 <i>A. junii</i> SB132 expressa proteínas envolvidas em processos chaves na degradação de hidrocarbonetos óleo diesel.....	53
5.5 Proteínas relacionadas ao metabolismo de álcool e aldeído derivado da oxidação de alcanos são expressas por <i>A. junii</i> SB132.	59
6. CONCLUSÕES.....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	79

1. INTRODUÇÃO

O petróleo é um dos grandes movimentadores da economia mundial pela sua ampla representatividade na geração de energia, responsável por aproximadamente 40 % de toda a energia mundial. Também merece destaque pela disponibilização de seus derivados na indústria (TONINI et al., 2010). Contudo, ao longo da história mundial, vários acidentes com derramamentos de petróleo e derivados têm sido descritos, culminando em grandes catástrofes ambientais (BORDALO, 2012).

Durante a extração, transporte ou refino podem ocorrer vazamentos de petróleo bruto ou de combustíveis já refinados, causando graves danos ao meio ambiente, como por exemplo, poluições de ambientes terrestres ou aquáticos. A preocupação com possíveis acidentes ambientais torna-se ainda maior, quando se trata de atividades de exploração inserida no interior da floresta amazônica, onde se apresenta uma vasta concentração de biodiversidade, seja ela animal, vegetal ou microbiológica (ALMEIDA-VAL, 2011). Para que o potencial energético do petróleo seja aproveitado ao máximo, ele deve ser submetido a uma série de processos, a fim de se desdobrar nos seus diversos derivados. Dentre estes, o óleo diesel é obtido em maior quantidade, logo é o derivado que mais está sujeito a chance de derramamentos (ANP, 2008). Devido, principalmente, à complexidade dessas misturas, normalmente o tratamento de áreas contaminadas por essas substâncias é bastante difícil e problemático. Além disso, o estudo feito por IEA (2011) prevê um aumento de 13 % no consumo de petróleo no Brasil e que o país estará em terceiro lugar entre os países que mais aumentarão a sua produção de petróleo até 2035. Portanto, espera-se uma expansão para o setor de óleo diesel e gás no país no decorrer dos próximos anos, e conseqüentemente o aumento do número de ocorrência de acidentes.

O óleo diesel é uma mistura complexa que contém vários compostos, sendo que os hidrocarbonetos representam a fração majoritária. De acordo com a origem do petróleo do qual foi derivado, sua composição química e as suas propriedades físicas podem variar de um campo petrolífero para outro. Diante disso, de forma geral, os compostos de interesse que exigem maior preocupação ambiental e que, normalmente, são os principais a serem identificados e quantificados antes e durante um processo de remediação são alcanos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, que estão presentes em concentrações relativamente altas, e causam danos físicos, químicos e biológicos ao meio ambiente (HUANG et al., 2013). Devido à sua complexidade, os hidrocarbonetos

policíclicos aromáticos (HPAs), estes, por serem formados por múltiplos anéis de benzeno, são mais resistentes a degradação microbiológica, e bastante persistentes no ambiente (SEO et al., 2009). No entanto deve se dar preocupação também aos alcanos, cujo número do átomo de carbono pode variar de 1 a mais de 60. Estes hidrocarbonetos podem ser lineares, ramificados ou cíclicos saturados formados exclusivamente por ligações muito estáveis de átomos de carbono e hidrogênio. Portanto, também são compostos bastante inertes no ambiente o que representa um problema ambiental e econômico chave, e ainda é um grande desafio para a descontaminação ambiental (ROJO, 2009).

A biorremediação é uma tecnologia muito eficaz e promissora na recuperação de áreas contaminadas por petróleo e seus derivados. Essa técnica é basicamente um processo natural, onde microrganismos degradam os contaminantes ambientais em formas menos tóxicas ou até em não tóxicas (LIMA, 2011). As estratégias de biorremediação têm sido adotadas seriamente como uma maneira eficaz e de baixo custo para a remediação de solos contaminados por petróleo e de seus derivados como o óleo diesel; causando, ainda, menores distúrbios na superfície a ser tratada. A habilidade dos microrganismos de degradar compostos orgânicos é cientificamente reconhecida e vem sendo utilizada ao longo do tempo em processos de tratamento biológico de efluentes líquidos e de resíduos sólidos (RINCÓN et al., 2008). Uma vez que os microrganismos desempenham a tarefa de reciclar a maior parte das moléculas, devido sua extraordinária diversidade metabólica, têm sido desenvolvidas pesquisas biotecnológicas destinadas a diversas finalidades (CLAIRE, 2005).

2. Revisão de literatura

2.1 Petróleo

2.1.1. Petróleo: descrição e composição.

O petróleo é um óleo, inflamável com cheiro único e cor entre negro e castanho. Sua composição elementar encontra-se nas seguintes faixas: carbono (83-87 %); hidrogênio (11-14,4 %); oxigênio (0,5 %); nitrogênio (0,11-1,7 %); enxofre (0,06-8,0 %) e metais pesados (0,3 %) (FARAH e ARAÚJO, 2012).

Na literatura encontram-se duas teorias que explicam a origem do petróleo: a teoria abiogênica (inorgânica) e a teoria biogênica (orgânica). De acordo com Glasby (2006); Hook et al. (2010), existem duas teorias que sustentam a origem abiogênica do petróleo, a teoria Russo Ucraniana e a Teoria de Thomas Gold. A primeira trata os hidrocarbonetos como um material fundamental que entrou em erupção na superfície da terra, e, por essa razão não é um combustível fóssil. A segunda está relacionada com a origem natural do metano na terra. A teoria biogênica afirma que o petróleo é originário de restos de matéria biológica.

A base da sua composição são os hidrocarbonetos constituídos por átomos de carbono e hidrogênio. Os hidrocarbonetos são classificados em saturados, insaturados e aromáticos, de acordo com sua estrutura. Denomina-se alcanos, os hidrocarbonetos saturados constituídos de átomos de carbono unidos somente por ligações simples, com número maior de átomos de hidrogênio organizados em cadeias lineares, ramificadas ou cíclicas, interligadas ou não. Os hidrocarbonetos insaturados apresentam pelo menos uma dupla ou tripla ligação entre os carbonos, enquanto que os hidrocarbonetos aromáticos, também chamados arenos apresentam pelo menos um anel benzeno na sua estrutura (THOMAS, 2001).

Na composição química do petróleo, átomos de carbono unem-se nas moléculas de hidrocarbonetos formando compostos em forma de anel (hidrocarboneto cíclico) ou de cadeia linear (hidrocarboneto acíclico ou alifático). Além disso, a formação de moléculas saturadas ou não saturadas se deve a forma de como cada átomo de carbono pode ser completado: de modo total ou apenas parcial por átomos de hidrogênio. Os hidrocarbonetos saturados cíclicos são denominados naftenos e os acíclicos, parafinas; os não saturados cíclicos chamam-se aromáticos e os acíclicos, oleofinas ou alcenos (CRISTALE et al., 2008). O petróleo é submetido ao processo de refino, obtendo-se

seus derivados que são distribuídos ao mercado consumidor. Usando o sistema de classificação SARA (Saturados-Aromáticos-Resinas-Asfaltenos), os constituintes do petróleo são divididos como mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Classificação dos componentes do petróleo pelo sistema S.A.R.A. Fonte: (MCGENITY, 2014; ZÍLIO e PINTO, 2002; ASHOORI et al., 2017).

Saturados	Aromáticos	Resinas	Asfaltenos
15-60 %	3-30 %	6-12 %	6 %
Ciclo-alcanos (Naftênicos)	Mono- aromáticos	Hidrocarbonetos polares	Hidrocarbonetos grandes
Alcanos de cadeia Linear e ramificados (Parafinas)	Poli-aromáticos	Hidrocarbonetos heterocíclicos	Contendo N, S e O com vestígios de metais pesados

Com isso, além da extração, a cadeia produtiva compreende mais três etapas: transporte do óleo cru (geralmente por oleodutos ou navios), refino e distribuição (entrega dos derivados ao consumidor final, geralmente por caminhões, tanques e embarcações) (ANEEL, 2008).

2.1.2. Refino do petróleo

Nas refinarias, o petróleo é submetido à destilação fracionada e consequente obtenção de seus derivados. Os derivados mais conhecidos são: gás liquefeito (GLP, ou gás de cozinha), gasolina, nafta, óleo diesel, querosene de aviação e de iluminação, óleo combustível, asfalto, lubrificante, combustível marítimo, solventes, parafinas e coque de petróleo (ANEEL, 2008).

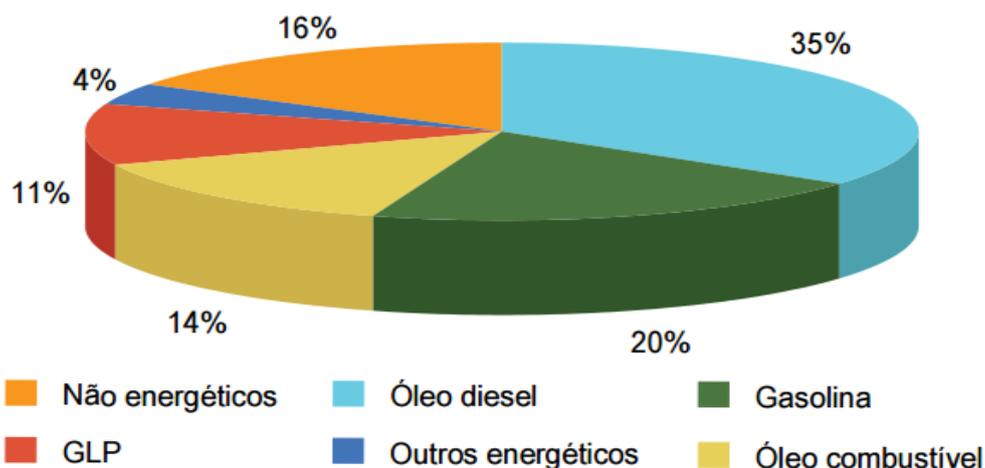


Figura 1: Alguns derivados do petróleo pós-refino. O óleo diesel corresponde a 35 % da composição do petróleo. Fonte: ANEEL, 2008

2.2 Óleo Diesel

Uma das frações do petróleo é o óleo diesel, que também é uma mistura complexa, composta de aproximadamente 40 % de *n*-alcanos, 40 % de iso e cicloalcanos, 20 % de hidrocarbonetos aromáticos e pequena porcentagem de isoprenóides, além de enxofre, nitrogênio e compostos oxigenados (PETROBRAS, 2011). É inflamável, tóxico, volátil e ligeiramente mais denso do que o querosene, destilado na faixa de 250 °C à 400 °C. Porém, a composição de um óleo diesel específico dependerá da fonte do petróleo, do método de produção e dos processos de destilação (ANP, 2008).

Conforme a Resolução da ANP n°. 65/2011, os óleos diesel rodoviários no Brasil são classificados da seguinte forma:

a) Óleo diesel tipo A: combustível proveniente de processos de refino de petróleo, centrais de matérias-primas petroquímicas autorizadas, sem adição de biodiesel;

b) Óleo diesel tipo B: é o óleo diesel tipo A com adição de biodiesel.

Kaipper (2003) estudou uma amostra de óleo diesel comercial brasileiro, definindo a sua composição: 75,2 % em massa dos hidrocarbonetos alifáticos, dentre eles, 0,4 % possuíam duplas ligações em suas cadeias (compostos oleofínicos), os outros 24,8 % correspondiam a hidrocarbonetos aromáticos: 17,7 % monoaromáticos e 7,1 % policíclicos aromáticos. Dos HPAs detectados, 79 % correspondiam a naftalenos (compostos com 2 anéis aromáticos), 19 % a poliaromáticos de 3 anéis e o restante 2 %, eram policíclicos de maior peso molecular (4 a 6 anéis). Podemos ver com esses dados que os hidrocarbonetos majoritários no óleo diesel estudado por Kaipper (2003) são os alifáticos saturado.

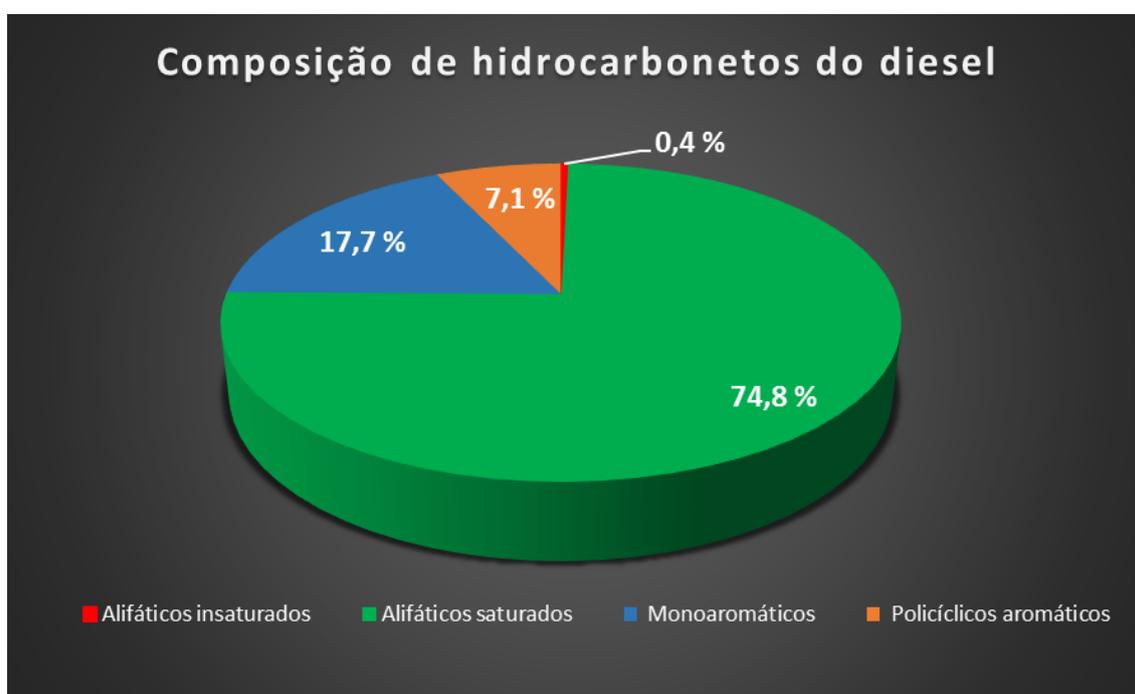


Figura 2: Composição de hidrocarbonetos de um óleo diesel comercial brasileiro. Adaptado de (KAIPPER 2003).

2.3 Ambientes contaminados por petróleo e diesel

A exploração petrolífera constitui uma ameaça em potencial aos ecossistemas com a possibilidade de derramamentos acidentais de petróleo, quer sejam nos campos de produção, quer em vazamentos nos oleodutos e estações de bombeamento, e mesmo no transporte através de embarcações fluviais que podem causar impactos negativos e significativos em locais como a atmosfera, solos, sedimentos, águas superficiais e subterrâneas, meio marinho, assim como também causar impactos na diversidade biológica e até efeitos adversos para a saúde humana (ANIEFIOK, 2013). O óleo derramado pode contaminar o abastecimento de água potável. Em 2013, dois derramamentos de petróleo diferentes contaminaram o abastecimento de água para trezentas mil pessoas em Miri, na Malásia e oitenta mil pessoas na Coca, Equador. Em 2000, nascentes foram contaminadas por um derramamento de óleo no Condado de Clark, Kentucky (ROBERTSON e KRAUSS, 2010). A contaminação também pode levar a um impacto econômico nas indústrias de turismo e extração de recursos marinhos assim como também na saúde mental das pessoas que vivem no local contaminado. Por exemplo, o derramamento de óleo da *Deepwater Horizon* afetou o turismo de praia e a pesca ao longo da costa do Golfo do México, e as partes responsáveis foram obrigadas a compensar as vítimas economicamente (GOULD et al., 2015).

O risco possível para os ecossistemas e populações das áreas impactadas pela exploração petrolífera ou mesmo na ocorrência de um derramamento de óleo se deve ao fato do petróleo e seus derivados como óleo diesel, conter substâncias de alta toxicidade para a biota e os seres humanos. Os compostos tóxicos ocasionam diversos efeitos biológicos, tais como efeitos neurológicos, imunológicos, efeitos no sistema reprodutivo, efeitos genotóxicos e carcinogênicos, dentre outros (WHO, 1998; IRWIN, et al., 1997; ATSDR, 1995). Na Amazônia Ocidental, há de fato, relatos desses efeitos em humanos (SEBASTIAN e HURTIG et al., 2005) e estudos em laboratório indicam efeitos na biota (MATSUO, et al., 2006; BRAUNER, e tal., 1999). Por essa causa, o petróleo e seus resíduos necessitam de destinação ou tratamento adequados, assim como as áreas contaminadas precisam ser recuperadas mediante o uso de tecnologias de remediação. Na figura 3 encontram imagens de derramamentos de petróleo nos Estados Unidos e de óleo diesel em plena floresta amazônica.

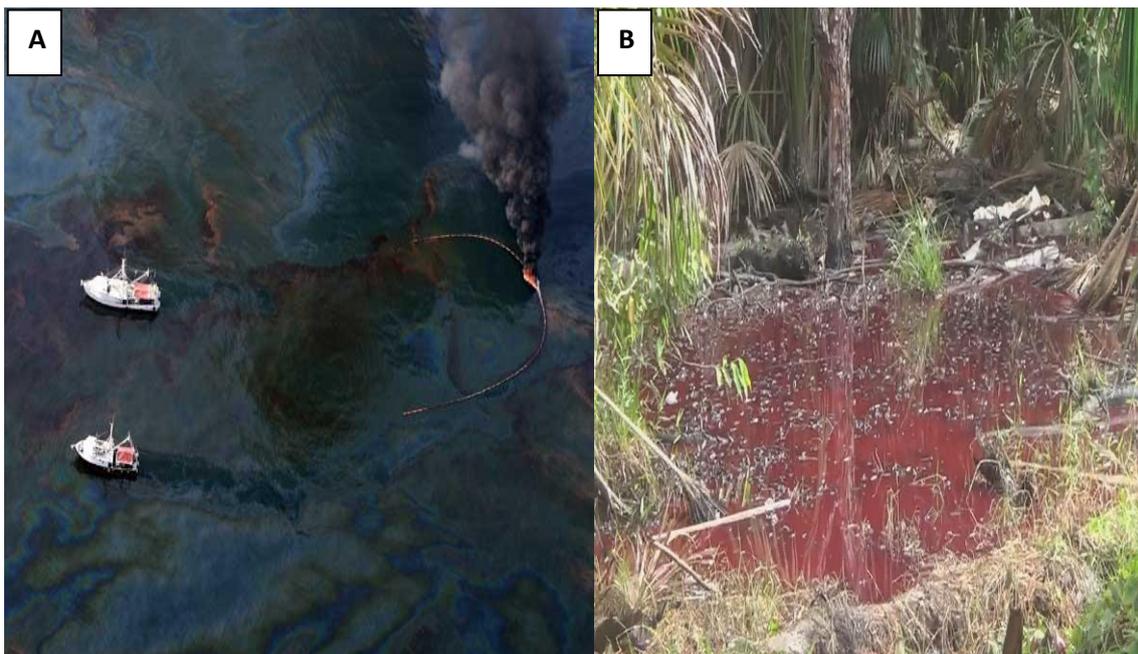


Figura 3: Maior vazamento de petróleo que ocorreu no Golfo do México nos Estados Unidos em 2010; (B): Vazamento de 30 mil litros de óleo diesel em um igarapé em Nova Olinda do Norte, interior do Amazonas 2017. Fonte: G1 portal de notícias.

2.4 Biorremediação

A escolha da técnica mais adequada para despoluição depende de vários fatores como: o tipo de poluente e quantidade; o tipo de ecossistema contaminado e sua acessibilidade; as condições econômicas do poluidor; a legalidade da técnica, as pesquisas existentes para dar suporte técnico aos órgãos ambientais; a proximidade com comunidades; o menor impacto aos ambientes; a repercussão na população que venha a ser afetada pela contaminação; os custos da recuperação; além das especificidades de cada contaminação. A biorremediação é a técnica de despoluição que mais se encaixa nesses fatores.

O termo biorremediação pode ser definido como o processo que usa sistemas biológicos na aceleração da transformação dos poluentes em produtos não tóxicos ou menos tóxicos (ADAMS et al., 2015; LEUNG 2004). Os microrganismos nativos desempenham um papel fundamental na biorremediação, como agentes biogeoquímicos, para transformar compostos orgânicos complexos em compostos inorgânicos simples ou em seus elementos constituintes. Este processo é denominado mineralização. Normalmente utiliza-se o metabolismo de microrganismos para eliminação rápida de poluentes, para diminuir sua concentração para níveis aceitáveis e transformá-los em

compostos de baixa toxicidade, ou mesmo mineraliza- los totalmente (COLLA e COSTA 2003; MANDRI e LIN 2007; YAKUBU, 2007).

2.4.1 Biorremediação por atuação microbiana e suas vantagens

A técnica de biorremediação utilizando microrganismos consiste em estimular microrganismos nativos nos locais contaminados para que eles degradem o poluente, podendo até fornecer nutrientes e outras substâncias químicas essenciais para o seu metabolismo em níveis ideais. A presença de microrganismos com as capacidades metabólicas apropriadas é o requisito mais importante para a biorremediação de derramamento de óleo de acordo com (VENOSA et al. 2002). Assim, os sistemas de biorremediação são limitados pelas capacidades dos micróbios nativos. Apesar disso, pesquisadores estão atualmente investigando as formas de fortificar locais contaminados com microrganismos não nativos incluindo microrganismos geneticamente modificados especialmente adequados para degradar os contaminantes (ADAM et al., 2015)

Diversos aspectos da biorremediação usando microrganismos a torna uma alternativa promissora na degradação de petróleo e diesel, demonstrando vantagens sobre outros métodos de tratamento, uma vez que consiste em um processo natural. Algumas técnicas podem ser aplicadas *in situ* com perturbação ambiental mínima, sendo muitas vezes mais baratas e mais seguras e outras podem ser aplicadas *ex situ*, executando sua aplicabilidade fora do local atingido, ou seja, aplicada em laboratório. Além do mais, muitos microrganismos degradam diversos poluentes permanentemente, podendo ser associados a métodos de tratamento físicos ou químicos (YAKUBU, 2007). Várias pesquisas têm indicado que a biorremediação usando microrganismo é uma alternativa segura e eficaz de remoção de ambientes contaminado por hidrocarbonetos (DÍAZ, 2004).

2.4.2 Fatores intervenientes na eficiência na biodegradação de petróleo e seus derivados

A eficácia de cada processo de biodegradação depende de fatores físicos, químicos e biológicos como a biomassa microbiana, diversidade populacional, atividades enzimáticas, características físico-químicas do substrato, estrutura molecular do poluente e sua concentração. Vários fatores ambientais que envolvem pH, temperatura, umidade, oxigênio dissolvido, nutrientes, fontes de carbono e energia,

disponibilidade de receptores de elétrons e a presença de co-metabólitos influenciam no uso de poluentes pelos microrganismos (SEO et al., 2009).

2.5 Degradação de hidrocarbonetos pelo gênero *Acinetobacter*

As bactérias pertencentes ao gênero *Acinetobacter* ganharam uma grande atenção por causa de seu potencial papel de aplicação em processos de grande importância ambiental (PANTOPHLET et al., 2002). São bactérias generalizadas na natureza e podem ser encontrados em água, solo, organismos vivos e até mesmo na pele humana (HALEEM 2003). As bactérias deste gênero podem degradar uma ampla gama de compostos orgânicos e inorgânicos. Muitos isolados ambientais de *Acinetobacter* mostraram competência para degradar compostos aromáticos e alifáticos, que são de interesse para biorremediação (YU et al., 2004). As cepas de *Acinetobacter* têm inúmeros usos em tratamento de resíduos perigosos ou como produtores de produtos biológicos economicamente importantes. Por exemplo, diferentes cepas de *Acinetobacter* podem degradar contaminantes como xenobióticos, halógenos, petróleo, fosfato e metais pesados, além de produzir substâncias biológicas, como biossurfactantes, polissacarídeos, poliésteres e lipases (HUANG et al., 2013).

