



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

MARIA GLEICIANE DE QUEIROZ MARTINS

**BIODEGRADAÇÃO DE ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO POR *Burkholderia*
*sp.***

SOBRAL

2012

MARIA GLEICIANE DE QUEIROZ MARTINS

BIODEGRADAÇÃO DE ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO POR *Burkholderia sp.*

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

Orientadora: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha

SOBRAL

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca do Curso de Medicina – *Campus* de Sobral

-
- M334b Martins, Maria Gleiciane de Queiroz.
 Biodegradação de ácido 2,4-diclorofenoxiacético por *Burkholderia* sp. / Maria Gleiciane de
 Queiroz Martins. – 2012.
 113 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina, Programa de Pós-
 Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2012.
 Área de Concentração: Macromoléculas.
 Orientação: Prof.^a. Dr.^a. Kyria Santiago do Nascimento.
 Coorientação: Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva.
1. *Burkholderia* 2. Biodegradação 3. Ácido 2,4 - diclorofenoxiacético
 I. Título.

CDD 616.0145

MARIA GLEICIANE DE QUEIROZ MARTINS

BIODEGRADAÇÃO DE ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO POR *Burkholderia sp.*

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

Aprovada em: 28 /02/2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Kyria Santiago do Nascimento (Orientadora)
Centro de Ciências / Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará (UFC) / *Campus* do Pici

Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha (Co-orientador)
Centro de Ciências Agrárias e Biológicas / Biologia / Núcleo de Biotecnologia de Sobral
(NUBIS)
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA) / *Campus* Betânia

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada
Centro de Ciências / Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará (UFC) / *Campus* do Pici

A Deus.

Aos Meus queridos Pais, dedico Honrosamente!

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre está iluminar meu caminho, pelas minhas conquistas, por todas as coisas boas que ele tem proporcionado e por todos os momentos maravilhosos que tenho tido em minha vida.

Aos meus pais, Raimunda Nonata de Queiroz e Francisco Honório Martins, por minha vida e por ensinar a vivê-la com dignidade, pelos seus ensinamentos, pela minha educação e formação e pelo amor que têm me dado. Agradeço a vocês de coração por tudo o que hoje sou e amo-os incondicionalmente no momento chamado sempre.

Aos meus avôs (*in memoria*), Maria Barbara e João Alberto, pelo amor, carinho e ensinamentos. Foram e sempre serão a lição de vida para mim. Hoje encontram-se em um plano superior, que não está ao meu alcance, mas com certeza de lá sabem o quanto eu os amo.

Às minhas irmãs, Gessiane e Gerliane, pelo amor, carinho, amizade, generosidade e admiração. Vocês sempre serem um presente de Deus e tenho orgulho em ter-las como irmãs. Lembrem-se por mais longe que eu esteja: “Perto está quem mora dentro do coração”.

Aos meus irmãos, Jucellyno, Jocellyno, Nacélio e Eudes, pelo carinho, pelo respeito sempre e pela convivência fraternal. Vocês são peças fundamentais em minha vida.

As minhas segundas mães: Edileuza de Queiroz e Fátima Sousa, pelo amor e cuidado.

A toda minha família, sobrinhos, cunhadas, cunhado, tias, tios, primos e avôs, por todos os momentos e carinho.

As meninas que moram comigo, Karysia, Ana Vitória, Vitória Virginia e Patrícia pela amizade e pelo amor fraternal proporcionando um lar agradável.

As minhas vizinhas: Bia, Brenda, Aurilene, Mônica, Tarciana, Flávia e Mariane, pela amizade, respeito e fazer com que os dias ruins tornem bons e os bons fiquem melhores com seus divertimentos, brincadeiras, risos e tudo de bom que elas têm proporcionado como boas vizinhas e grandes amigas-irmãs.

A minha orientadora, Profa. Dra. Kyria Santiago, por sua orientação, ensinamentos na pesquisa, compreensão e dedicação.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Rodrigo Maranguape, pela amizade, paciência e capacidade de repassar sua sabedoria, pela sua orientação e confiança durante todo o desenvolvimento do meu trabalho fazendo com que eu amadurecesse como profissional. Tenho maior respeito e consideração, para mim é um pai científico.

Ao Prof. Dr. Benildo Cavada por sempre ajudar no desenvolvimento da pesquisa do NUBIS (Núcleo de Biotecnologia de Sobral) e por ter aceitado o convite de fazer parte da minha banca examinadora de defesa de Mestrado.

Ao Prof. Gustavo Hitzschky (*in memoria*) pela oportunidade de ingressar na pesquisa dando a primeira base científica para a minha excelência como profissional acreditando no meu potencial e por ter sido uma pessoa de extrema bondade para todos aqueles ao seu redor.

A Dra Tânia Dantas por ter passado ensinamentos valiosos quando eu fui sua estudante de iniciação científica durante parte dos seus experimentos de doutorado no NUBIS. Com ela aprendi não só a ter visão crítica ao interpretar os resultados experimentais como também ter determinação, simplicidade e maturidade para alcançar um determinado objetivo.

A todos que me acolheram, Monalysa, Jackson Costa, João Garcia, Daniel de Brito, Ricardo Basto, Auxiliadora e Tatyane, quando eu cheguei ao NUBIS. Meu muito obrigado por terem me ajudado a compreender e realizar os primeiros experimentos envolvendo Genética e Biologia Molecular e pela amizade.

Ao Francisco Antônio por ter sido e é um grande amigo, por sempre me auxiliar nos meus experimentos, pela pontualidade e dedicação nos mesmos, agradeço-o cordialmente.

A Nyanne Hardy por sua dedicação, determinação e responsabilidade na pesquisa e nos meus experimentos. Muito obrigada por toda a ajuda e amizade.

A Amélia Araújo por está comigo numa grande jornada como amiga e aprendiz do mundo acadêmico e científico. Obrigada pela grande ajuda nos meus experimentos e pela amizade incondicional.

A Aurilene Cajado pela ajuda incondicional, carinho amizade e respeito. A você grande menina desejo uma vida profissional de excelência e isso porque você sabe fazer o diferencial buscando em cada pessoa um pouco de saber, sua vontade de aprender e ajuda prestada a faz diferente de todos os outros.

Ao Jedson, Raulzito, Vitória Virginia, Áurea Morgana e Cleane, pela ajuda sempre que necessária para conduzir meus experimentos e pela amizade.

A todos aqueles, Nágila Matos, Mariana, Bruno Bezerra, Crislayne, Flávia Muniz, Marcos Silvino, Tayane (*in memoria*) e Dauana que fazem parte da família NUBIS, meu muito obrigada.

A minha turma de mestrado: Daniel de Brito, Danielle do Vall, Ellen de Vasconcelos, F^{co} Flávio Evaristo, Ronaldo Farias, Gisvani Lopes, Joseíres Fontenelle, Luciana Castro, Manuela Montenegro, M^a Juliane Passos, M^a Nágila Matos, Robério Fiúza e Thiago Corrêa, meu muito obrigada pela união, colaboração uns para com os outros e pela amizade.

Aos integrantes do Laboratório de Imunologia e Bíoquímica de Sobral – LIBS, em especial ao Prof. Dr. Edson Holanda Texeira.

Ao amigos do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BIOMOL).

Ao Dr. Sérgio Miana Faria pesquisador da EMBRAPA Agrobiologia (Rio de Janeiro) por disponibilizar a coleção de beta-rizóbios.

Ao Cláudio Cunha por ter trazido a coleção de beta-rizóbios da EMBRAPA Agrobiologia (Rio de Janeiro).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela ajuda financeira com a bolsa de auxílio à pesquisa.

A Universidade Federal do Ceará por fornecer a possibilidade de pós-graduação em Biotecnologia.

A Faculdade de Medicina de Sobral, em especial ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia pelo esforço em possibilitar a formação acadêmica e científica de seus alunos de pós-graduação.

A todos os funcionários da Universidade Federal do Ceará.

A todos os integrantes dos Laboratórios de Microscopia para Microbiologia/Parasitologia e de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Sobral, em especial ao Rúlio Rocha (Técnico do Laboratório de Microscopia para Microbiologia/Parasitologia e Profa. Dr. Mirna Marques

Bezerra (Coordenadora do Laboratório de Farmacologia e do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia).

A todos que de alguma forma me ajudaram, meu muito obrigada.

“O que verdadeiramente somos é aquilo que o impossível cria em nós.”

Clarice Lispector

RESUMO

Bactérias do gênero *Burkholderia* apresentam capacidade de degradar diversos compostos tóxicos e recalcitrantes. Com base no exposto, neste estudo foi utilizado PCR em tempo real (qRT-PCR) e eletroforese bidimensional (2DE) para investigar os perfis de expressão do gene *tfdB* relacionado a biodegradação de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e proteínas diferencialmente expressas qualitativa e qualitativa, respectivamente na presença de 2,4-D por *Burkholderia sp.* SMF07. A fim de fazer a extração de RNA e proteínas totais foi realizado o crescimento bacteriano em dois meios de cultivo TY (*Tryptone-Yeast Medium*), sendo um controle e o outro suplementado com 1 mg/mL de 2,4-D, ambos foram incubados a 28 °C. A extração de RNA e proteínas totais foi feita após a adição do poluente no tempo de 15 minutos, 1, 2, 3 e 5 horas e durante a fase *log* do crescimento bacteriano, respectivamente. A qualidade do RNA total foi mensurada pela integridade dos fragmentos de RNA ribossômico (rRNA) verificado por eletroforese em gel de agarose 1,2% e pela relação entre as absorbâncias a 260 nm e 280 nm. Para análise quantitativa e qualitativa das proteínas foi utilizado o método de Bradford e SDS-PAGE, respectivamente. A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir do RNA total extraído utilizando a enzima de transcrição reversa (*Superscript III*, Invitrogen) e empregando iniciadores randômicos 6-mer (Invitrogen). A expressão relativa do gene *tfdB* foi feita através qRT-PCR utilizando Power SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems) e empregando o gene 16S rRNA como *housekeeping*. O cDNA sintetizado foi empregado como DNA *template*. A análise comparativa da qRT-PCR foi feita pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. A partir das proteínas totais extraídas foi determinado o mapa bidimensional de referência para cada condição. O ajuste das imagens dos géis bidimensionais, a detecção de *spots* protéicos e a avaliação dos dados para determinação de variações quantitativas e qualitativas, massa molecular (MM) e ponto isoelétrico (pI) dos *spots* foi feito pelo programa *ImageMaster*[®]. Proteínas diferencialmente expressas quantitativamente e qualitativamente na presença de 2,4-D foram identificadas utilizando os valores de pI e MM do *spot* contra um banco de dados de proteínas *UniProt* disponível no servidor ExpASY. De acordo com esse trabalho, a expressão do gene *tfdB* aumentou significativamente 200% em relação ao controle após 1 hora de indução com o supracitado herbicida. O número médio de *spots* protéicos das replicas dos géis 2DE foi de 836 (controle) e 803 (tratamento). A maior abundância de proteínas foi observada nos géis 2DE na faixa de pH de 5-6 com MM entre 20 e 40 quilodalton (kDa). Foi possível verificar nos géis 2DE proteínas diferencialmente expressas

quantitativamente e qualitativamente para a condição de estresse bacteriano em resposta ao 2,4-D em relação ao controle. A maioria dessas proteínas identificadas pertence às funções moleculares: transferase ou hidrolase, diferentes expressas quantitativas e qualitativas. De acordo com os presentes dados, conclui-se que a cepa de *Burkholderia sp.* SMF07 apresenta o gene *tfdB*, o qual demonstrou seu nível de expressão aumentado em meio contendo 2,4-D. Adicionalmente, houve proteínas diferencialmente expressas no referido meio suplementado, indicando a importância desta bactéria como ferramenta biotecnológica potencial para a biodegradação deste poluente.

Palavras-chave: *Burkholderia*. Biodegradação. Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Burkholderia* have the capacity to degrade various toxic and recalcitrant compounds. Based on the foregoing, this study used real-time PCR (qRT-PCR) and two-dimensional electrophoresis (2DE) to investigate the gene expression profiles *tfdB* related to biodegradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and differentially expressed proteins qualitatively and quantitatively, respectively in the presence of 2,4-D *Burkholderia sp.* SMF07. In order to make the extraction of RNA and protein total bacterial growth was carried out in two TY culture media (Tryptone-Yeast Medium), a control and the other being supplemented with 1 mg / mL 2,4-D, both were incubated at 28 ° C. RNA extraction and total proteins was done after addition of the pollutant in time of 15 minutes, 1, 2, 3 and 5 hours and during the log phase bacterial growth, respectively. The quality of total RNA was measured by the integrity of the fragments of ribosomal RNA (rRNA) checked by electrophoresis on 1.2% agarose gel and the ratio between the absorbances at 260 nm and 280 nm. For quantitative and qualitative analysis of proteins, the method of Bradford and SDS-PAGE, respectively. The synthesis of complementary DNA (cDNA) was determined from the total RNA using the enzyme reverse transcriptase (Superscript III, Invitrogen) using random primers and 6-mer (Invitrogen). Relative expression of the gene was performed using *tfdB* qRT Power-PCR using SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems) and using the 16S rRNA gene as housekeeping. The synthesized cDNA was used as template DNA. Comparative analysis of qRT-PCR was performed by $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. The total proteins extracted from the two-dimensional map was determined for each reference condition. The adjustment of the two-dimensional images of the gels, the detection of protein spots and evaluate data to determine quantitative and qualitative variations, molecular mass (MM) and isoelectric point (pI) of the spots was done by the program ImageMaster[®]. Proteins differentially expressed quantitatively and qualitatively in the presence of 2,4-D were identified using the values of pI and MM of the spot against a database of proteins available in UniProt ExPASy server. According to this work, the gene expression *tfdB* significantly increased 200% over the control after one hour of induction of the abovementioned herbicides. The mean number of spots of replication of protein was 836 2DE gel (control) and 803 (treatment). The greater abundance of proteins was observed in the 2DE gels in pH range 5-6 with MM between 20 and 40 kilodalton (kDa). It was verified in 2DE gels differentially expressed proteins quantitatively and qualitatively to the stress condition in response to bacterial 2,4-D compared to control. Most of these identified proteins belong to molecular function: hydrolase or transferase, expressed different quantitative and qualitative.

For these reasons, the strain of *Burkholderia sp.* SMF07 introduced tfdB also the gene expression level was increased and it was possible to detect differentially expressed proteins qualitatively and quantitatively to grow in medium containing 2,4-D, indicating the importance of these bacteria on the biodegradation of the pollutant. In accordance with these data, we conclude that strain *Burkholderia sp.* SMF07 tfdB introduced gene, which demonstrated high expression in a medium containing 2,4-D. Adicionalmente, were differentially expressed proteins in medium supplemented above, indicating the importance of these bacteria as a biotechnological tool for the biodegradation potential of this pollutant.

Keywords: *Burkholderia*. Biodegradation. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cartilha publicada em 19/09/2011 pela ANVISA	26
Figura 2– Mapa de consumo nacional de agrotóxicos e afins – 2005.....	31
Figura 3- Fórmula estrutural do ácido 2,4-diclorofenoxiacético.....	33
Figura 4 – Via de degradação do 2,4-D por <i>Alcaligenes eutrophus</i> JMP134.....	40
Figura 5– Perfil qualitativo do DNA Total de <i>Burkholderia sp</i> feito por meio eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Raia 1: DNA Total; Raias 2 e 3: poços vazios; 4: Marcador Molecular.	58
Figura 6 - Eletroforese de PCR usando <i>primers</i> para PCR convencional (A) e qRT-PCR (B).	59
Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta. A raia 1: Marcador molecular ladder; Raia 2: Controle negativo; 3: Produto de PCR do gene 16S rRNA de <i>Burkholderia sp.</i> SMF 07.....	60
Figura 8 - Dendograma da <i>Burkholderia mimosarum</i> SMF 07 baseada no gene ribossomal 16S. Reconstrução do dendograma utilizando o programa MEGA 5.05 e algoritmo Neighbor-joining.....	63
Figura 9 - Dendograma da <i>Burkholderia mimosarum.</i> SMF 07 baseada no gene ribossomal 16S. Reconstrução do dendograma utilizando o programa MEGA 5.05 e algoritmo Máxima parcimônia. .	64
Figura 10– Dendograma da <i>Burkholderia mimosarum</i> SMF 07 baseada no gene ribossomal 16S. Reconstrução da Árvore Filogenética utilizando o programa MEGA 5.05 e algoritmo Máxima verossimilhança.....	65
Figura 11- Imagem de coloração de Gram da estirpe de <i>Burkholderia mimosarum</i> SMF 07 utilizando microscopia óptica.	66
Figura 12 – Curva de crescimento para extração de RNA total de <i>Burkholderia mimosarum</i> SMF 07 durante 27 horas de monitoramento em espectrofotômetro usando comprimento de onda igual a 600 nm.	67
Figura 13 – Curva de crescimento para extração de proteína intracelular de <i>Burkholderia mimosarum</i> SMF 07 durante 26 horas de monitoramento em espectrofotômetro usando comprimento de onda igual a 600 nm.....	68
Figura 14 – Eletroforese em poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12,5% de proteínas obtidas de <i>Burkholderia mimosarum</i> SMF 07 corado com Comassie blue G-250.....	69
Figura 15 – Mapa de eletroforese bidimensional de proteínas obtidas de <i>Burkholderia mimosarum</i> SMF 07 cultivadas em meio TY presença de 2,4-D.....	71
Figura 16Figura 16 - Géis de eletroforese bidimensional de proteínas obtidas de <i>Burkholderia mimosarum</i> SMF 07 cultivadas em meio TY ausência (A, C e E – coluna à esquerda) e presença (B, D e F – coluna à direita) de 2,4-D.....	72

Figura 17 – Géis 2DE de referência para condição em estudo mostrando proteínas que apresentaram diferença quantitativa de expressão.....	79
Figura 18 – Géis 2DE de referência para condição em estudo mostrando proteínas que apresentaram diferença qualitativa de expressão.....	80
Figura 19 - Regiões dos géis de referência para a condição controle (C) e tratamento (T) correspondente a cada spot que teve sua expressão quantitativa aumentada na presença de 2,4-D comparado com o controle.....	82
Figura 20 - Regiões dos géis de referência para a condição controle (C) e tratamento (T) correspondente a spot que teve sua expressão qualitativa induzida na presença de 2,4-D comparado com o controle.	85
Figura 21 - Padrão do perfil qualitativo do RNA total de <i>Burkholderia mimosarum</i> SMF 07 cultivada em meio TY, avaliado por eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta.	87
Figura 22 - Padrão do perfil qualitativo dos cDNAs de <i>Burkholderia</i> sp. SMF 07 cultivada em meio TY, avaliado por eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta.....	88
Figura 23 - Curva de amplificação de qRT-PCR do gene 16S rRNA na ausência de 2,4-D.	90
Figura 24 - Curva de dissociação de qRT-PCR do gene 16S rRNA na ausência de 2,4-D.....	90
Figura 25 - Curva de amplificação de qRT-PCR do gene 16S rRNA na presença de 2,4-D.	91
Figura 26 - Curva de dissociação de qRT-PCR do gene 16S rRNA na presença de 2,4-D.	91
Figura 27 - Curva de amplificação de qRT-PCR do gene <i>tfdB</i> , na ausência de 2,4-D.	92
Figura 28 - Curva de dissociação de qRT-PCR do gene <i>tfdB</i> na ausência de 2,4-D.	92
Figura 29 - Curva de amplificação de qRT-PCR do gene <i>tfdB</i> na presença de 2,4-D.	93
Figura 30 - Curva de dissociação de qRT-PCR do gene <i>tfdB</i> na presença de 2,4-D.	93

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1– Distribuição percentual dos ingredientes ativos de agrotóxicos, por classes de uso - Brasil – 2005.....	31
Gráfico 2 - Número médio de Spots das réplicas de géis bidimensionais de Burkholderia mimosarum SMF 07.....	73
Gráfico 3 - Gráfico de dispersão das replicas dos géis de Burkholderia mimosarum SMF 07 controle.....	74
Gráfico 4 – Gráfico de dispersão das replicas dos géis de Burkholderia mimosarum SMF 07 tratamento 2,4-D.....	74
Gráfico 5 – Gráfico de dispersão dos géis de referência controle e tratado de Burkholderia mimosarum SMF 07. Os géis apresentaram correlação de 0,66 e 423 spots coincidentes. Corr.: correlação e Count.: spots coincidentes.....	75
Gráfico 6 – Número médio de Spots das replicas de géis bidimensionais controle (□) e tratamento com 2,4-D (■) de Burkholderia mimosarum SMF 07 distribuídos por ponto isoelétrico (pI).	76
Gráfico 7 – Número médio de Spots das réplicas de géis bidimensionais controle (□) e tratamento com 2,4-D (■) de Burkholderia mimosarum SMF 07 distribuídos por massa molecular (MM).....	77
Gráfico 8 – Expressão relativa de Burkholderia mimosarum SMF 07 em resposta ao tempo de contato com 2,4-D. Análise estatística Mann-Whitney e *p < 0,05.	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de amostras analisadas por cultura e resultados insatisfatórios em relação a quantidade de agrotóxicos não autorizados e autorizados, mas acima dos limites máximos estabelecidos	30
Tabela 2 - Relação das sete bactérias transferidas, sugeridas por Yabuuuchi e colaboradores (1992), para o gênero <i>Burkholderia</i> antes pertencente ao gênero <i>Pseudomonas</i>	37
Tabela 3 - Poluentes conhecido por ser degradado por espécies de <i>Burkholderia</i> . (Continua)	38
Tabela 4 - Primers utilizados para Sequenciamento do gene 16S rRNA	47
Tabela 5 - Parâmetro do programa IPGphor III usado para a focalização	53
Tabela 6 - Composição do Gel de Poliacrilamida	54
Tabela 7 - Sequência de Primers para qRT-PCR usados nesse estudo	57
Tabela 8 - Concentração de DNA genômico, absorvância a 260nm e relação entre as absorvâncias a 260/280 nm das amostras de DNA de <i>Burkholderia sp.</i> SMF 07	58
Tabela 9 - Resultado da busca por similaridade utilizando a ferramenta Blast do NCBI	61
Tabela 10 - Perfil quantitativo das Proteínas Intracelulares extraídas de <i>Burkholderia mimosarum</i> SMF 07 crescida em meio TY na ausência e presença de 2,4-D	68
Tabela 11 - Proteínas intracelulares de <i>Burkholderia mimosarum</i> SMF 07 com alterações quantitativas no nível de expressão identificadas com base no banco de dados <i>ExPaSy</i>	83
Tabela 12 - Proteínas intracelulares de <i>Burkholderia mimosarum</i> SMF 07 com alterações qualitativas no nível de expressão identificadas com base no banco de dados <i>ExPaSy</i>	85
Tabela 13 - Perfil quantitativo do RNA Totalde <i>Burkholderia sp.</i> SMF 07, crescida em meio TY na ausência e presença de 2,4-D	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcento
Δ	Delta
[m/v]	Concentração massa por volume
[v/v]	Concentração volume por volume
°C	Graus Celsius
μg	Micrograma
μl	Microlitro
16S	subunidade 16S ribossomal
16S rRNA ou 16S rDNA	Gene da subunidade 16S ribossomal
2,4,5-T	Ácido 2,4,5-triclorofenoacético
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoacético
23S	subunidade 23S ribossomal
2D	Segunda Dimensão
2DE	Eletroforese Bidimensional
A	Absorbância
A_{260}/A_{280}	Relação entre as absorbâncias de 260 e 280 nm
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina Sérica Bovina
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno
cDNA	Sítese do DNA complementar

CHAPS	3-cholamidopropyl]dimethylammonio
CIATs	Centros de Informação e Assistência Toxicológica
CO₂	Dioxido de carbono
Ct	Cycle threshold
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPIS	Equipamento de Proteção Individual
ExPASy	<i>Expert Protein Analysis System</i>
F	Forward
FAO	Control of water pollution from agriculture
g/cm³	Grama por centimetro cubico
H₂O	Água
HCl	Ácido clorídrico
HH:mm	Horas por minuto
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDT	Integrated DNA Technologies
IEF	Focalização Isoelétrica
IPG	Gradiente de pH Imobilizado

Kb	Kilobase
KDa	Quilodalton
Kv	Quilovolt
L	Litro
LWM	Marcador de baixo peso molecular
M	Molar
mA	Miliamperagem
mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama por mililitro
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
MM	Massa Molecular
mM	Milimolar
MP	Máxima Parcimônia
mRNA	RNA mensageiro
MSMA	Metano Arseniato Ácido Monossódico
MV	Máxima Verossimilhança
NaCl	Cloreto de Sódio
NAD	Dinucleótido de nicotinamida-adenina
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NJ	Neighbor-joining
nm	Nanômetro

nM	Nanomolar
O.D.	Densidade Óptica
p	Significancia na análise estatística
PAHs ou HPAS	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
PARA	Programa de análise de resíduos de agrotóxico em alimento
pb	Pares de bases
PCBs	Benifenilos Policlorados
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial de hidrogénio iônico
pI	Ponto Isoelétrico
ppm	Partes por milhão
PSA	Persulfato de amônia
qRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real
R	Reverso
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotação por minuto
rRNA	RNA ribossômico
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Dodecilsulfato de sódio (SDS) de poliacrilamida (PAGE)
SINDAG	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas

TA	Tapão de Amostra (Azul de bromofenol e glicerol)
Taq	DNA Polimerase Termoestável
TBE	Tris/ácido bórico/EDTA
TCE	Tricloroetileno
TE	Tris/EDTA
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
<i>tfdA</i>	Gene da enzima α -cetoglutarato dioxigenase
<i>tfdB</i>	Gene da enzima 2,4-diclorofenol hidroxilase
<i>tfdC</i>	Gene da enzima clorocatecol 1,3-dioxignase
<i>tfdD</i>	Gene da enzima cloromuconato cicloisomerase
<i>tfdE</i>	Gene da enzima dienalactona hidrolase
<i>tfdF</i>	Gene da enzima maleilacetato redutase
TIFF	<i>Tagged Image File Format</i>
Tris	Hidroximetil
tRNA	RNA transportador
TY	Triptona-Extrato de Levadura
v	Voltagem
vh	Voltagem por hora
x g	Força Centrifuga Relativa
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	25
1.1	Poluição	25
1.2	Histórico, aplicação e efeito dos agrotóxicos.....	27
1.3	Herbicidas	30
1.4	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).....	32
1.5	Biorremediação	34
1.6	Microrganismos na biorremediação	36
1.6.1	<i>Gênero Burkholderia: descrição e biorremediação</i>	37
1.7	Mecanismos moleculares para avaliação do potencial microbiano na biorremediação.....	40
2	OBJETIVOS.....	43
2.1	Objetivos gerais.....	43
2.2	Objetivos específicos.....	43
3	MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1	Bactérias e condições de cultivo	44
3.2	Microscopia e coloração de Gram	44
3.3	Extração de ácido deoxirribonucléico (DNA) total.....	44
3.4	Eletroforese em gel de agarose	45
3.5	Teste de <i>primers</i> para biorremediação	46
3.5.1	<i>Construção de primers</i>	46
3.5.2	<i>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</i>	46
3.6	Sequenciamento do gene 16S rRNA	47
3.6.1	<i>Amplificação do gene rRNA 16S</i>	47
3.6.2	<i>Reação de sequenciamento</i>	47
3.6.3	<i>Análise de sequência de nucleotídeos</i>	48
3.6.4	<i>Análise de filogenia molecular</i>	48
3.6.5	<i>Reconstrução de dendograma</i>	48
3.7	Curva de crescimento	49
3.8	Condição de <i>stress</i>	49
3.8.1	<i>Para extração de proteínas intracelulares</i>	49
3.8.2	<i>Para extração de ácido ribonucléico (RNA) total</i>	50
3.9	Extração de proteínas intracelulares.....	51
3.10	Quantificação de proteínas.....	51
3.10.1	<i>Método de Bradford</i>	51
3.10.2	<i>SDS-PAGE</i>	52
3.11	Eletroforese bidimensional	52
3.11.1	<i>Reidratação das strips</i>	52
3.11.2	<i>Focalização isoelétrica</i>	52
3.11.3	<i>Equilíbrio das strips</i>	53
3.11.4	<i>Segunda dimensão (2D)</i>	53
3.12	Extração de RNA total	55
3.13	Síntese do DNA complementar (cDNA)	55

3.14	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) e análise da expressão relativa.....	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	58
4.1	Extração de ácido deoxirribonucléico (DNA) total.....	58
4.2	Teste de <i>primers</i> para biorremediação	59
4.3	Sequenciamento do gene 16S rRNA	60
4.3.1	<i>Amplificação do gene 16S rRNA</i>	60
4.3.2	<i>Análise da sequência de nucleotídeos do gene 16S rRNA</i>	60
4.3.3	<i>Análise das sequências do gene 16S rRNA</i>	62
4.4	Curva de crescimento	66
4.5	Extração de proteínas intracelulares	68
4.6	Eletroforese bidimensional	69
4.6.1	<i>Pré-análise do proteoma de Burkholderia mimosarum SMF 07</i>	70
4.6.2	<i>Análise do proteoma de Burkholderia mimosarum SMF 07</i>	71
4.6.3	<i>Distribuição dos spots por ponto isoelétrico e massa molecular</i>	76
4.6.4	<i>Proteínas diferencialmente expressas</i>	77
4.6.4.1	<i>Análise quantitativa da expressão dos spots nos géis</i>	81
4.6.4.2	<i>Análise qualitativa da expressão dos spots nos géis</i>	84
4.7	Extração de RNA total	87
4.8	Síntese do DNA complementar (cDNA)	88
4.9	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) e análise da expressão relativa.....	89
5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	96
6	COLABORADORES.....	97
	REFERÊNCIAS	98

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Poluição

Pode-se entender por poluição, seja ela do ar, da água, do solo ou do alimento, a introdução pelo homem, direta ou indiretamente, de substâncias ou energia no ambiente em quantidades que provoque um impacto ambiental negativo, ou seja, uma alteração indesejável, causando assim danos na saúde humana, nos seres vivos e no ecossistema ali presente (JACQUES *et al.*, 2010). A poluição pode ter efeito negativo na biodiversidade, pois provoca a diminuição ou extinção de espécies tanto da flora como da fauna. Dessa forma, a poluição é em geral, consequência do crescimento demográfico e industrial, do desenvolvimento da sociedade, da ação imediatista e desprovida de consciência dos homens. Aos fatores que causam poluição chamam-se poluentes. Em geral, os poluentes são resíduos de atividades humanas essenciais, como a agricultura, a construção civil, os meios de transporte, atividades da indústria, produção de resíduos biológicos como fezes e urina (JACQUES *et al.*, 2010; GÓIS; WEBER, 2011). Na atualidade as atividades industriais, o uso de fertilizantes e agrotóxicos, a deposição atmosférica e a disposição de resíduos no meio ambiente sem tratamento prévio são algumas das numerosas e variadas fontes de contaminação do solo, superfície da água e de águas subterrâneas, na atualidade. Como fontes principais de poluição tem-se a atividade agropecuária e os processos da cadeia do petróleo. Os compostos nitrogenados, aromáticos policíclicos e outros hidrocarbonetos, que são constituintes de petróleo bruto, e compostos orgânicos halogenados, juntos, constituem um grupo grande e diversificado de produtos químicos que são responsáveis em grande parte causadores da poluição ambiental generalizada (JAIN *et al.*, 2005).

Na atualidade são muitos os poluentes no meio ambiente, sendo as fontes que os originam e os seus efeitos muito diversificados. Os poluentes podem ser agrupados em compostos biodegradáveis e recalcitrantes. As fontes de poluições podem ser de duas categorias como pontuais ou difusas (dispersas). A primeira, também denominada de localizadas, corresponde a esgotos domésticos ou industriais. Dentre as fontes difusas, os agrotóxicos são os que mais se destacam. Um dos principais exemplos dessa poluição dispersa é a pulverização nas lavouras dos agentes químicos que se dispersam no ar, na água e no solo, chegando até os lençóis freáticos, lagos e rios pela ação da lixiviação. As poluições dispersas são as mais difíceis de ser mediada e controlada em comparação com a poluição pontual e é a

que mais degrada os recursos hídricos (FAO, 1996). A poluição difusa pode ser oriunda de natureza urbana, rural ou atmosférica (MARIA *et al.*, 2006).

Os agrotóxicos podem ser definidos como quaisquer produtos de natureza biológica, física ou química, usados na lavoura, na pecuária e mesmo no ambiente doméstico, sendo utilizado nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, podendo alterar a composição da biota, a fim de preservar ações danosas de outros seres vivos considerados nocivos (CHABOUSSOU, 1987; BARBOSA, 2004).

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com sua finalidade, classe química e toxicidade. A classificação por finalidade categoriza os agrotóxicos em inseticidas, acaricidas, larvicidas, nematicidas, moluscocidas, bacteriostáticos e bactericidas, fungicidas, herbicidas, pediculicidas e rodenticidas. Com relação à classe química, podem ser divididos em organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, triazinas e outros. (BARBOSA, 2004).

De acordo com a classificação da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Figura 1), órgão de controle do Ministério da Saúde, os agrotóxicos são divididos em quatro classes de perigo para sua saúde, baseado no grau de toxidez e não a qualidade do produto. Cada classe é representada por uma cor no rótulo e na bula do produto (ANVISA, 2011). Os produtos da Classe I ou II só devem ser usados caso não tenha nenhum da Classe III ou IV ou outro meio que seja utilizado para combater praga ou doença.

