



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE SOBRAL - FAMED**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - PPGB**

**MARIA AMÉLIA ARAÚJO SOARES**

**CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES PROTEÔMICAS DE *BURKHOLDERIA***  
**SP. EM RESPOSTA AO FENOL**

**SOBRAL**

**2013**

MARIA AMÉLIA ARAÚJO SOARES

CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES PROTEÔMICAS DE *BURKHOLDERIA* SP.  
EM RESPOSTA AO FENOL

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.

Área: Macromoléculas

Orientador: Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano

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

SOBRAL

2013

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

---

S655c Soares, Maria Amélia Araújo.  
Caracterização das alterações proteômicas de Burkholderia sp. em resposta ao fenol. / Maria Amélia Araújo Soares. – 2013.  
99 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina, Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2013.

Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientação: Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano.

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

1. Burkholderia. 2. Proteômica. 3. Fenol.

CDD 660.6

---

MARIA AMÉLIA ARAÚJO SOARES

CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES PROTEÔMICAS DE *BURKHOLDERIA* SP.  
EM RESPOSTA AO FENOL

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: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano (Orientador)  
Centro de Ciências Agrárias / Departamento de Engenharia de Pesca  
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. João Garcia Alves Filho  
Faculdades INTA

A Deus,

A minha querida família,

E a meu amado esposo, Jackson Costa, dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, esta força maior que move minha vida. Por seu amor incondicional; por ter me presenteado com o dom da vida; por cuidar de mim em todos os momentos, em especial naqueles em que eu não tinha mais forças para prosseguir; por ter escrito a minha história de forma tão maravilhosa. Obrigado meu Deus, por todas as conquistas, por todas as pessoas especiais que fazem parte da minha vida, enfim obrigada por tudo.

Aos meus queridos pais João Elmiro Soares e Maria Amélia Araújo Soares. Agradeço por todo amor, por todo carinho, por todo cuidado e por toda a educação dada. Por terem feito de mim a pessoa que sou hoje. Sou muito feliz por ter sido escolhida por Deus para ser a filha caçula de vocês. Vocês são as razões da minha vida, minha força, minha inspiração, meu aconchego. Amo vocês infinitamente.

A meus irmãos Otacílio Araújo Soares, Orlene Maria Araújo Costa, Wilton Araújo Soares, Lourenço Ferreira Araújo Neto, João Sérgio Araújo Soares, Maria Marcigleide Araújo Soares e Olga Maria Araújo Soares (madrinha). Por terem cuidado de mim, por serem para mim bons exemplos de homens e mulheres, por todos os momentos compartilhados. Vocês são essenciais na minha vida.

A meu esposo José Jackson do Nascimento Costa, um presente que Deus me deu. Obrigada pelo companheirismo, pela compreensão, pelos ensinamentos e por todos os conselhos dados em todo esse período que já vivemos juntos. Por acreditar em mim e por me fazer acreditar que sou capaz. Por ser meu melhor amigo, por me ouvir sempre. Minha vida é muito mais completa com você. Sou muito mais feliz com você. Você me fez acreditar que realmente vale a pena esperar em Deus. Te Amo.

A meus sobrinhos-irmãos Erika Rafaele Costa Menezes e Hélio Henrique Araújo Costa, que são mais que meus sobrinhos, são meus irmãos, pois crescemos juntos, brincamos juntos, aprendemos juntos. Obrigada pelas brincadeiras da infância, pela companhia no período da faculdade, pelas alegrias e por toda ajuda dada sempre que precisei.

A meus sobrinhos-filhos Samira Araújo dos Santos, Júlia Maria Araújo Soares e João Artur Torres Soares. Pelos momentos de alegria e de descontração que vocês me proporcionam, pelo aprendizado, e por todo o carinho dado.

Aos amigos Maria Gleiciane de Queiroz Martins, João Garcia Alves Filho e Daniel de Brito pela acolhida quando eu cheguei ao laboratório. Sou grata a vocês pela paciência e pela disponibilidade em me ensinar tudo que eu sei hoje sobre Proteômica, Cultivo Microbiano e Biologia Molecular. Saibam que vocês foram fundamentais para minha formação.

A Nyanne Hardy Lima Pontes por toda a ajuda dada durante meus experimentos, por estar disponível sempre, especialmente durante a realização das infinitas curvas de crescimento. Sou grata a você por tudo, afinal você foi fundamental para a realização desse trabalho. Obrigada, pela sua competência, por todo o conhecimento compartilhado, pelo companheirismo, pelos conselhos dados e pelos momentos de descontração. Você é um exemplo de competência e dedicação a ser seguido por todos.

Aos membros do Laboratório de Genética Molecular do Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS), Nyanne Hardy Lima Pontes, Bruno Bezerra Carneiro, Cleane Gomes Moreira, João Garcia Alves Filho, Aurilene Gomes Cajado, Jedson Antonio de Souza Aragão, Mônica Valéria de Almeida Aguiar, Flávia Muniz Mesquita, Crislays Maria Pereira Fontenele, Vitória Virgínia Magalhães Soares, Raulzito Fernandes Moreira, Áurea Morgana da Silveira Vasconcelos, Maria Tatiana Farias Brito, Mariana da Silva Lima, Antônio Francisco de Sousa, Daniel de Brito e Maria Auxiliadora Silva Oliveira, pelas alegrias e conhecimentos compartilhados, pelos momentos de descontração e de conversas jogadas fora, por toda ajuda dada durante os meus experimentos. Muito obrigada!

Ao meu co-orientador Professor Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha, por ter me aceitado como aprendiz no seu laboratório, pela confiança dada, pelos ensinamentos, por estar sempre disponível para nos ajudar e por ser mais que um orientador, mas sim, um amigo com quem podemos contar sempre que precisamos. Você é e sempre será um exemplo para minha vida.

A todos os meus colegas da turma de Mestrado em Biotecnologia, Christiane Aguiar Nobre, Mariana da Silva de Lima, Bruno Rocha da Silva, Erica de Menezes Rabelo, Ângela Magalhães Vieira, Jordânia Marques de Oliveira, Antonia Moêmia Lúcia Rodrigues Portela,

Francisca Denyse Antonia Mendes Cruz, Rafaela Mesquita Bastos, Verônica Silva de Brito, Antônio Francisco de Sousa, Cleane Gomes Moreira, Aline de Carvalho Oliveira, Regislane Pinto Ribeiro e Alexandre Sales Barros, por todos os momentos vividos e por todas as dificuldades compartilhadas durante os períodos de seminários e avaliações. Desejo que todos alcancem o sucesso profissional e pessoal almejado.

A amiga Maria Juliane Passos e a toda a família Passos, Maria José Passos (Tia Mazé) e Neyla Joseane Passos Faustino pela amizade por todos os momentos vivenciados, muito deles de alegrias proporcionadas pelas piadas de Juliane Passos e Neyla Passos. Minha vida é muito mais divertida quando vocês estão por perto.

As amigas: Antonia Moêmia Lúcia Rodrigues Portela, Cleane Gomes Moreira e Jordânia Marques de Oliveira pelos momentos de desespero, pelo conhecimento compartilhado e pelo companheirismo durante os períodos de estudos para a seleção do Mestrado. Tudo se tornou muito mais fácil e divertido com vocês ao meu lado.

A Danielle Rocha do Val e Gisvani Lopes de Vasconcelos por todos os momentos de descontração e pela disponibilidade sempre.

Aos amigos do Laboratório de Cultivo de Células e Tecidos da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – UFC, campus Sobral: José Renato de Sousa Passos, Anderson Weiny Barbalho Silva, Glaucinete Borges de Souza, Katianne dos Santos Freitas, Francisco Taiã Gomes Bezerra e Tania de Azevedo Lopes e Rodrigo Otávio Deccaria de Sales Rossi, pela amizade e companheirismo.

Ao Professor Dr. José Roberto Viana Silva pela orientação do Projeto referente à bolsa CAPES/PROPAG/ REUNI.

Ao meu orientador, Professor Dr. Celso Sniniti Nagano, por estar sempre disponível e pela orientação.

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



Ao Ms. Cláudio de Oliveira Cunha, atualmente Analista em Ciência e Tecnologia do CNPq, 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 disponibilizar o curso de pós-graduação em Biotecnologia, no *campus* Sobral, possibilitando uma ótima alternativa de formação à alunos dessa região.

A todos os funcionários da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, *campus* Sobral, em especial ao Seu Almino, a Gade e a Diná e as meninas da cantina Dona Fátima e Naide, por toda a atenção e amizade.

A todos que de alguma forma contribuíram na minha formação, meu muito obrigada, pois acredito que NÃO CONQUISTAMOS NADA SOZINHOS, por isso minha gratidão a todos.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

(Cora Coralina)

## RESUMO

Bactérias do gênero *Burkholderia* apresentam como uma das suas aplicações biotecnológicas a capacidade de biodegradar compostos xenobióticos recalcitrantes. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade da *Burkholderia* sp. SMF 07 tolerar e utilizar o fenol como única fonte de carbono e realizar a análise proteômica desta bactéria, em resposta ao fenol, com a finalidade de identificar proteínas diferencialmente expressas que estão relacionadas à biodegradação do fenol, à resposta ao estresse ou ainda, que participem das vias metabólicas de produção de energia para as células. A avaliação da capacidade da *Burkholderia* sp. SMF 07 utilizar o fenol como única fonte de carbono foi realizada a partir na construção da curva de crescimento em meio mineral (BH). A fim de realizar a extração das proteínas totais foi realizado o crescimento bacteriano em meio de cultivo TY (*Tryptone-Yeast Medium*), suplementado ou não com 1000 mg/L de fenol, incubado a 28°C. A extração das proteínas totais foi feita após as culturas atingirem o final da fase *log* do crescimento bacteriano (O.D entre 0,8 e 1,0 e 0,6 e 0,8, para as condições controle e fenol, respectivamente). As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) e a avaliação da pureza das amostras proteicas foi realizada por SDS-PAGE. O mapa protéico para cada condição testada foi determinado a partir da eletroforese bidimensional (2-D). O ajuste das imagens dos géis bidimensionais, a detecção de *spots* protéicos e a avaliação dos dados para determinação de variações quantitativas e qualitativas dos *spots* foi feito pelo programa *ImageMaster*<sup>®</sup>. A identificação das proteínas foi feita através do *ExPASy Proteomics Server*, utilizando os valores de pI e MW do *spot*. Através dos dados obtidos foi possível observar proteínas diferencialmente expressas entre os grupos testados. Entre as proteínas que apresentaram expressão quantitativa aumentada na presença do fenol destaca-se a 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolase, uma enzima envolvida na via meta de degradação do fenol. Entre aquelas que apresentaram expressão reduzida na presença do fenol se destacam aquelas envolvidas na biossíntese de nucleotídeos e de ácidos graxos, moléculas importantes para o desenvolvimento e manutenção da estrutura microbiana. As proteínas que tiveram sua expressão inibida na presença do fenol estavam envolvidas principalmente na biossíntese de aminoácidos, proteínas, lipídeos, ubiquinona, purinas e pirimidinas; além de participarem do processamento do RNAt, síntese do peptídeoglicano e na resposta ao estresse. Em conclusão, o estudo mostrou que a *Burkholderia* sp. SMF 07 não foi capaz de utilizar o fenol como única fonte de carbono, mas apresentou capacidade de tolerar o fenol quando cultivada em meio nutritivo nas concentrações testadas. Através da análise proteômica concluiu-se que o

poluente alterou a expressão de proteínas importantes para o metabolismo e manutenção da estrutura celular.

Palavras-chave: *Burkholderia*, Proteômica, Fenol.

## ABSTRACT

Bacteria of the genus *Burkholderia* have as one of its biotechnological applications the ability to biodegrade recalcitrant xenobiotic compounds. Thus, this study aimed to evaluate the ability of *Burkholderia* sp. SMF 07 tolerate and using phenol as the sole carbon source and performing proteomic analysis of this bacterium, in response to phenol, in order to identify differentially expressed proteins that are related to biodegradation of phenol, the stress response or metabolic pathways involving the production of energy for cells. The evaluation of the capacity of *Burkholderia* sp. SMF 07 using phenol as the sole carbon source was based on the construction of the curve of growth in mineral medium (BH). For extraction of total proteins was performed bacterial growth in culture medium TY (*Tryptone-Yeast Medium*), supplemented or not with 1000 mg/L phenol, incubated at 28°C. The extraction of total proteins was done after the cultures reached the end of the *log* phase of bacterial growth (O.D between 0.8 and 1.0 and 0.6 and 0.8 for the control conditions and phenol, respectively). The proteins were quantified by the Bradford method (1976) and assessment of protein purity of the samples was performed by SDS-PAGE. The protein map for each tested condition was determined from two-dimensional electrophoresis (2-D). The adjustment of two-dimensional images of the gels, the detection of protein spots, and data evaluation to determine quantitative and qualitative changes of spots was made by the ImageMaster<sup>®</sup> software. The identification of proteins was performed using the ExPASy Proteomics Server, using the values of pI and MW of spot. Through the data obtained was observed differentially expressed proteins between the groups tested. Among the proteins that showed increased expression quantitative in the presence of phenol is highlight 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase, an enzyme involved in the degradation meta pathway phenol. Among those that showed decreased expression in the presence of phenol are highlights those involved in the biosynthesis of nucleotides and fatty acids, molecules important to the development and maintenance of microbial structure. Proteins which have inhibited its expression in the presence of phenol were mainly involved in the biosynthesis of amino acids, proteins, lipids, ubiquinone, purines and pyrimidines; beyond participate processing of tRNA, peptidoglycan synthesis, and in the stress response. In conclusion, the study showed that *Burkholderia* sp. SMF 07 not been able to utilize phenol as the sole carbon source but showed the ability to tolerate phenol when grown in nutrient medium at the concentrations tested. Through proteomic analysis was concluded that the pollutant alter the expression of proteins important for metabolism and maintenance of cellular structure.

Keywords: *Burkholderia*, Proteomics, Phenol.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura química de alguns compostos fenólicos.....	24
Figura 2 -	Vias aeróbicas de degradação do fenol. (A) Via <i>meta</i> de degradação do fenol por <i>Pseudomonas</i> sp. CF600. (B) Via <i>orto</i> de degradação do fenol por <i>R. erythropolis</i> CCM2595.....	29
Figura 3 -	Via anaeróbica de degradação do fenol.....	30
Figura 4 -	Imagem de coloração de Gram da estirpe de <i>Burkholderia</i> sp SMF 07 utilizando microscopia óptica.....	43
Figura 5 -	Curva de crescimento padrão, em sistema fechado.....	44
Figura 6 -	Curva de crescimento de <i>Burkholderia</i> sp. SMF 07 em meio TY suplementado com 500 mg/L de fenol, durante 19 horas de monitoramento em espectrofotômetro (600 nm).....	45
Figura 7 -	Curva de crescimento de <i>Burkholderia</i> sp. SMF 07 em meio TY suplementado com 1000 mg/L de fenol, durante 22 horas de monitoramento em espectrofotômetro (600 nm).....	45
Figura 8 -	Curva de crescimento de <i>Burkholderia</i> sp. SMF 07 em meio mineral Bushnell Hass (BH) suplementado com 400 mg/L de fenol, durante 93 horas de monitoramento em espectrofotômetro (600 nm).....	47
Figura 9 -	Curva de crescimento de <i>Burkholderia</i> sp. SMF07 em meio mineral Bushnell Hass (BH) suplementado com 600 mg/L de fenol, durante 93 horas de monitoramento em espectrofotômetro (600 nm).....	48
Figura 10 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de proteínas intracelulares obtidas de <i>Burkholderia</i> sp. SMF 07 corado com <i>Coomassie blue</i> G-250.....	50
Figura 11 -	Gráfico de dispersão das replicatas dos géis de <i>Burkholderia</i> sp. SMF 07 grupo controle).....	51
Figura 12 -	Gráfico de dispersão das replicatas dos géis de <i>Burkholderia</i> sp. SMF 07	

	grupo fenol.....	51
Figura 13 -	Géis de eletroforese bidimensional de proteínas obtidas de <i>Burkholderia</i> sp. SMF 07 cultivadas em meio TY, sem poluente (grupo controle) e na presença de 1000 mg/L de fenol (grupo fenol).....	53
Gráfico 1 -	Número médio de <i>spots</i> das réplicas de géis bidimensionais de <i>Burkholderia</i> sp.SMF07.....	54
Gráfico 2 -	Distribuição dos <i>spots</i> por faixa de ponto isoelétrico (pI).....	55
Gráfico 3 -	Distribuição dos <i>spots</i> por faixa de massa molecular (MW).....	55
Gráfico 4 -	Classificação funcional das proteínas que tiveram expressão quantitativa aumentada no grupo fenol em comparação ao grupo controle e foram identificadas através do banco de dados <i>UniProt/ Swiss-Prot</i> .....	57
Figura 14 -	Regiões dos géis de referência para o grupo controle (C) e tratado (fenol) (T) correspondente a cada <i>spot</i> que teve sua expressão quantitativa aumentada na presença do fenol comparado com o controle.....	58
Figura 15 -	Esquema da reação catalisada pela ferroquelatase.....	66
Figura 16 -	Via <i>meta</i> de degradação do fenol.....	67
Gráfico 5 -	Classificação funcional das proteínas que tiveram expressão quantitativa reduzida no grupo fenol em comparação ao grupo controle e foram identificadas através do banco de dados <i>UniProt/ Swiss-Prot</i> .....	68
Figura 17 -	Regiões dos géis de referência para o grupo controle (C) e tratado (fenol) (T) correspondente a cada <i>spot</i> que teve sua expressão quantitativa reduzida na presença do fenol comparado com o controle.....	69
Gráfico 6 -	Classificação funcional das proteínas que tiveram expressão exclusiva no grupo controle e foram identificadas através do banco de dados <i>UniProt/ Swiss-Prot</i> .....	73
Figura 18 -	Regiões dos géis de referência para o grupo controle (C) e tratado (fenol) (T) correspondente a cada <i>spot</i> que teve expressão exclusiva no grupo controle.....	74



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Propriedades físicas do fenol.....	25
Tabela 2 -	Lista de alguns micro-organismos envolvidos na biodegradação do fenol e compostos fenólicos.....	27
Tabela 3 -	Parâmetro do programa <i>IPGphor III</i> usado para a focalização isoeletrica.....	41
Tabela 4 -	Perfil quantitativo das proteínas intracelulares extraídas de <i>Burkholderia</i> sp. SMF 07 crescida em meio TY na ausência e presença de fenol.....	49
Tabela 5 -	Identificação das possíveis proteínas intracelulares de <i>Burkholderia</i> sp. SMF 07 com alteração quantitativa aumentada na presença do fenol (grupo fenol) comparado com o grupo controle identificadas com base no banco de dados <i>UniProt/Swiss-Prot</i> .....	60
Tabela 6 -	Identificação das possíveis proteínas intracelulares de <i>Burkholderia</i> sp. SMF 07 com alteração quantitativa reduzida na presença do fenol (grupo fenol) comparado com o grupo controle identificadas com base no banco de dados <i>UniProt/Swiss-Prot</i> .....	70
Tabela 7 -	Identificação das possíveis proteínas intracelulares de <i>Burkholderia</i> sp. SMF 07 expressão exclusiva no grupo controle identificadas com base no banco de dados <i>UniProt/Swiss-Prot</i> .....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATSDR	do inglês: <i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
Asn	Asparagina
Bcc	Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>
BH	Do inglês: <i>Bushnell Hass</i>
CB	<i>Coomassie Blue</i>
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
cm	Centímetro
C 1,2 DO	Catecol 1,2-dioxigenase
CoA	Coenzima A
CHAPS	3-colamidopropil dimetilamônio-1-propanosulfonado
CTP	Citidina trifosfato
DBT	Dibenzotiofeno
DmpB	Catecol 2,3-dioxigenase
DmpD	Semialdeído 2-hidroximucônico Hidrolase
DmpE	Oxopento-4-dienoato hidratase
DmpG	4-hidroxi-2-oxoalerato aldolase
DmpF	Acetaldeído desidrogenase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EF-Tu	Fator de elongação Tu
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Gln	Glutamina
GTP	Guanosina trifosfato
HAPs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
HH	Hora
ID	Identificação do <i>spot</i>
IEF	Focalização Isoelétrica
IPG	Gradiente de pH imobilizado

kDa	Quilodalton
L	Litro
LMW	do inglês: <i>low molecular weight</i>
M	Molar
Mb	Mega base
MCI	Muconato cicloisomerase
Mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mnmE	GTPase MnmE de modificação do RNAt
mnmG	Enzima MnmG de modificação do RNAt uridina 5-carboximetilaminometil
MLI	Muconolactona isomerase
MW	Do inglês: <i>molecular weight</i>
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido hidreto
NAD(P)	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NI	Não identificado
nm	Nanômetro
O.D	Densidade Óptica
PCBs	Bifenóis policlorados
pH	Potencial hidrogeniônico
PHB	Polihidroxibutirato
pI	Ponto isoelétrico
PHH	Fenol hidroxilase
PPAT	Fosfopanteteina adeniltransferase
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
RNA <sub>r</sub>	Ácido ribonucleico ribossômico
RNA <sub>t</sub>	Acido ribonucleico transportador
rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio

SMF	Sérgio Miana de Faria
sp	Espécie
TCE	Tricloroetileno
TIFF	do inglês: <i>Tagged Image File Format</i>
TY	do inglês: <i>Tryptone-Yeast Medium</i>
ttcA	Proteína TtcA de biossíntese do RNAt 2-tiocitidina
truA	Pseudouridina RNAt sintase A
UDP	Uridina difosfato
V	Volt
Vh	Volt hora
v/v	Volume/ volume
µg	Micrograma
µL	Microlitro
2D	Segunda Dimensão
2,4 D	Ácido 2,4 diclofenoxiacético

## LISTA DE SÍMBOLOS

OH	Hidroxila
C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O	Fenol
°C	Grau Celsius
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
H <sub>2</sub> O	Água
NO <sub>3</sub>	Óxido nítrico
B	Beta
<i>P</i>	Nível de significância
<	Menor que
HCl	Ácido clorídrico
%	Porcentagem
X	Vezes
*	Diferença significativa
A	Alfa
E	Epsilon
Fe <sup>2+</sup>	Ferro ferroso

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1	Fenol e compostos fenólicos.....	24
2.2	Fenol e Compostos Fenólicos: Riscos Ambientais e a Saúde.....	25
2.3	Tratamento de ambientes contaminados com fenol.....	26
2.3.1	<i>Biodegradação do Fenol.....</i>	27
2.3.1.1	<i>Biodegradação aeróbica do fenol.....</i>	28
2.3.1.2	<i>Biodegradação anaeróbica do fenol.....</i>	29
2.4	Biorremediação.....	30
2.5	Gênero <i>Burkholderia</i> .....	32
2.6	Proteômica.....	34
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	Objetivo Geral.....	37
3.2	Objetivos Específicos.....	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1	Bactérias e Condições do Cultivo.....	38
4.2	Microscopia e Coloração de Gram.....	38
4.3	Curva de crescimento.....	38
4.3.1	<i>Curva de crescimento de Burkholderia sp. SMF 07 em meio TY suplementado com fenol.....</i>	38
4.3.2	<i>Curva de crescimento de Burkholderia sp. SMF 07 em meio BH suplementado com fenol.....</i>	39
4.4	Extração de proteínas intracelulares.....	39
4.5	Quantificação de proteínas.....	40
4.5.1	<i>Método de Bradford.....</i>	40
4.5.2	<i>SDS-PAGE.....</i>	41
4.6	Eletroforese bidimensional.....	41
4.6.1	<i>Reidratação das tiras.....</i>	41
4.6.2	<i>Focalização isoelétrica.....</i>	41
4.6.3	<i>Equilíbrio das tiras.....</i>	41
4.6.4	<i>Segunda dimensão (2D).....</i>	42
4.7	Análise estatística.....	42

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1	Análise da pureza da cultura pelo Método de coloração de Gram.....	43
5.2	Curva de Crescimento.....	43
5.2.1	<i>Curva de crescimento de Burkholderia sp. SMF 07 em meio TY suplementado com fenol.....</i>	44
5.2.2	<i>Curva de crescimento de Burkholderia sp. SMF 07 em meio BH suplementado com fenol.....</i>	46
5.3	Extração e quantificação das proteínas intracelulares.....	49
5.4	Reprodutibilidade dos géis bidimensionais.....	49
5.5	Análise do perfil proteico de <i>Burkholderia sp. SMF 07</i> por eletroforese bidimensional.....	52
5.5.1	<i>Distribuição dos spots por ponto isoelétrico e massa molecular.....</i>	54
5.6	Proteínas Diferencialmente Expressas.....	56
5.6.1	<i>Análise das proteínas que apresentaram expressão quantitativa aumentada na presença do fenol.....</i>	56
5.6.2	<i>Análise das proteínas que apresentaram expressão quantitativa reduzida na presença do fenol.....</i>	68
5.6.3	<i>Análise das proteínas que apresentaram expressão exclusiva no grupo controle.....</i>	72
6	CONCLUSÕES.....	86
	REFERÊNCIAS.....	87

## 1 INTRODUÇÃO

Historicamente, o crescimento urbano e industrial em diversas cidades do mundo ocorreu às margens dos rios, devido à disponibilidade de água, a qual poderia ser utilizada tanto, para suprir as necessidades básicas da população, tais como, beber, preparar alimentos e produzir pequenos cultivos agrícolas, como na indústria, durante as etapas de fabricação de seus produtos. Contudo, o crescimento urbano e industrial desordenado e não planejado ao longo dos rios, trouxe consigo algumas consequências. Um dos principais efeitos é o despejo frequente de efluentes provenientes das atividades humanas e industriais diretamente no corpo dos rios, ocasionando sua poluição e conseqüentemente o desequilíbrio da biota natural.

Define-se por poluição a degradação da qualidade ambiental resultante de atividades que direta ou indiretamente prejudiquem a saúde, a segurança e o bem-estar da população; criem condições adversas às atividades sociais e econômicas; afetem desfavoravelmente a biota; afetem as condições estéticas ou sanitárias do meio ambiente ou lancem matérias ou energia em desacordo com os padrões ambientais estabelecidos (BRASIL, 1981).

A poluição dos recursos hídricos ocorre devido ao lançamento, nos corpos de água, de contaminantes, que podem ser de origem natural, sintetizadas pelo metabolismo biológico, como por exemplo, hidrocarbonetos presentes em combustíveis fósseis e metais pesados presentes em minerais, ou de origem sintética, produzidos por tecnologias industriais modernas apresentando estruturas químicas complexas e estranhas ao meio ambiente (xenobióticos) (DIAZ, 2004; GAYRLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

Dentre os diversos contaminantes ambientais produzidos sinteticamente, estão os fenóis ou compostos fenólicos, que são a unidade estrutural básica para diversos compostos orgânicos sintéticos, como por exemplo, químicos agrícolas e pesticidas, além de estarem envolvidos nas etapas de processamento de produtos de várias indústrias, tais como, a da borracha, tecido, papel e celulose, madeira, cola e adesivos, aço e ferro, e ainda na fabricação de fibras sintéticas (náilon) e na produção de intermediários químicos utilizados em inúmeras outras aplicações, que vão desde a fabricação de plástico a produtos farmacêuticos e agrícolas. Os detritos resultantes da produção destas indústrias, na maioria das vezes são tóxicos e recalcitrantes e não são adequadamente tratados sendo lançados diretamente no meio ambiente, podendo atingir rapidamente as fontes de água, causando danos às espécies aquáticas e ao homem. Este fato faz dessas industriais as principais responsáveis pela



presença desses compostos xenobióticos tóxicos no meio ambiente (BASHA; RAJENDRAN; THANGAVELU, 2010; CETESB, 2012; NANDISH, 2005).

Diversas tecnologias vêm sendo utilizadas no processo de tratamento de ambientes contaminados com fenol e seus derivados. Entre estas se destaca a biorremediação, uma técnica que utiliza o metabolismo dos micro-organismos para converter substâncias complexas e tóxicas, lançadas no meio ambiente, em compostos mais simples e menos poluente ou até mesmo em substâncias inertes (THAPA; KC; GHIMIRE, 2012).

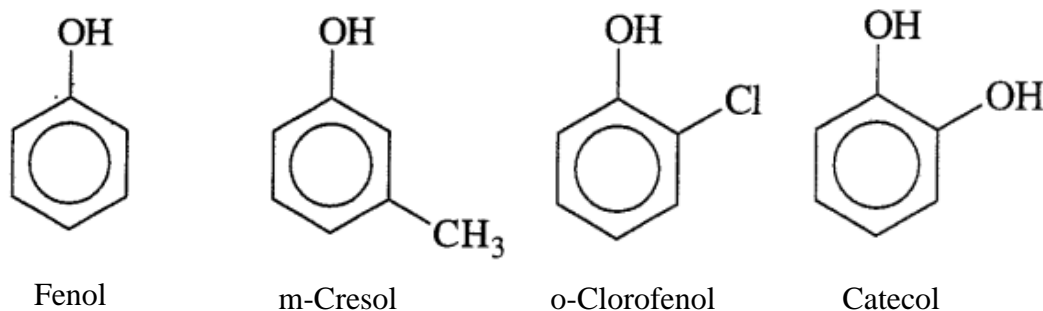
Várias bactérias incluindo aquelas pertencentes ao gênero *Burkholderia* têm sido identificadas como tendo ampla capacidade de degradar compostos aromáticos (BASHA; RAJENDRAN; THANGAVELU, 2010). Com o objetivo de se obter informações sobre os mecanismos envolvidos nas vias metabólicas de biodegradação desses compostos, foram desenvolvidas diversas tecnologias inovadoras. Após a conclusão de estudos sobre o sequenciamento do genoma de uma diversidade de bactérias capazes de remediar vários compostos recalcitrantes, surgiram outras tecnologias incluindo aquelas referentes à abordagem proteômica. A análise proteômica permite, além de outros benefícios, obter informações importantes sobre o ciclo de vida, regulação e modificações pós-traducionais de proteínas induzidas em condições específicas (KIM; CHOI; KAHNG, 2007).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Fenol e compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, abreviadamente designados de fenóis, são compostos orgânicos que apresentam em sua estrutura um grupo hidroxila (- OH) ligado de forma direta a um carbono do anel benzênico (Figura 1). O fenol, o composto básico do grupo dos fenóis foi isolado em 1834, por Runge, um químico alemão, a partir de alcatrão de carvão, sendo primeiramente utilizado na forma de creosoto, para prevenir o desgaste natural de ferrovias e cascos de navios e posteriormente utilizado em esgotos domésticos com a finalidade de diminuir o odor gerado pela decomposição desses dejetos (BASHA; RAJENDRAN; THANGAVELU, 2010). Este composto também é conhecido como fenol comum, ácido carbólico, hidroxibenzeno ou ácido fênico. Na Tabela 1 são mostradas algumas propriedades físicas do fenol.

Figura 1 – Estrutura química de alguns compostos fenólicos.



Fonte: MONTEIRO (1998).

À temperatura ambiente, o fenol pode ser sólido incolor ou líquido espesso, com tonalidade rosa por causa da presença de produtos da oxidação. Ele é higroscópico, sólido cristalino e ácido (NAIR; JAYACHANDRAN; SHASHIDHAR, 2008). Possui um odor doce como alcatrão e é solúvel em álcool, glicerol, petróleo e água. O fenol e os compostos fenólicos são tóxicos e estão entre os poluentes mais frequentemente encontrados em rios, efluentes industriais e águas de escoamento de aterros sanitários (BASHA; RAJENDRAN; THANGAVELU, 2010; PRASAD; ELLIS, 1978; SAA *et al.*, 2010; SANTOS, 2009).

Tabela 1 – Propriedades físicas do fenol.

<b>Propriedades</b>	<b>Informação</b>
Fórmula Molecular	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O
Massa Molecular	94,111
Ponto de fusão	40,89°C
Ponto de Ebulição	181,87°C
Densidade	1,072

Fonte: ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2008); Nair; Jayachandran; Shashidhar (2008).

O fenol é a unidade estrutural básica para uma variedade de compostos orgânicos sintéticos, incluindo químicos agrícolas e pesticidas. As indústrias de processamento da borracha, colas e adesivos, componentes elétricos (plásticos), siderúrgicas, pesticidas, papel e celulose, têxteis, madeira, entre outras, são responsáveis pela presença desses compostos xenobióticos tóxicos nas águas naturais. O fenol e seus derivados são também utilizados na fabricação de fibras sintéticas, tais como, náilon e na produção de intermediários químicos utilizados em inúmeras outras aplicações, que vão desde a fabricação de plástico a produtos farmacêuticos e agrícolas, tais como os pesticidas, ácido 2,4 diclofenoxiacético (2,4 D) ou o ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético (MCPA), e também, biocidas fenólicos como pentaclorofenol (BASHA; RAJENDRAN; THANGAVELU, 2010; CETESB, 2012; NANDISH, 2005; LAINE; JORGENSEN, 1996).

## **2.2 Fenol e Compostos Fenólicos: Riscos Ambientais e a Saúde**

Devido a sua mobilidade e solubilidade na água, o fenol e os compostos fenólicos podem atingir rapidamente as fontes de água, causando danos às espécies aquáticas e ao homem (JIANG; TAY; TAY, 2002).

De acordo com a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB, os fenóis constituem-se em padrão de potabilidade da água, pois estes, mesmo em baixas concentrações, ao reagirem com o cloro livre formam os clorofenóis que produzem sabor e odor na água, sendo imposto pela Portaria 1469 do Ministério da Saúde que a concentração máxima de fenol em águas potáveis não deve exceder 0,001 mg/L (CETESB, 2012).

A Agência para o Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças – ATSDR (2008), afirma que em animais, a exposição oral a longo-prazo a altos níveis de fenol, causa danos ao coração, rins, fígado e pulmões. Já na pele dos animais a exposição ao fenol, a curto-prazo,

pode produzir bolhas e queimaduras. Gad e Saad (2008) relatam em seus estudos que o fenol, mesmo em baixas concentrações, deve ser listado como um poluente altamente tóxico para os peixes, pois o mesmo pode causar disfunção endócrina, disfunção hepática, efeito genotóxico, redução na taxa de crescimento ou se acumularem em quantidade significativa nesses animais.

Leite *et al.* (2012) demonstraram em seus estudos que o fenol pode apresentar toxicidade crônica nas concentrações a partir de 1 mg/L, e ainda relataram que, a exposição prolongada ao fenol e seus derivados em determinadas concentrações, podem apresentar efeitos nocivos a animais e a seres vivos aquáticos como algas e peixes.

Pesquisa realizada com larvas de anfíbios da espécie *Bufo arenarum*, mostra que concentrações a partir de 25 mg/L de fenol podem ocasionar malformações no estágio inicial de desenvolvimento desses embriões ou em alguns casos levar a morte do indivíduo (PAISIO *et al.*, 2009).

Em seres humanos, embora não haja evidência que o fenol cause câncer, a exposição ao fenol, a longo-prazo pode provocar efeitos nocivos no Sistema Nervoso Central, coração, rins, fígado e pele, ocasionando distúrbios físicos e mentais, tais como, vômito, dificuldade de respirar, anorexia, dores de cabeça, dentre outros (SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

O tempo de meia-vida do fenol, ou seja, o tempo necessário para que este poluente, após aplicado, tenha sua eficiência reduzida a metade, varia de acordo com o tipo e condições do ambiente o qual ele se encontra. Por exemplo, no ar o seu tempo de meia-vida é de aproximadamente 15 horas; no solo a sua meia-vida é inferior a 5 dias; na água este poluente permanece por um período mais longo, onde o seu tempo de meia-vida varia entre 2 a 20 dias; já em ambientes onde o pH é 7 a meia-vida deste poluente é de 26 dias, enquanto que em pH 9 esse período reduz para 12 dias (MOUSSAVI, 1979; NPI, 2013).

### **2.3 Tratamento de ambientes contaminados com fenol**

Várias tecnologias (biológicas ou não biológicas) são utilizadas no processo de tratamento de ambientes contaminados com fenol e seus derivados. Os métodos não biológicos tais como, extração de solvente, adsorção, oxidação química, incineração, entre outros, apresentam algumas desvantagens, como por exemplo, o custo elevado e a formação de produtos secundários perigosos. Métodos biológicos são geralmente preferidos devido ao baixo custo e a possibilidade de completa degradação do poluente (BASHA; RAJENDRAN; THANGAVELU, 2010), dentre esses métodos destaca-se a biodegradação. Segundo Atlas e

Bartha (1998), biodegradação é a transformação de compostos orgânicos complexos em compostos mais simples como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NO<sub>3</sub> e outros compostos inorgânicos. Neste processo os micro-organismos fazem uso das moléculas orgânicas (carbono, nitrogênio, fósforo, etc.) dos compostos orgânicos complexos, como o fenol, aproveitando a energia destas moléculas, em sua autoconstrução e reprodução, devolvendo-as ao meio (ar, água, solo) na forma de compostos mais simples e menos tóxicos, como gás carbônico, fosfatos, nitratos, etc (SILVA; MELO e SOUZA, SOUZA, 2004).

### 2.3.1 Biodegradação do Fenol

Devido às diversas atividades industriais que envolvem o uso dos fenóis em seus processos de produção, tornou-se comum a ocorrência do fenol e seus derivados no meio ambiente. Diversos micro-organismos (Tabela 2) que incluem tanto os aeróbicos como os anaeróbicos, naturalmente utilizam o fenol como fonte de carbono e energia (BASHA; RAJENDRAN; THANGAVELU, 2010). De acordo com Nair, Jayachandran e Shashidhar (2008), esta atividade biodegradativa se dar pela ação de uma variedade de enzimas que incluem as hidroxilases, peroxidases, tirosinases e oxigenases.

Tabela 2 – Lista de alguns micro-organismos envolvidos na biodegradação do fenol e compostos fenólicos. Continua.

Fonte	Micro-organismos	Referências
Bactérias	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Avanzi; Gracioso; Perpetuo (2009)
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Sandhu; Halverson; Beattie (2009)
	<i>Alcaligenessp. CC-ESB2</i>	Sandhu; Halverson; Beattie (2009)
	<i>Rhodococcussp. CHNTR32</i>	Sandhu; Halverson; Beattie (2009)
	<i>Acinetobacter EDP3</i>	Geng <i>et al.</i> (2006)
	<i>Pseudomonas putida KT2440</i>	Roma-Rodrigues <i>et al.</i> (2010)
	<i>Pseudomonas A4CP2</i>	Jame <i>et al.</i> (2008)
	<i>Pseudomonas sp. PCT01</i>	Zhu; Tian; Chen (2012)
	<i>Pseudomonas sp. PTS02</i>	Zhu; Tian; Chen (2012)
	<i>Pseudomonas syringae</i>	Erhan <i>et al.</i> (2004)
	<i>Burkholderia kururiensis</i>	Zhang <i>et al.</i> (2000)
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	Boháčová; Godocikova; Polek. (2001)
	<i>Herbaspirillum chlorophenolicum sp.</i>	Im <i>et al.</i> (2004)
	Fungos e Leveduras	<i>Paecilomyces javanicus</i>
<i>Aspergillus niger AN400</i>		Damasceno <i>et al.</i> (2007)

Tabela 2 – Lista de alguns micro-organismos envolvidos na biodegradação do fenol e compostos fenólicos. Conclusão.

Fonte	Micro-organismos	Referências
	<i>Aspergillus</i> sp. LEBM2	Passos <i>et al.</i> (2009)
	<i>Mortierella</i>	Perron e Welander (2004)
	<i>Fusarium</i> sp. FE11	Santos e Linardi (2004)
	<i>Candida maltosa</i>	Fialova; Boschke; Bley (2004)
	<i>Candida parapsilopsis</i>	Rigo <i>et al.</i> (2006)

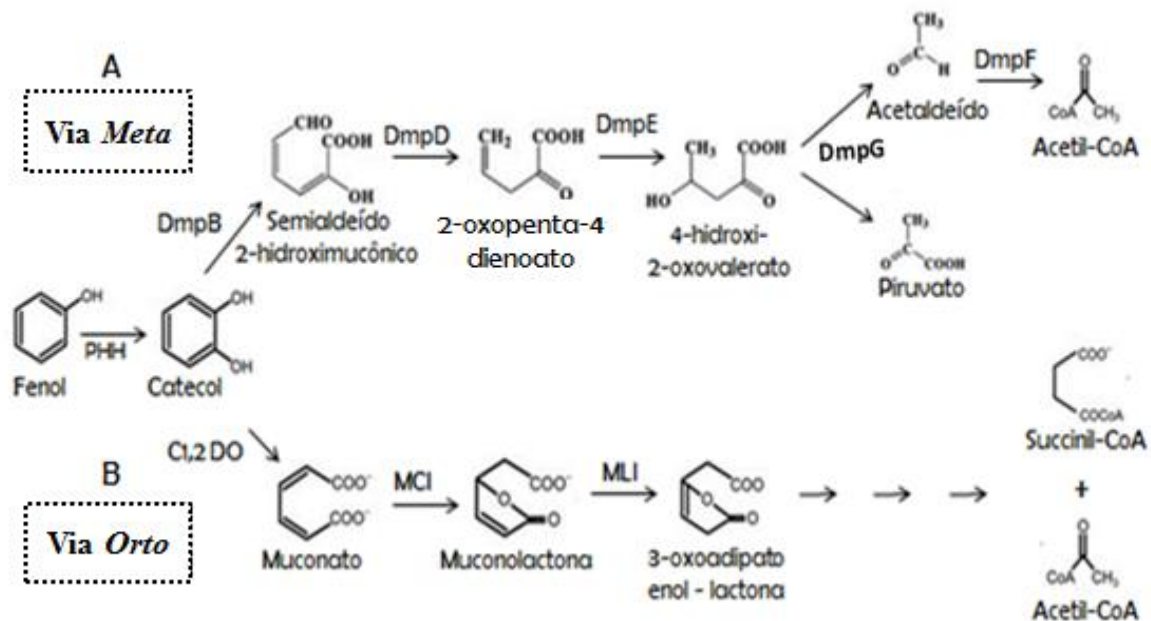
### 2.3.1.1 Biodegradação aeróbica do fenol

O processo de biodegradação aeróbica do fenol (Figura 2) é iniciado pela oxigenação do anel aromático, que é inicialmente monohidroxilado pela enzima fenol hidroxilase (fenol 2-mono-oxigenase), numa posição orto em relação ao grupo hidroxila pré-existente para formar o catecol. A molécula de catecol resultante (1,2 – dihidroxibenzeno) pode ser degradada por duas vias alternativas - *orto* ou *meta*.