Várias *Acinetobacter* já foram isoladas como cepas degradadoras de hidrocarbonetos de solo contaminado com hidrocarbonetos (SAIMMAI et al., 2012; LEE et al., 2012). Uma bactéria marinha que degrada óleo diesel, *Acinetobacter sp.* Y2 foi estudada para remediar efetivamente a poluição por hidrocarbonetos no meio marinho (LUO et al., 2013). Também foram estudadas as outras cepas pertencentes a este gênero, incluindo *Acinetobacter calcoaceticus* DSM 586 (DELNERI et al., 1995), *Acinetobacter radioresistens* KA53 (TOREN et al., 2001), *Acinetobacter lwoffii* K24 (KAHNG et al., 2002) e a cepa *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 (VINOGRADOV et al., 2002). Neste trabalho, foi utilizada *Acinetobacter junii* SB132 isolada a partir de água do Rio Negro (ARAÚJO, 2014) e identificada por métodos moleculares (SOUZA-NETO et al., 2014).

2.6 Produção de biossurfactantes.

Os surfactantes são moléculas que apresentam uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, podendo ser sintéticos, sendo obtidos por sínteses químicas, ou biossurfactantes, quando produzidos por microrganismos (CASSIDY e HUDAK, 2001; OLIVEIRA et al., 2013).

Os biossurfactantes são produzidos principalmente por uma variedade de microrganismos aeróbicos a partir de uma fonte de carbono, os quais variam nas propriedades químicas e no tamanho molecular. Os biossurfactantes tem a capacidade de misturar hidrocarboneto em água, e esta propriedade causa um aumento significativo na degradação de hidrocarbonetos, e por isso é utilizado na biorremediação de ambientes contaminados (FERRADJI et al., 2014). De acordo com Cameotra e Bollag (2003) os biossurfactantes podem ser utilizados “in situ” para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos e desta maneira, facilitam o acesso dos microrganismos naturalmente presentes no ambiente para que ocorra a degradação dos compostos hidrofóbicos.

2.7 Espectrometria de massas aplicada a proteoma

Microrganismos com habilidade de biodegradar alcanos estão vastamente espalhados no ambiente e têm sido isolados de locais contaminados com hidrocarbonetos (MARCHANT et al., 2006), podendo oxidar alguns hidrocarbonetos, como alcanos, alcenos e aromáticos. Tal degradação pode ocorrer aerobicamente com oxigênio, ou anaerobicamente com nitrato, íon férrico, sulfato ou outros aceptores de elétrons (WIDDEL e MUSAT, 2010). Os mecanismos enzimáticos envolvidos na degradação aeróbia de hidrocarbonetos por bactérias têm sido extensivamente estudados por várias décadas (BOLL e HEIDER, 2010). As proteínas envolvidas constituem uma classe chave de componentes moleculares que realizam reações bioquímicas essenciais na degradação de hidrocarbonetos. Se o objetivo é caracterizar um determinado grupo de proteína ou realizar análises qualitativas e quantitativas de uma amostra protéica, à espectrometria de massa é a tecnologia de escolha para tal análise (GILLET et al., 2016). As análises de proteômica visam caracterizar todo o conteúdo protéico presente em uma célula, tecido ou fluido corporal em um determinado momento, visando o objetivo de adquirir uma melhor compreensão dos processos biológicos que ali acontecem. Com base no método de caracterização de proteína, o campo proteômico

pode ser subdividido em dois principais fluxos analíticos: as abordagens de cima para baixo e de baixo para cima. As abordagens de cima para baixo baseiam-se na análise de proteínas intactas por MS e sua caracterização extensiva através da fragmentação de proteínas intactas dentro do espectrômetro de massa, seguido pela medição desses íons fragmentados. Em contrapartida, a abordagem de baixo para cima prossegue através de uma lógica de inferência de peptídeos para proteína. As proteínas presentes em uma amostra primeiro passam por digestão em peptídeos menores então o espectrômetro de massa é usado para identificar a sequência desses peptídeos. As sequências peptídicas identificadas devem então ser re-atribuídas às proteínas das quais elas originam, através de um processo chamado de inferência de proteína (AEBERSOLD, 2005). Nesta pesquisa foi utilizada a abordagem de baixo para cima.

2.8 Espectrometria de massas aplicada a biodegradação de hidrocarbonetos.

Desde o seu desenvolvimento em meados da década de 1950, a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) tornou-se indispensável no laboratório de análises químicas. Embora possa ser usado para identificar drogas, fármacos, material metabólico e identificar pesos moleculares, ganha destaque na determinação de compostos orgânicos voláteis como os hidrocarbonetos do petróleo e derivados em águas, solos e outras amostras ambientais, e a base de muitos métodos oficiais da Agência de Proteção Ambiental (EPA 2001). A técnica possibilita uma avaliação da capacidade dos microrganismos em biodegradar misturas complexas como petróleo, óleo diesel e outros de seus derivados, portanto vem sendo bastante utilizada para medir a capacidade de espécies de microrganismo em degradar composto orgânicos complexos visando suas aplicações em tecnologia de biorremediação (SNEDDON et al., 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a taxa de biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos por *A. junii* SB132 e identificar possíveis rotas metabólicas envolvidas.

3.2 Objetivos Específicos

1. Identificar e quantificar os alcanos presentes no óleo diesel.
2. Identificar e quantificar os alcanos presentes nas culturas de *A. junii* SB132 nos intervalos de 1, 4 e 14 dias de cultivo na presença de óleo diesel como única fonte de carbono.
3. Identificar por espectrometria de massas as proteínas de *A. junii* SB132 envolvidas na degradação de hidrocarbonetos do óleo diesel.

4.MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho, foram realizadas as seguintes etapas, como descritas no fluxograma abaixo.

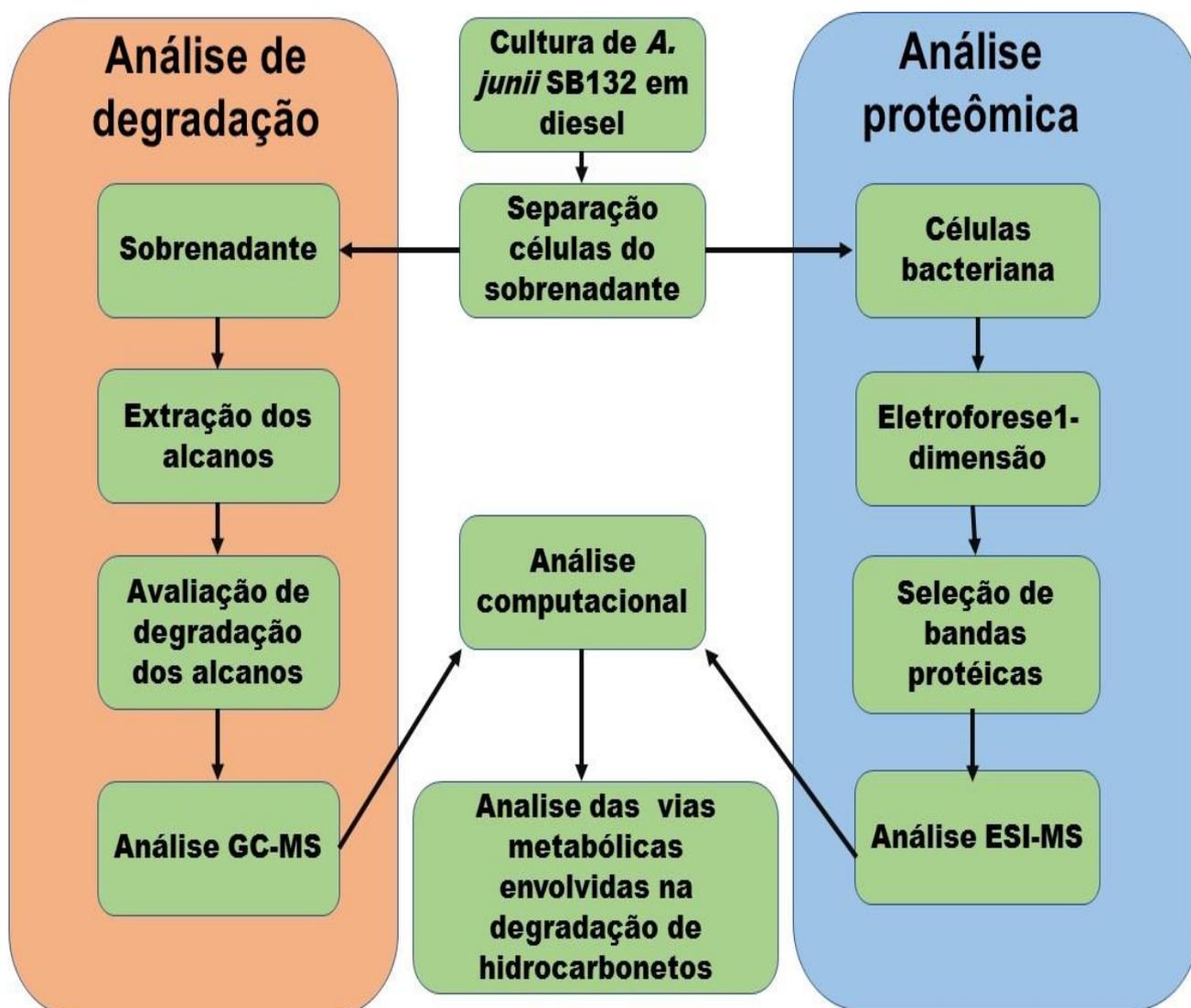


Figura 4: Fluxograma das etapas realizadas nesta pesquisa. ESI-MS: Espectrometria de Massas com Ionização por *Eletrospray*; GC-MS: Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas.

4.1 Coleta da linhagem *A. junii* SB132 com capacidade de biodegradação de óleo diesel.

O isolamento e identificação da *A. junii* SB132 utilizada nesse trabalho foram descritos em Araújo, 2014 e Souza Neto (2014). Resumidamente, a bactéria *A. junii* SB132 foi isolada de folhas da macrófita aquática *Eichhornia crassipes* (Mart.) coletadas no Rio Negro (localização global é S 3°8'50.30" e W 59°57'22,20"), com indícios de contaminação local com óleo cru em Manaus-AM (Figura 5). Neste procedimento foi empregado o protocolo baseado em seleção de microrganismos que crescem em petróleo como única fonte de carbono (ARAÚJO, 2014). A identificação alcançada por abordagem morfológica, molecular pelo sequenciamento de um fragmento do gene rRNA 16S e filoproteômica pelo perfil de proteínas ribossomais *A. junii* SB132 foi realizada por (SOUZA NETO et al., 2014).

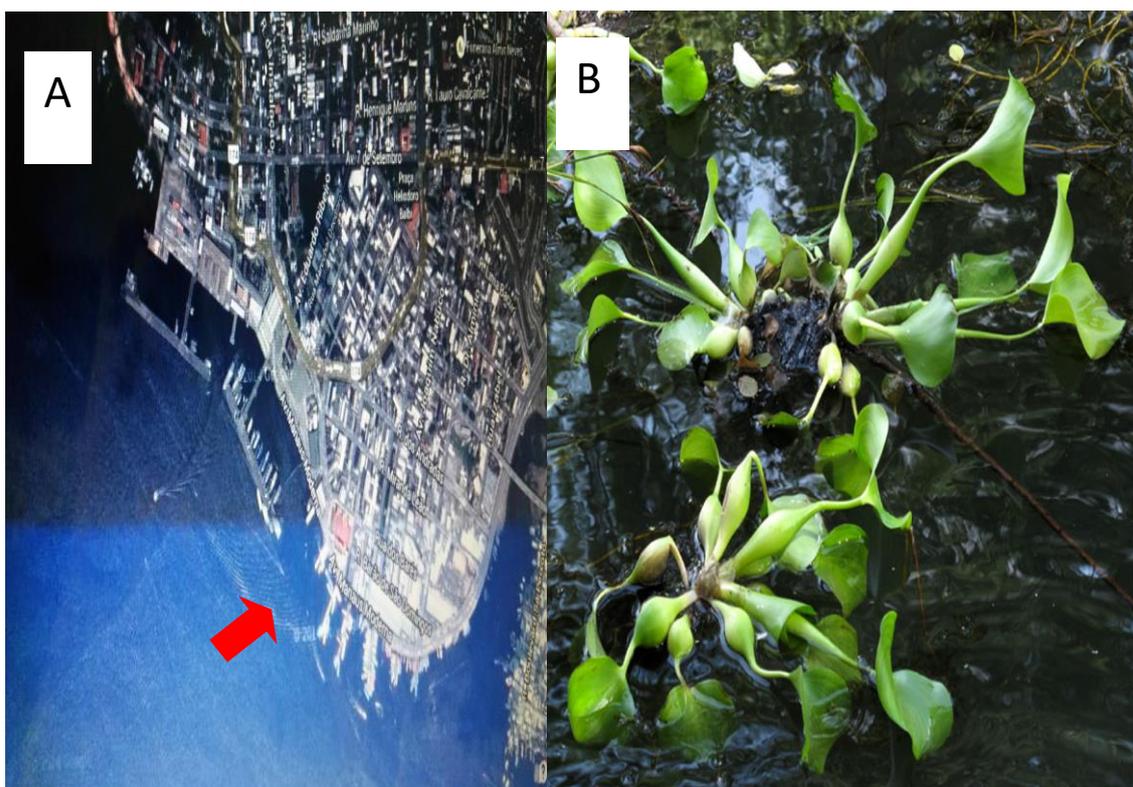


Figura 5: (A) -Localização da área de coleta de macrófita aquática *Eichhornia crassipes* (área mostrada pela seta vermelha). A localização global é S 3°8'50.30" e W 59°57'22,20", com elevação de 39m. (B) - A partir da superfície de suas folhas, *A. junii* SB132 foi coletada.

4.2 Cultivo de *A. junii* SB132

As bactérias estocadas em glicerol 25 % foram cultivadas em placas contendo meio LB (Luria Bertani) com ágar por um período de 16 a 24 h, a 30 °C. Uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio LB caldo estéril em tubo de rosca, mantidos a 30 °C por 18 a 24 h sob agitação. Em seguida, 1 mL da cultura foi utilizada para a medição da absorbância a 600 nm de comprimento de onda em espectrofotômetro (Biomat 3) para medir o crescimento bacteriano. Outro volume de 1 mL foi coletado a partir da cultura e transferido para um microtubo estéril e submetido à centrifugação por 3 minutos a 10.000 rpm, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 300 µL de meio mínimo BH (Burshnel-Hass) caldo estéril.

A partir desta ressuspensão de células foi retirado um volume necessário para uma absorbância final de 0,01 a 600 nm de comprimento de onda em 50 mL (utilizando frasco *Erlenmeyer* com capacidade para 250 mL) de meio mínimo BH (Bushnell-Haas, 1941 - Difco™) preparado de acordo com indicações do fabricante, na concentração 3,27 g.L⁻¹ em água destilada, o pH ajustado para 7,5 e em seguida autoclavado a 121 °C por 15 min a pressão de 1 atm e posteriormente suplementado com diesel 1 %. O experimento foi realizado em triplicata para cada intervalo de cultivo a ser analisado posteriormente (1, 4 e 14 dias de cultivo). Para cada intervalo de cultivo foi realizado um controle abiótico. Ao final de cada período de cultivo a absorbancia foi medida e após todo o volume do cultivo foi centrifugado por 30 min a 4 °C em tubos cônicos de 50 mL. O sobrenadante das culturas de 1, 4 e 14 dias foi recuperado para os testes de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). As células de 4 dias de cultivo foram utilizadas para as análises de proteoma.

4.3 Análise de degradação dos hidrocarbonetos por *A. junii* SB 132 utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

4.3.1 Extração dos hidrocarbonetos alifático do óleo diesel.

As análises foram executadas em um cromatógrafo de gás modelo QP2010 PLUS (Shimadzu). Inicialmente, o óleo diesel foi usado para identificação dos seus principais componentes utilizando a comparação com o banco de dados). Para separação dos compostos, foi utilizada uma coluna capilar (30 m x 0,25 mm, espessura de filme 0,25 µm) HP5MS (Agilent Technologies).

O sobrenadante da cultura foi obtido como descrito no item 4.2 para os períodos de 1, 4 e 14 dias de cultivo e seus respectivos controles abióticos utilizados para extração dos hidrocarbonetos alifáticos. Em um funil de separação (125 mL) o sobrenadante foi misturado com 5 mL de hexano (Biotec, P.A.) (1: 10, v/v), posteriormente deixando a solução em repouso por 5 minutos, para logo após recuperar 1 mL do hexano para análise em GC-MS.

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

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

A degradação dos *n*-alcanos do óleo diesel foi calculada usando a equação:

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

R _d	Taxa de degradação de alcanos do óleo diesel
D _c	Concentração de <i>n</i> -alcanos do óleo diesel no controle abiótico
D _s	Concentração de <i>n</i> -alcanos do óleo diesel residual após cultivo bacteriano

As variáveis estão descritas acima e foram baseadas em trabalhos anteriores. (ZHANG et al., 2010; DENG et al., 2014). O resultado obtido foi calculado de acordo com o teste de recuperação do diesel. Todas as análises foram realizadas em triplicatas no Laboratório de análise de Química Estrutural da Universidade Estadual do Amazonas (UEA) sob supervisão do Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen.

4.3.2 Avaliação da recuperação da extração de alcanos do óleo diesel.

Para avaliar a capacidade de recuperação do diesel, foram realizados dois experimentos complementares. O primeiro experimento consistiu em obter a somatória (Σ) da área dos n-alcanos proveniente da amostra do controle abiótico do cultivo de *A. junii* SB132. Essa amostra foi previamente preparada em frascos *Erlenmeyer* (250 mL) contendo 50 mL de meio mínimo BH e diesel 1 %. Logo depois para extração dos hidrocarbonetos alifáticos, em um funil de separação (125 mL) o sobrenadante foi misturado com 5 mL de hexano (Biotec, P.A.) (1: 10, v/v), posteriormente deixando a solução em repouso por 5 minutos, para logo após recuperar 1 mL do hexano para análise em GC-MS.

Para o segundo experimento, foi realizada uma mistura de diesel 1 % em hexano (50 mL). A partir desta, 1 mL foi utilizada para análise em GC-MS, onde esse é considerado 100 % de recuperação dos alcanos.

4.4 Análises proteômicas de *A. junii* SB132.

4.4.1 Obtenção do extrato protéico.

O extrato protéico foi obtido a partir de cultura bacteriana preparada como descrito no item 4.2. Células cultivadas por 4 dias foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm, a 4 °C, por 30 min em tubos cônicos de 50 mL, ressuspensas com 3 mL de tampão Tris-HCl (50 mM pH 7,5), centrifugadas novamente a 4000 rpm, a 4 °C, por 15 min. A lise celular foi obtida na presença de 1 mL de tampão de lise (7 M uréia, 2 M tiouréia e 4 % CHAPS, 50 mM DTT) acrescido de 10 % em relação a massa de células de PVPP, 1 % de tampão de anfólitos (IPG, pH 3-11) e 1 mM inibidor de serino e cisteíno proteases fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF). Para melhor eficiência de lise, a mistura foi submetida a tratamento em disruptor ultrassônico (*Fisher 100 Sonic Dismembrator*) com três pulsos de 30 s e intervalos de 30 s em banho de gelo na potência 1. As amostras foram incubadas no gelo por 1 h e centrifugadas por 30 min, a 12000 rpm, a 4 °C. O sobrenadante foi distribuído em volumes de 100 µL em microtubos de 1,5 mL. Foi adicionado 5V de solução gelada de clorofórmio e metanol na proporção de 1:4, respectivamente. Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex por 30 s, centrifugados por 15 min, a 12000 rpm, a 4 °C e em seguida descartado o sobrenadante. O sedimento foi ressuspensão com 1 mL de metanol e centrifugado novamente por 15 min, 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 até o momento de uso.

4.4.2 Quantificação do extrato proteico.

Para a quantificação de proteínas foi utilizado o *kit* BCA (*Protein Assay Reagent Pierce*®). Uma alíquota do extrato protéico foi homogeneizada em 50 µL de solução de uréia 3 M. Apenas 1 µL desse total foi utilizado, o qual foi misturado em 1 mL da solução de quantificação. As amostras foram então incubadas em banho seco a 37 °C por 30 min. Em seguida, foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro a 562 nm de comprimento de onda. Os dados obtidos foram então inseridos na fórmula geral da curva padrão preparada previamente em triplicata, obedecendo todos os critérios estabelecidos pelo fabricante.

4.4.3 Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE).

Para análise SDS-PAGE, 15 µg de proteínas totais de *A. junii* SB132 cultivada por 4 dias com massa quantificada foi solubilizada em 100 µL de tampão desnaturante contendo Tris-HCl 0,2 M pH 6,8; 4 % (v/v) SDS; 4 % (v/v) β-mercaptoetanol; 20 % (v/v) glicerol; 0,1 % (p/v) azul de bromofenol e incubados a 100 °C por 5 min. Após, 25 µg de proteínas totais (em duplicata) foram analisadas em SDS-PAGE 12 %, utilizando tampão Tris-Glicina 1x pH 8,3 (Tris 0,025 M; Glicina 0,192 M, SDS 0,1 %) para corrida eletroforética no sistema Mini-PROTEAN® gel releases (Bio-Rad), sob uma tensão de 250 V e corrente constante de 50 mA por gel. Para a visualização, o gel foi incubado por 30 minutos em solução fixadora (10 % (v/v) de ácido acético; 40 % (v/v) de metanol), seguido de coloração com Comassie *blue* R350 *overnight*, e descorado com água deionizada, por aproximadamente três dias.

4.4.4 Recorte das bandas e digestão das amostras.

Foram selecionadas bandas para análise por espectrometria de massas (EM) e foram recortadas manualmente utilizando um transiluminador de luz branca e lâmina de bisturi estéril. Foram selecionadas as bandas com massa molecular esperada para proteínas envolvidas na degradação de alcanos, bem como outras bandas com maior intensidade no gel, no intuito de identificar outras proteínas envolvidas na degradação de compostos do diesel. As bandas foram armazenadas individualmente em microtubos de 600 µL e estocados a -20 °C até o momento da digestão das amostras.

Para a digestão das amostras utilizou-se o protocolo de digestão *in gel* modificado (HANNA *et al.*, 2000). Este protocolo consiste das seguintes etapas: descoloração e remoção do SDS do gel, redução e alquilação das amostras, digestão com tripsina (Promega) e extração dos peptídeos, o protocolo completo estará em anexo. Após digestão, o solvente das amostras foi evaporado em evaporador da marca *SpeedVac System* modelo SPD1010-115 *Refrigerated* (ThermoSavant) e armazenadas a -20 °C até a realização das análises.

4.4.5 Espectrometria de massas para identificação das proteínas.

As amostras liofilizadas foram recuperadas com 10 µL de ácido fórmico 0,1 % e aplicadas em *vials*, onde uma alíquota de 2,5 µL da mistura de peptídeos foi separada

em uma coluna cromatográfica C18 (75 µm x 100 mm) RP-nanoUPLC (nanoAcquity, Waters) acoplado com um espectrômetro de massa modelo Q-ToF Ultima (Waters Micromass) com fonte de ionização nano-electrospray a uma taxa de fluxo de 0,6 µL/min. O gradiente utilizado, foi de 2-90 % de acetonitrila em 0,1 % de ácido fórmico concluído em 20 min. O instrumento foi operado no modo *top three*, onde um espectro de MS é adquirido seguido por MS / MS dos três primeiros picos mais intensos detectados. Os espectros obtidos foram processados utilizando o *software* Mascot Distiller 2.2.1.0, 2008, Matrix Science (MassLynx V4.1) e comparados com o banco de dados de *Acinetobacter* sp. Para as buscas, o *software* foi programado com carbamidometilação como uma modificação fixa, oxidação da metionina como modificação variável, permissão de até uma clivagem de tripsina perdida e uma tolerância de 0,1 Da para precursor e fragmentos de íons.