Figura 1 - Cartilha publicada em 19/09/2011 pela ANVISA

Classe I	Extremamente Tóxico	Vermelha
Classe II	Altamente Tóxico	Amarela
Classe III	Medianamente Tóxico	Azul
Classe IV	Pouco Tóxico	Verde

Fonte: Cartilha publicada em 19/09/2011 pela ANVISA.

1.2 Histórico, aplicação e efeito dos agrotóxicos

Os agrotóxicos, criados durante a Primeira Guerra Mundial, são produtos químicos utilizados na agricultura. Muitos não sabem que o surgimento dos agrotóxicos não tinha como propósito a aplicação nas lavouras e sim para serem usados como armas químicas de uso bélico. No pós-guerra as indústrias dos defensivos agrícolas se expandiram bastante e a sua utilização nas lavouras se intensificou com a Revolução Verde, na qual visava promover a agricultura tendo como base o incentivo de utilização de defensivos agrícolas, uma vez que um dos impactos da Segunda Guerra Mundial foi à disseminação da fome por toda a Europa. No Brasil os agrotóxicos começaram a ser usados na década de 40 com o propósito de controlar doenças endêmicas e depois como combate a pragas na agricultura (ALVES FILHO, 2002).

A Revolução Verde iniciou no Brasil na metade da década de 70. Nessa época houve o uso em larga escala dos agrotóxicos, isso se deu pela política de incentivo à compra dos mesmos pelos governadores que os financiavam aos agricultores, o chamado pacote agrícola. O pacote agrícola era composto por sementes, fertilizante e agrotóxico. Dessa forma aumentou a importação e implantação de indústrias de agrotóxicos no país (MEIRELLES, 1996). O uso excessivo e sem nenhum cuidado desses agrotóxicos fez com que surgissem os primeiros relatos de contaminação ambiental e problemas com a saúde humana (LIMA, 2008). Com esses impactos negativos dos agrotóxicos foi necessário criar regulamentações para a utilização dos mesmos, a fim de preservar o meio ambiente e a saúde coletiva. Portanto, na década de 80 foi instituída a Lei 7802/1989 que regulamentava a comercialização e utilização dos mesmos (ALVES FILHO, 2002). Para tanto era necessário a fiscalização, onde entre os que ficaram encarregados foram: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Ministério do Meio Ambiente, Ministério da Saúde, Ministério da Agricultura e Pecuária e ANVISA.

Os agrotóxicos podem oferecer prejuízo à saúde humana e desequilíbrio no ecossistema, contaminando solo, águas superficiais e subterrâneas, onde está sendo utilizado, isso depende da toxicidade, do grau de contaminação e do tempo de exposição durante sua aplicação (CASTRO; CONFALONIERI, 2005; OLIVEIRA, 2007). Eles têm sido usados em países em desenvolvimento indiscriminadamente e isso tem alertado atenção governamental, bem como das agências de vigilância e dos próprios agricultores.

Os pesticidas são aplicados sobre as plantas ou diretamente no solo e mesmo quando direcionados aos vegetais cerca de 50% da dose utilizada pode ter como destino final o solo. Existem três formas principais de transporte: a volatilização, a lixiviação e o escoamento

superficial. O transporte vertical dos pesticidas no perfil do solo (lixiviação) tem sido apontado como a principal forma de contaminação do lençol freático (águas subterrâneas), juntamente com a água das chuvas ou de irrigação que escoam pelo solo. Segundo a Embrapa, a contaminação de rios e lagos ocorre, em grande parte, pelo escoamento superficial (água de enxurrada), onde uma única chuva pode gerar perdas de até 2% da dose de agrotóxicos aplicada. A utilização extensiva de Linuron e Diuron, dois herbicidas comumente aplicados na agricultura, tem resultado em uma substancial contaminação ambiental das águas superficiais e subterrâneas (BREUGELMANS *et al.*, 2010).

A aplicação desses produtos no campo pode resolver a incidência de uma praga em uma lavoura, mas conseqüentemente pode afetar a reprodução de outras espécies vegetais que dependem daquele animal para a polinização. O impacto acumulativo sobre o ambiente resulta na degradação lenta dos recursos naturais, dentre eles a morte de animais silvestres e de peixes, contaminação da água e do solo, eliminação de predadores naturais das pragas das culturas e, conseqüentemente, um surgimento de pragas mais resistentes aos agrotóxicos.

Além disso, os compostos químicos podem se aderir às plantas e contaminar a alimentação humana. Existem pessoas que têm maior risco a exposição direta dos agrotóxicos, como por exemplo, os trabalhadores rurais que aplicam esses produtos nas lavouras. Por estarem sem os equipamentos de proteção individual (EPIs) e em contato direto e persistente com o produto, possuem diferentes graus de severidade de intoxicação, constituindo-se em um problema de saúde pública. Alguns estudos relacionam a exposição ocupacional aos inseticidas à prevalência de doenças referentes ao sistema nervoso e reprodutivo, paralisia, cegueira, câncer, sintomas de depressão e ansiedade. Vale salientar que a exposição aos agroquímicos, seja através de exposição ambiental ou ocupacional, raramente se limita a uma única substância. Conseqüentemente, nem sempre é possível determinar um efeito específico e expressar correlações devido à presença de vários agroquímicos no ambiente (BREUGELMANS *et al.*, 2010).

Em 2001, Fairbanks (2001) relatou o Brasil como o terceiro mercado de vendas e o oitavo maior consumidor de agrotóxicos por hectares no mundo, sendo os herbicidas e inseticidas responsáveis por 60,0% dos produtos comercializados no país. Desde 2008 essa classificação mudou, o Brasil lidera o mercado como o maior consumidor de agrotóxico do mundo, lugar antes assumido pelos Estados Unidos (ANVISA 2009), consumindo 733,9 milhões de toneladas (SINDAG, 2009) e nos últimos anos tem como principal destino de produtos banidos em outros países. A venda de agrotóxicos no Brasil representa 84% do

mercado da América Latina, com um faturamento anual que chega a US\$ 5 bilhões. Ao todo, são 1.224 produtos formulados registrados e cerca de 450 ingredientes ativos (ANVISA, 2008).

Altas doses de alguns agrotóxicos podem alterar o sistema endócrino, a função reprodutiva e causar malformações congênitas (AZIZ *et al.*, 2001; CALVERT *et al.*, 2007). Segundo o Sistema Nacional de Informação Tóxica Farmacológicas (SINITOX, 2011) o Ceará é o segundo da Região Nordeste com maior número registrado de intoxicação por agrotóxico. No ano de 2000 foi registrado pelo SINITOX um maior número percentual de intoxicação nas áreas urbanas (79%) em relação à rural, sendo que é sabido que 85% da massa de agrotóxicos é utilizada em atividades agrícolas, dessa forma há um contraste de informações (SILVA; MEYER, 2003). Isso pode ser devido ao fato de Centros de Informação e Assistência Toxicológica (CIATs) ao SINITOX estarem presentes nas capitais, assim dificultando aos agricultores rurais atribuir informações, dessa forma é difícil acreditar que no campo exista menos intoxicação do que nas cidades (PERES; MOREIRA, 2003). O conhecimento do tipo de agrotóxico responsável pela causa de uma intoxicação específica de um indivíduo auxilia na escolha do tratamento adequado (BARBOSA, 2004).

O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimento (PARA) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) foi criado em 2001 com o objetivo de avaliar a qualidade dos alimentos e implementar ações de controle de resíduos. O PARA divulgou um relatório de atividades em 05 de Dezembro de 2011, e fornece informações sobre o percentual de alguns alimentos (Tabela 1) analisados contaminados com agrotóxico (ANVISA, 2011).

Tabela 1- Número de amostras analisadas por cultura e resultados insatisfatórios em relação à quantidade de agrotóxicos não autorizados e autorizados, mas acima dos limites máximos estabelecidos

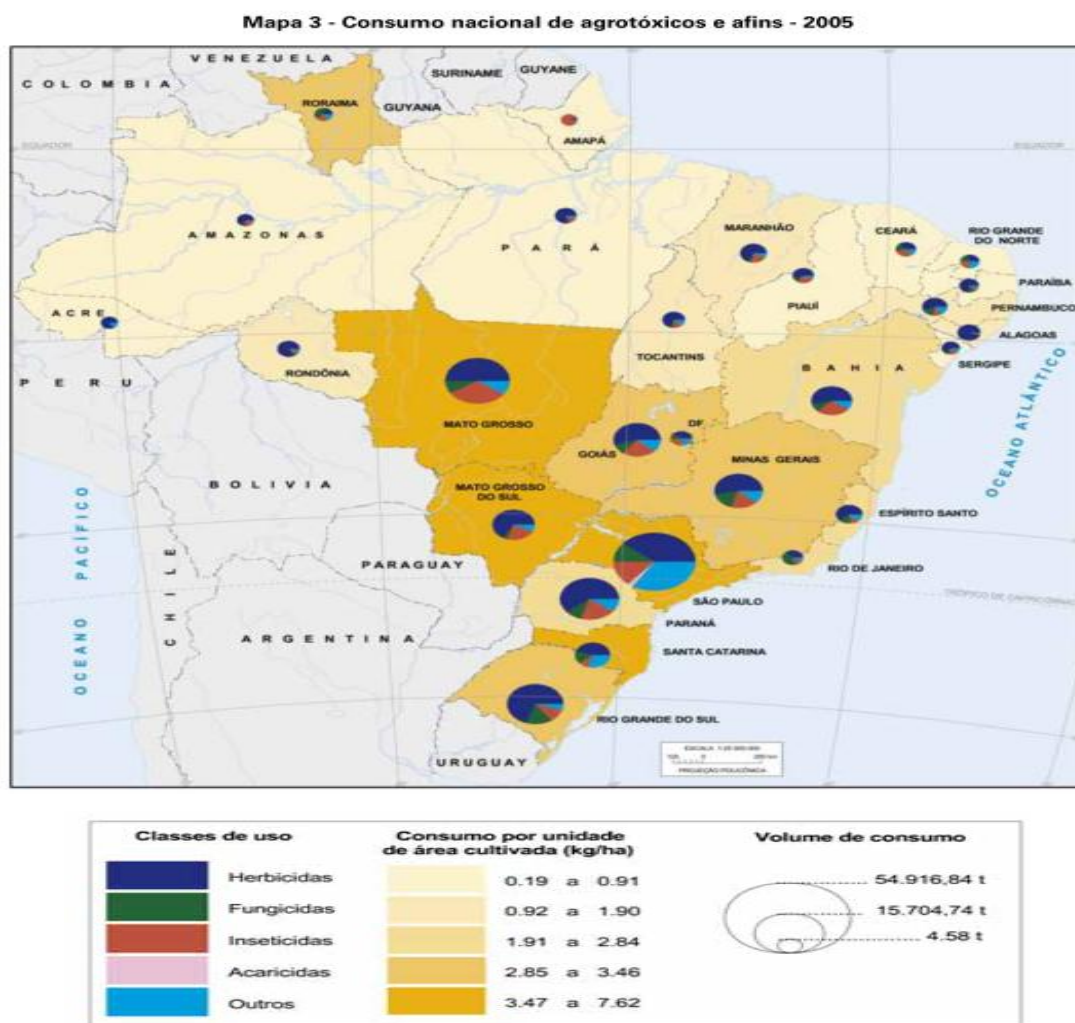
Produto	Nº de amostras Analisadas	NA (1)		> LMR (2)		>LMR e NA (3)		Total de Insatisfatórios (1+2+3)	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Abacaxi	122	20	16,4%	10	8,2%	10	8,2%	40	32,8%
Alface	131	68	51,9%	0	0,0%	3	2,3%	71	54,2%
Arroz	148	11	7,4%	0	0,0%	0	0,0%	11	7,4%
Batata	145	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Beterraba	144	44	30,6%	2	1,4%	1	0,7%	47	32,6%
Cebola	131	4	3,1%	0	0,0%	0	0,0%	4	3,1%
Cenoura	141	69	48,9%	0	0,0%	1	0,7%	70	49,6%
Couve	144	35	24,3%	4	2,8%	7	4,9%	46	31,9%
Feijão	153	8	5,2%	2	1,3%	0	0,0%	10	6,5%
Laranja	148	15	10,1%	3	2,0%	0	0,0%	18	12,2%
Maçã	146	8	5,5%	5	3,4%	0	0,0%	13	8,9%
Mamão	148	32	21,6%	10	6,8%	3	2,0%	45	30,4%
Manga	125	05	4,0%	0	0,0%	0	0,0%	5	4,0%
Morango	112	58	51,8%	3	2,7%	10	8,9%	71	63,4%
Pepino	136	76	55,9%	2	1,5%	0	0,0%	78	57,4%
Pimentão	146	124	84,9%	0	0,0%	10	6,8%	134	91,8%
Repolho	127	8	6,3%	0	0,0%	0	0,0%	08	6,3%
Tomate	141	20	14,2%	1	0,7%	2	1,4%	23	16,3%
Total	2488	605	24,3%	42	1,7%	47	1,9%	694	27,9%

(1) amostras que apresentaram somente agrotóxicos não autorizados (NA); (2) amostras somente com agrotóxico autorizados, mas acima dos limites máximos autorizados (> LMR); (3) amostras com as duas irregularidades (NA e > LMR); (1+2+3) soma de todos os tipos de irregularidades. Fonte: PARA, 2010

1.3 Herbicidas

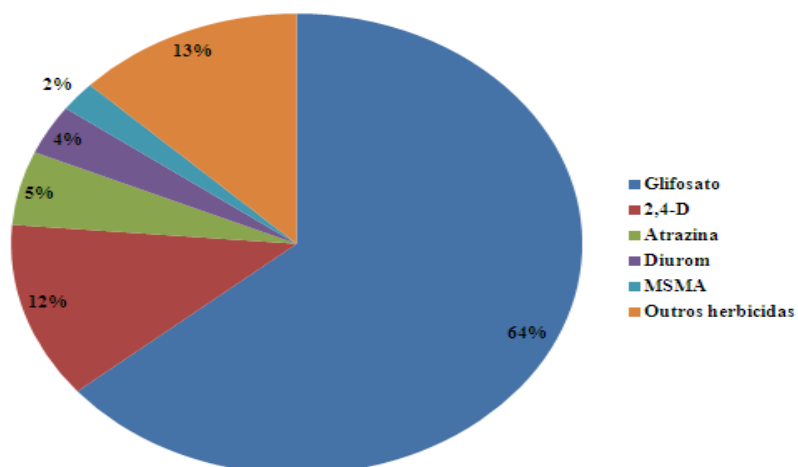
Os agrotóxicos se acumulam em solos, nas águas superficiais e subterrâneas, podendo ser persistentes, móveis e tóxicos. O uso intensivo dos agrotóxicos acomete à contaminação de alimentos, degradação ambiental e à saúde da população, esse último compromete não só aqueles que lidam com o produto, mas também aqueles que consomem os alimentos. Dentre os agrotóxicos a classe dos herbicidas (Figura 2) são os mais utilizados no nosso território nacional (acima de 50% do total), seguido dos inseticidas, fungicidas e acaricidas. Os herbicidas mais usados no Brasil são o glifosato e o ácido 2,4-diclorofexoacético, 2,4-D (IBGE, 2010). Os herbicidas têm como finalidade destruir ou impedir o crescimento de ervas daninha que causam prejuízos principalmente nas lavouras, por competir com a cultura agrícola pelos nutrientes ali presentes (LORENZI, 2000). O Gráfico 1 apresenta os ingredientes ativos mais usados no Brasil nas formulações dos herbicidas, segundo dados do IBGE (2010).

Figura 2– Mapa de consumo nacional de agrotóxicos e afins – 2005



Fonte: Adaptado de IBGE, 2010.

Gráfico 1– Distribuição percentual dos ingredientes ativos de agrotóxicos, por classes de uso - Brasil – 2005



Fonte: Adaptado de IBGE, 2010.

Para selecionar um herbicida adequado é necessário levar em conta o tipo da cultura desejada para o plantio, as características do clima e do solo. Também é de grande importância saber o efeito residual causado pela utilização do herbicida escolhido, sua eficiência sobre as plantas daninhas locais e quais culturas estão próximas da área de aplicação. Os fatores físico-químicos e dose dependente são muito importantes para a eficácia do herbicida. (VARGAS; ROMAN, 2003).

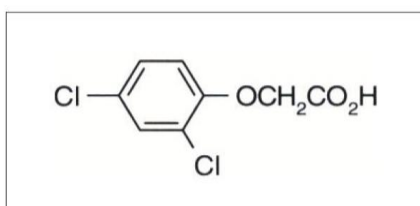
O herbicida pode causar vários processos metabólicos na planta sendo que a primeira reação bioquímica é relacionada ao modo de ação dos herbicidas, ou seja, corresponde ao primeiro evento metabólico de atuação do mesmo na planta infestante presente na cultura (OLIVEIRA JR, 2001).

Os herbicidas são classificados de forma geral em relação à forma de aplicação no solo e nas folhas. Os herbicidas aplicados nas folhas podem ser de duas categorias: de contato e sistêmicos. O primeiro desempenha seu efeito apenas no local em que entrou em contato com a planta, já o segundo é absorvido e transportado para o interior da planta direcionando-se aos locais de atuação (GWYNNE; MURRAY, 1985). Os herbicidas são uma importante classe de pesticidas, dos quais se destaca o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), devido à sua ampla utilização em todo o mundo (AMARANTE JÚNIOR *et al.*, 2003).

1.4 Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 2,4-D (Figura 3), foi produzido durante a II Guerra Mundial (1939 – 1945) para expandir a produção agrícola daquela época por uma equipe britânica na *Rothamsted Experimental Station* (FEDERATION OF AMERICAN SCIENTISTS, 2006). Em 1946 o 2,4-D passou a ser comercializado tornando um herbicida seletivo mais extensamente utilizado no mundo. É um dos herbicidas mais comuns e antigos, e verificou-se que ele era capaz de afetar o crescimento das plantas de um modo semelhante aos reguladores de crescimento naturais (CASTRO, 2010). Depois da década de 40 vários grupos de pesquisadores continuaram a pesquisar o produto classificando-o como herbicida.

Figura 3- Fórmula estrutural do ácido 2,4-diclorofenoxiacético.



Fonte: ANVISA

Além de herbicida o 2,4-D foi usado com outro propósito durante a Guerra do Vietnã, para fins militares, onde ele juntamente com o ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético e o pentaclorofenol deram origem a arma química conhecida como Agente Laranja. O Agente Laranja era usado como desfolhante pela força aérea norte-americana sob as florestas vietnamitas (FRUMKIN, 2003). Depois de ter sido usado na Guerra do Vietnã como arma química passou a ser usado na agricultura para aumentar a produção agrícola a baixo custo de mão de obra, pois ao ser utilizado pelo homem para a capina mecânica era usado esse herbicida com esse propósito (PRADO; VIEIRA, 1998; FARIA, 2004).

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um herbicida hormonal sistêmico do grupo químico dos clorofenoxiacéticos ou fenoxiacéticos, apresenta solubilidade em água de 600 ppm a 25 °C e densidade de 1,42 g/cm³ (RODRIGUES; ALMEIDA, 1998; KAMRIN, 1999). É o segundo composto mais usado como princípio ativo de muitas formulações de herbicidas. O 2,4-D normalmente é usado para deter ervas daninha de folhas largas, como dicotiledôneas, na cultura de soja, milho, trigo, cana-de-açúcar, aveia, café, centeio, cevada e arroz, dessa forma, não afeta as monocotiledôneas. Ele também tendo sido usado para deter ervas daninhas presentes em acostamentos, ferrovias e sob linha de transmissão de energia (ANDREI, 1985; HATZIOS; HOAGLAND, 1998).

O 2,4-D é uma auxina que tem ação sistêmica no vegetal, uma vez absorvido pela planta provoca o crescimento desordenado das células afetando a divisão celular e impedindo assim o desenvolvimento de raiz, frutos e folhas (WOODWARD; BARTEL, 2005).

Na atualidade o 2,4-D e outros componentes do grupo químico dos fenoxiacéticos estão sendo utilizados como ferramenta básica na agricultura moderna, principalmente pelo seu baixo custo e fácil aplicação. Apesar deste uso constante ainda são muitas as lacunas de informações relativas à saúde humana e ao meio ambiente. Em função do uso intensivo de produtos químicos na agricultura e na formação de grandes quantidades de resíduos, nos

últimos anos têm havido uma preocupação maior em conhecer o comportamento e o destino dos pesticidas, nos diversos ecossistemas (ARAÚJO, 2002).

Segundo Almeida e Rodrigues (1988), o 2,4-D apresenta três vias de absorção, sendo elas: oral, dérmica e respiratória. Uma vez absorvido provoca danos ao fígado, coração, baço, rim, pulmão e ao sistema nervoso central, podendo ocasionar também câncer (VIEIRA, 1999), dessa forma é potencialmente tóxico ao ser humano. Pesquisa realizada com pessoas que trabalhavam na produção e formulação do 2,4-D mostrou que esse composto foi acumulado na urina e secretado, mesmo depois do indivíduo apresentar semanas sem contato com o herbicida (KNOPP, 1994).

Há vários relatos e estudos que mostram o solo como reservatório final dos herbicidas, sendo o meio pelo qual os herbicidas podem ser liberados para atmosfera, lençóis freáticos e organismos vivos. Dentro desse contexto, a degradação do 2,4-D pode ser feita de várias formas uma delas é através de microrganismos (AMARANTE JÚNIOR *et al.*, 2003).

O 2,4-D é degradado por vários microrganismos através de uma série de biotransformações incluindo: β -oxidação, rompimento da ligação éter, degradação da cadeia lateral e hidroxilação do anel aromático. Esses processos resultam na produção de vários metabólitos como 2,4-diclorofenol, 4-clorocatecol e clorohidroquinona (MENZIE, 1969; BARBERÁ, 1976; PAUL; CLARK, 1989).

1.5 Biorremediação

Biorremediação é a utilização tecnológica de processo ou atividade biológica para transformar poluentes em substâncias menos tóxicas geralmente H_2O e CO_2 como produto final, quando tais agentes de poluição são metabolizados e utilizados como fonte de carbono e energia (MUSUMECI, 1992; HOLLINGER *et al.*, 1997). A transformação biótica de poluentes químicos tem sido utilizada por muitos países há vários anos e, é alvo de estudos visando o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para remediar áreas contaminadas. Esse processo é mais barato e apresenta maior eficácia na redução e/ou degradação de xenobióticos recalcitrantes em relação a outras estratégias físico-químicas, uma vez que estas apresentam baixa adequação (BAMFORTH; SINGLETON, 2005; JAIN *et al.*, 2005). A biorremediação é uma alternativa que tem despertado atração não apenas pelo baixo custo, mas também por possibilitar a descontaminação completa do poluente (MACHADO, 1998).

Há duas estratégias para o processo de biorremediação de xenobióticos em uma área, podem ser *in situ/on site* ou *ex situ/off site*. A primeira corresponde a remediação diretamente no local contaminado, deve se escolher essa estratégia quando a poluição já tem atingido o nível freático e a segunda, é necessária que seja removida à porção poluída para ser tratada em locais apropriados, usada quando a contaminação ainda localiza-se apenas na parte superficial do solo. Para a escolha da estratégia a ser utilizada, deve-se levar em consideração um conjunto de informações sobre o ambiente contaminado como o tipo da microbiota existente, qual poluente ali está inserido, bem como a sua concentração e extensão de contaminação (BOOPATHY, 2000; RAMSAY *et al.*, 2000; UNITED STATES, 2001).

A biodegradação de compostos orgânicos por populações naturais de microrganismos representa um dos mecanismos primários pela qual, compostos poluentes são eliminados do meio ambiente, pois os microrganismos autóctones são capazes de sobreviver, crescer e metabolizar em seu habitat e competir com outros membros da comunidade. Embora outras tecnologias que usam processos químicos ou físicos também sejam recomendadas para descontaminar ambientes poluídos, o processo biológico é uma alternativa mais eficaz e ecologicamente mais adequada. Esses processos utilizam geralmente microrganismos com capacidade de degradar esses compostos usando-os como fonte de carbono e energia (GAYLARD, *et al.*, 2005).

Inúmeros são os relatos sobre a utilização de processos biológicos para a descontaminação. Esse processo surgiu durante as primeiras civilizações, porém o termo biorremediação passou a ser usado nas últimas décadas com o desenvolvimento de técnicas biotecnológicas. Dessa forma, qualquer remoção ou degradação de um poluente através de organismos dá-se o nome de biorremediação (LITCHFIELD, 2005).

A metabolização dos poluentes pode ocorrer ao nível de apenas uma espécie ou através da formação de consórcios. Os consórcios são formados por microrganismos de diferentes espécies e são consequência do maior grau de complexidade dos processos metabólicos necessários à degradação do agrotóxico. Cada indivíduo possui uma função especializada, podendo ocorrer em primeiro momento à metabolização do composto por um gênero e em um segundo momento a metabolização do produto do primeiro por um segundo gênero. Além disso, o consórcio oferece uma maior resistência as variações de pH, temperatura, entre outros benefícios. Isso pode ser exemplificado na degradação dos variados componentes tóxicos da gasolina, onde a degradação benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX), substâncias que podem contaminar o solo e a água, assim causando danos ao meio ambiente, são metabolizados pelo consórcio dos seguintes gêneros: *Pseudomonas*, *Shewanella*,

Burkholderia, *Alcanivorax*, *Rhodococcus* e *Bacillus*. A formação desse consórcio permite a degradação de até 95% do total de BTEX (MORLETT-CHÁVEZ *et al.*, 2010).

A biomassa microbiana participa na degradação do 2,4-D no ambiente. Uma biota diversificada pode aumentar o potencial de remediação ou degradação do herbicida, pois apresenta naquele ambiente maior variedade de enzimas envolvidas na biorremediação (VEEH *et al.*, 1996). A biomineralização foi sugerida como rota principal de descontaminação ambiental de fenoxiacético (BENOIT *et al.*, 1999). O sucesso no desenvolvimento e utilização destas ferramentas biotecnológicas dependerá, em parte, da caracterização da diversidade natural e do desenvolvimento de ferramentas para a manipulação desta diversidade.

1.6 Microrganismos na biorremediação

A diversidade microbiana está presente em vários tipos de ambientes, desempenhando funções de fundamental importância para a natureza e constitui o mais extraordinário reservatório da vida na biosfera. Dois aspectos são importantes nessa diversidade, a quantidade de diferentes organismos e sua relativa distribuição homogênea (HUSTON, 1994). Ao longo da evolução, essas espécies tem se adaptado a ambientes extremamente diversos como no ar, água superficial, subterrânea e salina, solo, e em simbiose com outros organismos, com isso desenvolve diferentes vias metabólicas para que seja possível sua adaptação numa variedade de lugares. Essas vias metabólicas têm sido tradicionalmente exploradas pelo homem, como a fermentação, produção de antibióticos, vitaminas, enzimas e dentre outros. Mais recentemente, esse inexplorado reservatório de biotecnologias tem sido utilizado com outros propósitos, como o monitoramento dos níveis de poluição e a biodegradação de poluentes xenobióticos (HUSTON, 1994; JAIN *et al.*, 2005), fato decorrente da observação de que alguns microrganismos eram capazes de sobreviver a ambientes quimicamente contaminados, e que surpreendentemente utilizam alguns dos componentes tóxicos presentes no substrato como fonte de energia e carbono.

O conhecimento a cerca da diversidade microbiana bem como suas vias metabólicas de degradação de poluentes torna-se importante para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas, nas quais os microrganismos sejam manipulados com o propósito para a descontaminação de ambientes poluídos (MACRAE, 2000).

Em 2003 e 2008 Coenye e Vandamme (2003) e Qingyan e colaboradores (2008) relataram que dentre as bactérias que mais se destacam em metabolizarem poluentes químicos estão as dos gêneros: *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Arthrobacter* e *Burkholderia*. Dentre esses microrganismos, destacam-se algumas espécies do táxon genérico *Burkholderia*, capazes de usar novos genes para produção de enzimas catabólicas específicas que metabolizam substratos aromáticos clorados, utilizando esses componentes como fonte de carbono e energia (DAUBARAS *et al.*, 1996; O’SULLIVAN; MAHENTHIRALINGAM, 2005; MACUR *et al.*, 2007).

1.6.1 Gênero *Burkholderia*: descrição e biorremediação

Com base na sequência do gene rRNA 16S, homologia DNA-DNA, composição do lipídio e ácido graxo celular e características fenotípicas em 1992, o gênero *Burkholderia* foi proposto por Yabuuchi e colaboradores (1992). Esses autores sugeriram que sete espécies (Tabela 2) pertencentes ao grupo II do gênero das *Pseudomonas* fossem transferidas para o novo gênero *Burkholderia*. As *Burkholderias* são compostas por microrganismos aeróbios, gram-negativos, em forma de bastonete reto, não formam esporos, diazotróficos, oxidase e catalase positivos, pertencentes ao grupo das proteobactérias subclasse beta (β), são móveis apresentando um único flagelo polar (monótrico) ou um tufo de flagelos (lofótricos), mesófilos, extremamente versáteis, há espécies que podem formar biofilmes e o polihidroxibutirato é sua substância de reserva.

Tabela 2 - Relação das sete bactérias transferidas, sugeridas por Yabuuchi e colaboradores (1992), para o gênero *Burkholderia* antes pertencente ao gênero *Pseudomonas*

Espécies
<i>Burkholderia cepacia</i> *
<i>Burkholderia mallei</i>
<i>Burkholderia pseudomallei</i>
<i>Burkholderia caryophylli</i>
<i>Burkholderia gladioli</i>
<i>Burkholderia pickettii</i>
<i>Burkholderia solanacearum</i>

*Espécie típica do gênero

A lista do gênero *Burkholderia* desde 1992 tem sido frequentemente modificada, algumas espécies foram removidas e outras adicionadas (GILLIS *et al.*, 1995; YABUUCHI *et al.*, 1995; VIALARD *et al.*, 1998).

O gênero *Burkholderia* compreende mais de trinta espécies, ocupa uma diversidade de nichos ecológicos, como águas (incluindo ambientes marinhos), associação com fungos, solos contaminados, trato respiratório dos seres humanos, rizosfera de plantas e ambientes hospitalares. As *Burkholderias* têm sido utilizadas com vários propósitos biotecnológicos pela comunidade científica incluindo o controle biológico de patógenos de plantas, biorremediação de xenobióticos recalcitrantes e promotoras do crescimento de plantas (COENYE *et al.*, 2001; PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001; COENYE; VANDAMME, 2003).

Através de estudos de taxonomia verificou que a *Burkholderia cepacea* não era apenas uma espécie, mas sim um grupo de espécies similares fenotipicamente. Dessa forma foi proposto o termo “complexo *Burkholderia cepacea*” para agrupar todos os membros dessas espécies filogeneticamente associadas, cada membro foi denominado genomovares (COENYE *et al.*, 1999; VANDAMME *et al.*, 2002; COENYE; VANDAMME, 2003).

Vários membros do gênero *Burkholderia* têm sido usados para a biodegradação de compostos xenobióticos recalcitrantes, Tabela 3 a seguir (O’SULLIVAN; MAHENTHIRALINGAM, 2005).

Tabela 3 - Poluentes conhecidos por serem degradados por espécies de *Burkholderia*. (Continua)

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

Tabela 3- Poluentes conhecidos por ser degradado espécies de *Burkholderia* (Continuação)

<i>Burkholderia</i>	Poluentes degradáveis
<i>Burkholderia sp. strain 8</i>	Benzoato, 4-fluorobenzoato, 4-hidroxibenzoato
<i>Burkholderia sp. strain KZ2</i>	2-Clorobenzoato, 4-clorobenzoato, 2,4-diclorobenzoato
<i>Burkholderia sp. strain NF100</i>	Fenitrotona

¹TCE: tricloroetileno; ²PCBs: bifenilos policlorados; ³2,4,5-T: 2,4,5-triclorofenoxiacético; ⁴PAHs: Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos; ⁵2,4-D: 2,4-diclorofenoxiacético.

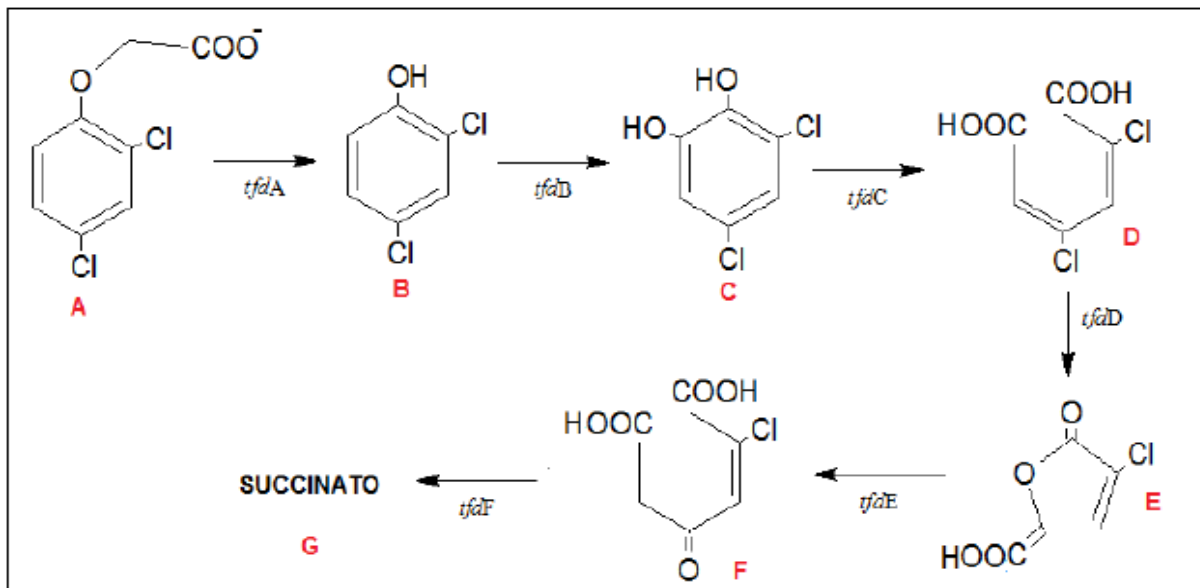
As informações relativas das cepas de *Burkholderia* pode ser obtida a partir do banco de dados: Biodegradative Strain Database (<http://bsd.cme.msu.edu/bsd/index.html>). Fonte: modificada a partir de O'SULLIVAN; MAHENTHIRALINGAM, 2005)

Vários relatos podem ser encontrados de bactérias do gênero *Burkholderia* na bioremediação, como na degradação de constituintes do óleo cru, incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos - PHA, herbicidas - incluindo ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 2,4,5-T, TCE e outros derivados como a gasolina aditivada (KILBANE *et al.*, 1982; FOLSOM *et al.*, 1990; KRUMME *et al.*, 1993; BHAT *et al.*, 1994; COENYE; VANDAMME, 2003).

As vias metabólicas envolvidas na degradação 2,4-D são encontradas em α , β e γ -Proteobactéria e são localizadas em plasmídios metabólicos e/ou dentro de cromossomos (RICE *et al.*, 2005). Em 2005, Rice e colaboradores (2005) identificaram algumas espécies de *Burkholderia* usando *primers* específicos para a amplificação de genes *tfdA*, *B*, *C*, *E* e *tftA*, *C*, *E* similares para aqueles previamente caracterizado para degradação de 2,4-D por *Wautersia eutropha* JMP134 (HARKER *et al.*, 1989) e 2,4,5-T por *Burkholderia cepacia* AC1100 e *Nocardiodes simplex* 3E (KILBANE *et al.*, 1982; GOLOVLEVA *et al.*, 1990; DAUBARAS *et al.*, 1996).

O 2,4-D tem sido o herbicida mais estudado para a compreensão do processo de degradação de clorofenoxiacético por microrganismos (HOFFMANN *et al.*, 2003). A rota do mecanismo de degradação deste herbicida completamente caracterizada é a via dos genes *tfdABCDEF* (Figura 4). Os genes *tfdA*, *tfdB*, *tfdC*, *tfdD*, *tfdE* e *tfdF* codificam, respectivamente as enzimas α -cetoglutarato dioxigenase, 2,4-diclorofenol hidroxilase, clorocatecol 1,2-dioxigenase, cloromuconato cicloisomerase, dienalactona hidrolase e maleilacetato redutase envolvidas no processo de biodegradação desse poluente (FUKUMORI; HAUSINGER, 1993).

Figura 4 – Via de degradação do 2,4-D por *Alcaligenes eutrophus* JMP134.



As letras em vermelho correspondem ao composto químico de cada etapa de transformação. A: 2,4-diclorofenoxiacetato; B: 2,4-diclorofenol; C: 3,5-diclorocatecol; D: 2,4-diclorocis, cis-muconato; E: cis-2-clorodieno lactona; F: 2-cloromaleilacetato; G: succinato. Fonte: Guedes, 2010.

1.7 Mecanismos moleculares para avaliação do potencial microbiano na biorremediação

A compreensão dos mecanismos moleculares dos processos de biorremediação de xenobióticos recalcitrantes utilizados pelos microrganismos é de grande importância para o desenvolvimento de biotecnologias de despoluição de ambientes. Para tanto pode ser feita uma investigação á nível de genoma e de proteoma desses organismos biodegradadores, possibilitando adquirir informações sobre o repertório de genes e proteínas envolvidos nas situações metabólicas e fisiológicas em estudo (ANDERSON; SEILHAMER, 1997; DESAINT *et al.*, 2000)

A genômica, estudo do conjunto total de genes de um indivíduo, é uma prática extremamente importante, pois nos permite identificar e caracterizar os genes de uma espécie. A partir dos anos 90, com a evolução da biotecnologia, disponibilidade de sequenciadores de DNA e com a evolução da bioinformática, a taxonomia de bactérias passou por uma grande revolução. O gênero *Burkholderia* foi descrito por Yabuuchi e colaboradores (1992) pela primeira vez através da análise do sequenciamento do gene 16S rDNA.

O desenvolvimento dos métodos de sequenciamento de DNA, possibilitou o acúmulo de informações de sequências do gene 16S rDNA em bancos de dados públicos de livre acesso como por exemplo o Genbank (Centro Nacional para Informação Biotecnológica, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O gene 16S rDNA possui aproximadamente 1500 nucleotídeos (CHAGAS JUNIOR *et al.*, 2009). Todas as sequências obtidas superam esse valor, o que garante o sequenciamento completo deste gene. Isto permite que novas sequências obtidas possam ser comparadas com genes de outras linhagens microbianas. A comparação de sequências da região que codifica o gene 16S rDNA é uma forma eficiente e adequada para inferir a filogenia das bactérias do gênero *Burkholderia*, uma vez que esse gene bastante conservado entre as bactérias, mas ao mesmo tempo 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.

Análise funcional das comunidades microbianas nos diferentes níveis de transcriptomas e proteomas é atualmente utilizada para prever vias de biodegradação microbiana. Transcriptômica ou metatranscriptômica são ferramentas usadas para o estudo do perfil transcricional do mRNA das comunidades microbianas do meio ambiente (McGRATH *et al.*, 2008). Análise do transcriptoma têm permitido aos pesquisadores decifrar os perfis de expressão de mRNA de genes superexpressos ou reprimidos em microrganismos, quando expostos a poluentes antropogênicos (JENNINGS *et al.*, 2009). A técnica de PCR em Tempo Real (qRT-PCR) emergiu como uma ferramenta promissora para as estimativas rápidas, reprodutíveis e precisas da dinâmica da comunidade microbiana ou monitoramento da sua atividade catabólica durante os processos de biorremediação (NYSSONEN *et al.*, 2006). Cébron e colaboradores. (2008) desenvolveram ensaios de qRT-PCR para determinar número de cópias de um gene funcional, que codifica uma dioxigenase (PAH-RHD α) dentro das populações de bactérias capazes de degradar PAHs de metabolismo aeróbico em amostras de solos e sedimentos. Nyssonen e colaboradores (2006) validou uma técnica de PCR em tempo real sensível para a quantificação de genes de Proteobacteria envolvido da degradação de naftaleno a partir de amostra de solo. Os estudos citados demonstram que é possível monitorar a expressão genética de microrganismos crescendo na presença de contaminantes antropogênicos.

Investigações baseada na proteômica têm sido úteis para determinar mudanças na composição e abundância de proteínas, bem como na identificação de proteínas-chave envolvidas na resposta fisiológica de microrganismos, quando expostos a poluentes

antropogênicos. Análise proteômica têm permitido aos pesquisadores indentificar proteínas expressas por microrganismos que habitam locais contaminados (KIM *et al.*, 2004). Abordagens proteômicas têm avançado significativamente devido à evolução tecnológica em eletroforese bidimensional (2-DE) e espectrometria de massas, juntamente com aumento gradativo do depósito de sequência e estrutura de proteínas em bancos de dados (BENNDORF *et al.*, 2007; WILMES *et al.*, 2008). A utilização de eletroforese bidimensional (2-DE) tem auxiliado na análise global de enzimas envolvidas nas vias catabólicas microbiana na biodegradação (KIM *et al.*, 2006; WILMES *et al.*, 2008).

O surgimento de técnicas especializadas para o acompanhamento da genômica, proteômica e dentre as outras –ômicas, formando a era “ômica”, tem desenvolvido estratégias de biorremediação eficiente. A interpretação dos dados gerados por essas abordagens –ômicas ainda requer o desenvolvimento de eficientes ferramentas de estatísticas e de bioinformática. Os progressos realizados pelos recentes explorações molecular e “–ômicas “ em biodegradação e/ou biotransformação microbiana têm um enorme impacto industrial e ambiental. (DESAI *et al.*, 2010).

Desta forma, há uma necessidade óbvia de bioprospectar novas espécies capazes de biorremediar e, ainda, de caracterizar moléculas envolvidas no processo de degradação destes contaminantes. Neste aspecto, os estudos dos genes e proteínas totais nos permite comparar qualitativamente e quantitativamente o metabolismo das espécies bacterianas quando em meios livres ou poluídos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivo estudar os genes e proteínas relacionados com a biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoacético (2,4-D) numa coleção de beta-rizóbios do gênero *Burkholderia*, isolados, na maioria, de leguminosas do gênero *Mimosa*, visando determinar o potencial biotecnológico na biodegradação desse herbicida recalcitrante.

2.2 Objetivos específicos

- Fazer análise filogenética de novas estirpes de rizóbio, isoladas de leguminosas do gênero *Mimosa*, por meio da sequência do gene 16S rRNA;
- Determinar a curva de crescimento de acordo com a densidade óptica das culturas de *Burkholderia* spp.;
- Extrair DNA genômico e RNA total de boa qualidade;
- Prospectar em beta-proteobactérias do gênero *Burkholderia*, genes que codificam enzimas oxigenases e dioxigenases, de interesse para a biorremediação;
- Avaliar a possível relação desses genes expressos com a capacidade das bactérias metabolizarem poluentes descritos na literatura;
- Identificar qualitativamente e quantitativamente proteínas intracelulares diferencialmente expressas em *Burkholderia* spp. na presença do ácido 2,4-diclorofenoacético (2,4-D).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Bactérias e condições de cultivo

A estirpe utilizada nesse trabalho foi previamente identificada como *Burkholderia* e é oriunda da coleção de β -rizóbios isolados de leguminosa do gênero *Mimosa* (*Fabaceae* e *Mimosoideae*) do Dr. Sérgio Miana Faria, pesquisador da Embrapa Agrobiologia (Rio de Janeiro, Brasil). O isolado de *Burkholderia* foi recuperado de ampolas contendo estas células estocadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e crescidos em meio TY (Tryptone-Yeast Medium) líquido (DÖBEREINER *et al.*, 1999) na temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 250 rpm por 48 horas.

3.2 Microscopia e coloração de Gram

Ao fim de cada crescimento bacteriano era feito a coloração de Gram para observação microscópica das células com o objetivo de identificação do tipo de parede e morfologia celular para ver se a cultura estava pura, ou seja, havia apenas as bactérias em forma de bastões Gram negativas. Para tanto uma alíquota da cultura crescida era tratada sucessivamente com cristal violeta, lugol, álcool-acetona e fuccina. O cristal violeta e o lugol formam um complexo denominado iodopararosanilina, o qual confere coloração roxa tanto pelas bactérias Gram-positivas, quanto as Gram-negativas. Com a adição de álcool-acetona, as bactérias Gram-negativas liberam o complexo formado, pois a camada de peptidoglicano é de pequena espessura, enquanto que as Gram-positivas retêm o complexo, permanecendo roxas. A adição de fuccina não altera a cor das Gram-positivas, mas conferem à cor avermelhada as bactérias Gram-negativas, que foram descoloridas pelo álcool-acetona (FREITAS; PICOLI, 2007).

3.3 Extração de ácido deoxirribonucléico (DNA) total

Foi realizada extração de DNA de acordo com Menna e colaboradores (2006) com algumas modificações e posterior amplificação do 16S rDNA visando o sequenciamento do gene do RNA ribossômico para a identificação da *Burkholderia*. A bactéria foi cultivada em meio TY, com incubação a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Da suspensão bacteriana, 2 mL foram recolhidos em tubos e centrifugada a $6000 \times g$ por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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 as amostras incubadas a 60 °C por 1 hora. Foram adicionados 60 µL de SDS (10%), seguido de incubação a 60 °C por 30 minutos. Foram acrescentados e misturados, por inversão dos tubos, 1 volume de clorofórmio:álcool isoamil (24:1), seguido por uma centrifugação por 15 minutos a 2500 x g a 4 °C. A fase aquosa de cada amostra foi coletada para novos tubos com adição de 700 mM de NaCl e incubação a 40 °C por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas 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, incubadas 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 1 mL 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 das amostras foram estimadas por espectrofotometria, com leituras das absorbâncias a 260 nm e 280 nm (GenQuant, GE Healthcare).

A qualidade das amostras foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. As amostras foram preservadas em freezer a -20 °C para as reações de amplificação do gene do rRNA 16S e aqueles genes envolvidos na biorremediação.

3.4 Eletroforese em gel de agarose

As eletroforeses em gel de agarose foram realizadas de acordo com Sambrook e colaboradores (1989). Para a eletroforese de DNA utilizou 0,4 g de agarose diluída em 50 mL de tampão TBE (Tris-Ácido Bórico 0,045 M, EDTA 0,001 M), dessa forma o gel correspondia a 0,8% em relação a quantidade de agarose presente no mesmo e pH de 8,0. Essa mistura após ser completamente fundida foi resfriada a uma temperatura ideal e adicionada 1,25 µL de brometo de etídio a partir de solução estoque de 10 mg/mL. Em seguida o gel permaneceu em repouso em uma cuba apropriada até sua completa solidificação e transferido para outra cuba *Hoefler HE* (mini horizontal submarine unit) *Amersham Biosciences*TM contendo TBE. Uma alíquota de 6 µL da amostra a ser submetida a eletroforese horizontal foi homogeneizada em 2 µL de Tampão da Amostra – TA (azul de bromofenol 25% [m/v], glicerol 30% [v/v], preparado em TE). A mistura da amostra com TA foi aplicada ao gel solidificado de agarose e a corrida eletroforética foi realizada com voltagem de 100 V e miliamperagem de 200 mA por 30 minutos, momento em que o azul de bromofenol tinha percorrido ¼ do gel. Após a corrida eletroforética a presença das bandas foi observada pela fluorescência do brometo de etídio

ligado aos nucleotídeos sobre luz ultravioleta. A eletroforese de RNA Total e dos produtos de amplificação de PCR foi realizada da mesma forma mudando apenas a concentração de agarose que ao invés de ser 0,8% usou 1,2%.

3.5 Teste de *primers* para biorremediação

3.5.1 Construção de *primers*

Os *primers* (Integrated DNA Technologies - IDT) foram desenhados com base em dados obtidos na literatura e do *GenBank* e submetidos à análise através do programa *PrimerBlast* (NCBI). Os genes utilizados no presente trabalho foram correspondentes à família do *tft* e *tfd*, para a biorremediação (KILBANE *et al.*, 1982; HARKER *et al.*, 1989; GOLOVLEVA *et al.*, 1990; DAUBARAS *et al.*, 1996).

3.5.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para verificar a eficiência de amplificação dos *primers* desenhados para PCR e qRT-PCR e verificar se no genoma de DNA extraído em estoque da coleção de β -rizóbios havia gene envolvido na biorremediação antes descrito na literatura foi realizada PCR usando tais *primers* e DNA Total em estoque. A amplificação foi realizada em 46 ciclos usando o termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf), sendo cada ciclo consistindo de: 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 genes amplificados foram confirmados em gel de agarose 1,2%. A concentração das amostras do produto de PCR foi estimada por espectrofotometria, com leituras das absorbâncias a 260 nm e 280 nm (GenQuant, GE Healthcare). A *Burkholderia* que apresentou melhor padrão de banda na eletroforese foi escolhida para o estudo com biorremediação, bem como o *primer* correspondente.

3.6 Sequenciamento do gene 16S rRNA

3.6.1 Amplificação do gene rRNA 16S

A estirpe *Burkholderia sp.* escolhida por apresentar em seu genoma genes envolvidos na biorremediação foi identificada por meio do sequenciamento e análise do gene 16S rRNA empregando os *primers* universais (Tabela 4) rD1 e fD1 (WEISBURG *et al.*, 1991). Para a reação de PCR foi utilizado uma solução com volume final de 40 μ L; 150 ng de DNA genômico; 1,5 mM de MgCl₂; 200 mM de DNTP; 5 mM de cada *primer*; 1U de Taq DNA polimerase e tampão de reação da Taq DNA polimerase (Invitrogen). A amplificação foi realizada em 42 ciclos, 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 por 8 minutos.

3.6.2 Reação de sequenciamento

A determinação da sequência de nucleotídeos dos fragmentos amplificados foi realizada em analisador genético MegaBace 750 (GE Healthcare) empregando o kit Dyanamic ET terminator sequencing premix. Para a reação de sequenciamento além dos *primers* fD1 e rD1, foram empregados os seguintes primers intragênicos (Tabela 4): 362f, 786f e 1203f e Y2 (MENNA *et al.*, 2006).

Após a reação, os fragmentos foram precipitados pela adição de 7,5 M acetato de amônio e etanol 100%, lavados com etanol 70% e então ressuspensos em tampão (formamida 70%; 1 mM de EDTA). A corrida eletroforética de sequenciamento foi realizada a 9 kv.

Tabela 4 - Primers utilizados para Sequenciamento do gene 16S rRNA

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
<i>rD1</i>	5'- CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GC-3'
<i>fD1</i>	5'-CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3'
<i>362f</i>	5'-CTC CTA CGG GAG GCA GCA GTG GGG-3'
<i>786f</i>	5'-CGA AAG CGT GGG GAG CAA ACA GG-3'
<i>1203f</i>	5'-GAG GTG GGG ATG ACG TCA AGT CCT C-3'
<i>Y2</i>	5'- CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT - 3'

A: Adenina; C: Citosina; G: Guanina; T: Timina.

3.6.3 *Análise de sequência de nucleotídeos*

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

A sequência foi editada para exclusão de bases com qualidade inferior a 20 (1 erro a cada 100 bases lidas), para assegurar uma maior confiabilidade nos resultados posteriores.

3.6.4 *Análise de filogenia molecular*

A sequência consenso foi comparada com outras sequências de 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 (ALTSCHUL *et al.*, 1997) realiza alinhamentos entre as sequências submetidas (query) e as sequências depositadas no *GenBank*.

3.6.5 *Reconstrução de dendograma*

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 empregando 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 três 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) foram utilizadas como *outgroup* (VANDAMME *et al.*, 2007; AIZAWA *et al.*, 2011), ou seja, referência como estirpe distante geneticamente da estirpe em estudo.

3.7 Curva de crescimento

O crescimento bacteriano em sistema fechado possui uma curva bastante característica, que compreende 4 fases: *lag*, *log*, estacionária e declínio. A extração de proteínas e RNAs é crucial para abordagens proteômicas e de expressão gênica. A determinação da curva de crescimento é importante, uma vez que a fase *log* é ideal para obter estas biomoléculas com qualidade e quantidade satisfatória, em decorrência da atividade metabólica associada ao aumento bacteriano (LIU *et al.*, 2011).

A partir de um isolado de *Burkholderia sp.* SMF 07, que apresentou melhor padrão de bandas no teste de *primers* para biorremediação, foi feito pré-inóculo com 15 mL de meio TY e estocado a 28 °C por 24 horas. Após o crescimento, a cultura de *Burkholderia* foi verificada pela coloração de Gram (FREITAS; PICOLI, 2007). Em seguida, 1,25 mL do pré-inóculo foi utilizado em dois meios de cultivo de 250 mL: TY, controle, e TY suplementado com 1 mg/mL de 2,4-D, tratamento. As culturas foram cultivadas a 28 °C sob agitação de 250 rpm. Após a inoculação o crescimento bacteriano foi monitorado a cada hora pela Densidade Óptica de 600 nm (O.D_{600nm}) através de espectrofotômetro (GenQuant, Ge Healthcare) até o estabelecimento da fase estacionária. Em seguida a presença de *Burkholderia* foi verificada em todas as culturas pela coloração de Gram. O crescimento bacteriano foi realizado em triplicata. A análise estatística foi desenvolvida no programa *Statística 6 Workbook* usando o *Mann-Whitney* considerando $p < 0,05$ e a construção da curva de crescimento foi feita a partir do *GraphPad Prism 3.0*.

3.8 Condição de stress

3.8.1 Para extração de proteínas intracelulares

O isolado de β -rizóbio, *Burkholderia sp.* SMF 07, que apresentou melhor padrão de bandas para os genes envolvidos na biorremediação por PCR foi selecionado para o crescimento em contato com poluente, a fim de extrair proteínas intracelulares. A cepa de

Burkholderia foi crescida *overnight* em 5 mL de meio TY à temperatura de 28 °C e sob agitação orbital de 250 rpm. Em seguida, o pré-inóculo foi utilizado em 1 L de TY. A indução da expressão de proteínas foi realizada através da adição de 1 mg/mL de 2,4-D, como descrito por Rice e colaboradores (2005). Usando sempre um controle para cada meio com o poluente (tratamento) que constava apenas de meio TY e o isolado característico para que pudessem ser comparadas as expressões do genoma funcional de cada condição envolvida no estudo. O crescimento bacteriano foi monitorado através da O.D_{600nm} e quando os crescimentos bacterianos estavam na fase *log* o crescimento bacteriano foi fracionado em tubo falcon de 50 mL e centrifugados por 10000 rpm a 4 °C por 30 minutos, para obtenção do sobrenadante e do sedimento, sendo o primeiro descartado, e o último para a extração das proteínas intracelulares. Uma vez que nesse período as células bacterianas estão em constante divisão celular, logo, com maior produto metabólico. Para ter certeza que o cultivo não estava contaminado por outros tipos de bactérias sempre era feito o teste de Gram após cada crescimento. O crescimento foi feito pelo menos três vezes para que pudesse ter confiabilidade nos resultados.

3.8.2 Para extração de ácido ribonucléico (RNA) total

O mesmo isolado de β -rizóbio *Burkholderia sp.* SMF 07 utilizado no item 3.8.1. foi selecionado para o crescimento em contato com 2,4-D, afim de extrair RNA total. A cepa de *Burkholderia* foi crescida *overnight* em 15 mL de meio TY à temperatura de 28 °C e sob agitação orbital de 250 rpm. Em seguida, alíquotas 1,25 mL do pré-inóculo foi distribuída em seis erlenmeyer com 250 mL de TY. Os crescimentos bacterianos foram monitorados através da O.D_{600nm} e quando os crescimentos bacterianos atingiram a absorbância de 0,2 foi feito indução da expressão dos genes através da adição de 2,4-D, na mesma proporção mencionada no item 3.8.1., em três dos erlenmeyer e os outros que não foram adicionados a dioxina serviram como controle do experimento. Cada crescimento bacteriano era monitorado tanto pela absorbância e pela coloração de Gram, para ver o momento que a bactéria chegava à fase estacionária e construir a curva de crescimento bacteriana (estatística usada igual no item 3.7.) e para ter certeza que o cultivo não estava contaminado por outros tipos de bactérias, respectivamente. Após a adição do 2,4-D foi retirada alíquotas em tempos diferentes (15 minutos, 1, 2, 3 e 5 horas após a adição do herbicida), tanto do tratamento como do controle. As alíquotas foram estocadas em TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) e freezer a -80 °C, para posterior extração de RNA Total.

3.9 Extração de proteínas intracelulares

A extração das proteínas intracelulares foi feita de acordo com Riedel e colaboradores (2006) com algumas modificações. A partir do sedimento de crescimento bacteriano como descrito do item 3.8.1. foi feita a extração de proteínas. Dessa forma o sedimento foi lavado duas vezes com 10 mL de Tris/HCl 50 mM, pH 7,5. Após as lavagens foi adicionado 10 mL de Tris/HCl 50 mM, pH 7,5 acrescido de 40 µL do Inibidor de Protease (Protease Inibidor Mix(GE Healtcari™)). As células foram lisadas por sonicação (10 pulsos de 20 segundos com intervalo de 1 minuto entre cada pulso – com 50% de potência). Após sonicadas as células foram centrifugadas a 12000 rpm por 1 hora e 30 minutos a 4 °C para remoção dos *debris*. O sobrenadante foi colhido e a ele 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 sedimento lavado duas vezes com acetona gelada 100%. Após as lavagens o sedimento final foi seco a temperatura ambiente e ressuspenso em uréia 7 M/tiouréia 2 M.

3.10 Quantificação de proteínas

3.10.1 Método de Bradford

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.

3.10.2 SDS-PAGE

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.

3.11 Eletroforese bidimensional

3.11.1 Reidratação das strips

Para dar início à reidratação foi preparado um *pool* de amostra dos três crescimentos bacterianos feito na presença e ausência de 2,4-D que consistia da junção de alíquotas das proteínas extraídas de cada condição de crescimento, onde no final o *pool* de cada amostra tanto do controle como o tratamento apresentava concentração final de 250 µg/µL.

Ao tampão de reidratação (uréia 7 M/tiouuréia 2 M; 1% CHAPS; 1% DTT; 0,5% [v/v], anfólitos [pH de 4-7] e azul de bromofenol) foi adicionado 250 µg de proteína de cada *pool* de amostra em um volume final de 250 µL e homogeneizado. Cada mistura de tampão com proteína foi então transferida para um *slop* do IPG Box ou Immobiline DryStrip Reswelling Tray, devidamente nivelado, em seguida foi adicionado em cada *slop* com a mistura as *strips* de gradiente de pH imobilizado (IPG) de 13 cm de comprimento linear e pH de 4-7 com o gel voltado para baixo. Essa faixa de pH foi escolhida por as proteínas da *Burkholderia sp.* SMF 07 se apresentarem em maior abundância entre 4-7. As *strips* foram cubertas com *cover fluid* começando da extremidade e indo em direção ao centro. A reidratação ocorreu em temperatura ambiente por 16 horas (*overnight*).

3.11.2 Focalização isoelétrica

Após a reidratação, as *strips* foram lavadas com água Milli-Q, para a retirada do excesso de *cover fluid* e solução de reidratação. A focalização isoelétrica (IEF) ou primeira dimensão foi realizada no sistema de focalização Ettan IPGphor III da GE Healthcare. As

strips foram encaixadas nas raias do *manifold* presente na plataforma do *IPGphor III*. Nas extremidades das *strips* foram posicionado os *eletrode pads* úmidos com água Milli-Q. O *eletrode assembly* foi encaixado no *manifold* de modo que tocasse o *eletrode pad*, então pode ser dado início a focalização. O programa IPGphor III usado para a focalização teve os seguinte parâmetros mostrado na Tabela 5. Depois das *strips* terem sido focalizadas, as mesmas foram armazenadas dentro de tubos de ensaio com rosca e estocadas em freezer a -80 °C para posterior corrida de segunda dimensão.

Tabela 5 - Parâmetro do programa IPGphor III usado para a focalização

<i>Etapa</i>	<i>Voltagem</i>	<i>Tempo</i>
Step 1	500 V	2:00 HH:mm
Grad 2	4.000 V	2:30 HH:mm
Step3	10.000 V	18.000 Vh
Step 4	50.00 V	4:00 HH:mm
Total	24.825 Vh	10:18 HH:mm

3.11.3 *Equilíbrio das strips*

Após a focalização isoeétrica, a *strip* a ser utilizada deve ser equilibrada para realizar a segunda dimensão. Para tanto, a *strip* IPG foi retirada do freezer -80 °C e descongelada, em seguida em tubo de ensaio com tampa foi equilibrada com 3 mL de solução de equilíbrio I (Uréia 6M, Tris 50mM, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol, e DTT) por 15 minutos sob agitação. Após esse tempo a *strip* foi transferida para outro tubo de ensaio com tampa com 3 mL de solução de equilíbrio II (Uréia 6M, Tris 50mM, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol e iodoacetamida) também por 15 minutos e sob agitação. A *strip* foi lavada rapidamente com água Milli-Q e utilizada para correr na segunda dimensão.

3.11.4 *Segunda dimensão (2D)*

Para cada *pool* de amostra, controle e tratamento, foi feito eletroforese bidimensionais em triplicata a fim de verificar a reprodutividade do método. A separação da segunda dimensão foi feita no sistema de eletroforese vertical Hoefer Ruby SE 600 da GE

Healthcare. A *strip* equilibrada foi colocada em gel polimerizado de poliacrilamida, composição descrita na Tabela 6, a 12,5% e para selá-la no gel foi adicionado sobre ela uma solução de agarose (0,5 % de agarose com traços de azul de bromofenol), antes dessa solução de agarose se polimerizasse foi colocado do lado da *strip* um pente para a formação de um poço para aplicação do marcador de peso molecular. A separação da segunda dimensão teve duração de aproximadamente 4 horas e 30 minutos.

Tabela 6 - Composição do Gel de Poliacrilamida

<i>Componente</i>	<i>Quantidade</i>
Acrilamida/bis (22,5%)	22,5 mL
Tris 1,5 M pH 8,8	11,25 mL
H ₂ O Milli-Q	10,35 mL
SDS 10%	450 µL
PSA 2,5%	450 µL
TEMED	36 µL

Após a corrida, o gel de poliacrilamida foi submerso na solução corante com *Comassie blue* G-250 a 0,1% e deixada *overnight* sob agitação e descorado em solução descorante, que é composta de água, metanol e ácido acético (6:3:1). Para obter a imagem do gel em formato TIFF que é o utilizável pelo programa de identificação dos *spots*, o mesmo foi digitalizado utilizando um *scanner* do modelo *LabScan* da *GE Healthcare*TM, através do *ImageScanner III* e estocado em solução de ácido acético a 5%. O ajuste da imagem, a detecção dos *spots* e a avaliação dos dados para determinar variações quantitativas (% do volume) e qualitativas, massa e ponto isoelétrico dos *spots* foi feito pelo programa *ImageMaster*TM também desenvolvida pela *GE Healthcare*. Algumas proteínas foram identificadas utilizando os valores de pI e massa molecular do *spot* contra um banco de dados de proteínas no *ExpASY* (<http://www.expasy.ch/tools/#proteome>). As análises de significância das diferenças quantitativas existentes entre o tratamento em relação ao controle, foi avaliada em análise não-paramétrica e independente, utilizando o programa de análise estatística *Statística 6 Workbook* e com aplicação do teste *Mann-Whitney* considerando $p < 0,05$. O programa *GraphPad Prism 3* foi utilizado para confecção dos gráficos.

3.12 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada utilizando água, reagentes e plásticos livre de RNase. O RNA total foi extraído a partir de cultura de células bacterianas crescidas a 28 °C e 250 rpm quando estavam na fase *log* em diferentes tempos como descrito no item 3.8.2., em meio líquido TY com e sem 2,4-D. As células foram coletadas por centrifugação de 1,5 mL de cultura de bactéria a 6000 x g por 5 minutos a 4 °C. Foi adicionado ao precipitado 1 mL TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) e a mistura foi incubada por 5 minutos. Foi adicionado 200 µL de clorofórmio gelado, sendo, em seguida, centrifugado a 15000 x g por 15 minutos a 4 °C. Os ácidos nucleicos presentes na fase superior foram precipitados pela adição de isopropanol. Visando maximizar a precipitação, a amostra foi incubada por 10 minutos a 4 °C. O tubo foi centrifugado a 15000 x g por 10 minutos sob temperatura de 4 °C. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% e centrifugado a 7500 x g por 5 minutos a 4 °C. O precipitado foi ressuspensão em 50 µL de água livre de RNase. Para obter RNA Total livre de resíduos de DNA o mesmo foi tratado com DNase (Invitrogen) de acordo com a recomendação do fabricante (RITZ *et al.*, 2009). A qualidade das amostras de RNA Total foi mensurada pela integridade dos fragmentos de RNA ribossômico e verificação de ausência de DNA através de eletroforese em gel de agarose 1,2% e pela absorvância a 260 e 280 nm foi mensurada a concentração e grau de pureza do RNA.

3.13 Síntese do DNA complementar (cDNA)

A síntese do DNA complementar, cDNA, foi realizada utilizando a partir de RNA Total de *Burkholderia sp.* SMF 07 estocado a -80 °C. A enzima usada na transcrição reversa foi a transcriptase reversa (*Superscript III*, Invitrogen) e como iniciadores os Random Hexamer. A reação foi realizada segundo recomendações do fabricante.

3.14 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) e análise da expressão relativa

A análise quantitativa da expressão do gene *tfdB* foi realizada através de qRT-PCR. Para tanto, utilizou 300 ng do cDNA de cada amostra na reação de qRT-PCR. Além dos ácidos nucleicos, a reação foi composta de iniciadores específicos para os genes (300 nM cada) e 10 µl

de 2X Power SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems), com volume final de 20 µl. Realizou a reação de amplificação através de 40 ciclos térmicos de 95 °C por cinco segundos, 55 °C por cinco segundos e 68 °C por 20 segundos. A desnaturação inicial foi de 95 °C por cinco minutos.