Na via *meta* (Figura 2A), a clivagem do anel aromático do catecol ocorre entre um dos grupos hidroxila e um carbono não hidroxilado (fissão extradiol) pela ação da enzima catecol 2,3-dioxigenase (CERNIGLIA, 1984; GURUJEYALEKSHMI; ORIEL, 1988) produzindo semialdeído 2-hidroximucônico que é convertido a 2-oxopenta-4-dienoato pela ação da enzima semialdeído 2-hidroximucônico hidrolase. O produto resultante é degradado pela enzima 2-oxopenta-4-dienoato hidratase à 4-hidroxi-2-oxoalderato, que em seguida será transformado em piruvato e acetaldeído, o qual será convertido a acetil-CoA. Esta reação é catalisada pela enzima acetaldeído desidrogenase.

Na via *orto* ou  $\beta$  – cetoalderato (Figura 2B) o anel aromático é clivado entre as duas hidroxilas do catecol pela enzima catecol 1,2 dioxigenase (fissão intradiol) (HARWOOD; PARALES, 1996; STANIER; ORNSTON, 1973) produzindo muconato, que é convertido a muconolactona pela enzima muconato cicloisomerase. Este produto, pela ação se uma isomerase (muconolactona isomerase) é transformado em 3-oxoalderato enol-lactona que posteriormente será convertido em acetil-CoA e succinil- CoA (ZÍDKOVÁ *et al.*, 2012).

Figura 2 - Vias aeróbicas de degradação do fenol. (A) Via *meta* de degradação do fenol por *Pseudomonasp.* CF600. (B) Via *orto* de degradação do fenol por *R. erythropolis* CCM2595.



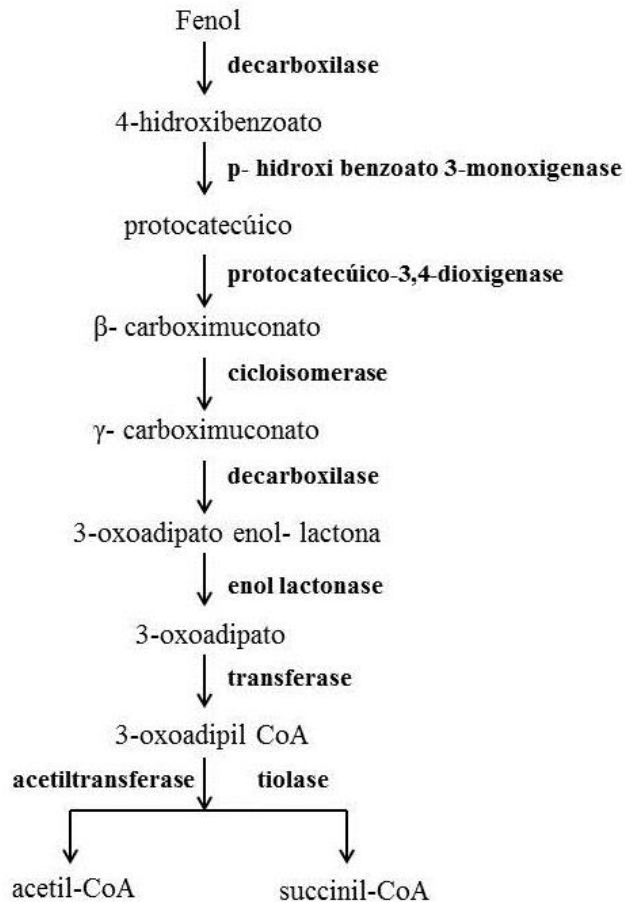
Fonte: SUENAGA *et al.* (2009); ZÍDKOVÁ *et al.* (2012). Abreviações das enzimas: PHH: fenol hidroxilase; DmpB: catecol 2,3-dioxigenase; DmpD: semialdeído 2-hidroximucônico hidrolase; DmpE: 2-oxopenta-4-dienoato hidratase; DmpG: 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolase; DmpF: acetaldeído desidrogenase. (B) Via *orto* de degradação do fenol por *R. erythropolis* CCM2595. Abreviações das enzimas: PHH: fenol hidroxilase; C1,2DO: catecol 1,2-dioxigenase; MCI: muconato cicloisomerase; MLI: muconolactona isomerase.

Os produtos finais de ambas as vias são moléculas que podem entrar no ciclo de Krebs (BASHA; RAJENDRAN; THANGAVELU, 2010; HARAYAMA, KOK; NEIDLE, 1992; POWLOWSKI; SHINGLER, 1994) e serem utilizadas como fonte energética pelas células.

### 2.3.1.2 Biodegradação anaeróbica do fenol

O processo de biodegradação anaeróbica do fenol (Figura 3) é baseado na via de degradação anaeróbica do benzoato proposta por Williams e Evans (1975). A primeira etapa desta via é a carboxilação do fenol na posição *para*, pela enzima 4-hidroxi benzoato carboxilase, formando 4-hidroxibenzoato. O produto final desta via, assim como nas vias aeróbicas, são moléculas que podem entrar no ciclo de Krebs, como por exemplo, acetil-CoA e succinil-CoA.

Figura 3 - Via anaeróbica de degradação do fenol.



Fonte: BASHA; RAJENDRAN; THANGAVELU (2010).

## 2.4 Biorremediação

A biorremediação é o processo que utiliza agentes biológicos, principalmente plantas e micro-organismos (bactérias, fungos e leveduras), para remover ou reduzir poluentes em ambientes contaminados, como por exemplo, águas superficiais, subterrâneas e solo, além de resíduos e efluentes industriais em aterro ou áreas de contenção (GAYRLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005; STRONG; BURGESS, 2008).

A tecnologia da biorremediação é baseada na biodegradação. Neste processo utiliza-se o metabolismo dos micro-organismos para transformar poluentes tóxicos de difícil degradação em compostos de baixa toxicidade, ou mesmo em substâncias inofensivas ou inertes, como dióxido de carbono, água e compostos inorgânicos (MANDRI; LIN, 2007; YAKUBU, 2007). Segundo Okoh e Trejo-Hernandez (2006), os micro-organismos são os componentes fundamentais no processo de biorremediação, pois eles produzem enzimas envolvidas nas reações de degradação ocasionando a eliminação ou desintoxicação dos



poluentes químicos. Porém, o sucesso dessa tecnologia depende de vários fatores tais como: o tipo de solo, a estrutura química e a disponibilidade do contaminante, além de condições favoráveis ao desenvolvimento dos micro-organismos, como por exemplo, aeração, umidade, temperatura e pH, presença de nutrientes, entres outros (RIZZO *et al.*, 2006).

A prática de biorremediação apresenta, em certos casos, um menor custo e maior eficiência de remoção dos contaminantes do que técnicas físicas e químicas (como incineração e lavagem do solo), sendo atualmente utilizada em escala comercial no tratamento de diversos resíduos e na remediação de áreas contaminadas (BAMFORTH; SINGLETON, 2005).

Os processos de biorremediação podem ser classificados em *in situ* ou *ex situ*. A biorremediação *in situ* é realizada no local, sem que haja remoção de águas e solos contaminados. Isto elimina a necessidade de transferência do material contaminado para outros locais destinados ao tratamento, evitando custos e distúrbios ambientais associados a este movimento. Já a biorremediação *ex situ*, é conduzida fora do local contaminado. Neste caso, o material contaminado é retirado e transferido para posterior tratamento em instalações apropriadas, podendo envolver o uso de biorreatores (JACQUES *et al.*, 2007; MARIANO, 2006).

As técnicas de biorremediação fundamenta-se nas atividades aeróbicas ou anaeróbicas de micro-organismos denominados “petrófilos” (MANDRI; LIN, 2007). Bactérias aeróbicas dos gêneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus*, e *Mycobacterium*, são conhecidas por sua capacidade de degradar pesticidas e hidrocarbonetos, utilizando os contaminantes como fonte de carbono e energia. A biorremediação anaeróbica ainda não é frequentemente utilizada como a aeróbica. Porém vem aumentando o interesse em se utilizar bactérias anaeróbicas no processo de biorremediação de bifenóis policlorados (PCBs) em sedimentos de rios e na descloração do solvente tricloetileno (TCE) (PRASAD; GARG; MAHESHWARI, 2012).

Vários estudos relatam a utilização das técnicas de biorremediação na biodegradação de diversos poluentes. *Burkholderia* DBT1, uma bactéria isolada de esgotos de refinarias de petróleo, se mostrou capaz de degradar oxidativamente dibenzotiofeno (DBT) em cultura líquida (DI GREGORIO *et al.*, 2004). *Arthrobacter* sp. W1 tem sido relatada por ser capaz de biodegradar compostos fenólicos em condições salinas complexas (WANG; QU; ZHOU, 2009). Enquanto que, Cerqueira *et al.* (2012) observaram que as bactérias, *Stenotrophomonas acidaminiphila* BB5, *Bacillus megaterium* BB6, *Bacillus cibi*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* BS20 mostraram potencial distinto para uso em

processos futuros de biorremediação envolvendo borra oleosa, um resíduo perigoso gerado em abundância na indústria petrolífera.

Muitas estirpes bacterianas isoladas foram investigadas quanto à sua capacidade de degradar fenol, como *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Comamonas* sp., etc. A maioria dessas cepas foram isoladas de sítios contaminados e sua tolerância ao fenol variou de 400 a 2500 mg/L (DONG *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2010; ZHU; TIAN; CHEN, 2012);

A biorremediação pode ocorrer pela ação de uma única espécie microbiana ou pela ação conjunta de diversos micro-organismos (consórcio microbiano). Segundo Jacques *et al.* (2007) e Sathishkumar *et al.* (2008), a formação de consórcios microbianos se faz necessário quando as moléculas a serem degradadas possuem estrutura complexa e de difícil degradação (compostos recalcitrantes).

Estudos relatam que a utilização de consórcios microbianos pode aumentar a degradação de contaminantes, devido ao efeito sinérgico produzido pela combinação de algumas culturas. Jacques *et al.* (2005) mostraram que a inoculação de um consórcio microbiano composto por seis bactérias e um fungo no solo contaminado com antraceno, fenantreno e pireno resultou em um aumento de aproximadamente 10 vezes na degradação desses hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), em relação a microbiota nativa dos solos. Já, Prpich e Daugulis (2005) realizando estudos de biodegradação do fenol em biorreatores revelaram que estirpes de *Pseudomonas* presentes de forma isolada em biorreatores eram incapazes de degradar o fenol, mas quando presentes com outras estirpes, formando um consórcio microbiano, mostraram capacidade de degradar o poluente. Isto sugere que todos os organismos dentro do consórcio são importantes na degradação de fenol.

## 2.5 Gênero *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia* foi inicialmente proposto por Yabuuchi *et al.* (1992). Porém, uma das primeiras espécie de *Burkholderia* sp., *Phytomonas caryophylli* foi descrita por Burkholder (1942). Em 1949, uma espécie bacteriana fitopatogênica, foi descrita como sendo a responsável pelo apodrecimento dos bulbos da cebola. Esta espécie ficou conhecida como “cepacia”, significado derivado de cebola (*Allium cepa*), sendo posteriormente incluída no gênero *Pseudomonas* durante muitos anos (BURKHOLDER, 1950).

Segundo Yabuuchi *et al.* (1992), a análise taxonômica molecular, induziu a transferência de várias espécies do gênero *Pseudomonas* para o gênero *Burkholderia*, sendo a

espécie *Burkholderia cepacia* nomeada como espécie tipo do gênero. Porém, nas últimas décadas, estudos utilizando técnicas moleculares, tais como, o perfil proteico das células, hibridização DNA-RNA, hibridização DNA-DNA, análise dos ácidos graxos e testes bioquímicos convencionais, revelaram que a espécie *Burkholderia cepacia*, na verdade, não se trata de uma única espécie, mas sim, de um grupo heterogêneo, composto de várias espécies filogeneticamente associadas, com grande semelhança fenotípica. O termo genomovar foi utilizado para nomear cada um dessas várias espécies geneticamente distintas, e o conjunto de genomovares foi designado de complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc) (VANDAMME *et al.*, 1997), anteriormente formado por nove espécies distintas, a saber: *B. cepacia* (VANDAMME *et al.*, 1997); *B. multivorans* (VANDAMME *et al.*, 1997); *B. cenocepacia* (VANDAMME *et al.*, 2003); *B. stabilis* (VANDAMME *et al.*, 2000); *B. vietnamiensis* (GILLIS *et al.*, 1995; VANDAMME *et al.*, 1997); *B. dolosa* (COENYE *et al.*, 2001; VERMIS *et al.*, 2004); *B. ambifaria* (COENYE *et al.*, 2001); *B. anthina* (VANDAMME *et al.*, 2002); *B. pyrrocinia* (VANDAMME *et al.*, 2002). Estudos mais recentes mostram que o complexo *Burkholderia cepacia* é formado por pelo menos 17 espécies (VANLAERE *et al.*, 2009).

O gênero *Burkholderia*, classe  $\beta$ -proteobactéria, abrange mais de 60 espécies (COENYE; VANDAMME, 2003 *apud* VIAL *et al.*, 2011) de bactérias gram-negativa, na forma de bacilos, isoladas de uma diversidade de nichos ecológicos que incluem: áreas industriais (*B. cenocepacia* IIB: VANDAMME *et al.*, 2003), solos (*B. sartisoli*: VANLAERE *et al.*, 2008), rizosferas (*B. tropica* TTe-791; *B. xenovorans* TCo-213: CABALLERO-MELLADO *et al.*, 2007), água (*B. pseudomallei*: MOORE *et al.*, 2008), alimentos (*B. cocovenenans*: COENYE; VANDAMME, 2003), animais (*B. mallei*: VANDAMME; MAHENTHIRALINGAM, 2003), ambientes hospitalares (*B. cepacia*: WONG-VILLARREAL; CABALLERO-MELLADO, 2010), plantas (*B. kururiensis*: CABALLERO-MELLADO *et al.*, 2007), fungos (*B. fungorum*: VANDAMME; MAHENTHIRALINGAM, 2003), nódulos radiculares (*B. sabiae*: CHEN *et al.*, 2008) e seres humanos infectados (*B. anthina*: VANDAMME; MAHENTHIRALINGAM, 2003).

A grande versatilidade ecológica do gênero *Burkholderia* tem sido atribuída a dois fatores principais: primeiramente, as bactérias pertencentes a este gênero são metabolicamente resistentes devido ao tamanho do seu genoma, o qual é frequentemente composto por vários *replicons* grandes (dois a quatro) que podem variar em tamanho de 4,0 a 9 Mb. Em segundo lugar seu genoma pode conter ilhas genômicas contendo elementos genéticos móveis

(sequências de inserção, profagos) que conferem plasticidade ao genoma e explicam a versatilidade (LESSIE *et al.*, 1996; VIAL *et al.*, 2007).

Alguns membros desse gênero foram identificados como patógenos ou associados com algumas doenças em seus hospedeiros. Almeida *et al.* (2009) demonstraram que bactérias *Burkholderia andropogoni* ocasionam manchas em folhas de *Ruscus* sp. *Burkholderia pseudomallei*, foram relatadas por ocasionar infecções letais em muitas espécies de animais, como por exemplo, grandes primatas (gorilas), algumas espécies de aves e em determinados mamíferos marinhos (WHITE, 2003). Em seres humanos, as espécies *B. cenocepacia* e *B. multivorans* estão associadas a infecções em pacientes afetados por fibrose cística (JONES *et al.*, 2004).

Porém, outros não são patogênicos e são conhecidos por realizar interações neutras ou benéficas com seus hospedeiros. Em plantas, estes atuam aumentando a resistência a doenças (KILANI-FEKI *et al.*, 2011) , melhorando a habilidade da planta de resistir ao estresse ambiental (PARK *et al.*, 2010) e/ou aumentam a fixação de nitrogênio atmosférico (PAYNE *et al.*, 2006; FRANCHE; LINDSTRÖM; ELMERICH, 2009). Entre outras aplicações biotecnológicas, as bactérias do gênero *Burkholderia* podem atuar como agentes de biocontrole, na biorremediação de compostos xenobióticos recalcitrantes e com considerável potencial na produção de plásticos biodegradáveis (COENYE; VANDAMME, 2003).

## 2.6 Proteômica

É inquestionável que os estudos sobre o sequenciamento do DNA e consequentemente de todos os genes de um determinado organismo, proporcionaram uma riqueza de informações que contribuíram para o entendimento da função das células vivas a nível molecular (MONTI *et al.*, 2005) . Porém, estudos sobre o sequenciamento do genoma são insuficientes para entender todas as funções celulares, já que o sequenciamento dos genes não nos fornecem dados sobre as proteínas de um determinado organismo e nem de que forma elas atuam, individual ou coletivamente, no cumprimento de suas funções. Além disso, a partir da sequencia genômica não é possível se estudar as modificações que as proteínas sofrem após serem sintetizadas (modificações pós-traducionais) tais como, glicosilação e fosforilação. Da mesma forma, o estudo do genoma compromete o conhecimento de que proteínas estão sendo expressas por uma célula a determinado momento (SOUSA; FONTES; RICART, 1999).

O estudo do proteoma, ou seja, o conjunto de proteínas codificadas pelo genoma (WILKINS *et al.*, 1996), é de grande importância para elucidar a funcionalidade das proteínas a nível celular, uma vez que, ao contrário do genoma, o proteoma não é estático e este pode se modificar dependendo das condições e estímulo ao qual o organismo em estudo possa estar exposto.

A ciência que estuda o proteoma é conhecida como proteômica, e esta, de acordo com Palzkill (2002) pode ser definida como o estudo em larga escala das propriedades das proteínas, com o propósito de se obter uma visão global dos processos celulares a nível de proteína. Em geral, a proteômica possui diversas aplicações, tais como: 1) o estudo da expressão diferencial de proteínas, que pode fornecer importantes informações sobre a sinalização celular e desenvolvimento dos organismos; 2) o estudo de modificações pós-traducionais; 3) os estudos de interação proteínas-proteína; 4) o estudo da proteômica estrutural que visa o estudo da composição proteica de organelas e membranas; 5) o estudo da função das proteínas através da proteômica funcional e; 6) a proteômica computacional, que visa estudos de modelagem e dinâmica das proteínas (DIAS *et al.*, 2007).

A história dos estudos proteômicos iniciou na década de 70 quando O'Farrell (1975) descreveu uma técnica de separação de proteínas, denominada de eletroforese bidimensional (2D-PAGE ou 2-DE). Utilizando esta técnica, as proteínas poderiam ser separadas, em gel de acrilamida, de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI) por focalização isoelétrica (IEF) na primeira dimensão, e por sua massa molecular (MW) por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) na segunda dimensão.

Segundo Magdeldin *et al.* (2012) a eletroforese bidimensional (2-DE) é uma das ferramentas mais comuns e poderosas para separação e fracionamento de complexos proteicos extraídos de tecidos, células e outras amostras biológicas. Através dessa técnica é possível elaborar o mapa ou perfil global de todos os produtos gênicos presentes na célula a um dado momento (SILVA, 2002).

A abordagem proteômica vem sendo recentemente utilizada como ferramenta metodológica em várias pesquisas que empregam uma diversidade de materiais oriundos de diversas fontes, tais como, plantas, animais, bactérias, fungos, seres humanos, entre outros. Yin *et al.* (2012) ao analisar alterações no proteoma do trigo ocasionada pela exposição ao fostiazato verificaram que este nematocida, induziu mudanças no proteoma de embriões do trigo. Já Sengupta *et al.* (2010), realizando a análise proteômica comparativa das proteínas extracelulares da bactéria Gram-positiva *Clostridium perfringens* das cepas tipo A e do tipo

C, verificou que muitas das proteínas identificadas em ambas as cepas não foram relatadas no exoproteoma de qualquer outra bactéria Gram-positiva. Além disso, Contreras *et al.* (2010) ao utilizar a abordagem proteômica em seus estudos identificaram diversas proteínas potencialmente envolvidas no controle do estresse oxidativo mediado pelo cobre em algas *Scytosiphon gracilis*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- Este trabalho tem como objetivo geral realizar a análise proteômica de *Burkholderia* sp. SMF 07 em resposta ao fenol visando determinar a tolerância e a capacidade de degradação deste composto pela cepa estudada.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a curva de crescimento de *Burkholderia* sp. SMF 07 cultivada em meio TY suplementado com diferentes concentrações de fenol com a finalidade de verificar se a cepa estudada é tolerante ao fenol.
- Determinar a curva de crescimento de *Burkholderia* sp. SMF 07 cultivada em meio mineral BH suplementado com diferentes concentrações de fenol com a finalidade de verificar se a cepa estudada é capaz de utilizar o fenol como única fonte de carbono.
- Obter perfis protéicos de *Burkholderia* sp. SMF 07 na ausência (grupo controle) e na presença de fenol (grupo fenol) cultivada em meio TY;
- Comparar os mapas proteômicos obtidos para cada grupo, em busca de proteínas específica de cada grupo ou diferencialmente expressas;
- Identificar as proteínas intracelulares específica de cada grupo ou diferencialmente expressas por *Burkholderia* sp. SMF 07;
- Buscar proteínas que estão relacionadas à biodegradação do fenol, que estejam envolvidas na resposta ao estresse ou ainda, que participem das vias metabólicas de produção de energia para as células.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Bactérias e Condições do Cultivo

A cepa bacteriana utilizada nesse trabalho foi previamente identificada como *Burkholderia* e é oriunda da coleção de  $\beta$ -proteobactéria do Dr. Sérgio Miana Faria, pesquisador da Embrapa Agrobiologia (Rio de Janeiro, Brasil). O isolado de *Burkholderia* foi recuperado de ampolas contendo estas células e crescidos em meio TY líquido (DÖBEREINER, ANDRADE; ALCÂNTARA, 1999) na temperatura de 28°C e 250 rpm por 48 horas.