A aquisição dos espectros e o processamento dos dados gerados foram realizados no Laboratório de Espectrometria de Massas e Workstation, do Laboratório Nacional de Biociências – LNBio, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - LNLS, Campinas – SP com a supervisão da Dra. Adriana Franco Paes Lemes e suas técnicas de laboratório, Dra. Bianca Alves Pauletti e MSc. Romênia Ramos Domingues.

4.5 Montagem da rede biológicas das proteínas identificadas

Para a montagem da rede biológicas das proteínas identificadas, foi utilizado, o programa Cytoscape, usando o plugin BinGO (Maere Heymans et al., 2005). Foi realizada a anotação das proteínas identificadas representada em (nós) com base no banco de dados de ontologia de genes (GO) <http://geneontology.org/>, para o domínio de processos biológicos. Em seguida, foi executada uma análise de enriquecimento, a fim de descobrir quais termos estão mais representados estatisticamente (P-valor) em uma rede, mapeando todos os termos mais relevantes e listando os genes envolvidos em cada um respectivamente, fornecendo uma rede no Cytoscape correlacionando-os, assim chegando a seguinte resposta: Das (X) proteínas identificadas comparando com (N) proteínas (conjunto de referência), qual é a probabilidade de X dessas proteínas pertencerem a uma mesma categoria funcional C. Neste trabalho a descrição utilizada para padronizar a representação de uma lista de proteínas, através de termos que descrevem determinada características foi de processos biológicos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Degradação dos hidrocarbonetos por *A. junii* SB132 utilizando (GC-MS).

5.1.1 Perfil de hidrocarbonetos alifáticos saturados constituintes do óleo diesel.

Para analisar a composição do óleo diesel utilizado nesse trabalho, amostras do óleo diesel e o sobrenadante utilizado no crescimento de *A. junii* SB132 por 14 dias foram submetidos às análises por GC-MS, conforme descrito no tópico 4.3 do Material e Métodos. Os resultados indicam que a composição do óleo diesel é majoritariamente de hidrocarbonetos da classe dos *n*-alcanos, tendo uma maior intensidade os picos de hidrocarbonetos com 10 a 13 átomos de carbonos. Esses dados se assemelham com os apresentados por Liang (2005); Luo (2015), que descreveram que os alcanos são os principais constituintes do óleo diesel e variam numa faixa de alcanos muito semelhante aos resultados obtidos no presente trabalho.

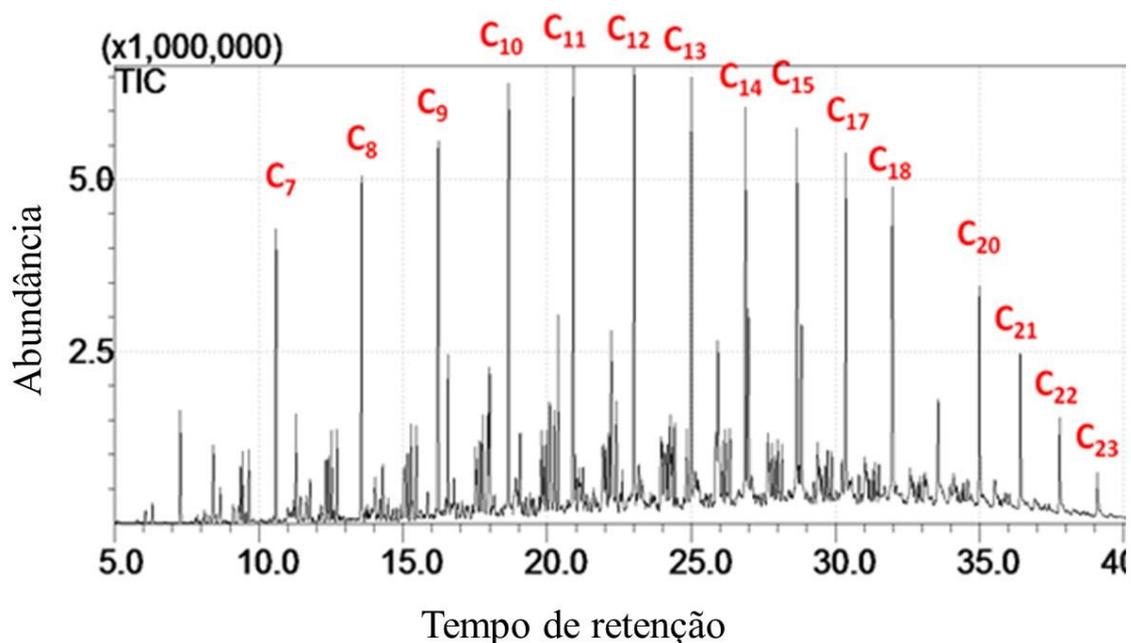


Figura 6: Cromatograma geral do diesel recuperado do controle abiótico. Os espectros mostram os principais picos representando os hidrocarbonetos da classe de alcanos de diferentes cadeia carbonicas (7 a 23 carbonos).

5.1.2 Degradação dos hidrocarbonetos pela *A. junii* SB132 durante os diferentes dias de cultivo.

Após obtenção do cromatograma do óleo diesel, as amostras de cultura de *A. junii* SB132 cultivadas por 14 dias foram analisadas e apresentaram perfil cromatográfico ilustrado na (Figura 7). Ao comparar o cromatograma do diesel sobreposto com o cromatograma do diesel proveniente da cultura após 14 dias de cultivo com *A. junii* SB132, podemos confirmar a biodegradação dos alcanos do óleo diesel observando a diminuição dos picos correspondente aos alcanos. Nota-se que houve a redução de todos os picos referentes aos alcanos identificados, dado esse que comprova a versatilidade de *A. junii* SB 132 em biodegradar uma ampla variedade de alcanos de cadeia curta, média e longa. Isso pode indicar uma preferência de metabolização inicial de alcanos por *A. junii* SB132, já que estão em abundância e em maior biodisponibilidade.

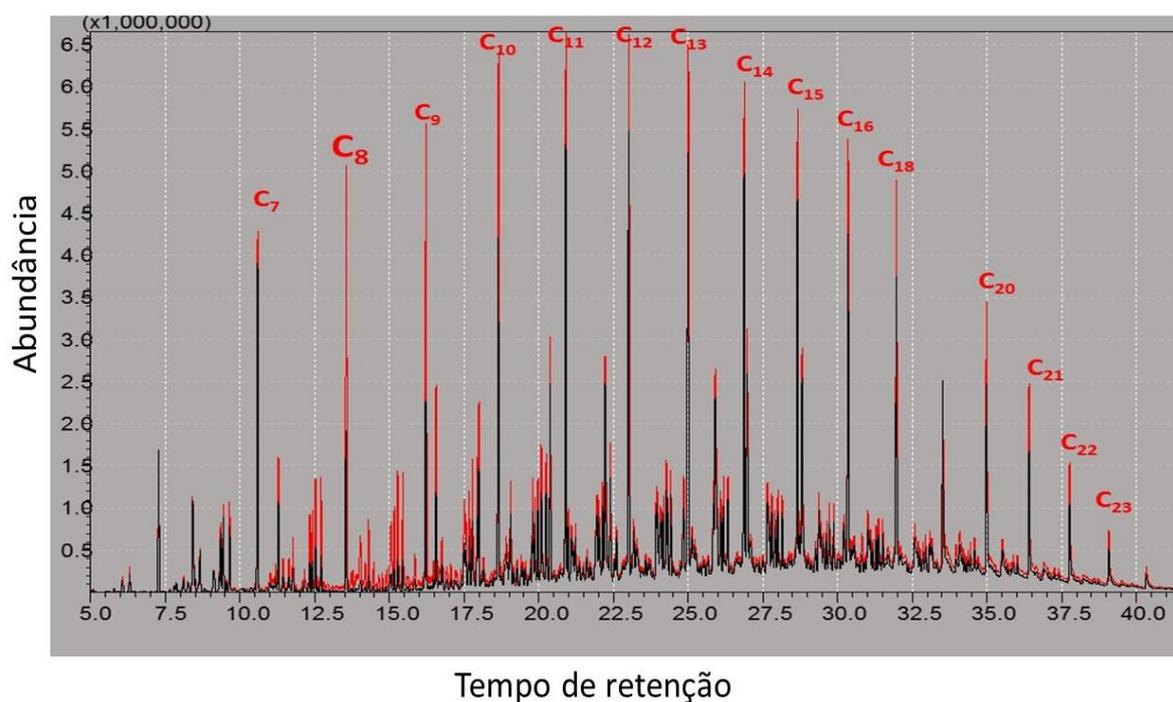


Figura 7: Cromatograma geral sobreposto do diesel do controle abiótico (vermelho) com o após 14 dias de cultivo como fonte de carbono para *A. junii* SB132 (preto). Nota-se que os picos em preto referentes às amostras obtidas do crescimento em 14 dias estão menores que os picos vermelhos (controle), demonstrando a biodegradação desses alcanos por *A. junii* SB132.

Após obtenção dos cromatogramas, os dados obtidos foram correlacionados com suas respectivas áreas do gráfico, obtendo-se assim os valores de degradação nas condições testadas. Essa taxa de degradação foi relacionada aos valores obtidos durante a curva de crescimento de *A. junii* SB132, sendo esta monitorada por espectrofotometria, como descrito no tópico 4.2 do material e métodos.

Nessa pesquisa o crescimento de *A. junii* SB132 utilizando unicamente como fonte de carbono o óleo diesel foi estudado nos intervalos 1, 4 e 14 dias de cultivo a 35 °C. A cada intervalo de cultivo, foi realizado uma análise do sobrenadante em GC-MS para avaliar a capacidade de degradação de alcanos por *A. junii* SB 132, (Figura 8).

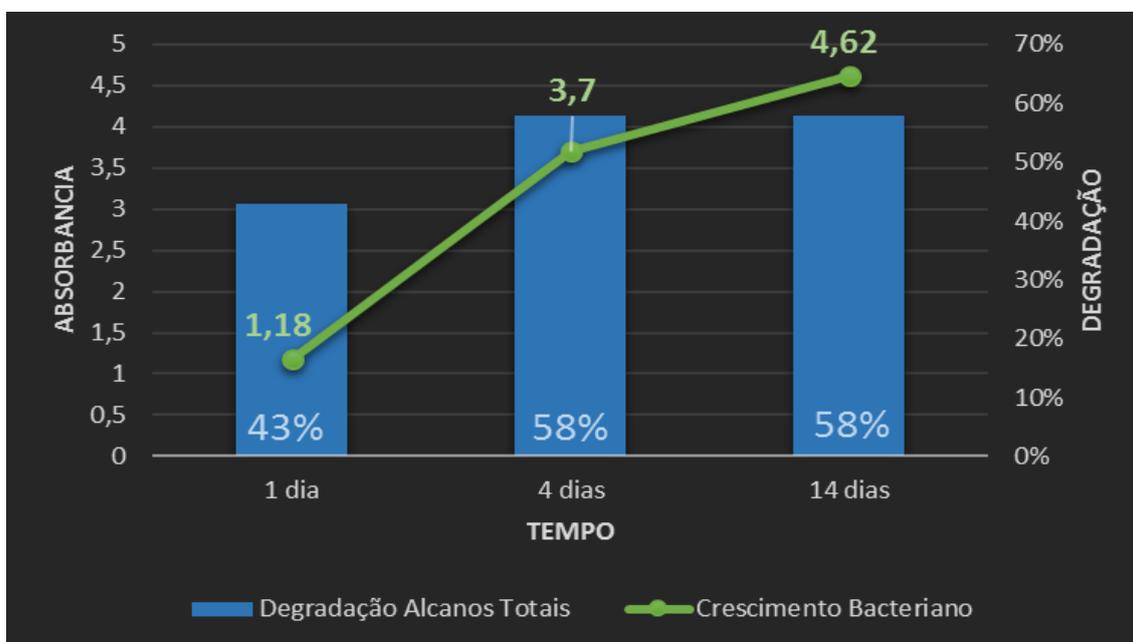


Figura 8: Degradação de alcanos totais do diesel pela *A. junii* SB132 por 14 dias. No 1º dia, ocorre 43 % de degradação, atingindo 58 % no 4º dia de crescimento, permanecendo na mesma taxa até o 14º dia. Em azul, taxa de degradação de alcanos totais obtidos por experimentos de GC-MS e em verde, a taxa de crescimento bacteriano monitorada por Espectrofotometria UV-VIS.

A taxa de degradação é apresentada nas barras azuis, e a linha verde representa o crescimento bacteriano em cada intervalo de cultivo. Pode-se observar nesses resultados que *A. junii* SB132 extraordinariamente pode metabolizar quase metade dos alcanos totais do óleo diesel com apenas 1 dia de cultivo, chegando a 58 % de taxa de degradação com 4 dias. Porém, observa-se que no intervalo de 4 para 14 dias de cultivo

a taxa de degradação de alcanos se manteve em 58 %, mesmo com a continuidade do crescimento bacteriano (vide valores de absorbância).

A partir desse resultado, procedeu-se à quantificação de degradação dos alcanos por *A. junii* SB132. Observou-se que os alcanos com maior taxa de degradação são os alcanos de cadeia média e longa, como demonstrado na Figura 9.

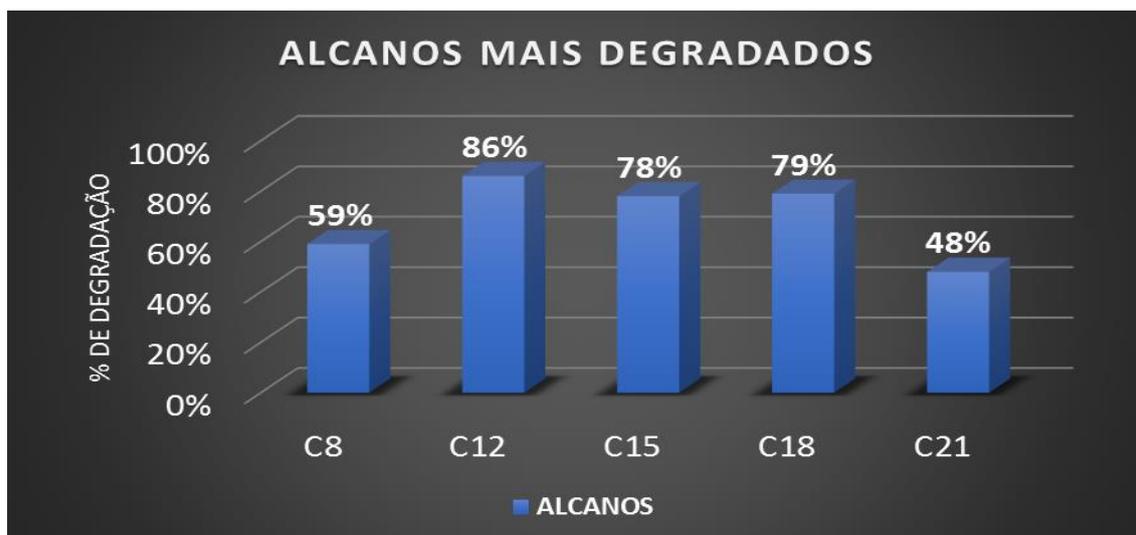


Figura 9: Alcanos do óleo diesel que tiveram maior taxa de degradação por *A. junii* SB 132 durante cultivo de 14 dias a 30°C. Os alcanos de 12 carbonos foram os que apresentaram maior taxa de degradação (86m %), seguido pelos alcanos com cadeia de 18 carbonos (79 %).

Observamos que os hidrocarbonetos de cadeia média e longa são utilizados preferencialmente por *A. junii* SB132, especificamente os alcanos de cadeia linear que variam de 7 a 23 carbonos equivalentes, resultado similar aos dados relatados por (LUO et al., 2015). As maiores taxas de degradação foram identificadas nos alcanos com 12 átomos de carbono (86 %), seguido dos alcanos com 18 átomos de carbono (79 %) e 15 carbonos (78 %).

5.1.3 Teste de recuperação dos alcanos do óleo diesel

A partir do teste de recuperação foi possível visualizar que a metodologia aqui usada nesse trabalho se mostrou totalmente eficaz par estudos de degradação de hidrocarbonetos. Ao compararmos o primeiro experimento realizado (no qual foi utilizado apenas 5 mL de hexano para recuperar os alcanos do óleo diesel em uma solução de 50 ml com 1 % de diesel) com o segundo experimento (que consistia em uma mistura de diesel 1 % em hexano (50 mL) logo considerado como 100 % de recuperação), pode-se notar que não houve diferença significativa na recuperação dos alcanos do primeiro para o segundo, validando positivamente a eficiência da metodologia (Figura 10)

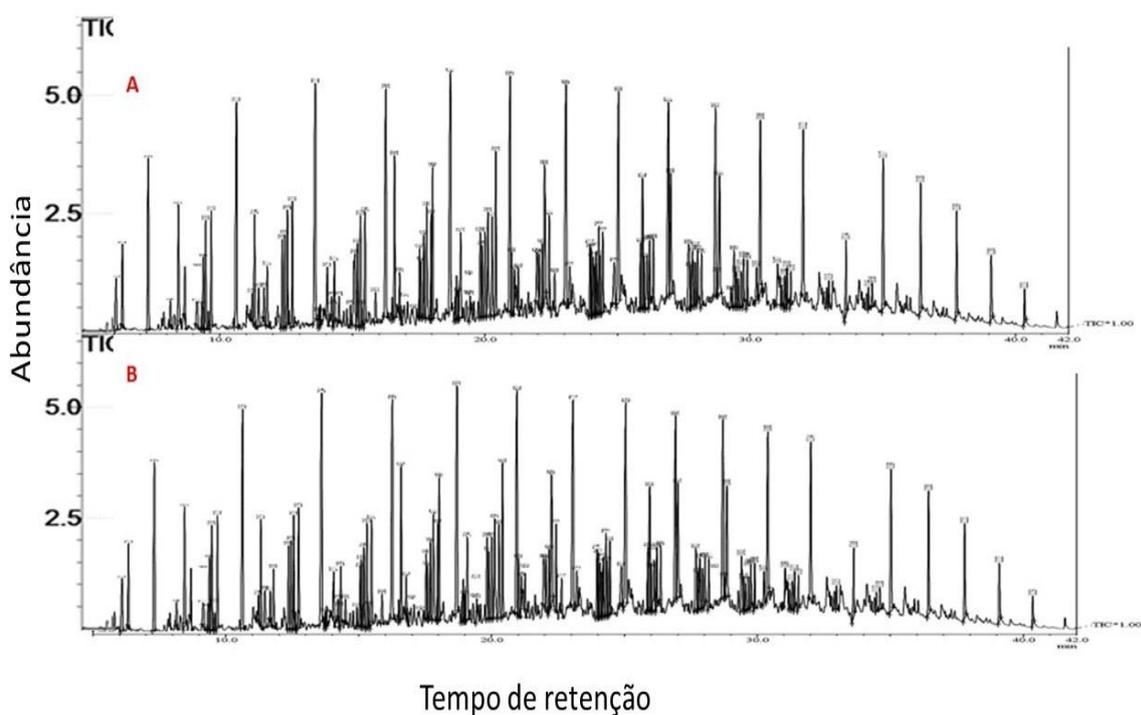


Figura 10: (A) Cromatograma geral dos alcanos do óleo diesel do primeiro experimento recuperação diretamente diluído em hexano. (B) Cromatograma geral dos alcanos do óleo diesel do segundo experimento de recuperação após o método de extração liquido-liquido. A área dos picos cromatográficos foram mantidos nos dois experimentos.

Também foi observado que não houve volatilização significativa dos alcanos do óleo diesel, ao comparar as análises de GC-MS do sobrenadante do controle abiótico da cultura crescida em 14 dias com o sobrenadante do controle abiótico previamente preparado no dia de análise em GC-MS. Esses dados demonstram assim a eficácia de degradação de *A. junii* SB132 (Figura 11).

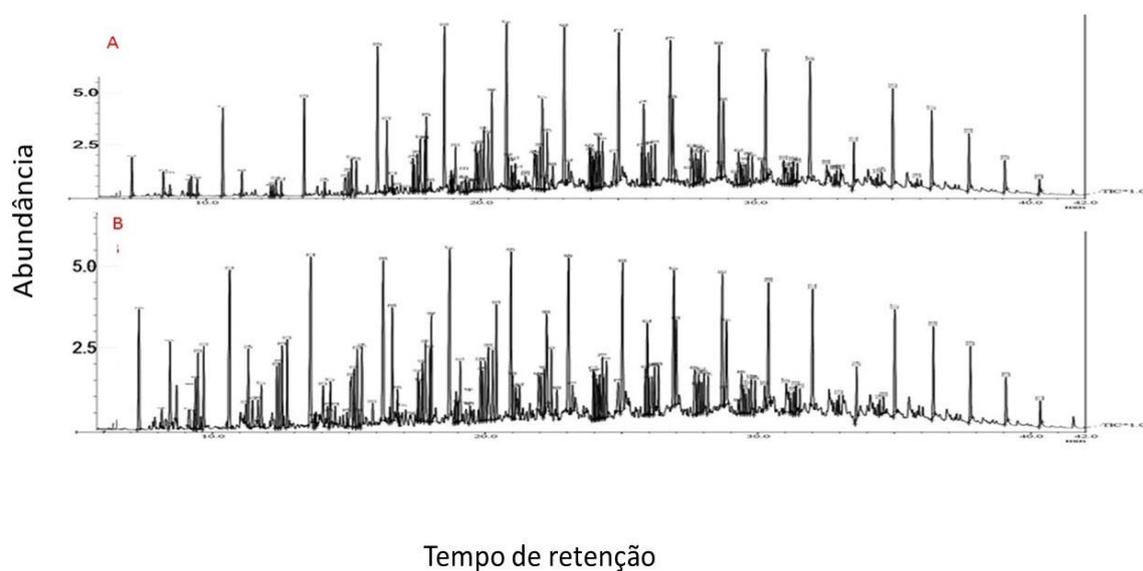


Figura 11: (A) Cromatograma geral dos alcanos do óleo diesel referentes ao controle abiótico de 14 dias. (B) Cromatograma geral do controle abiótico previamente preparado antes da análise em GC-MS. A área dos picos cromatográficos em ambas as condições foram mantidos.

5.2 Análises proteômicas por ESI-MS dos extratos protéico de *A. junii* SB132 crescida por 4 dias.

Tendo em vista esses dados importantes em relação à degradação de alcanos, os experimentos seguintes buscaram identificar as enzimas que estejam participando na degradação alcanos do óleo diesel.

5.2.1 Anotação funcional das proteínas identificadas de *A. junii* SB132.

Foram identificadas no total 181 proteínas, sendo 9 destas consideradas como proteínas hipotéticas (tabela 2 em anexo). Das 181 proteínas, 168 tiveram entrada no UNIPROT (<http://www.uniprot.org/>) e a partir desse resultado foi feito a anotação funcional utilizando o banco de dados para Ontologia de Genes (GO) (<http://geneontology.org/>). Estes resultados estão resumidos nos gráficos (Figura 12 - componente celular), (Figura 13 - funções moleculares) e (Figura 14 - processos biológicos).

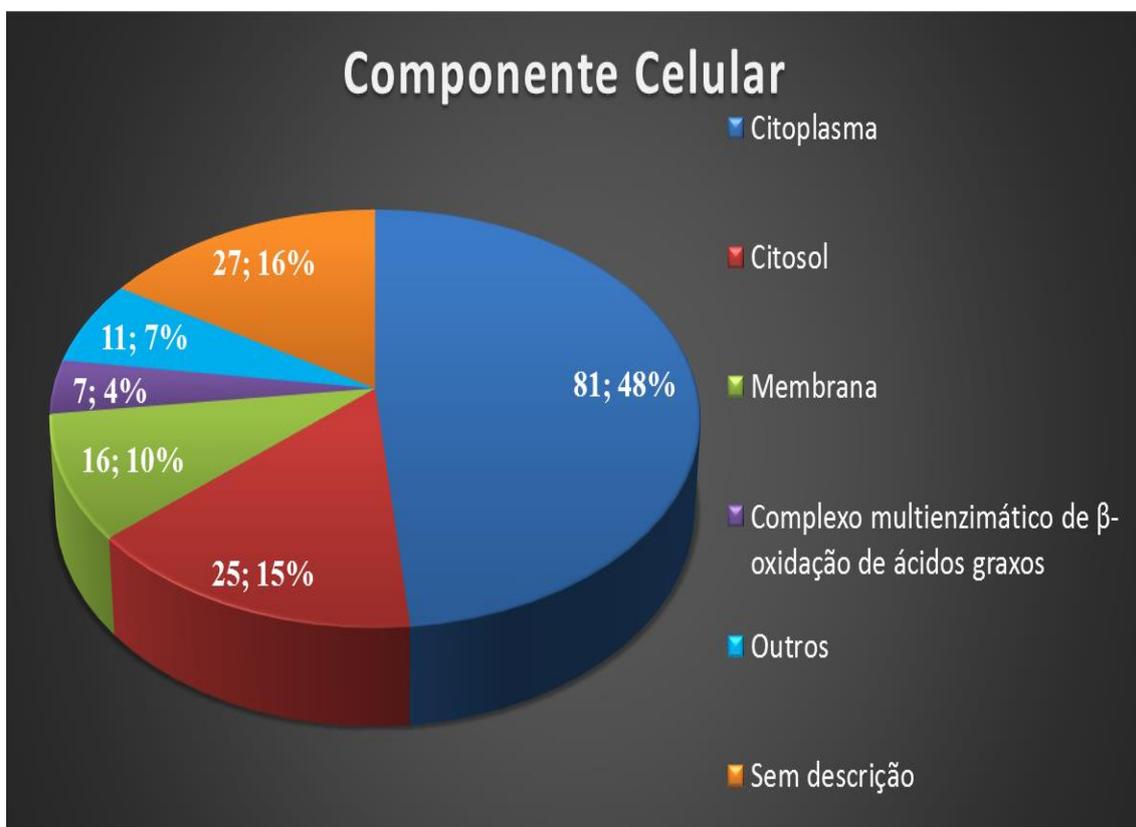


Figura 12: Anotação funcional das proteínas identificadas de acordo a categoria de componente celular. Pode- visualizar uma maior quantidade de proteínas no citoplasma (48 %), seguido do citosol (15 %), proteínas de membrana (10 %), complexo multienzimático de β -oxidação de ácidos graxos (4 %).

Na figura 12 está representada a categoria "Componente Celular" e observa-se que 16 proteínas identificadas estão localizadas na membrana celular (8 %) e são relacionadas à captação de substratos e outras ao transporte de moléculas. Cerca de 81 proteínas encontram-se no citoplasma (48 %), sendo 7 proteínas relacionadas ao complexo de multienzimas para oxidação de ácido graxos (4 %).

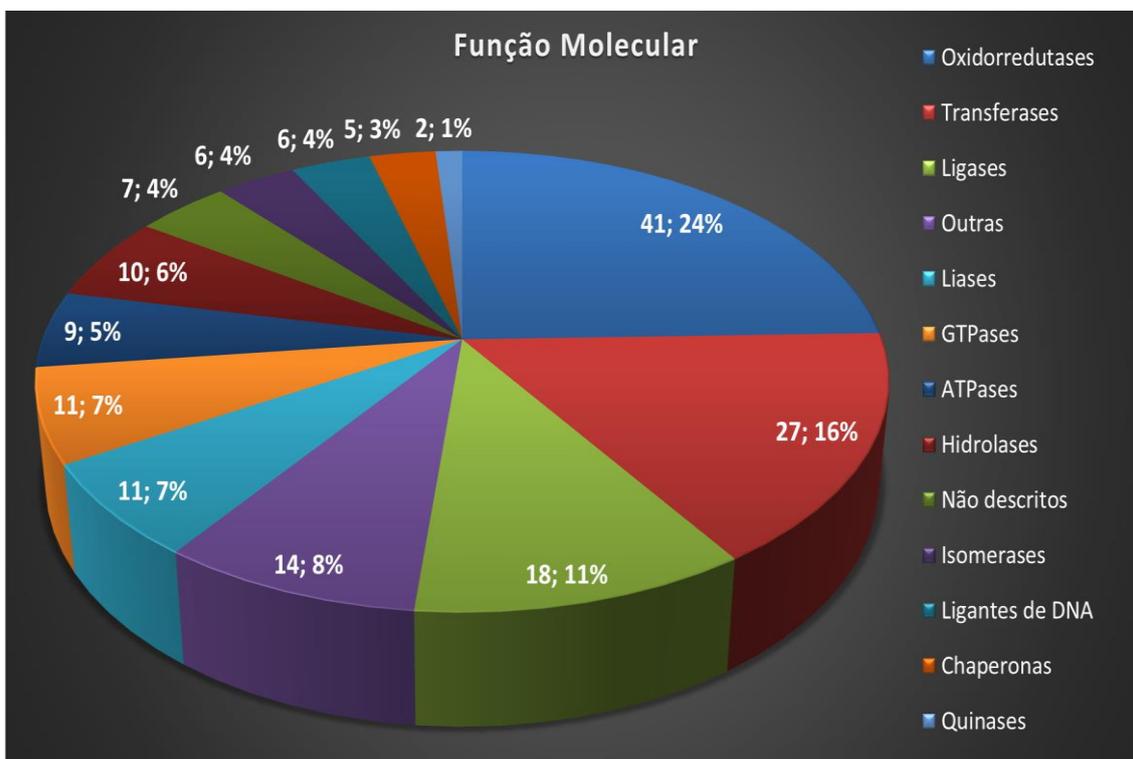


Figura 13: Anotação funcional das proteínas identificadas de acordo a categoria de Função Molecular. Foram identificadas 41 proteínas da classe oxidorrredutases (25 %), 27 proteínas transferases (16 %), 18 proteínas ligases (11 %), 14 proteínas de classificação diversa (8 %), 11 proteínas liases (7%), 11 proteínas GTPases (7 %), 9 proteínas ATPases (5 %), 10 proteínas hidrolases (6 %), 7 proteínas não descritas (4 %), 6 proteínas Isomerases (4%), 6 proteínas ligantes de DNA (4 %), 5 proteínas chaperonas (3 %) e 2 proteínas quinases (1 %).

Na Figura 13, de função molecular, observa-se maior porcentagem das enzimas pertencentes à classe de oxidorrredutases, corroborando com as análises já que essas são chaves na via de biodegradação de hidrocarbonetos (CRUZ e MARSAIOLI., 2013). A degradação de vários compostos orgânicos tóxicos por várias bactérias ocorrem através de acoplamento oxidativo mediadas por enzimas da classe das oxidorrredutases. Os microrganismos extraem energia através de reações bioquímicas que produzem energia, para escariar ligações químicas e para auxiliar a transferência de elétrons de um

substrato orgânico reduzido (doador) para outro composto químico (aceitador). Durante tais reações de oxidação-redução, os contaminantes são finalmente oxidados para compostos inofensivos (ITRC 2002). Assim as oxidorreduções podem degradar xenobióticos tóxicos, como compostos fenólicos ou anilínicos, por meio de polimerização, copolimerização com outros substratos ou ligação a substâncias húmicas (PARK et al., 2006).

Dentro da classe de enzimas oxidorreduções, citam-se as oxigenases que participam da oxidação de substratos reduzidos, transferindo oxigênio do oxigênio molecular (O_2) utilizando FAD / NADH / NADPH como um substrato. As oxigenases são agrupadas em duas categorias; as monoxigenases e dioxigenases com base no número de átomos de oxigênio usados para oxigenação (ARORA et al., 2009; FETZNER 2003). Elas desempenham um papel fundamental no metabolismo de compostos orgânicos, aumentando a sua reatividade ou solubilidade em água ou provocando a sua clivagem. As oxigenases têm uma ampla gama de substratos e são ativas contra uma ampla gama de compostos e são geralmente as enzimas mais estudadas na biorremediação. As oxigenases

As monoxigenases compreendem uma superfamília versátil de enzimas que catalisam reações oxidativas de substratos variando de alcanos a moléculas endógenas complexas, como esteróides e ácidos graxos e atuam como biocatalisadores no processo de biorremediação e química sintética devido à sua alta seletividade regional e estereoseletividade em ampla gama de substratos. A maioria das monoxigenases estudada tem cofator, mas existem certas monoxigenases que funcionam independentemente de um cofator. Essas enzimas requerem apenas oxigênio molecular para suas atividades e utilizam o substrato como agente redutor (ARORA et al., 2010; CIRINO e ARNOLD 2002).

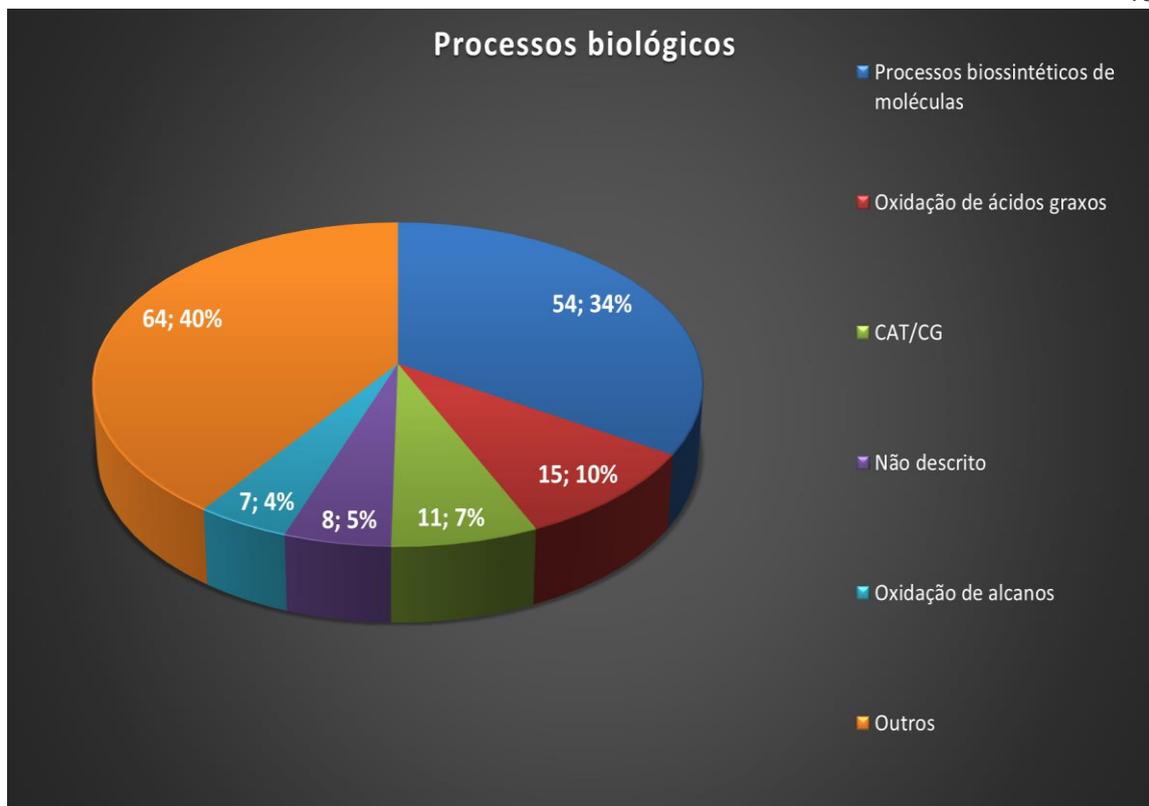


Figura 14: Anotação funcional das proteínas de acordo com a categoria de processos biológicos. Processos biossintéticos de moléculas como aminoácidos, nucleotídeos, ácido graxos entre outras (34%), oxidação de ácidos graxos (10%), ciclo do ácido tricarboxílico (CAT) com desvio do glioxilato (CG) (11%), não descrito (5%), Oxidação de alcanos (4%), outros processos (40%).

Na categoria processos metabólicos observa-se grupamentos de enzimas que participam em processos de biossíntese de moléculas e também proteínas chaves que participam na degradação de alcanos (Figura 14).

5.2.2 Proteínas identificadas em *A. junii* SB132 encontram-se envolvidas em diversos processos biológicos.

Com o intuito de detectar as vias biológicas mais ativas na *A. junii* SB132, as proteínas identificadas foram submetidas ao *software* Cytoscape. Em anexo 3, apresenta-se a rede geral de processos biológicos obtida para as proteínas identificadas de *A. junii* SB132 por meio da ferramenta BINGO (*Biological Networks Gene Ontology*) (S. Maere et al., 2005). A partir da rede obtida, realizou-se uma análise mais específica do mapa integrativo a processos relacionados com a degradação de hidrocarbonetos do óleo diesel que será discutindo mais adiante relacionadamente com outros resultados obtidos.

5.3 A. junii SB132 expressa proteínas que participam da captação, degradação e na resposta ao estresse de hidrocarbonetos.

A mineralização de hidrocarbonetos leva a busca por diferentes genes que codificam enzimas envolvidas em uma variedade de vias de degradação de hidrocarbonetos. No entanto, a adaptação de microrganismos no ambiente poluído por hidrocarbonetos não se limita a diferentes proteínas que participam na degradação, contudo a adaptação em geral é assegurada por fatores responsáveis pela estabilidade da célula e captação dos hidrocarbonetos (DAS et al. 2014).

Sabe-se que as bactérias são frequentemente expostas a tensões osmóticas. Para reverter o efeito negativo deste estresse, as bactérias podem acumular solutos compatíveis como aminoácidos e seus derivados, oligossacarídeos e glicosídeos em seu citoplasma para estabilizar a célula. A proteína reguladora de transcrição OmpR (Uniprot D0CCK5) identificada nesse estudo regula genes responsáveis pela detecção do estresse hiperosmótico e pela regulação da expressão de genes envolvidos na biossíntese de paredes celulares e no acúmulo de solutos compatíveis (NIE et al., 2013). OmpR é um dos membros de uma grande família de reguladores de resposta. Somente em *E. coli*, existem pelo menos 15 proteínas cujas sequências de aminoácidos mostram extensas semelhanças com a de OmpR (MIZUNO 1997). Além disso, os membros da família OmpR foram relatados para ocorrer em outras espécies bacterianas (CHIANG et al., 1992; FABRET e ETHER 1999). Uma série de genes para osmosensor e regulação foram encontrados no genoma *Halophile Amycolicoccus subflavus* DQS3-9A1T, nos quais eram MtrA / MtrB e KdpD / KdpE pertencente à família OmpR que possui genes responsáveis pela detecção do estresse hiperosmótico e regulamenta a expressão de genes na biossíntese da parede celular e para a acumulação de solutos compatíveis (NIE et al., 2013).

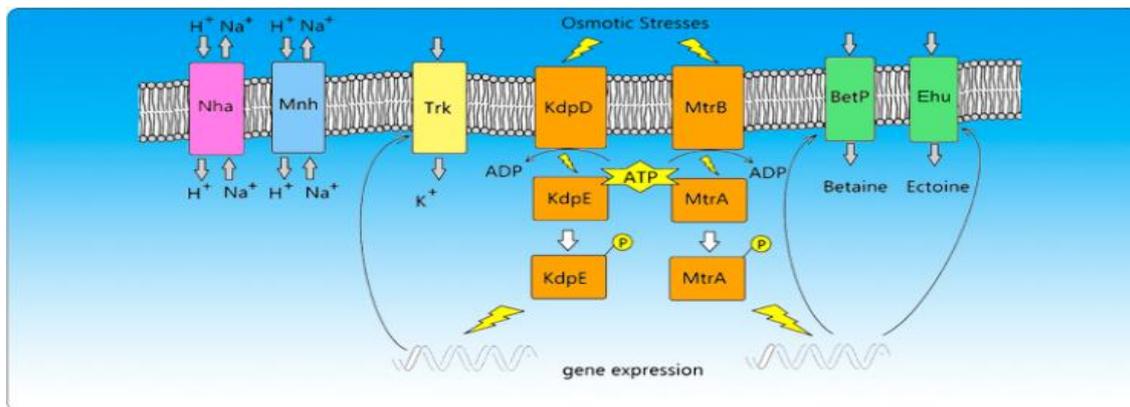


Figura 15: Proteínas da família OmpR (KdpD, KdpE, MtrB e MtrA) regulando genes em resposta a estresse osmótico na membrana celular. Fonte: (NIE et al., 2013).

SABIROVA et al., 2006 descreveram que há um aumento na expressão de genes que medeiam a degradação e biossíntese de ácidos graxos induzido por alcano em *Alcanivorax borkumensis*. Também foi descrito que quando *Pseudomonas oleovorans* GPO1 é submetida a crescimento em alcanos ocorre um acúmulo substancial da proteína alcano 1-monoxigenase na membrana interna (EGGINK et al., 1987) e isto poderia provocar uma perturbação da estrutura da membrana se não fosse compensado por um aumento de lipídeos.

A regulação das enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos pode estar presumidamente associada à necessidade de manter a fluidez e integridade da membrana decorrente do aumento das perturbações induzidas pela proteína alcano 1-monoxigenase. A regulação das enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos não saturados pode ser presumivelmente associada à proteína reguladora de transcrição OmpR visando a necessidade de manter a fluidez e a integridade da membrana em conjunto com o aumento das perturbações induzidas pela proteína Alcano 1-monoxigenase.

Na rede de processos biológicos é possível observar proteínas compartilhando processos em comum (Figura no anexo 3). Na figura 16, que mostra uma análise mais específica, pode-se visualizar nós com intensidade de cor mais escura que representam vários conjuntos de proteínas que participam em processos de produção de ácido graxos possivelmente destinado também para a membrana celular visando sua estabilidade, dado esse que corrobora com os resultados obtidos. Na tabela 2 estão listadas as proteínas que compartilham o processo de biossíntese de ácidos graxos

Tabela 2: Proteínas que participam no processo de biossíntese de ácidos carboxílicos de acordo com as análises no plugin BinGO.

Código Uniprot	Proteína
D0SID9	Acetylornithine aminotransferase
D0SMI5	Glutamine synthetase
D0SPB8	Threonine synthase
D0SIM1	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase) (DAHP synthase) (Phospho-2-keto-3-deoxyheptonate aldolase)
D0SP52	Dihydroxy-acid dehydratase (DAD)
D0SIR7	Methionine synthase, vitamin-B12 independent
D0SPB9	Homoserine dehydrogenase
D0SK84	Phosphoserine aminotransferase (Phosphohydroxythreonine aminotransferase) (PSAT)
D0SII2	Serine hydroxymethyltransferase (SHMT) (Serine methylase)
D0SQ35	Ketol-acid reductoisomerase (NADP(+)) (KARI) (Acetohydroxy-acid isomeroeductase) (AHIR) (Alpha-keto-beta-hydroxylacyl reductoisomerase)
D0SM06	Carbamoyl-phosphate synthase small chain) (Carbamoyl-phosphate synthetase glutamine chain)
D0SJG1	Argininosuccinate synthase (Citrulline--aspartate ligase)
D0SQ33	Acetolactate synthase

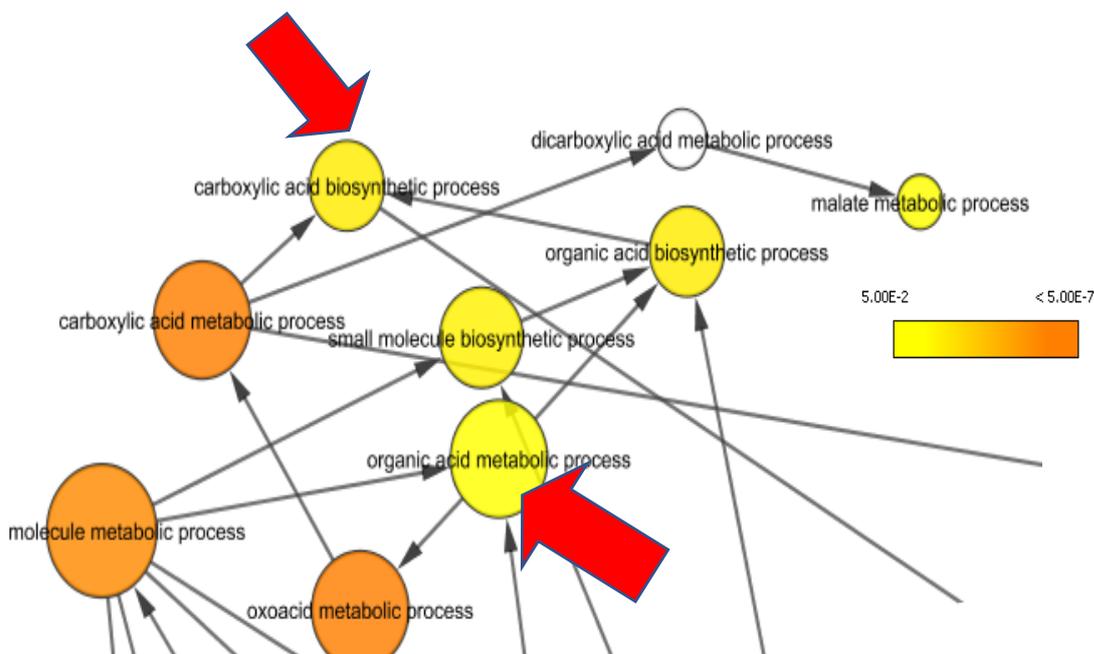


Figura 16: Mapa integrativo de processos biológicos de proteínas de *A. junii* SB132 envolvidas na produção de ácidos graxos. O tamanho do nó indica a quantidade de proteínas associadas, e as cores mais escuras um maior suporte estatístico (P-value) para cada categoria. As setas vermelhas largas indicam os nós selecionados para obtenção das proteínas descritas na tabela 2.

Os transportadores ABC são proteínas universalmente distribuídas entre organismos vivos. São proteínas conhecidas por seu papel na importação de nutrientes, exportação de moléculas tóxicas, e por mediar o transporte de muitos outros substratos. Podem ser divididas em importadores, que medeiam a absorção de substratos, e os exportadores que estão envolvidos na secreção de várias moléculas incluindo toxinas (DAVIDSON et al., 2008). Em bactérias, os transportadores ABC constituem permeases, ATPases e proteína de ligação ao substrato (MURPHY et al., 2016).

Em *A. junii* SB132 foi identificada a proteína ABC de ligação e transporte de sulfato (Uniprot D0SK26) o que pode nos indicar a sua participação no processo de degradação do óleo diesel, já que o mesmo é constituído de uma taxa de enxofre que também pode ser encontrado na forma de sulfato (GALVÃO 2017; MIOR 2013). Em via de oxidação anaeróbica de alcanos, o sulfato atua como aceptores de elétrons (CALLAGHAN et al. 2009).

A proteína CheY (*Chemotaxis Protein Y*; gi|586961731) identificada em *A. junii* SB132, indicada em azul na figura 17, é descrita como envolvida em um sistema de bastante complexidade, envolvendo muitas proteínas numa cascata de sinalização contribuindo para quimiotaxia de alcanos. A quimiotaxia facilita o movimento de microrganismos para gradientes químicos longe no meio ambiente, e este processo desempenha um grande papel na biodegradação ao colocar as células em contato com substratos de degradação (PARALES e HARWOOD, 2002; PARALES et al., 2008). Para algumas espécies de bactérias, os alcanos demonstraram funcionar como quimioatratores. A linhagem *Flavimonas oryzihabitans* que foi obtido a partir de solo contaminado com petróleo mostrou ser quimiotático para hexadecano (LANFRANCONI et al., 2003), da mesma forma, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 é quimiotática para hexadecano (SMITS et al., 2003). Na investigação da sequência do genoma de *Alcanivorax dieselolei* B-5 por (LAI et al., 2012) foi identificado uma maquinaria para quimiotaxia de alcanos que consiste em oito proteínas de quimiotaxia citoplasmática que transmitem sinais das proteínas MCP (*Methyl-accepting Chemotaxis Protein*) para os motores flagelares (Figura 17). Esta maquinaria de quimiotaxia é semelhante à de *Escherichia coli* (PARALES e DITTY, 2010).

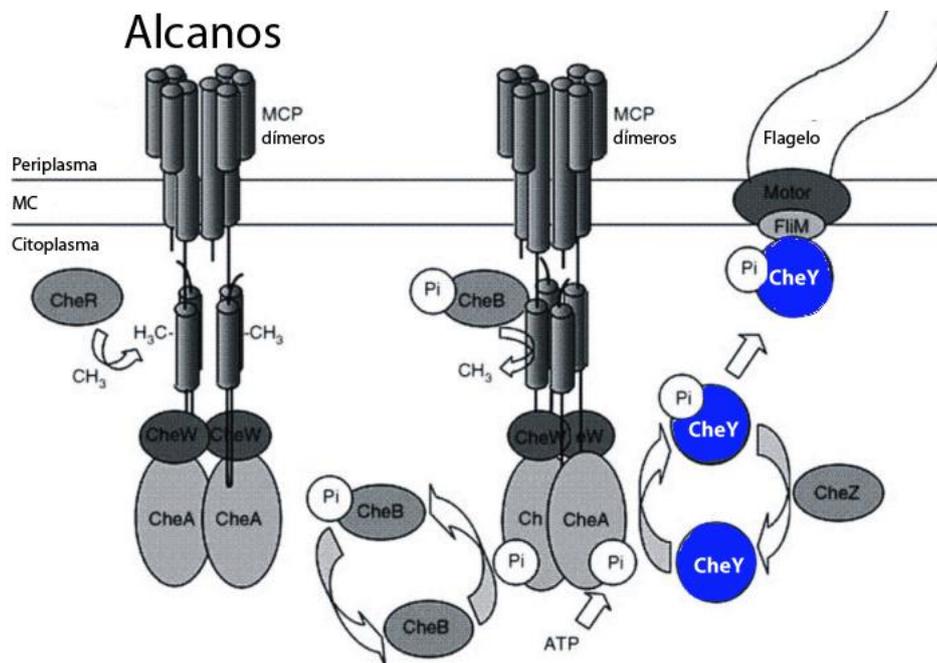


Figura 17: Esquema ilustrativo do sistema de sinalização quimiosensorial de *A. Dieselolei* B-5. A proteína CheY (em azul) descrita por WANG e SHAO, 2013 também foi identificada no presente trabalho em *A. junii* SB132. Modificado de WANG e SHAO, 2013.

Também foram identificadas proteínas de transporte da membrana externa (OmpP1/FadL/TodX) em *A. junii* SB132. Sabe-se que em bactérias gram-negativas, a camada de lipopolissacarídeos na membrana externa é uma barreira eficiente para moléculas hidrofóbicas, tais como ácidos graxos de cadeia longa, *n*-alcanos e HPAs destinados a biodegradação (NIKAIDO, 2003). O transporte dessas moléculas requer uma proteína de transporte de membrana externa da família OmpP1 / FadL / TodX (MEHBOOB et al., 2015) o que pode justificar a presença destas em *A. junii* SB132.

5.4 *A. junii* SB132 expressa proteínas envolvidas em processos chaves na degradação de hidrocarbonetos óleo diesel.

Diversos microrganismos têm a capacidade de degradar diferentes componentes do petróleo e seus derivados, sob variadas condições ambientais. Tal habilidade se dá pela presença de enzimas responsáveis por essa degradação. Os genes envolvidos na síntese dessas enzimas degradadoras podem estar localizados em cromossomos ou no DNA plasmidial (PEIXOTO et al., 2011). A variabilidade dos genes responsáveis pelo metabolismo de hidrocarbonetos tem sido descoberta à medida que ocorre o isolamento, identificação e caracterização de bactérias degradadoras de petróleo e seus derivados.

As moléculas de alcanos são quimicamente inertes e devem ser ativadas para permitir passos metabólicos seguintes. Grande parte dos alcanos de cadeia CE 1 - 17 podem ser oxidados por uma dessas duas classes de enzimas: alcano1-monoxigenase expressa pelo gene (AlkB) ou citocromo P450 expressa pelo gene (CYP) (AUSTIN e GROVES, 2011).

A via de degradação aeróbica para alcanos de cadeia curta e média foi bem estudada, na qual essas duas enzimas da família das monoxigenases ligada à membrana é responsável pela ativação inicial crucial de alcanos (Figura 18). A adição de átomos de oxigênio na estrutura desses hidrocarbonetos, resulta na conversão para um álcool pela enzima alcano-1-monoxigenase ou P450 para alcanos de cadeia curta (Figura 18, A.). Em seguida o álcool é oxidado a um aldeído pela enzima álcool desidrogenase (Figura 18, B.) seguido da conversão a um ácido graxo pela enzima aldeído desidrogenase (Figura 18, C.) (VAN HAMME et al., 2003; YONG & ZHONG, 2010). Os ácidos graxos são conjugados à coenzima A (CoA) e posteriormente processados pela β -oxidação para originar Acetil-CoA (Figura 18, D.) (WENTZEL et al., 2007).

A anotação de vias metabólicas para as proteínas identificadas foi feita usando-se informações contidas na enciclopédia de Kyoto de genes e genomas (KEGG; www.genome.jp/kegg/). Foram localizadas as proteínas que participam da degradação de alcanos iniciada por alcano 1-monoxigenase (WANG & SHAO 2013). (Figura 18).

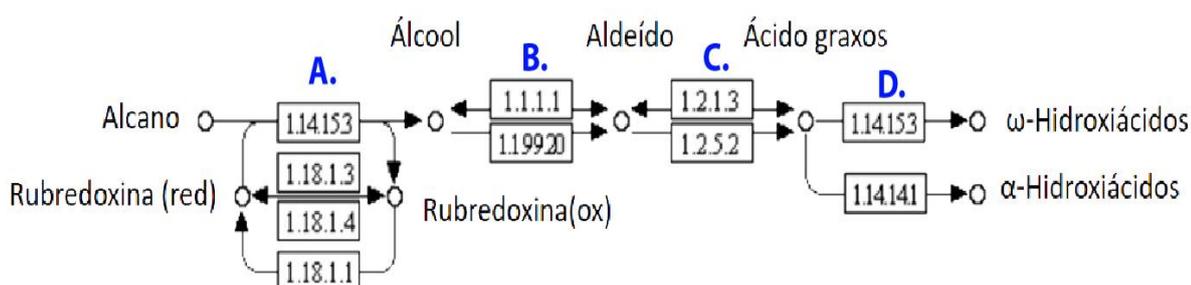


Figura 18: As proteínas identificadas na via de degradação de alcanos em *A. junii* SB132. Alcano 1-monoxigenase (AlkB) (EC 1.14.15.3) (Uniprot D0SIU3), álcool desidrogenase dependente de ferro (EC 1.1.1.1) (Uniprot D0SLW7), aldeído desidrogenase B (EC 1.2.1.-) (Uniprot D0SIK1) e citocromo P450 (gi|648402256). Fonte: Adaptado K.E.G.G. PATHWAY, 2017.

As alcano 1-monoxigenases (AlkB) identificadas nesse trabalho são enzimas-chave no processo de biodegradação de alcanos. São enzimas de ferro não heme que se localizam integralmente na membrana e catalisam a primeira reação de adição de

oxigênio em alcanos. Essa enzima tem recebido cada vez mais atenção sob ponto de vista biotecnológico, já que são biocatalisadores versáteis que realizam uma ampla gama de reações de oxidação úteis (LUO, et al., 2015). A alcano 1-monoxigenase (AlkB) em bactérias Gram-negativas atuam em conjunto com outras duas proteínas, rubredoxina expressa pelo gene (AlkG) e rubredoxina redutase expressa pelo gene (AlkT). A rubredoxina redutase transfere elétrons de NADH para a rubredoxina, a qual por sua vez, transfere os elétrons para o componente catalítico, alcano 1-monoxigenase (VAN HAMME et al., 2003). Esse processo com ação em conjunto dessas três enzimas é chamado de sistema alcano hidroxilase e permite que várias bactérias consigam crescer em meios de cultura contendo alcanos de CE 5 a 17 carbonos (HEISS BLANQUET, et al., 2005; VAN BEILEN e FUNHOLFF, 2007). A via de degradação de *n*-alcanos de cadeia média CE 5 a 17 é amplamente definida para a bactéria gram-negativa *P. putida* GPO1. Esta linhagem contém o plasmídeo OCT, o qual possui dois operons. O operon AlkBFGHJKL codifica dois componentes do sistema alcano hidroxilase e enzimas envolvidas na via metabólica, no qual se inclui alcano1-monoxigenase (AlkB), rubredoxinas (AlkF e AlkG), álcool desidrogenase (AlkJ), aldeído desidrogenase (AlkH), acil-CoA sintetase (AlkK), e uma proteína de membrana externa provavelmente envolvida na captação do hidrocarboneto (AlkL). O outro operon AlkST codifica um terceiro componente do sistema alcano hidroxilase, a rubredoxina redutase (AlkT), e um regulador positivo da expressão do operon AlkBFGHJKL (AlkS) (CANOSA, et al., 2000; VAN BEILEN, et al., 2001), como mostrado na Figura 19.

Proteínas que estão estritamente relacionadas ao gene alcano monoxigenase (alkB) de *P. putida* GPo1 têm sido detectados em grande parte da comunidade microbiana (VANBEILEN et al., 2003, VAN BEILEN; FUNHOFF, 2005). Tánicsicsa et al., (2015) relataram que diversos integrantes do gênero *Rhodococcus* são bem conhecidos como degradadores de alcanos e contém em seu genoma vários genes AlkB que codificam para diferentes monoxigenases. O gene AlkB já foi encontrado em várias bactérias que habitam diversos ambientes, incluindo sedimentos no Alasca (SOTSKY et al., 1994), solos contaminados por petróleo (KNAEBEL e CRAWFORD, 1995), aquíferos superficiais (STAPLETON e SAYLER, 1998), solos do Ártico e da Antártica (PANICKER et al., 2010; BELL et al., 2011) e outros locais contaminados com petróleo (GUO et al., 1997).

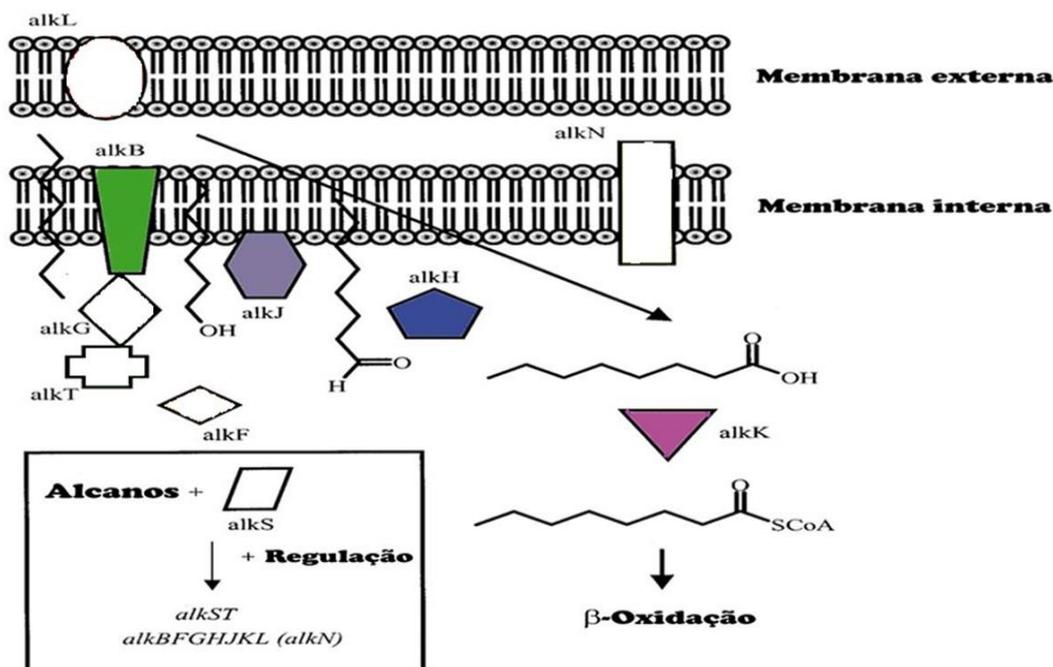


Figura 19: Via de degradação de n-alcanos de cadeia média, mostrando a localização e funções das enzimas envolvidas no sistema alcano hidroxilase em *P. putida* Gp01. As figuras preenchidas representam as enzimas identificadas em *A. junii* SB132. Fonte: Adaptado de VAN HAMME et al. 2003

Já a *Acinetobacter sp.* ADP1 é capaz de usar alcanos de cadeia longa com pelo menos 12 átomos de carbono como única fonte de carbono e energia (RATAJCZAK et al., 1998), e a disposição dos genes AlkB nessa bactéria é inteiramente distinta. Eles não estão contidos em um grande operon, e nem agrupados ou localizados em um plasmídeo, mas ocorrem em localizações aleatórias no cromossomo de *A. sp.* ADP1 (GRALTON et al., 1997). Os estudos feitos por Rojo (2009) indicam que novas alcano 1-monoxigenases ainda não foram identificadas e que poderiam incluir novas funções que ainda são desconhecidas, mas que são importantes para o metabolismo microbiano.

Viggor et al., 2015 caracterizou 543 genes AlkB diferentes de comunidades bacterianas degradantes de petróleo da água do mar Báltico Salobra. Alguns deles representando novas linhagens com identidades de sequências muito baixas com genes correspondentes das linhagens de referência. GRANT et al., 2011 conseguiram expressar o gene AlkB em *Escherichia coli* GEC137pGEc47ΔJ, e visualizou em gel eletroforese de uma dimensão a proteína alcano 1-monoxigenase.

Outra proteína identificada na degradação dos componentes do óleo diesel foi a citocromo P450 (gi|648402256) e ferredoxina redutase (Uniprot Q93SX2). A citocromo P450 é uma hemoproteína que hidroxila um grande número de compostos. Elas são ubíquas entre todos os reinos da vida e podem ser agrupadas em mais de 100 famílias com base na semelhança de sequência. Várias estirpes bacterianas que degradam os alcanos de C₅-C₁₀, contêm alcano hidroxilases que pertencem a uma família distinta de monoxigenases do citocromo P450. Estes citocromos P450 requerem uma ferredoxina e uma ferredoxina redutase que transferem elétrons de NAD (P) H para o citocromo. A proteína citocromo P450 de *Mycobacterium* sp. HXN-1500 foi purificada e foi demonstrado que ela é capaz de hidroxilar alcanos C₆-C₁₁ (FUNHOFF et al., 2006). Após a hidroxilação, o produto gerado seguirá a mesma via do produto hidroxilação por alcano 1-monoxigenase (ROJO 2009). (Figura 20).

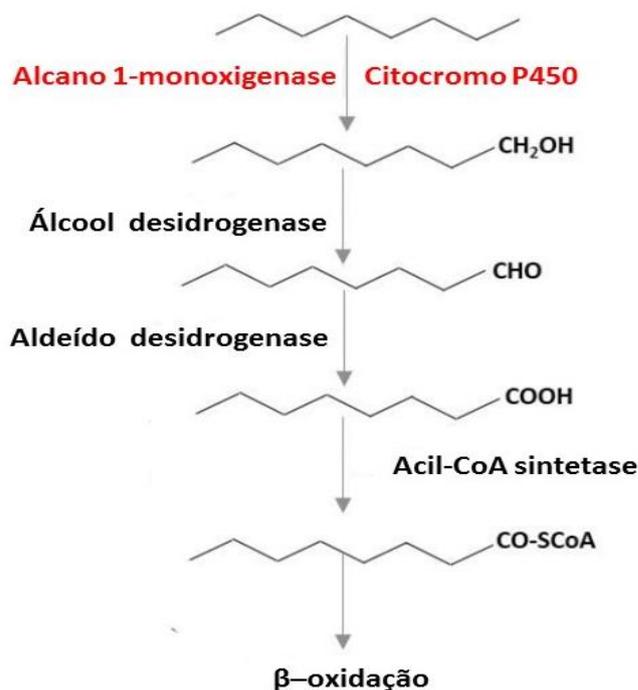


Figura 20: Via de oxidação terminal da degradação de N-alcanos. Em bactérias aeróbicas, o ataque inicial de alcanos sempre necessita de uma molécula de oxigênio como um co-substrato. A ativação dos alcanos pode ser feita pelas enzimas alcano 1-monoxigenase para alcanos de C₅-C₁₇, ou Citocromo P450 para alcanos C₅-C₁₀ destacadas em vermelho. Fonte: Modificado de ROJO, 2009.

SHANKLIN et al., (1997) e GENG et al., (2010) descrevem que essas monoxigenases de membrana são responsáveis pela degradação de alcanos e que várias desidrogenases exibem capacidades oxidativas usando íon férrico como cofator. Para essas enzimas, deve ser assegurada uma fonte adequada de ferro, e a presença de proteínas de membrana que permitam o transporte de ferro para dentro e fora da célula (ESKRA et al., 2012). GUNASEKERA et al., (2013) observou em sua pesquisa que *P. aeruginosa* PAO1 cultivada em meio com octano ocorria a indução de uma cascata de proteínas responsáveis pelo comportamento de sideróforos, e umas das proteínas responsáveis pela captação de ferro nessa cascata é a TonB- receptor dependente sideróforo (DOSPY2) e proteínas de transporte ABC (Figura 21) também identificada nesse estudo.

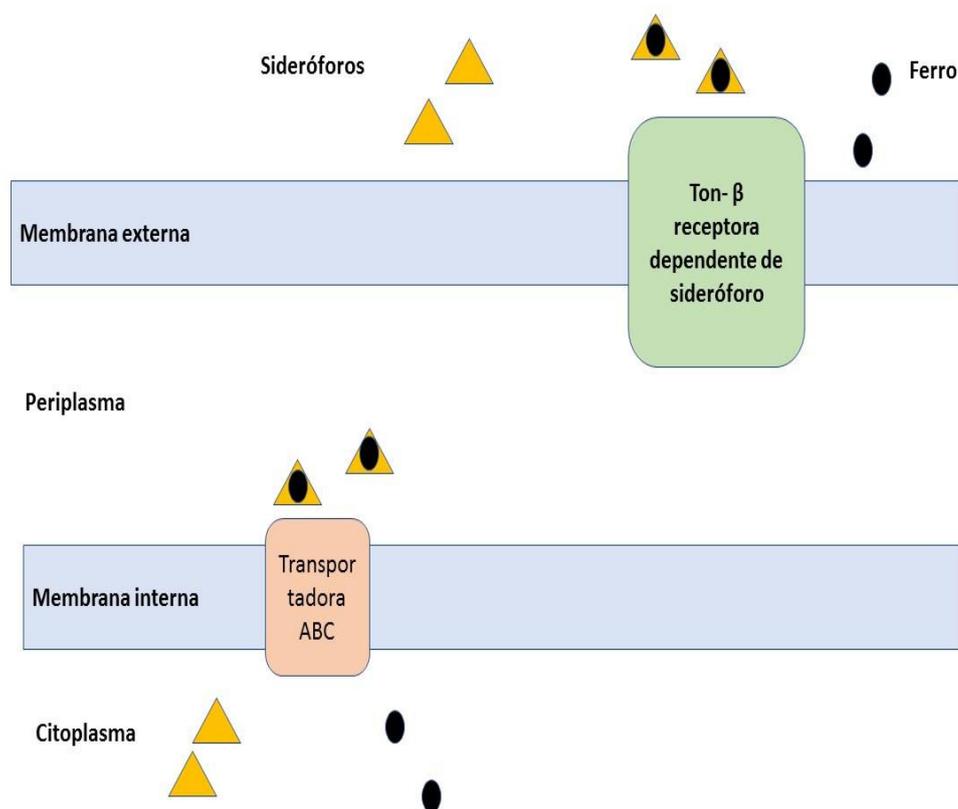


Figura 21: Os sideróforos se ligam ao ferro fora da bactéria e transportam-o através da proteína Ton-β receptora dependente de sideróforo. O complexo de sideróforo-ferro no espaço periplasmático então é transportado através de um dos vários transportadores ABC para o citoplasma. Fonte: Modificado de ESKRA 2012.

5.5 Proteínas relacionadas ao metabolismo de álcool e aldeído derivado da oxidação de alcanos são expressas por *A. junii* SB132.

Durante o processo de degradação de *n*-alcanos, enzimas convertem estes componentes em intermediário como o acil-CoA. Um dos processos descritos em condições aeróbicas, inicia com hidroxilação da região N-terminal dos *n*-alcanos catalisada por uma monoxigenase, em seguida, a molécula resultante é oxidada pelas enzimas álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase, o ácido carboxílico resultante será substrato para a acil-CoA sintetase (Uniprot D0SP89).

O acil-CoA resultante entra na via de β -oxidação (WENTZEL et al., 2007). Quatro reações catalisadas por enzimas constituem a primeira etapa da oxidação de ácidos graxos. Primeiro, a desidrogenação da acil-CoA graxo produz uma ligação dupla entre os átomos de carbono alfa e beta (C-2 e C-3) produzindo uma $\text{trans-}\Delta^2$ -enoil-CoA, mediada pela enzima Acil-CoA desidrogenase (Uniprot N9C2J0). Em seguida, ocorre uma reação de hidratação na ligação dupla de $\text{trans-}\Delta^2$ -enoil-CoA para formar o estereoisômero L da β -hidroxil-CoA, catalisada pela Enoil-CoA hidratase (Uniprot Q6F9Y3). No terceiro passo, a L- β -hidroxil-CoA é desidrogenada para formar β -cetoacil-CoA pela ação da β -hidroxil CoA desidrogenase (Uniprot A0A0M2ZZB2). O quarto e último passo do ciclo da β -oxidação é catalisada pela acil-CoA-acetil transferase (Uniprot B0V755) mas comumente chamada de tiolase, que promove a reação de β -cetoacil-CoA com uma molécula de coenzima A livre para separar o fragmento de dois carbonos da extremidade carboxílica do ácido graxo original como acetil-CoA. O outro produto é tioéster de coenzima A do ácido graxo agora encurtado em dois átomos de carbono (NELSON e COX, 2014). Todas enzimas chaves foram identificadas em *A. junii* SB132, assim podendo presumir que os alcanos assimilados convertido a acil-CoA estão participando desta rota metabólica (Figura 22).

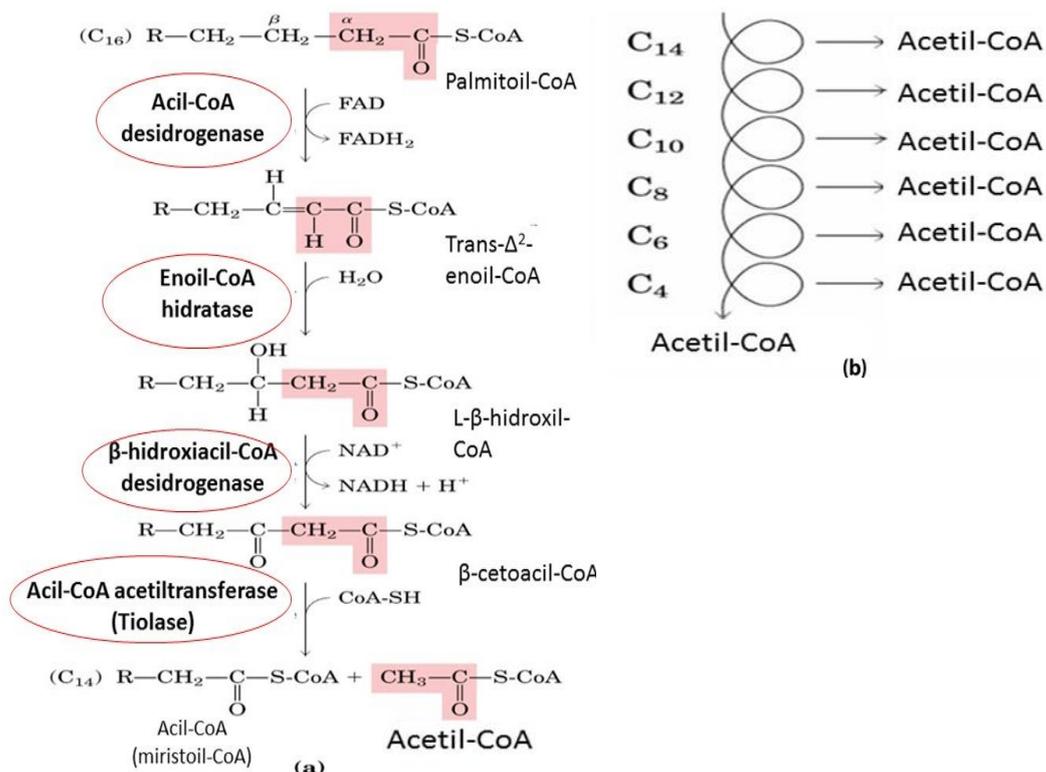


Figura 22: Processo de β -oxidação ácidos graxos. Em (a), todas as quatro etapas que compreendem a β -oxidação dos ácidos graxos e em (b), uma exemplificação da quebra de ácidos graxos saturados de cadeia par, gerando ao final do processo, as moléculas de acetil-CoA. As quatro enzimas chaves nesses processos foram identificadas em *A. junii* SB132 e estão circuladoas em vermelho. Fonte: NELSON e COX, 2014.

SABIROVA et al., 2006 descreveram que durante o crescimento em alcanos como única fonte de carbono, as bactérias devem gerar todos os metabólitos celulares precursores a partir de acetil-CoA, que é o intermediário principal formado durante a degradação de alcanos através da β -oxidação de ácidos graxos. Um mecanismo para tal realização é por meio da ativação da derivação do ciclo do glioxilato, que converte acetil-CoA para o metabólito fosfoenolpiruvato, via isocitrato, glioxilato e malato, por isocitratoliase e malato sintetase (Figura 23). Cinco enzimas estão envolvidas neste ciclo, três delas são enzimas do ciclo CAT, citrato sintase (Uniprot D0SLY2), aconitase hidratase (Uniprot N9LNK8) e malato desidrogenase (Uniprot D0SPY9); as outras duas enzimas, isocitrato liase (ICL, Uniprot Q6FD89) e malato sintetase (MS, Uniprot D0SIC7) são únicas para o ciclo do glioxilato. ICL (A) cliva o isocitrato ao succinato e ao glioxilato e a MS (B) condensa o glioxilato com acetil-CoA para produzir malato. As bactérias que não possuem essa via não conseguem crescer em fontes como acetato ou ácidos graxos, uma vez que o carbono que entra no ciclo CAT é quantitativamente

perdido como CO_2 , resultando na falta de meios para reabastecer os ácidos dicarboxílicos consumidos na biossíntese de aminoácidos (CRONAN, 2006). Outra enzima do ciclo do TC necessária para a derivação do glioxilato, é a succinato desidrogenase (Uniprot D0SLY5).

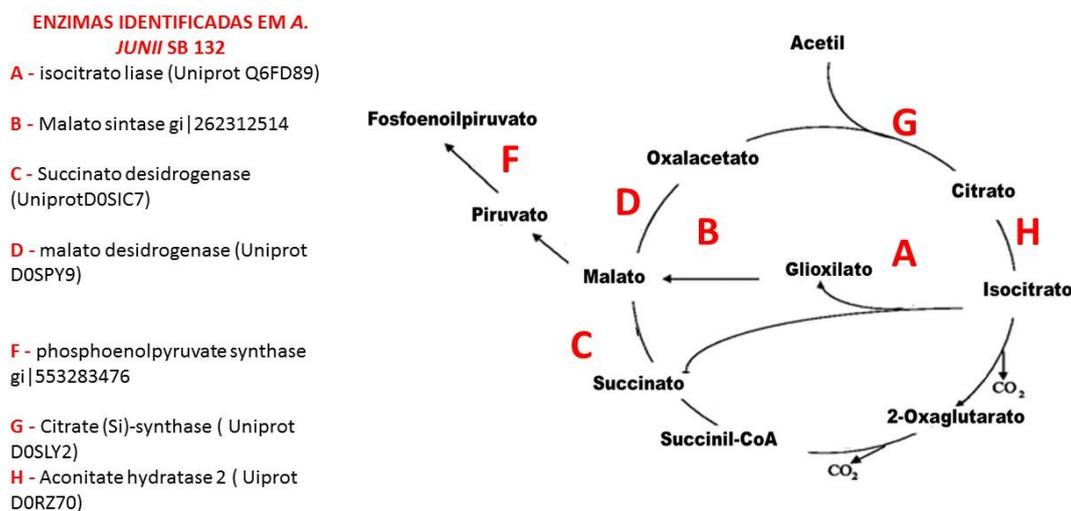


Figura 23: Ciclo do TCA e derivação do glioxilato. A derivação do glioxilato é realizada por isocitratoliase (A) e malato sintase (B). O succinato produzido via derivação do glioxilato é convertido em malato pela succinato desidrogenase (C). O malato é convertido em oxaloacetato pela malato desidrogenase (D) ou é utilizado pela enzima málica na gliconeogênese para produzir piruvato. O piruvato é então convertido por fosfoenolpiruvato sintase (F) para produzir fosfoenolpiruvato. Fonte: adaptado SABIROVA et al., 2006.

A degradação de alcano é um processo complexo, as vias de desvio do glioxilato e de gliconeogênese induzidas por alcanos adaptam a célula para produzir metabólitos precursores celulares chave como glicolipídios para biossíntese de biossurfactantes para captação de hidrocarbonetos (WANG et al. 2013), diretamente a partir dos ácidos graxos produzidos pela oxidação de alcanos (NIE et al., 2013; ROJO 2009). A partir da rede de processos biológicos também foi possível visualizar grupos de proteínas relacionadas a produção de malato inferindo para produção de biossurfactante responsáveis pela captação desses compostos como descreve (NIE et al., 2013), (Figura 24).

Uma grande variedade de microrganismos que utilizam acetato ou outros ácidos graxos como única fonte de carbono empregam o ciclo do glioxilato para a biossíntese de precursores de compostos celulares. O ciclo do glioxilato ignora os passos de descarboxilação do ciclo do ácido tricarboxílico (ATC), impedindo assim a oxidação completa do acetyl-CoA em dióxido de carbono. Ao gerar oxaloacetato como acceptor de acetyl-CoA, ele permite a incorporação líquida de carbono nos fluxos para metabólitos celulares (KORNBERG e KREBS, 1957). NIE et al. 2013 descreveram que a partir da oxidação de alcanos gerando produtos para a via do glioxilato, a linhagem *Amycolicoccus subflavus DQS3-9AIT* foi capaz de produzir enzimas que participam no metabolismo de aminoácidos, cofatores, nucleotídeos e gliconeogênese que pode estar relacionado a produção de biosurfactantes (Figura 24).

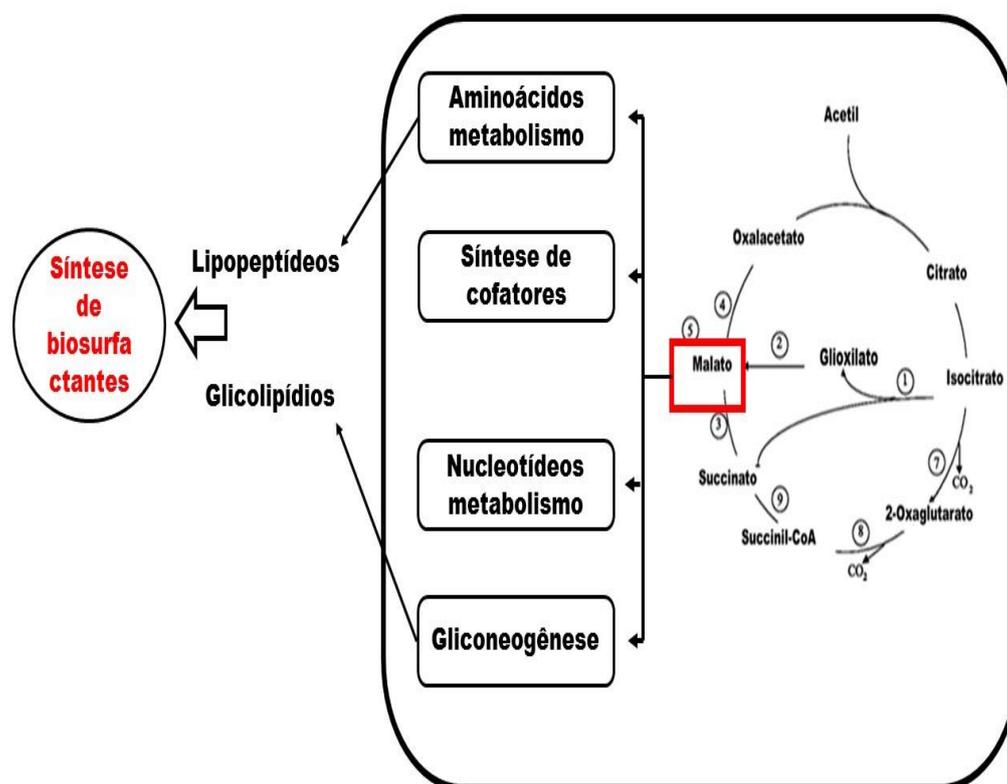


Figura 24: Produção de metabólitos a partir de acetyl-CoA, via ciclo do ATC e derivação do glioxilato. O principal intermediário metabólico em células cultivadas com alcano é o malato, formado através da canalização de acetyl-CoA para a derivação do glioxilato. Fonte: Modificado de SABIROVA et al., 2006.

Além disso, foi possível visualizar no mapa integrativo, processos metabólicos de *A. junii* SB132 relacionados à biossíntese de aminoácidos, metabolismo de cofatores e principalmente carboidratos assemelhando com os dados obtidos por (NIE et al. 2013; SABIROVA et al., 2006) (Figura 25).

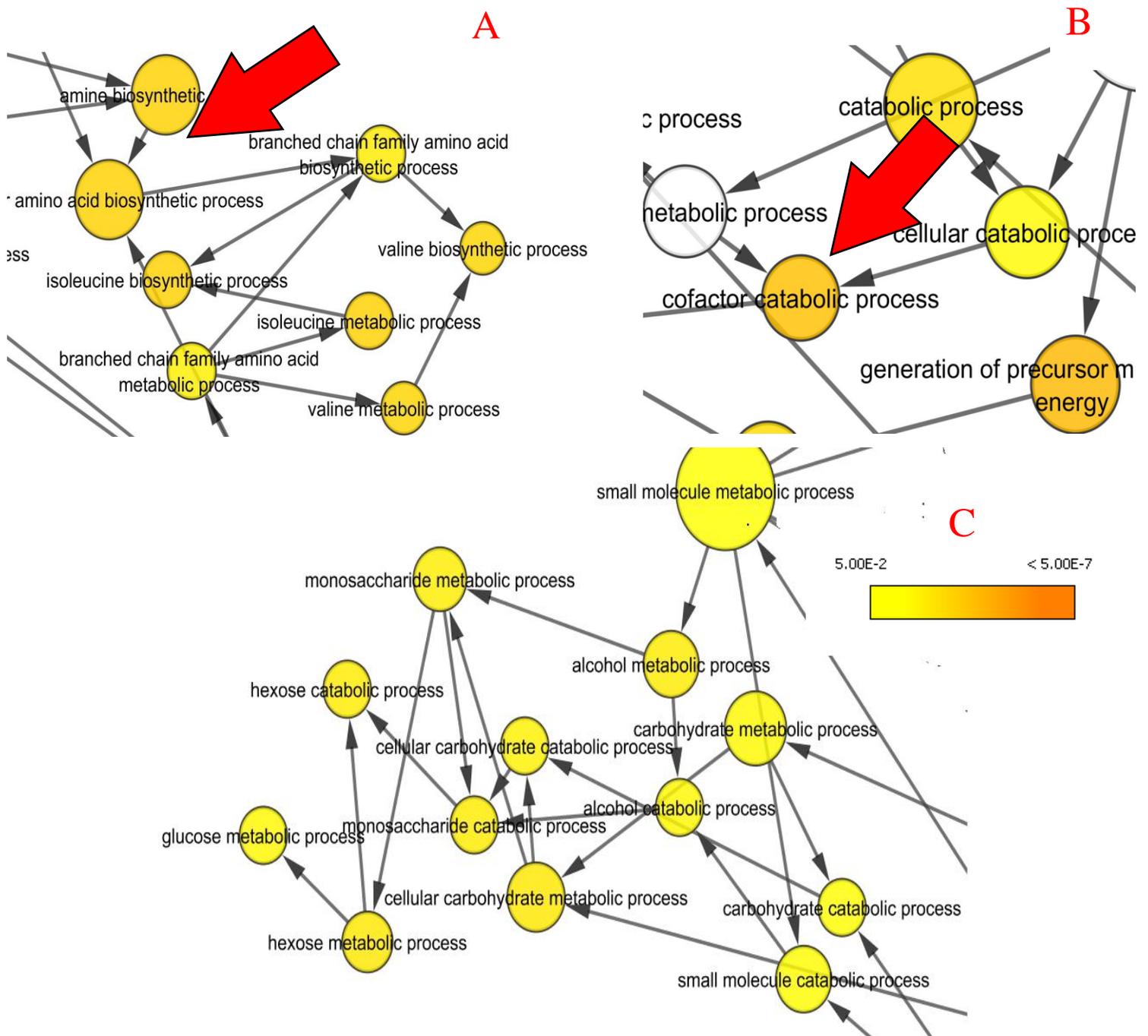


Figura 25: Mapa integrativo de processos biológicos de proteínas de *A. junii* SB132 envolvidas biossínteses de aminoácidos (A), metabolismo de cofatores (B) e carboidratos (C). O tamanho do nó indica a quantidade de proteínas associados, e as cores mais escuras um maior suporte estatístico (P-value) para cada categoria. As setas vermelhas indicam o (Nós) com os respectivos processos discutidos.

Dado os resultados obtidos nessa pesquisa, é proposto um mecanismo pelo qual *A. junii* SB132 possa estar biodegradando os alcanos do diesel (Figura 26). Podemos notar que essa cepa possui uma maquinaria protéica capaz de captar e transportar os alcanos através da membrana pela ação das proteínas (OMPP1/FadL/TodX). A partir dessa disponibilização de alcanos, as monoxigenases irão ativá-los e convertê-los para um álcool e em sequência, para um aldeído pela ação da álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase, respectivamente. Posteriormente, esse produto será convertido a um ácido graxo pela ação da Acil-coA sintetase que irá adicionar uma CoA-enzima e destinará o produto ao complexo multienzimático de β -oxidação. Ao final do processo, o produto gerado será a acetil-CoA que será destinado ao ciclo do ácido tricarboxílico com o desvio do glioxilato, resultando na produção de metabólitos necessários para suas funções celulares (como por exemplo, biossurfactantes). Além disso, pode-se inferir que a proteína CheY identificada nessa cepa esteja relacionada aos processos quimiotáticos de alcanos.

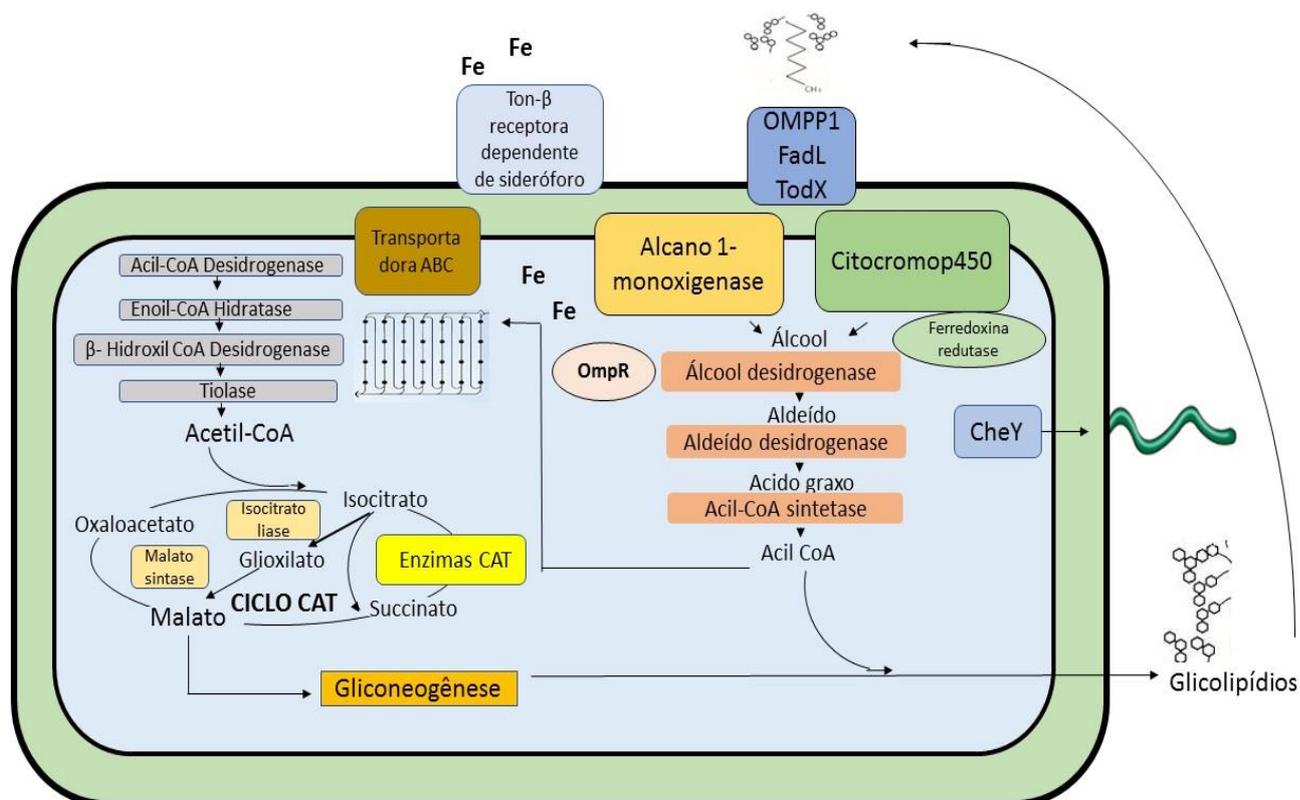


Figura 26: Modelo proposto para biodegradação de alcanos do diesel pela *A. junii* SB132 a partir dos resultados obtidos nesta pesquisa.

6. CONCLUSÕES

A. junii SB132 é uma bactéria capaz de crescer utilizando óleo diesel como única fonte de carbono. Nesse trabalho, foi constatado que *A. junii* SB132 foi capaz de crescer e degradar 43% dos alcanos presentes no óleo diesel já no primeiro dia de crescimento, e atinge 58 % de degradação com 4 dias de cultivo. Os maiores índices de degradação pela *A. junii* SB132 foram observados em alcanos contendo 12 carbonos (86%) e 18 carbonos (79%).

Nas análises proteômicas, foram identificadas 167 proteínas, sendo essas enzimas que participam desde a captação até a metabolização dos produtos gerados a partir da degradação de alcanos, a citar as enzimas Alcano 1-monoxigenase e Citocromo P450 (ambas da classe de monoxigenases), responsáveis pela degradação de *n*-alcanos de comprimento curto e de cadeia média.

A. junii SB132 demonstrou possuir uma maquinaria protéica para captação e metabolização completa de alcanos. Por meio do conhecimento básico da utilização desses alcanos por *A. junii* SB132, as perspectivas desse trabalho englobam o uso dessa maquinaria e seu aprimoramento em outras bactérias no intuito de utilizar esse metabolismo bacteriano em prol dos processos de biorremediação de ambientes contaminados por petróleo, diesel ou outros derivados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G. O; FUFYIN, P. T; OKORO, S. E; EHNOMEN, I. Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review, **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, 2015. DOI <10.12691/ijebb-3-1-5>.

AEBERSOLD, R. Interpretation of shotgun proteomic data: the protein inference problem, **Molecular & Cellular Proteomics**, 4:1419–40. 2005.

ALMEIDA-VAL, V. M. F; OLIVEIRA, A. R; SILVA, M. N. P; NOZAWAI, M. S. F; ARAÚJO, R. M; VAL, A. L; NOZAWA, S. R. Anoxia-and hipoxia-Induced expression of LDH-A in the amazon oscar, *Astronotus crassipinis*, **Genetics and Molecular Biology**, vol.34, no.2 São Paulo, 2011.

ANIEFIOK, N. D. E; IBOK U. J; MARGARET U; SUNDAY W. P. Petroleum Exploration and Production: Past and Present Environmental Issues in the Nigeria's, **Science and Education Publishing**, 2013.

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

Environmental Protection Agency (EPA). **METHOD 1684 Total, Fixed, and Volatile Solids in Water, Solids, and Biosolids**, 2001.

ANP. Agência Nacional de Petróleo. Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em <www.anp.gov.br. Acesso em 22/ 12/ 2015>.

ASHOORI, S; SHARIFI, M; MASOUMI, M; SALEHI, M. M. The relationship between S.A.R.A. fractions and crude oil stability, **Egyptian Journal of Petroleum**, Volume 26, Issue 1, March 2017.

ATSDR – Agency for toxic substances and disease registry. Toxicological profile for fuel oils, **Sciences International**, Atlanta, Georgia.1995

AUSTIN, R. N; GROVES, J. T. Alkane-oxidizing metallo enzymes in the carbono cycle, **Metallomics**. 2011.

BELL, T. H; YERGEAU, E; MARTINEAU, C; JUCK, D; WHYTE L, G. Identification of Nitrogen-Incorporating Bacteria in Petroleum-Contaminated Arctic Soils by Using [15N] DNA-Based Stable Isotope Probing and Pyrosequencing, **Applied and Environmental Microbiology**, 2011.

Boll, M; Heider, J. "Anaerobic degradation of hydrocarbons: mechanisms of C–H-bond activation in the absence of oxygen" **Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology**, eds K. N. TIMMIS, T. MCGENITY, J. R. Van Der Meer, and V. De Lorenzo (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), 1011–1024, 2010.

BORDALO, C. D. M. **A valoração econômica como ferramenta para compensação de derramamentos de petróleo**, Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em planejamento energético, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

BRAUNER, C.J; BALLANTYNE, C.L; VIJAYAN, M. M; VAL, A. L; Crude oil exposure affects air-breathing frequency, blood phosphate levels and ion regulation in an air-breathing teleost fish, *Hoplosternum littorale*, **Comparative Biochemistry and Physiology**, vol. 123C, no. 2, P. 127-134, 1999.

CALLAGHAN, A. V; TIERNEY, M; PHELPS, C.D; YOUNG, L. Y; Anaerobic biodegradation of n-hexadecane by a nitrater educing consortium, **Applied and Environmental Microbiology**, 2009.

CAMEOTRA, S. S; BOLLAG, J. M. Biosurfactant enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons, **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, V. 30, P. 111-126. 2003.

CANOSA, I; SÀNCHEZ-ROMERO, J. M; YUSTE, L; ROJO, F. A. positive feedback mechanism controls expression of AlkS, the transcriptional regulator of the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway, **Molecular Microbiology**, 2000.

CASSIDY, D. P; HUDAK, A. J. Microorganism selection and biosurfactant production in a continuously and periodically operated bioslurry, **Journal of Hazardous Materials**, V. 84, p. 253-264. 2001

CLAIRE, C. C. Biorremediação: aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos, **Biotecnologia ciência e desenvolvimento** n: 34. 2005

COLLA, L. M; COSTA J. A.V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, 2003.

CRISTALE, J; SILVA F. S; MARCHI, M. R. R. Desenvolvimento e aplicação de método GC-MS/MS para análise simultânea de 17 HPAs em material particulado atmosférico, **Eclética Química**,v.33, n.4, 2008.

CRONAN, J. J. Ciclo de ácido tricarboxílico e bypass de glyoxilato, **EcoSal Plus** 2006; DOI <10.1128 / ecosalplus.3.5.2. 2006>.

CRUZ, G. F; MARSAIOLI, A. J; Natural processes of petroleum biodegradation in reservoirs, **Marine Pollution Bulletin**, Volume 76, numbers 1-2, November 15, P. 325-332. 2013.

DAS, D; BARUAH, R; SARMA, R. A; SINGH, A. K; DEKA, B. H. P; KALITA, J; BORA, T. C. Complete genome sequence analysis of *Pseudomonas aeruginosa* N002 reveals its genetic adaptation for crude oil degradation, **Genomics**, 2015. DOI <10.1016/j.ygeno.2014.12.006. Epub 2014 Dec 26.>

DAVIDSON A, L; DASSA E; ORELLE, C; CHEN, J. Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2008.

DELNERI, D; DEGRASSI, G; RIZZO, R; BRUSCHI, C. V. Degradation of trans-ferulic and p-coumaric acid by *Acinetobacter calcoaceticus* DSM 586, **Biochimica and Biophysica Acta**, 1995.

DENG, M. C; LI, J; LIANG, F. R; YI, M; XU, X. M; YUAN, J. P; PENG, J.;WU, C. F; WANG, J. H. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter sp.* HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the Daya Bay, southern China, **Marine Pollution Bulletin**, 2014.DOI: <10.1016/j.marpolbul.2014.04.018. Epub 2014 Apr 26 >

DÍAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility, **International Microbiology**, 2004.

EGGINK, G; LAGEVEEN, R. G; ALTENBURG B., WITHOLT B. Controlled and functional expression of the *Pseudomonas oleovorans* alkane utilizing system in *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*.**The Journal of Biological Chemistry**, 1987.

ESKRA, L; COVERT, J; GLASNER J; SPLITTER G. Differential Expression of Iron Acquisition Genes by *Brucella melitensis* and *Brucella canis* during Macrophage Infection, **Plos one**, 2012.

WIDDEL, F; MUSAT, F. Diversity of common principles in enzymatic activation of hydrocarbons, **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**, ed. K. N. Timmis (Berlin: Springer-Verlag), 983–1009, 2010.

FARAH, M. A; ARAÚJO, M. A. S. Petróleo e seus Derivados. 1 ed. Rio de Janeiro, **Editora Livros Técnicos e Científicos**, 2012.

FERRADJI, F. Z; MNIF, S; BADIS, A; REBBANI, S; FODIL, D; EDDOUAOUDA, K; SAYADI, S. Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing *Streptomyces* spp. isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria), **International Biodeterioration & Biodegradation**, Volume 86, Part C, January, P. 300-308, 2014.

LIANG, F; LU M; KEENER, T. C; LIUA, Z; KHANG S. The organic composition of diesel particulate matter, diesel fuel and engine oil of a non-road diesel generator, **Journal of Environmental Monitoring**, 2005.

FUNHOFF E. G; BAUER, U; GARCÍA-RUBIO, I; WITHOLT, B; VAN BEILEN, J. B. CYP153A6, a soluble P450 oxygenase catalyzing terminal-alkane hydroxylation, **Journal of Bacteriology**, 2006.

GLASBY, G. P. Abiogenic origin of hydrocarbons: An historical overview, **Resource Geology**, v. 56, n. 1, p. 85-98, 2006.

GALVÃO, A. G. P. **Otimização de metodologia para determinação de enxofre na forma de sulfato em petróleo pesado por cromatografia de íons**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017

GENG, C; YE, S; ANGEWANDTE, F. N. Analysis of Reaction Channels for Alkane Hydroxylation by Nonheme Iron(IV) Oxo Complexes, **Angewandte Chemie International Edition**, 2010.

GILLET, L. C; LEITNER, A; AEBERSOLD, R. Mass Spectrometry Applied to Bottom-Up Proteomics: Entering the High-Throughput Era for Hypothesis Testing, **Annual Review of Analytical Chemistry**, Vol. 9:449-472, Junho 2016.

GOULD, D. W; TEICH, J. L; PEMBERTON, M. R; PIERANNUNZI, C; LARSON, S. Behavioral Health in the Gulf Coast Region Following the Deepwater Horizon Oil Spill: Findings from Two Federal Surveys, **The journal of behavioral health services & research**, Jan; 42(1): 6–22, 2015.

GRALTON, E. M.; CAMPBELL, A. L.; NEIDLE E. L. Directed introduction of DNA cleavage sites to produce a high-resolution genetic and physical map of the *Acinetobacter* sp. strain ADP1 (BD413UE) chromosome. *Microbiology*143: 1345–1357, 1997.

GRANT, C; WOODLEY, J. M; BAGANZ, F. Whole-cell bio-oxidation of n-dodecane using the alkane hydroxylase system of *P. putida* GPo1 expressed in *E. coli*, **Enzyme and Microbial Technology**, 2011.

GUNASEKERA, T. S; Striebich, R. C; Mueller S. S; Strobel E. M; Ruiz O. N. Transcriptional profiling suggests that multiple metabolic adaptations are required for effective proliferation of *Pseudomonas aeruginosa* in jet fuel, **Environmental Science & Technology**, P. 13449–13458, 2013.

HANNA, S. L, SHERMAN, N. E, KINTER, M.T. Goldberg JB. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry, **Microbiology**, 2000.

HEISS B. S; BENOIT, Y; MARECHAUX, C; MONOT, F. Assessing the role of alkane hydroxylase genotypes in environmental samples by competitive PCR, **Journal Applied Microbiology**, 2005.

HOOK, M; BARDI, U; FENG, L; PANG, X. Development of oil formation theories and their importance for peak oil, *Marine and Petroleum Geology*, 2010.

HUANG, L; XIE, J; BO-YI, LV; SHI, X; LI, G; LIANG, F; LIAN, J. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Acinetobacter beijerinckii* ZRS, **Marine Pollution Bulletin**, Volume 76, Issues 1–2, 15, November 2013.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY – IEA. Key World Energy Statistics 2011. França: IEA, 2011a. 80 p. Disponível em: <http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/key_world_energy_sta> Acesso em 23/04/2016.

IRWIN, R. J. Environmental Contaminants Encyclopedia, **National ParkService**, 1997.

KAIPPER, B. I. A. **Influência do etanol na solubilidade de Hidrocarbonetos Aromáticos em aquíferos contaminados por óleo diesel**, Tese (Doutorado em Química), Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

KNAEBEL, D. B; CRAWFORD, R. L. Extraction and purification of microbial DNA from petroleum-contaminated soils and detection of low numbers of toluene, octane and pesticide degraders by multiplex polymerase chain reaction and Southern analysis. **Molecular Ecology**. 1995.

KAHNG, H. Y; CHO, K; SONG, S. Y; KIM, S. J; LEEM, S. H; KIM, S. I. Enhanced detection and characterization of protocatechuate 3,4-dioxygenase in *Acinetobacter lwoffii* K24 by proteomics using a column separation, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2002

KORNBERG, H. L; KREBS H. A. Nature. Synthesis of cell constituents from C2-units by a modified tricarboxylic acid cycle. 1957.

LAI, Q; LI, W; SHAO, Z. Sequência completa do genoma da estirpe B5 do tipo dieselolei de *Alcanivorax*. **Journal of Bacteriology**. 2012.

LANFRANCONI, M. P; ALVAREZ H. M; STUDDERT C. A. Strain isolated from gas oil-contaminated soil displays chemotaxis towards gas oil and hexadecane, **Environmental Microbiology**, 2003. DOI: 10.1046/j.1462-2920.2003.0050.x

LEE, M; WOO, S; DEZ, L. N. Characterization of novel diesel-degrading strains *Acinetobacter haemolyticus* MJ01 and *Acinetobacter johnsonii* MJ4 isolated from oil-contaminated soil, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2012.

LEUNG, M. Bioremediation: Techniques for cleaning up a mess, **Journal of Biotechnology**, vol. 2, P. 18-22, 2004.

LIMA, D. F. utilização dos fungos na biorremediação de substratos contaminados por petróleo, **Estado da arte. Cadernos de Geociências**, v. 8, n. 2. Novembro, 2011.

LUO, Q; YING, E; DENG-Y, H; JIAN, G. Z; XIAN-R, S. GPO1 alkB gene expression for improvement of the degradation of diesel oil by a bacterial consortium, **Brazilian Journal of Microbiology**, 2015.

LUO, Q; ZHANG, J. G; SHEN, X. R; FAN, Z. Q; HOU, Y. D. Y. Isolation and characterization of marine diesel oil-degrading *Acinetobacter sp.* strain Y2, **Annals of Microbiology**, June, 2013.

MAERE, S; HEYMANS, K; KUIPER, M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks, **Bioinformatics applications note**, Vol. 21, P. 3448–344916, 2005.

MANDRI, T; LIN, J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa, **African Journal of Biotechnology**, 2007

MARCHANT, R; FREDDIE, H. S; IBRAHIM, M. B; THAHIRA, J. R; PERFUMO, A. The degradation of n-hexadecane in soil by thermophilic geobacilli, **FEMS Microbiology Ecology**, Volume 56, Edição 1, 1 de abril de 2006.

MATSUO, A. Y. O; WOODIN, B. R; REDDY, C. M; VAL, A. L; STEGEMAN, J. J; Humic Substances and Crude Oil Induce Cytochrome P450 1A Expression in the Amazonian Fish Species *Colossoma macropomum* (Tambaqui), **Environmental Science & Technology**, 2006.

MCGENITY, T.J. 2014. Hydrocarbon biodegradation in intertidal wetland sediments. **Current Opinion in Biotechnology**, 2013.

MEHBOOB, F; OOSTERKAMP, M. J; KOEHORST, J. J; FARRAKH, S; VEUSKENS, T; PLUGGE, C. M; BOEREN, S; VOS, W. M; SCHRAA, G; STAMS, A. J. M; SCHAAP, P. J. Genome and proteome analysis of *Pseudomonas chloritidismutans* AW-1T that grows on n-decane with chlorate or oxygen as electron acceptor, **Environmental Microbiology**, 2015.

MIOR, R. **Desenvolvimento de procedimentos analíticos para a determinação de enxofre em carvão usando espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua de forno de grafite**, Dissertação de mestrado em química, Universidade Federal de Santa Catarina. 2013.

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

NIE, Y; FANG, H; LI, Y; CHI, C; TANG, Y; WU, X. The Genome of the moderate *halophile Amycolicoccus subflavus* DQS3-9A1T reveals Four Alkane Hydroxylation systems and Provides Some Clues on the Genetic Basis for Its Adaptation to a Petroleum Environment, **Plos one**, 2013.

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology and Molecular Biology**, 2003.

OLIVEIRA, D. W. F; FRANÇA, I. W. L; FÉLIX A. K. N; MARTINS, J. J. L; GIRO, M. E. A; MELO, V. M. M; GONÇALVES, L. R. B. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Volume 101, 1 January P. 34-43, 2013.

PANICKER, G; MOJIB, N; AISLABIE, J; BEJ, A. K. Detection, expression and quantitation of the biodegradative genes in Antarctic microorganisms using PCR, **Antonie Van Leeuwenhoek**, 2010.

PANTOPHLET, R; SEVERIN, J. A; NEMEC, A; BRADE, L; DIJKSHOORN, L; BRADE, H. Identification of *Acinetobacter* Isolates from Species Belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* Complex with Monoclonal Antibodies Specific for O Antigens of Their Lipopolysaccharides, **Clinical and vaccine immunology**, 2002. DOI <10.1128/CDLI.9.1.60-65>.

PARALES R. E., JU K.S., ROLLEFSON J., DITTY, J. L. (2008). Bioavailability, chemotaxis and pollutants transport of organic. **Microbial Biodegradation**, (2003).

PARALES, R. E. E; DITTY, J. L. "Chemotaxis", no Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. eds T. McGenity, JR van der Meer, V. de Lorenzo e KN Timmis., **Berlim: Springer-Verlag**, 2010.

PARALES, R. E. E; HARWOOD, C. S. Bacterial chemotaxis to pollutants and plant-derived aromatic molecules, **Current Opinion in Microbiology**, (2002).

PEIXOTO, R. S; VERMELHO, A. B; ROSADO, A. S. Petroleum-degrading enzymes: bioremediation and new prospects, **Enzyme Research**, 2011.

PETROBRAS – PETRÓLEO BRASILEIRO S.A. **Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico** – FISPQ, 2011. Disponível em: <<http://www.br.com.br/wps/wcm/connect/f69c2f0043a796c4b3f4bfec2d0136c/fispqoleodiesel-S-500.pdf?MOD=AJPERES>> acesso em 20 de março, 2016.

RATAJCZAK, A.; GEIBDORFER, W.; HILLEN, W. Expression of alkane hydroxylase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1 is induced by a broad range of n-Alkanes and requires the transcriptional activator AlkR, **Journal of Bacteriology**, 1998.

RINCÓN, B; BORJAA, R; GONZÁLEZ, J. M; PORTILLO, M. C; Sáiz-Jiménez, C. Influence of organic loading rate and hydraulic retention time on the performance, stability and microbial community stage anaerobic digestion of two-phase olive mill solid residue, **Biochemical Engineering Journal**. P. 253–261. 2008. <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.12.019>>

ROBERTSON, C; KRAUSSAUG, C. Gulf Spill Is the Largest of Its Kind, Scientists Say, **The New York Times**, 2010.

ROJO, F. Degradation of alkanes by bacteria, **Environmental Microbiology**, Outubro, 2009, Doi: <10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x>.

SABIROVA, J. S; FERRER, M; REGENHARDT, D; TIMMIS, K.N; GOLYSHIN, P. N. Proteomic insights into metabolic adaptations in *Alcanivorax borkumensis* induced by alkane utilization, **Journal of Bacteriology**, 2006.

SAIMMAI, A; KAEWRUENG, J; MANEERAT, S. Used lubricating oil degradation and biosurfactant production by SC-9 consortia obtained from oil-contaminated soil, **Annals of Microbiology**, Volume 62, Issue 4, P 1757–1767. December, 2012.

SEBASTIAN, S; HURTIG, A. K. Oil development and health in the Amazon basin of Ecuador: the popular epidemiology process, **Social Science Med**, 60, P.799–807. 2005.

SEO, J; KEUM, Y; QING, X. L. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds, **International Journal of Environmental Research and Public health**, P: 279-309. Janeiro 2009.

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

SMITS T. H., WITHOLT B., VAN B.J. B. Functional characterization of genes involved in alkane oxidation by *Pseudomonas aeruginosa*, **Antonie Van Leeuwenhoek**, 2003.

SNEDDON, J; MASURAM, S; RICHER, J. C. Gas Chromatography-Mass Spectrometry Basic Principles, Instrumentation and Selected Applications for Detection of Organic Compounds, **Analytical Letters**, 40: 1003–1012, 2007

SOTSKY, J. B; GREER, C. W; ATLAS, R. M. Frequency of genes in aromatic and aliphatic hydrocarbon biodegradation pathways within bacterial populations from Alaskan sediments.

SOUZA-NETO, J. N; ARAÚJO, S.P; BATISTA, I. H.; PEREIRA, J. O; ANDRADE, E.V. Proteomic Analysis of Petroleum Degrading Bacteria, **BMC Proceedings**, 8:(4): p240, 2014.

ARAÚJO, S. P. **Produção de inóculo microbiano, obtido de macrófitas aquáticas na amazônia, com potencial de degradação de hidrocarbonetos de petróleo**, Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, 2014.

STAPLETON, R. D; SAYLER, G. S. Assessment of the Microbiological Potential for the Natural Attenuation of Petroleum Hydrocarbons in a Shallow Aquifer System, **Microbial Ecology**, 36(3): 349-361, 1998.

TÁNCICSICA A.; BENEDEKA T.; SZOBOSZLAYB S.; VERESB P. G.; MILÁN F.; ISTVÁN M; KÁROLY M; JÓZSEF K; SZABOLCS L; BALÁZS K. The detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-monooxygenase gene of members of the genus *Rhodococcus*. **Systematic and Applied Microbiolog**, Volume 38, Issue 1, February P:1–7, 2015.

THOMAS, J. E. **Fundamentos de engenharias de petróleo**, Rio de janeiro: Interciência: PETROBRAS, 2001.

TONINI, R. C. W; REZENDE, C; GRATIVO, E. A. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: Revisão, **OecologiaAustralis**, v.14, n. 4, p. 1025-1035, dezembro, 2010.

TOREN, A; NAVON-VENEZIA, S; ELIORA, Z. R; ROSENBERG, E. Emulsifying Activities of Purified Alaskan Proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53. **Applied Environmental Microbiology**. 2001 Mar; 67(3): 1102–1106. doi: 10.1128/AEM.67.3.1102-1106.2001

VAN BEILEN, J. B. E; FUNHOFF, E. G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation, **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2007

VAN BEILEN, J. B; PANKE, S; LUCCHINI, S; FRANCHINI, A. G; THLISBERGER, M. R; WITHOLT, B. Analysis of *Pseudomonas putida* alkane degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes, **Microbiology**, 2001

VAN HAMME, J. D; SINGH, A; WARD, O. P. Recent advances in petroleum microbiology, **Microbiology and Molecular Biology**, 2003.

VENOSA, A. D; LEE K; SUIDAM, M. T; BLANCO, S. G; COBANLI, S; MOTELEB, M; HAINES, J. R; TREMBLAY, G; HAZELWOOD, M. Bioremediation and Biorecovery of a Crude Oil-Contaminated Freshwater Wetland on the St. Lawrence River, **Bioremediation Journal**, 2002.

VIGGOR S., JÖESAAR M; VEDLER E; KIIKER R; PÄRNPUU L; HEINARU A. Occurrence of diverse alkane hydroxylase alkB genes in indigenous oil-degrading bacteria of Baltic Sea surface water, **Marine Pollution Bulletin**, 2010.

VINOGRADOV, E. V; DUUS, J. O; BRADE, H; HOLST, O. The structure of the carbohydrate backbone of the lipopolysaccharide from *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606, **European Journal of Biochemistry**, January, 2002.

WANG, W; SHAO, Z. Enzymes and genes involved in aerobic alkane degradation, **Frontier Microbiology**, 2013.

WANG, X. B; NIE, Y; TANG, Y. Q; WU, G; WU, X. L. Alkane chain length Alters *Dietzia* sp. Strain DQ12-45-1b, biosurfactant production and cell surface activity, **Applied and Environmental Microbiology**, 2013.

WENTZEL, A; ELLINGSEN, T. E; KOTLAR, H. K; ZOTCHEV, S. B; Throne-Holst M. Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes, **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2007.

WHO. World Health Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. Organization International Programme on Chemical Safety, **Environmental Health Criteria**, 1998.

YAKUBU, M. B. Biological approach to oil spills remediation in the soil, **African Journal of Biotechnology**, 2007.

YONG, Y. C; ZHONG, J. J. Recent advances in biodegradation in China: New microorganisms and pathways, biodegradation engineering, and bioenergy from pollutant biodegradation, **Process Biochemistry**, 2010.

YU, X.Q. Diversity of degradation pathways of some aromatic compounds by phenotype and genotype testing in *Acinetobacter* strains, **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 2004.

ZHANG, Z; GAI, L; HOU, Z; YANG, C; MA, C; WANG, Z; SUN, B; HE, X; TANG, H; XU, P. Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil contaminated soils, **Bioresource Technology**, 2010.

ZÍLIO, E. L; PINTO, U. B. Identificação e distribuição dos principais grupos de compostos presentes nos petróleos brasileiros, **Boletim Técnico Petrobras**, 2002.

PARK, J. W; PARK, B.-K; KIM J.-E. Remediation of soil contaminated with 2,4-dichlorophenol by treatment of minced shepherd's purse roots, **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 50, no. 2, pp. 191–195, 2006.

ARORA, P. K; KUMAR, M; CHAUHAN, A; RAGHAVA, G. P; JAIN, R. K. OxDBase: a database of oxygenases involved in biodegradation, **BMC Research Notes**, vol. 2, article 67, 2009.

FETZNER, S. Oxygenases without requirement for cofactors or metal ions, **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 60, no. 3, pp. 243–257, 2003.

ARORA, P. K; SRIVASTAVA A; SINGH, V. P. Application of Monooxygenases in dehalogenation, desulphurization, denitrification and hydroxylation of aromatic compounds, **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, vol. 1, pp. 1–8, 2010.

CIRINO, P. C; ARNOLD, F. H. Protein engineering of oxygenases for biocatalysis, **Current Opinion in Chemical Biology**, vol. 6, no. 2, pp. 130–135, 2002.

INTERSTATE TECHNOLOGY & REGULATORY COUNCIL (ITRC). DNAPL Source Reduction: Facing the Challenge. 2002.

CHIANG, G. G; SCHAEFER, M.R; GROSSMAN, A.R. Complementation of a red-light-indifferent cyanobacterial mutant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1992.

FABRET, C., ETHER, V.A., AND HOCH, J.A. Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: How one organism sees its world, *Journal of Bacteriology*, 1999.

MIZUNO, T; TANAKA, I. Structure of the DNA-binding domain of the OmpR family of response regulators. *Microbiology and Molecular Biology*, 1997.

KEEG PATHWAYS. <<http://www.genome.jp/kegg/>> Acesso em 15/08/2017

GLOBO NOTÍCIAS. <<https://g1.globo.com/am/amazonas/noticia/populares-tentam-invadir-area-onde-ocorreu-vazamento-de-oleo-no-am.ghtml>>. Acesso 19/09/2017

UNIPROT DATABASE BANK. <http://www.uniprot.org/uploadlists/> Acesso em 15/08/201

REVISTA ELETRÔNICA SCIENTIA AMAZONIA <http://scientia-amazonia.org/index.php/normas-publicacao/artigos-originais/> Acesso 13/10/2017.

ANEXOS

ANEXO 1. Tabela contendo as proteínas identificadas por espectrometria de massas, com seus respectivos códigos no banco de dados Uniprot, valores de Score e peptídeos (sequências). Os números de sequências fora dos parênteses indicam o total de sequências identificadas, e os valores dentro dos parênteses indicam peptídeos únicos.

Código Uniprot ou GI Number	PROTEÍNAS	SCORE	SEQUENCIAS
D0SR12	Citrate synthase	195	6 (3)
Q6FBR3	2,4-dienoyl-CoA reductase (EC 1.-.-)	64	2 (2)
D0SXI6	3,4-dihydroxy-2-butanone 4- phosphate synthase (DHBP synthase) (EC 4.1.99.12)	61	1 (1)
Q6F7R8	30S ribosomal protein S3	89	2(0)
D0SIM1	Phospho-2-dehydro-3- deoxyheptonate aldolase (EC 2.5.1.54) (3-deoxy-D-arabino- heptulose 7-phosphate synthase) (DAHP synthase) (Phospho-2-keto-3- deoxyheptonate aldolase)	193	5 (5)
A0A0M2ZZB2	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	168	5 (5)
A0A031LUT5	3-ketoacyl-ACP reductase (EC 1.1.1.100)	51	2(0)
Q6F821	Ketol-acid reductoisomerase (NADP(+)) (KARI) (EC 1.1.1.86) (Acetohydroxy-acid isomeroreductase) (AHIR) (Alpha-keto-beta-hydroxylacyl reductoisomerase) (Ketol-acid reductoisomerase type 1) (Ketol-acid reductoisomerase type I)	426	8(4)
D0SQ33	Acetolactate synthase (EC 2.2.1.6)	80	5 (4)
D0SLD9	Acetyl-CoA acetyltransferase (EC 2.3.1.9)	125	2 (2)
D0SPH3	3-ketoacyl-CoA thiolase (EC 2.3.1.16) (Acetyl-CoA acyltransferase) (Beta- keto thiolase) (Fatty acid oxidation complex subunit	516	10 (10)

	beta)		
D0RZ70	Aconitate hydratase B (EC 4.2.1.3) (EC 4.2.1.99) (2-methylisocitrate dehydratase)	66	1 (1)
N9C2J0	Uncharacterized protein	827	15(7)
D0S6K3	Acyl-CoA dehydrogenase, C-terminal domain protein	434	9(3)
D0SMK7	Adenosylhomocysteinase (EC 3.3.1.1) (S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase) (AdoHcyase)	266	6(2)
D0SJS1	Adenylosuccinate lyase (ASL) (EC 4.3.2.2) (Adenylosuccinase)	64	6 (4)
Q6FCS7	Adenylosuccinate synthetase (AMPSase) (AdSS) (EC 6.3.4.4) (IMP--aspartate ligase)	79	2(1)
D0SIK3	Alcohol dehydrogenase (Acceptor) (EC 1.1.1.244)	155	3 (3)
D0SLW7	Alcohol dehydrogenase, iron-dependent (EC 1.1.1.1)	510	10 (6)
D0SIK1	Aldehyde dehydrogenase B (EC 1.2.1.-)	346	8 (6)
D0SIU3	Alkane 1-monooxygenase (EC 1.14.15.3)	52	1 (1)
D0SHU2	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F domain protein (Fragment)	54	2 (1)
D0SID9	Acetylmethionine aminotransferase (ACOAT) (EC 2.6.1.11)	52	3 (2)
D0SR09	Aminotransferase (EC 2.6.1.-)	96	3 (2)
D0SJG1	Argininosuccinate synthase (EC 6.3.4.5) (Citrulline--aspartate ligase)	201	6 (5)
Q6FCT	Aspartokinase (EC 2.7.2.4)	262	5(3)
D0SL79	Aspartate--tRNA(Asp/Asn) ligase (EC 6.1.1.23) (Aspartyl-tRNA synthetase) (AspRS) (Non-discriminating aspartyl-tRNA synthetase) (ND-AspRS)	467	11 (8)
D0SRC6	ATP synthase gamma chain (ATP synthase F1 sector gamma subunit) (F-ATPase gamma subunit)	76	4 (2)

D0SJA0	Chaperone protein ClpB	83	4 (3)
N8ZUN9	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	60	2 (2)
N9AQT8	Uncharacterized protein	134	4 (3)
S7WRH0	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	333	12 (10)
B0V7H5	Bifunctional purine biosynthesis protein PurH [Includes: IMP cyclohydrolase (EC 3.5.4.10) (IMP synthase) (Inosinicase) (ATIC); Phosphoribosylaminoimidazol ecarboxamide formyltransferase (EC 2.1.2.3) (AICAR transformylase)]	72	3 (2)
N9AXX9; N9C979	Branched-chain amino acid aminotransferase	198	4(2)
D0SIR7	Methionine synthase, vitamin- B12 independent (EC 2.1.1.14)	85	5 (5)
D0SM06	Carbamoyl-phosphate synthase small chain (EC 6.3.5.5) (Carbamoyl-phosphate synthetase glutamine chain)	70	1 (1)
N9C223	Catalase-peroxidase (CP) (EC 1.11.1.21) (Peroxidase/catalase)	382	16 (11)
B0V8Z4	Site-determining protein	218	4(3)
D0SNT1	Cell division protein FtsZ	89	3(0)
A0A0B0KS30	Citronellyl-CoA dehydrogenase	63	3 (1)
N9ALY9	Aldehyde dehydrogenase	150	7 (5)
D0SII2	CTP synthase (EC 6.3.4.2) (Cytidine 5'-triphosphate synthase) (Cytidine triphosphate synthetase) (CTP synthetase) (CTPS) (UTP-- ammonia ligase)	184	7 (6)
A0A1P8EMG7	Acyl-CoA dehydrogenase	827	15(7)
B0VAJ9	Cyclic AMP receptor protein	97	2(1)
D0SNT4	D-alanine--D-alanine ligase (EC 6.3.2.4) (D-Ala-D-Ala ligase) (D-alanylalanine synthetase)	187	4(2)
D0SMA9	Diaminobutyrate decarboxylase (EC 4.1.1.86)	86	2 (2)

D0SMA8	Diaminobutyrate--2-oxoglutarate transaminase (EC 2.6.1.76)	60	1(1)
D0SLY9	Dihydrolipoyl dehydrogenase (EC 1.8.1.4)	296	6 (4)
D0SLY8	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (EC 2.3.1.61) (2-oxoglutarate dehydrogenase complex component E2)	372	5 (5)
D0SP52	Dihydroxy-acid dehydratase (DAD) (EC 4.2.1.9)	112	5 (3)
B0V6E0	Protein RecA (Recombinase A)	92	2 (2)
D0SHX3	Probable transcriptional regulatory protein HMPREF0026_00721	88	2 (2)
B0VDL6	Electron transfer flavoprotein alpha-subunit	414	6(4)
D0SPP6	Electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase (EC 1.5.5.1)	66	3 (2)
N9ATA4	Uncharacterized protein	299	11 (9)
S7WRV2	ABC transporter, ATP-binding protein	174	5 (4)
Q93SX2	Ferredoxin reductase	98	3 (3)
A0A1E8DZP6	Fe/S biogenesis protein NfuA	80	1(1)
D0SK63	Fructose-1,6-bisphosphatase class 1 (FBPase class 1) (EC 3.1.3.11) (D-fructose-1,6-bisphosphate 1-phosphohydrolase class 1)	59	4 (2)
B0V8N2	Glutamate synthase small chain (EC 1.4.1.13)	63	2 (2)
D0SMI5	Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	307	9 (5)
D0SIU2	Glutathione-disulfide reductase (EC 1.8.1.7)	52	1 (1)
D0SK00	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.-)	220	7 (5)
N9APM3	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+] (EC 1.1.1.94) (NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase)	61	4 (2)

D0SH12	Serine hydroxymethyltransferase (SHMT) (Serine methylase) (EC 2.1.2.1)	265	5(4)
D4XU03	Glycine--tRNA ligase beta subunit (EC 6.1.1.14) (Glycyl-tRNA synthetase beta subunit) (GlyRS)	57	4 (2)
D0SD91	Glycine--tRNA ligase alpha subunit (EC 6.1.1.14) (Glycyl-tRNA synthetase alpha subunit) (GlyRS)	177	3 (2)
D0SJU0	Glyoxylate/hydroxypyruvate reductase B (EC 1.1.1.215) (EC 1.1.1.79) (EC 1.1.1.81)	56	2 (1)
Q6FFN2	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] (EC 6.3.5.2) (GMP synthetase) (Glutamine amidotransferase)	110	5 (3)
Q6FE94	GTP-binding elongation factor family protein	135	3 (3)
D0SLF9	GTP-binding protein TypA	165	3 (3)
D0SPB9	Homoserine dehydrogenase (EC 1.1.1.3)	115	5 (4)
D0SMX6	Fumarate hydratase class I (EC 4.2.1.2)	52	4 (2)
A0A172YKX8; D0SNS0	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMP dehydrogenase) (IMPD) (IMPDH) (EC 1.1.1.205)	118	5 (5)
D0SN74	Inositol monophosphatase family protein	111	2(2)
D0SM84	Isocitrate dehydrogenase, NADP-dependent (EC 1.1.1.42)	153	8 (5)
Q6FD89	Isocitrate lyase (EC 4.1.3.1)	67	1 (1)
D0SQ35	Ketol-acid reductoisomerase (NADP(+)) (KARI) (EC 1.1.1.86) (Acetohydroxy-acid isomeroreductase) (AHIR) (Alpha-keto-beta-hydroxylacyl reductoisomerase)	719	11 (8)
D0SPA7	Probable cytosol aminopeptidase (EC 3.4.11.1) (Leucine aminopeptidase) (LAP) (EC 3.4.11.10) (Leucyl aminopeptidase)	192	2 (2)

D0SP89	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase (EC 6.2.1.3)	270	5 (5)
D0SMK3	Malate dehydrogenase (Oxaloacetate-decarboxylating) (NADP(+)) (EC 1.1.1.40)	142	5 (4)
D0SPY9	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	1081	14 (13)
D0SIC7	Malate synthase G (EC 2.3.3.9)	579	13 (11)
Q6FFK2	ATP synthase subunit alpha (EC 3.6.3.14) (ATP synthase F1 sector subunit alpha) (F-ATPase subunit alpha)	75	3 (3)
Q6FFK0	ATP synthase subunit beta (EC 3.6.3.14) (ATP synthase F1 sector subunit beta) (F-ATPase subunit beta)	1493	17 (16)
Q6FFK1	ATP synthase gamma chain (ATP synthase F1 sector gamma subunit) (F-ATPase gamma subunit)	103	2(1)
D0SMD1	META domain protein	54	2 (1)
Q6FAQ6	S-adenosylmethionine synthase (AdoMet synthase) (EC 2.5.1.6) (MAT) (Methionine adenosyltransferase)	70	3 (1)
D4XL84	2-methylisocitrate lyase (2-MIC) (MICL) (EC 4.1.3.30) ((2R,3S)-2-methylisocitrate lyase)	244	4 (3)
B0V6M8	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase, oxidoreductase protein (EC 1.2.1.27)	54	2 (2)
N8W517	Chaperone protein DnaK (HSP70) (Heat shock 70 kDa protein) (Heat shock protein 70)	699	22 (18)
N9C1R2	Chaperone protein HtpG (Heat shock protein HtpG) (High temperature protein G)	99	8 (4)
N9GT89	Fatty acid oxidation complex subunit alpha [Includes: Enoyl-CoA hydratase/Delta(3)-cis-Delta(2)-trans-enoyl-CoA isomerase/3-hydroxybutyryl-	1267	23 (20)

	CoA epimerase (EC 4.2.1.17) (EC 5.1.2.3) (EC 5.3.3.8); 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (EC 1.1.1.35)]		
N8QEA2; N8W5F9	Diaminobutyrate-2-oxoglutarate aminotransferase	60	1(1)
N9F262; N9GWM7	Branched-chain amino acid aminotransferase	86	4(2)
N9BWF0	Aldehyde dehydrogenase	188	9 (8)
N8Q609; N8VI71	CTP synthase (EC 6.3.4.2) (Cytidine 5'-triphosphate synthase) (Cytidine triphosphate synthetase) (CTP synthetase) (CTPS) (UTP-- ammonia ligase)	118	3(2)
R9B812	Electron transfer flavoprotein subunit alpha	296	4(3)
Q6FA54	Elongation factor Ts (EF-Ts)	202	7 (6)
A0A009YFB5; N9D5L9; N9DIB0, N9S5E2	Elongation factor Tu (EF-Tu)	350	6(4)
A0A072D266; A0A077KVR1; A0A0Q7F8K2; A0A0Q7F8K2; N8TG82; N8YAL6	GTP-binding protein TypA	118	4 (3)
A0A0M1HU50	S-adenosylmethionine synthase (AdoMet synthase) (EC 2.5.1.6) (MAT) (Methionine adenosyltransferase)	134	6 (2)
N8W0L6	Fatty acid oxidation complex subunit alpha	2147	26 (25)
A0A0A7XHH1	Membrane protein	377	6(4)
L9M1X7	Outer membrane protein Omp38	275	4(3)
A0A0B0KJ89; N8W5N8	Phosphoribosylformylglycine midine cyclo-ligase (EC 6.3.3.1) (AIR synthase) (AIRS) (Phosphoribosyl-aminoimidazole synthetase)	84	3(1)
A0A0M1HWX7; A0A1P8EJ23; N9BW86	Site-determining protein	146	3(2)
Q6F807	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] (EC 1.3.1.9)	85	2(1)
D0SN07	Oligopeptidase A (EC 3.4.24.70)	68	3 (2)

D0SL56	Outer membrane protein assembly factor BamB	64	3 (2)
D0SLF3	Outer membrane protein Omp38	434	7(5)
A0A150HNS0	Outer membrane protein transport protein (OMPP1/FadL/TodX)	133	3 (3)
D0SHR6	Oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family protein	257	7(1)
D0SMW7	Peptidase, S41 family (EC 3.4.21.-)	61	6 (3)
D0SHS3	Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	86	3 (3)
D0SRG4	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide synthase (N5-CAIR synthase) (EC 6.3.4.18) (5-(carboxyamino)imidazole ribonucleotide synthetase)	46	3 (2)
D0SK84	Phosphoserine aminotransferase (EC 2.6.1.52) (Phosphohydroxythreonine aminotransferase) (PSAT)	77	2(0)
B0VEA3	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase (EC 2.7.7.8) (Polynucleotide phosphorylase) (PNPase)	179	6 (4)
D0SLH1	Proline--tRNA ligase (EC 6.1.1.15) (Prolyl-tRNA synthetase) (ProRS)	88	2 (2)
Q6FF97	Elongation factor Tu (EF-Tu 1)	79	1(1)
B0V8T8	Putative acyl coenzyme A dehydrogenase (HcaD-like) (EC 1.3.99.13)	58	2 (1)
B0V755	Putative acyl-CoA thiolase (EC 2.3.1.-)	99	2 (2)
Q6F9Y3	Putative enoyl-CoA hydratase/isomerase (EC 4.2.1.17)	87	2 (2)
D0SJX9	Putative isocitrate lyase	871	18 (12)
Q6FDB8	Fe/S biogenesis protein NfuA	80	1(1)
D0SQA3	Putative NAD(P)(+) transhydrogenase (AB-specific), alpha subunit	100	4(1)
B0V9B1	Putative NADPH:quinone reductase and related Zn-	81	2 (2)

	dependent oxidoreductase (EC 1.6.5.5)		
F0KH17	Putative short-chain dehydrogenase	162	3(2)
A0A077L914	Putative TonB-dependent receptor	171	7 (6)
B0V4L1	Putative transcriptional regulator (AraC family)	63	1 (1)
D0SJY4	Sulfate adenylyltransferase subunit 1 (EC 2.7.7.4) (ATP-sulfurylase large subunit) (Sulfate adenylyl transferase) (SAT)		
B0V8R0	Putative transport protein (ABC superfamily, atp_bind)	234	8(0)
B0VN97	Putative type I restriction-modification system DNA methylase (HsdM) (EC 2.1.1.72)	89	7 (5)
Q6F836	Pyridine nucleotide transhydrogenase (Proton pump), alpha subunit (Part1) (EC 1.6.1.2)	100	4(1)
A0A0R4J6P6	Pyrroline-5-carboxylate reductase (P5C reductase) (P5CR) (EC 1.5.1.2) (PCA reductase)	50	1(1)
A3M959	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha (RNAP subunit alpha) (EC 2.7.7.6) (RNA polymerase subunit alpha) (Transcriptase subunit alpha)	500	9 (8)
P16706	Tryptophan synthase beta chain (EC 4.2.1.20)	62	1 (1)
D0S435	50S ribosomal protein L2	140	3(1)
N8PCE7	50S ribosomal protein L3 glutamine methyltransferase (L3 MTase) (EC 2.1.1.298) (N5-glutamine methyltransferase PrmB)	66	2 (1)
D0STQ5	GTPase Era	49	2 (1)
D0SK21	Serine protease MucD (EC 3.4.21.-)	215	7(2)
Q6F8H5	RNA polymerase sigma factor RpoD (Sigma-70)	53	2 (1)
B0VBD1	Soluble pyridine nucleotide transhydrogenase (NAD(P)(+))	57	2 (1)

	transhydrogenase [β -specific] (EC 1.6.1.1)		
D0SLY5	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit (EC 1.3.5.1)	171	12 (9)
D0SLZ0; Q6F8L5	Succinate--CoA ligase [ADP- forming] subunit beta (EC 6.2.1.5) (Succinyl-CoA synthetase subunit beta) (SCS- beta)	330	11 (8)
D0SK26	Sulfate ABC transporter, sulfate-binding protein	57	3 (2)
N9BQU7	Sulfate adenylyltransferase subunit 1 (EC 2.7.7.4) (ATP- sulfurylase large subunit) (Sulfate adenylyl transferase) (SAT)	242	5(3)
D0SPB8	Threonine synthase (EC 4.2.3.1)	419	8 (8)
D0SL81	TonB-dependent receptor	1015	22 (19)
D0SPY2	TonB-dependent siderophore receptor	93	3 (2)
D0SMU9	Transaldolase (EC 2.2.1.2)	175	4(2)
B0V5Q2; D0SQE4	Transcription termination factor Rho (EC 3.6.4.-) (ATP- dependent helicase Rho)	129	5 (3)
D0SPK0	Transcription termination/antitermination protein NusA	174	9 (6)
D0S3D8	Transketolase (EC 2.2.1.1)	109	3 (3)
D0SKI3	Elongation factor G (EF-G)	795	21 (17)
D0SMK1	Elongation factor Ts (EF-Ts)	554	11 (10)
A0A022I1Z0	Elongation factor Tu (EF-Tu)	535	8 (7)
D0SMY1	Trigger factor (TF) (EC 5.2.1.8) (PPIase)	1030	21 (21)
A0A0N9VCE7	tRNA modification GTPase MnmE (EC 3.6.-.-)	59	2 (1)
D0SLZ8	Tryptophan--tRNA ligase (EC 6.1.1.2)	51	1 (1)
Q6F7B5	Two-component response regulator	98	2(1)
D0SRK2	Tyrosine--tRNA ligase (EC 6.1.1.1) (Tyrosyl-tRNA synthetase) (TyrRS)	230	7(1)
N9LFF9	UDP-N-acetylglucosamine 2- epimerase	142	3 (2)

D0SP04	Bifunctional protein GlmU [Includes: UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase (EC 2.7.7.23) (N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase); Glucosamine-1-phosphate N-acetyltransferase (EC 2.3.1.157)]	73	2 (1)
D0SJW7	Universal stress family protein	130	3(1)
N8TGA2	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase (EC 2.7.7.9) (UDP-glucose pyrophosphorylase)	87	2 (2)
D0CCK5	Transcriptional regulatory protein OmpR	98	2(1)
gi 564742173	2,hydroxycyclohexanecarboxyl-Coa dehydrogenase [Acinetobacter baumannii zw85-1]gi 564742173	85	2(1)
gi 586961731	chemotaxis protein Che Y [Acinetobacter baumannii 25307_6]	98	2 (1)
gi 648402256	cytochrome P450 [Acinetobacter venetianus]	358	12 (8)
gi 262312654	BSFGBNXSFGNSXB XDGNBXFN	55	2(0)
gi 1030036870	Hypothetical protein AY607_07440 [Acinetobacter sp. SFA]	54	2(0)
gi 262312655	Hypothetical protein HMPREF0026_01016 [Acinetobacter junii SH205]	99	5 (4)
gi 712286287	Hypothetical protein GW12_19300 [Acinetobacter sp. HR7]	53	2(0)
gi 496874432	hypothetical protein [Acinetobacter sp. WC-141]	156	3(1)
gi 49531379	Conserved hypothetical protein; putative ATPase [Acinetobacter sp. ADP1]	51	1(1)
gi 692534111	hypothetical protein	150	4 (4)

	GS19_17265, partial [Acinetobacter sp. MII]		
gi 490956069	MULTISPECIES: hypothetical protein [Acinetobacter]	71	3 (2)
gi 491100482	hypothetical protein [Acinetobacter junii]	60	2 (1)
gi 948331820	hypothetical protein APB87_18305 [Acinetobacter pittii]	59	1 (1)

ANEXO 2. Protocolo de digestão de proteínas para serem submetidas às análises por espectrometria de massas.

As bandas do gel foram cortadas em pedaços de 1mm², e em seguida submetidas à descoloração, adicionando 0,5 mL da solução 1 (metanol 50%, ácido acético 2,5% em água purificada), sendo incubadas por 3h à temperatura ambiente. Após isso foi feita a desidratação, removendo a solução 1, adicionando 200 µL de acetonitrila (100 %), deixando nesta solução por 5 minutos. Em seguida, removeu-se a acetonitrila e repetiu-se este passo mais uma vez. Evaporou-se o que restou da acetonitrila em evaporador 2 a 3 minutos, depois foi adicionado 30 µL da solução de DTT 10 mM incubando por 30 minutos à temperatura ambiente. Transcorrido o tempo, foi removida a solução de DTT e foi adicionado 30 µL da solução de IAA 50 mM, incubando por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foi removida a solução de IAA e o gel foi incubado com 100 µL de bicarbonato de amônio 100 mM por 10 minutos, e em seguida, removendo esta solução. O gel foi desidratado novamente com 200 µL de acetonitrila (100 %), incubando por 5 minutos à temperatura ambiente e depois removendo a solução. Posteriormente o gel foi hidratado com 200 µL de bicarbonato de amônio 100 mM por 10 minutos, removendo a solução de bicarbonato de amônio em seguida. O gel foi então desidratado 200 µL de acetonitrila (100%), incubando por 5 minutos à temperatura ambiente em seguida removendo a acetonitrila repetindo este passo. Depois evaporou o que restou de acetonitrila em evaporador 2 a 3 minutos. Foi preparado tripsina: 20 µg de tripsina em 100 µL de bicarbonato de amônio 50 mM gelado. Concentração final da tripsina 20ng/ µL. Então adicionou-se 30-50 µL da solução de tripsina e reidratou-o por 30 minutos em banho de gelo. Então foi removido o excesso de solução de tripsina e adicionar 5 a 20 µL de bicarbonato de amônio 50 mM para cobrir o gel, incubando-o depois durante 16h a 37 °C.

Após o tempo, foi realizada a *extração*, adicionando 30 µL da solução de extração 1 (ácido fórmico 5% em água purificada), incubando por 10 minutos a temperatura ambiente. Depois foi adicionado 30 µL da solução de extração 2 (ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%) seguidamente incubando por 10 minutos à temperatura ambiente, posteriormente coletando o sobrenadante no tubo que foi previamente separado. A amostra foi inserida em evaporador (~40 minutos) de forma a restar aproximadamente 1 µL (tentar não evaporar totalmente a amostra e armazenado a amostra a -20°C até a realização da análise. Para análise, a amostra foi ressuspensa em 20 µL de ácido fórmico 0,1%.

ANEXO 3. Mapa integrativo de processos biológicos de proteínas de *A. junii* SB132. O tamanho do nó indica a quantidade de proteínas associados, e as cores mais escuras um maior suporte estatístico (P-value) para cada categoria.