Primers (Invitrogen) desenhados para qRT-PCR foram 20 - 25 bases de comprimento, tinha um conteúdo G / C igual ou mais de 50% e t_m cerca de 60 ° C (Tabela 7). Para as análises da expressão do gene selecionado *tfdB* de cada amostra, foi monitorado o nível de expressão de outro gene não afetados pela condição analisada (controle endógeno). Tal controle endógeno utilizado foi: Burk16S-F/R correspondem ao gene *16S rRNA* de *Burkholderia*. Realizou monitoramento em tempo real da PCR através de um termociclador RealPlex 4S (Eppendorf) pela detecção dos níveis de fluorescência do 2X Power SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems). Os níveis de fluorescência das reações foram analisados e normalizados sob as mesmas condições pelo corante de referência ROX, para corrigir variações na leitura do sinal emitido por conta de flutuações decorrentes do volume e evaporação ao longo da corrida (NISHI *et al.*, 2009). As análises dos dados de fluorescência obtidos foram realizadas pelo Realplex Software. Todas as reações, tanto do gene alvo quanto do controle endógeno, foram realizadas em triplicatas e sempre era feito o controle negativo da reação para cada *primer* a fim de detectar contaminação nos componentes utilizados na reação. Os *Cycle threshold* – Ct (quantidade de número de ciclos da qRT-PCR para atingir o limiar de detecção – *Threshold*) utilizados para as análises foram a média aritmética entre as triplicatas do gene alvo e controle endógeno. Os resultados foram normalizados. Para a normalização, foi utilizado a equação $\Delta Ct = Ct (\text{gene alvo}) - Ct (\text{controle endógeno})$. A calibração foi determinada pela fórmula: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{amostra}) - \Delta Ct (\text{controle})$. A obtenção da expressão relativa foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ como descrito anteriormente por Livak e Schmittgen (2001). A significância das diferenças de expressão existentes entre o tratamento em relação ao controle, foi avaliada em análise não-paramétrica e independente, utilizando o programa de análise estatística *Statística 6 Workbook*, dessa forma foi analisado a significância das diferenças entre o ΔCt do controle em relação ao tratamento de cada amostra usando o teste *Mann-Whitney* considerando $p < 0,05$. O programa GraphPad Prism 3 foi utilizado para confecção dos gráficos.

Tabela 7 - Sequência de Primers para qRT-PCR usados nesse estudo

Gene	Sequência	GC%	Primer (pb ³)	Amplicon (pb ³)	Template
<i>q-tfdB</i>	¹ F 5'- AAA TTG AGG GCA TCT CGA CCT GGA -3'	50,0	24	145	694-717
	² R 5'- AAG CTG TCC TGG ATG GAG GTG TTT -3'	50,0	24		838-815
<i>q-Burk 16S</i>	¹ F 5'-TCC AGC AAT GCC GCG TGT GT-3'	60,0	20	101	369-388
	² R 5'-CGG TAC CGT CAT CCG CCA CG-3'	70,0	20		469-450

¹F: Forward; ²R: Reverso; ³pb: pares de base

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Extração de ácido deoxirribonucléico (DNA) total

A concentração da amostra foi de 613 ng/uL e o valor da relação entre as absorvâncias (A_{260}/A_{280}) foi de 1,801 (Tabela 8). Sambrook e colaboradores (1989) afirmam que a relação entre as absorvâncias a 260 nm e 280 nm deve ser maior que 1,75 para que uma amostra seja considerada de qualidade e livre de contaminação. Porém, outros trabalhos defendem relações entre 1,6 e 2,0 apresentam qualidade suficiente. Valores maiores que 2,0 indicam contaminação com proteínas, fenol ou alcoóis (ROMANO, 1998).

No presente trabalho foi observado que o DNA Total (Figura 5) da amostra extraída apresentou boa qualidade e livre de contaminante.

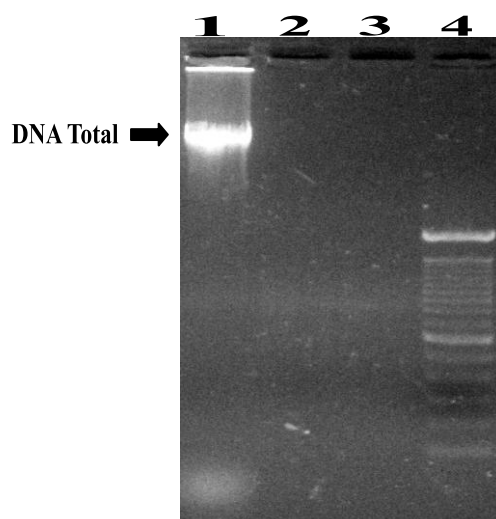
Tabela 8 - Concentração de DNA genômico, absorvância a 260nm e relação entre as absorvâncias a 260/280 nm das amostras de DNA de *Burkholderia mimosarum* SMF 07

Amostras	Concentração (ng/ μ l)	A^*_{260}	$A^*_{260/280}$
SMF007	613	0,245	1,801

*A**: absorvância

No presente trabalho foi observado que o DNA Total (Figura 5) da amostra extraída apresentou boa qualidade e livre de contaminante.

Figura 5– Perfil qualitativo do DNA Total de *Burkholderia sp* feito por meio eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Raia 1: DNA Total; Raias 2 e 3: poços vazios; 4: Marcador Molecular.

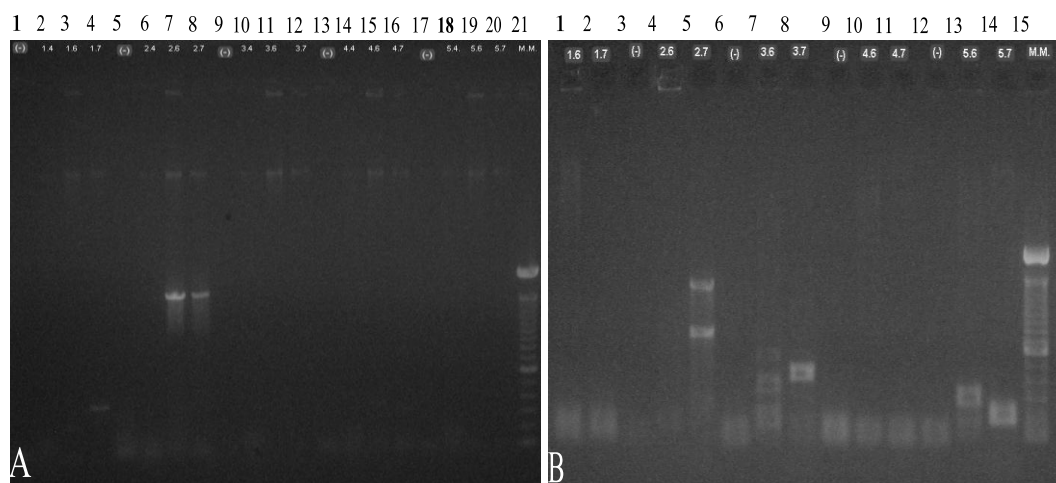


4.2 Teste de *primers* para biorremediação

Para saber se os isolados disponíveis de *Burkholderias* teriam em seu genoma genes de interesse para a biorremediação foi confeccionado *primers* da família *tfd* e *tft*, antes descritos na literatura, que se anelava na região de genes que correspondessem à degradação de poluentes. A Figura 6 (A) mostra a eletroforese de uma PCR com os *primers*: Opd-F/R; L1 e R1; *tfdB*-L/R; *tfdC*-L/R; *tftA*-L/R, evidenciando bandas nos poços correspondentes as estirpes de *Burkholderia sp.* SMF 06 e SMF 07.

Com isso podemos constatar que as amostras 06 e 07 apresentam genes para a biorremediação e bom anelamento dos *primers*. Para teste dos *primers* para qRT-PCR foi escolhido aqueles que apresentaram melhor padrão para PCR convencional testados (Figura 6 A). A Figura 6 (B) apresenta uma imagem de eletroforese de PCR com *primers* para qRT-PCR: q-*tfdE*-L/R; q-*tfdA*-L/R; q-*tftA*-L/R; q-*tfdB*-L/R; q-*tfdC*-L/R e usando amostras de DNA de SMF 06 e SMF 07. Os resultados mostram que a SMF 07 apresentou maior intensidade nas bandas e por essa razão foi escolhida para o estudo de biorremediação desse trabalho.

Figura 6 - Eletroforese de PCR usando *primers* para PCR convencional (A) e qRT-PCR (B).



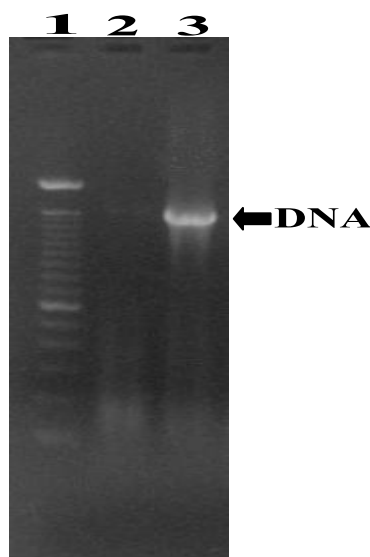
A - Opd-F/R (raias 1 a 4); L1 e R1 (raias 5 a 8); *tfdB*-L/R (raias 9 a 12); *tfdC*-L/R (raias 13 a 16); *tftA*-L/R (raias 17 a 20). Controle negativo (-) raias 1, 5, 9, 13 e 17; Amostra: 4 (raias 2, 6, 10, 14 e 18); 6 (raias 3, 7, 11, 15 e 19); 7 (raias 4, 8, 12, 16 e 20) e Marcador Molecular (M.M.) raia 21; **B** - q-*tfdE*-L/R (raias 1 a 3); q-*tfdA*-L/R (raias 4 a 6); q-*tftA*-L/R (raias 7 a 9); q-*tfdB*-L/R (raias 10 a 12); q-*tfdC*-L/R (raias 13 a 15). Controle negativo (-) raias 3, 6, 9 e 12; Amostra: 6 (raias 1, 4, 7, 10 e 13); 7 (raias 2, 5, 8, 11 e 14) e Marcador Molecular (M.M.) raia 15.

4.3 Sequenciamento do gene 16S rRNA

4.3.1 Amplificação do gene 16S rRNA

A amostra amplificada por PCR apresentaram-se de boa qualidade (Figura 7), com banda de DNA íntegra. Além disso, a eletroforese não apresentou bandas de DNA no controle negativo, o que garante eficiência da reação.

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta. A raia 1: Marcador molecular ladder; Raia 2: Controle negativo; 3: Produto de PCR do gene 16S rRNA de *Burkholderia sp.* SMF 07.



4.3.2 Análise da sequência de nucleotídeos do gene 16S rRNA

Os genes *16S rRNA* são moléculas altamente conservadas e universalmente distribuídos entre os procariotos (HEAD *et al.*, 1998). Os genes ribossomais têm sido bastante utilizados nos últimos anos em estudos de similaridade entre espécies por estar presente em todos os organismos, apresentam o mesmo papel funcional em todos eles e é bastante conservação. Nesta perspectiva a análise do gene *16S rRNA* é considerado relevante para a identificação de espécies bacterianas e para estudos de evolução e filogenia bacteriana (MUYZER *et al.*, 1993; HEAD *et al.*, 1998; SOARES-RAMOS *et al.*, 2003; MENNA *et al.*, 2006).

Neste trabalho foi sequenciado o gene *16S rRNA* da estirpe de *Burkholderia sp.* SMF 07, de maneira que foi obtida uma sequência cujo comprimento corresponde a 1551 nucleotídeos. Uma vez que este gene possui cerca de 1500 nucleotídeos (AMANN; LUDWIG, 2000; MAGNANI, 2009) podemos afirmar que foi obtido a sequência integral do gene 16S rRNA desta bactéria.

O programa BLASTn (ALTSCHUL *et al.*, 1997) apresenta no final do processo uma lista decrescente de 50 resultados de similaridades mais significantes. A Tabela 9, apresenta as 10 similaridades mais significativas quando comparadas com *Burkholderia sp.* SMF 07.

A comparação desta sequência com outras de espécies de *Burkholderia* presentes no *GenBank*, mostrou que esta estirpe apresenta 99% de similaridade com o isolado *Burkholderia sp.* CAF324 (Tabela 9) isolada de raiz de *Mimosa invisa* (Acesso: EU399922.1, 2008). Peng e colaboradores (2010) ao estudar esta cepa mostraram que CAF324 foi agrupada juntamente com β -rizóbios de *Burkholderia mimosarum* PAS44 (Acesso: AY752958), com uma similaridade de 99,7%. Neste trabalho SMF 07 também foi agrupada com PAS44 com uma similaridade de 99%, dessa forma podemos supor que a *Burkholderia* em estudo possa ser a *Burkholderia mimosarum* PAS44 (Tabela 9).

Tabela 9 - Resultado da busca por similaridade utilizando a ferramenta Blast do NCBI

Acesso	Descrição	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EU399922.1	<i>Burkholderia sp.</i> CAF324	2734	2734	96%	0.0	99%
AY773196.1	<i>Burkholderia mimosarum</i> Br3467	2695	2695	95%	0.0	99%
AY752958.1	<i>Burkholderia mimosarum</i> PAS44	2647	2647	92%	0.0	99%

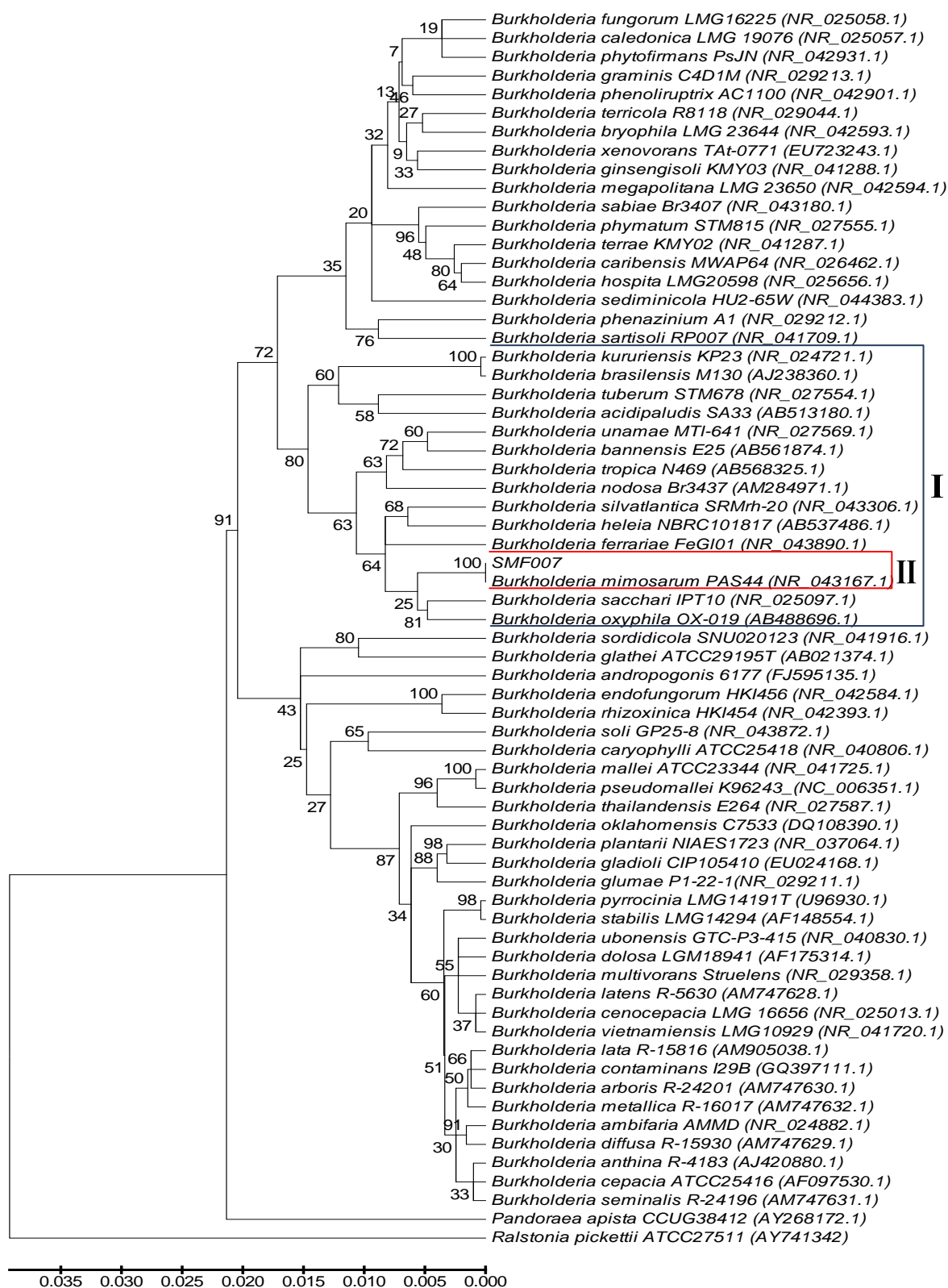
4.3.3 Análise das sequências do gene *16S rRNA*

Os dendogramas construídos com base na sequência do gene *16S rRNA* do isolado estudado juntamente com outras sequências de outros tipos espécies do gênero *Burkholderia* estão apresentados nas Figuras 8, 9 e 10.

Na análise da sequência do gene *16S rRNA*, foi avaliado as relações de parentesco entre a estirpe deste trabalho com as sequencias de *16S* de espécies de *Burkholderia* obtidas do *GenBank* (NCBI, 2012).

A sequências do gene *16S rRNA* do isolado SMF 07 apresenta 99% de similaridade com o *16S rRNA* de *Burkholderia mimosarum* PAS44. Os valores de *bootstrap* desta comparação foram de 100% e 86%, de acordo com os métodos NJ, MP, quanto ao método MV, à árvore não atribui divergência entre SMF 07 e PAS44, indicando ser a mesma espécie. Os resultados indicam que os três dendogramas concordam entre si com relação ao parentesco do isolado SMF 07. Embora empregando algoritmos diferentes os três modelos matemáticos reconstruíram dendogramas muito similares, com algumas variações, nos valores de *bootstraps* e na posição de alguns ramos. Tendo em vista que Coenye e colaboradores (2005) afirmam que por ser tão conservado, as sequências do gene *16S rRNA* não são adequadas para distinguir entre isolados de uma mesma espécie. Assim, podemos concluir que SMF 07 é uma cepa de *Burkholderia mimosarum*.

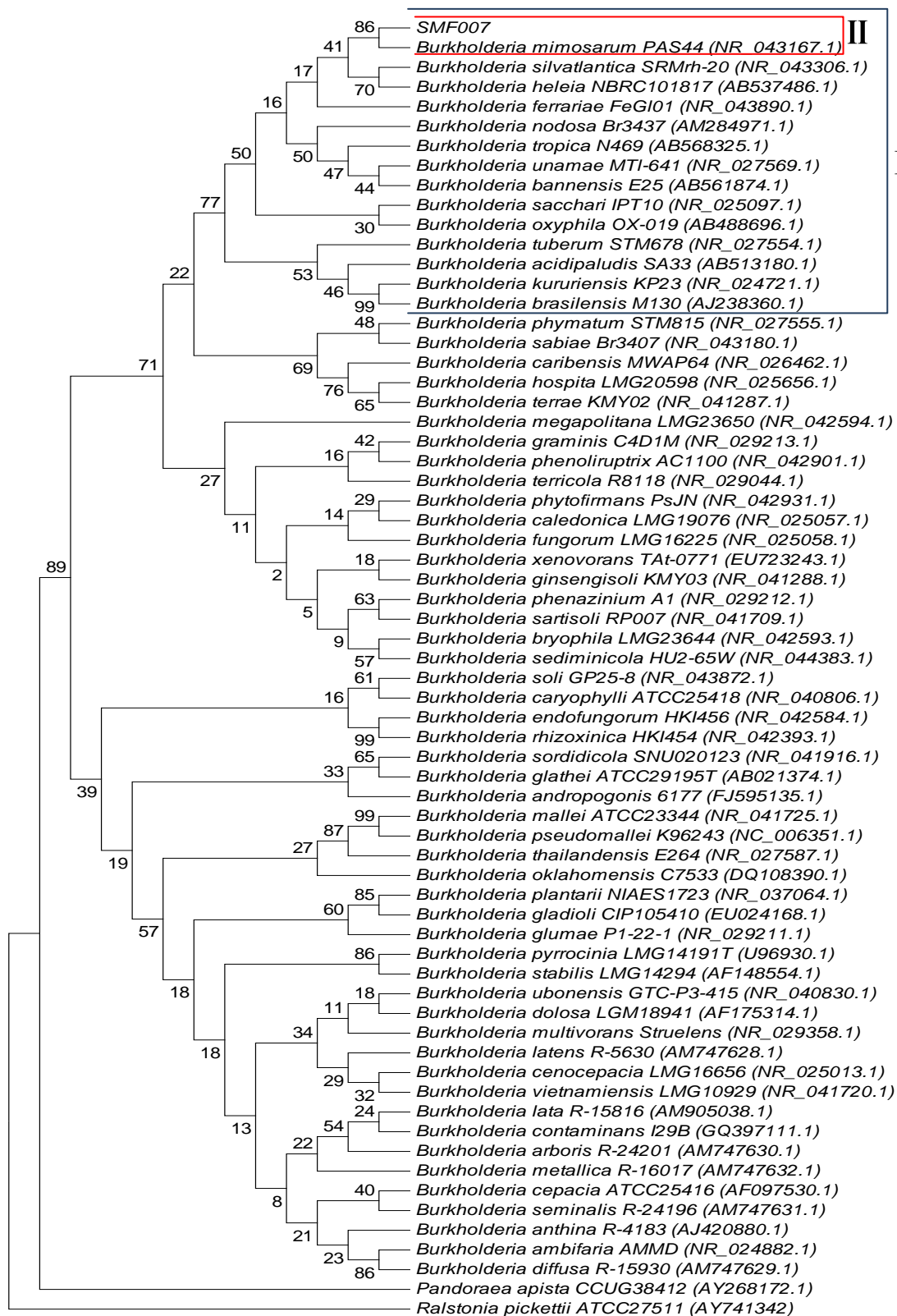
Figura 8 - Dendograma da *Burkholderia mimosarum* SMF 07 baseada no gene ribossomal 16S. Reconstrução do dendograma utilizando o programa MEGA 5.05 e algoritmo Neighbor-joining.



A sequência de *Ralstonia pickettii* ATCC27511 e *Pandoraea apista* CCUG38412 foram utilizadas como outgroup.

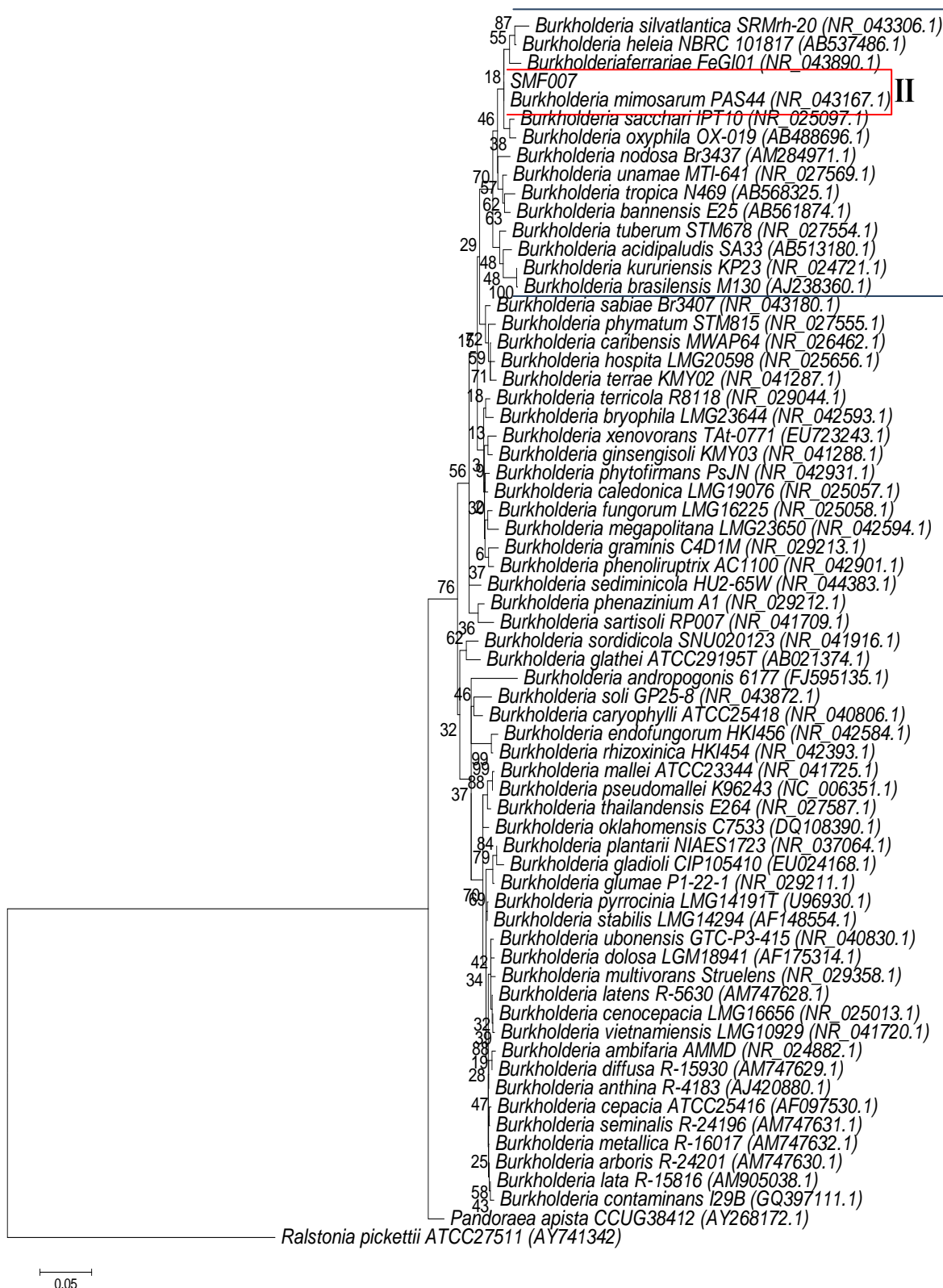
I e II correspondem ao grupo das espécies que dividem o mesmo ancestral comum e a espécie mais próxima da SMF 07, respectivamente.

Figura 9 - Dendograma da *Burkholderia mimosarum*. SMF 07 baseada no gene ribossomal 16S. Reconstrução do dendograma utilizando o programa MEGA 5.05 e algoritmo Máxima parcimônia.



A sequência de *Ralstonia pickettii* ATCC27511 e *Pandoraea apista* CCUG38412 foram utilizadas como outgroup. I e II correspondem ao grupo das espécies que dividem o mesmo ancestral comum e a espécie mais próxima da SMF 07, respectivamente.

Figura 10– Dendograma da *Burkholderia mimosarum* SMF 07 baseada no gene ribossomal 16S. Reconstrução da Árvore Filogenética utilizando o programa MEGA 5.05 e algoritmo Máxima verossimilhança.

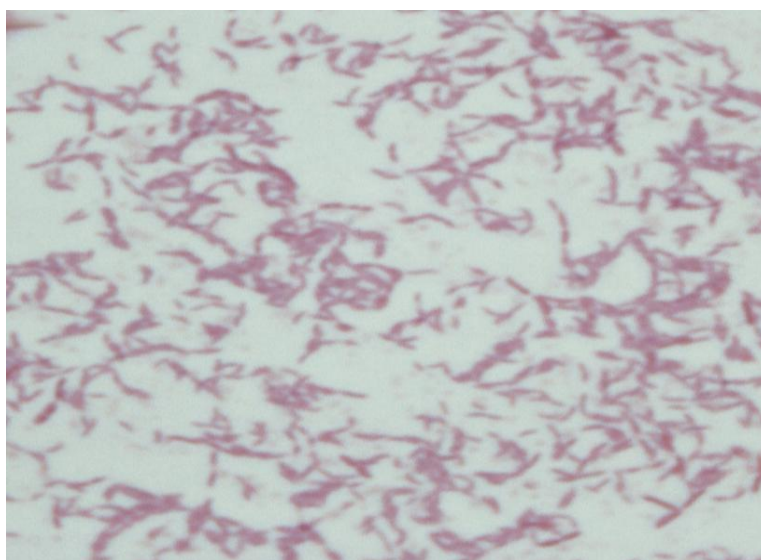


A sequência de *Ralstonia pickettii* ATCC27511 e *Pandoraea apista* CCUG38412 foram utilizadas como outgroup. I e II correspondem ao grupo das espécies que dividem o mesmo ancestral comum e a espécie mais próxima da SMF 07, respectivamente.

4.4 Curva de crescimento

A análise da coloração de Gram apresentou apenas bacilos gram-negativos típicos do gênero *Burkholderia* (Figura 11), o que sugere a pureza de todas as culturas empregadas. A fase *lag* é o momento em que os organismos adquirem habilidades para sobreviver e reproduzir em meio particular, assim ganhando habilidade para degradar compostos (HERBES; SHAWALL, 1977), a partir dessa fase as células estão plenamente adaptadas e iniciam seu processo de divisão entrando em crescimento logarítmico. Durante este intervalo, a divisão celular encontra-se muito ativa, sendo o gráfico dessa fase caracterizado por uma linha em ascensão no qual o número de indivíduos dobra a cada geração.

Figura 11- Imagem de coloração de Gram da estirpe de *Burkholderia mimosarum* SMF 07 utilizando microscopia óptica.

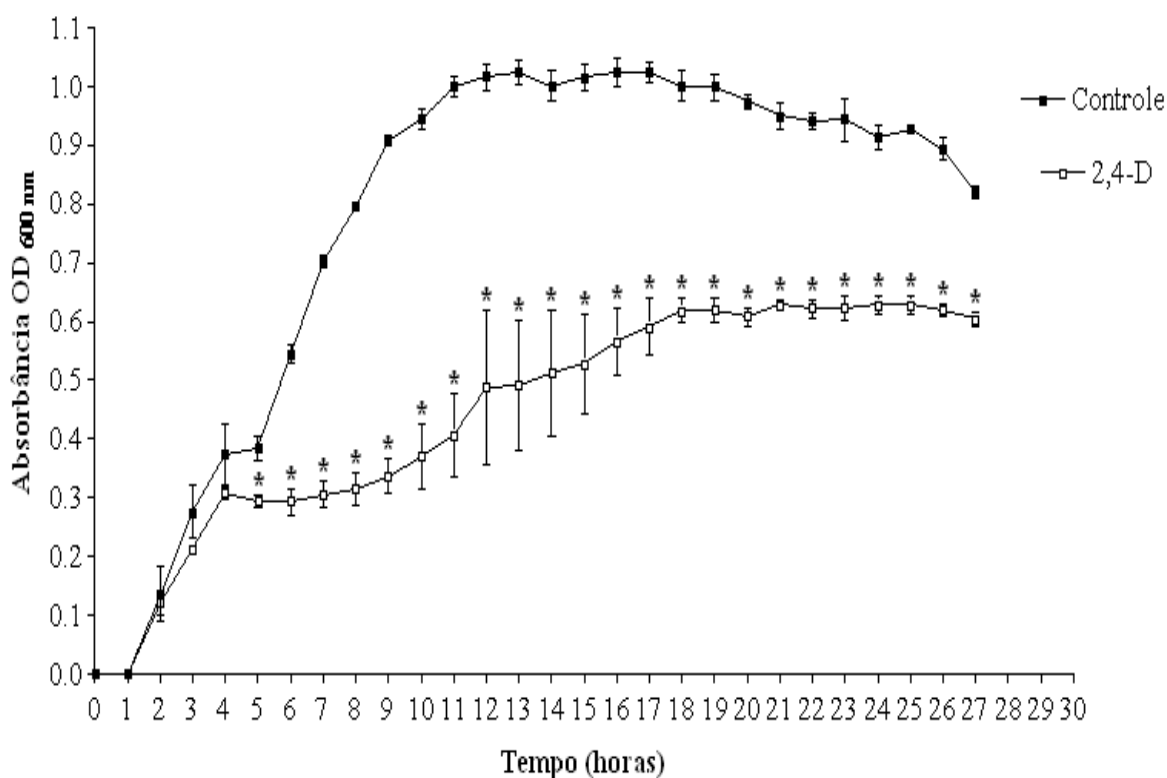


(Foto registrada pela autora)

Foi verificado que na curva correspondente ao crescimento sem poluente a fase *log* ficou caracterizada pelos valores de O.D_{600nm} em torno de 0,2 a 1,0 (Figura 12 e 13). Houve diferença estatisticamente significativa entre as curvas de crescimento dos grupos controle e tratado com 2,4-D para a extração de RNA total. Essa diferença é observada a partir do tempo de crescimento de cinco horas e se estendendo ao longo de todo crescimento (Figura 12), mas vale ressaltar que o herbicida não inibiu o crescimento da *Burkholderia mimosarum* SMF 07. Após esse tempo as culturas convergiram caracterizando a fase platô. Na figura 13 pode ser observado a curva de crescimento bacteriano em meio TY suplementado com 2,4-D para

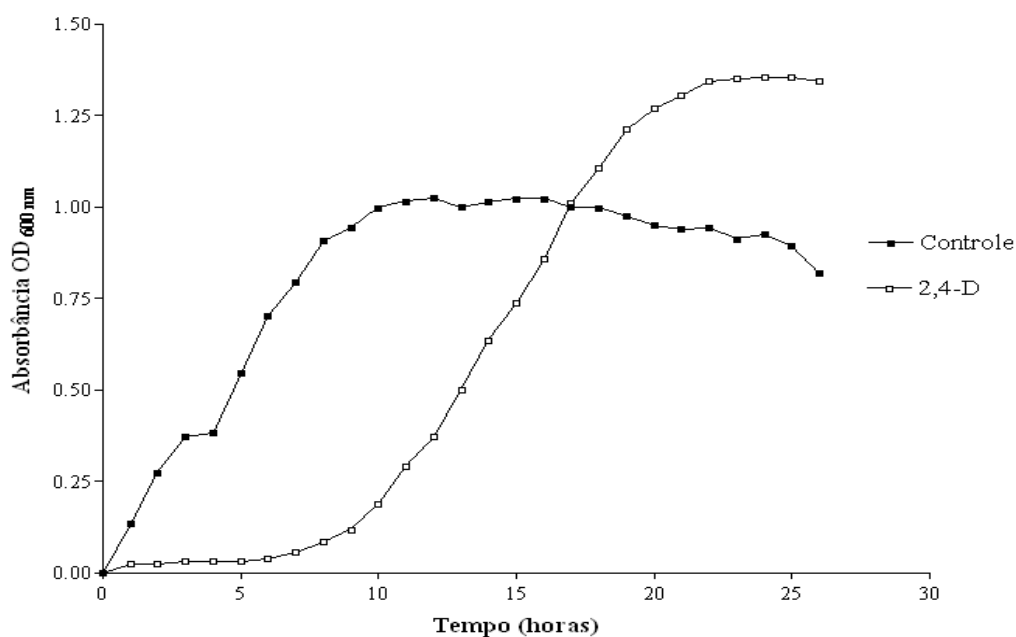
extração de proteína. O grupo controle apresentou início e término da fase *log* anteriores ao grupo com 2,4-D, crescimento bacteriano para extração de RNA Total como para o de proteína intracelular, essa diferença se dá devido ao período de adaptação da bactéria ao poluente presente no meio, corroborando com Roma-Rodrigues e colaboradores (2010) na qual estudos mostraram que *Pseudomonas putida* KT2440 na presença de fenol necessita de um período de adaptação ao meio para retomar o crescimento. Em 2006, Riedel e colaboradores (2006) relatam que a cepa *Burkholderia cenocepacia* H111 atinge o final da fase *log* com O.D_{600nm} 1,5, aproximando-se dos resultados obtidos pela bactéria em estudo.

Figura 12 – Curva de crescimento para extração de RNA total de *Burkholderia mimosarum* SMF 07 durante 27 horas de monitoramento em espectrofotômetro usando comprimento de onda igual a 600 nm.



A curva com quadrado preenchido em preto (■) corresponde ao controle e em branco (□) ao tratamento com 2,4-D. As barras verticais indicam o desvio padrão entre as triplicatas de cada ponto de medição. Análise estatística feita no *Statistica 6 Workbook* usando o teste *Mann-Whitney* e $*p < 0,05$ e a construção da curva foi feita a partir do *GrpPad Prism 3.0*.

Figura 13 – Curva de crescimento para extração de proteína intracelular de *Burkholderia mimosarum* SMF 07 durante 26 horas de monitoramento em espectrofotômetro usando comprimento de onda igual a 600 nm.



A curva com quadrado preenchido em preto (■) corresponde ao controle e em branco (□) ao tratamento com 2,4-D. A construção da curva foi feita a partir do GrphPad Prism 3.0.

4.5 Extração de proteínas intracelulares

A extração de proteínas intracelulares foi realizada a partir de sedimento de cultura de *Burkholderia mimosarum* SMF 07, quando essa bactéria encontrava-se na fase *log*. Finalizado o processo de extração, a quantidade total de proteínas foi mensurada através do método de Bradford (1976), tabela 10.

Tabela 10 - Perfil quantitativo das proteínas intracelulares extraídas de *Burkholderia mimosarum* SMF 07 crescida em meio TY na ausência e presença de 2,4-D

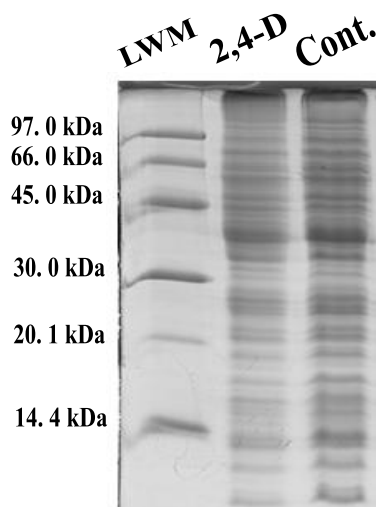
Amostra	ABS ¹ _{260/280}	C ² (µg/µL)
(I) ³ Controle 2,4-D	0,774	7,558
2,4-D	0,212	1,938
(II) ³ Controle 2,4-D	0,353	3,348
2,4-D	0,829	8,108
(III) ³ Controle 2,4-D	0,549	5,308
2,4-D	0,164	1,458

¹ABS: Absorbância; ²C: Concentração; ³Replicata do Crescimento

Na Figura 14, pode-se observar o resultado da separação das proteínas intracelulares extraídas após corrida eletroforética em gel de SDS-PAGE 12,5%. A primeira raia corresponde ao marcador de peso molecular, o qual permite estimar o peso molecular nas proteínas percorrida no gel, as raias 2 e 3, correspondendo ao controle e tratamento com 2,4-D, respectivamente. A pureza e a integridade das proteínas intracelulares extraídas podem ser verificadas pelo padrão de bandas em SDS-PAGE (WEBER; OSBORN, 1969; LAEMMLI, 1970), dessa forma podemos observa na Figura 14 que as proteínas extraídas apresentam de boa qualidade com bandas bem definidas e livres de possíveis contaminantes.

De acordo com análise do perfil quantitativo (Tabela 10) e qualitativo (Figura 14), método de Bradford (1976) e SDS-PAGE, respectivamente foi observado que as proteínas intracelulares totais extraídas estavam em quantidade e qualidade ideal para análise em géis bidimensionais.

Figura 14 – Eletroforese em poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12,5% de proteínas obtidas de *Burkholderia mimosarum* SMF 07 corado com Comassie blue G-250.



A raia 1 corresponde ao marcador de peso molecular – MM, em quilodaltons - kDa; Raia 2 e 3 corresponde proteína intracelular total extraída de *Burkholderia mimosarum* SMF 07 na presença e ausência de 2,4-D, respectivamente.

4.6 Eletroforese bidimensional

Em 1975, O'Farrel e Klose (1975) desenvolveram a eletroforese bidimensional (2D) é a técnica mais direta para mapear o proteoma de um indivíduo (CAHILL *et al.*, 2001). Essa técnica possibilita fazer análises de expressão gênica comparando os padrões protéicos,

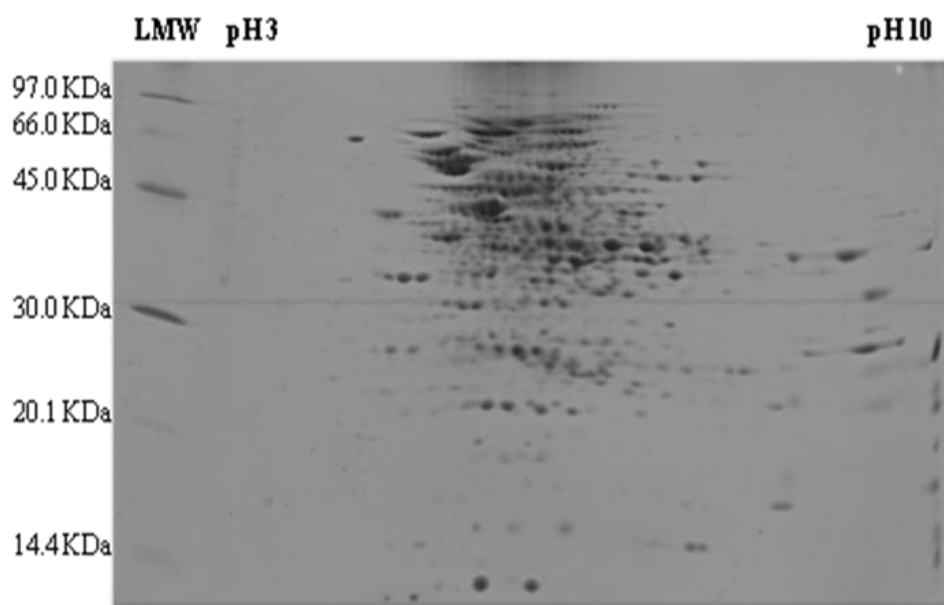
proporcionando uma idéia relativa de cada proteína na amostra, através de métodos de coloração (ONG; MANN, 2005). Dessa forma reflete o estado atual de funcionamento do sistema em condições fisiológicas e metabólica específicas que é determinado pela expressão funcional do genoma (ANDERSON; SEILHAMER, 1997). A caracterização do proteoma bacteriano a partir de análise de proteínas utilizando eletroforese bidimensional tem sido aplicada por varias áreas de investigações específicas, dentre elas as que visão estudos de interações de bactérias com as células eucarióticas e respostas ao estresse bacteriano (CASH, 1998, TAM *et al.*, 2006).

A proteômica é o estudo mais apropriado para se entender o produto final dos genes (PANDEY; MANN, 2000), isto é, refere-se à coleção de proteínas derivada da tradução do genoma de um organismo ou tipo celular (HAYNES; YATES, 2000) e tem sido usada amplamente para a pesquisa microbiológica como um indicador global da síntese da expressão de proteínas (CASH, 2000). Muitos pesquisadores têm observado através da eletroforese bidimensional modificações nos padrões de expressão gênica de bactérias em reposta a diferentes condições de estresse ambientais submetidas em função do tempo, possibilitando assim a construção de catálogo proteômico de referência para determinadas condições de perturbações do ambiente. Adicionalmente, o ambiente celular é refletido por mudanças contrastando com o genoma de um organismo, que bem mais estável, dessa forma um indivíduo tem um genoma, mas muitos proteomas (CASH, 2002, CHAVES, 2008).

4.6.1 Pré-análise do proteoma de *Burkholderia mimosarum* SMF 07

Após a verificação do bom padrão de bandas por eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) do *pool* das proteínas intracelulares extraídas de *Burkholderia mimosarum*. SMF 07 foi realizada eletroforese bidimensional (2DE), a fim de determinar o padrão de expressão do genoma funcional quando a bactéria em estudo foi crescida na presença e ausência de 2,4-D. Como ponto de partida para se estabelecer protocolo de 2DE para esse estudo foi realizada eletroforese usando *strips* com pH 3-10 de 13 cm e observamos que os *spots* das proteínas intracelulares encontravam-se em maior abundância na faixa de pH 4-7, mostrado na Figura 15, que corresponde a um gel de *Burkholderiamimosarum* SMF07 na condição de estresse por 2,4-D. Com isso foram empregadas *strips* IPG com essa faixa de pH 4-7 para todos os géis bidimensionais em estudo e tomando nota que o gel controle piloto na faixa de pH 3-10 apresentou o mesmo perfil do tratamento (dado não apresentado).

Figura 15 – Mapa de eletroforese bidimensional de proteínas obtidas de *Burkholderia mimosarum* SMF 07 cultivadas em meio TY presença de 2,4-D.



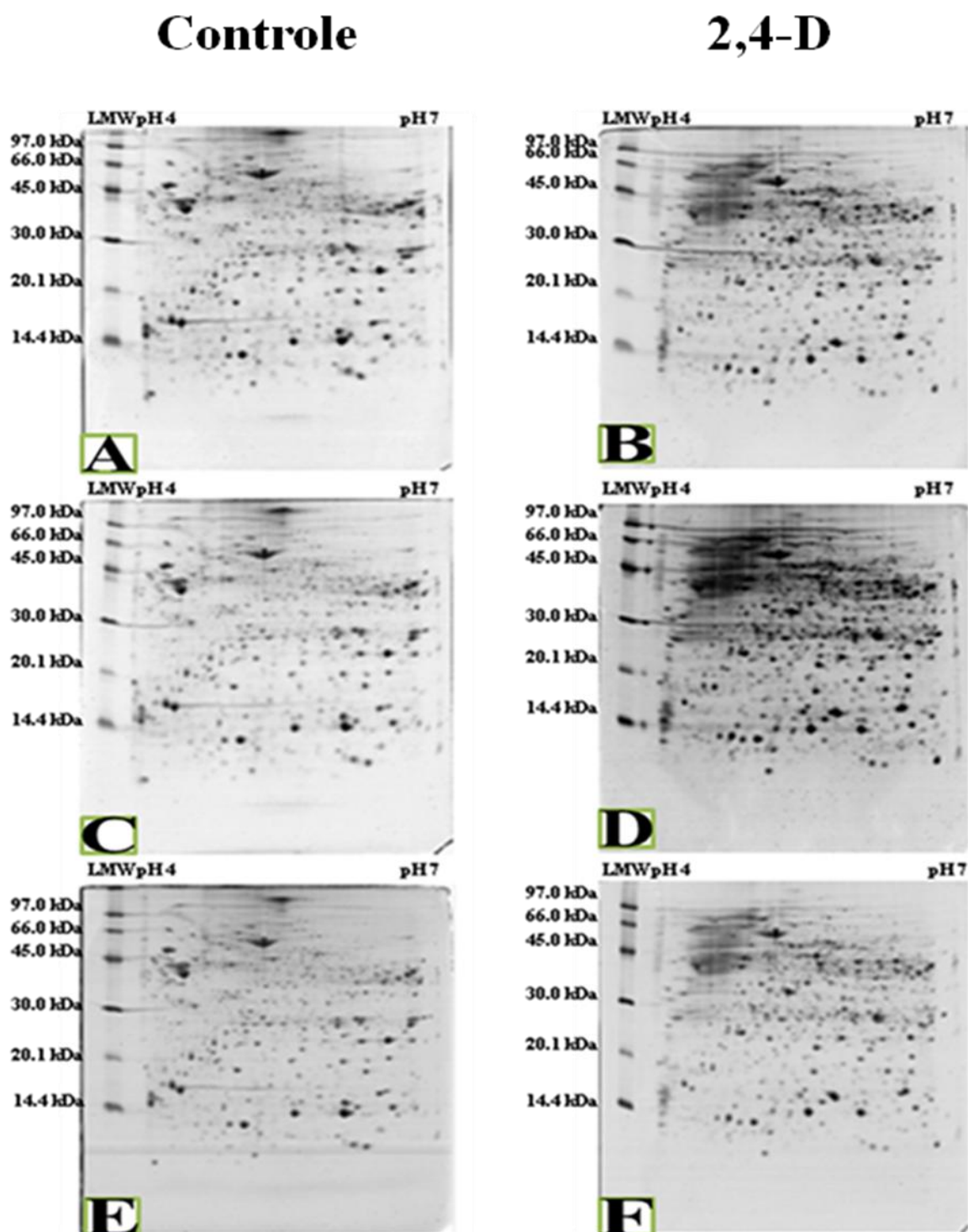
A primeira dimensão foi realizada em gradiente de pH 3-10 (*strip* de 13 cm) e a segunda dimensão em SDS-PAGE 12,5%. O gel foi corado com *Comassie blue* G-250 e analisado com auxílio do programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare). LMW corresponde ao marcador molecular utilizado com unidade em Quilodalton (kDa).

4.6.2 Análise do proteoma de *Burkholderia mimosarum* SMF 07

Na Figura 16, pode ser observado as imagens dos géis bidimensionais obtidos para o *pool* de amostras de *Burkholderia mimosarum* SMF 07 crescidas controle e com 2,4-D. Os géis da condição controle correspondem a figura 16: A (replica 1 - C1); C (replica 2 - C2); E (replica 3 - C3) e para a condição estresse figura 16: B (replica 1 – T1); D (replica 2 – T2); F (replica 3 – T3).

A técnica de eletroforese bidimensional de proteínas é uma técnica sensível, podendo ter grandes variações de resultados. A comparação entre as replicatas técnicas nos fornece fortes indícios sobre a qualidade dos dados obtidos. As análises dois géis C1, C2 e C3 possibilitaram a identificação de 826, 821 e 860 *spots*, respectivamente. O gel C3 (Figura 16) foi escolhido como referência para o controle por ser o gel com maior número de *spots* e que apresentou melhor focalização. Em relação à condição de estresse foi evidenciado nas replicatas T1, T2 e T3 uma quantidade de 791, 804 e 814 *spots*, respectivamente. O gel de referência para o 2,4-D foi a replica T3 (Figura 16), utilizando os mesmos critérios de escolha para o controle.

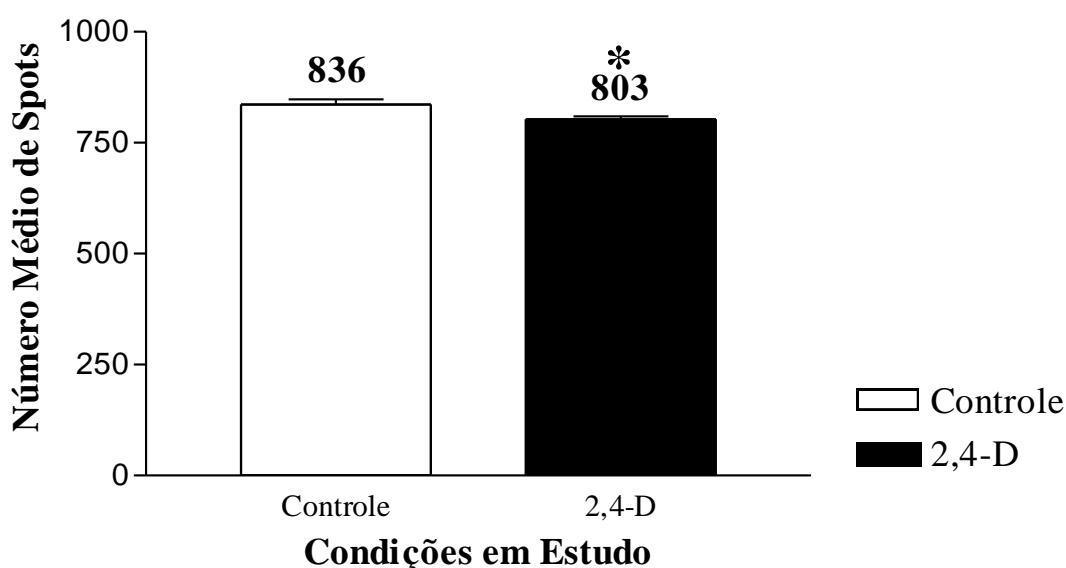
Figura 16 - Géis de eletroforese bidimensional de proteínas obtidas de *Burkholderia mimosarum* SMF 07 cultivadas em meio TY ausência (A, C e E – coluna à esquerda) e presença (B, D e F – coluna à direita) de 2,4-D.



As letras em maiúsculo na parte inferior a esquerda dos géis correspondem as replicas dos géis: A = C1, B = T1, C = C2, D = T2, E = C3 e F = T3 de cada condição estudada. LMW corresponde ao marcador molecular utilizado com unidade em Quilodalton (kDa). Foram identificados nos géis A, B, C, D, E e F um total de 826, 791, 821, 804, 860 e 814 *spots*, respectivamente.

No Gráfico 2, o número médio de *spots* encontrados nas réplicas dos géis 2DE para a condição controle e tratamento foi de 836 e 803, respectivamente. A análise estatística do número médio de *spots* foi estatisticamente diferente usando $p < 0,05$. Além disso, observamos uma menor abundância de proteínas no tratamento com 2,4-D em relação ao controle, o que sugere que o herbicida pode ter interrompido alguns processos de biossíntese de proteínas e alterado algumas atividades normais fisiológicas da *Burkholderia sp.* SMF 07 (LI *et al.*, 2009).

Gráfico 2 - Número médio de Spots das réplicas de géis bidimensionais de *Burkholderia mimosarum* SMF 07.

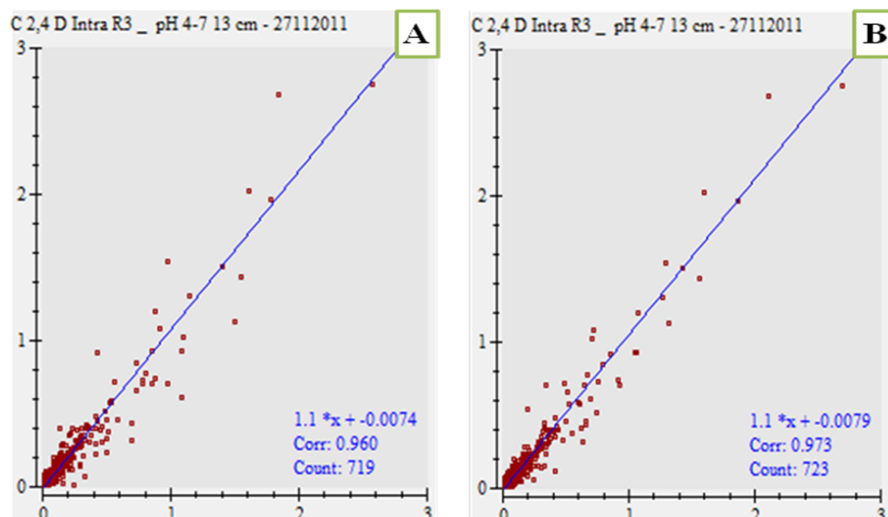


Análise estatística feita no Statistica 6 Workbook usando o teste Mann-Whitney e $*p < 0,05$ e a construção dos gráficos foi feita a partir do GraphPad Prism 3.0

Os géis de *Burkholderia mimosarum* SMF 07 na condição controle, C1 e C2, apresentaram um coeficiente de correlação linear de 0,960 e 0,973, respectivamente, em comparação com o gel de referência C3 controle (Gráfico 3). Enquanto que na condição de estresse apresentou um coeficiente de correlação linear de 0,969 e 0,917 para as réplicas T1 e T2, respectivamente em comparação com o gel de referência T3 tratamento 2,4-D (Gráfico 4). Chen e Popovic (2002) relataram que para descrever o padrão de relacionamento entre variáveis são escolhidos em 95% dos casos a correlação de Pearson. Essa correlação mensura a direção e o grau de relacionamento linear entre duas variáveis quantitativas (MOORE, 2007). A correlação de Pearson é utilizada para análise de confiabilidade e atribui um valor limite para que sejam confiáveis tais resultados. Quanto mais próximo de 1 for o valor da correlação linear indica que existe um maior grau de relação entre as variáveis em estudo, indicando nesse caso

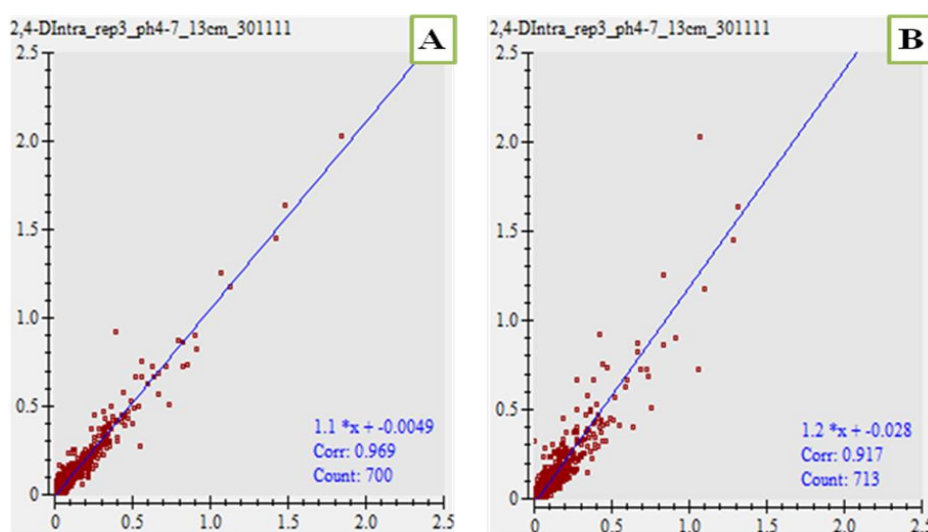
uma direção positiva do relacionamento e caso o valor da correção linear for menor que 0,85 o grau de relação entre as variáveis é insatisfatório (VIEIRA, 1980). Dessa forma podemos afirmar que os resultados das correlações lineares obtidos nesse trabalho são válidos e que as técnicas utilizadas não impactaram negativamente nos resultados obtidos.

Gráfico 3 - Gráfico de dispersão das replicas dos géis de *Burkholderia mimosarum* SMF 07 controle.



A – Replica controle C1 comparada com gel de referência C3 controle apresentando coeficiente de correlação de 0,96 e 719 *spots* coincidentes. **B** – Replica controle C2 comparada com gel de referência C3 controle apresentando coeficiente de correlação de 0,97 e 723 *spots* coincidentes. Corr.: correlação e Count.: *spots* coincidentes.

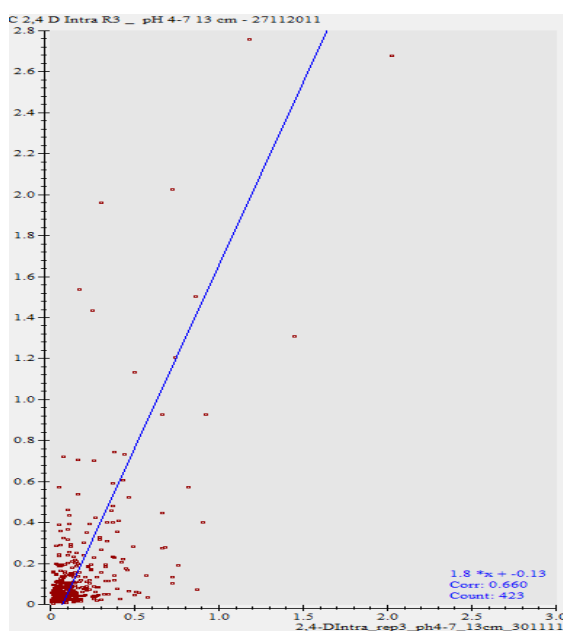
Gráfico 4 – Gráfico de dispersão das replicas dos géis de *Burkholderia mimosarum* SMF 07 tratamento 2,4-D.



A – Replica tratamento 2,4-D T1 comparada com gel de referência T3 tratamento 2,4-D apresentando coeficiente de correlação de 0,969 e 700 *spots* coincidentes. **B** – Replica tratamento 2,4-D T2 comparada com gel de referência T3 tratamento 2,4-D apresentando coeficiente de correlação de 0,917 e 713 *spots* coincidentes. Corr.: correlação e Count.: *spots* coincidentes.

A análise realizada nos géis bidimensionais de proteínas possibilitou a identificação de *spots* que demonstraram as diferenças quantitativas e/ou qualitativas específicas para cada crescimento bacteriano. Neste trabalho, nos interessa a identificação de proteínas que sejam positivamente reguladas na condição testada, tendo em vista que essas proteínas podem ser utilizadas para elucidar os aspectos metabólicos de degradação do 2,4D. A comparação entre os géis de referência do controle e do tratamento demonstrou a variação metabólica ocorrida em consequência da adição do 2,4D. O coeficiente linear entre os géis de referência foi de 0,66 (Gráfico 5). O alinhamento entre os géis de referência do controle e 2,4-D revelou o compartilhamento de 423 *spots* (51,8% de similaridade). Assim, podemos afirmar que houve uma alteração marcante no padrão de expressão global de proteínas em decorrência do 2,4D.

Gráfico 5 – Gráfico de dispersão dos géis de referência controle e tratado de *Burkholderia mimosarum* SMF 07. Os géis apresentaram correlação de 0,66 e 423 spots coincidentes. Corr.: correlação e Count.: spots coincidentes.

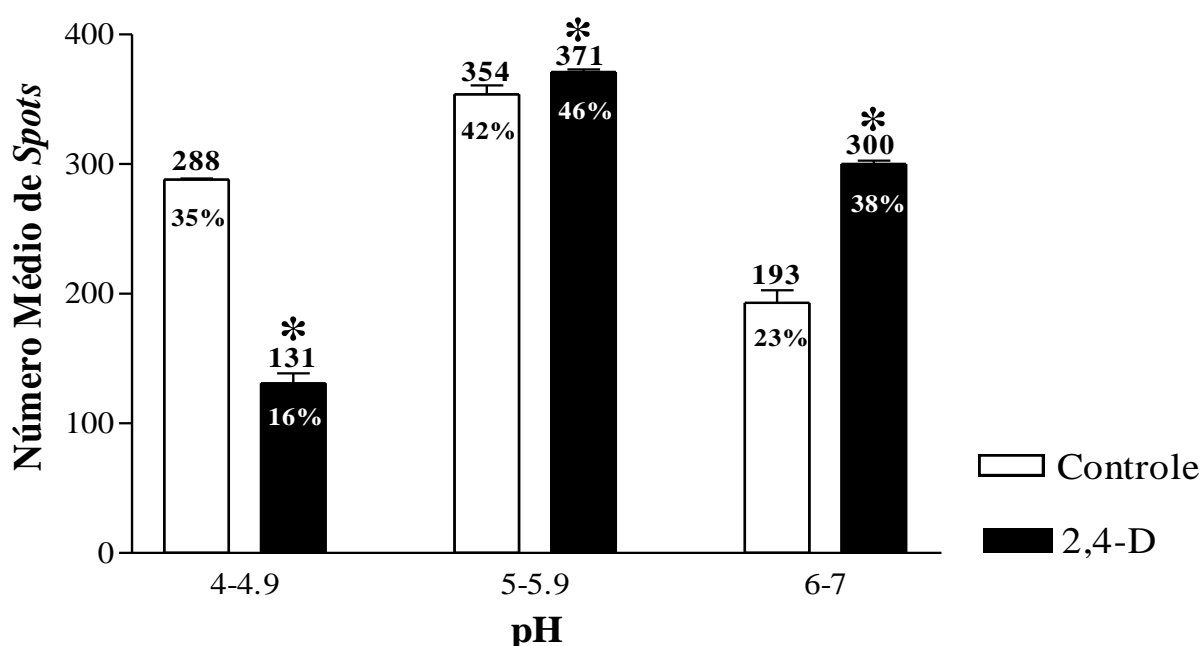


4.6.3 Distribuição dos spots por ponto isoelétrico e massa molecular

Os valores de ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MM) das proteínas obtidos pelo programa *ImageMaster* apresentou variação de pH 4 a 7 e massa molecular variando de 20 a 80 kDa. A análise computacional das imagens dos mapas protéicos demonstraram que a maioria das proteínas possuem ponto isoelétrico na faixa de pH 5-6 totalizando 354 (42%) e 371 (46%) *spots* para controle e tratamento, respectivamente (Gráfico 6). O Gráfico 7 corresponde à distribuição média das proteínas por massa molecular, observado que a maior abundância de *spots* está presente entre 20 a 40 Quilodalton (kDa), com 355, (41%) e 398 (48%) para controle e 2,4-D, respectivamente. Foi observado que a menor distribuição de proteínas encontrou-se na faixa de pH de 6-7 para o controle e tratamento de 4-5. Em relação a MM a região de proteínas que apresentou uma menor abundância foi aquela acima de 80 kDa para as duas condições analisadas.

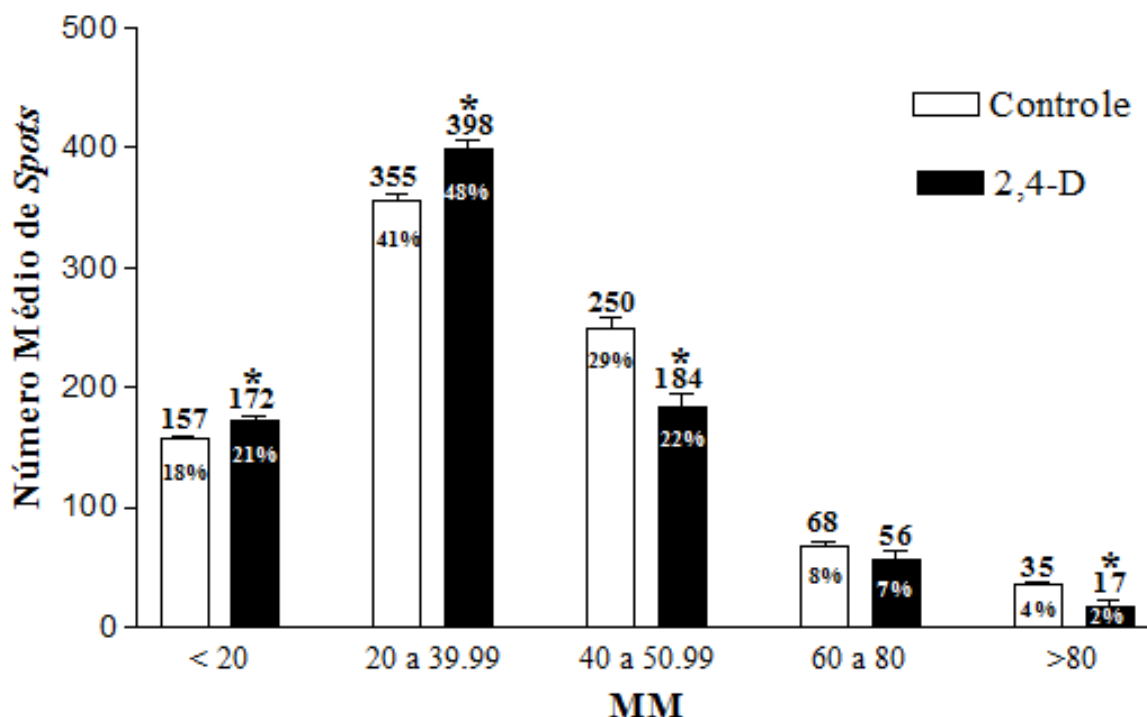
Os resultados de maior abundância de proteínas por pI e MM nesse estudo corroboram com os achados de Li e colaboradores (2009), que estudando o padrão protéico de *Burkholderia cepacia* WZ1 em estresse por quiclorato, também um herbicida, mostraram que a maioria das proteínas foram localizadas entre pH 4-6,5 e massa molecular de 15-66 kDa.

Gráfico 6 – Número médio de Spots das replicas de géis bidimensionais controle (□) e tratamento com 2,4-D (■) de *Burkholderia mimosarum* SMF 07 distribuídos por ponto isoelétrico (pI).



Análise estatística feita no *Statística 6 Workbook* usando o teste *Mann-Whitney* e $*p < 0,05$ e a construção do gráfico foi feita a partir do *GrphPad Prism 3.0*.

Gráfico 7 – Número médio de Spots das réplicas de géis bidimensionais controle (□) e tratamento com 2,4-D (■) de *Burkholderia mimosarum* SMF 07 distribuídos por massa molecular (MM).



Análise estatística feita no *Statística 6 Workbook* usando o teste *Mann-Whitney* e $*p < 0,05$ e a construção do gráfico foi feita a partir do *GrpPad Prism 3.0*.

4.6.4 Proteínas diferencialmente expressas

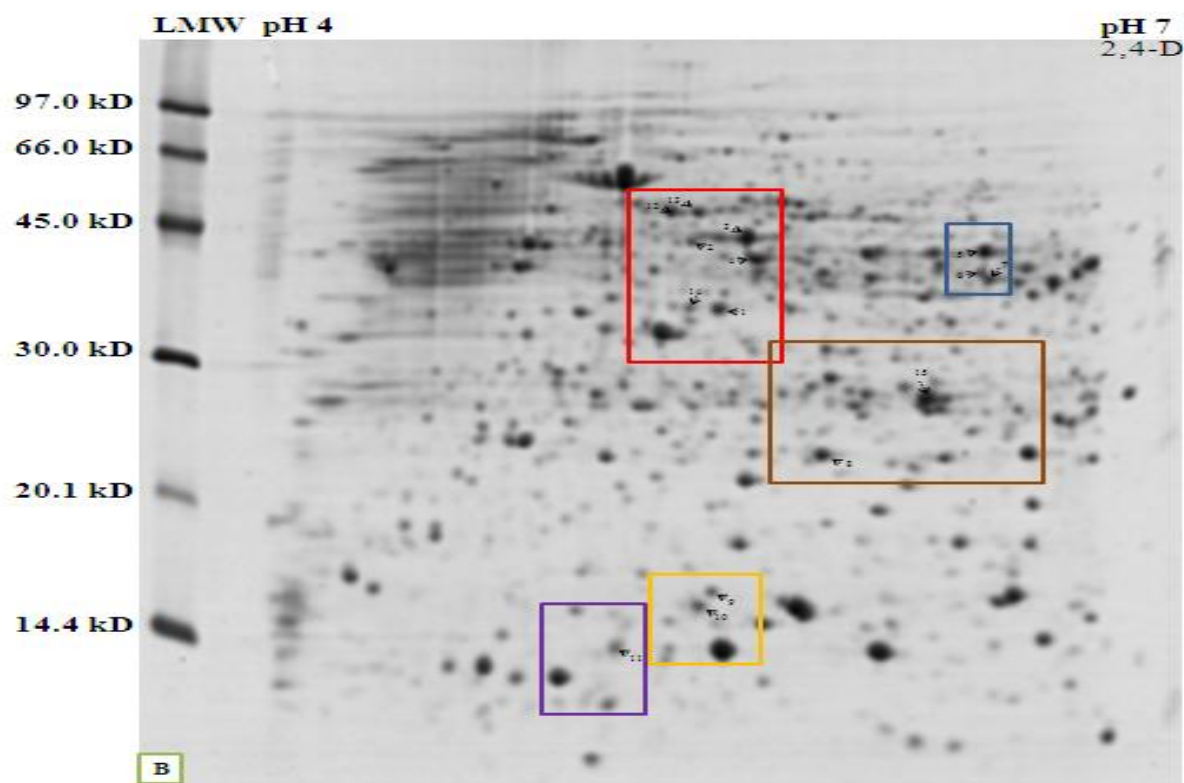
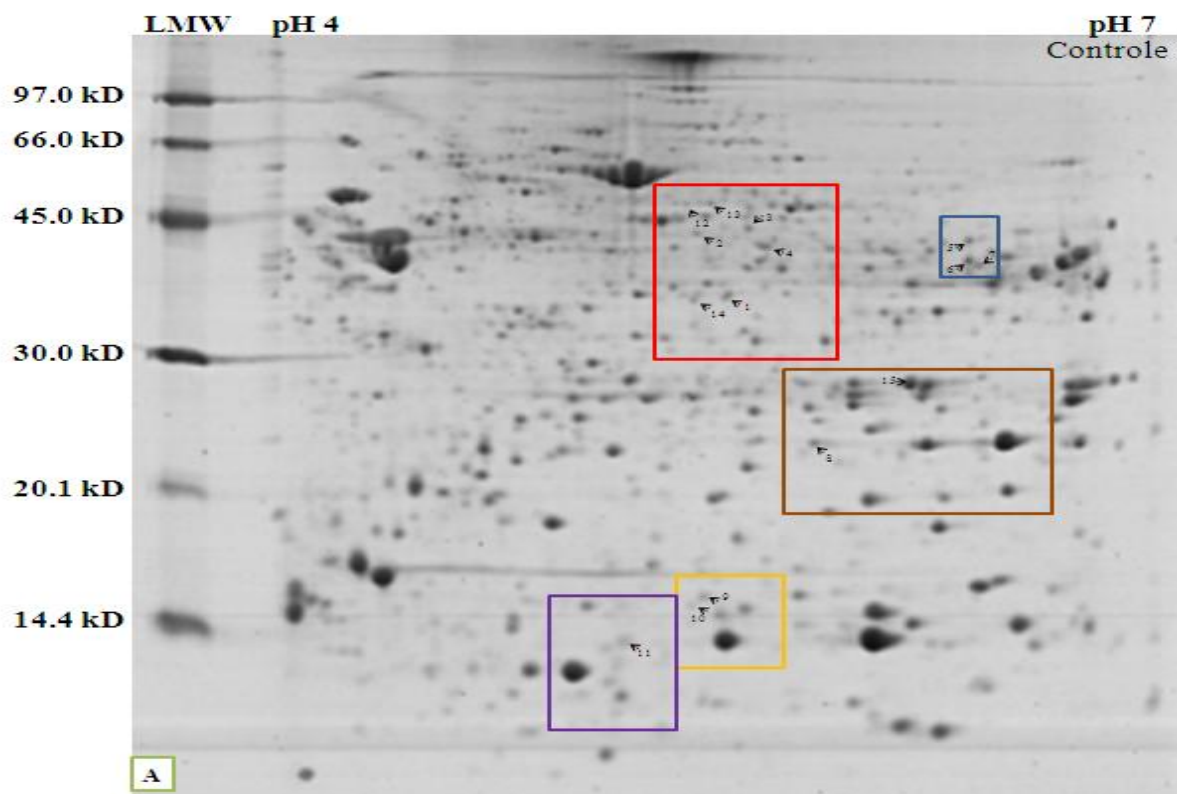
A partir da análise entre os géis 2DE resultantes da condição de estresse e controle foram identificados vinte e oito *spots* expressos diferencialmente. Dos 28 *spots* expressos diferencialmente, 15 *spots* presentes nas duas condições apresentaram diferença quantitativa nos níveis de expressão, o tratamento aumentou o nível de expressão desses *spots* em relação aos do controle (Figura 17 A e B) e 13 *spots* foram induzidos na condição de estresse na presença de 2,4-D (Figura 18 A e B). Tais achados sugerem que as proteínas diferencialmente expressas quantitativamente e qualitativamente estejam envolvidas na biodegradação do 2,4-D.

A fim de analisar mudanças significativas na expressão quantitativa das proteínas os géis entre classes foram combinados em conjunto para o alinhamento dos *spots*. Para tanto deve ser usados métodos analíticos como histogramas e testes estatísticos (*ImageMaster 2D platinum: User Manual, 2008*). Após o alinhamento dos *spots* foi gerado um histograma referente a cada *spot* correspondente entre as classes de géis controle e tratamento pelo *Image*

Master. Além disso, foi feita análise estatística a partir da porcentagem de volume de cada *spot* correspondente considerando $p < 0,05$. Todos os *spots* em análise apresentaram-se estatisticamente significantes em relação ao nível de expressão quantitativa aumentada bem como histogramas de acordo para o padrão do histograma gerado.

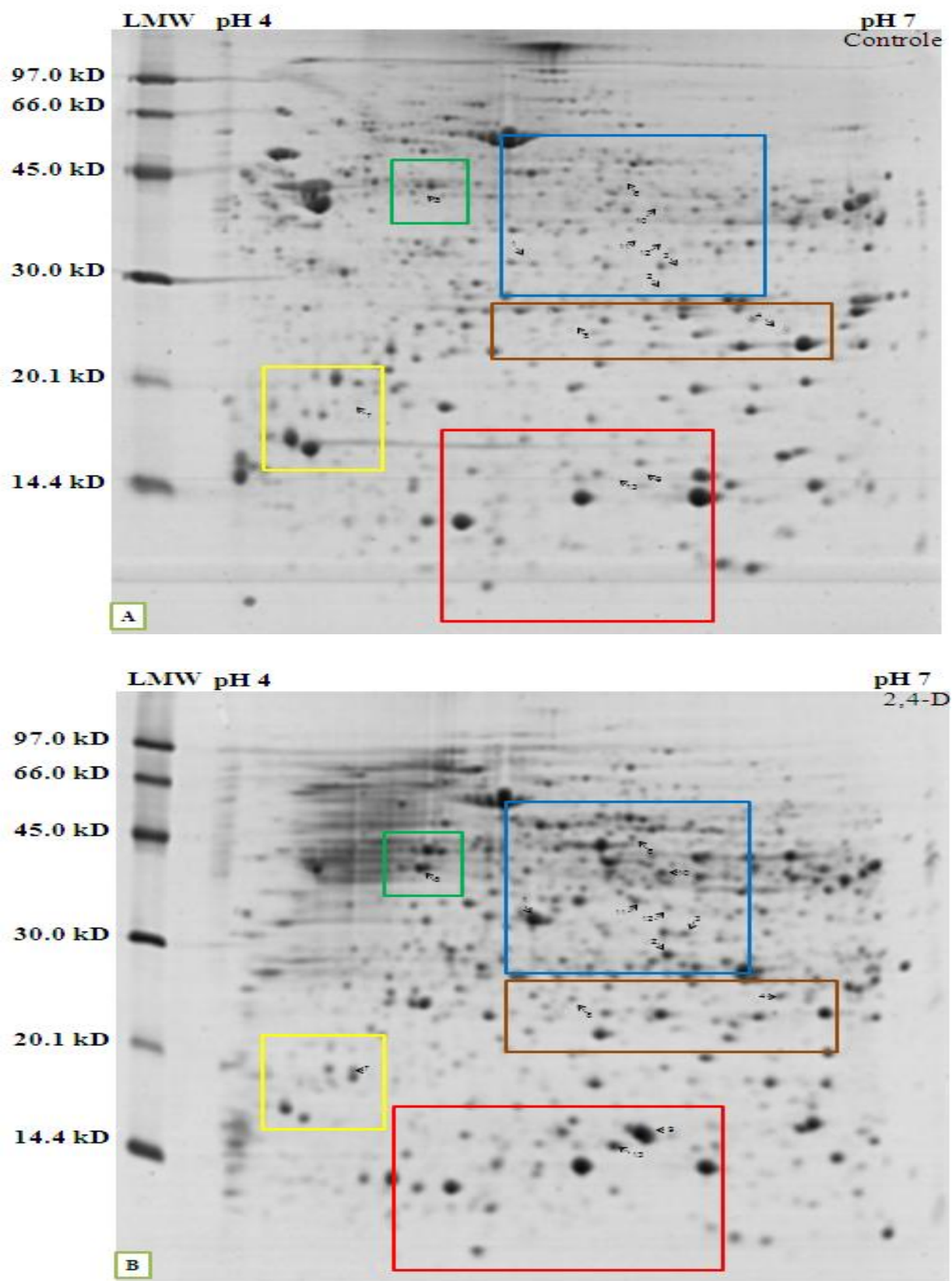
Os valores de pI e MM calculados pelo programa *ImageMaster*[®] de cada *spot* diferencialmente expresso foi utilizado para identificar possíveis proteínas no banco de dados *UniProt* disponível no servidor *ExPASy*. Para tanto ao utilizar esse banco de dados foi feita restrição ao táxon *Burkholderia* e palavra-chave citoplasma, para a busca ser mais ser direcionada, uma vez que o organismo em estudo pertence a esse gênero e as proteínas extraídas localizam-se no interior da célula.

Figura 17 – Géis 2DE de referência para condição em estudo mostrando proteínas que apresentaram diferença quantitativa de expressão.



A – Gel de referência controle. **B** – Gel de referência tratamento. As setas representam os *spots* nos géis que teve o nível de expressão alterado. Para melhor ilustração os *spots* que apresentaram níveis de expressão alterados foram separados dos de mais por quadrantes.

Figura 18 – Géis 2DE de referência para condição em estudo mostrando proteínas que apresentaram diferença qualitativa de expressão.



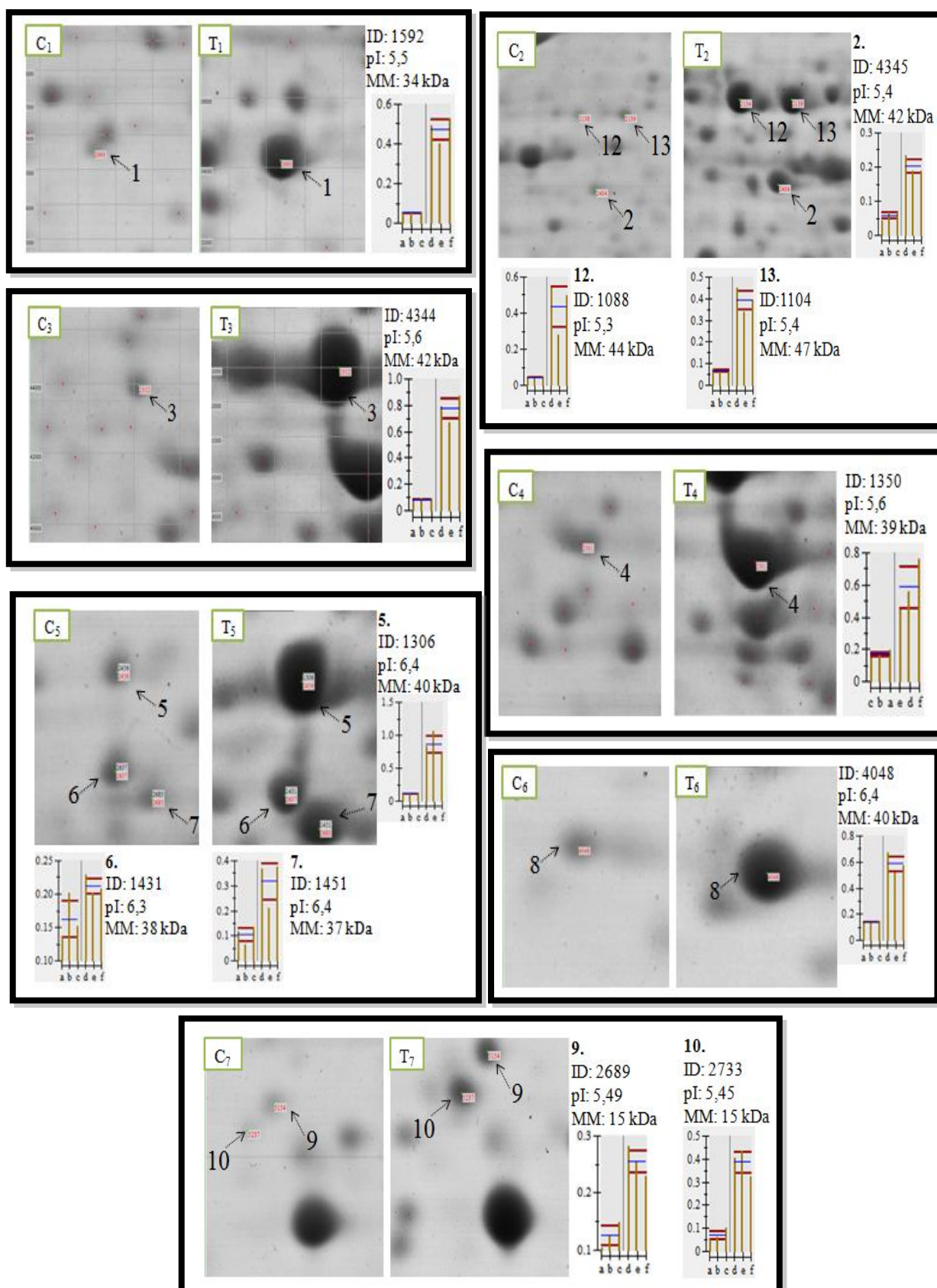
A – Gel de referência controle. **B** – Gel de referência tratamento. As setas representam os *spots* nos géis que teve o nível de expressão alterado. Para melhor ilustração os *spots* que apresentaram níveis de expressão alterados foram separados dos de mais por quadrantes..

4.6.4.1 Análise quantitativa da expressão dos spots nos géis

Na Figura 19 encontram-se as regiões dos géis de referência para a condição controle (C) e tratamento (T) correspondente a cada *spot* que teve sua expressão quantitativa aumentada na presença de 2,4-D comparado com o controle. Do lado direito da região de cada classe de gel comparada pode ser observado um histograma para aquele *spot* correspondente. Quando uma região apresentava mais de um *spot* os histogramas foram numerados (no topo) com o mesmo número de identificação do *spot* dentro da região do gel.

As quinze proteínas que apresentaram diferenças quantitativas e identificadas no banco de dados *ExPASy* pertencem à categoria funcional molecular de oxidoreductase, fator de alongação, transferase, aminotransferase/transferase, quinase/transferase, ligante de ATP, ligase, hidrolase e aciltransferase/trasferase (Tabela 11). A categoria funcional que apresentou maior número de proteínas nos géis foi a transferase, seguida por hidrolase.

Figura 19 - Regiões dos géis de referência para a condição controle (C) e tratamento (T) correspondente a cada spot que teve sua expressão quantitativa aumentada na presença de 2,4-D comparado com o controle.



As setas e os números na região do gel mostram os *spots* que apresentaram alterações quantitativas nos níveis de expressão. ID, pI e MM corresponde a identificação, ponto isoelétrico e massa molecular, respectivamente do *spot* referência da condição tratada.

Tabela 11 - Proteínas intracelulares de *Burkholderia mimosarum* SMF 07 com alterações quantitativas no nível de expressão identificadas com base no banco de dados *UniProt*.

Nº <i>spot</i>	Proteína	Função Molecular	Nº de acesso
1	Coproporfirinogênio-III oxidase	Oxidoreductase	HEM6_BURCM (Q0BD83)
2	Fator alongação-TU	Fator de alongação	EFTU_BURCA (Q1BRT3)
3	tRNA-específico 2-tiouridilase	Transferase	MNMA_BURCH (A0K4M4)
4	Fosfoserina aminotransferase	Aminotransferase/transferase	SERC_BURVG (A4JCH1)
5	Glutamato 5-quinase	Quinase/transferase	PROB_BURTA (Q2SZF9)
6	tRNA 2-tiocitidina biosíntese	Ligante de ATP	TTCA_BURP8 (B2JIL8)
7	L-treonina 3-desidrogenase	Ligante de ATP	TDH_BURM1 (A9AR24)
8	Deoxiribose-fosfato aldolase	Liase	DEOC_BURCJ (B4ENZ2)
9	Fosforibosil-AMP ciclohídrólase	Hidrolase	HIS3_BURMS (A1V8H6)
10	Fosforibosil-AMP ciclohídrólase	Hidrolase	HIS3_BURP1 (Q3JN03)
11	Fosforibosil-ATP pirofosfatase	Hidrolase	HIS2_BURM9 (A2S756)
12	Elongação-TU	Fator de alongação	AROA_BURXL (Q13VC2)
13	UDP-N-acetilmuramate-L-alanina ligase	Ligase	MURC_BURA4 (B1YSS5)
14	Coproporfirinogênio-III oxidase	Oxidoreductase	HEM6_BURCC (B1JW43)
15	Octonoiltransferase	Aciltransferase/transferase	LIPB_BURVG (A4JI72)

A coproporfirinogênio-III oxidase foi identificado nos géis em análise (Figura 19 C₁ e T₁). É uma enzima na biossíntese do heme. O heme está envolvido no metabolismo oxidativo, incluindo resposta de estresse oxidativo, reações de oxigenação e desintoxicação e ajuda na adaptação metabólica de procariontes em resposta a hipóxia (RODGERS, 1999).

O *spot* de número dois e doze (Figura 19 C₂ e T₂) correspondem ao fator de alongação Tu (EF-Tu). Essa enzima atua na ligação do aminoacil-tRNA ao sítio A do complexo ribossomal, ou seja, está envolvido na adição de aminoácidos durante a tradução de mRNA, para tanto o EF-Tu tem que está complexado com GTP (MILLER; WEISSBACH, 1977; LODISH *et al.*, 2000). O aumento da expressão dessa proteína pode estar relacionado com a necessidade de produção das outras proteínas responsivas a presença de 2,4-D.

O *spot* de número quatro (Figura 19 C₄ e T₄) foi identificado como fosfoserina aminotransferase uma enzima que está envolvida na biossíntese de L-serina em muitos organismos incluindo bactéria. L-serina é um intermediário chave em muitas vias metabólicas importantes e é a principal unidade de fonte de carbono em vários indivíduos (ICHIHARA;

GREENBERG, 1957; BASURKO *et al.*, 1999; HESTER *et al.*, 1999). A regulação positiva dessa proteína poderia ser ocasionada pela necessidade de L-serina, sendo esta utilizada como monômero para formação de proteínas que possam esse aminoácido em sua sequência.

A enzima glutamato-5-quinase (*spot* cinco, Figura 19 C₅ e T₅) está envolvida na biossíntese de prolina a partir de glutamato. O acúmulo de prolina em procariontes e eucariontes, está relacionado não apenas como aminoácido de proteínas, mas também como um osmólito e seu acúmulo facilita o crescimento bacteriano em osmolaridades elevadas (CSONKA, 1981; CSONKA; HANSON, 1991; LEISINGER, 1996).

A L-treonina 3-desidrogenase, *spot* 7 (Figura 19 C₅ e T₅), está envolvida na via mais comum para o catabolismo de L-treonina. L-treonina tem sido relatada como única ou principal fonte de carbono e nitrogênio para o crescimento de várias bactérias isoladas de solo. O catabolismo de L-treonina por L-treonina 3-desidrogenase é raramente encontrada em microrganismos, mas tem sido descrito em estudo com bactérias (BELL; TURNER, 1976; BELL; TURNER, 1977).

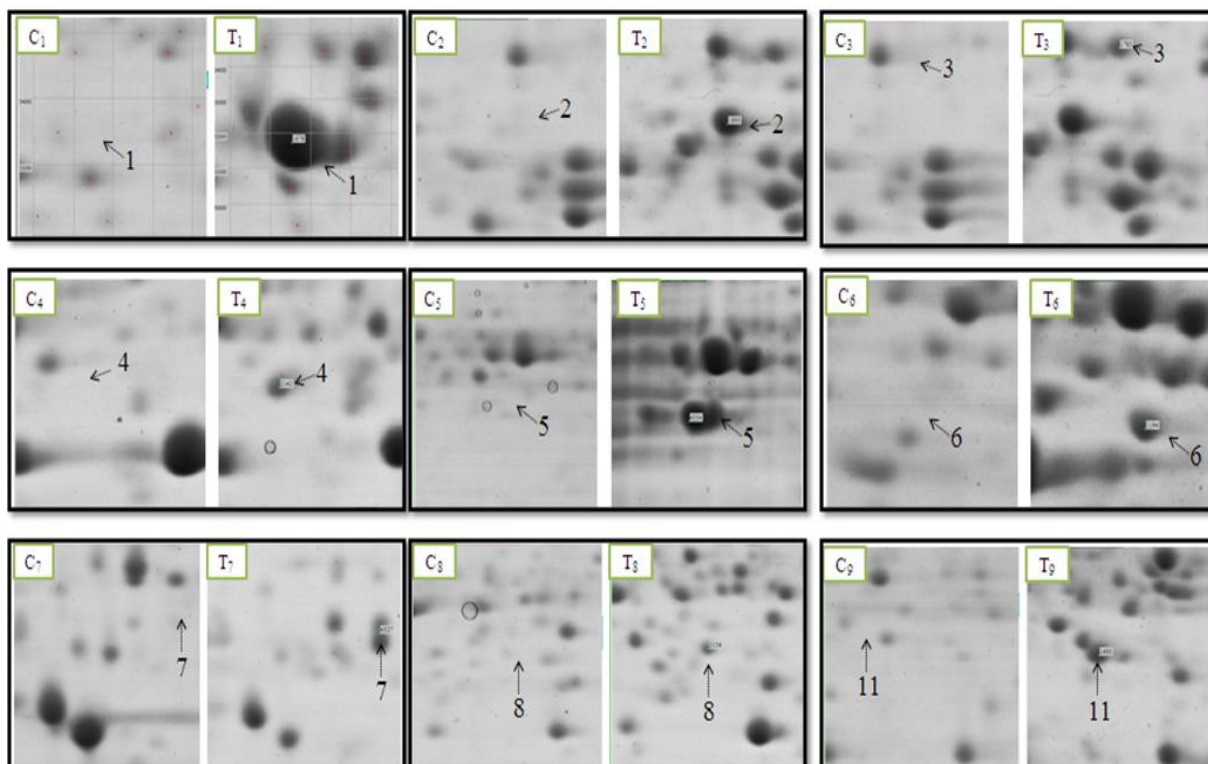
Com base nos resultados obtidos surge como hipótese que o aumento quantitativo no nível de expressão das proteínas envolvidas em várias funções moleculares identificadas possa estar relacionado à capacidade da *Burkholderia mimosarum* SMF 07 em aumentar a sua proteção celular a fim de crescer na presença do 2,4-D bem como de biodegradar o herbicida.

4.6.4.2 Análise qualitativa da expressão dos spots nos géis

Na Figura 20 encontram-se as regiões dos géis de referência para a condição controle (C) e tratamento (T) correspondente a cada *spot* que foi induzido sua expressão na presença de 2,4-D comparado com o controle.

As treze proteínas que tiveram sua expressão induzida foram identificadas no banco de dados *UniProt* apresentando categoria funcional molecular de quinase/transferase, oxidoreductase, isomerase, glicosiltransferase/transferase, ligase, hidrolase, chaperona, isomerase/transferase e acetiltransferase/transferase (Tabela 12). A categoria funcional na análise qualitativa que apresentou maior número de proteínas nos géis foi a transferase, seguida por hidrolase e chaperona.

Figura 20 - Regiões dos géis de referência para a condição controle (C) e tratamento (T) correspondente a spot que teve sua expressão qualitativa induzida na presença de 2,4-D comparado com o controle.



As setas e os números na região do gel mostram os *spots* que tiveram sua expressão induzida. ID, pI e MM corresponde a identificação, ponto isoelétrico e massa molecular, respectivamente do *spot* referência da condição tratada.

Tabela 12 - Proteínas intracelulares de *Burkholderia mimosarum* SMF 07 com alterações qualitativas no nível de expressão identificadas com base no banco de dados *UniProt*

Nº <i>spot</i>	Proteína	Função Molecular	Nº de acesso
1	Acetilglutamato quinase	Quinase/transferase	ARGB_BURCH (A0KBG7)
2	Dihidrodipicolinato redutase	Oxidoreductase	DAPB_BURM1 (A9AHB2)
3	Diaminopimelate epimerase	Isomerase	DAPF_BURMA (Q62EZ3)
4	ATP Fosforibosiltransferase	Glicosiltransferase/transferase	HIS1_BURVG (A4JAW2)
5	Enolase	Liase	ENO_BURMS (A1V5K2)
6	Imidazolonepropionase	Hidrolase	HUTI_BURCH (A0K8U2)
7	Chaperona (secB)	Chaperona	SECB_BURCM (Q0BBK8)
8	Chaperona (ureF)	Chaperona	UREF_BURM1 (A9AF74)
9	Fosforibosil-AMP ciclohidrolase	Hidrolase	HIS3_BURCA (Q1BS32)
10	5-adenosilmetionina: tRNA ribosiltransferase-isomerase	Isomerase/transferase	QUEA_BURXL (Q145H9)
11	3-oxoacil-[acilcarrier-proteína] sintase 3	Acetiltransferase/transferase	FABH_BURCH (A0K5U6)
12	Polifosfato/ATP-NAD inorgânico	Quinase/transferase	PPNK_BURTA (Q2SZ01)
13	Fosforibosil-AMP ciclohidrolase	Hidrolase	HIS3_BURCH (A0K3V9)

O *spot* um (Figura 20 C₁ e T₁) corresponde à enzima acetilglutamato quinase. Essa enzima está envolvida na via anabólica da L-arginina. Atua no substrato N-acetilglutamato formando N-acetil-g-glutamato fosfato mais ATP (UDAKA, 1966; CRABEEL *et al.*, 1979; PIETTE *et al.*, 1982).

A dihidrodipicolinato redutase (*spot* 2, Figura 20 C₂ e T₂) e diaminopimelato epimerase (*spot* 3, Figura 20 C₃ e T₃) são enzimas que atuam na biossíntese de L-lisina a partir de L-aspartato (SHEDLARSKY; GILVARG, 1970; SCAPIN; BLANCHARD, 1995). Essa via é exclusiva para microrganismos e plantas superiores. L-lisina é fundamental para a síntese da parede celular de bactérias (BLICKLING *et al.*, 1997).

A ATP fosforibosiltransferase (*spot* 4, Figura 20 C₄ e T₄) catalisa a primeira etapa da via da biossíntese de histidina em microrganismo (AMES *et al.*, 1961).

A enzima enolase (*spot* 5, Figura 20 C₅ e T₅) atua na nona reação da glicólise catalisando a desidratação reversível de 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato (SCHURIG *et al.*, 1995; BROWN *et al.*, 1998).

A principal via de degradação da histidina tanto em mamíferos como em bactérias é bastante conservada e estão envolvidas quatro enzimas principais histidase, urocanase, formiminoglutamase e imidazolonepropionase, esta última corresponde ao *spot* seis, Figura 20 C₆ e T₆ (BROWN; KIES, 1959; SNYDER *et al.*, 1961).

O *spot* sete (Figura 20 C₇ e T₇) foi identificado como sendo uma chaperona (secB) comum entre bactérias gram negativas que tem como função exportar proteínas do citoplasma para o exterior da célula bacteriana (THANASSI; HULTGREN, 2000). A desintoxicação microbiana induz ao transporte de pequenas moléculas, logo a um aumento na expressão de proteínas de transporte (STRAZIELLE; GHERSI-EGEA, 1999). Isso implica que essa proteína pode transportar metabólitos ou toxinas providas da biodegradação do 2,4-D.

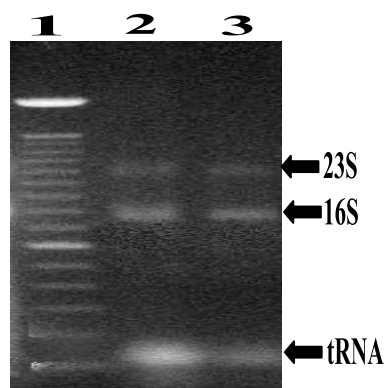
Tais achados sugerem que a partir da análise do proteoma de *Burkholderia mimosarum* SMF 07 exposta a 2,4-D quando comparado ao controle poderia elucidar o mecanismo como a bactéria se protege da toxicidade do herbicida e dar alguma visão para as enzimas “chave” na via de biodegradação desse composto recalcitrante.

4.7 Extração de RNA total

O RNA Total extraído para ser de boa qualidade tem que está íntegro. Além disso, o RNA Total deve estar puro. Segundo Sambrook e colaboradores (1989) e Souza (2006) a relação entre as absorvâncias 260/280 nm estima o grau de pureza do RNA. RNA Total diluído em água livre de RNase mantêm uma relação entre as absorvâncias 260/280 nm na faixa entre 1,5 e 1,9, enquanto RNA Total é diluído em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, mantêm a relação entre 1,8 e 2,1. Por sua vez, o perfil eletroforético do RNA Total íntegro, em gel de agarose 1,2%, deve mostrar um bandejamento dos RNAs ribossomais 23S e 16S correspondente aos tamanhos 2,9 e 1,5 Kb, respectivamente.

Uma vez que RNAs íntegros são requeridos para a obtenção de cDNAs de qualidade para análises de qRT-PCR, o perfil qualitativo (Figura) e quantitativo de RNA total (Tabela 13) de SMF 07 foi deduzido através da densidade óptica e de gel de agarose, respectivamente. A Figura 21, representa o perfil de RNA Total da SMF 07 crescida em meio de cultura TY sem poluente e em contato com 2,4-D, respectivamente, podemos tomar nota que foi obtido RNA Total de boa qualidade. Portanto, um RNA íntegro deve apresentar bandas bem definidas correspondentes às unidades ribossomais: 16S e 23S; sendo a presença de mRNA detectada por um *smear* que fica sob as bandas das unidades ribossomais; os RNAs de tamanho pequeno, como por exemplo RNA transportador (tRNA), corresponde a uma banda isolada no fim do arrastado. A Tabela 13 mostra o perfil quantitativo do RNA Total que foi obtido no padrão determinado, pois manteve uma relação entre as absorvâncias de 260/280 nm na faixa entre 1,5 a 1,9, uma vez que foi solubilizado com água livre de RNase.

Figura 21 - Padrão do perfil qualitativo do RNA total de *Burkholderia mimosarum* SMF 07 cultivada em meio TY, avaliado por eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta.



A raia 1: Marcador Molecular; as raias 2 e 3: RNA Total de *Burkholderia mimosarum*. SMF 07 crescida em meio TY na ausência e presença de 2,4-D, respectivamente.

Tabela 13 - Perfil quantitativo do RNA Totalde *Burkholderia sp.* SMF 07, crescida em meio TY na ausência e presença de 2,4-D

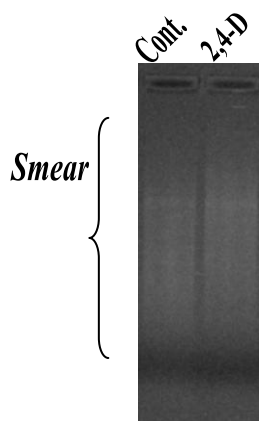
<i>Amostra</i>	<i>ABS</i> ¹ _{260/280}	<i>C</i> ² (ng/ μ L)
Controle 2,4-D	1,605-1,9	544-4090
2,4-D	1,503-1,9	662-4384

¹*ABS*: Absorbância; ²*C*: Concentração

4.8 Síntese do DNA complementar (cDNA)

As amostras de cDNA submetidas à reação de qRT-PCR foram analisadas tanto em relação ao perfil qualitativo e quantitativo por gel de agarose 1,2% e espectrofotometro (GenQuant, GE Healthcare), respectivamente. Foi obtido cDNA de boa qualidade, pois o perfil qualitativo e quantitativo mostram dentro do padrão estabelecido. Onde em gel de agarose 1,2% o cDNA tem que se apresentar como um *smear* característico da síntese de cDNA (Figura 22), correspondendo apenas a mRNA, sem as unidades ribossômicas como vistas no RNA Total, evidenciando que a transcriptase reversa foi eficiente. Na quantificação foi obtido concentração acima de 1000 ng/uL e relação entre as absorbâncias de 260/280 nm entre 1,7 e 2,0, dessa forma estando de boa qualidade para ser utilizado como *template* para qRT-PCR.

Figura 22 - Padrão do perfil qualitativo dos cDNAs de *Burkholderia sp.* SMF 07 cultivada em meio TY, avaliado por eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta.



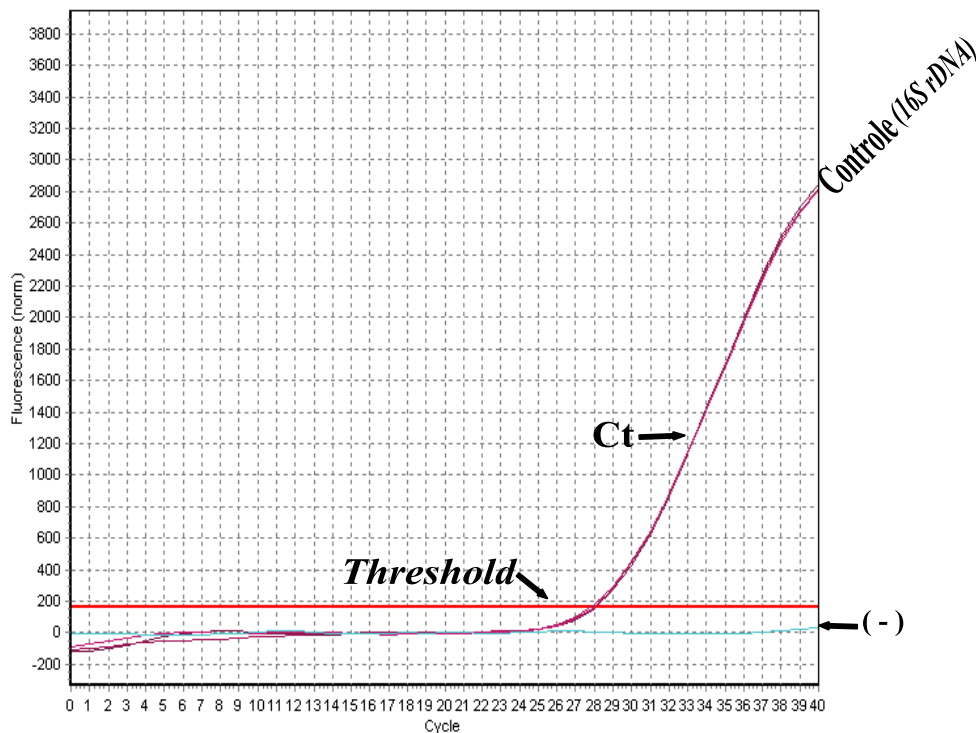
As raias 1 e 2 correspondem ao cDNA de *Burkholderia sp.* SMF 07 crescida em meio TY sem poluente (Cont.) e 2,4-D, respectivamente. *Smear* – corresponde ao arrastado nas raias que corresponde aos cDNAs após a transcriptase reversa.

4.9 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) e análise da expressão relativa

A qRT-PCR permite a quantificação da expressão de genes induzidos em resposta a diferentes condições, é a instrumentação mais confiável e tecnologia de referência para a detecção e/ou comparação dos níveis de RNA (BUSTIN *et al.*, 2005). Sendo a quantificação da expressão dos genes nesse estudo feita de forma relativa, uma vez que foi comparada a expressão de um grupo exposto a uma condição a um grupo não exposto, definido como grupo controle (ZARLENGA; HIGGINS, 2001).

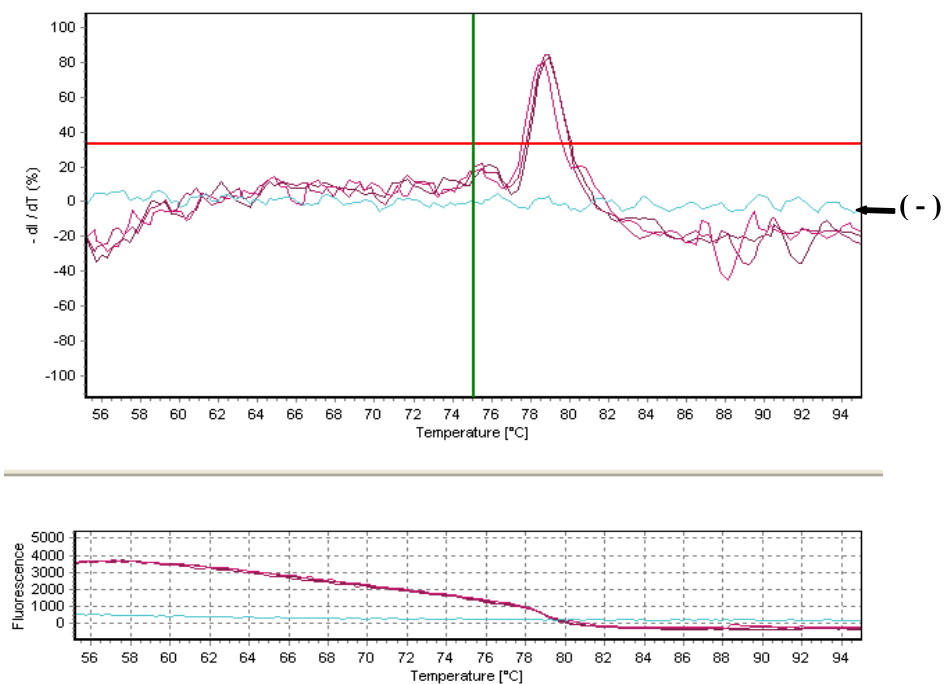
Depois de ter testado os *primers* para qRT-PCR, pode ser feito a PCR em tempo real quantitativa usando os qRT-*primers*: q-tfdB F/R e q-Burk 16S F/R. O cDNA sintetizado a partir do RNA Total da *Burkholderia sp.* SMF 07, estirpe que apresentou melhor resultado no teste de *primers*, foi usado como DNA *template*. Os Cts (*Cycle Threshold*) apresentaram quase sobrepostos e picos bem elevados, dessa forma a qRT-PCR apresentou um bom resultado em relação a expressão dos genes 16S rRNA (Figura 23 - controle e 25 - tratamento) e tfdB (Figura 27 - controle e 29 - tratamento), pois a especificidade de amplificação pode ser notada através da curva de amplificação, dessa forma não foi constatado nenhuma formação de dímeros. A curva de amplificação mostra a fluorescência emitida por cada amostra a cada ciclo da reação permitindo identificar com precisão o ciclo que a amostra atinge o limiar da fase exponencial, Ct (NOVAIS *et al.*, 2004). Esse ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseada na fluorescência para a avaliação da expressão relativa. A análise da curva de dissociação do produto amplificado (Curva de *Melting*) mostra se houve contaminação da amostra. Nessa curva analisa-se a fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura, o que possibilita determinar a temperatura de dissociação ou *melting temperature* (*T_m*) de cada fragmento de DNA presente na reação de amplificação. Cada fragmento de DNA amplificado possui um *T_m* específico, o que permite a diferenciação dos produtos resultantes. Na análise realizada, observou-se apenas a formação de um pico, indicando a ausência de dímeros ou *amplicons* inespecífico tanto para o gene 16S rRNA (Figura 24 - controle e 26 - tratamento) e tfdB (Figura 28 - controle e 30 - tratamento). A análise da *T_m* é uma forma precisa e rápida de perceber *amplicons* inespecífico, mas não deve ser uma única fonte de confirmação de especificidade dos *primers*, uma vez que em alguns casos, *amplicons* diferentes podem apresentar comprimentos diferentes, porém a mesma temperatura de desnaturação, assim sendo indistinguíveis por essa análise.

Figura 23 - Curva de amplificação de qRT-PCR do gene 16S rRNA na ausência de 2,4-D.



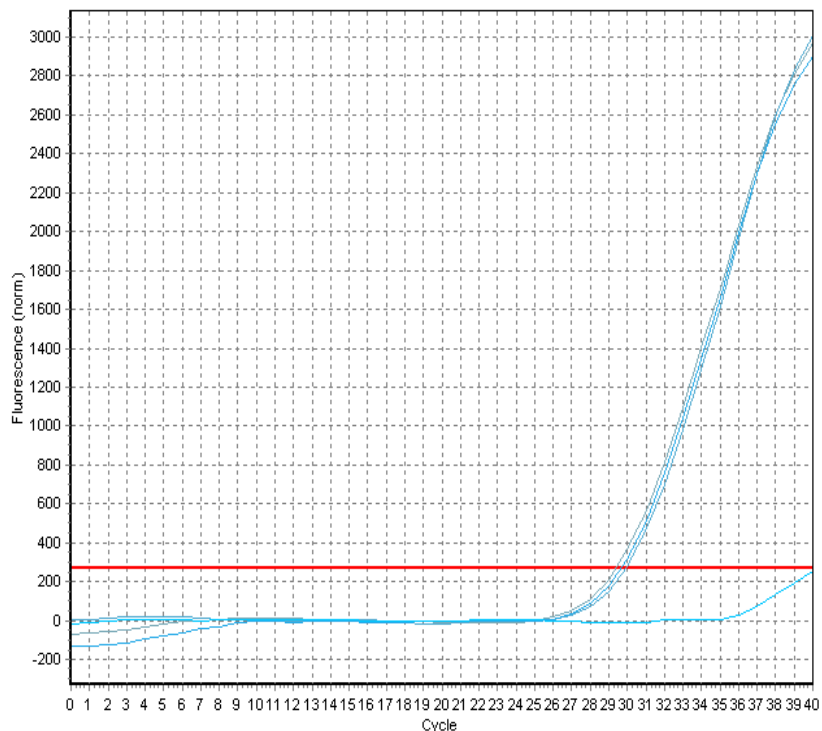
Ct - Cycle Threshold. Threshold – limiar de detecção. Controle Negativo da Reação (-), linha em azul.
Fonte: autora

Figura 24 - Curva de dissociação de qRT-PCR do gene 16S rRNA na ausência de 2,4-D.



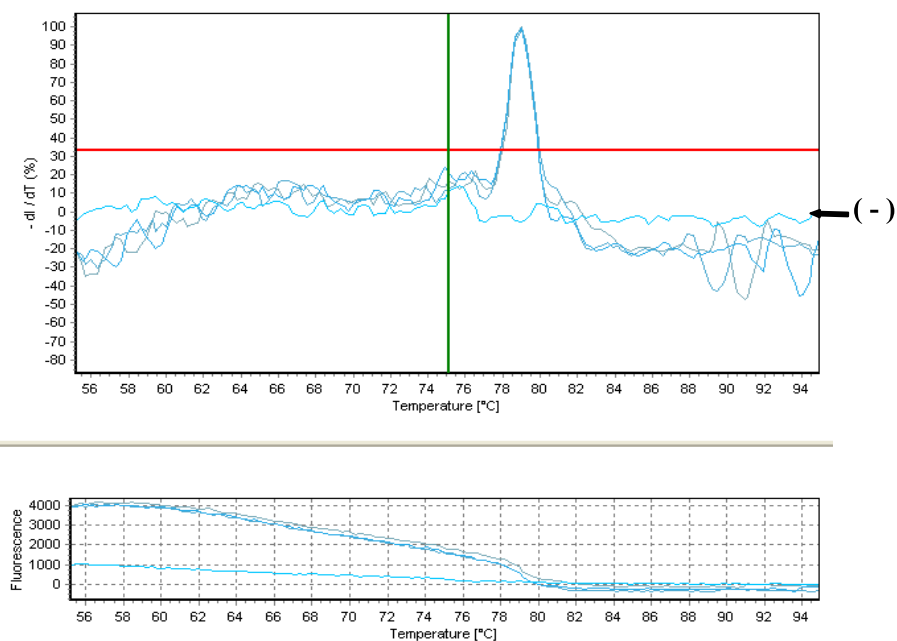
Picos em roxo correspondem ao controle do 2,4-D. Linha azul clara, controle negativo (-) da reação.
Fonte: autora

Figura 25 - Curva de amplificação de qRT-PCR do gene 16S rRNA na presença de 2,4-D.



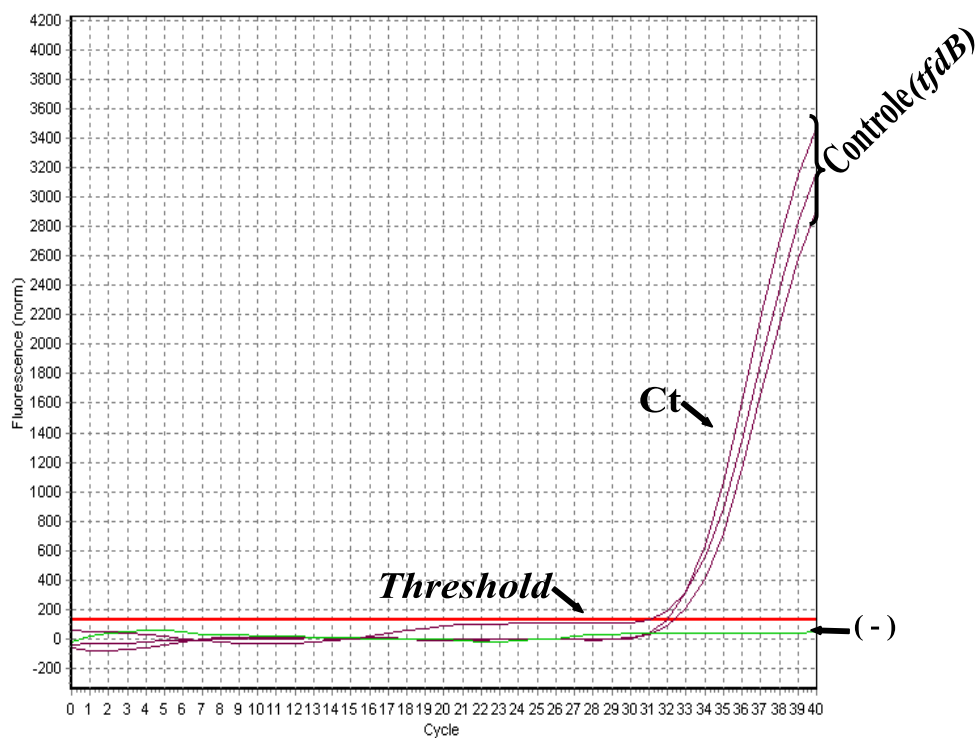
Ct - Cycle Threshold. Threshold – limiar de detecção. Controle Negativo da Reação (-), linha em azul abaixo do Threshold. Fonte: autora

Figura 26 - Curva de dissociação de qRT-PCR do gene 16S rRNA na presença de 2,4-D.



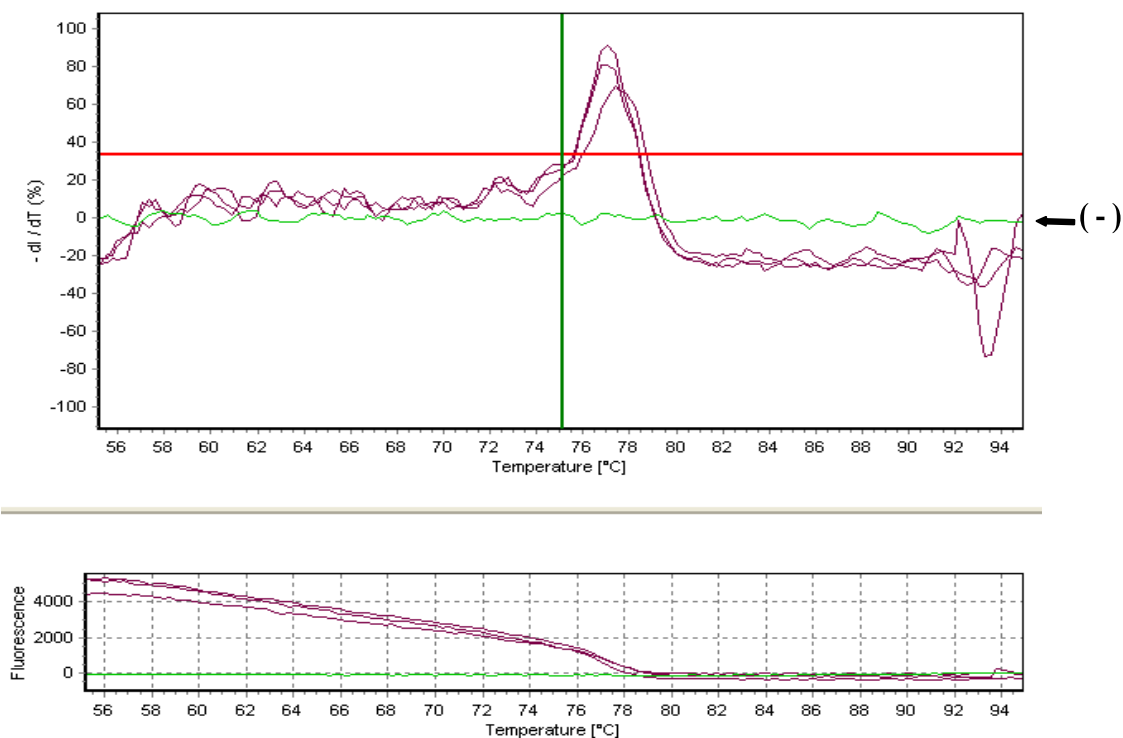
Picos em azul turquesa correspondem ao tratamento do 2,4-D. Linha azul clara, controle negativo (-) da reação. Fonte: autora

Figura 27 - Curva de amplificação de qRT-PCR do gene *tfdB*, na ausência de 2,4-D.



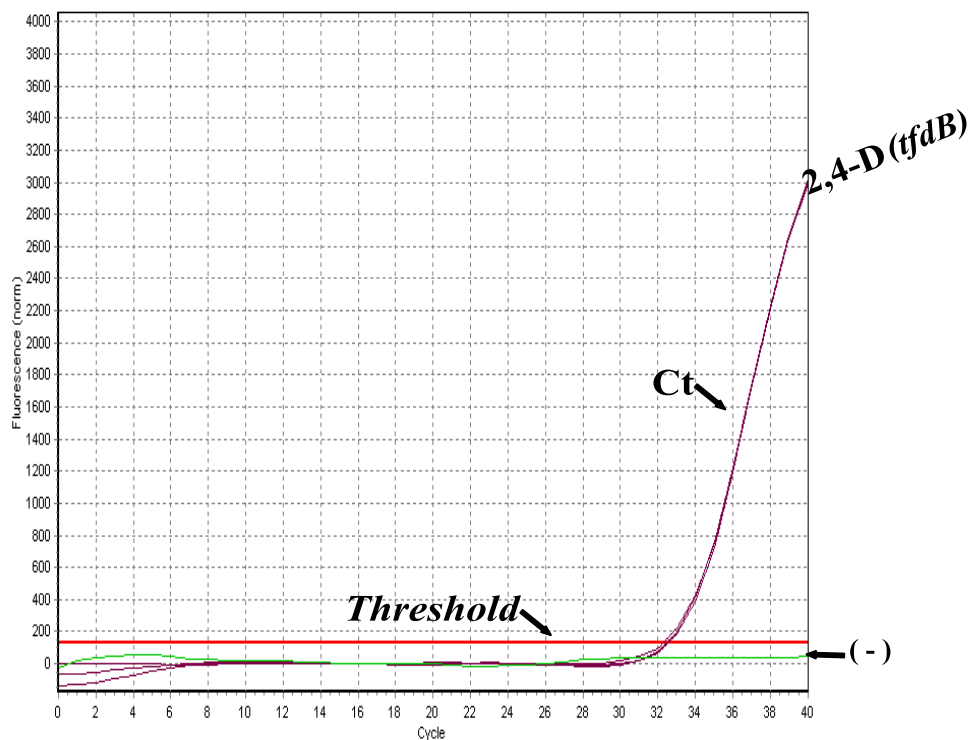
Ct - Cycle Threshold. Threshold – limiar de detecção. Controle negativo (-) da reação (-), linha em verde. Fonte: autora

Figura 28 - Curva de dissociação de qRT-PCR do gene *tfdB* na ausência de 2,4-D.



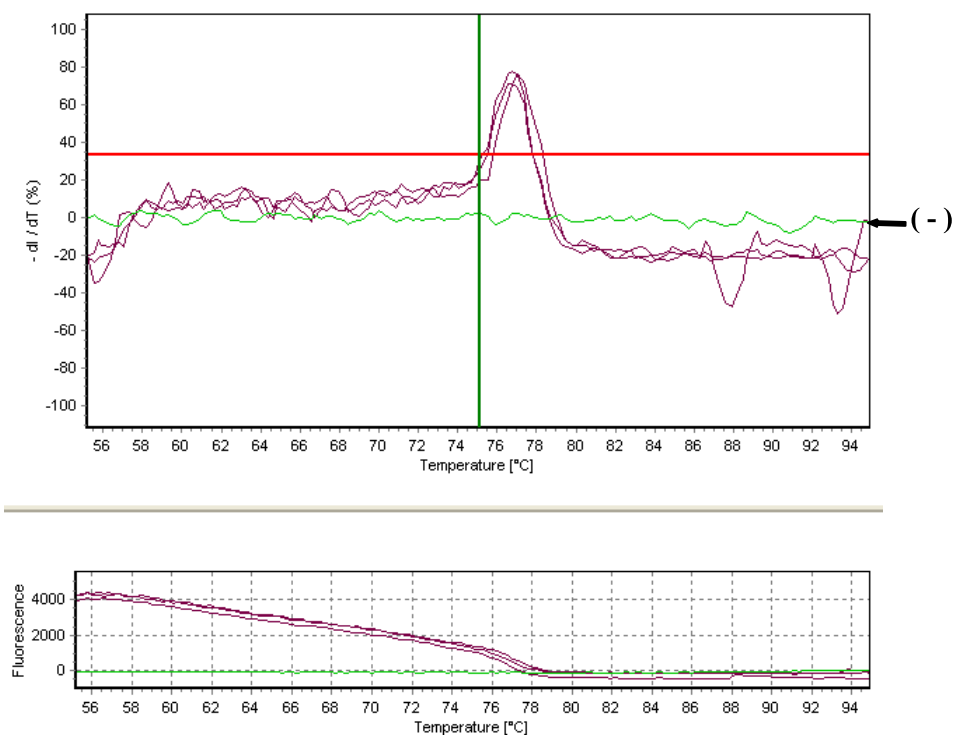
Picos em roxo correspondem ao controle do 2,4-D. Linha verde, controle negativo (-) da reação. Fonte: autora

Figura 29 - Curva de amplificação de qRT-PCR do gene *tfdB* na presença de 2,4-D.



Ct - Cycle Threshold. Threshold – limiar de detecção. Controle negativo (-) da reação, linha em verde. Fonte: autora

Figura 30 - Curva de dissociação de qRT-PCR do gene *tfdB* na presença de 2,4-D.



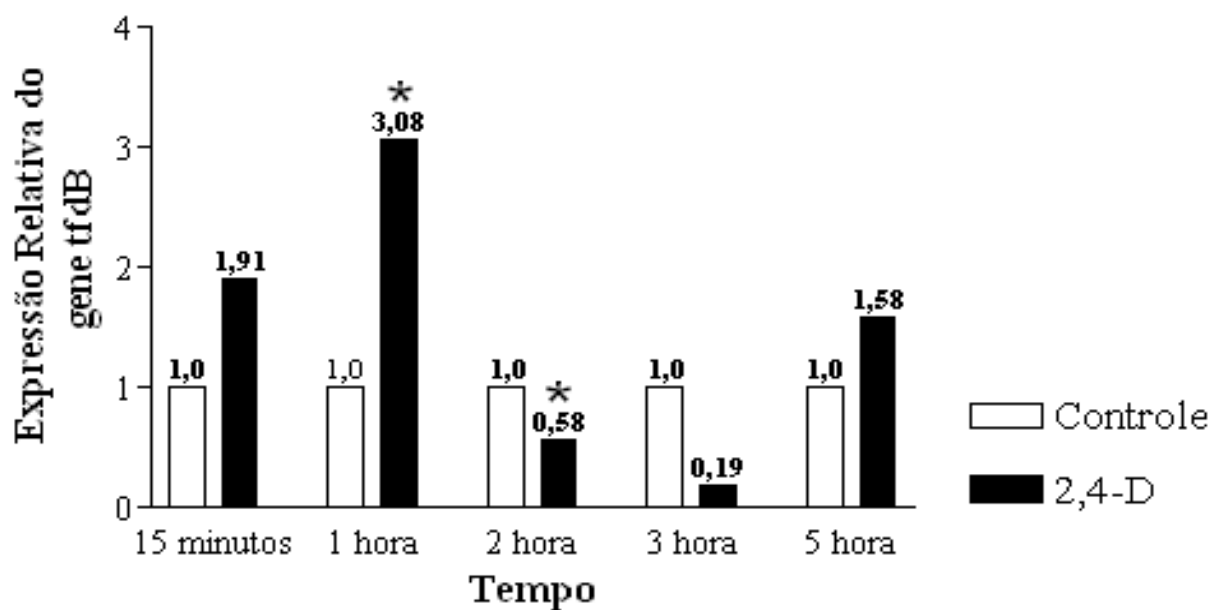
Picos em roxo correspondem ao tratamento com 2,4-D. Linha verde, controle negativo (-) da reação. Fonte: autora.

A análise de qRT-PCR indica que a expressão do *tfdB*, envolvido na via metabólica do 2,4-D (EPPINK *et al.*, 1999), aumentou cerca 100% após 15 minutos a adição do supracitado herbicida e 200% após uma hora. Nos tempos de duas e três horas verificamos uma redução na expressão do *tfdB*. Posteriormente, no tempo de cinco horas, verificamos uma nova regulação positiva que resultou em aumento de mais de 100% (Gráfico 8). A análise estatística revelou que apenas o aumento do *tfdB* detectado no tempo de uma hora foi significativo. Contudo, vale salientar que os dados obtidos nos outros tempos demonstraram uma tendência de regulação positiva do gene estudado. Harker e colaboradores (1989), ressaltam que a família de genes *tfdABCDEF* faz parte da via metabólica envolvido na degradação do ácido 2,4-fenoxiacético caracterizado em *Wautersia eutropha* JMP134 (atual *Ralstonia eutropha* JMP134). Sendo o gene *tfdB* que codificante para a enzima 2,4-diclorofenol (EPPINK *et al.*, 1999; ELLIS *et al.*, 2006), O *tfdB* está inserido no plasmídio pJP4, primeiramente isolado na Austrália, a partir de *Ralstonia eutropha* JMP134. Esse plasmídio contém a família de genes *tfd* da via de degradação do 2,4-D, sendo essa via a única completamente caracterizada para a biodegradação desse organoclorado (DON; PEMBERTON, 1981). No entanto Suwa e colaboradores (1996) em seus estudos relataram que a família de genes *tfd* está presente em cromossomo de *Burholderia sp.* RASC e comparando o gene *tfdA* com o de *Ralstonia eutropha* JMP134 corresponde a 78,5 % de similaridade para as sequências nucleotídicas e em relação a sequência de aminoácidos a similaridade aumenta para 80,5 %. Isso evidencia que independente do cluster genérico e da localização, plasmídial ou cromossômica, esses genes estão correlacionados com a via de degradação do 2,4-D. Essas observações sugerem que a via de degradação do 2,4-D tem origem diversas e não se restringindo ao plasmídeo, mas também estando presente no cromossomo bacteriano. Além disso, a similaridade dos genes mencionados indica uma possível homologia.

Os níveis celulares da expressão gênica, bem como seus produtos, se elevam e caem em resposta a sinais moleculares (NELSON; COX, 2002). Dessa forma, é sugerido que a presença de 2,4-D induz a expressão gênica do *tfdB* e quando há amplo suprimento do produto gênico, enzima 2,4-diclorofenol hidroxilase, leva à repressão desse gene e por consequência a diminuição nos níveis transcricionais da envolvida da via de biodegradação do 2,4-D pela bactéria, esse decaimento dos níveis de expressão gênica pode ser observado no tempo de 2 e 3 horas (Gráfico 8) após a adição do herbicida. O aumento detectado no tempo de cinco horas após a adição do herbicida, cinco horas de crescimento, pode ser explicado pela presença persistente do 2,4-D neste tempo. Um dos indícios para essa afirmação é análise da curva de crescimento que demonstra a dificuldade da bactéria em desenvolver os índices de crescimento

semelhantes ao controle. Assim, podemos pressupor que o 2,4-D existente desencadeou novos sinais moleculares de indução a expressão gênica, resultando no aumento observado.

Gráfico 8 – Expressão relativa de *Burkholderia mimosarum* SMF 07 em resposta ao tempo de contato com 2,4-D. Análise estatística Mann-Whitney e $*p < 0,05$.



5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base na análise dos resultados obtidos desse trabalho podemos concluir que:

- Foi possível identificar a partir de uma coleção de beta-rizóbios uma bactéria, *Burkholderia mimosarum* SMF 07, que apresentou tolerância à toxicidade do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético;
- É possível a extração de boa qualidade do RNA Total de *Burkholderia* e a funcionalidade dos *primers* mostra que a cepa de *Burkholderia sp.* SMF07 apresenta gene, *tfdB*, envolvidos na via metabólica de 2,4-D, dessa forma sendo possível mensurar a expressão desse gene que aumentou sua expressão ao crescer essa estirpe em meio contendo 2,4-D, indicando a sua importância na biodegradação deste importante poluente ambiental;
- É possível utilizar uma metodologia reprodutível para eletroforese bidimensional a fim de determinar o genoma funcional de *Burkholderia mimosarum* SMF 07 em condições normais e estresse na presença de 2,4-D. Dessa forma sendo possível identificar qualitativamente e quantitativamente as proteínas que apresentaram diferenças de expressões pela bactéria em estudo através do banco de dados *UniProt* disponível no servidor *ExPASy*, sendo as proteínas identificadas em maior abundância da categoria funcional transferase e hidrolase.

A partir desses resultados será possível utilizar a *Burkholderia mimosarum* SMF 07 como uma ferramenta de aplicação biotecnológica na biorremediação de ambientes contaminados com 2,4-D, uma vez que essa bactéria apresenta tolerância à toxicidade do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético e conseqüentemente pode ter potencial para biorremediação de compostos químicos em especial o herbicida estudado. É necessária a realização de novos estudos nesta área, como técnicas moleculares para identificação de genes e proteínas-chave para determinar a via metabólica presentes nesses organismos envolvidos na biorremediação destes compostos.

6 COLABORADORES

Este trabalho foi realizado com tais apoios:

Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior – CAPES

Universidade Federal do Ceará – UFC

Faculdade de Medicina de Sobral – FAMED

Núcleo de Biotecnologia de Sobral – NUBIS

Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas – Biomol Lab

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Agrobiologia) – EMBRAPA Agrobiologia

Laboratório de Imunologia e Bioquímica de Sobral – LIBS

REFERÊNCIAS

- ACHOUAK, W.; CHRISTEN, R.; BARAKAT, M.; MARTEL, M. H.; HEULINL, T. *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.787-794, 1999.
- AMANN, R.; LUDWIG, W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **FEMS Microbiology**, v. 24, p. 555-565, 2000.
- AIZAWA, T.; VIJARNORM, P.; NAKAJIMA, M.; SUNAIRI, M. *Burkholderia bannensis* sp. nov., an acidneutralizing bacterium isolated from torpedo grass (*Panicum repens*) growing in highly acidic swamps. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.61, p.1645–1650, 2011.
- ALMEIDA, F. S.; RODRIGUES, B. N. **Guia de herbicidas**. 2.ed. Londrina: ALMEIDA e RODRIGUES, 1988. p. 75-217.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.
- ALVES FILHO, J. P. **Uso de agrotóxicos no Brasil controle social e interesses corporativos**. São Paulo: Annablume, 2002. 188p.
- AMARANTE JÚNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; NUNES, G. S.; RIBEIRO, M. L. **Breve revisão de métodos de determinação de resíduos do herbicida ácido 2,4-Diclorofenoxiacético(2,4-D)**. Química Nova, v.26, 2003.
- AMES, B. N.; MARTIN, R.G.; GARRY, B. J. The first step of histidine biosynthesis, **J. Biol. Chem.**, v. 236, p.2019-2026, 1961.
- ANDERSON, L.; SEILHAMER, J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 18, n. 3-4, p. 353-357, 1997
- ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas: guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola**. São Paulo: Andrei, 1985.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária **Reavaliação de agrotóxico: 10 anos de proteção à população**. Brasília, 2 de abril de 2009. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/020409.htm>> Acesso em: 10 abril 2012.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Brasil é referência na América Latina**. Brasília, 9 de dezembro de 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/091208_link.htm> Acesso em: 10 janeiro 2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Cartilha sobre Agrotóxicos: Série Trilhas do Campo**. 19 de setembro de 2011a. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9e0b790048bc49b0a4f2af9a6e94f0d0/Cartilha.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso: 16 de janeiro de 2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **PROGRAMA DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS (PARA)** 05 de dezembro de 2011b. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b380fe004965d38ab6abf74ed75891ae/Relat%C3%B3rio+PARA+2010+-+Vers%C3%A3o+Final.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso: 16 de janeiro de 2012.

ARAÚJO, A. S. F. **Biodegradação, extração e análise de glifosado em dois tipos de solos**. 2002. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura de Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

AZIZ, M. H.; AGRAWAL, A. K.; ADHAMI, V. M.; SHUKLA, Y.; SETH, P. K. Neurodevelopmental consequence of gestacional exposure (GD14-GD20) to low doses of deltamethrin in rats. **Neuroscience Letters**, v.300, n. 3 p.161-165, 2001.

BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Sussex, v.80, n.7, p.723-736, 2005.

BARBERÁ, C. **Pesticidas agrícolas**. Barcelona, Espanha: Omega, 1976. 604p.

BARBOSA L, C, D. **Os pesticidas o homem e o meio Ambiente**. Viçosa: Editora UFV; 2004.

BASURKO, M. J.; MARCHE, M.; DARRIET, M.; CASSAIGNE, A. Phosphoserine aminotransferase, the second step-catalyzing enzyme for serine biosynthesis. **IUBMB Life.**, v. 48, p. 525–529, 1999.

BELL, S. C.; TURNER, J. M. Bacterial catabolism of L-threonine. Threonine degradation initiated by L-threonine hydrolyase (deaminating) in a species of *Corynebacterium*. **Biochem. J.**, v. 164, p. 579–587. 1977.

BELL, S. C.; TURNER, J. M. L-Threonine catabolism via aminoacetone: a search for a pathway in bacteria. **Biochem Soc Trans.**, v. 4(3), p. 497–500, 1976.

BENNDORF, D.; BALCKE, G. U.; HARMS, H.; VON BERGEN, M. Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater. **ISME J.** v.1, p.224–234. 2007.

BENOIT, P.; BARRIUSO, E.; SOULAS, G. Degradation of 2,4-D, 2,4-Dichlorophenol, and 4-Chlorophenol in soil after sorption on humified and nonhumified organic matter. **J. Environ. Quality**, v. 28, p. 1127-1135, 1999.

BHAT, M. A.; TSUDA, M.; HORIIKE, K.; NOZAKI, M.; VAIDYANATHAN, C.S.; NAKAZAWA, T. Identification e characterization of a new plasmid carrying genes for

degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate from *Pseudomonas cepacia* CSV90. **Appl Env Microbiol.** v.60, p. 307–312, 1994.

BLICKLING, S.; RENNER, C.; LABER, B.; POHLENZ, H.; HOLAK, T.; HUBER, R. Reaction mechanism of *Escherichia coli* dihydrodipicolinate synthase investigated by X-ray crystallography and NMR spectroscopy. **Biochemistry.** v. 36, p. 24-33, 1997.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation Technologies. **Bioresource Technology,** Chicago, v.74, n.1, p.63-67, 2000.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal. Biochem,** v. 72, p. 248-254, 1976.

BREUGELMANS, P.; LEROY, B.; BERS, K.; DEJONGHE, W.; WATTIEZ, R.; DE MOT, R.; SPRINGAEL, D. Proteomic study of linuron and 3,4-dichloroaniline degradation by *Variovorax* sp. WDL1: evidence for the involvement of an aniline dioxygenase-related multicomponent protein. **Int. Research in Microbiology,** v.161, p. 208-218, 2010.

BROWN D. D.; KIES, M. W. The mammalian metabolism of L-histidine: II. The enzymatic formation, stabilization, purification, and properties of 4(5)-imidazolone-5(4)-propionic acid, the product of urocanase activity, **J. Biol. Chem.,** v. 234, p. 3188–3191, 1959.

BROWN, C. K.; KUHLMAN P. L.; MATTINGLY, S.; SLATES, K.; CALIE, P. J.; FARRAR; W. W. A model of the quaternary structure of enolases, based on structural and evolutionary analysis of the octameric enolase from *Bacillus subtilis*. **J. Protein Chem.,** v. 17, p. 855–866, 1998.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; NOLAN T.; PFAFFL, M. W. Quantitative real-time RT-PCR- a perspective. **J. Mol. Endocrinol,** v. 34, p. 597-601, 2005.

CAHILL, D. J.; NORDHOFF, E.; O'BRIEN, J.; KLOSE, J.; EICKHOFF, H.; LEHRACH, H. Bridging genomics and proteomics. In: PENNINGTON, S.R; DUNN, M.J (Ed.). **Proteomics from protein sequence to function.** BIOS Scientific Publishers Limited, 2001. p.1-22.

CALVERT, G. M.; ALARCON, W. A.; CHEMINSKI, A.; CROWLEY, M. S.; BARRETT, R; CORREA, A.; et al. Case Report: Three Farmworkers Who Gave Birth to Infants with Birth Defects Closely Grouped in Time and Place - Florida and North Carolina, 2004 - 2005. **Environ Health Perspect.** v. 115, p. 787–791, 2007.

CASH, F. Review: Characterization of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis. **Anal. Chim. Acta,** v. 372, p. 121-145, 1998.

CASH, P. Proteomics in medical microbiology. **Electrophoresis,** v. 21, p. 1187 – 1201, 2000.

CASH, P. Proteomics: the protein revolution. **Biologist,** v. 49, p. 58-62, 2002.

CASTRO, F. D. **Degradação do ácido fenoxiacético (2,4-D) com ozônio eletrogerado.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, 2010.

CASTRO, J. S. M.; CONFALONIERI, U. **Uso de agrotóxicos no Município de Cachoeiras de Macacu (RJ).** *Ciência & Saúde Coletiva*. v. 10, n. 2, p. 473-482, 2005.

CÉBRON, A.; NORINI, M. P.; BEGUIRISTAIN, T.; LEYVAL, C. Real-time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHDa) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. **J. Microbiol. Methods**. V. 73, 148-159, 2008.

CHABOUSSOU, F. **Plantas doentes pelo uso de agrotóxicos: a teoria da trofobiose.** 2. Ed. Porto Alegre: L&PM, 1987.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Caracterização genética de rizóbio isolados de solos no Amazonas baseada na técnica de PCR-RFLP. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**. v. 30, n. 4, p. 841-846, out./dez. 2009.

CHAVES, D. F. S. **Análise e identificação de proteínas celulares e proteínas secretadas por *Herbaspirillum seropedicae*.** 2008. 156f. Tese (doutorado em Ciências – Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

CHEN, P. Y.; POPOVIC, P. M. **Correlation.** London, Sage, 2002.

COENNYE, T.; HOLMES, B.; KERSTERS, K.; GOVAN, J. R. W.; VANDAMME, P. *Burkholderia cocovenerans* and *Burkholderia vandii* are junior synonyms of *Burkholderia gladiolo* and *Burkholderia plantarii*, respectively. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 49, p. 37-42, 1999.

COENNYE, T.; MAHENTHIRALINGAM, E.; HENRY, D.; LIPUMA, J. J.; LAEVENS, S.; GILLIS, M.; SPEERT, D. P.; VANDAMME, P. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1099-1107, 2001.

COENNYE, T.; GEVERS, D.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; SWINGS, J. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 29, p. 147-167, 2005.

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

CRABEEL, M.; CHARLIER, D.; CUNIN, R.; GLANSDORFF, N. Cloning and endonuclease restriction analysis of *argF* and of the control region of the *argECBH* bipolar operon in *Escherichia coli*. **Gene** 5., p. 207-231, 1979.

CSONKA, L. N. Proline over-production results in enhanced osmotolerance in *Salmonella typhimurium*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 182, p. 82-86, 1981.

CSONKA, L. N.; HANSON, A. D. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 45, p. 569–606, 1991.

DAUBARAS, D. L.; DANGANAN, C. E.; HUBNER, A.; YE, R. W.; HENDRICKSON, W.; CHAKRABARTY, A. M. Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by *Burkholderia cepacia* strain AC1100: evolutionary insight. **Gene**. v. 179, n.1, p.1-8. 1996.

DESAI, C.; PATHAK, H.; MADAMWAR, D. Advances in molecular and “-omics” technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites. **Bioresource Technology**. v. 101. p. 1558–1569. 2010.

DESAINT, S.; HARTMANN, A.; PAREKH, N.R.; FOURNIER, J. C. Genetic diversity of carbofuran-degrading soil bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 34, p. 173-180, 2000.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. O.; BALDANI, V.L.D. Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia. Seropédica. **Embrapa Agrobiologia**. v. 110, p.38,1999.

DON, R. H.; PEMBERTON, J. M.. Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. **Journal Bacteriology**. v. 145, p. 681-686. 1981.

ELLIS, L. B.; ROE, D.; WACKETT, L. P. The University of Minnesota Biocatalysis / Biodegradation database: The First Decade. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. 17-21. 2006.

EPPINK, M. H.; BUNTHOL, C.; SCHREUDER, H. A.; VAN BERKEL, W. J. Phe¹⁶¹ and ARG¹⁶⁶ variants of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase implications for NADPH recognition and structural stability. **FEBS letters**, v. 443, p. 241-255, 1999.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p.175-85, 1998.

FAIRBANKS, M. Defensivos agrícolas ampliam o mercado. **Revista Química e Derivados**. v. 396, p. 398-403, 2001.

FAO. **Control of water pollution from agriculture**. (FAO Irrigation and Drainage Papers, 55). 1996. Disponível em : <<http://www.fao.org/docrep/w2598e/w2598e00.htm>>. Acesso em: 25 jan. 2011.

FARIA, L. J. S. **Avaliação de diferentes sorventes na extração em fase sólida de pesticidas em água. Desenvolvimento e avaliação de metodologia**. 2004. 79f. Dissertação (Mestrado) – UNICAMP, Campinas, 2004.

FEDERATION OF AMERICAN SCIENTISTS. **National Programs Prior to and During World War II**. 2006. Disponível em <<http://www.fas.org/bwc/papers/review/wwii.htm>>. Acesso em: 27 jan. 2012.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p.783–791, 1985.

- FITCH, W. M. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. **Systematic Zoology**, v.20, p.406–416, 1972.
- FOLSOM, B. R.; CHAPMAN, P. J.; PRITCHARD, P. H. Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: kinetics and interactions between substrates. **Appl Env Microbiol**. v. 56. p. 1279–1285, 1990.
- FREITAS, V. R.; PICOLI, S.U. A Coloração de Gram e as Variações na sua Execução. **News Lab**. v.82, 2007.
- FRUMKIN, H. Agent Orange and Cancer: Na Overview for Clinicians. **Environmental Carcinogens**, v. 153, n. 4 , p. 245-255, 2003.
- FUKUMORI, F.; HAUSINGER, R. P. Purification and characterization of 2,4 dichlorophenoxyacetate / α -ketoglutarate dioxygenase. **Journal Biological Chemistry**. v. 268, n. 32. p. 24311-24317. 1993
- GAYLARD, C. C.; BELLINASSO, M. DE L.; MANFIO, G. P. Biorremediação. **Aspectos biológicos e técnicos da remediação de xenobióticos**. 2005.
- GEE, J. E.; GLASS, M. B.; LACKNER, G.; HELSEL, L. O.; DANESHVAR, M.; HOLLIS, D. G.; JORDAN J.; MOREY, R.; STEIGERWALT, A.; HERTWECK, C. Characterization of *Burkholderia rhizoxinica* and *B.endofungorum* Isolated from Clinical Specimens. **PLoS ONE**6, p.15731-15731, 2011.
- GILLIS, M.; VAN, T. V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M. P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N_2 -fixing isolates from rice in Vietnam. **Int J Syst Bacteriol**, v. 45, p. 274–289, 1995.
- GÓIS; WEBER. UMA ABORDAGEM DE RELACIONAMENTO NO ENSINO DE BIOLOGIA COM AS QUESTÕES AMBIENTAIS. **Revista Eletrônica do CEspEdAmb-CCR/UFSM**, Santa Catrina, nº 2, 2011. Disponível em: <<http://cascavel.ufsm.br/revistas/ojs-2.2.2/index.php/remoa/article/view/2771/1612>>. Acesso em: 16 jul. 2011.
- GOLOVLEVA, L. A.; PERTSOVA, R. N.; EVTUSHENKO, L. I.; BASKUNOV, B. P. Degradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by a *Nocardioides simplex* culture. **Biodegradation**, v. 1, p. 263–271, 1990.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, n.8, p.195-202, 1998.
- GUEDES, S. F. **Estudo da biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, um herbicida selectivo amplamente utilizado na agricultura, por uma estirpe de *penicillium***. 2010. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) – Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 2010.
- GWYNNE, D. C.; MURRAY, R.B. **Weed biology and control in agriculture and horticulture**. London: Batsford. Academic and Educational, 1985. 258p.

HARKER, A. R.; OLSEN, R. H.; SEIDLER, R. J. Phenoxyacetic acid degradation by the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (TFD) pathway of plasmid pJP4: mapping and characterization of the TFD regulatory gene, *tfdR*. **J. Bacteriol.**, v.171, p. 314–320, 1989.

HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, J. Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated organisms. **Microb. Ecology**, v.35, p. 1-21, 1998.

HATZIOS, K. K.; HOAGLAND, R. E. **Crop safeners for herbicides**. Academic Press, New York, 1988. 10p.

HERBES, S.E.; SHAWALL, L.R. Microbial Transformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Pristine and Petroleum contaminated Sediments. **Applies and Environmental Microbiology**. v. 35, p.306-316. 1977.

HESTER, G.; STARK, W.; MOSER, M.; KALLEN, J.; MARKOVIĆ-HOUSLEY, Z.; JANSONIUS, J. N. Crystal structure of phosphoserine aminotransferase from *Escherichia coli* at 2.3 Å resolution: Comparison of the unligated enzyme and a complex with α -methyl-L-glutamate. **J. Mol. Biol.** v. 286, p. 829–850, 1999.

HOFFMANN, D.; KLEINSTEUBER, S.; MULLER, R. H.; BABEL, W. A transposon encoding the complete 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation pathway in the alkali-tolerant strain *Delftia acidovorans* P4a. **Microbiology**, v. 149, p. 2545-2556, 2003.

HOLLIGER, C.; GASPARD, S.; GLOD, G.; HEIJMAN, C.; SCHUMACHER, W.; SCHWARZENBACH, R. P.; VAZQUEZ, F. Contaminated environment in the subsurface and bioremediation: organic contaminants. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v.20, n.4, p.517-523, 1997.

HUSTON, M.A. Biological Diversity: The Coexistence of Species on Changing Landscapes, **Int. Cambridge University Press**, Cambridge, UK, 1994.

HAYNES, P.; YATES, J. R. Review article: Proteome profiling – pitfalls and progress. **Yeast**, v.17, p.81-87, 2000.

ICHIHARA, A.; GREENBERG, D. M. Further studies on the pathway of serine formation from carbohydrate. **J. Biol. Chem.** v. 224, p.331–341, 1957.

ImageMaster 2D platinum: **User Manual**. GE Healthcare. [S.l.]. 2008.

Indicadores de desenvolvimento sustentável - Brasil 2010. Rio de Janeiro: IBGE 2010. 443 p. Disponível em: <
<http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/ids2010.pdf>> Acessado em: 26 jan. 2012.

JACQUES, R. J.S.; SILVA, K. J.; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. **Cienc. Rural**. v. 40, n.2, p. 280-287, 2010.

- JAIN, R. K.; KAPUR, M.; LABANA, S.; LAL, B.; SARMA, P.M.; BHATTACHARYA, D.; THAKUR, I. S. Microbial diversity: Application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. *Int. Current Science*, v.89, n.1, p.101-112. 2005.
- JENNINGS, L. K.; CHARTRAND, M. M.; LACRAMPE-COULOUME, G.; LOLLAR, B. S.; SPAIN, J. C.; GOSSETT, J. M.; Proteomic and transcriptomic analyses reveal genes upregulated by cis-dichloroethene in *Pseudomonas JS666*. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 11. p. 3733–3744. 2009.
- KAMRIN, M. A. **Pesticides profile: toxicity, environmental impact, and fate**. Nova Iorque: Lewis, 1999.
- KILBANE, J. J.; CHATTERJEE, D. K.; KARNS, J. S.; KELLOGG, S. T.; CHAKRABARTY, A. M. Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by a pure culture of *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* v.44, p.72–78, 1982.
- KIM, S. J.; JONES, R. C.; CHA, C. J.; KWEON, O.; EDMONDSON, R. D.; CERNIGLIA, C. E. Identification of proteins induced by polycyclic aromatic hydrocarbon in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and de novo sequencing methods. *Proteomics*, v. 4, p. 3899–3908, 2004.
- KIM, Y. H.; CHO, K.; YUN, S. H.; KIM, J. Y.; KWON, K. H.; YOO, J. S.; KIM, S. I. Analysis of aromatic catabolic pathways in *Pseudomonas putida* KT 2440 using a combined proteomic approach: 2DE/MS and cleavable isotope-coded affinity tag analysis. *Proteomics*, v. 6, p.1301–1318, 2006.
- KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. *Humangenetik*, v. 26, p. 231-243, 1975.
- KNOPP, D. Assessment of exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in the chemical industry - results of a 5-years biological monitoring study. *Occupational and Environmental Medicine*, v. 51 n. 3, p. 152-159, março 1994.
- KRUMME, M. L., TIMMIS, K.N., e DWYER, D.F. Degradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4 and the constitutive mutant strain G4, 5223 PR1 in aquifer microcosms. *Appl Env Microbiol.* v. 59. p. 2746–2749, 1993.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, p. 680-685, 1970.
- LEISINGER, T. **Biosynthesis of proline. in Escherichia coli and Salmonella**: cellular and molecular biology, ed Neidhardt F. C., et al. (American Society for Microbiology, Washington, D.C.) 2nd ed. p. 434-441, 1996.
- LI, Z.; SHAO, T.; MIN, H.; LU, Z.; XU, X. Stress response of *Burkholderia cepacia* WZ1 exposed to quinclorac and the biodegradation of quinclorac. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 4, p. 984–990, 2009.

- LIMA, P. J. P. **Possíveis doenças físicas e mentais relacionadas ao manuseio de agrotóxicos em atividades rurais, na região de Atibaia, SP/Brasil.** 2008. 158f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- LITCHFIELD, C. Thirty Years and Counting: Bioremediation in Its Prime?. **BioScience.** v. 55. p. 273-279. 2005.
- LIU, J. B.; AMEMIYA, T.; CHANG, Q.; XU, XIAOJ.; ITOH, K. Real time reverse transcription PCR analysis of trichloroethylene-regulated toluene dioxygenase expression in *Pseudomonas putida* F1. **Journal of Environmental Science and Health Part B.,** v. 46, p.294-300, 2011.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} *Method.* **Methods,** v.25, p.402–408. 2001.
- LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. *Molecular Cell Biology* 4th edn. New York: W. H. Freeman. 2000.
- LORENZI, H. **Manual de Identificação e Controle de Plantas Daninhas do Brasil:** terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 6.ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. 2000.
- MACHADO, K. M. G. **Biodegradação de pentaclorofenol por fungos basidiomicetos ligninolíticos em solos contaminados por resíduos industriais.** 1998. 172f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 1998.
- MACRAE, A. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. **Brazilian Journal of Microbiology,** v. 31, p. 77-82, 2000.
- MACUR, R. E.; WHEELER, J. T.; BURR, M. D.; INSKEEP, W. P. Impacts of 2,4-D application on soil microbial community structure and on populations associated with 2,4-D degradation. **Microbiological Research,** v. 162, p. 37-45, 2007.
- MAGNANI, G. S. **Análise da biodiversidade de bactérias endofíticas de colmo de cana-de-açúcar cultivada no noroeste do Paraná.** 2009. 153f. Tese (Doutorado em Ciências)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2009.
- MARIA, T. C. MANSOR FILHO, J. T.; ROSTON, D. M. Avaliação preliminar das cargas difusas de origem rural, em uma sub-bacia do Rio Jaguari, SP. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.** Campina Grande, v. 10, n. 3, p. 715–723, 2006.
- McGRATH, K. C.; THOMAS-HALL, S. R.; CHENG, C. T.; LEO, L.; ALEXA, A.; SCHMIDT, S.; SCHENK, P. M. Isolation and analysis of mRNA from environmental microbial communities. **J. Microbiol. Methods.** v. 75. p. 172–176. 2008
- MEIRELLES, L. C. **Controle de agrotóxicos: estudo de caso do Estado do Rio de Janeiro, 1985/1995.** Dissertação (Mestrado). Programas de Pós-Graduação de Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1996.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, n.4, p.315-332. 2006.

MENZIE, C. M. **Metabolism of Pesticides**. Washington: Bureau of Sport Fisheries and Wildlife, 1969.

MILLER, D. L.; WEISSBACH, H. Molecular mechanisms of protein synthesis. In: WEISSBACH, H.; PESTKA, S. (eds). **Molecular Mechanisms of Protein Synthesis**. New York: Academic Press, p. 323-373, 1977.

MOORE, D. S. **The Basic Practice of Statistics**. New York: Freeman, 2007.

MORLETT-CHÁVEZ, J. A.; ASCACIO-MARTÍNEZ, J. A.; RIVAS-ESTILLA, A. M.; VELÁZQUEZ-VADILLO, J. F.; HASKINS, W. E.; BARRERA-SALDAÑA, H. A.; ACUÑA-ASKAR, K. Kinetics of BTEX biodegradation by a microbial consortium acclimatized to unleaded gasoline and bacterial strains isolated from it. Int. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.64, p. 581-587. Oct. 2010.

MUSUMECI, M. R. Defensivos agrícolas e sua interação com a microbiota do solo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. 1.ed. **Microbiologia do solo**. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360p.

MUYZER, G.; WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695-700, março 1993.

NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica**. 3ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NISHI, S. M.; VIERO, L. M.; SOARES, R. M.; MAIORKA, P. C.; GENNARI, S. M. Use of the real time RT-PCR for immune related gene expression quantitation in experimentally infected *Neospora caninum* bovine calves. **Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal**, v. 18, n. 1, p. 8-14, jan.-mar. 2009.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em Tempo Real. **Rev. Biotecnol. Ciên. Desenv.**, v. 33, p. 10-13, 2004.

NYSSONEN, M.; PISKONEN, R.; ITAVAARA, M. 2006. A targeted real-time PCR assay for studying naphthalene degradation in the environment. **Microb. Ecol.** v. 52, p. 533–543. 2006.

O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 4007-4041, maio. 1975.

O'SULLIVAN, L. A.; MAHENTHIRALINGAM, E. Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. **Applied Microbiology**, v. 41, p. 8-11, 2005.

OLIVEIRA JÚNIOR, R.S. Mecanismos de ação de herbicidas. In: Rubem Silvério de Oliveira Jr.; Jamil Constantin. (Org.). **Plantas daninhas e seu manejo**. Guaíba, RS: Livraria e Editora Agropecuária, 2001, p. 207-260.

OLIVEIRA, A. F. S. **A sustentabilidade da agricultura orgânica familiar dos produtos associados à APOI (Associação dos Produtores Orgânicos da Ibiapaba-CE)**. 2007. 97f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e meio ambiente) – Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2007.

ONG, S. E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. **Nature Chemical Biology**, v. 5, p. 252-62, 2005.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, p. 837-846, 2000.

PARKE, J. L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Annu Rev Phytopathol**, v. 39, p. 225–258, 2001.

PAUL, E. A.; CLARK, F. E. **Soil Microbiology and Biochemistry**. San Diego, California: Academic Press, 1989.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. **O desafio interdisciplinar da avaliação da exposição humana a agrotóxicos**. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 347-366.

PIETTE, J.; CUNIN, R.; BOYEN, A.; CHARLIER, D. R. M.; CRABEEL M.; VAN VLIET, F.; GLANSDORFF, N.; SQUIRES, C.; SQUIRES, C. L. The regulatory region of the divergent *argECBH* operon in *Escherichia coli* K-12. **Nucleic Acids Res.**, v. 10, p. 8031-8048, 1982.

PRADO, A.G.S. VIEIRA, E.M. Avaliação das quantidades crônicas do herbicida 2,4-D aplicadas no solo baseada em estudos de adsorção/dessorção. **An. Assoc. Bras. Quím.**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 239-246, 1998.

QINGYAN, L.I.; YING, L.I.; XIKUN, Z.H.U.; BAOLI, C.A.I. Isolation and characterization of atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. AD26 and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. **Journal of Environmental Sciences**, v.20, p.1226-1230, 2008.

RAMSAY, M. A.; SWANNELL, R. P. J.; SHIPTON, W. A.; DUKE, N. C.; HILL, R. T. Effect of biorremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin**. v. 41. p. 413-419. 2000.

RICE, J. F.; MENN, F. M.; HAY, A. G.; SANSEVERINO, J.; SAYLER, G. S. Natural selection for 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid mineralizing bacteria in agent orange contaminated soil. **Biodegradation**. v. 16, p. 501–512, 2005.

- RIEDEL, K.; CARRANZA, P.; GEHRIG, P.; POTTHAST, F.; EBERL, L. Towards the proteome of Burkholderia cenocepacia H111: Setting up a 2-DE reference map. **Proteomics. Zurich**, v. 6, p. 207-218, 2006.
- RODGERS, KR. Heme-based sensors in biological systems. **Curr Opin Chem Biol.**, v. 3, p. 158-167. 1999.
- RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S.de. **Guia de Herbicidas**. 4. ed. Londrina, 1998. p. 158 – 159.
- ROMANO, Eduardo. 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.; SANTOSA, M. P.; BENNDORF, D.; RAPPC, E. ; SÁ-CORREIA, I. Response of Pseudomonas putida KT2440 to phenol at the level of membrane proteome. **Jornal of proteomics**, v. 73, p. 1461 – 1478, 2010.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p.406–425, 1987.
- SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. **Molecular cloning: A laboratory manual**, 2.ed. New York: Cold Spring harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989.
- SCAPIN, G.; BLANCHARD, J. S.; SACCHETTINI, J. C. Three-Dimensional Structure of Escherichia coli Dihydrodipicolinate Reductase. **Biochemistry** v. 34, p. 3502-3512, 1995.
- SCHURIG, H.; RUTKAT, K.; RACHEL, R.; JAENICKE, R. Octameric enolase from the hyperthermophilic bacterium Thermotoga maritima: purification, characterization, and image processing. **Protein Sci.**, v. 4, p. 228–236, 1995.
- SHEDLARSKY, J. G.; GILVARG, C. The pyruvate-aspartic semialdehyde condensing enzyme of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 245, p. 1362-1373, 1970.
- SILVA, J. J. O.; MEYER, A. **O sistema de notificação das intoxicações: o fluxograma da joeira**. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 317-326, 2003.
- SINDAG. Mercado Brasileiro de Fitossanitários. In: **Apresentado no Workshop: Avaliação da Exposição de Misturadores, Abastecedores e Aplicadores a Agrotóxicos**. Brasília. Abr. 2009.
- SINITOX. **Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas**. Ministério da Saúde. Casos registrados de intoxicação e/ou envenenamento. Brasil, 2009. Uma análise. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=361>. Acesso em: 16 jan. 2012.
- SNYDER, S. H.; SILVA, O. L.; KIES, M. W. The mammalian metabolism of lhistidine. IV. Purification and properties of imidazolone propionic acid hydrolase, **J. Biol. Chem.**, v. 236, p. 2996–2998, 1961.

SOARES-RAMOS, J. R. L.; RAMOS, H. J. O.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; RIGO, L. U.; SOUZA, E. M. Comparative molecular analysis of *Herbaspirillum* strains by RAPD, RFLP, and 16S rDNA sequencing. **Genet. Mol. Biol.** v. 26, n. 4, p. 53-543, 2003

SOUZA, J.A.M. **Perfil transcricional de *Bradyrhizobium elkanii* semia 587 “in vitro” e em simbiose com soja (*Glycine max* L. Merrill) através de microarranjo de dna.** 2006. 150p. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP.

STRAZIELLE, N.; GHERSI-EGEA, J. F. Demonstration of a coupled metabolism-efflux process at the choroid plexus as a mechanism of brain protection toward xenobiotics. **Journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, p. 6275–6289, 1999.

SUWA, Y.; WRIGHT, A. D.; FUKIMORI, F.; NUMMY, K. A.; HAUSINGER, R. P.; HOLBEN, W. E.; FORNEY, L. J. Characterization of a chromosomally encoded 2,4-dichlorophenoxyacetic acid/ α -ketoglutarate dioxygenase from *Burkholderia* sp. Strain RASC. **Applied Environmental Microbiology**, v. 7, n. 62, p. 2464-2469, 1996.

TAM, L. T.; ANTELMANN, H.; EYMANN, C.; ALBRECHT, D.; BERNHARDT, J.; HECKER, M. Proteome signatures for stress and starvation in *Bacillus subtilis* as revealed by a 2-D gel image color coding approach. **Proteomics**, Weinheim, v.6, p.4565-4585, 2006.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28. p. 2731- 2739. 2011.

THANASSI, D. G.; HULTGREN, S. J. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. **Curr Opin Cell Biol.** v. 12, p. 420–430, 2000.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

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. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 44, n.4, p. 384-391, 2009.

UDAKA, S. Pathway-specific pattern of control of arginine biosynthesis in bacteria. **J.Bacteriol.**, v. 91, p. 617–621, 1966.

UNITED STATES. 2001. Environmental Protection Agency. A citizen’s guide to bioremediation. Disponível em: www.epa.gov/superfund/sites; www.cluin.org>. Acesso em: 16. Jan. 2012.

VANDAMME, P.; HENRY, D.; CONYE, T.; NZULA, S.; VANCANNEYT, M.; LI PUMA, J. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional Burkholderia cepacea complex bacteria, may confound test results of new molecular diagnostic tools. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 33, p. 143-149, 2002.

VANDAMME, P.; OPELT, K.; KNÖCHEL, N.; BERG, C.; SCHÖNMANN, S.; DE BRANDT, E.; EBERL, L.; FALSEN, E.; BERG, G. *Burkholderia bryophila* sp. nov. and *Burkholderia megapolitana* sp. nov., moss-associated species with antifungal and plant-growth-promoting properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.2228–2235, 2007.

VARGAS, L.; ROMAN, E.S. **Controle de plantas daninhas em pomares**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. 26p. (EMBRAPA Uva e Vinho. Circular Técnica, 47).

VEEH, R. H.; INSKEEP, W. P.; CAMPER, A. K. Soil depth and temperature effects on microbial degradation of 2,4-D. **J. Environ. Quality**, v. 25, p. 5-12, 1996.

VIALARD, V.; POIRIER, I.; COURNOYER, B.; HAURAT, J.; WIEBKIN, S.; OPHEL-KELLER, K.; BALANDREAU, J. *Burkholderia graminis* sp. nov., a rhizospheric Burkholderia species, and reassessment of [*Pseudomonas*] phenazinium, [*Pseudomonas*] pyrrocinia and [*Pseudomonas*] glathei as Burkholderia. **Int J Syst Bacteriol**, v. 48, p. 549–563, 1998.

VIEIRA, E. M.; PRADO, A. G. S.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. Estudo da adsorção/dessorção do ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4D) em solo na ausência e presença de matéria orgânica. **Química Nova**, São Paulo, v.22, n.3, p.305-308, 1999.

VIEIRA, S. Introdução a bioestatística. Ed. Campus, 3º edição, 1980

WEBER, K.; OSBORN. The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. **M. J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 4406–4412, 1969.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WILMES, P.; WEXLER, M.; BOND, P.L. Metaproteomics provides functional insight into activated sludge wastewater treatment. **PLoS One.**, v. 12, p. 1–11. 2008.

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

WOODWARD, A.W.; BARTEL, B. Auxin: reulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, v. 5, n. 95, p. 707-735, 2005.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of Burkholderia gen nov. and transfer of seven species of the genus Pseudomonas homology group II to the new genus, with the type species

Burkholderia cepacia (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiol Immunol**, v. 36, p. 1251–1275, 1992.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y. Transfer of two Burkholderia and an Alcaligenes species to Ralstonia gen nov. proposal of Ralstonia pickettii (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. **Microbiol Immunol**, v. 39, p. 897–904, 1995.

ZARLENGA, D. S.; HIGGINS, J. PCR as diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**,