### 4.2 Microscopia e Coloração de Gram

Ao final de cada crescimento bacteriano foi realizada a coloração de Gram (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005), com o objetivo de verificar se a cultura estava pura, ou seja, se na suspensão celular havia apenas bacilos Gram-negativos, morfologia típica das bactérias do gênero *Burkholderia*. Para isto, após cada crescimento, uma alíquota da suspensão bacteriana foi coletada e fixada pelo calor em lâmina para microscopia e em seguida recoberto com cristal violeta, lugol, álcool-acetona e fuccina, respectivamente. Após o processo de fixação as lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Eclipse E200).

### 4.3 Curva de Crescimento

#### 4.3.1 Curva de crescimento de *Burkholderia* sp. SMF 07 em meio TY suplementado com fenol

A partir de um isolado de *Burkholderia* sp. SMF 07, foi feito um pré-inóculo com 10 mL de meio TY e estocado a 28°C por 24 horas sob agitação orbital a 250 rpm. Após o crescimento, a pureza da cultura de *Burkholderia* foi verificada pelo Método de coloração de Gram (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Em seguida, 2,5 mL do pré-inóculo foi utilizado em meio de cultivo de 250 mL: TY (grupo controle) e TY suplementado com 500 ou 1000 mg/L de fenol (grupo fenol). As culturas foram cultivadas a 28°C sob agitação a 250 rpm. Após a inoculação o crescimento bacteriano foi monitorado a cada hora pela Densidade Óptica de 600 nm ( $O.D_{600\text{ nm}}$ ) através de espectrofotômetro (*GenQuant, GE Healthcare<sup>TM</sup>*) até o estabelecimento da fase estacionária. Em seguida a presença de *Burkholderia* foi verificada



em todas as culturas pela coloração de Gram (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). O crescimento bacteriano foi realizado em triplicata.

#### **4.3.2 Curva de crescimento de *Burkholderia* sp. SMF 07 em meio BH suplementado com fenol**

Com o objetivo de verificar se a cepa bacteriana *Burkholderia* sp. SMF 07 seria capaz de utilizar o fenol como única fonte de carbono e energia, foi realizado o cultivo desta bactéria em meio mineral Bushnell Hass (BH) suplementado ou não com fenol. Para isso, foi feito um pré-inóculo a partir de um isolado de *Burkholderia* sp. SMF 07 em 10 mL de meio TY estocado a 28°C por 24 horas, sob agitação orbital a 250 rpm. Após o crescimento, a pureza da cultura de *Burkholderia* foi verificada pelo Método de coloração de Gram (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Em seguida, 1 mL do pré-inóculo foi transferido para 100 mL de meio TY estocado a 28°C sob agitação orbital a 250 rpm até a cultura atingir densidade óptica (O.D) entre 0,8 e 1,0. Posteriormente o inóculo foi centrifugado a 1000 x g por 5 minutos e o decantado (*pellet*) obtido foi lavado com solução salina 0,85% por centrifugação a 1000 x g por 5 minutos. O decantado (*pellet*) resultante foi ressuspenso em meio BH (estoque de bactéria em meio BH). Logo após, 3 mL do estoque de bactéria em meio BH foi utilizado em meio de cultivo de 300 mL: BH ( grupo controle) e BH suplementado com 400 ou 600 mg/L de fenol (grupo fenol). As culturas foram cultivadas a 28°C sob agitação a 250 rpm. Após a inoculação o crescimento bacteriano foi monitorado a cada três horas pela Densidade Óptica de 600 nm (O.D<sub>600 nm</sub>) através de espectrofotômetro (*GenQuant, GE Healthcare<sup>TM</sup>*) até o estabelecimento da fase estacionária. Em seguida a presença de *Burkholderia* foi verificada em todas as culturas pela coloração de Gram (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

#### **4.4 Extração de proteínas intracelulares**

A extração das proteínas intracelulares foi realizada de acordo com Riedel *et al.* (2006) com algumas modificações. Para este fim, a cepa de *Burkholderia* sp. SMF 07 foi crescida *overnight* em 10 mL de meio TY à 28°C sob agitação orbital de 250 rpm. Em seguida, o pré-inóculo foi adicionado a 1,3 L de TY. A indução da expressão de proteínas foi realizada através da adição de 1000 mg/L de fenol. Usando sempre um controle para cada meio com o poluente (grupo fenol) que constava apenas de meio TY e o isolado característico, para que pudesse ser comparada a expressão proteica de cada condição

envolvida no estudo. O crescimento bacteriano foi monitorado através da O.D<sub>600 nm</sub> utilizando o espectrofotômetro (*GenQuant, GE Healthcare<sup>TM</sup>*). Quando as suspensões bacterianas estavam na fase *log* de crescimento bacteriano uma alíquota foi retirada e utilizada para realização do teste de coloração de Gram (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005) e o restante foi centrifugado a 5000 rpm a 4°C por 30 minutos, para obtenção do sobrenadante e do decantado (*pellet*), sendo o primeiro descartado, e o último utilizado para a extração das proteínas intracelulares. Dessa forma o precipitado (*pellet*) 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 Healthcare<sup>TM</sup>)*). 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 decantado (*pellet*) lavado duas vezes com acetona gelada 100%. Após as lavagens o decantado (*pellet*) final foi seco a temperatura ambiente e ressuspenso em uréia 7 M/ tiouréia 2 M.

## 4.5 Quantificação de proteínas

### 4.5.1 Método de Bradford

As proteínas totais extraídas das culturas bacterianas nas condições testadas foram quantificadas através do método de Bradford (1976). Para tanto, nesse trabalho, 5 µL da amostra de proteína intracelular foi 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 (O.D) de 595 nm utilizando espectrofotômetro (ULTROSPEC 2100 pro). Para mensurar a concentração foi realizada uma média das absorbâncias da triplicata de cada amostra. A média das absorbâncias foi inserida na fórmula de calibração do reagente de Bradford, obtida através da construção da curva padrão do reagente de Bradford, sendo assim possível obter a concentração em µg/ µL das amostras estudadas.

#### 4.5.2 SDS-PAGE

Análise da pureza das proteínas foi realizada através da Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio – SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). O sistema de eletroforese utilizado para SDS-PAGE foi o Mini-Protean, BioRad.

#### 4.6 Eletroforese bidimensional

##### 4.6.1 Reidratação das tiras

Para a reidratação das tiras, 250 µg de cada amostra foram solubilizadas em tampão de reidratação (uréia 7 M/ tiouréia 2 M; 1% CHAPS; 1% DTT; 0,5% [v/ v], anfólitos [pH de 3-10] e azul de bromofenol) em um volume final de 250 µl. Cada mistura foi transferida para uma raia do IPG Box ou *Immobiline DryStrip Reswelling Tray* (GE Healthcare). Em seguida foi adicionado em cada raia, as tiras de gradiente de pH imobilizado (IPG) linear com 13 cm de comprimento e pH de 3-10. As tiras foram recobertas com *Cover fluid*. A reidratação ocorreu à temperatura ambiente por aproximadamente 16 horas (*overnight*).

##### 4.6.2 Focalização isoeétrica

O procedimento de focalização isoeétrica (IEF) ou primeira dimensão foi realizada no sistema de focalização *Ettan IPGphor III* (GE Healthcare). Os parâmetros utilizados no processo de focalização são mostrados na tabela 3. Depois de focalizadas as *strips* foram armazenadas a -80 °C para posterior corrida de segunda dimensão.

Tabela 3 - Parâmetro do programa *IPGphor III* usado para a focalização isoeétrica.

Etapa	Voltagem	Tempo
1	500 V	2: 00 HH: min
2	4.000 V	2: 30 HH: min
3	10.000V	18.000 Vh

##### 4.6.3 Equilíbrio das tiras

Após a focalização isoeétrica, as tiras foram equilibradas em solução de equilíbrio I (Uréia 6 M, Tris 50 mM, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol, e DTT ) e mantidas sob agitação por 15 minutos. Após esse tempo as tiras foram transferidas para

solução de equilíbrio II (Uréia 6 M, Tris 50 mM, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol e iodoacetamida) e mantidas sob agitação, por 15 minutos. Em seguida as tiras foram mergulhadas em tampão de corrida por 10 segundos para retirar o excesso da solução de equilíbrio.

#### **4.6.4 Segunda dimensão (2D)**

A separação na segunda dimensão foi realizada no sistema de eletroforese vertical *Hoefler Ruby SE 600 (GE Healthcare™)*. As tiras equilibradas foram colocadas em gel de poliacrilamida a 12,5% na presença de SDS e seladas com uma solução de agarose (0,5% de agarose e 0,002% de azul de bromofenol). Um marcador de baixo peso molecular (LMW) foi aplicado no lado ácido da tira. A separação da segunda dimensão teve duração de aproximadamente 5 horas.

Após a corrida, o gel de poliacrilamida foi submerso na solução corante com *Coomassie blue G-250 (Blue Silver)* (CANDIANO *et al.*, 2004) por 24 horas, sob agitação. Para obter a imagem do gel em formato TIFF que é o utilizado pelo programa de identificação dos *spots*, o mesmo foi digitalizado utilizando o scanner *ImageScanner III* através do software *LabScan (GE Healthcare™)*, 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 e qualitativas, massa e ponto isoelétrico dos *spots* foi feito pelo programa *ImageMaster™ (GE Healthcare™)*. Algumas proteínas foram identificadas utilizando os valores de ponto isoelétrico (pI) e massa molecular do *spot* contra o banco de dados *UniProtKB / Swiss-Prot*, através do *Expasy*, um Portal de Pesquisa de Bioinformática (<http://www.expasy.ch/tools/#proteome>), empregando a ferramenta *TagIdent*.

#### **4.7 Análise estatística**

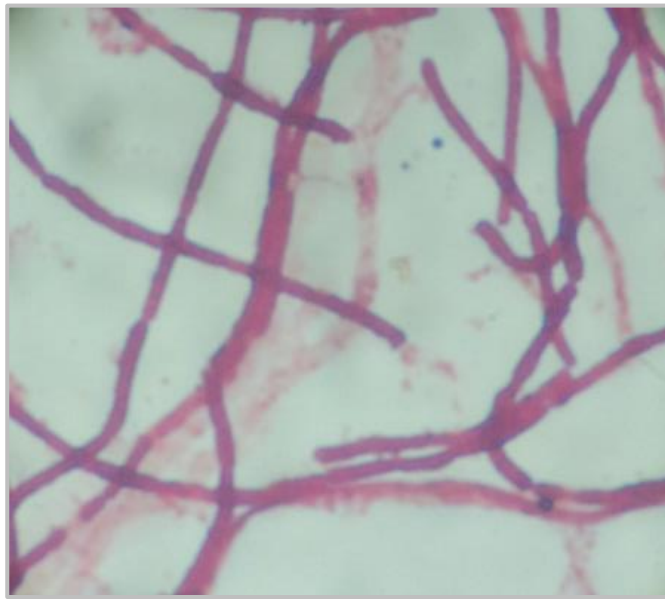
As análises de significância das diferenças quantitativas existentes entre o tratamento em relação ao controle, foi avaliada em análise não-paramétrica e independente, utilizando o programa de análise estatística *Statística 6 Workbook* com aplicação do teste *Mann-Whitney* considerando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise da pureza da cultura pelo Método de coloração de Gram

A análise da pureza da cultura realizada pelo Método de Coloração de Gram apresentou apenas bacilos gram-negativos típicos do gênero *Burkholderia* (Figura 4), o que sugere a pureza de todas as culturas empregadas.

Figura 4 - Imagem de coloração de Gram da estirpe de *Burkholderia* sp. SMF 07 utilizando microscopia óptica.

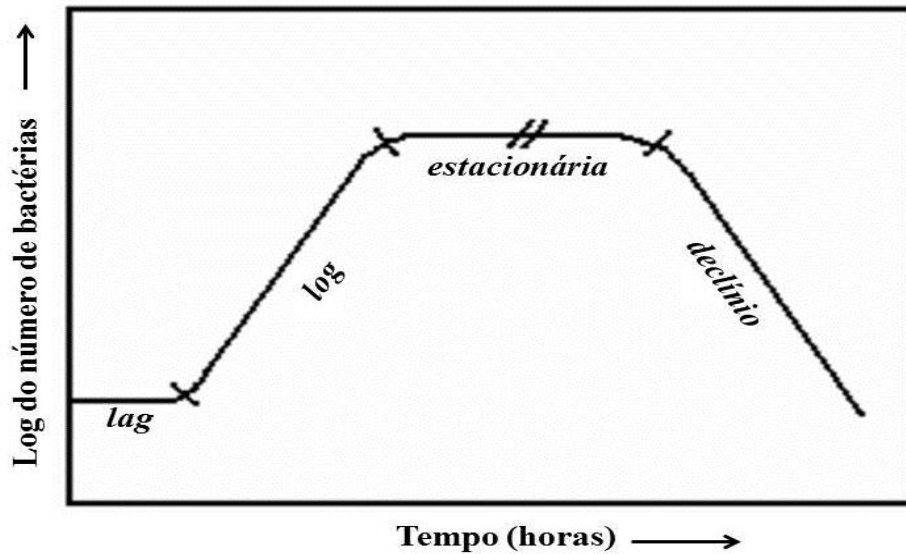


Fonte: SOARES (2013). Imagem ampliada 1000x.

### 5.2 Curva de Crescimento

Quando uma cultura microbiana desenvolve-se em um sistema fechado com condições favoráveis ao seu desenvolvimento, tais como, temperatura controlada e agitação adequada, observa-se um comportamento nos valores da concentração celular. Através desses valores, é possível se construir uma curva de crescimento que pode ser dividida nas seguintes fases: *lag*, exponencial (*log*), estacionária e declínio (Figura 5). A fase *log* é a etapa mais importante do crescimento microbiano, pois aqui, as células estão amplamente adaptadas, absorvendo os nutrientes, sintetizando seus constituintes, crescendo e duplicando-se, tornando-se possível estudar a influência de uma série de fatores entre estes os produtos oriundos do metabolismo microbiano (BEZERRA, 2006).

Figura 5 – Curva de crescimento padrão, em sistema fechado.



Fonte: BEZERRA (2006).

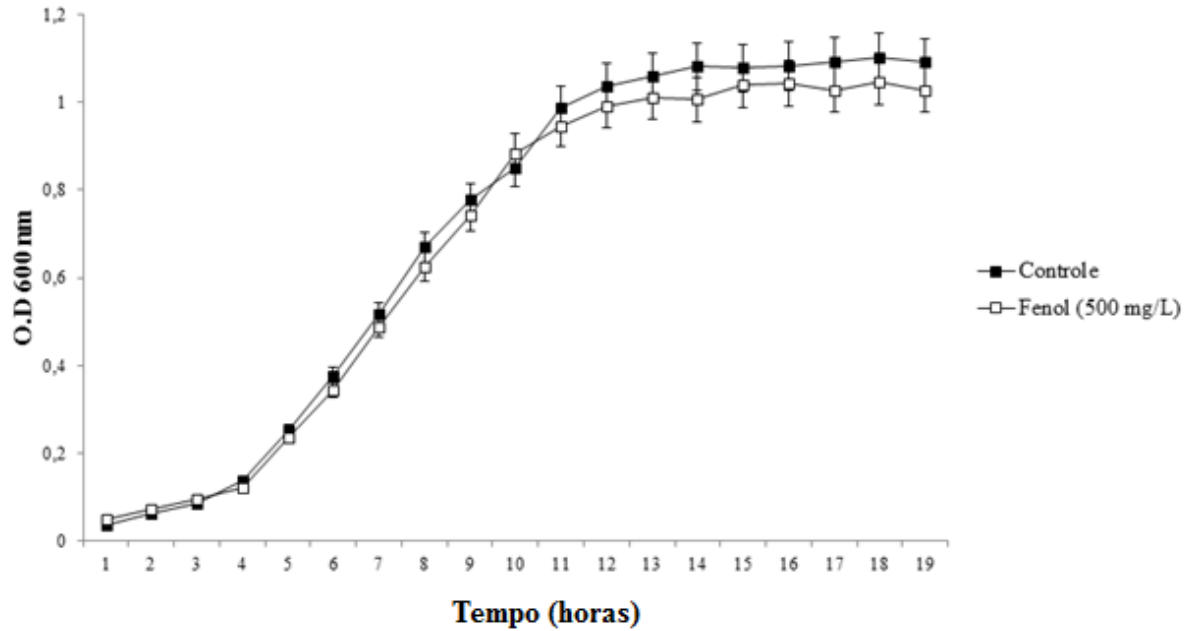
### 5.2.1 Curva de crescimento de *Burkholderia* sp. SMF 07 em meio TY suplementado com fenol.

Nos experimentos realizados com o objetivo de se obter a curva de crescimento de *Burkholderia* sp. SMF 07 em meio TY suplementado com 500 mg/L de fenol (Figura 6), foi possível verificar, que tanto na curva correspondente ao crescimento sem poluente (grupo controle), como na curva referente a crescimento com poluente (grupo fenol) a fase *log* ficou caracterizada pelos valores de  $O.D_{600\text{ nm}}$  em torno de 0,1 a 1,0. A análise dos dados mostra que não houve diferença estatisticamente significativa entre as curvas de crescimento dos grupos controle e fenol na concentração testada. Estes resultados demonstram que o fenol em concentrações inferiores ou igual a 500 mg/L não são tóxicos para *Burkholderia* sp. SMF 07.

Já nos experimentos realizados com o objetivo de se obter a curva de crescimento de *Brurkholderia* sp. SMF 07 em meio TY suplementado com 1000 mg/L de fenol (Figura 7) foi possível verificar, que na curva correspondente ao crescimento sem poluente (grupo controle) a fase *log* ficou caracterizada pelos valores de  $O.D_{600\text{ nm}}$  em torno de 0,1 a 1,0. Já na curva referente ao crescimento com poluente (grupo fenol) a fase *log* ficou caracterizada pelos valores de  $O.D_{600\text{ nm}}$  em torno de 0,2 a 0,8. O grupo controle apresentou início e término da fase *log* anteriores ao grupo com fenol, essa diferença se dá devido ao período de adaptação da bactéria ao poluente presente no meio, corroborando 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. Houve diferença estatisticamente significativa entre as curvas de crescimento dos grupos controle e fenol. Essa

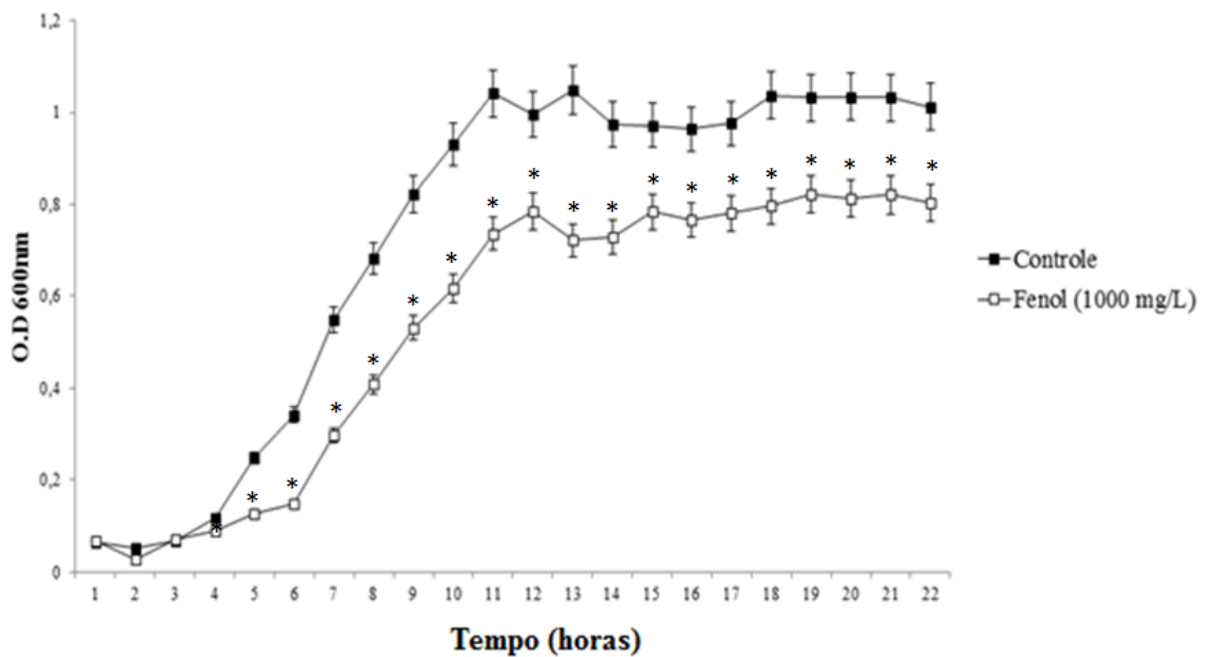
diferença é observada a partir do tempo de crescimento de quatro horas e se estendendo ao longo de todo crescimento.

Figura 6 - Curva de crescimento de *Burkholderia* sp. SMF 07 em meio TY suplementado com 500 mg/L de fenol, durante 19 horas de monitoramento em espectrofotômetro (600 nm).



Fonte: SOARES, (2013). A curva com quadrado preenchido em preto (■) corresponde ao controle e em branco (□) ao tratamento com fenol. As barras verticais indicam o desvio padrão entre as triplicatas de cada ponto de medição. Análise estatística feita no *Statística 6 Workbook* usando o teste *Mann-Whitney* e  $*p < 0,05$ .

Figura 7 – Curva de crescimento de *Burkholderia* sp. SMF 07 em meio TY suplementado com 1000 mg/L de fenol, durante 22 horas de monitoramento em espectrofotômetro (600nm).



Fonte: SOARES, (2013). A curva com quadrado preenchido em preto (■) corresponde ao controle e em branco (□) ao tratamento com fenol. As barras verticais indicam o desvio padrão entre as triplicatas de cada ponto de medição. Análise estatística feita no *Statística 6 Workbook* usando o teste *Mann-Whitney* e  $*p < 0,05$ .

Estes dados demonstram que *Burkholderia* sp. SMF 07 é tolerante ao fenol quando cultivada em meio nutritivo e que o fenol em concentrações superiores ou igual a 1000 mg/L podem ser tóxicos para *Burkholderia* sp. SMF 07, alterando o metabolismo da célula bacteriana, levando ao aumento, diminuição ou inibição de síntese de proteínas envolvidas em uma diversidade de funções biológicas importantes para a manutenção da estrutura bacteriana. Santos; Benndorf e Sá-Correia (2004), observaram mudanças na expressão de proteínas por *Pseudomonas putida* KT2440, quando esta foi cultivada em meio mineral basal suplementado com 600 e 800 mg/L de fenol. Entre as proteínas que apresentaram expressão aumentada em resposta ao fenol se destacam aquelas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo, choque-térmico, chaperonas, proteínas envolvidas na divisão celular, na biossíntese do envelope celular, no metabolismo energético e no metabolismo dos aminoácidos.

### **5.2.2 Curva de crescimento de *Burkholderia* sp. SMF 07 em meio BH suplementado com fenol.**

O cultivo de *Burkholderia* sp. SMF 07 em meio mineral Bushnell Hass – BH, contendo como única fonte de carbono o fenol nas concentrações de 400 ou 600 mg/L, foi realizado com o objetivo de verificar se esta cepa bacteriana seria capaz de utilizar o fenol como única fonte de carbono e energia. Nas figuras 8 e 9 são mostradas as curvas de crescimento de *Burkholderia* sp. SMF 07 em meio mineral Bushnell Hass – BH, contendo como única fonte de carbono o fenol nas concentrações de 400 e 600 mg/L, respectivamente.

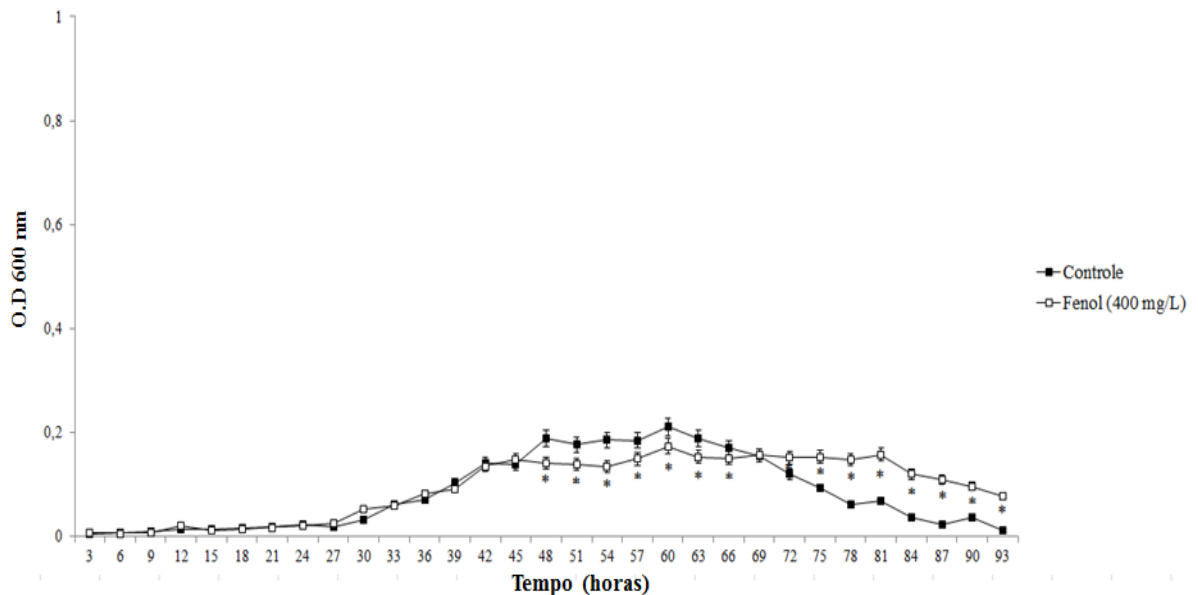
As curvas de crescimento de *Burkholderia* sp. SMF 07 na condição controle para ambos os tratamentos (400 e 600 mg/L de fenol) alcançaram a fase de platô com a densidade óptica (O.D) de aproximadamente 0,2, fato também verificado por Brito (2012), quando cultivou *Burkholderia* sp. SMF 90 em meio mineral Bushnell Hass – BH contendo gasolina como única fonte de carbono. Brito (2012) afirma que este fato deve-se provavelmente ao acúmulo de substâncias de reservas, tal como o polihidroxibutirato (PHB) no citoplasma da célula. O polihidroxibutirato (PHB) é definido como um composto de uma classe dos polímeros termoplásticos chamados “polihidroxicanoatos” que servem a muitas bactérias como uma maneira de armazenar dentro da célula, materiais que podem servir de reserva para obtenção de carbono e como fonte de energia para o caso de ausência de um dos dois (COUTINHO *et al.*, 2004).

Na figura 8 é mostrada a curva de crescimento de *Burkholderia* sp. SMF 07 em meio mineral Bushnell Hass – BH, contendo como única fonte de carbono 400 mg/L de fenol.



Os dados demonstram que a cultura iniciou a fase *log* de crescimento microbiano após 27 horas do início do crescimento, tanto na condição controle como na condição tratado (400 mg/L de fenol) e atingiu a fase de *platô* com O. D de aproximadamente 0,2 em ambas as condições, porém esta fase foi mais prologanda na condição tratado (400 mg/L de fenol). Houve diferença estatisticamente significativa entre as curvas de crescimentos dos referidos grupos e esta diferença foi observada a partir das 48 horas após o início do crescimento, onde se observou que o crescimento de *Burkholderia* sp. SMF 07 na presença de 400 mg/L de fenol foi reduzida em relação à condição controle. A análise desses dados sugere que a cepa bacteriana *Burkholderia* sp. SMF 07, provavelmente não está utilizando o fenol como fonte de carbono, e que o crescimento observado na condição tratado (400 mg/L) deve-se à presença das substâncias de reserva acumuladas no citoplasma da célula, por exemplo, polihidroxibutirato (PHB) como observado na condição controle (dados discutidos anteriormente) . Além disso, o fenol pode ainda está afetando até a produção dessas substâncias de reserva, uma vez que foi observado diferença significativa entre a curva de crescimento de *Burkholderia* sp. SMF 07 na condição tratado quando comparado com a condição controle.

Figura 8 – Curva de crescimento de *Burkholderia* sp. SMF 07 em meio mineral Bushnell Hass (BH) suplementado com 400 mg/L de fenol, durante 93 horas de monitoramento em espectrofotômetro (600 nm).

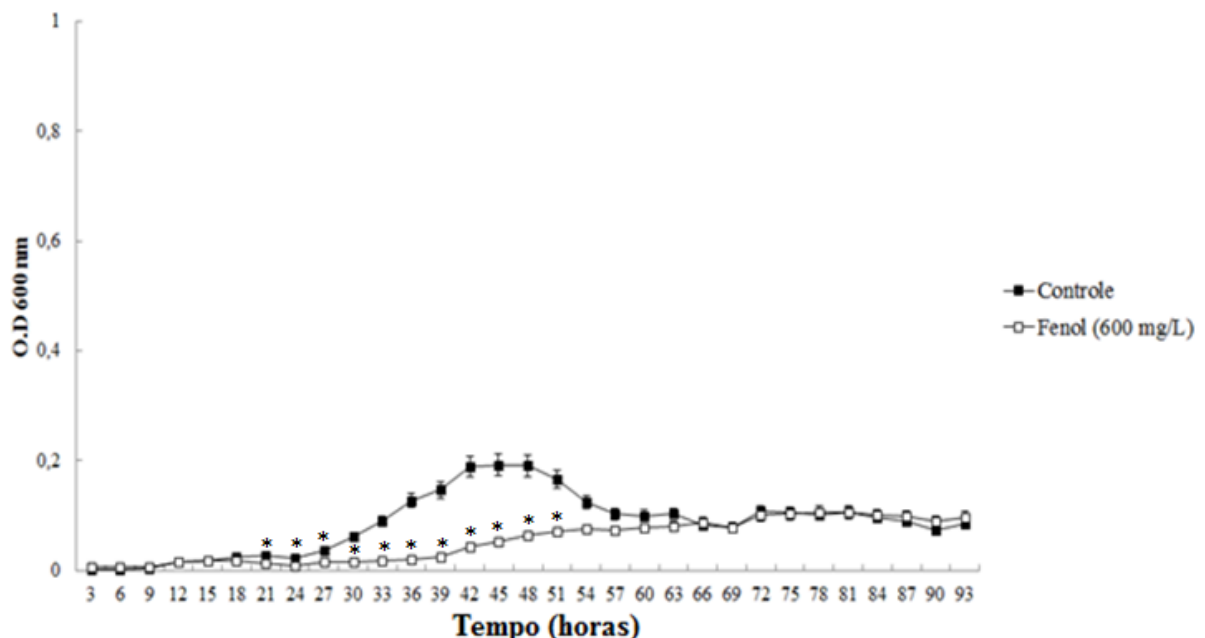


Fonte: SOARES, (2013). A curva com quadrado preenchido em preto (■) corresponde ao controle e em branco (□) ao tratamento com fenol. As barras verticais indicam o desvio padrão entre as triplicatas de cada ponto de medição. Análise estatística feita no *Statistica 6 Workbook* usando o teste *Mann-Whitney* e  $*p < 0,05$ .

Na figura 9 é mostrada a curva de crescimento de *Burkholderia* sp. SMF 07 em meio mineral Bushnell Hass – BH, contendo como única fonte de carbono 600 mg/L de fenol.

Os resultados demonstram que os grupos controle e tratado (600 mg/L de fenol) apresentaram início da fase *log*, 27 e 39 horas após o início do crescimento, respectivamente. Esse dado demonstra que ocorreu um atraso no início da fase *log* do grupo tratado em relação ao grupo controle. Como discutido anteriormente essa diferença se dá devido ao período de adaptação da bactéria ao poluente presente no meio, corroborando Roma-Rodrigues e colaboradores (2010). Observou-se ainda que, a cultura na condição tratado (600 mg/L de fenol) atingiu a fase de platô na densidade óptica (O.D) inferior a da condição controle. Houve diferença estatisticamente significativa entre as curvas de crescimentos dos referidos grupos e esta diferença foi observada a partir das 21 horas após o início do crescimento e se estendeu até às 51 horas de crescimento. Nesse período observou-se que o crescimento de *Burkholderia* sp. SMF 07 na presença de 600 mg/L de fenol foi reduzida em relação à condição controle e essa redução foi mais intensa do que aquela observada quando a cepa estudada foi cultivada na presença de 400 mg/L (Figura 8). Portanto estes dados sugerem que a cepa bacteriana *Burkholderia* sp. SMF 07 provavelmente não está utilizando o fenol como fonte de carbono e que doses iguais ou superiores a 600 mg/L de fenol podem ser letais para as células inibindo até a produção de substâncias de reserva acumuladas no citoplasma da célula.

Figura 9 – Curva de crescimento de *Burkholderia* sp. SMF 07 em meio mineral Bushnell Hass (BH) suplementado com 600 mg/L de fenol, durante 93 horas de monitoramento em espectrofotômetro (600 nm).



Fonte: SOARES, (2013). A curva com quadrado preenchido em preto (■) corresponde ao controle e em branco (□) ao tratamento com fenol. As barras verticais indicam o desvio padrão entre as triplicatas de cada ponto de medição. Análise estatística feita no *Statística 6 Workbook* usando o teste *Mann-Whitney* e  $*p < 0,05$ .

### 5.3 Extração e quantificação das proteínas intracelulares

A extração de proteínas intracelulares foi realizada a partir do sedimento da cultura de *Burkholderia* SMF 07 de acordo com Riedel e colaboradores (2006), quando essa bactéria encontrava-se na fase *log*. Após o processo de extração, a quantidade total de proteínas foi mensurada através do método de Bradford (1976). Na Tabela 4 é mostrado o valor médio da concentração de proteínas intracelulares totais obtidas do isolado de *Burkholderia* sp. SMF 07 dos grupos controle e fenol.

Tabela 4 - Perfil quantitativo das proteínas intracelulares extraídas de *Burkholderia* sp. SMF 07 crescida em meio TY na ausência e presença de fenol.

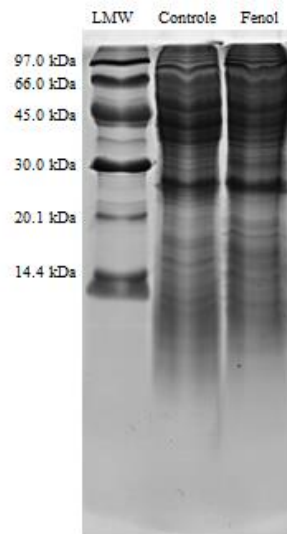
Grupo	Concentração ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
Controle	8,2
Fenol	7,5

Fonte: SOARES (2013).

Na Figura 10, pode-se observar o resultado da separação das proteínas intracelulares extraídas de *Burkholderia* sp. SMF 07, após corrida eletroforética em gel de SDS-PAGE. A primeira raia corresponde ao marcador de peso molecular, as raias 2 e 3, correspondem às proteínas do grupo controle e fenol, respectivamente, ambas na concentração de 25 $\mu\text{g}$ . De acordo com Weber e Osborn (1969) e Laemmli (1970) a pureza das proteínas após a extração podem ser verificadas pelo padrão de bandas em SDS-PAGE. Dessa forma, podemos observar que as proteínas intracelulares extraídas apresentam boa qualidade com bandas bem definidas e livres de possíveis contaminantes.

De acordo com a análise do perfil quantitativo e qualitativo das proteínas intracelulares totais extraídas o método de extração de proteínas utilizado foi eficiente para obter proteínas em quantidade e qualidade ideal para análise em géis bidimensionais.

Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de proteínas intracelulares obtidas de *Burkholderia* sp. SMF 07 corado com *Coomassie blue* G-250.



Fonte: SOARES (2013). A raia 1 corresponde ao marcador de baixo peso molecular – LMW, em quilodalton (kDa); Raia 2 e 3 corresponde a proteína intracelular total extraída de *Burkholderia* sp. SMF 07 na presença e ausência de fenol, respectivamente, ambas na concentração de 25 $\mu$ g.

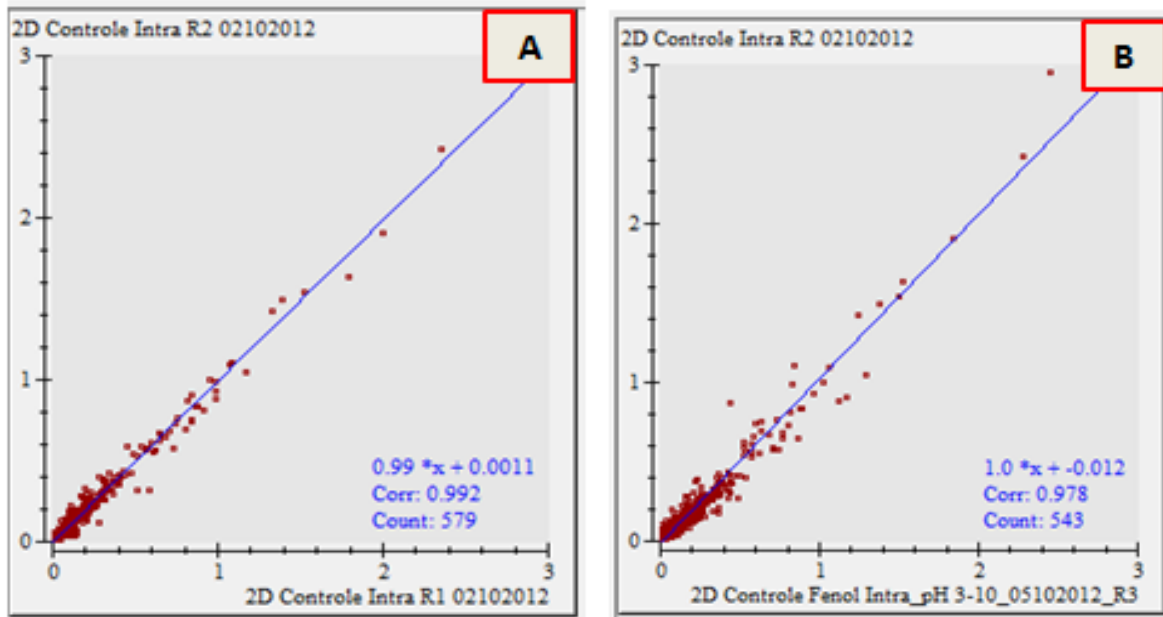
#### 5.4 Reprodutibilidade dos géis bidimensionais

Para avaliar a reprodutibilidade dos géis bidimensionais, foi realizado o alinhamento entre as repetições de cada grupo testado. Os *spots* correspondentes (*matches*) entre as repetições de cada grupo foram utilizados para criar um gráfico de dispersão mostrando a correlação linear e o número de *spots* correspondentes (*matches*) entre as replicatas de cada grupo.

Na figura 11 são mostrados os gráficos de dispersão das replicas dos géis de *Burkholderia* sp. SMF 07 referentes ao grupo controle. O coeficiente de correlação linear e o número de *spots* correspondentes entre a replicata 1 (R1) e o gel de referência (R2) do grupo controle foi de 0,992 e 579, respectivamente (Figura 11A), enquanto que, entre a replicata 3 (R3) e o gel de referência (R2) foi de 0,978 e 543, respectivamente (Figura 11B).

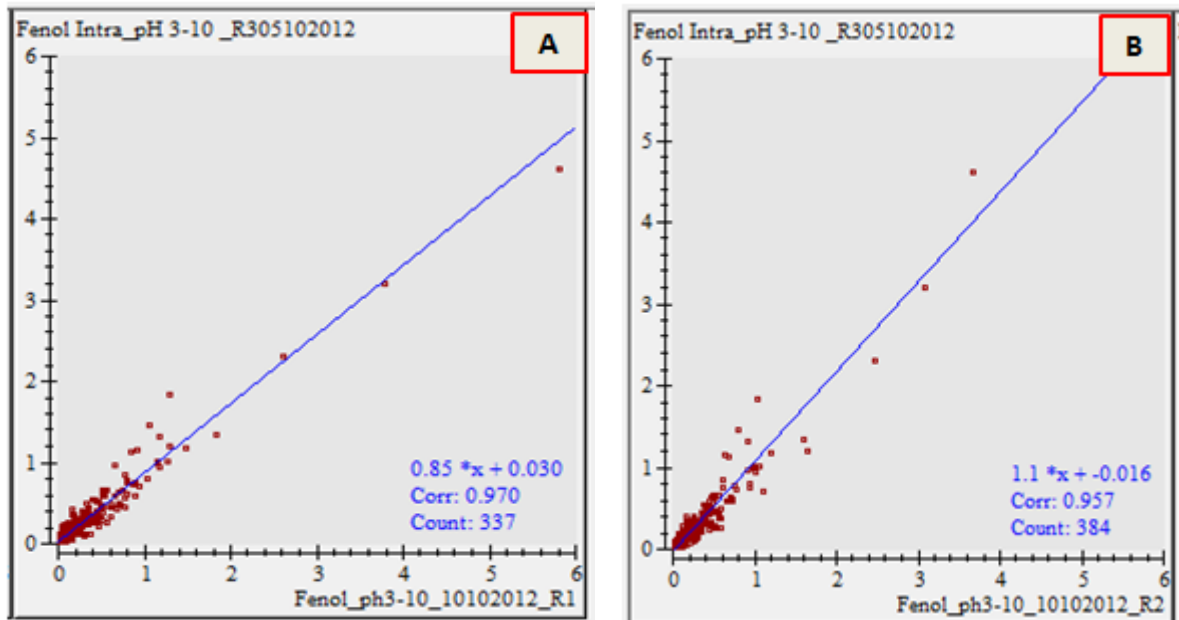
Os gráficos de dispersão das replicas dos géis de *Burkholderia* sp. SMF 07 referentes ao grupo fenol são mostrados na figura 12. O coeficiente de correlação linear e o número de *spots* correspondentes entre a replicata 1 (R1) e o gel de referência (R3) do grupo fenol foi de 0,970 e 337, respectivamente (Figura 12A), enquanto que, entre a replicata 2 (R2) e o gel de referência (R3) foi de 0,957 e 384, respectivamente (Figura 12B).

Figura 11 - Gráfico de dispersão das replicatas dos géis de *Burkholderia* sp. SMF 07 grupo controle.



Fonte: SOARES (2013). (A) Replicata 1 (R1) comparada com o gel de referência - replicata 2 (R2); (B) Replicata 3 (R3) comparada com o gel de referência - replicata 2 (R2). Corr.: correlação e Count.: *spots* coincidentes.

Figura 12 - Gráfico de dispersão das replicatas dos géis de *Burkholderia* sp. SMF 07 grupo fenol.



Fonte: SOARES, 2013. (A) Replicata 1 (R1) comparada com o gel de referência - replicata 3 (R3); (B) Replicata 2 (R2) comparada com o gel de referência - replicata 3 (R3). Corr.: correlação e Count.: *spots* coincidentes.

O Coeficiente de Correlação Linear de Pearson é um método usualmente conhecido para medir a correlação entre duas variáveis (SCHULTZ; SCHULTZ, 1992). O coeficiente é interpretado como um indicador que descreve a interdependência entre variáveis

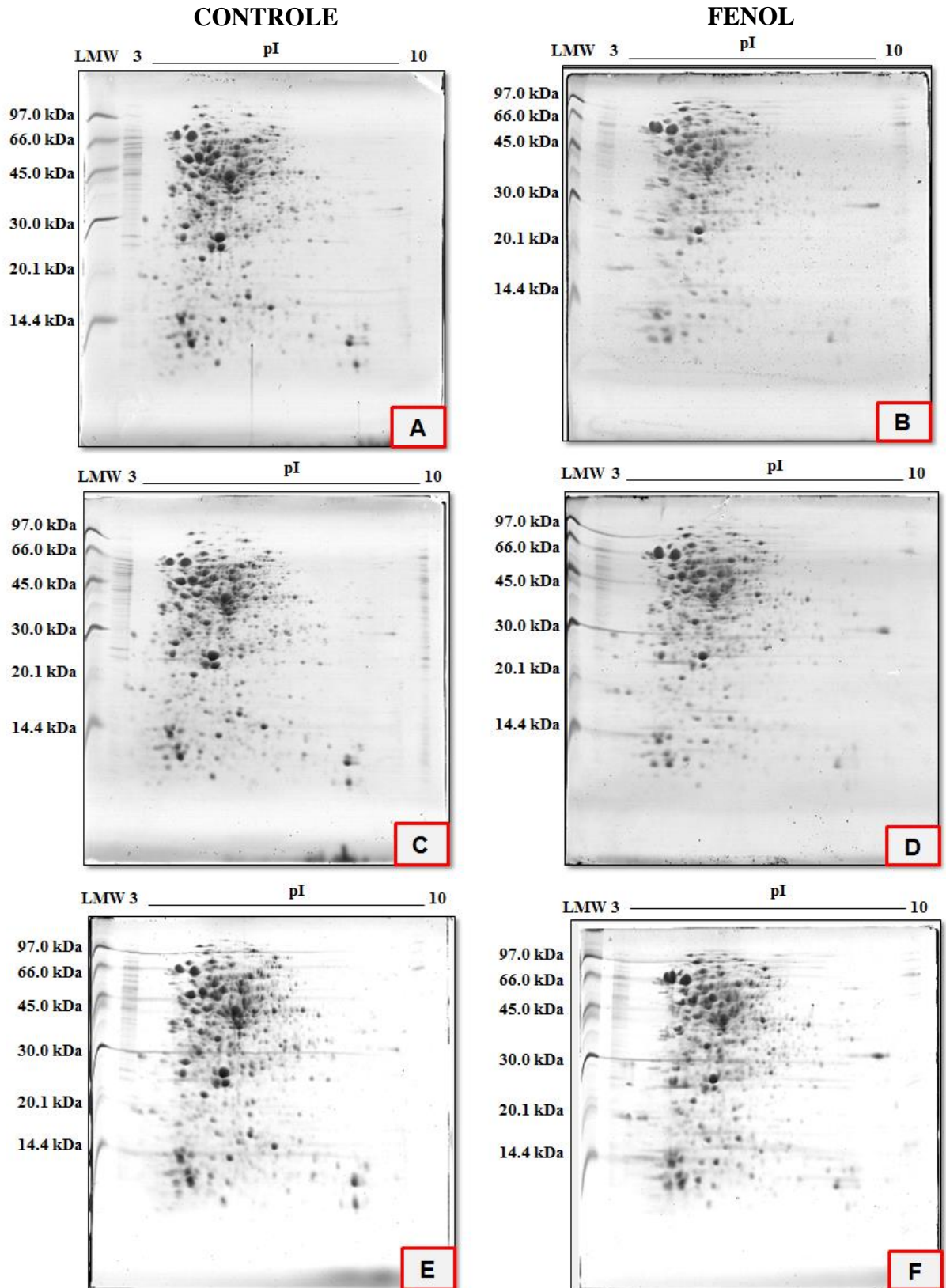
e este pode ser avaliado qualitativamente. Quanto mais próximo de 1 for o valor da correlação linear entre duas variáveis mais forte é a correlação entre estas variáveis (LIRA, 2004). Desta forma, analisando os dados sobre a correlação linear entre os géis do grupo controle e os do grupo fenol, mostrados anteriormente, podemos afirmar que as correlações lineares obtidos nesse trabalho são validas e que as técnicas utilizadas não impactaram negativamente nos resultados obtidos.

### **5.5 Análise do perfil proteico de *Burkholderia* sp. SMF 07 por eletroforese bidimensional**

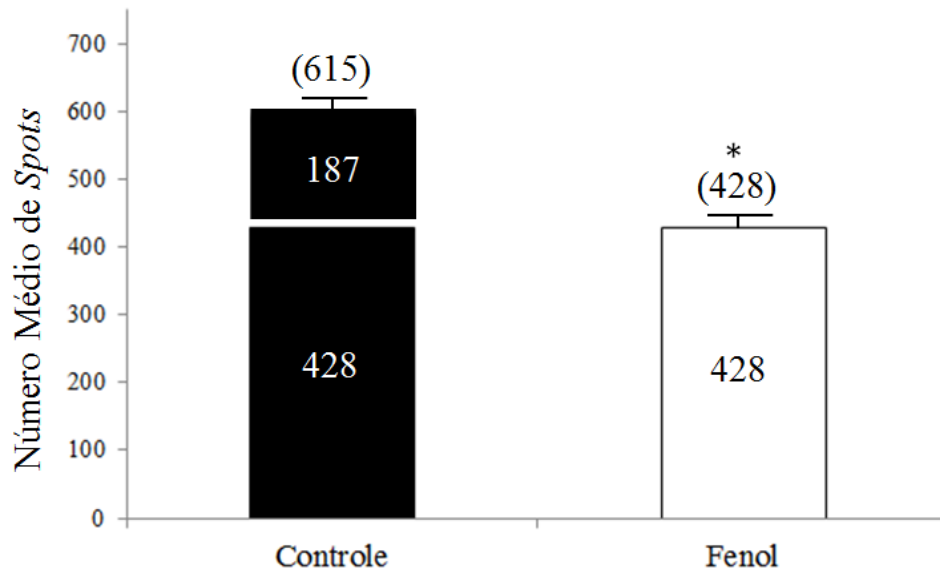
Na figura 13 podem ser observadas as imagens dos géis bidimensionais das proteínas intracelulares obtidas de *Burkholderia* sp. SMF 07 cultivadas em meio TY para o grupo controle (sem poluente) e fenol (com 1000 mg/L de fenol). As figuras 13: A, C e E correspondem as replicatas 1, 2 e 3, respectivamente do grupo controle e as figuras 13: B, D e F as replicatas 1, 2 e 3, respectivamente do grupo fenol. As análises dos géis do grupo controle possibilitaram a identificação de 624, 570 e 652 *spots* para as replicatas 1, 2 e 3 respectivamente. Em relação ao grupo fenol foi evidenciada nas replicatas 1, 2 e 3 uma quantidade de 377, 446 e 463 *spots*, respectivamente. A replicata 2 (Figura 13C) do grupo controle e a replicata 3 (Figura 13F) do grupo fenol foram escolhidas como géis de referência para os respectivos grupos por serem os géis com maior número de *spots* e por apresentarem melhor focalização.

Os grupos controle e fenol apresentaram um número médio de 615 e 428 *spots*, respectivamente (Gráfico 1). Os dados mostram que ocorreu uma redução significativa no número médio de *spots* no grupo fenol em relação ao grupo controle. Esta redução foi de 187 *spots* o que equivale a 30% de redução no número médio de *spots* no grupo fenol em relação ao grupo controle.

Figura 13 - Géis de eletroforese bidimensional de proteínas obtidas de *Burkholderia* sp. SMF 07 cultivadas em meio TY, sem poluente (grupo controle) e na presença de 1000 mg/L de fenol (grupo fenol).



Fonte: SOARES (2013). Os géis A, C e E (coluna à esquerda) correspondem as replicatas 1,2 3 do grupo controle. Os géis B,D e F (coluna à direita) correspondem as replicatas 1,2 e 3 do grupo fenol. LMW: marcador de baixo peso molecular; kDa: Quilodaltos; pI: ponto isoeétrico.

Gráfico 1- Número médio de *spots* das réplicas de géis bidimensionais de *Burkholderia* sp.SMF 07.

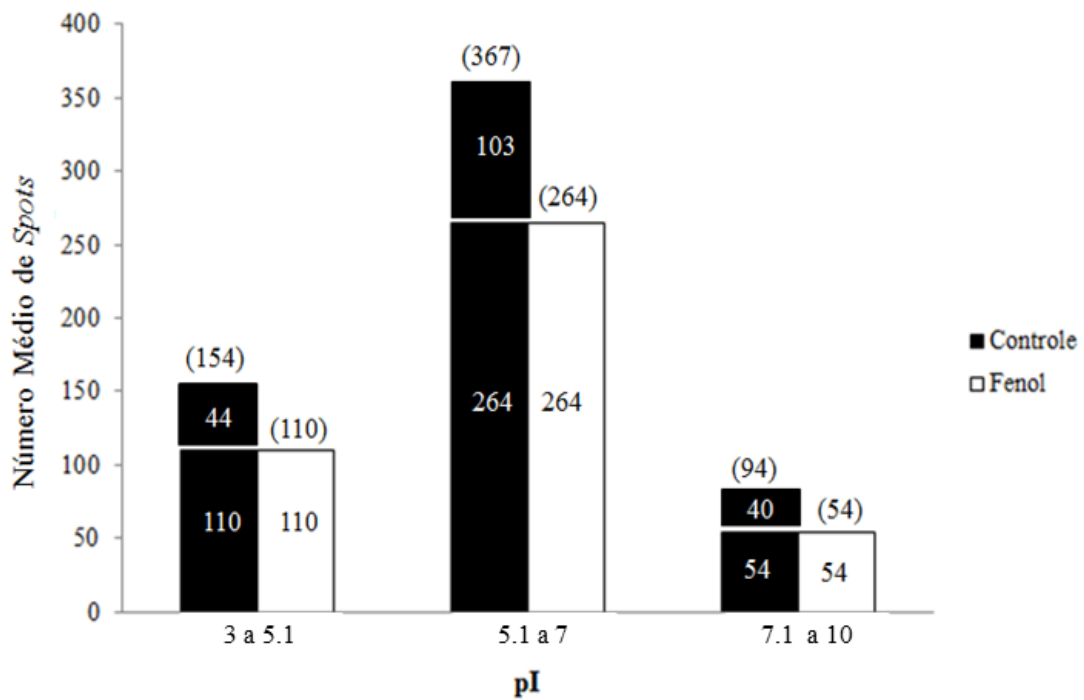
Fonte: SOARES (2013). O número total de *spots* está mostrado entre parêntese o qual constitui a soma do número de proteínas compartilhadas entre os grupos controle e fenol (base) com o número de proteínas exclusivas (topo). \* diferença estatística entre o grupo fenol e o grupo controle com  $p < 0,05$ .

### 5.5.1 Distribuição dos *spots* por ponto isoelétrico e massa molecular

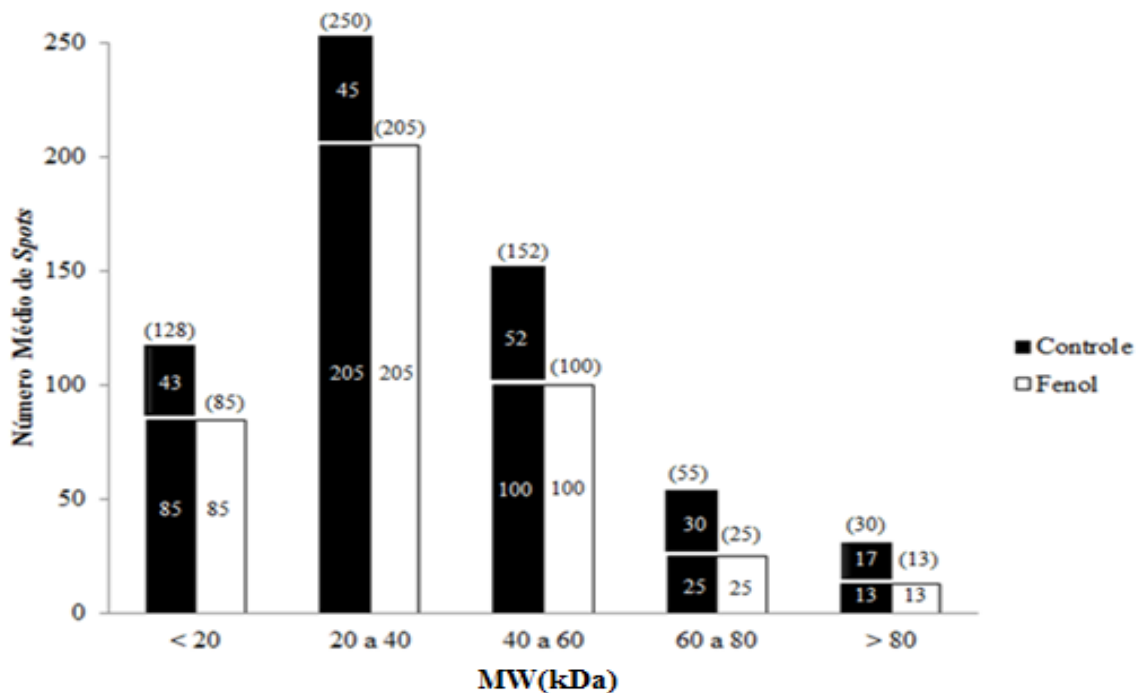
Para construção dos gráficos de distribuição dos *spots* por faixa de ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MW), os géis dos grupos controle e fenol foram alinhados com o objetivo de encontrar proteínas que estivessem na mesma posição no gel (*match*). Através desse método foi possível verificar que os grupos compartilham 428 *spots* (*matches*). Esse resultado (*match report*) foi comparado com a tabela que contém os valores de pI e massa molecular dos géis de referência (*spot report*). A partir desta comparação foi possível construir os gráficos que mostram a distribuição dos *spots* por faixa de ponto isoelétrico (pI) (Gráfico 2) e massa molecular (MW) (Gráfico 3).

Com base na análise dos gráficos referentes à distribuição dos *spots* por ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MW), foi possível constatar que o número de *spots* do grupo fenol reduziu em todos os intervalos de pI e massa molecular (MW) em relação ao grupo controle. Em relação ao ponto isoelétrico (Gráfico 2), foi observado um maior número de *spots* no intervalo de pI entre 5,1 a 7, tanto no grupo controle (367 *spots*) como no fenol (264 *spots*). Já em relação à massa molecular (Gráfico 3), o maior número de *spots* foi encontrado na faixa entre 20-40 kDa tanto no grupo fenol (205 *spots*) quanto no grupo controle (250 *spots*).



Gráfico 2 – Distribuição dos *spots* por faixa de ponto isoelétrico (pI).

Fonte: SOARES (2013). O grupo controle está representado por colunas pretas e o grupo teste por colunas brancas. O número total de *spots* está mostrado entre parêntese o qual constitui a soma do número de *spots* compartilhados entre os grupos controle e fenol (base) com o número de proteínas exclusivas (topo).

Gráfico 3 – Distribuição dos *spots* por faixa de massa molecular (MW).

Fonte: SOARES (2013). O grupo controle está representado por colunas pretas e o grupo teste por colunas brancas. O número total de *spots* está mostrado entre parêntese o qual constitui a soma do número de *spots* compartilhados entre os grupos controle e fenol (base) com o número de proteínas exclusivas (topo).

## 5.6 Proteínas Diferencialmente Expressas

A fim de verificar diferenças na expressão quantitativa das proteínas nos géis 2DE resultantes do grupo controle e fenol, os géis inter classe, foram alinhados através do *Software Image Master* com o objetivo de encontrar proteínas que estivessem na mesma posição no gel (*match*). Após esse alinhamento foi gerado um histograma referente a cada *spot* correspondente entre as classes de géis do grupo controle e fenol, Além disso, foi feita a análise estatística a partir da porcentagem de volume de cada *spot* correspondente considerando  $p < 0,05$ . A partir desses dados foi possível verificar quais *spots* tiveram expressão quantitativa aumentada no grupo fenol em relação ao grupo controle, ou no grupo controle em relação ao grupo fenol; ou que tiveram expressão exclusiva no grupo controle.

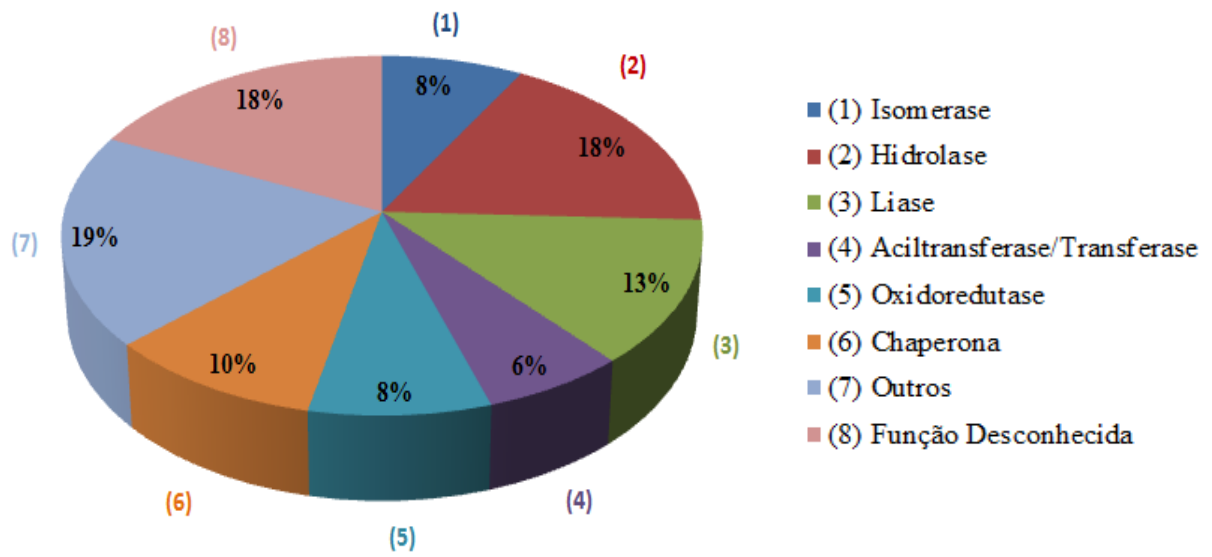
### 5.6.1 Análise das proteínas que apresentaram expressão quantitativa aumentada na presença do fenol

Na figura 14 são mostradas as regiões dos géis de referência para o grupo controle (C) e tratado (fenol) (T) correspondente a cada *spot* que teve sua expressão quantitativa aumentada na presença de fenol comparado com o controle. Um histograma localizado no lado inferior direito da região de cada *spot* analisado mostra a diferença quantitativa no volume dos referidos *spots* no grupo fenol quando comparado com o grupo controle.

Foi possível identificar trinta e um *spots* com expressão quantitativa aumentada no grupo fenol em relação ao grupo controle. Desses, vinte e cinco *spots* foram identificados no banco de dados *UniProt/ Swiss-Prot* disponível no servidor *ExPASy*, utilizando os valores de ponto de isoelétrico (pI) e massa molecular (MW). Na Tabela 5 são mostradas as possíveis proteínas para cada *spot* que teve sua expressão quantitativa aumentada no grupo fenol em relação ao grupo controle, além das suas possíveis funções e processos biológicos as quais essas proteínas podem estar envolvidas.

Através das informações obtidas no banco de dados *UniProt/ Swiss-Prot* as proteínas identificadas foram classificadas de acordo com a função biológica dentro das seguintes categorias: (1) isomerase; (2) hidrolase; (3) liase; (4) aciltransferase/ transferase; (5) oxidoreductase; (6) chaperona; (7) outros; (8) função desconhecida (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Classificação funcional das proteínas que tiveram expressão quantitativa aumentada no grupo fenol em comparação ao grupo controle e foram identificadas através do banco de dados *UniProt/Swiss-Prot*.



Fonte: SOARES (2013).

Figura 14 - Regiões dos géis de referência para o grupo controle (C) e tratado (fenol) (T) correspondente a cada *spot* que teve sua expressão quantitativa aumentada na presença do fenol comparado com o controle. Continua.

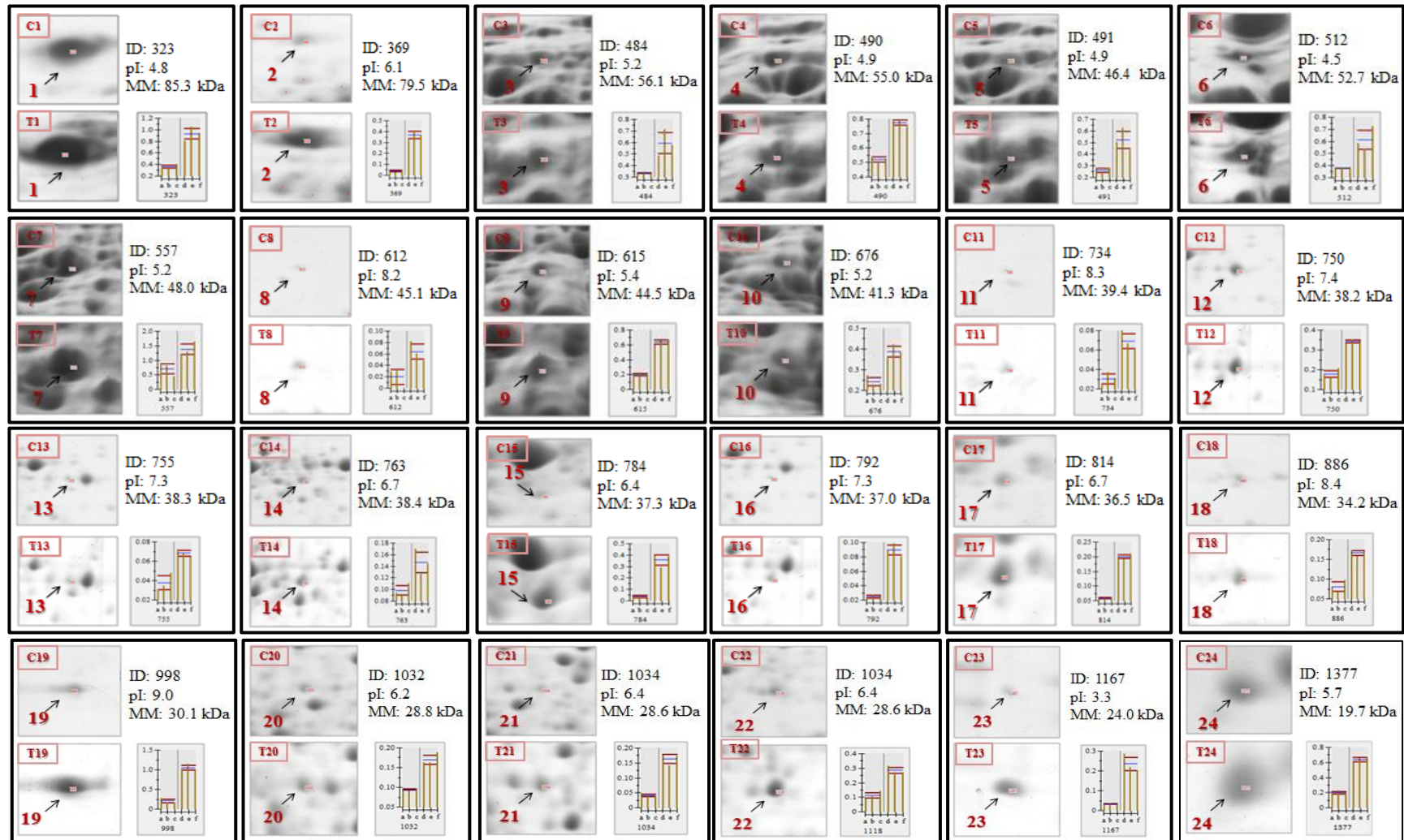
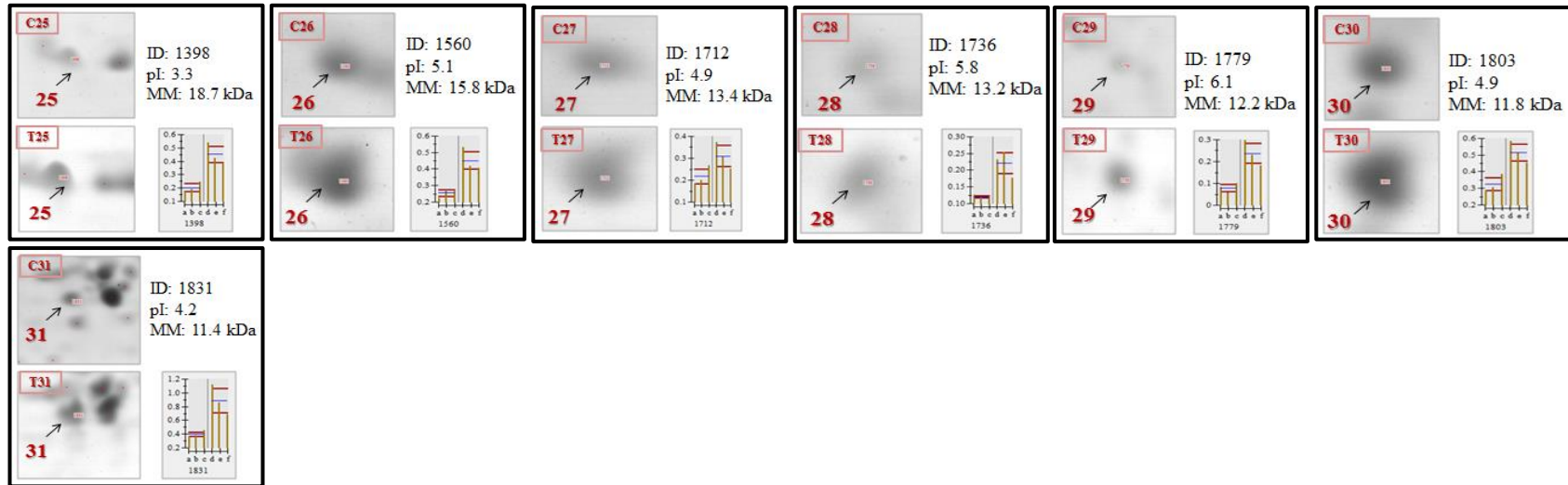


Figura 14 - Regiões dos géis de referência para o grupo controle (C) e tratado (fenol) (T) correspondente a cada *spot* que teve sua expressão quantitativa aumentada na presença do fenol comparado com o controle. Conclusão.



Fonte: SOARES (2013). C1 a C31: região do gel de referência do grupo controle; T1 A T31: região do gel de referência do grupo fenol (tratado); Setas e números: mostram os *spots* que apresentaram alterações quantitativas nos níveis de expressão; ID: identificação do *spot*; pI: ponto isoeletrico; MM: massa molecular; Letras a, b e c na base do histograma: correspondem às replicas 1, 2 e 3 do grupo controle; Letras d, e e f na base do histograma: correspondem às replicas 1, 2 e 3 do grupo fenol (tratado).

Tabela 5 - Identificação das possíveis proteínas intracelulares de *Burkholderia* sp. SMF 07 com alteração quantitativa aumentada na presença do fenol (grupo fenol) comparado com o grupo controle identificadas com base no banco de dados *UniProt/Swiss-Prot*. Continua.

Nº do spot	ID	pI (E)	MM (E)	Proteína	Função Biológica	Processo Biológico	Número de Acesso
1	323	485.857	71763.0	NI			
2	369	611.940	79517.0	Metionina RNAt ligase.	Aminoacil RNAt sintetase; Ligase	Biossíntese de Proteínas	SYM_BURMS (A1V5W0)
3	484	522.015	56146.0	Chaperonina 3 (60 kDa). Chaperonina (60 kDa).	Chaperona Chaperona	<i>Desconhecido</i> <i>Desconhecido</i>	CH603_BURCH (A0KCS0) CH60_BURMS (A1V1Z9)
4	490	493.284	55092.0	NI			
5	491	498.765	46459.0	Enolase.	Liase	Glicólise	ENO_BURMS (A1V5K2)
6	512	453.358	52786.0	NI			
7	557	524.627	48068.0	GTPase MnmE modificadora do RNAt	Hidrolase	Processamento do RNAt	MNME_BURMS (A1V7D3)
8	612	821.642	45192.0	D-aminoácido desidrogenase (Subunidade menor)	Oxidoreductase	<i>Desconhecido</i>	DADA_BURXL (Q13VE3)
9	615	542.910	44535.0	L-ramnonato desidratase. Fator de Elongação Tu.	Liase Fator de Elongação	<i>Desconhecido</i> Biossíntese de proteína	RHMD_BURA4(B1YMY4) EFTU_BURXL (Q13TF5)
10	676	523.507	41355.0	Succinil-CoA ligase (subunidade β).	Ligase	Ciclo do ácido tricarboxílico	SUCC_BURMS (A1V6W8)
11	734	834.702	39413.0	Glutamato metilesterase (Proteína reguladora de resposta à quimiotaxia)	Hidrolase	Quimiotaxia	CHEB1_BURTA (Q2STS8)
				Ferroquelatase.	Liase	Biossíntese do Heme	HEMH_BURTA (Q2SYZ9)
12	750	744.776	38253.0	NI			
13	755	731.343	38352.0	Proteína UgpC de ligação ao ATP importadora de sn-glicerol-3-fosfato.	Hidrolase	Transporte de Açúcar; Transporte.	UGPC_BURCH (A0K3S5)
14	763	677.985	38452.0	Chaperona DnaJ.	Chaperona	Replicação do DNA; Resposta ao Estresse.	DNAJ_BURCH (A0K4S9)
15	784	645.149	37368.0	UDP-3-O-acilglucosamina N-aciltransferase. Chaperona Lipase.	Aciltransferase; Transferase Chaperona	Biossíntese de Lipídeos Degradação de Lipídeos	LPXD_BURCJ (B4ECM1) LIFO_BURGL (Q05490)
				1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase.	Hidrolase	<i>Desconhecido</i>	1A1D_BURTA (Q2T6A1)
				4-hidroxi-2-oxovalerato aldolase.	Liase	Catabolismo <u>dos hidrocarbonetos aromáticos</u>	HOA_BURP6 (A3NML2)

Tabela 5 - Identificação das possíveis proteínas intracelulares de *Burkholderia* sp. SMF 07 com alteração quantitativa aumentada na presença do fenol (grupo fenol) comparado com o grupo controle identificadas com base no banco de dados *UniProt/Swiss-Prot*. Continuação.

Nº do spot	ID	pI (E)	MM (E)	Proteína	Função Biológica	Processo Biológico	Número de Acesso
16	792	733.582	37030.0	Succinilglutamato desuccinilase. Proteína Cys A de ligação ao ATP transportadora de sulfato/tiosulfato.	Hidrolase Hidrolase	Metabolismo da Arginina Transporte de Sulfato; Transporte.	ASTE_BURTA (Q2SXN7) SA_BURPS (Q63TY1)
17	814	676.119	36504.0	Metionil-RNAt formiltransferase. Glicerol-3-fosfato desidrogenase [NAD(P) +]. RNA Ribossomal metiltransferase H (subunidade menor) Proteína SsuB 1 ligante de ATP importadora de sulfonatos alifáticos	Metiltransferase; Transferase Oxidoredutase Metiltransferase; Transferase Hidrolase	Biossíntese de proteínas Biossíntese de lipídeos Processamento do RNAr Transporte	FMT_BURPP (B2T1K6) GPDA_BURTA (Q2T1H1) RSMH_BURCH (A0K478) SSUB1_BURCH (A0K739)
18	886	844.776	34252.0	RNA dimetilaliltransferase.	<i>Desconhecida</i>	Processamento do RNAt	MIAA_BURTA (Q2SYY3)
19	998	905.597	30117.0	Diidroorotato deidrogenase (quinona). Leucil/fenilalanil-tRNA-transferase.	Oxidoredutase Aciltransferase; Transferase Hidrolase	Biossíntese da Pirimidina <i>Desconhecido</i> <i>Desconhecido</i>	PYRD_BURCA (Q1BWM4) LFTR_BURP8 (B2JKL7) RPPH_BURCJ (B4E5W7)
20	1032	626.866	28803.0	RNA pirofosfohidrolase. UDP-N-acetilglucosamina O-aciltransferase Diidrodipicolinato redutase.	Aciltransferase; Transferase Oxidoredutase	Biossíntese de Lipídeos Biossíntese de aminoácidos	LPXA_BURMS (A1V556) DAPB_BURP0 (A3NZN9)
21	1034	641.418	28647.0	Fosfoglicerato mutase. Fosfoglicerato mutase. UDP-N-acetilglucosamina O-aciltransferase	Isomerase Isomerase Aciltransferase; Transferase	Glicólise Glicólise Biossíntese de Lipídeos	GPMA_BURCM (Q0BBK5) GPMA_BURMS (A1UZX9) LPXA_BURVG (A4JF63)
22	1118	658.209	26370.0	3-isopropilmalato desidratase (subunidade menor) Citidilato quinase	Liase Quinase	Biossíntese de aminoácidos <i>Desconhecido</i>	LEUD_BURM1 (A9AMB3) KCY_BURP8 (B2JF05)
23	1167	331.343	24077.0	Fator RimM de maturação do ribossomo <i>NI</i>	Chaperona	Biogênese do Ribossomo	RIMM_BURTA (Q2SY00)

Tabela 5 - Identificação das possíveis proteínas intracelulares de *Burkholderia* sp. SMF 07 com alteração quantitativa aumentada na presença do fenol (grupo fenol) comparado com o grupo controle identificadas com base no banco de dados *UniProt/Swiss-Prot*. Continuação.

Nº do spot	ID	pI (E)	MM (E)	Proteína	Função Biológica	Processo Biológico	Número de Acesso
24	1377	573.134	19759.0	Provável corismato--piruvato liase 1.	Liase	Biossíntese da ubiquinona	UBIC1_BURP1 (Q3JJ81)
				Fosfopanteteína adenililtransferase.	Nucleotidiltransferase ; Transferase	Biossíntese da Coenzima A	COAD_BURPP (B2SXG0)
				Protease ATP-dependente (subunidade HsIV).	Protease	<i>Desconhecido</i>	HSLV_BURS3 (Q39BY1)
				NADH-azoredutase 7 FMN-dependente.	<i>Desconhecida</i>	<i>Desconhecido</i>	AZOR7_BURS3 (Q39M92)
25	1398	330.597	18794.0	<i>NI</i>			
26	1560	514.179	15820.0	ATP sintase (cadeia ε).	<i>Desconhecida</i>	Síntese de ATP; Transporte de Íon.	ATPE_BURMS (A1V8T0)
27	1712	498.134	13481.0	D-tirosil-RNAt (Tyr) deacilase. NADH-quinona oxidoredutase (Subunidade A)	Hidrolase Oxidoredutase	<i>Desconhecido</i> Transporte	DTD_BURA4 (B1YTD6) NUOA_BURP8 (B2JDM8)
28	1736	584.328	13236.0	Proteína Ribossomal 50S L7/L12. Metilglioxal sintase. L-ramnose mutarotase.	Ribonucleoproteína; Proteína Ribossomal Liase Isomerase	Tradução <i>Desconhecido</i> Metabolismo de Carboidratos	RL7_BURCH (A0K3L6) MGSA_BURVG (A4JGH2) RHAM_BURCC (B1KAV4)
				Regulador FlhD Transcricional Flagelar.	Ativador	Biogênese do flagelo bacteriano; Transcrição; Regulador da transcrição	FLHD_BURMS (A1V915)
				Proteína ClpS adaptada a protease ATP-dependente de Clp	<i>Desconhecida</i>	<i>Desconhecido</i>	CLPS_BURP8 (B2JDY3)
29	1779	613.806	12226.0	L-ramnose mutarotase.	Isomerase	Metabolismo dos Carboidratos; Metabolismo do Ramnose	RHAM_BURP8 (B2JLI5)
				Acilfosfatase. Provável pterina-4-α-carbinolamina desidratase.	Hidrolase Liase	<i>Desconhecido</i> <i>Desconhecido</i>	ACYP_BURTA (Q2T321) PHS_BURM1 (A9AJD5)



Tabela 5 - Identificação das possíveis proteínas intracelulares de *Burkholderia* sp. SMF 07 com alteração quantitativa aumentada na presença do fenol (grupo fenol) comparado com o grupo controle identificadas com base no banco de dados *UniProt/Swiss-Prot*. Conclusão.

Nº do spot	ID	pI (E)	MM (E)	Proteína	Função Biológica	Processo Biológico	Número de Acesso
30	1803	490.672	11872.0	Proteína UPF0145 Bcep18194_B0595. Aspartato 1-descarboxilase (cadeia $\alpha$ )	<i>Desconhecida</i> Descarboxilase; Liase	<i>Desconhecido</i> Biossíntese do Patentenato (Vitamina B5)	Y595_BURS3 (Q39A02) PAND_BURCH (A0K9L6)
31	1831	423.134	11445.0	Proteína CyaY. Exodeoxiribonuclease 7 (subunidade menor).	<i>Desconhecida</i> Exonuclease; Nuclease	<i>Desconhecido</i> <i>Desconhecido</i>	CYAY_BURP8 (B2JI26) EX7S_BURVG (A4JLT2)

Fonte: SOARES (2013). ID: número de identificação dos *spots*; pI (E): ponto isoelétrico experimental; MM(E): massa molecular experimental; NI: *Spots* não identificados.

Proteínas envolvidas no metabolismo energético (succinil-CoA ligase- subunidade  $\beta$ ; enolase e fosfoglicerato mutase), *spots* 10, 5 e 20 e/ou 21, respectivamente (Figura 14) tiveram sua expressão aumentada após exposição ao fenol. De acordo com Santos; Teixeira e Sá-Correia (2004), este fato está de acordo, pois a ativação dos mecanismos de adaptação ao estresse causado pela adição do fenol depende da disponibilidade de energia (ATP). O aumento da expressão de proteína envolvidas no metabolismo energético também foi observado, quanto *Pseudomonas putida* KT2440 foi cultivada em meio mineral basal contendo 800 mg/L de fenol (ROMA-RODRIGUES *et al.*, 2010).

A enzima fosfopanteteína adeniltransferase (PPAT), *spot* 24 (Figura 14) está envolvida na biossíntese da Coenzima A (CoA), um cofator que atua transportando grupo acil e ativando grupo carbonil em várias reações bioquímicas, incluindo o ciclo do ácido tricarbóxico e a biossíntese dos ácidos graxos. A CoA é utilizada obrigatoriamente como um cofator por cerca de 4% das enzimas conhecidas e participa de mais de 100 reações diferentes do metabolismo intermediário (BEGLEY; KINSLAND; STRAUSS, 2001). Logo, sugere-se que o aumento da expressão de PPAT na presença do fenol, está diretamente relacionado aos mecanismos de adaptação ao estresse causado pela adição do fenol, uma vez que, essa enzima está envolvida na biossíntese da CoA, um cofator indispensável em várias vias metabólicas necessárias para produzir energia (ATP) e ativar os mecanismos de adaptação ao estresse.

A proteína glicerol-3-fosfato desidrogenase, *spot* 17 (Figura 14) é uma enzima que exerce efeito regulador sobre o metabolismo do glicerol e síntese de lipídeos. Segundo Gattás e Peres (2003) variação no nível de expressão desta enzima pode ser um indicador de tolerância a situações de estresse. Outra proteína envolvida na biossíntese de lipídeos e que apresentou expressão aumentada quando exposta ao fenol foi UDP-3-O-acilglucosamina N-aciltransferase, *spots* 20 e/ou 21 (Figura 14). Assim, o aumento no nível de expressão dessas proteínas após exposição ao fenol sugere a indução de mecanismos que conduzam ao reparo, substituição ou alteração da composição dos lipídeos de membrana ou da parede celular bacteriana, presumivelmente danificada pela ação do fenol (SANTOS; TEIXEIRA e SÁ-CORREIA, 2004).

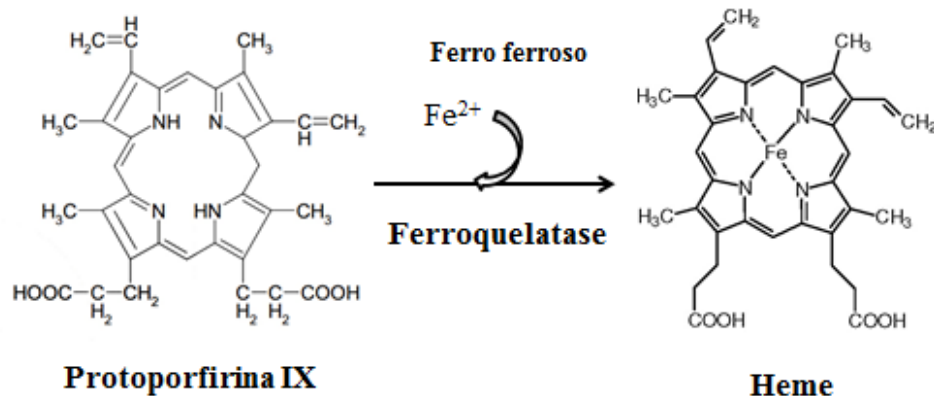
Foi possível verificar o aumento na expressão de algumas proteínas envolvidas na biossíntese de aminoácidos e proteínas (Diidrodipicolinato redutase (ID: 1032); 3-isopropilmalato desidratase (ID: 1118); succinilglutamato desuccinilase (ID: 792); metionil-RNA<sup>t</sup> formiltransferase (ID: 814); metionina RNA<sup>t</sup> ligase (ID: 369); fator de alongação Tu (ID: 615) (Tabela 5), corroborando Santos; Benndorf e Sá-Correia (2004), no qual estudos realizados com *Pseudomonas putida* KT2440 exposta ao fenol, também mostraram um

aumento na expressão de proteínas envolvidas na biossíntese de aminoácidos e proteínas, entre essas a 3-isopropilmalato desidratase, encontra no presente estudo. O aumento na expressão de algumas proteínas envolvidas na biossíntese de aminoácidos sugere que o estresse causado pelo fenol causa uma carência de aminoácidos, que pode estar relacionada com a permeabilização da membrana após a exposição a este solvente (SANTOS; TEIXEIRA; SÁ-CORREIA, 2004).

Entre as proteínas envolvidas na biossíntese de proteínas se destaca o Fator de Elongação Tu (EF-Tu), *spot 9* (Figura 14) que participa do processo de tradução de proteínas, transportando o aminoacil-RNAt livre no citoplasma, até o códon específico no sítio aminoacil (sítio A) do ribossomo no complexo RNAm-ribossomo. Caldas, Yaagoubi e Richarme (1998), relataram em seus estudos que em *Escherichia coli* o EF-Tu está envolvido no enovelamento e na renaturação de proteínas após estresse. Este fato sugere que o EF-Tu, além de desempenhar sua função como fator de elongação no processo de tradução de proteínas ele poderia ainda estar envolvido no processo de enovelamento de proteínas e proteção ao estresse. Dessa forma sugere-se que o aumento da expressão dessa proteína na presença do fenol está relacionado à resposta ao estresse com fenol, uma vez que este poluente está envolvida na desnaturação de proteínas. O aumento da expressão dessa proteína também foi observado por Martins (2012), quanto *Burkholderia* sp.SMF 07 foi cultivada em meio TY (*Tryptone-Yeast Medium*) contendo 1000 ppm do herbicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D).

A Ferroquelatase, *spot 11* (Figura 14) é uma enzima que participa da última etapa da via biossintética do grupo heme catalisando a quelatação do ferro ferroso ( $Fe^{2+}$ ) ao anel da protoporfirina IX formando protoheme ou heme (Figura 15). Na natureza esta enzima é encontrada em vários organismos, inclusive em bactérias. O grupo heme é essencial para os seres vivos, uma vez que este faz parte da estrutura de uma diversidade de proteínas (tais como, hemoglobina, mioglobina, citocromos, catalases) que desempenham uma variedade de funções importantes nas células.

Figura 15 – Esquema da reação catalisada pela ferroquelatase.



FONTE: Adaptado de: FERREIRA *et al.* (1995).

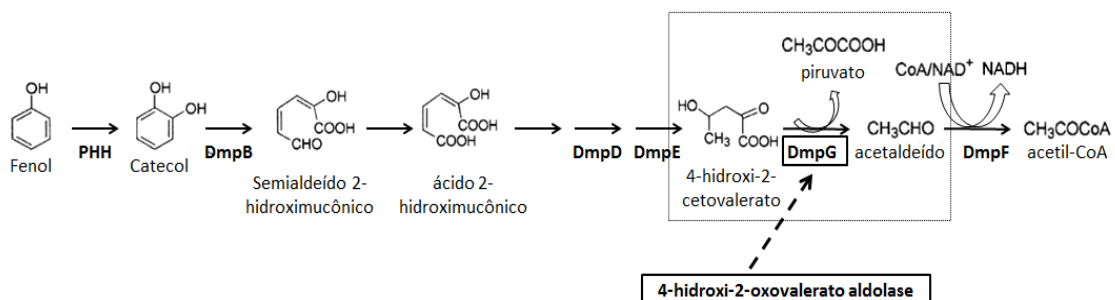
O aumento na expressão de proteínas envolvidas nas vias metabólicas de produção de energia, tais como, glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico, biossíntese da coenzima A (CoA), biossíntese de proteínas e biossíntese de lipídeos por *Burkholderia* sp. SMF 07 na presença do fenol, sugere modificações nos níveis metabólicos dessas bactérias, o que pode levar a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) provenientes dessas vias, o que pode desencadear um estresse oxidativo nessas células. Os EROs podem atuar danificando a estrutura de moléculas vitais como o DNA, RNA, lipídeos e proteínas (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000). Em contrapartida, como mostrado anteriormente, também foi observado o aumento na expressão da proteína ferroquelatase que está envolvida na via biossintética do grupo heme. O grupo heme, por sua vez, participa da estrutura de várias proteínas, entre estas, se destaca a enzima catalase presente no citoplasma bacteriano, a qual é produzida em resposta ao estresse oxidativo. Em micro-organismos a catalase desempenha uma importante função na desintoxicação de EROs (HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998)

A Glutamato Metilesterase, *spot 11* (Figura 14) é uma proteína que atua na regulação do sistema de quimiotaxia. Quimiotaxia é definida segundo Murray (2002), como o movimento quimicamente dirigido desenvolvido por alguns seres vivos, incluindo determinados organismos unicelulares, com diversas finalidades, incluindo a busca de nutrientes. Esse termo é quase sempre usado para se referir ao movimento celular em resposta a gradientes de concentrações de químicos presentes no ambiente. Portanto, uma vez que ocorreu o aumento na expressão da glutamato metilesterase podemos concluir que ocorreu também o aumento da quimiotaxia pelas bactérias *Burkholderia* sp. SMF 07 na presença do fenol (grupo fenol) quando comparado com o grupo controle.

O *spot* quatorze (ID: 763) foi identificado como sendo possivelmente a proteína Chaperona DnaJ (Figura 14). Esta proteína é conhecida como membro da família das co-chaperonas Hsp40. A função mais conhecida das co-chaperonas é impedir a agregação de cadeias polipeptídicas recém-traduzidas. Porém, elas também atuam no redobramento de moléculas que perderam a conformação por mutação ou por fatores do micro ambiente, como estresse (CAPLAN, 2003; FRYDMAN, 2001). Outras moléculas envolvidas na recuperação da conformação de proteínas mal formadas são as chaperoninas, que podem ser encontradas tanto em bactérias como em compartimentos celulares eucarióticos (BONSHTIEN *et al.*, 2009). O *spot* três foi identificado como sendo uma possível chaperonina 60 kDa (Figura 14).

A proteína 4-hidroxi-2-oxoalderato aldolase, *spot* 15 (Figura 14) é uma enzima envolvida na via *meta* de degradação do fenol. Esta proteína converte 4-hidroxi-2-cetoalderato em piruvato e acetaldeído (Figura 16), moléculas que podem ser convertidas a acetilcoenzima A (acetil-CoA), um substrato essencial para produção de energia a partir do ciclo do ácido tricarbóxico (CHEN; SIEWERS; NIELSEN, 2012). Esta enzima também apresentou expressão quantitativa aumentada na presença do fenol. Esse dado sugere que a *Burkholderia* sp. SMF 07 apresenta possivelmente a capacidade de biodegradar o fenol para compostos menos tóxicos para o ambiente, porém não é possível afirmar que esta bactéria apresenta capacidade de utilizar o fenol como fonte de carbono, uma vez que como mostrado anteriormente (Figuras 8 e 9) esta bactéria não foi capaz de crescer em meio mineral Bushnell Hass (BH), tendo como única fonte de carbono o fenol nas concentrações de 400 e 600 mg/L.

Figura 16 - Via *meta* de degradação do fenol.



Fonte: TSIROGIANNI *et al.* (2006); SUENAGA *et al.* (2009). Abreviações das enzimas: PHH: fenol hidroxilase; DmpB: catecol 2,3-dioxigenase; DmpD: semialdeído 2-hidroxiacético hidrolase; DmpE: 2-oxopent-4-dienoato hidratase; DmpG: 4-hidroxi-2-oxoalderato aldolase; DmpF: acetaldeído desidrogenase.

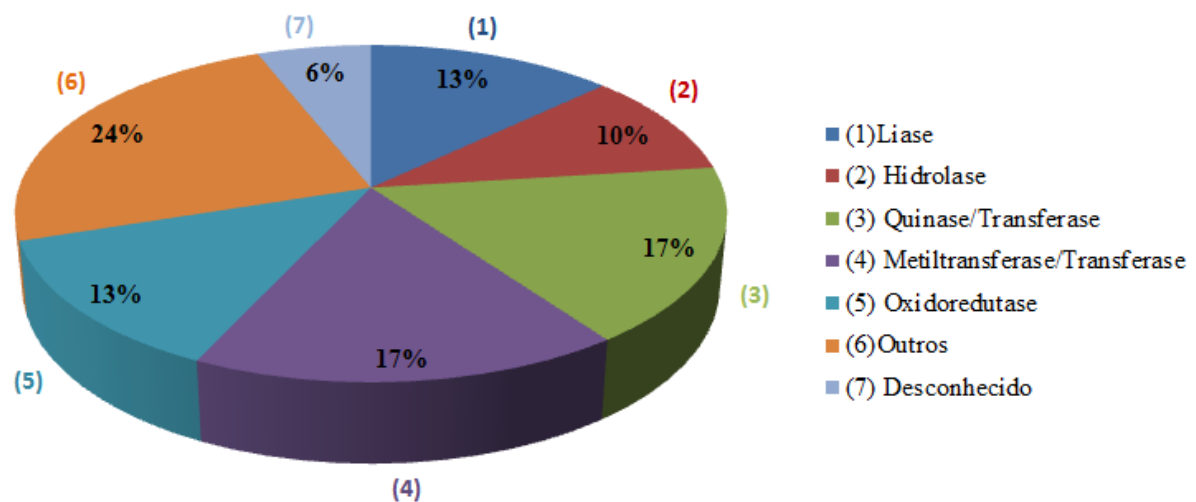
### 5.6.2 Análise das proteínas que apresentaram expressão quantitativa reduzida na presença do fenol

Na figura 17 são mostradas as regiões dos géis de referência para o grupo controle (C) e tratado (fenol) (T) correspondente a cada *spot* que teve sua expressão quantitativa reduzida na presença de fenol comparado com o controle. Um histograma localizado no lado inferior direito da região de cada *spot* analisado mostra a diferença quantitativa no volume dos referidos *spots* no grupo fenol quando comparado com o grupo controle.

Foi possível observar treze *spots* com expressão quantitativa reduzida no grupo fenol em relação ao grupo controle. Desses, onze *spots* foram identificados no banco de dados *UniProt/ Swiss-Prot* disponível no servidor *ExPASy*, utilizando os valores de ponto de isoelétrico (pI) e massa molecular (MW). Na Tabela 6 são mostradas as possíveis proteínas para cada *spot* que teve sua expressão quantitativa aumentada no grupo fenol em relação ao grupo controle, além das suas possíveis funções e processos biológicos as quais essas proteínas podem estar envolvidas.

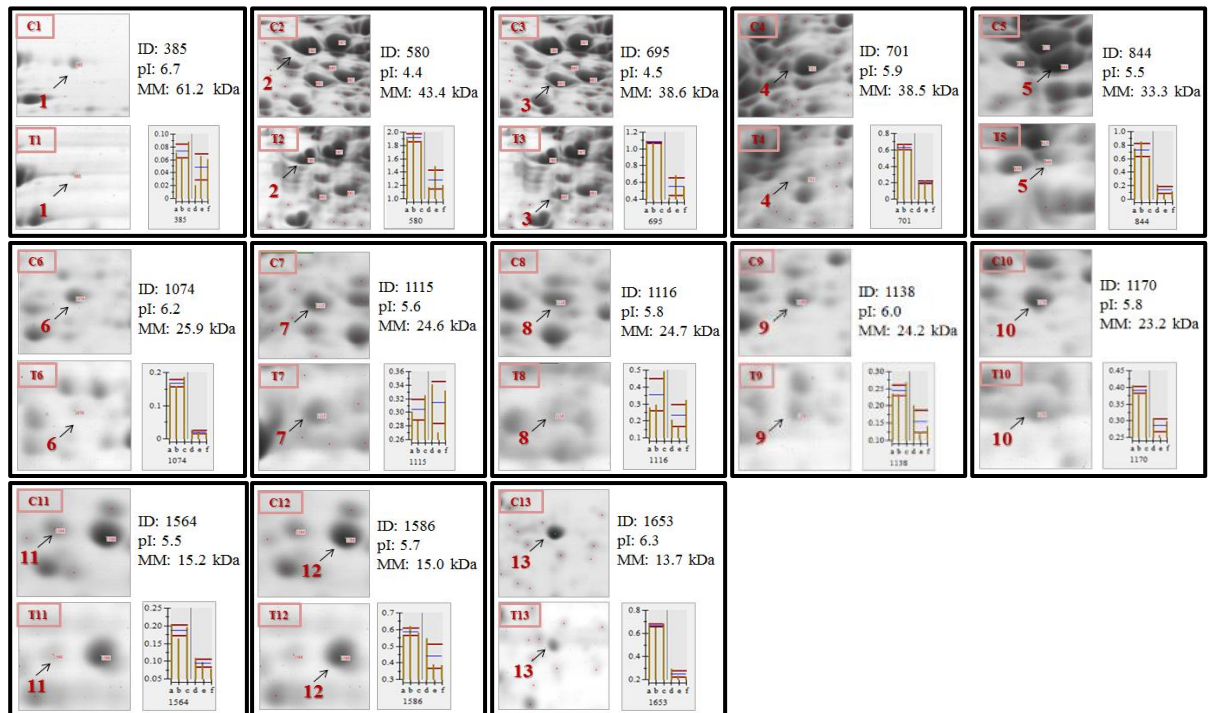
As proteínas que apresentaram expressão reduzida na presença do fenol e foram identificadas no banco de dados *UniProt/ Swiss-Prot* foram classificadas de acordo com a sua função biológica dentro das seguintes categorias: (1) liase; (2) hidrolase; (3) quinase/transferase; (4) metiltransferase/transferase; (5) oxidoreductase; (6) outros; (7) função desconhecida; (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Classificação funcional das proteínas que tiveram expressão quantitativa reduzida no grupo fenol em comparação ao grupo controle e foram identificadas através do banco de dados *UniProt/ Swiss-Prot*.



Fonte: SOARES (2013).

Figura 17 - Regiões dos géis de referência para o grupo controle (C) e tratado (fenol) (T) correspondente a cada *spot* que teve sua expressão quantitativa reduzida na presença do fenol comparado com o controle.



Fonte: SOARES (2013). C1 a C31: região do gel de referência do grupo controle; T1 A T31: região do gel de referência do grupo fenol (tratado); Setas e números: mostram os *spots* que apresentaram alterações quantitativas nos níveis de expressão; ID: identificação do *spot*; pI: ponto isoelétrico; MM: massa molecular; Letras a, b e c na base do histograma: correspondem às replicas 1, 2 e 3 do grupo controle; Letras d, e e f na base do histograma: correspondem às replicas 1, 2 e 3 do grupo fenol (tratado).

Tabela 6 - Identificação das possíveis proteínas intracelulares de *Burkholderia* sp.SMF 07 com alteração quantitativa reduzida na presença do fenol (grupo fenol) comparado com o grupo controle identificadas com base no banco de dados *UniProt/Swiss-Prot*. Continua.

Nº do spot	ID	pI (E)	MM (E)	Proteína	Função Biológica	Processo Biológico	Número de Acesso
1	385	670.610	61210.0	Colina desidrogenase.	Oxidoreductase	<i>Desconhecido</i>	BETA_BURA4 (B1Z034)
2	580	447.581	43468.0	<i>NI</i>			
3	695	453.838	38618.0	<i>NI</i>			
4	701	591.115	38562.0	Provável deoxiribonuclease-2.	Endonuclease; Nuclease	<i>Desconhecido</i>	DNS2_BURP1 (Q3JJK4)
				S-adenosilmetionina RNAt ribosiltransferase-isomerase.	Transferase	Biossíntese da Queuosina	QUEA_BURXL (Q145H9)
				2-aminoetilfosfonato-piruvato transaminase.	Aminotransferase; Transferase	<i>Desconhecido</i>	PHNW_BURPS (Q63NF6)
				Corismato sintase.	Liase	Biossíntese de Aminoácidos	AROC_BURPS (Q63TK6)
5	844	555.783	33332.0	UDP-3-O-[3-hidroximiristoil] N- acetilglucosamina deacetilase	Hidrolase	Biossíntese do Lipídeo A	LPXC_BURCH (A0K493)
				Lipase.	Hidrolase	Degradação de Lipídeos	LIP_BURCE (P22088)
				2,3-diidroxifenilpropionato/2,3-ácido 1,2-diidroxicinâmico dioxigenase	Dioxigenase; Oxidoreductase	Catabolismo dos hidrocarbonetos aromáticos	MHPB_BURXL (Q13QH9)
				3-oxoacil sintase 3.	Aciltransferase; Transferase	Biossíntese dos ácidos graxos	FABH_BURMS (A1V6D0)
				Proteína RdgC.- associada a recombinação	<i>Desconhecido</i>	Recombinação do DNA	RDGC_BURCC (B1K4Q5)
6	1074	624.606	25996.0	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferase.	Nucleotidiltransferas Transferase	Biossíntese de Isopreno	ISPD_BURP8 (B2JGK2)
				RNA Ribossomal metiltransferase G (subunidade menor)	Metiltransferase; Transferase	Processamento de RNAr	RSMG_BURCM (Q0BJM7)
				3-isopropilmalato desidratase (subunidade menor)	Liase	Biossíntese de aminoácidos	LEUD_BURPS (Q63JL1)
7	1115	560.568	24664.0	Proteína UreF acessória a Urease RNA Ribossomal metiltransferase G (subunidade menor)	Chaperona Metiltransferase; Transferase	Inserção do Níquel Processamento do RNAr	UREF_BURCM (Q0BHN7) RSMG_BURXL (Q13SP1)



Tabela 6 - Identificação das possíveis proteínas intracelulares de *Burkholderia* sp.SMF 07 com alteração quantitativa reduzida na presença do fenol (grupo fenol) comparado com o grupo controle identificadas com base no banco de dados *UniProt/Swiss-Prot*. Conclusão.

Nº do spot	ID	pI (E)	MM (E)	Proteína	Função Biológica	Processo Biológico	Número de Acesso
				Piridoxina/piridoxamina 5'-fosfato oxidase.	Oxidoredutase	Biossíntese da Piridoxina	PDXH_BURS3 (Q39DH2)
8	1116	581.914	24772.0	Adenilato quinase.	Quinase; Transferase	Biossíntese de Nucleotídeo	KAD_BURVG (A4JH80)
				RNA Ribossomal metiltransferase G. (subunidade menor)	Metiltransferase; Transferase	Processamento do RNAr	RSMG_BURS3 (Q39KY8)
				3-demetilubiquinona-9 3-metiltransferase.	Metiltransferase; Transferase	Biossíntese da Ubiquinona	UBIG_BURPS (Q63RZ8)
9	1138	605.836	24200.0	Adenilato quinase.	Quinase; Transferase	Biossíntese de Nucleotídeos	KAD_BURCH (A0K9X1)
				RNA Ribossomal metiltransferase G. (subunidade menor)	Metiltransferase; Transferase	Processamento do RNAr	RSMG_BURCJ (B4E582)
10	1170	580.810	23229.0	Timidilato quinase.	Quinase; Transferase	Biossíntese de Nucleotídeos	KTHY_BURS3 (Q39FH9)
				Adenilato quinase.	Quinase; