

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA DE SOBRAL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DANIEL DE BRITO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DE GASOLINA POR
BURKHOLDERIA SP.

SOBRAL

2012

DANIEL DE BRITO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DE GASOLINA POR
*BURKHOLDERIA SP.***

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maranguape
Silva da Cunha

SOBRAL

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca da Faculdade de Medicina de Sobral

B875a Brito, Daniel de.

Avaliação do potencial de biodegradação de gasolina por *Burkholderia sp.* / Daniel de Brito. – 2012.

69 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2012.

Área de Concentração: Macromoléculas.

Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Maranguape da Silva Cunha.

1. *Burkholderia*. 2. Biodegradação Ambiental 3. Gasolina. I. Título.

CDD 572

DANIEL DE BRITO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DE GASOLINA POR
*BURKHOLDERIA SP.***

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha (Orientador)

Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

Prof. Dr. Victor Alves Carneiro

Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle

Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA.

À minha saudosa avó Maria Gabriel da Silva,

dedico honrosamente.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e por colocar nesta todos que me ajudaram nesta realização. Por fazer crescer em mim a força de vontade, confiança, determinação, disciplina e fé que permitiram esta conquista.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha, sem o qual não existiria em mim um pesquisador. Por todo ensinamento, formação humana e científica, tão imprescindível para a realização desta pesquisa como coroação de um trabalho firmado na confiança, dedicação, respeito, amizade, compreensão e paciência. Pela excelente orientação, presença e contribuição fundamentais para esta vitória.

Ao meu amigo João Garcia Alves Filho, pelo apóio irrestrito nos experimentos, na compreensão e manipulação dos softwares utilizados na interpretação dos dados. Pela partilha de conhecimentos bioquímicos no cotidiano, pelo estímulo, parceria e paciência.

Ao Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada pela importante contribuição para a implantação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia no interior do estado do Ceará, com o qual foi possível esta realização. Por todo suporte conferido ao programa, em especial a este experimento, pelas orientações e exemplos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro essencial a realização desta conquista.

Ao Dr. Sérgio Miana Faria pesquisador da EMBRAPA Agrobiologia (Rio de Janeiro) por disponibilizar a coleção de beta-rizóbios da qual trabalhamos com o isolado SMF 090.

Ao Cláudio Cunha por trazer a coleção de beta-rizóbios da EMBRAPA Agrobiologia (Rio de Janeiro) para nosso estado.

A amiga Maria Auxiliadora Sousa Oliveira, pela ajuda nos experimentos, na escrita, pelos conselhos e paciência.

Aos amigos Ricardo Basto Souza, Francisco Robson Farias, José Airton Dias Martins, Antônio Valdir Gomes Lima Júnior, Antônio Clairtom Moura de Sousa, Francisco Wagner Cavalcante e Cícero Luiz Sousa Silva pela amizade fraterna e verdadeira, pelo apóio e conselhos tão essenciais nos momentos de tomada de decisão, pela torcida e companheirismo.

Aos estudantes de iniciação científica, em especial aqueles que trabalham diretamente comigo: Aurilene Gomes Cajado, Jedson Antonio de Sousa Aragão e Mônica Valéria Almeida Aguiar pela ajuda incondicional nos experimentos, pela dedicação, pontualidade, disciplina e disposição para aprender. Além do carinho, respeito e companheirismo.

À minha namorada Nívea Thereza Rodrigues, pelo carinho, atenção, compreensão e companhia em dividir momentos difíceis durante a fase final do trabalho. Pelo amor e paciência.

Aos integrantes do Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biotecnologia de Sobral – NUBIS, pela colaboração nos experimentos de proteômica e bioinformática, fundamentais para conclusão deste trabalho. A saber: Antônio Francisco de Sousa, Bruno Bezerra Carneiro, Maria Amélia Araújo Soares, Vitória Virginia Magalhães Soares, Cleane Gomes Moreira, Tatiana Maria Farias Pinto, Áurea Morgana Silveira Vasconcelos, Nyanne Hardy Lima Pontes, Raulzito Fernandes Moreira, Flávia Muniz de Mesquita, Crislay Maria Pereira Fontenele, Maria Nágila Carneiro Matos, Maria Gleiciane de Queiroz Martins e Mariana Silva.

Ao Dr. Celso Shiniti Nagano e toda a equipe do Laboratório de Espectrometria de Massa (LEMAP) pelos experimentos envolvendo MS.

Ao Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BIOMOL), em especial a Professora Dra. Kyria Santiago do Nascimento pelo apóio prestado

Ao Laboratório de Imunologia e Bíoquímica de Sobral – LIBS, na pessoa do Prof. Dr. Edson Holanda Texeira e toda a equipe, em especial ao Dr. Francisco Vasciliepe de Sousa Arruda e Dr. Victor Alves Carneiro.

Ao Laboratório de Microbiologia, em especial ao técnico Francisco Ruliglésio Rocha.

Aos colegas de mestrado Anderson Weiny Barbalho Silva, Danielle Rocha do Val, Ellen de Vasconcelos da Cunha, Fco. Flávio Vasconcelos Evaristo, Fco. Ronaldo Farias Lima , Gisvani Lopes de Vasconcelos, Joseíres Lira Sousa Fontenelle, Luciana Antonia Araújo de Castro, Manuela Almeida Montenegro, Maria Gleiciane Queiroz Martins, Maria Juliane Passos, Maria Nágila Carneiro Matos, Nairley Cardoso Sá e Robério Ferreira Fiúza por todos os momentos vividos durante esses anos.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) *campus* de Sobral e seus funcionários.

Aos professores: Dr. André Luis Coelho da Silva, Dr. Benildo de Sousa Cavada, Dr. Gerardo Cristino Filho, Dr. José Roberto Viana Silva, Dra. Mirna Marques Bezerra, Dr. Ricardo Pires dos Santos, Rodrigo Maranguape da Silva Cunha, Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto, Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha, Dra. Kyria Santiago do Nascimento e Dr. Walter A. Zin.

Aos membros examinadores da banca Dr. Victor Alves Carneiro da Universidade Federal do Ceará - UFC e Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA.

À minha família: minha mãe Inácia Helena de Brito, minhas tias Raimunda Maria de Brito (Tidô) e Iraci Maria de Brito, minha prima Lucineide Marques de Brito e minha avó Maria Gabriel da Silva (em memória) por consistirem no alicerce do meu ser.

“As grandes idéias surgem da
observação dos pequenos
detalhes”.

Augusto Cury

RESUMO

O táxon genérico *Burkholderia* apresenta grande diversidade metabólica, possibilitando que estas proteobactérias vivam numa variedade de habitats, dentre os quais destacamos o solo, água (incluindo água do mar), plantas, fungos, animais e até mesmo seres humanos. Uma das aplicações biotecnológicas mais marcantes é a capacidade de promover a biodegradação de poluentes. Assim, este estudo visou a identificação do isolado de *Burkholderia* SMF 090, bem como a avaliação do potencial na utilização da gasolina como fonte de carbono e a identificação de vias metabólicas possivelmente envolvidas na degradação dos componentes da gasolina através da realização de análises proteômicas. A identificação do isolado SMF 090 e análise da filogenia molecular foi realizada pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. Posteriormente, foram realizadas análises de filogenia molecular e reconstrução de árvores filogenéticas com outras bactérias do gênero. Para a caracterização do perfil de crescimento do isolado SMF 090 foram realizadas curvas de crescimento em meio nutritivo (TY), meio sem fonte de carbono (BH), BH suplementado com gasolina comercial e BH suplementado com D-glicose. O estudo das proteínas diferencialmente expressas ocorreu através de eletroforese bidimensional, de espectrometria de massa e análises de bioinformática. Através da análise do 16S rDNA, sugeriu-se que SMF 090 está relacionada à *Burkholderia* *sabiae* Br3407 e ambos descendem de um ancestral comum recente. A bactéria estudada foi capaz de crescer em meio mineral contendo gasolina como única fonte de carbono. Foi possível observar proteínas diferencialmente expressas entre os grupos testados, as quais podem estar associadas ao metabolismo de degradação de hidrocarbonetos. As análises dos géis de 2DE e os dados de espectrometria de massas permitiram a identificação de várias proteínas das vias de catabolismo dos hidrocarbonetos aromáticos monocíclicos e policíclicos. Portanto, o estudo apresentou informações relevantes sobre o metabolismo de Burkholdeiras como potenciais biodegradadoras de gasolina.

Palavras-chave: *Burkholderia*. Biodegradação. Gasolina.

ABSTRACT

The generic taxon *Burkholderia* presents a high metabolic diversity that allows these protobacteria live in a wide range of habitats, among these are the soil, water (including sea water), plants, fungi, animals and even humans. A remarkable biotechnological application is the capacity to promote the pollutants biodegradation. Thus, this study aimed the identification of *Burkholderia* SMF 090 isolate, as well the evaluation of its potential on the utilization of gasoline as a carbon source and the identification of metabolic pathways possibly involved in the degradation of gasoline on its components through realization of proteomic analysis. The identification of the SMF 090 isolate and the analysis of molecular phylogeny were carried out by 16S rRNA gene sequencing. In addition, the molecular phylogeny was analyzed and phylogenetic trees were reconstructed using other bacteria from the same genus. In order to characterize the growth pattern of SMF 090, bacterial growth curves were assessed using the media TY (a nutritive media), BH (a medium without carbon), BH plus commercial gasoline and BH plus D-glucose. The study of differentially expressed proteins was performed using bidimensional electrophoresis, mass spectrometry and bioinformatics analysis. After the 16S rRNA analysis was suggested that SMF 090 is related to *Burkholderia sabiae* Br3407 and both descended from a recent common ancestral. The strain grown in mineral media containing gasoline as the unique carbon source. Differentially expressed proteins were observed between the tested groups and these proteins may be associated to the metabolic degradation of hydrocarbons. The analysis of data provided by 2DE electrophoresis and mass spectrometry allowed the identification of various proteins related to the monocyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons catabolism pathway. Therefore, this study showed relevant results about the growth of *Burkholderia* as a potential gasoline biodegradant.

Keywords: *Burkholderia*. Biodegradation. Gasoline.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | Pág. |
|-----------|---|
| Figura 1 | Estrutura química dos compostos BTEX..... 16 |
| Figura 2 | Porcentagem em massa dos compostos da fração monoaromática da gasolina.. 16 |
| Figura 3 | Esquema da clivagem do catecol via <i>orto</i> 24 |
| Figura 4 | Esquema da clivagem do catecol via <i>meta</i> 25 |
| Figura 5 | Dendograma do isolado SMF 090 baseado no gene 16S rRNA. Reconstrução do dendograma utilizando o programa MEGA 5.05 e algoritmo Neighbor-joining. A seqüência de <i>Ralstonia pickettii</i> ATCC27511 e <i>Pandoraea apista</i> CCUG38412 foram utilizadas como <i>outgroup</i> 42 |
| Figura 6 | Dendograma do isolado SMF 090 baseado no gene 16S rRNA. Reconstrução da Árvore Filogenética utilizando o programa MEGA 5.05 e algoritmo Máxima verossimilhança. A seqüência de <i>Ralstonia pickettii</i> ATCC27511 e <i>Pandoraea apista</i> CCUG38412 foram utilizadas como <i>outgroup</i> 43 |
| Figura 7 | Dendograma do isolado SMF 090 baseado no gene 16S rRNA. Reconstrução do dendograma utilizando o programa MEGA 5.05 e algoritmo Máxima parcimônia. A seqüência de <i>Ralstonia pickettii</i> ATCC27511 e <i>Pandoraea apista</i> CCUG38412 foram utilizadas como <i>outgroup</i> 44 |
| Figura 8 | Curva de crescimento do isolado SMF 090 em meio TY..... 46 |
| Figura 9 | Imagem de coloração de Gram do isolado SMF 090 utilizando microscopia óptica..... 46 |
| Figura 10 | Curva de crescimento do isolado SMF 090 em meio BH..... 48 |
| Figura 11 | SDS-PAGE de proteínas totais do isolado SMF..... 49 |
| Figura 12 | Géis bidimensionais de referencia de proteínas de <i>Burkholderia</i> crescidas na ausência (A) e presença (B) de gasolina comercial. Os grupos controle (A) e teste (B) contem 542 e 256 <i>spots</i> respectivamente. A focalização isoeétrica foi feita com faixa de pH de 4 a 7 e a segunda dimensão feita em gel de poliacrilamida a 12,5% corado com Comassie G-250..... 50 |
| Figura 13 | Gráfico de dispersão dos géis bidimensionais de proteínas intracelulares de <i>Burkholderia</i> 51 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 14 | Distribuição das proteínas de <i>Burkholderia</i> de acordo com o ponto isoelétrico e massa molecular..... | 53 |
| Figura 15 | Via de degradação do benzoato. O retângulo vermelho mostra a via de degradação do catecol. Em verde são mostradas as enzimas do gênero <i>Burkholderia</i> com sequência depositada em bancos de dados..... | 54 |
| Figura 16 | <i>Spots</i> com expressão aumentada no grupo teste..... | 55 |
| Figura 17 | <i>Spot</i> 1208 com expressão aumentada no grupo teste..... | 61 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|-----|
| Tabela 1- | Poluentes conhecidos por serem degradados por espécies de <i>Burkholderia</i> . (Modificado de Urbance et al., 2003)..... | 222 |
| Tabela 2- | Resultado da busca por similaridade utilizando a ferramenta Blast do NCBI..... | 400 |
| Tabela 3- | Busca manual por spots com valores de pI e massa molecular próximos dos valores teóricos de enzimas envolvidas com a degradação do catecol. Spot ID, número de identificação do spot; Teor. (Teórico); Exp. (experimental)..... | 55 |
| Tabela 4- | Lista das proteínas de <i>Burkholderia</i> com expressão suprimida no grupo teste identificadas por MS/MS. A busca foi feita no MASCOT restringindo o banco de dados do SwissProt para o táxon “bacteria”. Foi levada em consideração a adição de carboximetil como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável. A tolerância para MS e MS/MS foi de 1,2 e 0,6, respectivamente..... | 56 |
| Tabela 5- | Lista das proteínas de <i>Burkholderia</i> com expressão suprimida no grupo teste identificadas por PMF. A busca foi feita no ProFound restringindo o banco de dados do NCBI nr para o táxon “bactéria”. As modificações incluíram “Iodoacetamida (Cys)” e oxidação da metionina..... | 57 |
| Tabela 6- | Lista de proteínas diferencialmente expressas em <i>Burkholderia</i> (com expressão aumentada no grupo teste) identificadas por PMF. A busca foi feita no ProFound restringindo o banco de dados do NCBI nr para o táxon “bactéria”. As modificações incluíram “Iodoacetamida (Cys)” e oxidação da metionina..... | 59 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|--|
| 2D | Eletroforese Bidimensional |
| BH | Meio Bushnell Haas |
| BLAST | Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Básico Local |
| BLASTn | Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Básico Local (nucleotídeo-nucleotídeo) |
| BTEX | Benzeno, tolueno, etilbenzeno e os três xilenos orto, meta e para |
| CHAPS | Ciclohexilamino dimetilamônio propano sulfonato |
| CID | Decomposição induzida por colisão |
| CONAMA | Conselho Nacional do Meio Ambiente |
| COV | Compostos Orgânicos Voláteis |
| D. O. | Densidade Óptica |
| DDA | Análise direta de dados |
| ddNTP | Didesoxirribonucleotídeos Trifosfatados |
| DDT | <i>Dicloro Difenil Tricloroetano</i> |
| DNA | <i>Ácido Desoxirribonucléico</i> |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| ESI | Ionização por Electrospray |
| GenBank | Banco de Dados de Sequências Genéticas |
| IEF | Focalização Isoelétrica |
| IPG | Gradiente de pH Imobilizado |
| IUPAC | União Internacional de Química Pura e Aplicada |
| kDa | Kilodalton |
| LMW | Marcador de Baixo Peso Molecular |
| MALDI | Dessorção/Ionização a laser Auxiliado por Matriz |
| MEGA | <i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i> |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| MS | Espectrometria de Massa |

| | |
|----------|--|
| NCBI | Centro Nacional para Informação Biotecnológica |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| pI | Ponto Isoelétrico |
| PPM | Parte por Milhão |
| rRNA | RNA Ribossômico |
| SDS | Dodecilsulfato de Sódio |
| SDS-PAGE | Eletoforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de Dodecil Sulfato de Sódio |
| SMF | Sérgio Miana de Faria |
| TE | Tampão Tris-EDTA |
| TY Meio | Triptona-Levedura |
| PHB | Polihidroxibutirato |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 14 |
| 2.1 Degradação ambiental e indústria petrolífera | 14 |
| 2.1.1 Petróleo | 14 |
| 2.1.2 Gasolina | 15 |
| 2.2 Biorremediação | 18 |
| 2.3 Bactérias envolvidas na degradação do petróleo | 20 |
| 2.4 Gênero <i>Burkholderia</i> | 20 |
| 2.4.1 Descrição | 20 |
| 2.4.2 Metabolismo de degradação | 23 |
| 2.5 Proteômica | 25 |
| 3 OBJETIVOS | 28 |
| 3.1 Objetivos gerais | 28 |
| 3.2 Objetivos específicos | 28 |
| 4 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL | 29 |
| 5 MATERIAIS E MÉTODOS | 30 |
| 5.1 Identificação do isolado SMF090 e análise de filogenia molecular | 30 |
| 5.1.1 Bacteria empregada e condições de cultivo | 30 |
| 5.1.2 Extração e purificação do ácido desoxirribonucléico (DNA) | 30 |
| 5.1.3 Amplificação do gene 16S rRNA | 31 |
| 5.1.4 Sequenciamento dos amplicons do gene 16S rRNA | 31 |
| 5.1.5 Análise das sequências de nucleotídeos | 32 |
| 5.1.6 Identificação do isolado SMF 090 com base no gene 16S rRNA | 32 |
| 5.1.7 Análise de filogenia molecular e reconstrução de árvores filogenéticas .. | 33 |
| 5.2 Ensaio de biodegradação da gasolina comercial | 33 |
| 5.2.1 Crescimento do isolado SMF090 em meio TY na presença de gasolina .. | 33 |
| 5.2.2 Crescimento do isolado SMF090 em meio BH na presença de gasolina . | 34 |
| 5.3 Análise de proteínas diferencialmente expressas do isolado SMF090 crescidas em meio contendo gasolina comercial por 2D e MS | 34 |
| 5.3.1. Cultivo do isolado SMF090 em meio TY na presença de gasolina | 34 |
| 5.3.2 Extração das Proteínas Intracelulares | 35 |
| 5.3.3 Dosagem de proteínas totais | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 5.3.4 Eletroforese bidimensional | 36 |
| 5.3.5 Seleção e processamento dos <i>spots</i> para análise por Espectrometria de Massa..... | 37 |
| 5.3.6 Bioinformática..... | 37 |
| 5.4 Análise Estatística..... | 38 |
| 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 39 |
| 6.1 Extração e purificação do ácido desoxirribonucléico (DNA) | 39 |
| 6.2 Amplificação do gene 16S rRNA..... | 39 |
| 6.3 Seqüenciamento do gene 16S rRNA, análise das seqüência de nucleotídeos e identificação do isolado SMF 090..... | 39 |
| 6.4 Análise de filogenia molecular e reconstrução de árvores filogenéticas | 41 |
| 6.5 Crescimento do isolado SMF 090 em meio TY na presença de gasolina | 45 |
| 6.6 Crescimento do isolado SMF 090 em meio BH na presença de gasolina | 47 |
| 6.7 Análise de proteínas diferencialmente expressas do isolado SMF090 crescidas em meio contendo gasolina comercial por 2D e MS | 49 |
| 6.7.1 Extração e quantificação de proteínas..... | 49 |
| 6.7.2 Análise do perfil protéico do isolado SMF 090 por eletroforese bidimensional | 50 |
| 6.7.3 Reprodutibilidade dos géis bidimensionais | 50 |
| 6.7.4 Distribuição das proteínas de <i>Burkholderia</i> de acordo com o ponto isoelétrico e massa molecular | 52 |
| 6.7.5 Identificação de proteínas por espectrometria de massa | 56 |
| 7 CONCLUSÃO..... | 62 |
| REFERÊNCIAS..... | 63 |

1 INTRODUÇÃO

A indústria petrolífera possui, no Brasil e no mundo, uma marcante importância econômica. Suas atividades têm se intensificado visando acompanhar a crescente demanda da sociedade. Logo, é previsível a ocorrência de acidentes que afetem de forma direta ou indireta a população e o meio ambiente, uma vez que o petróleo e seus derivados contêm substâncias tóxicas e carcinogênicas.

Um dos derivados de petróleo mais comuns é a gasolina. Esta possui diversas substâncias tóxicas, incluindo o benzeno, tolueno, etileno e xileno, coletivamente denominados de BTEX. Vale salientar que a gasolina comercializada no Brasil, além dos BTEX, contém etanol, o que a torna mais solúvel em água, aumentando assim os danos ao ambiente.

A biorremediação constitui atualmente uma das melhores estratégias para recuperação de solos e água contaminados por petroderivados. Portanto, a descoberta de novos micro-organismos hábeis em metabolizar compostos tóxicos transformando-os em inofensivos é cada vez mais indispensável.

A caracterização dos mecanismos moleculares específicos de biorremediação pode se tornar uma poderosa ferramenta no desenvolvimento de produtos biotecnológicos para biorremediar ambientes contaminados. Assim, o presente trabalho faz uso de técnicas de proteômica associadas à bioinformática propõe gerar conhecimento sobre o metabolismo de *Burkholderias* como potenciais biodegradadoras de gasolina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Degradação ambiental e indústria petrolífera

Nos dias atuais, vivemos em uma sociedade altamente consumidora e que depende dos combustíveis fósseis para fornecer os produtos e serviços necessários à manutenção do aparato de facilidades que o nosso cotidiano exige. Segundo Schirmer (2004) a indústria petrolífera constitui a principal fonte energética mundial, assim uma grande estruturação da cadeia produtiva desse setor é exigida para atender toda essa demanda. Acidentes e vazamentos vêm ocorrendo durante a exploração, refino, transporte e armazenamento do petróleo, provocando a contaminação de solos e rios, gerando assim, graves danos ao meio ambiente. Uma das principais preocupações é a contaminação de aquíferos que sejam usados como fonte de abastecimento de água para consumo humano. Este é um problema que, nos últimos anos, vem ganhando grande importância no Brasil em função dos diagnósticos crescentes de áreas impactadas (SCHNEIDER, *et al.*, 2003).

Segundo Finotti, Caicedo e Rodriguez (2001), as contaminações subterrâneas com petroderivados, em especial gasolina e óleo diesel, são cada vez mais frequentes tornando-se um dos maiores problemas ambientais. A contaminação de solos com gasolina, diesel, óleos em geral e outros produtos de petróleo através de vazamentos, derrames e por outras fontes tem se tornado importante foco de pesquisa (ZHOU e CRAWFORD, 1995

2.1.1 Petróleo

O petróleo é uma mistura complexa de compostos orgânicos, na maior parte alcanos e hidrocarbonetos aromáticos, com pequenas quantidades de compostos contendo oxigênio, nitrogênio e enxofre. Além disso, o petróleo apresenta outras características importantes, a saber: oleoso, inflamável, menos denso que a água, cor variando entre negro e castanho escuro e odor característico. A composição do petróleo varia em função da localização geográfica e das condições físicas, químicas e biológicas que o originaram (CRAPEZ *et al.*, 2002; VAN HAMME *et al.*, 2003).

O petróleo é a principal fonte de energia do mundo moderno, fornecendo diversos produtos, tais como: gasolina, diesel, querosene, óleo combustível, lubrificante, parafina, diversos tipos de gases e etc. (FINOTTI; CAICEDO; RODRIGUEZ, 2001; RANGEL, 2010).

2.1.2 Gasolina

A gasolina é constituída de uma mistura de hidrocarbonetos voláteis, cujos componentes são cadeias ramificadas de alcanos, alcenos, cicloalcanos e compostos aromáticos monocíclicos ou policíclicos (ANDRADE, 2008). A composição específica da gasolina está relacionada ao petróleo do qual foi originada, com o processamento utilizado para o seu refinamento e com a existência ou não de aditivos (PENNER, 2000).

Os alcanos, cuja fórmula química é $C_nH_{(2n+2)}$, são hidrocarbonetos alifáticos saturados, ou seja, possuem cadeias carbônicas acíclicas, lineares ou ramificadas, e ligações simples entre os átomos de carbono. Os alcenos (C_nH_{2n}), são hidrocarbonetos alifáticos insaturados, por apresentarem alguma ligação dupla entre os átomos de carbono.

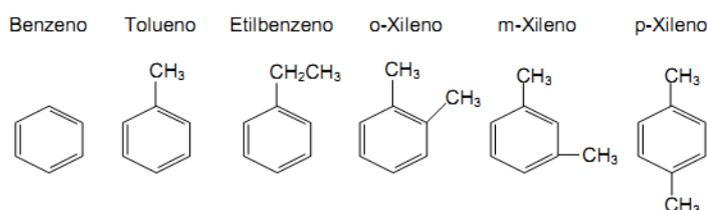
Os cicloalcanos (C_nH_{2n}), são hidrocarbonetos cíclicos saturados, caracterizados por cadeias carbônicas fechadas com ligações simples entre os átomos de carbono. Os aromáticos são hidrocarbonetos caracterizados pela presença de anéis benzênico, ou seja, possuem cadeia fechada formada por seis átomos de carbono com alternância de ligações simples e duplas.

Os compostos aromáticos com dois ou mais anéis benzênicos são chamados de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs). Devido à possibilidade da fusão de um número variável de anéis e das várias posições em que estes anéis podem se ligar entre si, há atualmente mais de 100 HAPs reconhecidos pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Contudo, somente 16 HAPs são considerados em função de sua importância industrial, ambiental e toxicológica. São eles: acenaftaleno, acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(g,h,i)pireleno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, naftaleno e pireno (POTIN *et al.*, 2004). A maior fonte de contaminação de HPAs no ambiente é devido aos afloramentos de

petróleo, à combustão de automóveis e aos acidentes ambientais envolvendo petróleo e petroderivados (BIAZATI, 2009).

Dentre os aromáticos com baixo peso molecular, destacam-se os compostos com apenas um anel, a saber: benzeno, tolueno, etilbenzeno e os xilenos (orto, meta e para), apresentados na figura 1, coletivamente chamados de BTEX (SANCHES, 2009), os quais representam os compostos mais solúveis e mais móveis encontrados na gasolina (POULSEN *et al.*, 1992).

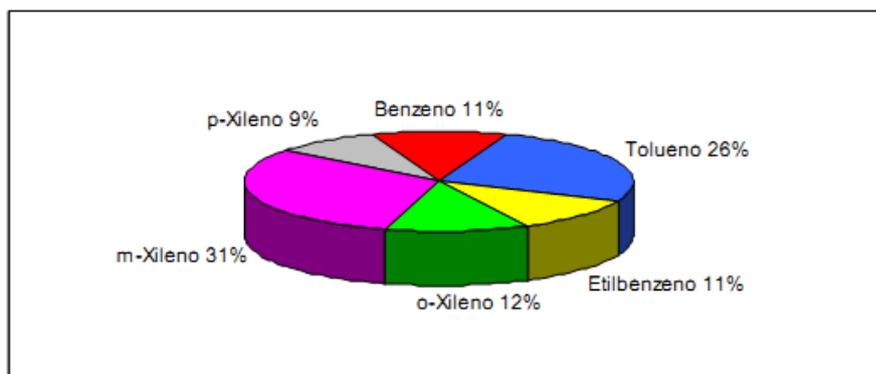
Figura 1 – Estrutura química dos compostos BTEX



Fonte: Trigueiros, 2008

Os BTEX são os hidrocarbonetos mais abundantes da gasolina, podendo representar uma parcela de 18% a 25% em massa (ANP, 2006 *apud* TRIGUEIROS, 2008; ANDRADE, 2008). As porcentagens dos compostos BTEX na gasolina são apresentadas na Figura 2.

Figura 2 – Porcentagem em massa dos compostos da fração monoaromática da gasolina.



Fonte: ANP, 2006 *apud* TRIGUEIROS, 2008

O vazamento em tanques de combustíveis representa uma das maiores fontes de contaminação de gasolina. Nos EUA é estimado que mais de 10% dos 3,5 milhões de

tanques de armazenamento de derivados de petróleo estejam vazando. No Brasil, a maioria dos tanques de armazenamento de combustível foi construída nos anos 70. A vida útil desses tanques de armazenamento é estimada em 25 anos, assim nos anos 90 cresceu a preocupação com relação aos vazamentos e os riscos envolvidos na contaminação de solos e águas subterrâneas (CUNHA *et al.*, 2008). Os vazamentos não apenas contaminam os ecossistemas dos solos, mas são também, em longo prazo, uma potencial fonte de contaminação para os aquíferos (ZHOU e CRAWFORD, 1995). A maioria dos tanques de armazenamento estão situados no subsolo, fato que dificulta o monitoramento e controle de vazamentos, os quais quando ocorridos exigem estratégias imediatas para impedir possível contaminação do solo e águas subterrâneas.

Segundo Tiburtius e colaboradores (2004), a presença dos hidrocarbonetos aromáticos no ambiente é um perigo para a saúde pública bem como para os ecossistemas, levando em conta sua toxicidade e capacidade de bioacumular ao longo da cadeia alimentar.

De acordo com Mariano (2006) e com a Resolução Conama 396/2008, o benzeno é considerado o mais tóxico dentre os BTEX, o qual possui a maior solubilidade em água dentre os constituintes da gasolina, portanto, é o composto com maior potencial de poluir o lençol freático (CORSEUIL, 1992). Normas do Ministério da saúde estabelecem o padrão de potabilidade benzeno em 10 µg/L.

Particularmente no Brasil, os efeitos ao meio-ambiente são potencializados pelas características intrínsecas da gasolina nacional. A gasolina comercializada no Brasil é misturada com aproximadamente 22-24% de etanol (CUNHA e LEITE, 2000; CORDAZZO *et al.*, 2000; POWERS *et al.*, 2001) que visa elevar o índice de octanagem da gasolina automotiva e reduzir a poluição atmosférica. Vale salientar que este procedimento provoca consequências importantes em termos de toxicidade, aumentando a persistência e alterando o padrão de deslocamento deste composto no solo (CORSEUIL e FERNANDES, 1999; ANDRADE, 2008), uma vez que a gasolina tem seu comportamento determinado através de suas características físico-químicas e da interação destes com o ambiente.

Os frequentes vazamentos de petróleo e seus derivados vêm motivando o desenvolvimento de novas técnicas que objetivam, principalmente, a descontaminação desses ambientes. Portanto, diversas técnicas estão sendo desenvolvidas para a remoção ou a degradação *in situ* ou *ex situ* de petróleo derramado e para a redução de seus efeitos sobre os ecossistemas (ANDRADE *et al.*, 2010).

Diversos processos físico-químicos e biológicos têm sido utilizados na remoção de hidrocarbonetos de petróleo puros e dissolvidos na água subterrânea, tais como: extração de vapores do solo (SVE), adsorção em carvão ativado, recuperação de produto livre, bioventilação, torres de aeração, extração com solventes, incineração, biorreatores, biorremediação no local, dentre outros (CORSEUIL e MARINS, 1997). Após um vazamento, o destino destes compostos irá depender da interação entre vários fatores, inclusive, podendo se destacar a degradação do poluente pelos seres vivos do ambiente, em especial a microbiota (CRAPEZ *et al.*, 2002).

2.2 Biorremediação

O termo biorremediação pode ser definido como um processo que utiliza organismos vivos, ou parte deles, na aceleração da transformação dos poluentes em produtos menos tóxicos através de reações bioquímicas. Diaz (2004) e Yakubu (2007), afirmam que vários estudos têm indicado a biorremediação como alternativa segura e eficaz na remoção de petróleo do ambiente, tendo em vista que grande parte dos componentes do petróleo é biodegradável. A escolha pela biorremediação leva em consideração o conhecimento das características físico-químicas do contaminante, volume vazado, tempo de vazamento, caracterização geológica e hidrológica do local contaminado, análise do meio físico superficial e subterrâneo e ainda a extensão da pluma contaminante (SPILBORGHS, 1997). A biorremediação é uma opção atraente na degradação de petróleo. Por ser um método natural, atrai vantagens sobre outros métodos a guisa de exemplo: incineração, oxidação química *in-situ*, atenuação natural monitorada, extração de vapores no solo entre outros. A biorremediação gera como produtos finais água e gás carbônico, que não apresentam toxicidade e podem ser incorporados ao ambiente sem prejuízo aos organismos vivos. Diante das técnicas desenvolvidas, a “biorremediação” vem se firmando como uma estratégia viável e promissora para o tratamento de solos contaminados por petróleo e seus derivados (BENTO *et al.*, 2003; DUA *et al.*, 2002; RAHMAN *et al.*, 2002).

A biodegradação de hidrocarbonetos é essencialmente uma reação de oxirredução onde o hidrocarboneto é oxidado e um aceptor de elétrons é reduzido. De acordo com Boopathy (2000) e Mandri e Lin (2007), a biorremediação por microorganismos utiliza tanto o metabolismo aeróbio quanto o anaeróbio. Segundo Ghiorse e

Wilson (1991), bactérias, fungos, algas e protozoários geralmente formam populações de micro-organismos nas condições subsuperficiais.

Chapelle (1993) afirma que na zona saturada, as bactérias variam de acordo com as condições geoquímicas e hidrogeológicas do aquífero, com predominância das bactérias aeróbias. Mariano (2006) relata que a estrutura química dos poluentes orgânicos tem grande importância na capacidade dos micro-organismos metabolizarem estas moléculas, principalmente em relação às taxas e extensão da biodegradação. Ele ainda afirma que alguns compostos orgânicos são biodegradados rapidamente, enquanto outros não, sendo assim recalcitrantes. Álcoois e hidrocarbonetos de baixo a médio peso molecular são exemplos de compostos facilmente biodegradáveis bem diferentes dos compostos xenobióticos que apresentam resistência à biodegradação.

A biorremediação pode ser aplicada tanto *in situ* quanto *ex situ*, como citado anteriormente. No primeiro, os procedimentos de biorremediação são aplicados no local poluído, sem a necessidade de remoção do substrato contaminado. No segundo, o substrato precisa ser removido, e a biorremediação realizada fora do local contaminado (BOOPATHY, 2000; RAMSAY *et al.*, 2000). Existem várias técnicas de biorremediação adequadas para tratamento de solos contaminados, como bioaugmentação, bioestimulação, biorremediação intrínseca, sistema de *landfarming*, bioventilação e compostagem. Para o tratamento de líquidos ou suspensões pode-se utilizar biorreatores, biofiltros (para poluentes voláteis), *pump and treat* e biosurfactantes (WETLER-TONINI1, 2010). Segundo Boopathy (2000), a técnica de biorremediação escolhida deve alcançar limpeza necessária do local poluído, apresentar níveis aceitáveis de contaminantes após a biorremediação, apresentar um custo benefício positivo em relação às demais técnicas de remediação, obter resultados conhecidos pela população e capacidade de cumprir as limitações de tempo e espaço.

Muitos micro-organismos transformam hidrocarbonetos em intermediários comuns do seu catabolismo, através de vias bioquímicas complexas, gerando assim, fontes de carbono e energia para seu metabolismo e conseqüente crescimento (DÍAZ, 2004; JACQUES *et al.*, 2007; MANDRI e LIN, 2007; SEO *et al.*, 2009).

Segundo Rosato (1997), diversos gêneros microbianos, principalmente bactérias, fungos e leveduras possuem a habilidade de degradar hidrocarbonetos do petróleo, entretanto, cianobactérias, algas e mesmo protozoários também possuem essa habilidade.

2.3 Bactérias envolvidas na degradação do petróleo

De acordo com Jacques e colaboradores (2007), bactérias degradadoras de compostos de petróleo são isoladas desde a década de 50. Os principais táxons genéricos relacionados ao catabolismo de petroderivados são *Acidovorans*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Beijemickia*, *Burkholderia*, *Nocardia*, *Paracoccus*, *Pasteurella*, *Bacillus*, *Comomonas*, *Corynebacterium*, *Cycloclasticus*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Microbacterium*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Neptunomonas*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces* e *Vibrio* (CRAPEZ *et al.*, 2002; JACQUES *et al.*, 2007; MANDRI e LIN, 2007; SEO *et al.*, 2009).

Crapez e colaboradores (2002) explicam que a formação de consórcios, com bactérias de diferentes gêneros e espécies, onde cada uma é especializada na degradação de uma ou mais frações do poluente, ocorre por causa da complexidade dos processos metabólicos necessários à degradação dos hidrocarbonetos. Assim, a descoberta de novas bactérias com potencial de degradação de compostos tóxicos é importante para o aumento do poder de eficiência da biorremediação.

Segundo Coenye e Vandamme (2003) e Qingyan e colaboradores (2008), as bactérias dos gêneros: *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Arthrobacter* e *Burkholderia* destacam-se no metabolismo de poluentes químicos. No tocante ao gênero *Burkholderia*, estudos tem se destacado em biorremediação e biodegradação de gasolina (CUNHA e LEITE, 2000).

2.4 Gênero *Burkholderia*

2.4.1 Descrição

O gênero *Burkholderia* pertence ao grupo das β -proteobactérias e foi proposto por Yabuuchi e colaboradores (1992) através de taxonomia polifásica, para acomodar as sete espécies de bactérias que antes eram classificadas como "grupo II de homologia do rRNA" do gênero *Pseudomonas*, a saber: *Burkholderia cepacia* (PALLERONI e HOLMES, 1981), *B. caryophylli* (BURKHOLDER, 1942), *B. gladioli* (SEVERINI, 1913), *B. mallei* (ZOPF, 1885), *B. pseudomallei* (WHITMORE, 1913), *B. pickettii*

(RALSTON *et al.*, 1973) e *B. solanacearum* (SMITH, 1896). *B. pickettii* e *B. solanacearum* foram, posteriormente, transferidas para o gênero *Ralstonia* (YABUUCHI *et al.*, 1995).

O gênero *Burkholderia* é constituído por bacilos gram-negativos, aeróbios, não formadores de esporos e pertencente ao filo das proteobactérias e classe das β -proteobactérias. De acordo com Fuzari Júnior (2008) bactérias do gênero *Burkholderia* armazenam polihidroxibutirato (PHB) como reserva energética a partir de fontes de carbono. Até 2009, de acordo com Magnani (2009), diversas espécies de *Burkholderia* haviam sido descritas de maneira que existiam cerca de 60 espécies conhecidas. As espécies de *Burkholderia* podem ser encontradas nos mais diversos ambientes, ocorrendo comumente no solo e rizosfera, água (incluindo água do mar), plantas, fungos, animais e até mesmo seres humanos (COENYE, 2003; VANDAMME, 2003). Segundo Sousa e colaboradores (2011) essa diversidade de habitats pode ser explicada pela extraordinária versatilidade metabólica que essas bactérias possuem.

O nome deste gênero é uma referência a Walter H. Burkholder da Cornell University, pesquisador que primeiro observou a espécie tipo (descrita como *Pseudomonas cepacia*) como patógeno causador da podridão mole da cebola (*Allium cepa* L.), conforme foi observado no Estado de Nova York nos Estados Unidos em 1940 (BURKHOLDER, 1950; COMPANT *et al.*, 2008). Contudo em 1942 este pesquisador já havia descrito uma das primeiras *Burkholderia sp.*, *Phytomonas caryophylli*, a qual foi posteriormente chamada de *Pseudomonas caryophylli* e agora *Burkholderia caryophylli* (COMPANT *et al.*, 2008).

A partir dos anos 90, com a evolução da biotecnologia, disponibilidade de máquinas seqüenciadoras de DNA e com a evolução da bioinformática, a taxonomia de bactérias passou por uma grande revolução. A capacidade de estudar o genoma, conjunto total de genes de um indivíduo, através de ferramentas de biologia molecular permitiu identificar e caracterizar a nível molecular novas espécies. O gênero *Burkholderia* foi descrito por Yabuuchi e colaboradores (1992) através da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA. O desenvolvimento dos métodos de sequenciamento de DNA, possibilitou o acúmulo de sequencias do gene 16S rRNA em bancos de dados públicos como Genbank (Centro Nacional para Informação Biotecnológica, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A comparação de seqüências da região codificadora do gene 16S rRNA é uma forma eficaz de inferir a filogenia das bactérias do gênero *Burkholderia*, visto que esse gene é bastante conservado entre as bactérias. Contudo, o gene 16S rRNA é suficientemente variável e com uma quantidade de informações capaz de revelar, claramente as relações filogenéticas entre as espécies (WOESE, 1987). A classificação de bactérias é importante para que novas espécies sejam identificadas e que as antigas sejam revistas.

Segundo Magnani (2009) muitas espécies pertencentes ao gênero *Burkholderia* têm capacidade de produzir compostos com atividade antimicrobiana, são agentes de biocontrole, produtores de plásticos biodegradáveis e biorremediadores. Além de realizarem a fixação biológica de nitrogênio em associação com leguminosas. Algumas espécies podem desenvolver simbiose com fungos e formarem biofilme.

Neste contexto, espécies do gênero *Burkholderia* têm despertado grande interesse em estudos de biodegradação de poluentes, conforme demonstrado na tabela 1 (URBANCE *et al.*, 2003).

Tabela 1 - Poluentes conhecidos por serem degradados por espécies de *Burkholderia*. (Modificado de Urbance *et al.*, 2003).

| <i>Burkholderia</i> | Poluentes degradáveis |
|---|---|
| <i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4 (ATCC 53617 ou R1808) | Benzeno, o-cresol, m-cresol, p-cresol, fenol, tolueno, TCE, naftaleno, cloroformio; US patents 4925802 e 5543317; http://genome.ornl.gov/microbial/bcep_1808/ |
| <i>Burkholderia kururiensis</i> KP23 (JCM 10599) | ¹ TCE |
| <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400 (LMG 21463) | Bifenil, ² PCBs; http://genome.ornl.gov/microbial/bfun/ |
| <i>Burkholderia phenoliruptrix</i> AC1100 (LMG 22037) | ³ 2,4,5-T, 2,3,4,6-tetraclorofenol, pentaclorofenol |

| | |
|---|--|
| <i>Burkholderia sp.</i> JS150 | TCE, benzeno, fenol, toluene, clorobenzeno, naftaleno |
| <i>Burkholderia sp.</i> CRE-7 e RP007 | ⁴ PAHs |
| <i>Burkholderia sp.</i> CSV90, EML1549, K712, RASC, TFD2 e TFD6 | ⁵ 2,4-D |
| <i>Burkholderia sp.</i> strain CBS3 | 4-Clorobenzoato, 2-nitrobenzoato, 3-nitrobenzoato, 4-nitrobenzoato, 3-nitroclorobenzeno, 2-nitrofenol, 3-nitrofenol, 2,4,6 trinitrotolueno |
| <i>Burkholderia sp.</i> strain 8 | Benzoato, 4-fluorobenzoato, 4-hidroxibenzoato |
| <i>Burkholderia sp.</i> strain KZ2 | 2-Clorobenzoato, 4-clorobenzoato, 2,4-diclorobenzoato |
| <i>Burkholderia sp.</i> strain NF100 | Fenitrotiona |

Fonte: adaptado a partir de O'SULLIVAN & MAHENTHIRALINGAM, 2005). ¹TCE: tricloroetileno; ²PCBs: bifenilos policlorados; ³2,4,5-T: 2,4,5-triclorofenoxiacético; ⁴PAHs: Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos; ⁵2,4-D: 2,4-diclorofenoxiacético. As informações relativas das cepas de *Burkholderia* pode ser obtida a partir do banco de dados: *Biodegradative Strain Database* (<http://bsd.cme.msu.edu/bsd/index.html>).

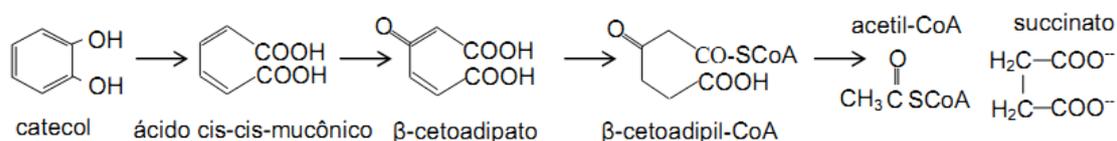
2.4.2 Metabolismo de degradação

As rotas catabólicas bacterianas dos compostos BTEX e de outros compostos aromáticos podem ser divididas em duas principais categorias, a saber: rotas metabólicas periféricas e centrais. As rotas periféricas transformam um composto original em um composto comum a muitas rotas metabólicas. Estes compostos comuns são chamados de metabólitos centrais e são metabolizados por enzimas de rotas metabólicas centrais, sendo utilizado como subproduto de crescimento, resultando em intermediários durante a reação (TRIGUEIROS, 2008).

Durante a degradação dos compostos aromáticos as enzimas oxigenase promovem a introdução do oxigênio na molécula de hidrocarboneto. Assim, os compostos aromáticos são convertidos em dihidroxi-aromáticos. O catecol é um exemplo de dihidroxi-aromático, este aliás, é o intermediário mais comumente formado durante a degradação de hidrocarbonetos aromáticos, e pode ser completamente degradado pela clivagem do anel aromático, por meio da via *meta* ou via *orto* (FARRELL E QUILTY, 1999). A via *orto*, mostrada na figura 3, diz respeito à quebra de ligação entre os átomos de carbono ligados aos grupos hidroxila do catecol, através da enzima catecol-1,2-dioxigenase, levando a formação de cis-muconato, e subsequente acetil-CoA e succinato. Os catecóis clivados pela via *meta* (figura 4), sofrem a quebra de ligação entre o átomo de carbono adjacente ao grupo hidroxila, por meio da enzima catecol-2,3-dioxigenase (HENDRICKX *et al.*, 2006), formando semialdeído 2-hidroximucônico e, posteriormente, piruvato e acetaldeido. Desta forma, podemos perceber que tanto via *orto* quanto a via *meta* geram produtos que inserem-se no ciclo do ácidos cítrico podendo serem utilizados na produção de energia e/ou biossíntese de compostos orgânicos.

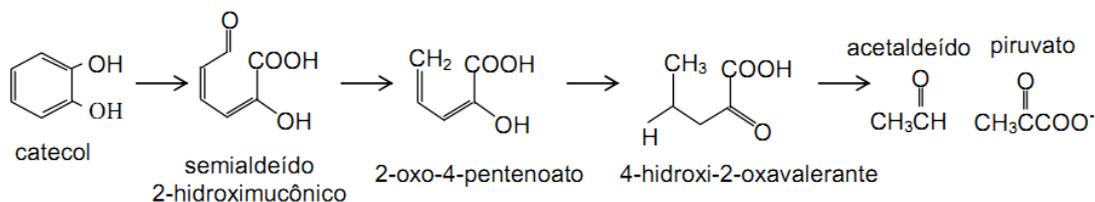
Shields e colaboradores (1995) sugeriram que a *Burkholderia cepacia* G4 possui a via *orto* para degradação de compostos aromáticos. Eles demonstraram que os dois primeiros genes (tomA e tomB) envolvidos na degradação do tolueno, estão localizados no maior dos dois plasmídeos (*pTOM*) presentes na bactéria. Os genes tomA e tomB codificam as enzimas tolueno monoxigenase e catecol-2,3-dioxigenase, respectivamente.

Figura 3 – Esquema da clivagem do catecol via *orto*.



Fonte: Trigueiros, 2008

Figura 4 – Esquema da clivagem do catecol via *meta*.



Fonte: Trigueiros, 2008

A rota metabólica primária TOM pode ser utilizada para degradação de compostos BTEX (ZYLSTRA, 1994 apud BIELEFELDT e STENSEL, 1999), por uma variedade de bactérias aeróbicas.

A rota metabólica TOM presente em *Burkholderia cepacia* G4 (NEWMAN e WACKETT, 1995) e *Burkholderia cepacia* MB2 (JORGENSEN *et al.* 1995) respectivamente, pode ser utilizada para degradação de no mínimo três dos compostos BTEX (ZYLSTRA, 1994 apud BIELEFELDT e STENSEL, 1999).

Diferente das enzimas constitutivas, aquelas que atuam nas rotas metabólicas centrais e são produzidas independentemente das condições ambientais, as enzimas degradativas são induzidas. De acordo com a teoria operon lac de Jacob-Monode (1961) a indução destas enzimas envolve a ativação de regiões específicas do genoma bacteriano. As enzimas que iniciam a utilização dos compostos BTEX são normalmente induzíveis. Para compreender os processos dinâmicos que ocorrem dentro das células, o estudo das proteínas é muito importante. Assim, o estudo da expressão protéica de bactérias na presença de compostos BTEX bem como dos demais componentes da gasolina comercializada no Brasil, através de técnicas de proteômica como a eletroforese bidimensional (2D), a espectrometria de massa e ferramentas de bioinformática, pode oferecer evidências diretas dos tipos de processos microbiológicos atuantes na remoção dos contaminantes.

2.5 Proteômica

A proteômica é uma nova tecnologia e campo de estudo pós-genômico, que se propõe a analisar de forma global o conjunto de proteínas expressas numa célula ou tecido, isto é, o proteoma.

O proteoma é o conjunto de todas as proteínas presentes em um material biológico e que, ao contrário do genoma, está em contínua mudança em resposta aos estímulos internos e externos (WILKINS, 1995; PATERSON e AEBERSOLD, 2003). A proteômica, o estudo do proteoma, é uma área recente tendo surgido em meados dos anos 90. Contudo, algumas das principais técnicas já eram bastante difundidas. A eletroforese bidimensional, por exemplo, teve início nos anos 70 (O'FARREL, 1975), e o primeiro espectrômetro de massa data de 1918. No entanto, a invenção das fontes de ionização MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) e ESI (*EletroSpray Ionization*) nos anos 80 possibilitou com que as proteínas pudessem ser levadas à fase gasosa sem a necessidade de altas temperaturas. De uma maneira geral, várias áreas da pesquisa convergiram para tornar possível o estudo de proteínas em larga escala.

Em genômica, o problema de medir a expressão de genes tem sido resolvido pela introdução de métodos como a PCR, hibridização e microarranjos. Infelizmente, não há nenhum análogo disponível para estudos envolvendo proteínas. Uma pequena quantidade de polipeptídeo deve ser detectada em pequenas quantidades sem nenhum tipo de amplificação ou hibridização (LIEBLER, 2002). Sendo assim, a análise do proteoma requer uma série de metodologias para que esse estudo se torne possível. Entre as ferramentas para proteômica destacam-se a eletroforese bidimensional, a espectrometria de massa e ferramentas de bioinformática que, além de analisarem os dados, criam e gerenciam banco de dados.

Durante a última década, a proteômica foi extensivamente aplicada à área da microbiologia. O rápido progresso nesse campo se deu primariamente pela disponibilidade de sequências genômicas de diversos organismos, e pelos avanços nas ciências de separação de proteínas e MS.

A proteômica, vista como análise em larga escala da expressão de proteínas, é considerada uma das áreas centrais da genômica funcional. Os avanços técnicos que permitem resolver e identificar centenas ou milhares de proteínas a partir de extratos protéicos complexos, através de tecnologia proteômica possibilitam a aquisição em larga escala de informações a cerca do repertório de proteínas envolvidas com diferentes situações metabólicas e fisiológicas de um dado organismo, além de detectar modificações pós-traducionais (ANDERSON e SEILHAMER, 1997).

Em bactérias, de acordo com Cash (1998), a expressão de proteínas relacionadas à vias catabólicas é dependente de substratos disponíveis no ambiente. Assim, a 2D pode ser utilizada para detectar o nível de expressão de enzimas envolvidas em

determinadas vias metabólicas em resposta a diferentes fontes de carbono. Esta técnica pode gerar resultados satisfatórios no estudo de proteômica funcional mediante alterações ambientais, tanto em organismos multicelulares quanto micro-organismos (GODOVAC-ZIMMERMANN e BROWN, 2001). A 2D pode ser utilizada para avaliar o nível de expressão de enzimas envolvidas em específicas vias metabólicas em resposta a determinadas fontes de carbono. Portanto, a análise por espectrometria de massa em tandem (MS/MS) em paralelo com a 2D desempenha um papel vital na caracterização de proteínas e peptídeos (CLAUSER; BAKER; BURLINGAME, 1999; ENG; MCCORMACK; YATES, 1994 e PERKINS, 1999).

Bactérias envolvidas na biodegradação e biorremediação, tiveram enzimas responsáveis pela degradação de poluentes ambientais identificados com sucesso usando estas tecnologias. A guisa de exemplo, a análise proteômica de *Burkholderia cepacia* MBA4 na degradação de monocloroacetato por Kwok *et al.* (2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

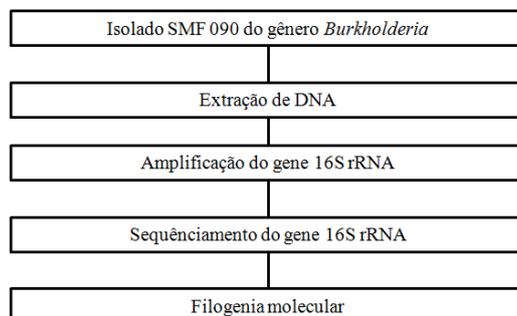
O presente trabalho teve como objetivos gerais a identificação por taxonomia molecular da cepa SMF 090, avaliar a capacidade de SMF 090 de tolerar e crescer na presença de gasolina e analisar as possíveis rotas de metabolização dos componentes da gasolina comercial.

3.2 Objetivos específicos

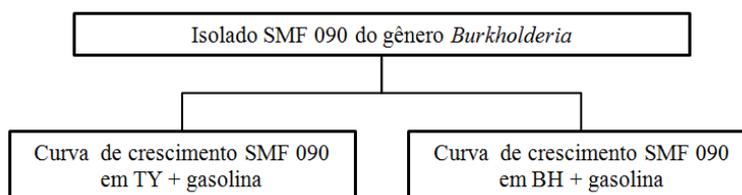
- Identificar o isolado SMF 090 por taxonomia molecular utilizando o gene 16S rRNA;
- Caracterizar os perfis de crescimento do isolado SMF 090 em meio de cultura padrão (TY) e em TY suplementado com gasolina;
- Caracterizar os perfis de crescimento do isolado SMF 090 em meio escasso de fonte de carbono (Bushell hass, BH), em meio BH enriquecido de glicose e meio BH suplementado de gasolina;
- Obter perfis de géis bidimensionais de bactérias crescidas na presença e ausência de gasolina comercial;
- Identificar as proteínas diferencialmente expressas de bactérias crescidas na presença de gasolina por espectrometria de massa;
- Identificar proteínas de vias metabólicas de degradação dos compostos aromáticos da gasolina.

4 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

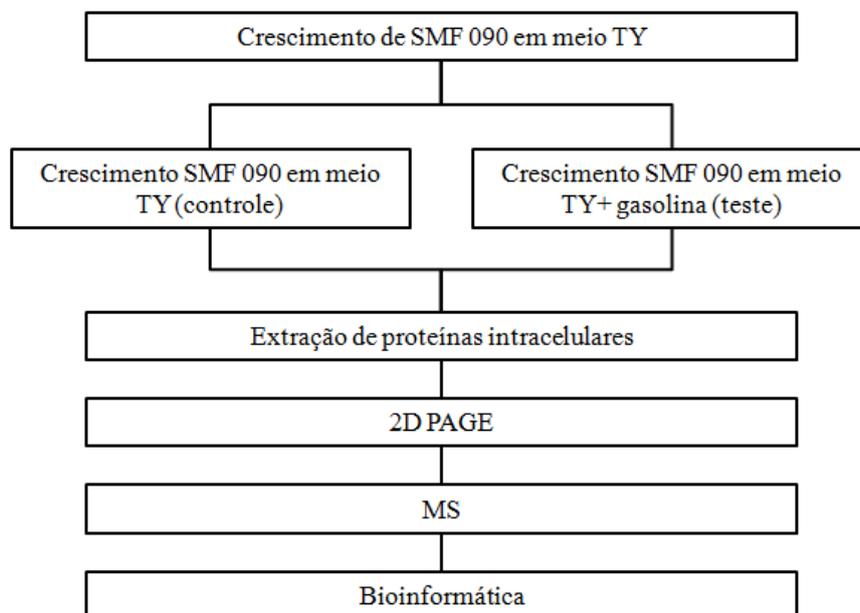
IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO SMF 090



ANÁLISES DAS VIAS METABÓLICAS POR PROTEÔMICA



TOLERÂNCIA A AGENTES XENOBIÓTICOS



5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Identificação do isolado SMF090 e análise de filogenia molecular

5.1.1 Bactéria empregada e condições de cultivo

Neste trabalho foi utilizado o isolado identificado como SMF 090, oriundo da coleção de beta-rizóbios do gênero *Burkholderia* do Dr. Sérgio Miana de Faria (pesquisador da Embrapa Agrobiologia, Rio de Janeiro, Brasil) isoladas de leguminosas do gênero *Mimosa*.

O isolado foi recuperado de uma ampola contendo esta bactéria e crescida em meio TY (Tryptone-Yeast Medium) líquido (BERINGER, 1974) na temperatura de 28 °C (TOLEDO *et al.*, 2009). Estoques foram feitos em meio TY e armazenadas a -80 °C (em glicerol 20%).

5.1.2 Extração e purificação do ácido desoxirribonucléico (DNA)

O isolado SMF 090 foi cultivado em meio TY, com incubação a 28 °C por 48 horas. Da suspensão bacteriana, 2 mL foram recolhidos e centrifugadas a 6000 x g por 10 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado com solução salina (NaCl 0,85%). Descartado o sobrenadante, o precipitado foi ressuspenso em 400 µL de TE 50/20 (50 mM Tris, pH 7,5; 10 mM NaCl e 10 mM EDTA, pH 8,0), sendo a amostra incubada a 60 °C por 1 hora. Foram adicionados 60 µL de SDS (10%), seguido de incubação a 60 °C por 30 minutos. Foi acrescentado 1 volume de clorofórmio:álcool isoamil (24:1) e misturado por inversão dos tubos, seguido por uma centrifugação de 15 minutos a 2500 x g a 4 °C. A fase aquosa foi coletada e adicionou-se 700 mM de NaCl e incubação a 40 °C por 30 minutos. A amostra foi centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C e recolhido o sobrenadante. Foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto frio, e em seguida, incubada a -20 °C *overnight*. Após centrifugação a 15.000 x g por 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1ml de etanol 70%. A seguir o DNA foi ressuspenso em 100 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). A concentração e a pureza da amostra foi estimada por espectrofotometria, com leituras das absorbâncias a 260 nm e 280 nm. A qualidade da amostra foi verificada por

eletroforese em gel de agarose a 0,8 %. A amostra foi preservada a -20°C para a reação de amplificação do gene 16S rRNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

5.1.3 Amplificação do gene 16S rRNA

Para amplificação do DNA ribossomal utilizou-se os iniciadores: fD1: 5'-CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3' e rD1: 5'- CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GC-3' (WEISBURG *et al.*, 1991). Para a PCR utilizou-se uma mistura com volume final de 40 μL , constituída por 300 ng de DNA molde, 0,2 mM de cada dNTP; 0,5 μM de cada iniciador; 1,5 mM de MgCl_2 ; 0,2 U de *Taq* DNA polimerase, sendo a mistura de reação diluída com água destilada esterilizada para PCR (Milli-Q) em tampão apropriado para a enzima conforme concentração sugerida pelo fabricante.

A amplificação foi realizada em 46 ciclos usando o termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf), sendo cada ciclo: 94°C de desnaturação por 3 minutos, anelamento a 60°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C a 8 minutos.

Os *amplicons* foram conferidos em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A corrida eletroforética seguiu os parâmetros: 100 v por 50 minutos. A concentração das amostras de DNA foi estimada por espectrofotometria, com leituras das absorvâncias a 260 nm e 280 nm (*GenQuant, GE Healthcare*).

5.1.4 Sequenciamento dos amplicons do gene 16S rRNA

A determinação da sequência de nucleotídeos dos fragmentos amplificados foi realizada pelo analisador genético *MegaBace 750* (*GE Healthcare*) que utiliza tecnologia de eletroforese capilar. A incorporação dos terminadores de cadeia marcados (ddNTPs ligados à fluoróforos) foi realizado através de PCR empregando o *kit Dyenamic ET terminator sequencing premix*. Para a reação de sequenciamento, além dos primers fD1 e rD1, também utilizou-se os seguintes iniciadores intragênicos: 362f (5'-CTC CTA CGG GAG GCA GCA GTG GGG-3'), 786f (5'-CGA AAG CGT GGG GAG CAA ACA GG-3') e 1203f (5'-GAG GTG GGG ATG ACG TCA AGT CCT C-

3') e Y2 (5'- CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT - 3') segundo Menna *et al* (2006).

Após a reação, os ácidos nucleicos marcados foram precipitados pela adição de 7,5 M de acetato de amônio e etanol absoluto, centrifugados a 4000 x g por 30 minutos, em seguida lavados com etanol 70% e então ressuspensos em *loading solution*. A corrida eletroforética de sequenciamento foi realizada à 9 kv. A qualidade das seqüências obtidas foi observada através de ferramentas de bioinformática.

5.1.5 Análise das seqüências de nucleotídeos

Os eletroferogramas oriundos do programa *MegaBACE Sequece Analysis 4.0* do analisador genético, foram analisados e reunidos em uma seqüência consenso. Esta seqüência consenso é chamada de *contig* e é adquirida empregando os programas *Phred/Phrap/Consed* (EWING *et al.*, 1998; GORDON *et al.*, 1998) em sistema operacional Linux.

A seqüência foi editada para exclusão de bases com qualidade inferior a 20 (1 erro a cada 100 bases lidas), para assegurar uma maior confiabilidade. Os dados foram submetidas a um alinhamento local usando a ferramenta *BLAST* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, www.ncbi.nlm.nih.gov) e comparadas com as seqüências depositadas no *GenBank*.

5.1.6 Identificação do isolado SMF 090 com base no gene 16S rRNA

A seqüência consenso foi comparada com outras seqüências do gene 16S rRNA de espécies de *Burkholderia* previamente depositadas no *GenBank* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, www.ncbi.nlm.nih.gov), através da ferramenta *BLASTn* (ALTSCHUL *et al.*, 1997) para busca de alinhamentos de nucleotídeos significativos. A ferramenta *BLASTn* realiza alinhamentos entre as seqüências submetidas (*query*) e as seqüências depositadas no *GenBank*.

5.1.7 Análise de filogenia molecular e reconstrução de árvores filogenéticas

Para determinar as relações de parentesco, foi realizado a reconstrução de árvores filogenéticas, por meio de um alinhamento múltiplo entre as sequências obtidas neste trabalho com sequências de 16S rRNA de espécies tipo de *Burkholderia* obtidas do *GenBank*, usando o programa *ClustalW* (THOMPSON *et al.*, 1994) inserido no programa Análise Genética de Evolução Molecular - MEGA 5.05 (TAMURA *et al.*, 2011) com os seguintes parâmetros: *Pairwise Alignment* (*Gap opening* 10.00, *Gap Extension* 0.10), *Multiple Alignment* (*Gap opening* 10.00, *Gap Extension* 0.10) (TOLEDO *et al.*, 2009).

Neste trabalho foi empregado 3 algoritmos de reconstrução de árvores utilizando o programa MEGA 5.05 (TAMURA *et al.*, 2011), sendo eles: *Neighbor-joining* (SAITOU; NEI., 1987), usando modelo de substituição de nucleotídeos *Kimura 2-parameter* (ACHOUAK *et al.*, 1999; GEE *et al.*, 2011); *Máxima parcimônia* (FITCH., 1972) e *Máxima verossimilhança* usando modelo de substituição de nucleotídeos distância *Kimura 2-parameter*. Nas 3 análises o suporte dos ramos foi inferido por valores de *bootstrap* de 1000 reamostragens (FELSENSTEIN, 1985). A sequência de *Ralstonia pickettii* ATCC27511 (AY741342) e *Pandoraea apista* CCUG38412 (AY268172.1) foi utilizada como *outgroup*. (VANDAMME *et al.*, 2007; AIZAWA *et al.*, 2011).

5.2 Ensaios de biodegradação da gasolina comercial

5.2.1 Crescimento do isolado SMF090 em meio TY na presença de gasolina

A partir do isolado de *Burkholderia* sp. SMF 090 foi feito um pré-inóculo cultivado em meio TY a 28 °C por 24 horas. Após o crescimento, a cultura foi verificada pela coloração de Gram afim de checar as características morfológicas das bactérias. Este experimento consistiu em um grupo controle e outro grupo suplementado com 1000 ppm de gasolina comercial após as culturas atingirem a D. O. 0,2 ambos em triplicata, cada um contendo 200 mL de meio TY e 2 mL de pré-inóculo. As culturas foram cultivadas a 28 °C sob agitação 250 rpm. Após a inoculação o crescimento bacteriano foi monitorado a cada hora em espectrofotômetro (*GenQuant*, *GE*

Healthcare), sendo este calibrado em comprimento de onda de 600 nm até o estabelecimento da fase estacionária.

5.2.2 Crescimento do isolado SMF090 em meio BH na presença de gasolina

A partir do isolado de *Burkholderia* sp. SMF 090, foi feito um pré-inóculo cultivado em meio TY a 28 °C por 24 horas. Após o crescimento, a cultura de *Burkholderia* foi verificada pela coloração de Gram. Para verificar a capacidade do isolado crescer em meio contendo gasolina como única fonte de carbono, foi empregado meio mineral de Bushnell Haas – BH composto de 1g de KH₂PO₄, 1g de K₂HPO₄, 1g de NH₄NO₃, 0,2g de MgSO₄.7H₂O, 0,05g de FeCl₃, 0,02g de CaCl₂.2H₂O, para 1L de H₂O (ATLAS, 1995). Este experimento consistiu em um grupo controle suplementado com glicose 1mM, um grupo enriquecido com 1000 ppm de gasolina comercial e um último cultivado apenas em meio BH. Todos em triplicata. Cada grupo contendo 300 mL de meio BH e 3 mL de suspensão bacteriana em meio salino (NaCl 0,85%) suficiente para atingir uma D. O. inicial de 0,01. As culturas foram cultivadas a 28 °C sob agitação 250 rpm. Após a inoculação o crescimento bacteriano foi monitorado a cada 2 horas por espectrofotometria a O.D₆₀₀ (*GenQuant, GE Healthcare*) até o estabelecimento da fase estacionária.

5.3 Análise de proteínas diferencialmente expressas do isolado SMF090 crescidas em meio contendo gasolina comercial por 2D e MS

5.3.1. Cultivo do isolado SMF090 em meio TY na presença de gasolina

A partir do isolado de *Burkholderia* sp. SMF 090, foi feito um pré-inóculo cultivado em meio TY a 28 °C até D.O. 0.7. Após o crescimento, a cultura de *Burkholderia* foi verificada pela coloração de Gram. Este experimento consistiu em um grupo controle insento de gasolina comercial e um grupo teste suplementado com 1000 ppm de gasolina comercial, ambos em triplicata. Baseado em uma otimização prévia, cada cultivo continha 1,4 L de meio TY e 12 mL de pré-inóculo. Após as culturas atingirem a D. O. 0,2 foi adicionado 1,4 mL de gasolina comercial. As culturas foram cultivadas a 28 °C sob agitação 250 rpm. Após a inoculação o crescimento bacteriano

foi monitorado a cada hora por espectrofotometria a D. O. $_{600}$ (*GenQuant, GE Healthcare*) até atingir D. O. de 0.7. As culturas foram centrifugadas e armazenadas a -20 °C para extração de proteínas.

5.3.2 Extração das Proteínas Intracelulares

A extração das proteínas intracelulares foi feita de acordo com Riedel e colaboradores (2006) com algumas modificações. O precipitado bacteriano foi lavado 2 vezes com 10 mL de Tris/HCl 50mM pH 7,5 . Após as lavagens foi adicionado 10 mL de Tris/HCl 50mM pH 7,5 acrescido de 40µL do Inibidor de Protease Mix (*GE HealthcareTM*). As células foram lisadas por sonicação (10 pulsos de 20 segundos com intervalo de 1 minuto entre cada pulso – com 20% de amplitude). Após sonicadas as células foram centrifugadas a 12000 rpm por 1 hora e 30 minutos a 4 °C. Ao sobrenadante foi adicionado 1 mL de fenol e a mistura foi incubada a 70 °C por 10 minutos. As amostras foram resfriadas em gelo por 5 minutos e as fases foram separadas por centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado 2 vezes com acetona gelada 100%. Após as lavagens o precipitado repousou em temperatura ambiente para evaporação da acetona e foi ressuspensão em uréia 7 M/ tiouréia 2 M.

5.3.3 Dosagem de proteínas totais

Para a quantificação de proteína foi utilizado o método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando como curva padrão para o cálculo da concentração BSA – Albumina de Soro Bovino. Para tanto, utilizou 5 µL de amostra de proteína intracelular diluída em 2,5 mL do reagente de Bradford, em triplicata, para o branco foi utilizado 5 µL de uréia 7 M/tiouréia 2 M também diluído em 2,5 mL de reagente de Bradford. A leitura da absorbância foi feita com Densidade Óptica de 595 nm utilizando espectrofotômetro ULTROSPEC 2100 pro. Para mensurar a concentração foi feita uma média da absorbância da triplicata da amostra. A média da absorbância foi atribuída na fórmula de calibração do reagente Bradford, dessa forma foi obtida a concentração em µg/µL.

Para análise da integridade e da pureza das proteínas intracelulares extraídas pela verificação do padrão de bandas, foi realizada a Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de Dodecilsulfato de Sódio – SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). O sistema de eletroforese utilizado para SDS-PAGE foi o mini-protean, Biorad.

5.3.4 Eletroforese bidimensional

Para a primeira dimensão foram adicionados 250 µg de proteína de cada amostra ao tampão de reidratação [uréia 7 M/ tiouréia 2 M, 1% CHAPS, 1% DTT; 0,5% (v/v) anfólitos (pH de 4-7) e azul de bromofenol] em um volume final de 250 µL por amostra. As tiras com gradiente de pH imobilizado (IPG) de 13 cm de comprimento e pH de 4-7 foram reidratadas com solução contendo proteínas em temperatura ambiente por 16 horas.

Posteriormente, foi realizada a Focalização Isoelétrica - IEF usando o sistema de focalização *EttanIPGphor III (GE-Healthcare)* nas seguintes condições: etapa 1, 500 V por 30 minutos; etapa 2, 4000 V por 2:30 horas e etapa 3, 8000 V até atingir 18.000 V horas totais. Em seguida as tiras foram armazenadas em freezer a -80 °C para procedimentos posteriores.

Na segunda dimensão a tira de IPG foi equilibrada com a solução I (Uréia 6 M, Tris 50 mM, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol, e DDT) por 15min e em seguida, com a solução de equilíbrio II (Uréia 6 M, Tris 50 mM, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol e iodoacetamida) por 15min. Subseqüentemente, a tira foi colocada em um gel de poliacrilamida a 12,5%. A tira foi selada com uma solução de agarose (0,5% de agarose e 0,002% de azul de bromofenol). O marcador de baixo peso molecular (LMW) foi aplicado em um poço criado ao lado ácido da tira. A separação na segunda dimensão foi realizada na unidade de eletroforese vertical *Hoefler SE 600 Ruby* por aproximadamente 5 horas. Após a corrida, o gel foi submerso na solução corante contendo Comassie G 250 (*Blue Silver*) (CANDIANO, 2004) por 24 horas sob agitação e armazenados em solução de ácido acético 5%. Para a digitalização dos géis, utilizou-se o equipamento *ImageScanner III* gerenciado pelo programa *LabScan 6.0* (ambos da *GE Healthcare*). As imagens obtidas foram analisadas no programa *ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare)*.

5.3.5 Seleção e processamento dos *spots* para análise por Espectrometria de Massa

Os *spots* de interesse foram excisados dos géis bidimensionais com o auxílio de um bisturi e transferidos para tubos de 1,5 mL (*eppendorf*), onde foi realizado a digestão com tripsina, de acordo com o método de (HELLMAN, WERNSTEDT, *et al.*, 1995) com algumas alterações (NOGUEIRA, 2007). Os *spots* selecionados foram descorados em solução de bicarbonato de amônio 25 mM / acetonitrila (1:1) em pelo menos 3 lavagens de 30 min, e desidratados, duas vezes, com acetonitrila 100% por 5 minutos. O solvente remanescente foi removido dos pedaços de gel. Os géis foram reidratados a 4°C na proporção de 1:50 (proteínas/tripsina) e a digestão realizada a 37 °C por 16 horas.

Os peptídeos obtidos pela digestão triptica (1,2 µL) foram aplicados na placa de MALDI e seco a temperatura ambiente. Em seguida, foi coberto por uma solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em acetonitrila 50% / ácido trifluoroacético 0,1% (1,2 µL). Após secas a temperatura ambiente, as amostras foram analisadas por um espectrômetro de massa híbrido quadrupolo com mobilidade de íon Tempo de Voo com aceleração ortogonal de alta definição *Synapt HDMS* (Waters). O espectrômetro foi operado em modo positivo, com fonte de ionização MALDI.

Para esta metodologia, o instrumento foi calibrado com íon glucofibrinopeptídeo-B (M+H) = 1570,68 Da. Foi selecionada a função DDA (análise direta de dados) para a seleção dos íons que foram fragmentados por decomposição induzida por colisão (CID). Os espectros de MS foram coletados entre 300 m/z a 3000 m/z e os espectros de MS/MS entre 50 m/z a 3000 m/z. A coleta e análise de dados foi feita utilizando o software MassLynx®.

5.3.6 Bioinformática

Os géis digitalizados a 300 dpi foram analisados pelo software *ImageMaster 2D Platinum* 6.0 (GE Healthcare). Foi feita a detecção automática de *Spots* seguida de busca por *spots* correspondentes nas repetições (*Matches*). A reprodutibilidade foi feita pelo gráfico de dispersão (*Scatter Plot*), cujo valor de coeficiente de correlação linear deve ficar acima de 0,85. Os *Spots* diferencialmente expressos foram analisados por histogramas utilizando como parâmetro a porcentagem do volume do *Spot*.

As proteínas foram identificadas por PMF utilizando o ProFound e MS/MS pelo MASCOT. Ambas utilizando os bancos de dados Swiss-Prot e NCBIInr. A tolerância de massa foi de 1,2 para MS e 0,6 para MS/MS. As modificações fixas ou variáveis incluíam a presença de iodoacetamida e oxidação da metionina. O táxon foi restringido para "bactéria".

As proteínas teóricas envolvidas na via de degradação dos xenobióticos foram encontradas no Uniprot e Kegg *Pathways*, seus valores teóricos foram encontrados utilizando a ferramenta Compute pI/MW do ExPASy.

5.4 Análise Estatística

A análise estatística para avaliar os resultados da curva de crescimento bacteriano em meio TY foi feita no *Statistica 6 Workbook* usando o teste *Mann-Whitney* e $*p < 0,05$ e a construção da curva foi feita a partir do *GraphPad Prism 3.0*.

A análise estatística para avaliar os resultados da curva de crescimento em meio BH foi feita com o teste *Two-way-anova* e $*p < 0,001$ e a construção da curva foi feita a partir do *GraphPad Prism 3.0*.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Extração e purificação do ácido desoxirribonucléico (DNA)

A concentração de DNA do isolado SMF 090 foi de 1.290 ng/uL. A relação entre as absorbâncias a 260 nm e 280 nm foi de 1,817, o que de acordo Sambrook e colaboradores (1989), é considerada de boa qualidade, pois segundo estes, a relação deve estar acima de 1,75 para ser considerado de boa qualidade. Valores maiores que 2,0 indicam contaminação com proteínas, fenol ou alcoóis (ROMANO, 1998). Assim, podemos afirmar que o DNA obtido possui níveis de contaminação com outras moléculas aceitáveis para o estudo proposto.

6.2 Amplificação do gene 16S rRNA

Os amplicons produzidos pela PCR apresentaram banda íntegra no gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta, demonstrando boa qualidade e eficiência da reação (dados não mostrados), onde os fragmentos apresentaram cerca de 1500 pb o que segundo Magnani (2009) corresponde a amplificação completa do gene 16S rRNA. Além disso, não foi verificada a presença de RNAs contaminantes.

6.3 Seqüenciamento do gene 16S rRNA, análise das seqüência de nucleotídeos e identificação do isolado SMF 090

Após a exclusão dos nucleotídeos com qualidade inferior a 20 (1 erro a cada 100 pb, phred 20) foi obtido uma seqüência de 1471 pb, tamanho próximo do estimado para o gene 16S rRNA, o que corrobora o trabalho de Magnani (2009). Quando comparada com as seqüências do *GenBank*, mostrou similaridade de 99% com estirpes de *Burkholderia*. (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultado da busca por similaridade utilizando a ferramenta Blast do NCBI

| Acesso | Descrição | Max score | Total pontuação | Cobertura de consultas | E value | Max ident |
|----------------|---------------------------------------|--------------|--------------------|------------------------------|------------|--------------|
| FJ025138.1 | <i>Burkholderia sp.</i> SEMIA 6413 | 2647 | 2647 | 98% | 0.0 | 99% |
| FJ025137.1 | <i>Burkholderia sp.</i> SEMIA 6410 | 2647 | 2647 | 98% | 0.0 | 99% |
| FJ025136.1 | <i>Burkholderia sp.</i> SEMIA 6385 | 2647 | 2647 | 98% | 0.0 | 99% |
| AY904775. 1 | <i>Burkholderia sp.</i> SEMIA 6382 | 2623 | 2623 | 96% | 0.0 | 99% |
| FJ478405.1 | <i>Burkholderia sp.</i> TAt- 045 | 2610 | 2610 | 98% | 0.0 | 99% |
| AY533862 | <i>Burkholderia sp.</i> Br3407 | 2601 | 2601 | 96% | 0.0 | 99% |
| NR 043180.1 | <i>Burkholderia sabiae</i> | 2591 | 2591 | 96% | 0.0 | 99% |

A comparação com as sequências depositadas no GenBank apresentou o isolado SMF 090 inicialmente similar a estirpes da coleção SEMIA, seguida de TAt-045, todas do gênero *Burkholderia*, que não estão classificadas a nível de espécie. Entretanto, a primeira estirpe classificada à nível de espécie, refere-se a *Burkholderia sabiae* Br3407. De acordo com Chen (2008), o termo *sabiae* vem de sabiá, nome em português de *Mimosa caesalpinifolia*, uma leguminosa nativa do Brasil, árvore a partir da qual a estirpe foi isolada. Os representantes da espécie *sabiae* são bactérias gram-negativas e não formadores de esporos.

6.4 Análise de filogenia molecular e reconstrução de árvores filogenéticas

As análises filogenéticas realizadas com a estrutura do rDNA sugerem que o isolado SMF 090 está intimamente relacionado com a espécie *Burkholderia sabiae* Br3407. Os resultados dos três dendogramas obtidos concordam entre si com relação ao parentesco do isolado SMF 090. Embora empregando algoritmos diferentes, os três modelos matemáticos reconstruíram árvores filogenéticas muito similares, com algumas variações nos valores de *bootstraps* e na posição de alguns ramos específicos, o que atribui grande confiabilidade estatística aos resultados. A utilização da sequência de nucleotídeos do gene do 16S rRNA já fora anteriormente utilizada para taxonomia molecular e análises filogenéticas de *Burkholderia*. À guisa de exemplo, Menna e colaboradores (2006) ao realizarem a caracterização de 68 estirpes de rizóbios, identificaram alguns dos espécimes como pertencentes ao táxon genérico *Burkholderia*. Os autores empregaram análises da sequência do gene 16S rRNA para alcançarem os seus objetivos.

A similaridade de 99% entre as sequências do gene do 16S rRNA de SMF 090 e de *B. sabiae*, o bom suporte da ramificação dos dendogramas com *bootstrap* maiores que 97% e o constante agrupamento de SMF 090 e *B. sabiae* em um mesmo clado nos três diferentes algoritmos de análises filogenética utilizados, nos permite sugerir que o isolado estudado pertence ao táxon específico de *B. sabiae*.

Figura 5- Dendograma do isolado SMF 090 baseado no gene 16S rRNA. Reconstrução do dendograma utilizando o programa MEGA 5.05 e algoritmo Neighbor-joining. A seqüência de *Ralstonia pickettii* ATCC27511 e *Pandoraea apista* CCUG38412 foram utilizadas como *outgroup*.

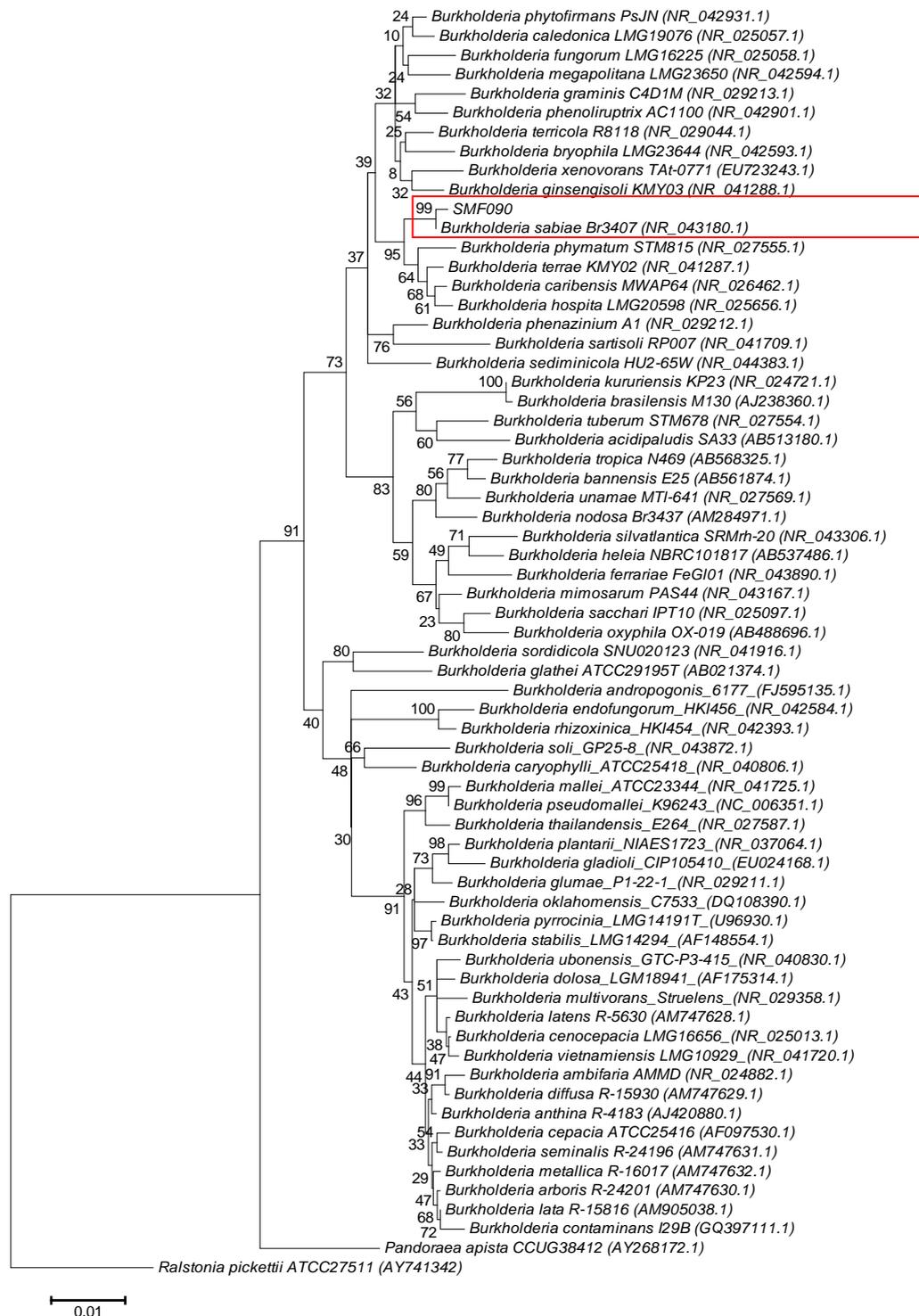
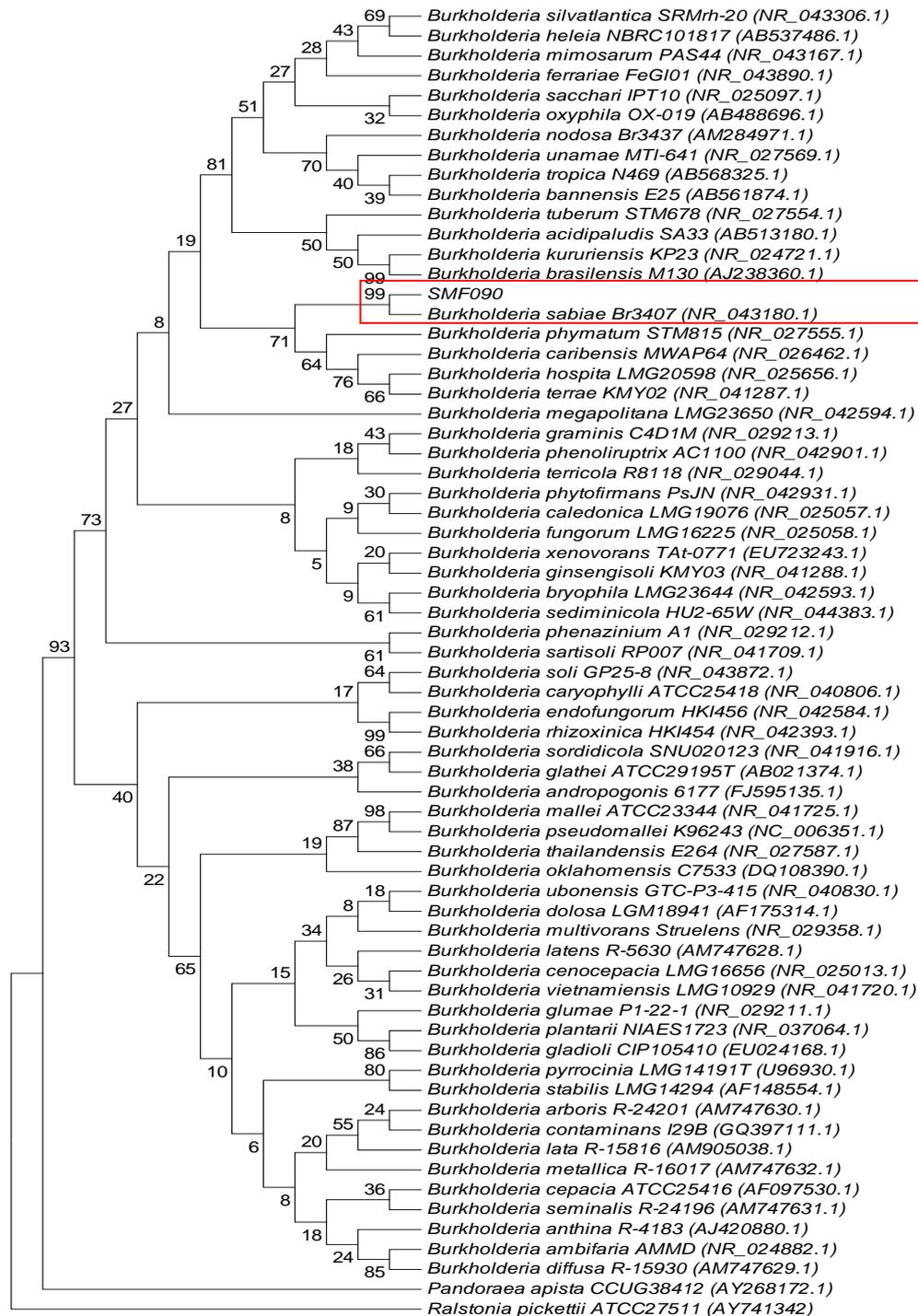


Figura 6– Dendograma do isolado SMF 090 baseado no gene 16S rRNA. Reconstrução da Árvore Filogenética utilizando o programa MEGA 5.05 e algoritmo Máxima verossimilhança. A seqüência de *Ralstonia pickettii* ATCC27511 e *Pandoraea apista* CCUG38412 foram utilizadas como *outgroup*.



Figura 7- Dendograma do isolado SMF 090 baseado no gene 16S rRNA. Reconstrução do dendograma utilizando o programa MEGA 5.05 e algoritmo Máxima parcimônia. A seqüência de *Ralstonia pickettii* ATCC27511 e *Pandoraea apista* CCUG38412 foram utilizadas como *outgroup*.



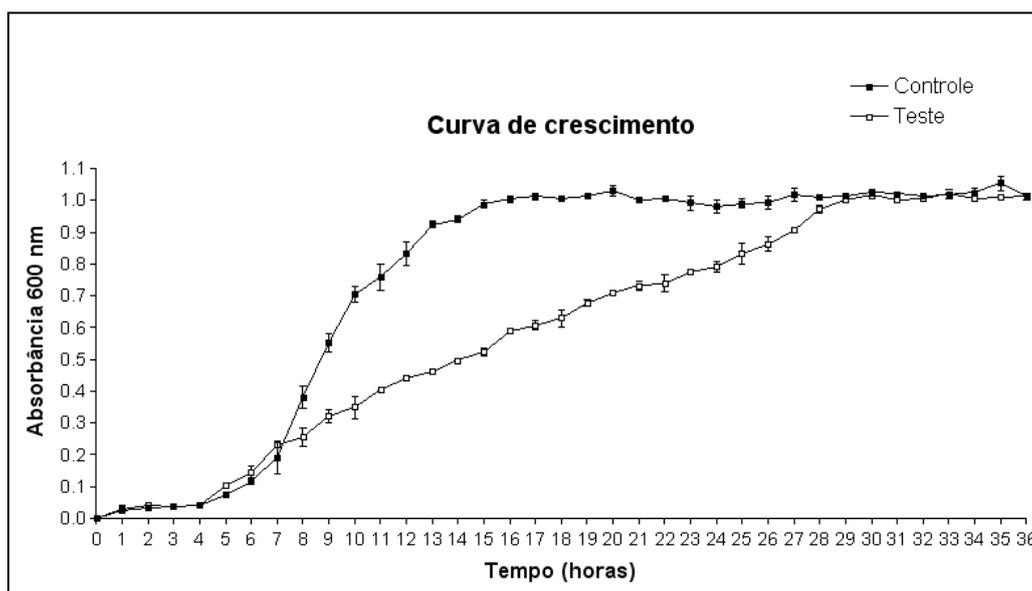
6.5 Crescimento do isolado SMF 090 em meio TY na presença de gasolina

A caracterização do perfil de crescimento de SMF 090 em meio de cultura padrão, TY, com gasolina foi realizado com objetivo verificar o nível de tolerância do isolado bacteriano ao petroderivado. Os resultados obtidos revelam que em ambas as curvas, controle e teste, (figura 8) a fase log ficou caracterizada pelos seguintes valores de D. O.₆₀₀ (0,2 a 1,0) sendo 0,6 a metade desta fase. Houve diferença estatisticamente significativa entre a curva de crescimento dos grupos controle e teste após 9 horas de crescimento. Essa diferença permaneceu por um período de 10 horas. Após esse tempo as culturas convergiram caracterizando a fase platô.

O grupo controle apresentou término da fase *log* anterior ao grupo enriquecido com gasolina comercial, essa diferença se dá devido ao período de adaptação da bactéria ao poluente presente no meio, corroborando Roma-Rodrigues e colaboradores (2010) os quais mostraram que *Pseudomonas putida* KT2440 na presença de fenol necessita de um período de adaptação ao meio para retomar o crescimento.

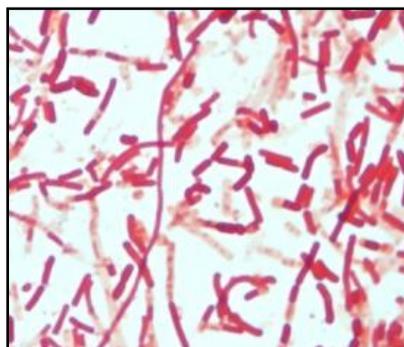
Vale salientar ainda que no início e no final da curva de crescimento foram realizadas análises com coloração de Gram para verificar a possibilidade de contaminação do experimento. Os resultados obtidos revelaram apenas a presença de bacilos gram-negativos típicos de *Burkholderia*, o que demonstra pureza de todas as culturas empregadas, antes e após os experimentos, conforme figura 9.

Figura 8 – Curva de crescimento do isolado SMF 090 em meio TY.



Fonte: Brito, 2012. Curva de crescimento do isolado SMF 090 em meio TY. As medidas de D. O. a 600 nm (luz visível), começaram a ser realizadas 01 hora após a inoculação e foram feitas até o tempo máximo de 36 horas. A curva com quadrado preenchido em preto (■) corresponde ao grupo controle (ausência de gasolina comercial) enquanto o branco (□) ao grupo teste (meio suplementado com 1000 ppm de gasolina comercial após as culturas atingirem a D. O. de 0, 2). As barras verticais indicam o desvio padrão entre as triplicatas de cada ponto de medição. Análise estatística feita no *Statística 6 Workbook* usando o teste *Mann-Whitney* e $*p < 0,05$ e a construção da curva foi feita a partir do *GraphPad Prism 3.0*.

Figura 9- Imagem de coloração de Gram do isolado SMF 090 utilizando microscopia óptica. Aumento 1000x.



Fonte: Brito, 2012

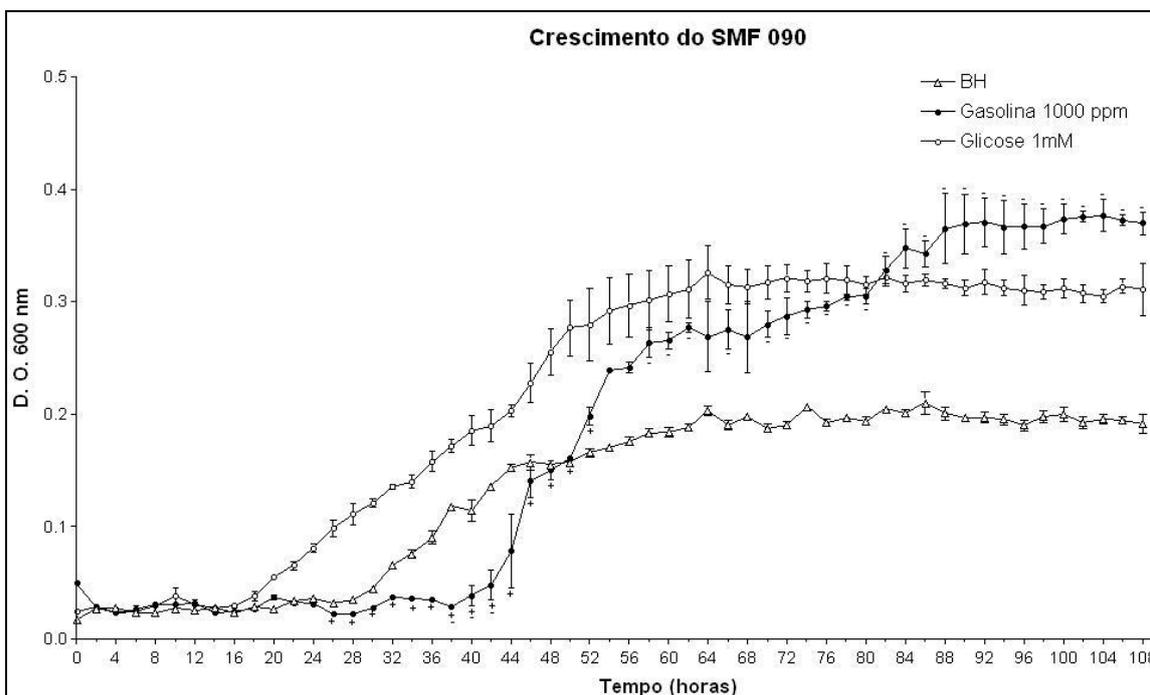
6.6 Crescimento do isolado SMF 090 em meio BH na presença de gasolina

O isolado de *Burkholderia* SMF 090 apresentou crescimento quando cultivado em meio mineral BH (sem fonte de carbono). Contudo, a bactéria nestas condições atingiu a fase platô com uma densidade óptica de 0,2, cuja curva de crescimento diferiu significativamente daquelas cultivadas na presença de gasolina comercial e glicose, este fato deve-se provavelmente a substâncias de reservas acumuladas no citoplasma das células. À guisa de exemplo, o polihidroxibutirato que é utilizado normalmente como reserva de carbono e energia por bactérias como as do gênero *Burkholderia* (DOI, 1995; LIMA, 2001). O crescimento bacteriano no meio suplementado com glicose apresentou perfil esperado, pois o reagente limitante foi repostado. A glicose como fonte de energia no meio foi eficiente.

As curvas de crescimento das amostras em presença de glicose e gasolina comercial diferiram significativamente da 26^a a 52^a hora de cultivo durante o início da fase logarítmica, apresentando crescimento semelhante a partir 54^a hora até a última medida de densidade óptica realizada no tempo de 108 horas referente à fase platô. Essa diferença de crescimento no início da fase lag se dá pelo período de adaptação da bactéria ao poluente. No entanto, a partir da 54^a hora podemos perceber que a biomassa bacteriana do controle e do tratamento esta semelhante.

A curva de crescimento do isolado SMF 090 em meio mineral BH suplementado com gasolina (figura 10) demonstra a capacidade de *Burkholderia* crescer em meio contendo gasolina comercial como única fonte de carbono. Este resultado está de acordo com Zobell (1946) que demonstrou a capacidade de certos micro-organismos utilizarem hidrocarbonetos como fonte de carbono. Além disso, Chaillan e colaboradores (2004) identificaram cepas de *Burkholderia* cultivadas em solução onde o petróleo era a única fonte de carbono e energia.

Figura 10 – Curva de crescimento do isolado SMF 090 em meio BH.



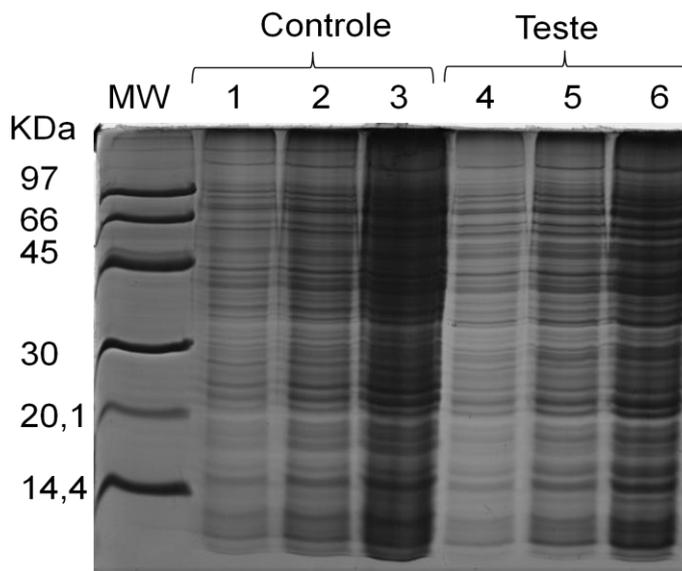
Fonte: Brito, 2012. Curva de crescimento do isolado SMF 090 em meio BH. As medidas de D. O. a 600 nm (luz visível), começaram a ser realizadas zero hora após a inoculação e foram feitas até o tempo máximo de 108 horas. A curva com círculo vazio (○) corresponde ao grupo controle (suplementado com glicose 1 mM). A curva com círculo preenchido de preto (●) ao grupo teste em meio suplementado com 1000 ppm de gasolina comercial. Uma terceira curva (Δ) apenas com meio sem fonte de carbono. As barras verticais indicam o desvio padrão entre as triplicatas de cada ponto de medição. A diferença significativa de crescimento entre os grupos suplementados com glicose 1 mM e 1000 ppm de gasolina comercial está representada pelo sinal de mais (+). A comparação estatística entre suplementado com gasolina e não suplementado esta representada pelo sinal de menos (-). Análise estatística feita no *Statística 6 Workbook* usando o teste *Two-way-anova* e $*p < 0,001$ e a construção da curva foi feita a partir do GrphPad Prissm 3.0.

6.7 Análise de proteínas diferencialmente expressas do isolado SMF090 crescidas em meio contendo gasolina comercial por 2D e MS

6.7.1 Extração e quantificação de proteínas

O método de extração de proteínas utilizado foi eficiente nos aspectos qualitativos e quantitativos. O valor médio da concentração de proteínas totais obtidas do isolado SMF 090 crescido em meio TY não suplementado (controle) foi de 16,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 2,38$ e 13,12 $\mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 0,92$ para as proteínas totais obtidas do isolado SMF 090 crescido em meio TY suplementado com 1000 ppm de gasolina comercial (teste). Com relação à integridade, podemos perceber bandas protéicas íntegras no SDS-PAGE (figura 11).

Figura 11- SDS-PAGE de proteínas totais do isolado SMF .

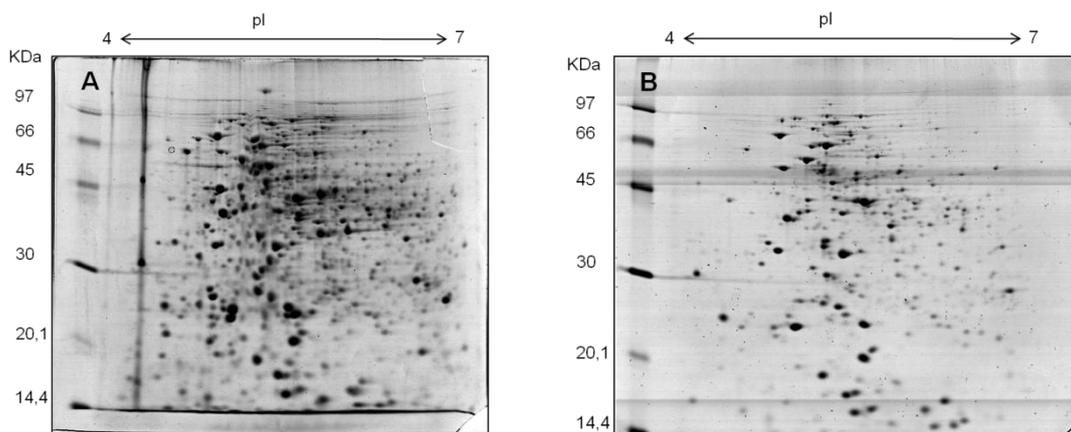


Fonte: Brito, 2012. SDS-PAGE de proteínas totais do isolado SMF 090 em gel de poliacrilamida 12,5 %. MW: marcador de baixo peso molecular LMW (*GE Healthcare*). As amostras protéicas SMF 090 controle (linha 1 a 3) e teste (linha 4 a 6) foram aplicadas em três diluições diferentes 1:10, 1:5 e 1:1, respectivamente.

6.7.2 Análise do perfil protéico do isolado SMF 090 por eletroforese bidimensional

O mapeamento protéico do isolado SMF 090 grupo controle e grupo teste foi resolvido em géis bidimensionais em faixa de pH 4-7 e pesos moleculares de 14,4 a 97 kDa. Podemos visualizar estes resultados nos géis de referência obtidos para cada grupo (Figura 12). Os grupos controle (Figura 12-A) e teste (Figura 12-B) contêm 542 e 256 *spots* respectivamente. Sendo assim, o grupo teste mostrou uma redução de 286 *spots* (52,76%) em relação ao grupo controle. No entanto, algumas proteínas mostraram aumento significativo de intensidade enquanto que outras se mostraram ser diferencialmente expressas no grupo teste.

Figura 12– Géis bidimensionais de referencia.



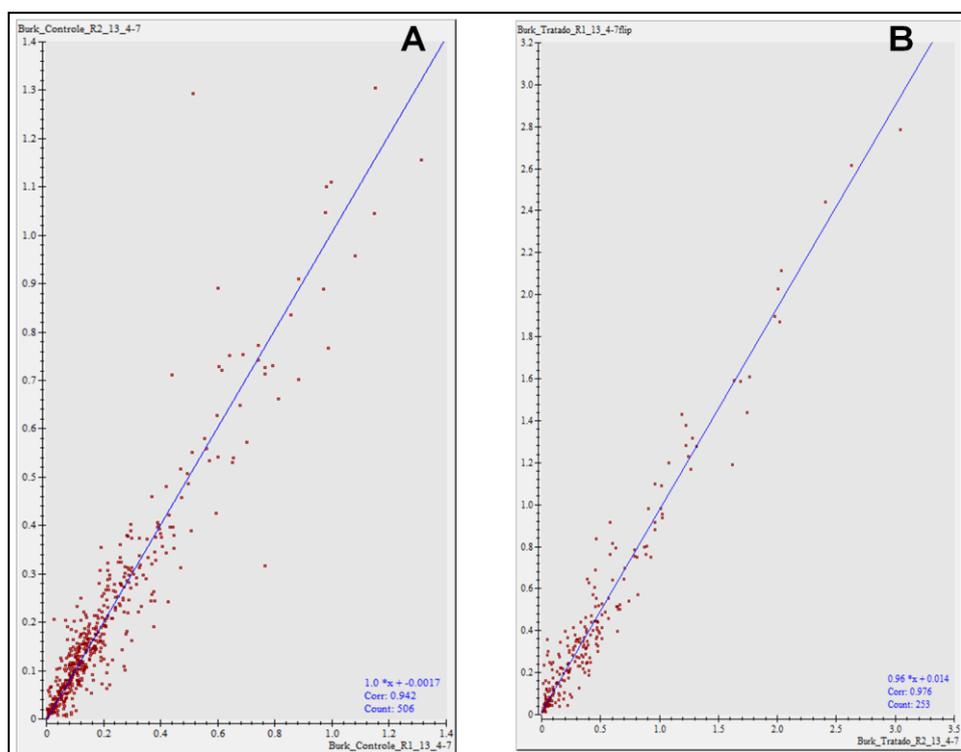
Fonte: Brito, 2012. Géis bidimensionais de referencia de proteínas de *Burkholderia* crescidas na ausência (A) e presença (B) de gasolina comercial. Os grupos controle (A) e teste (B) contem 542 e 256 *spots* respectivamente. A focalização isoelétrica foi feita com faixa de pH de 4 a 7 e a segunda dimensão feita em gel de poliacrilamida a 12,5% corado com Comassie G-250.

6.7.3 Reprodutibilidade dos géis bidimensionais

Para avaliar a reprodutibilidade dos géis bidimensionais, foi feito um alinhamento entre as repetições. Os *spots* correspondentes (*matches*) foram utilizados para criar um gráfico de dispersão (*scatter plot*) a partir da porcentagem do volume do

spot. O número de *matches* no grupo controle foi 506 (92,2 %) e o no grupo teste foi de 253 (98,2%). O coeficiente de correlação linear obtido no gráfico de dispersão foi de 0,942 para o grupo controle e 0,976 para o grupo teste (figura 13). Vale ressaltar que de acordo com a correlação de Pearson, valores acima de 0,85 são aceitáveis para indicar a reprodutibilidade entre duas variáveis (VIEIRA, 1980). Assim, podemos afirmar que a técnica utilizada não interfere nos resultados obtidos entre os géis dos grupos teste e controle, desta forma as análises realizadas são estatisticamente válidas.

Figura 11 - Gráfico de dispersão dos géis bidimensionais de proteínas intracelulares de *Burkholderia*.



Fonte: Brito, 2012. O grupo controle (A) compartilha 506 *spots* (*matches*) entre as repetições e apresenta um coeficiente de correlação linear de 0,942. O grupo teste (B) compartilha 253 *spots* (*matches*) entre as repetições e apresenta um coeficiente de correlação linear de 0,976.

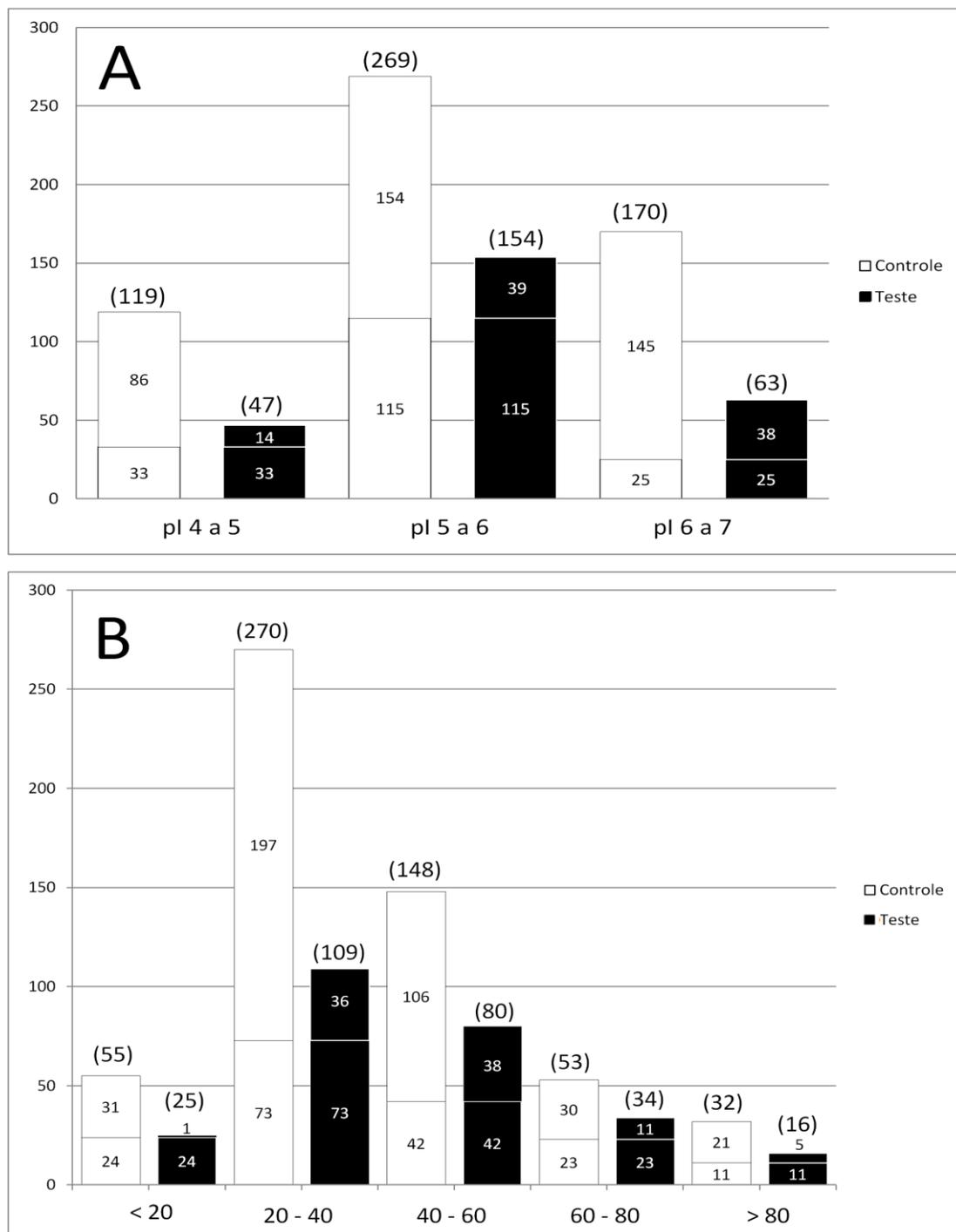
6.7.4 Distribuição das proteínas de *Burkholderia* de acordo com o ponto isoelétrico e massa molecular

Os géis dos grupos teste e controle foram alinhados para buscar por proteínas que estivessem na mesma posição do gel (*match*). Os grupos compartilharam 173 spots (*matches*) e esse resultado (*match report*) foi comparado com a tabela que contém os valores de pI e massa dos géis de referência (*spot report*). A comparação dessas tabelas resultou em gráficos que mostram a distribuição dos spots de acordo com o pI (figura 14-A) ou massa molecular (figura 14-B) correlacionando com o número de *matches*. Convém ressaltar que a idéia de combinar o número de *matches* com distribuição de *spots* por pI ou massa em gráficos ainda não foi encontrado em trabalhos semelhantes.

O número de spots do grupo teste reduziu em todos os intervalos de pI e massa molecular em relação ao grupo controle. Em relação ao ponto isoelétrico, foi observado um maior número de spots no intervalo de pI entre 5 e 6 tanto no grupo teste (154 spots) quanto no grupo controle (269 spots), ambos compartilhando 115 spots (figura 14 A).

Em relação à massa molecular, o maior número de spots foi encontrado na faixa entre 20-40 KDa tanto no grupo teste (109 spots) quanto no grupo controle (270 spots), ambos compartilham 73 *matches*.

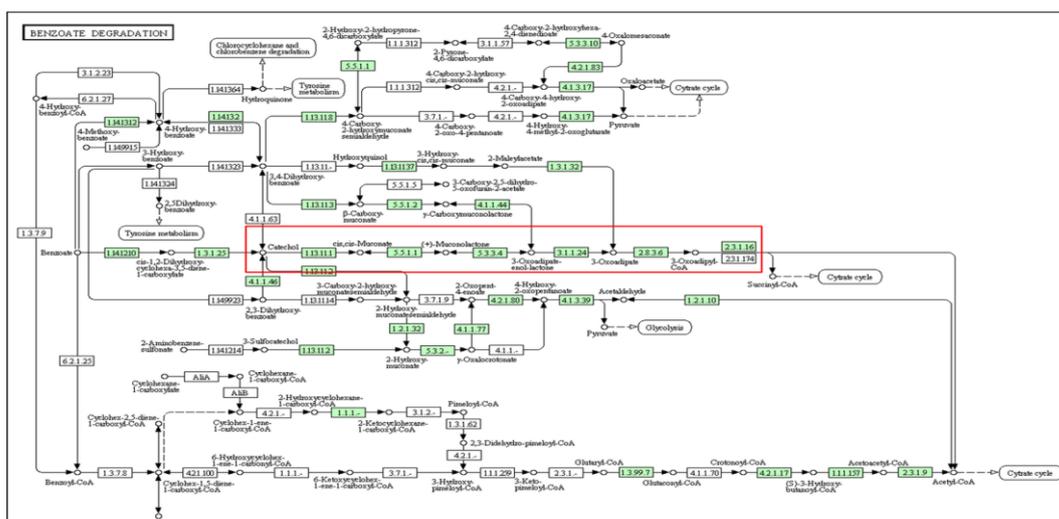
Figura 14 - Distribuição das proteínas de *Burkholderia* de acordo com o ponto isoelétrico e massa molecular.



Fonte: Brito, 2012. As proteínas estão distribuídas de acordo com o ponto isoelétrico A e peso molecular em KDa B. O grupo controle está representado por colunas brancas e o grupo teste por colunas pretas. O número de spots totais está mostrado entre parênteses o qual constitui da soma do número de proteínas compartilhadas entre os grupos teste e controle (base) com o número de proteínas exclusivas (topo).

Na busca por vias metabólicas envolvidas na degradação de xenobióticos no *Kegg Pathways*, encontramos várias enzimas de *Burkholderia* relacionadas à degradação do benzoato. Vale salientar que a via central de catabolismo do benzoato em bactérias já está completamente caracterizada, incluindo a rota de degradação do catecol (figura 15).

Figura 15 - Via de degradação do benzoato. O retângulo vermelho mostra a via de degradação do catecol. Em verde são mostradas as enzimas do gênero *Burkholderia* com sequência depositada em bancos de dados.



Fonte: Brito, 2012.

Os valores de pI e massa de todas as enzimas envolvidas no metabolismo do catecol foram anotadas seguido de busca manual por spots com valores de pI e massa semelhantes no gel de referência do grupo teste.

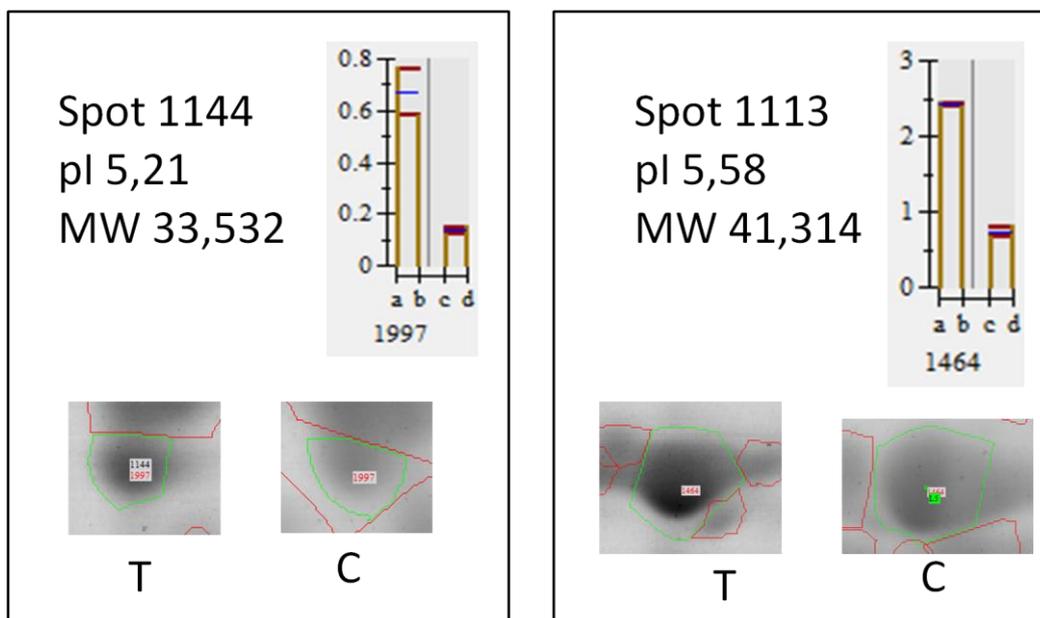
Ao compararmos os valores teóricos e experimentais de pI e MW conseguimos encontrar alguns candidatos a enzimas envolvidas na degradação do catecol (tabela 3). Dois desses candidatos possuem expressão aumentada no grupo teste em relação ao grupo controle (Figura 16).

Os spots 1144 e 1113 com níveis de expressão aumentadas no grupo teste (Figura 16) possuem valores de pI e massa molecular semelhantes as enzimas *catechol 1,2-dioxygenase* e *Muconate cycloisomerase*, ambas presentes na via de degradação do catecol (tabela 3).

Tabela 3 - Busca manual por spots com valores de pI e massa molecular próximos dos valores teóricos de enzimas envolvidas com a degradação do catecol. Spot ID, número de identificação do spot; Teor. (Teórico); Exp. (experimental).

| Spot ID | Nome da proteína | pI | | MW | |
|---------|--------------------------|---------|--------------|---------|--------------|
| | | Teórico | Experimental | Teórico | Experimental |
| 1144 | catechol 1,2-dioxygenase | 5,21 | 5,21 | 32,974 | 33,532 |
| 1113 | Muconate cycloisomerase | 5,55 | 5,58 | 40,189 | 41,314 |

Figura 16 - Spots com expressão aumentada no grupo teste.



Fonte: Brito, 2012. O histograma feito com base na porcentagem do volume mostrou um aumento na expressão do grupo teste (a e b) quando comparados com o grupo controle (c e d). Abaixo a foto do spot e acima valores experimentais de pI e massa molecular.

6.7.5 Identificação de proteínas por espectrometria de massa

Um total de 138 proteínas foram excisadas dos géis de referência do grupo teste (94 Spots) e do grupo controle (44 Spots) para digestão com tripsina. As amostras que foram aplicadas na placa MALDI resultaram em 118 arquivos (pk1). Utilizando a ferramenta MASCOT foi possível obter a identificação de 09 proteínas (tabela 4). Entre estas 05 aumentaram a expressão no grupo teste. Por outro lado, utilizando a ferramenta ProFound foi possível identificar 76 proteínas, entre estas 49 aumentaram no grupo teste (tabela 6) e 27 diminuíram (tabela 5).

Tabela 4 - Lista das proteínas de *Burkholderia* com expressão diferenciada no grupo teste identificadas por MS/MS. A busca foi feita no MASCOT restringindo o banco de dados do SwissProt para o táxon “*bacteria*”. Foi levada em consideração a adição de carboximetil como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável. A tolerância para MS e MS/MS foi de 1,2 e 0,6, respectivamente.

| Spot ID | Nome (Num. Acesso) | Score/Massa | Expect/Matches | Expressão no grupo teste |
|---------|--|-------------|----------------|--------------------------|
| E2-12 | Phenylalanyl--tRNA ligase operon leader peptide (LPF2_ECO57) | 22/1761 | 2e+03/1 | Aumentada |
| 1209 | Bacteriocin lactocin-705 (LC70_LACPA) | 45/3356 | 11/3 | Aumentada |
| 1210 | 30S ribosomal protein S20 (RS20_CORA7) | 45/9640 | 9,5/4 | Aumentada |
| 1247 | 60 kDa chaperonin (CH60_ACIBS) | 85/57002 | 0.0011/5 | Aumentada |
| 1244 | IlvGMEDA operon leader peptide (LPID_YERPE) | 57/3426 | 0.61/3 | Aumentada |
| 1373 | Probable msrA leader peptide (LPMS_STAEP) | 23/936 | 1.7e+03 / 1 | Reduzida |
| 1392 | 50S ribosomal protein L1 (RL1_BIFA0) | 41/24718 | 27/5 | Reduzida |

| | | | | |
|------|---|----------|--------|----------|
| 1347 | Antitoxin HigA-1 (HIGA1_VIBCH) | 46/11698 | 8.8/4 | Reduzida |
| 1438 | 50S ribosomal protein L19 (RL19_EHRRW) | 68/14635 | 0.05/6 | Reduzida |

As proteínas diferencialmente expressas em *Burkholderia* (com expressão aumentada no grupo teste) foram identificadas por PMF (tabela 6). A busca foi feita no ProFound restringindo o banco de dados do NCBIInr para o táxon “*bacteria*”. As modificações incluíram “*Iodoacetamide (Cys)*” e oxidação da metionina. Como demonstrado na tabela 6 encontramos uma catalase (*manganese containing catalase*) com expressão aumentada no grupo teste. O aumento da expressão de catalase é um fenômeno comum durante o catabolismo de PHAs. As proteínas com expressão aumentada no grupo teste foram: transportadores de membrana como a proteína transportadora de oligopeptídeo (*OppA, partial*) e a *acriflavin resistance protein*; enzimas envolvidas na produção de energia como *A/G-specific adenine glycosylase* e *F-type H⁺-transporting ATP synthase, A subunit*. O aumento da expressão destas proteínas corrobora com as afirmações de Seo, Keum e Li (2009) sobre degradação de compostos aromáticos por bactérias. Um aumento na expressão das enzimas *methionine-R-sulfoxide reductase* (figura 17) e *lig3 gene product* (enzima de reparo) também foi observado. Etienne (2003) afirma que as células que realizam metabolismo oxidativo produzem catalase e metionina sulfoxido redutase contra as espécies reativas

Tabela 5 - Lista das proteínas de *Burkholderia* com expressão suprimida no grupo teste identificadas por PMF. A busca foi feita no ProFound restringindo o banco de dados do NCBIInr para o táxon “*bactéria*”. As modificações incluíram “*Iodoacetamide (Cys)*” e oxidação da metionina.

| ID | Nome | Cover. % | pI | MW |
|------|---|-------------|-----|------|
| | hypothetical protein HMPREF0992_01009 | | | |
| 1391 | (gi 331082965) | 8 | 4,5 | 26,6 |
| 1375 | AMP-dependent synthetase and ligase (gi 312198854) | 7 | 5,4 | 60,7 |
| | UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] N-acetylglucosamine | | | |
| 1392 | deacetylase (gi 301168491) | 8 | 6,2 | 33,8 |

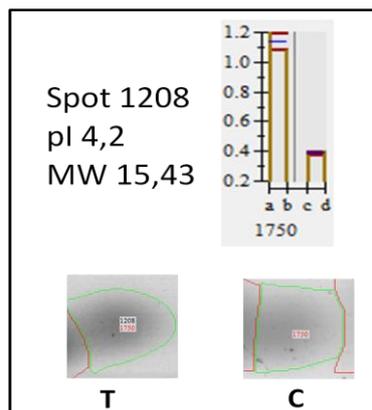
| | | | | |
|------|---|----|-----|------|
| 1393 | hypothetical protein Desku_3164 (gi 333980513) | 28 | 4,6 | 8,8 |
| 1360 | ketoacyl synthase (gi 111218110) | 11 | 6,1 | 24,3 |
| 1354 | guanylate kinase (gi 332522905) | 18 | 4,9 | 23,8 |
| 1347 | Hypothetical protein (gi 21324576) | 19 | 4,9 | 11,7 |
| | hypothetical protein CLOSTASPAR_06700 | | | |
| 1391 | (gi 225420355) | 18 | 3,8 | 41,0 |
| 1375 | hypothetical protein BRLA_c15810 (gi 339007809) | 13 | 4,1 | 34,6 |
| 1373 | hypothetical protein CLOLEP_03956 (gi 160935080) | 15 | 4,1 | 27,1 |
| 1381 | unnamed protein product (gi 158314153) | 13 | 3,7 | 13,6 |
| 1370 | unnamed protein product (gi 158314153) | 13 | 3,7 | 13,6 |
| 1366 | unnamed protein product (gi 158314153) | 13 | 3,7 | 13,6 |
| | hypothetical protein ECNC101_18254 | | | |
| 1394 | (gi 306814007) | 60 | 4,1 | 34,5 |
| 1407 | DNA-directed DNA polymerase (gi 253701103) | 10 | 4,1 | 45,6 |
| 1434 | putative phosphatase (gi 255655090) | 6 | 5,2 | 28,9 |
| 1433 | hypothetical protein GUU_03870 (gi 350546964) | 22 | 4,1 | 46,6 |
| 1417 | unnamed protein product (gi 158314153) | 13 | 3,7 | 13,6 |
| 1425 | acriflavin resistance protein (gi 340778683) | 13 | 4,1 | 20,2 |
| 1408 | unnamed protein product (gi 158314153) | 13 | 3,7 | 13,6 |
| | hypothetical protein HMPREF9621_01005 | | | |
| 1379 | (gi 313837014) | 13 | 4,1 | 16,2 |
| 1369 | uracil phosphoribosyltransferase (gi 157962397) | 13 | 4,1 | 22,6 |
| 1455 | putative thioredoxin (gi 297160796) | 18 | 4,1 | 15,0 |
| 1497 | hypothetical protein Sputw3181_2650 (gi 120599453) | 18 | 4,1 | 21,8 |
| 1541 | efflux transporter (gi 33864946) | 8 | 4,1 | 46,6 |
| 1611 | hypothetical protein SclaA2_32232 (gi 326445793) | 27 | 4,1 | 45,0 |
| 1613 | hypothetical protein Bcer98_3473 (gi 152977161) | 20 | 4,1 | 46,2 |

Tabela 6 - Lista de proteínas diferencialmente expressas em *Burkholderia* (com expressão aumentada no grupo teste) identificadas por PMF. A busca foi feita no ProFound restringindo o banco de dados do NCBIInr para o táxon "bactéria". As modificações incluíram "Iodoacetamide (Cys)" e oxidação da metionina.

| ID | Nome | Cover. | | |
|-------|--|--------|------|--------|
| | | % | pI | MW |
| 1067 | OppA, partial (gi 365540202) | 27 | 10.4 | 9.65 |
| 1146 | DNA-directed DNA polymerase (gi 325983092) | 8 | 9.9 | 49.13 |
| 1149 | manganese containing catalase (gi 134300742) | 26 | 5.6 | 21.61 |
| 1071 | Lipoprotein (gi 288925211) | 5 | 7.8 | 44.35 |
| 1088 | acriflavin resistance protein (gi 91978658) | 4 | 6.7 | 115.71 |
| E3-77 | methionine-R-sulfoxide reductase (gi 291614454) | 9 | 4.2 | 15.43 |
| E3-80 | cupin domain-containing protein (gi 294629878) | 17 | 6.3 | 14.68 |
| E3-84 | ATP-dependent RNA helicase RhlE (gi 167835963) | 8 | 7.9 | 43.31 |
| E3-86 | hypothetical protein HMPREF0322_02724 (gi 361854616) | 16 | 6.2 | 28.57 |
| E3-88 | cupin domain-containing protein (gi 294629878) | 17 | 6.3 | 14.68 |
| | inosine guanosine and xanthosine phosphorylase family | | | |
| E3-91 | protein (gi 297566666) | 13 | 6.1 | 30.03 |
| E3-92 | inner membrane protein YeeR (gi 260888312) | 9 | 7.2 | 63.36 |
| E3-94 | hypothetical protein SPP_0057 (gi 225855781) | 30 | 4.7 | 7.28 |
| E3-95 | hypothetical protein BCB4264_A2984 (gi 218235433) | 23 | 5.2 | 10.97 |
| E4-59 | hypothetical protein MEA186_30347 (gi 357029189) | 4 | 9.6 | 30.53 |
| E4-60 | putative xylose-proton symporter (gi 333398394) | 5 | 9.3 | 52.29 |
| | DltD protein for D-alanine esterification of lipoteichoic acid | | | |
| E4-65 | and wall teichoic acid (gi 16803011) | 5 | 9.0 | 48.47 |
| E4-66 | A/G-specific adenine glycosylase (gi 170724079) | 6 | 7.2 | 39.88 |
| E4-68 | unnamed protein product (gi 258512665) | 28 | 10.7 | 13.39 |
| E4-69 | hypothetical protein CBUD_A0033a (gi 209363631) | 52 | 9.7 | 4.08 |
| E4-70 | solute/DNA competence effector (gi 91793077) | 14 | 9.6 | 25.55 |
| | dTDP-Rha:a-D-GlcNAc-diphosphoryl polyprenol, a-3-L- | | | |
| E4-71 | rhamnosyl transferase (gi 294673625) | 6 | 6.3 | 32.12 |
| E4-74 | F-type H ⁺ -transporting ATP synthase, A subunit | 8 | 5.6 | 31.61 |

| | | | | |
|--------|--|----|------|--------|
| | (gi 89092253) | | | |
| E4-77 | hypothetical protein BAPKO_0758 (gi 111115544) | 8 | 7.6 | 38.58 |
| E4-80 | unnamed protein product (gi 187477416) | 4 | 5.6 | 120.19 |
| E4-81 | unnamed protein product (gi 294101977) | 7 | 5.1 | 65.88 |
| E4-82 | ATP-dependent helicase Lhr (gi 333991755) | 4 | 5.9 | 160.21 |
| E4-83 | AMP-dependent synthetase and ligase (gi 296123831) | 6 | 9.2 | 62.14 |
| E4-84 | ricin B lectin (gi 361061956) | 10 | 6.3 | 28.39 |
| E4-85 | argininosuccinate lyase (gi 160877311) | 7 | 5.1 | 49.53 |
| E4-86 | hypothetical protein Srot_0054 (gi 296392494) | 15 | 6.8 | 24.36 |
| E4-87 | unnamed protein product (gi 113477480) | 16 | 5.3 | 15.29 |
| E4-89 | hypothetical protein CgS9114_14944 (gi 344043387) | 43 | 8.2 | 5.34 |
| E4-90 | 30S ribosomal protein S6 (gi 320104414) | 19 | 6.5 | 15.60 |
| E4-91 | putative type III secretion protein YscC (gi 163802024) | 8 | 5.3 | 68.77 |
| E4-94 | DNA ligase (gi 338530816) | 9 | 8.9 | 38.38 |
| E4-96 | hypothetical protein bmyco0003_24960 (gi 228997926) | 12 | 8.9 | 37.56 |
| E5-C8 | unnamed protein product (gi 146301196) | 14 | 5.4 | 29.09 |
| E5-C9 | putative transcriptional regulator (gi 359824630) | 29 | 5.7 | 8.49 |
| E5-C11 | Fe-hydrogenase, gamma subunit (gi 325261422) | 6 | 5.1 | 19.36 |
| E5-C12 | elongation factor P (gi 359440212) | 19 | 5.0 | 20.86 |
| E5-D1 | hypothetical protein CLOHYLEM_04965 (gi 225568886) | 8 | 6.4 | 55.81 |
| E5-D2 | type III effector Hrp-dependent outer (gi 330986436) | 6 | 5.7 | 45.21 |
| E5-D3 | tRNA(Ile)-lysine synthase (gi 361052252) | 6 | 10.1 | 53.43 |
| E5-D4 | sorbitol dehydrogenase (gi 300714984) | 6 | 6.1 | 50.33 |
| E5-D5 | siderophore-interacting protein (gi 314921985) | 11 | 9.7 | 13.68 |
| E5-D9 | hypothetical protein GCWU000182_01430 (gi 229826066) | 44 | 5.0 | 5,47 |
| E5-D10 | spore cortex-lytic enzyme (gi 256005192) | 10 | 9.7 | 25,64 |
| E5-D11 | lig3 gene product (gi 21243148) | 6 | 9.5 | 96,46 |

Figura 17 - Spot 1208 com expressão aumentada no grupo teste.



Fonte: Brito, 2012. O histograma feito com base na porcentagem do volume mostrou um aumento na expressão do grupo teste (a e b) quando comparados com o grupo controle (c e d). A proteína foi identificada por PMF como sendo *methionine-R-sulfoxide reductase*. A busca foi feita no ProFound restringindo o banco de dados do NCBI nr para o táxon "bactéria". As modificações incluíram "Iodoacetamida (Cys)" e oxidação da metionina. Abaixo a foto do spot e acima valores experimentais de pI e massa molecular.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que o isolado SMF 090 trata-se da espécie *Burkholderia sabiae* que demonstrou a capacidade de tolerar e metabolizar a gasolina comercial. As análises proteômicas revelaram que o isolado de *Burkholderia* estudado possui enzimas de rotas metabólicas já descritas de compostos mono e poliaromáticos encontrados na gasolina comercial, demonstrando a potencialidade de SMF 090 ser utilizada na biorremediação. Vale ressaltar ainda que este estudo constitui o primeiro relato da existência de biomarcadores da via de degradação de gasolina em *B. sabiae* utilizando uma abordagem proteômica.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, L.; SEILHAMER, J. A. A comparasion of selected mRNA and protein abundances in human liver. **Electrophoresis**, vol.18, p. 533-537, 1997.
- ANDRADE, D. M. **Avaliação de bactérias provenientes de um biofiltro de tratamento de vapores de gasolina**. 2008. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental na área de Poluição Atmosférica) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.
- ANDRADE, J. de A. *et al.* Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética Química**, vol. 35, número 3, p. 17-43, 2010.
- ATLAS, R.M. Fate of petroleum pollutants in arctic ecosystems. **Water Science Technology**, vol. 18 (2), p. 59-67, 1986.
- BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER-JÚNIOR, W.T. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Braz. J. Microbiol.**, vol. 34, p. 65-68, 2003.
- BERINGER, J. E. R. Factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, vol. 84, p.188-198,1974.
- BIELEFELDT, A. R.; STENSEL, H. D. Modeling competitive inhibition effects during biodegradation of BTEX mixtures. **Wat Res**, vol. 33, p.707-714, 1999.
- BINDE, D. *et al.* Rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol.83, p.897-908, 2009.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, vol. 74, p. 63-67, 2000.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, vol. 72, p. 248-254, 1976.
- BURKHOLDER, W. H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**, vol. 40, p. 115-117, 1950.
- CANDIANO, G. *et al.* Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, vol. 25, p. 1327-1333, 2004.
- CASH, P. Characterisation of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis. **Anal. Chim. Acta**, vol. 372, p. 121–145, 1998.
- CHAILLAN, F. *et al.* Identifi cation and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbondegrading microorganisms. **Research in Microbiology**, vol. 155, p. 587-595, 2004.
- CHAPELLE, F. H. **Ground water microbiology & geochemistry**. N.Y. John Wiley & Sons Inc. 424 p., 1993.

CHEN, W. *et al.* *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol.57, p.1055-1059, 2007.

CHEN, W. *et al.* Proof that *Burkholderia* Strains Form Effective Symbioses with Legumes: a Study of Novel *Mimosa*-Nodulating Strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, vol.71, p.7461-7471, 2005.

CHU, H. *et al.* Catalytic incineration of C₂H₅SH and its mixture with CH₃SH over aPt/A1203 catalyst. **Journal of Environmental Engineering**, vol. 127, p. 438-442, 2001.

CLAUSER, K. R.; BAKER, P. R.; BURLINGAME, A. L. Role of accurate mass measurement (± 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching anal. **Chem**, vol.71, p. 2871–2882, 1999.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, vol. 5, p. 719-729, 2003.

COMPANT, S. *et al.* Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. **FEMS Microbiology Reviews**, vol.32, p. 607-626, 2008.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (Conama). Resolução 396, de 03 de abril de 2008. Disponível em:

<<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=562>>. Acesso em: 12 de mar. 2012.

CORDAZZO, J. **Modelagem e simulação numérica do derramamento de gasolina acrescida de álcool em águas subterrâneas**. 2000. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica). Universidade Federal Santa Catarina: Florianópolis, 2000.

CORSEUIL, H. X.; FERNANDES, M. Efeito do etanol no aumento da solubilidade de compostos aromáticos presentes na gasolina brasileira. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, vol. 4, p. 71-75, 1999.

CORSEUIL, H.X. **Enhanced degradation of monoaromatic hydrocarbons in sandy aquifer materials by inoculation using biologically active carbon reactors**. *PhD dissertation*, Ann Arbor, MI, EUA, 1992.

CORSEUIL, H.X; MARINS, M.D.M. Contaminação de águas subterrâneas por derramamentos de gasolina: o problema é grave? **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, vol.2, p.50-54, 1997.

COX, M. M.; LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1205 p., 2006.

CRAPEZ, M.A.C. *et al.* Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, vol. 30, p.179, 2002.

CUNHA, C. D. *et al.* **Biorremediação de água subterrânea contaminada com gasolina e análise molecular da comunidade bacteriana presente**. Rio de Janeiro, RJ: CETEM/MCT, 2008.

- CUNHA, C.D., LEITE, S.G.F. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 31, p.45-49, 2000.
- DÍAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. **International Microbiology**, vol.7, p. 173-80, 2004.
- DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V.L.D. **Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 1999. 38p.
- DOI, Y. **Microbial Polyesters** VCH Pub., New York, EUA, 156 p, 1990.
- DUA, M. *et al.* Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Appl. Microbiol. Biot.**, vol. 59, p. 143-152, 2002.
- ELLIOTT, G. N. *et al.* *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogenfixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen *ex planta*. **New Phytologist**, vol.173, p.168-180, 2007.
- ENG, J. K., MCCORMACK, A. L., YATES, J. R., J. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. **J. Am. Soc. Mass Spectrom**, vol. 5, p. 976-989, 1994.
- FARRELL, A.; QUILTY, B. Degradation of mono-chlorophenols by a mixed microbial community via a meta-cleavage pathway. **Biodegradation**, vol.10, p.353-362, 1999.
- FERREIRA, J.; ZUQUETTE, L. V. Considerações sobre as interações entre contaminantes constituídos de hidrocarbonetos e os compostos do meio físico. **Geociências**, vol. 17 (2), p. 527-557, 1998.
- FINOTTI, A.R; CAICEDO, N.O.L; RODRIGUEZ, M.T.R; Contaminações subterrâneas com combustíveis derivados de petróleo: toxicidade e a legislação brasileira. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, vol. 6, p. 29-46, 2001.
- FUZARI JUNIOR, G. C. **Obtenção e caracterização de filmes de PHB e de blendas de PHB com borracha**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências dos materiais) – Faculdade de Engenharia – UESP – Campos de Ilha Solteira, Ilha Solteira, São Paulo, 2008.
- GHIORSE, W. C.; WILSON, J. L. Microbial ecology of the terrestrial subsurface. **Advances in Applied Microbiology**, vol. 33, p. 107-172, 1988.
- GODOVAC-ZIMMERMANN, J.; BROWN, L. Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. **Mass Spectrometry Reviews**, vol. 20, p. 1–57, 2001.
- HENDRICKX, B. *et al.* Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: Distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. **Journal of Microbiological Methods**, vol. 64, p. 250-265, 2006.
- HENDRICKX, B. *et al.* Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: Distribution of the genes in BTEX

degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. **Journal of Microbiological Methods**, vol.64, p.250-265, 2006.

HIGSON, F. K.; FOCHT, D. D. Degradation of 2-methylbenzoic acid by *Pseudomonas cepacia* MB2. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 58, p.194-200, 1992.

JACOB, F., MONOD, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. **J. Mol. Biol.**, vol.3, p.318-356, 1961.

JACQUES, R.J.S. *et al.* Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, vol. 37 (4), p.1192-1201, 2007.

JORGENSEN, C. *et al.* Transformation of o-xylene to o-methyl benzoic acid by a denitrifying enrichment culture using toluene as the primary substrate. **Biodegradation**, vol.6, p.141-146, 1995.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, p. 680-685, 1970.

LIMA, U.A. **Biotecnologia industrial**. 1. ed. vol.3, São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

MAGNANI, G. S. **Análise da biodiversidade de bactérias endofíticas de colmo de cana-de-açúcar cultivada no noroeste do Paraná**. 2009. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 2009.

MAGNANI, G. S. **Análise da biodiversidade de bactérias endofíticas de colmo de cana-de-açúcar cultivada no noroeste do Paraná**. 2009. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2009.

MANDRI, T.; LIN, J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. **African Journal of Biotechnology**, vol.6 (1), p.023-027, 2007.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 2006. 162 f. Tese (Doutorado em Geociências e Ciências Exatas) - Universidade Estadual Paulista, 2006.

MENNA, P. *et al.* Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, vol. 29, p. 315-332, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria 36/MS/GM, de 19 janeiro 1990. D.O.U. de 23/01/90. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/36_90.pdf>. Acessado em: jan. de 2012.

MME-DNC - MINISTÉRIO DAS MINAS E ENERGIA, DEPARTAMENTO NACIONAL DE COMBUSTÍVEIS. **Anuário estatístico de 1995**, 1995.

NEWMAN, L. M.; WACKETT, L. P. Purification and characterization of toluene 2-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* G4. **Biochem**, vol.34, p.14066-14076, 1995.

PENNER, G.C. **Estudos laboratoriais da contaminação do solo por gasolina com o uso de detector de fotoionização**. 2000. 109 f. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) – Universidade de São Paulo, 2000.

PERKINS, D. N. *et al.* Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, vol. 20, p. 3551-3567, 1999.

PERKINS, D. N., PAPPIN, D. J. C., CREASY, D. M., COTTRELL, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**. vol. 20, p. 3551–3567. 1999.

POTIN, O. *et al.* Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, vol. 54, p. 45-52, 2004.

POULSEN, M.; LEMON, L.; BARKER, J. F. Dissolution of monoaromatic hydrocarbons into groundwater from gasoline – oxygenate mixtures. **Environ. Sci. Technol.**, vol. 26, p. 2483-2489, 1992.

POWERS, S.E. *et al.* The transport and fate of ethanol and BTEX in groundwater contaminated by gasoline. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, vol.31, p.79-123, 2001.

QINGYAN, L.I. *et al.* Isolation and characterization of atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. AD26 and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. **Journal of Environmental Sciences**, vol. 20, p.1226-1230, 2008.

RAHMAN, K.S.M.; BANAT, I.M.; THAHIRA, J. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. **Bioresour. Technol.**, vol. 81, p.25-32, 2002.

RAMSAY, M.A. *et al.* Effect of bioremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin**, vol.41 (7-12), p.413-419, 2000.

RANGEL, M.R. Gestão de emergência em terminal terrestre de distribuição de petróleo e derivados. *In*: CONGRESSO NACIONAL DE EXCELÊNCIA EM GESTÃO, 6, 2010. Niterói. **Anais ...** Niterói, RJ, Brasil. 2010.

RIEDEL, K. *et al.* Towards the proteome of *Burkholderia cenocepacia* H111: Setting up a 2-DE reference map. **Proteomics. Zurich**, vol. 6, p. 207-218, 2006.

RODRIGUES, D. F. **Caracterização polifásica da biodiversidade de isolados degradadores de poluentes xenobióticos na baixada santista**. 2002. 170 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, 2002.

ROMANO, E. Extração de DNA de Tecidos Vegetais. **Manual de transformações genéticas de plantas**. Editoras: Ana Cristina Miranda Brasileiro, Vera Tavares de Campos Carneiro; Brasília.1998.

ROMA-RODRIGUES, C. *et al.* Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to phenol at the level of membrane proteome. **Jornal of proteomics**, vol. 73, p. 1461-1478.

ROSATO, Y. B. Biodegradação do petróleo. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna, SP: Embrapa-CNPMA, p. 307-334, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2 ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p.

SANCHES, V.L. **Remediação de solos da formação são Paulo contaminados por vapores de gasolina**. 2009. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica, Saneamento Básico) – Universidade de São Paulo, 2009.

SCHIRMER, M.; MOLSON, J. W.; BARKER, J. F., 1999. The potential impact of alcohol as a gasoline oxygenate on BTEX degradation at spill sites. In: PETROLEUM HYDROCARBONS CONFERENCE, Nov. 17-19, Houston, Texas.

SCHIRMER, W. N. **Amostragem, análise e proposta de tratamento de compostos orgânicos voláteis (COV) e odorantes em estação de despejos industriais de refinaria de petróleo**. 2004. 140 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

SCHNEIDER, M.R.; CORSEUIL, H.X.; MALAMUD, E.S.T. O Intemperismo de fontes de contaminação e a análise de riscos em locais contaminados por derramamento de gasolina e álcool. In: 22º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 2003. Joinville, SC.

SEO, J. KEUM, Y. LI, Q.X. Bacterial degradation of aromatic compounds. **Int. J. Environ**, vol. 6, p. 278- 309, 2009.

SEO, J.; KEYN, Y.; LI, Q.X. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. **International Journal of Environmental Research and Public health**, vol. 6, p.278-309, 2009.

SHIELDS, M.S. *et al.* TOM, a new aromatic degradative plasmid from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* G4. **Appl Environ Microbiol.**, vol.61, p.1352–1356, 1995.

SOKOLOVSKA, I.; ROZENBERG, R.; RIEZ, C.; ROUXHET, P.G.; AGATHOS, S.N.; WATTIAU, P. Carbon-source induced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* E1. **Appl. Environ. Microbiol**, vol. 69, p.7019-7027. 2003.

SOUSA, S. A.; RAMOS, C. G.; LEITÃO, J. H. *Burkholderia cepacia* complex: emerging multihost pathogens equipped with a wide range of virulence factors and determinants. **International Journal of Microbiology**, vol.2011, p.1-9, 2011.

spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. **American Society for Mass Spectrometry**, vol. 5, p. 976–989, 1994.

SPILBORGHES, M. C. F. **Biorremediação de aquífero contaminado com hidrocarboneto**. 1997. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, 1997.

SPRINGAEL, D. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading

isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. **Journal of Microbiological Methods**, vol.64, p.250-265, 2006.

TIBURTIUS, E. R. L. *et al.* Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, vol. 27, p. 441-446, 2004.

TOLEDO, B. F. B.; MARCONDES, J.; LEMOS, E. G. M. Caracterização de rizóbios indicados para produção de inoculantes por meio de sequenciamento parcial do 16S rRNA. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol.44, p.384-391, 2009.

TOLEDO, B. F. B.; MARCONDES, J.; LEMOS, E. G. M. Caracterização de rizóbios indicados para produção de inoculantes por meio de sequenciamento parcial do 16S rRNA. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol.44, p.384-391, 2009.

TRIGUEIROS, D. E. G. **Avaliação da cinética de biodegradação dos compostos tóxicos: benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno (BTEX) e fenol.** 2008. 157 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Campus de Toledo. Centro de Engenharias e Ciências Exatas, 2008.

URBANCE, J.W. *et al.* BSD: the biodegradative strain database. **Nucleic Acids Res.**, vol. 31, p.152–155, 2003.

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, vol. 67 (4), p.503-549. 2003.

VIEIRA, S. **Introdução à Bioestatística.** 3. ed. Rio de Janeiro: campus, 1980.

WEISBURG, W. G. *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, vol.173, p.697-703, 1991.

WETLER-TONINI1, R. M. C.; REZENDEL, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e Biorremediação de Compostos do Petróleo por Bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, vol. 14 (4), p.1010-1020, 2010.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, vol. 51, p. 221- 271, 1987.

WOK, S. *et al.* Proteomic analysis of *Burkholderia cepacia* MBA4 in the degradation of monochloroacetate. **Proteomics**, vol. 7, p. 1107–1116, 2007.

YAKUBU, M.B. Biological approach to oil spills remediation in the soil. **African Journal of Biotechnology**, vol. 6 (24), p. 2735-2739, 2007.

ZHOU, E., CRAWFORD, R.L. Effects of oxygen, nitrogen, and temperature on gasoline biodegradation in soil. **Biodegradation**, vol. 6, p.127-140, 1995.

ZOBELL, C. E. Action of microorganisms on hydrocarbons. **Archive of Bacteriological Reviews**, vol. 10, p. 1-49, 1946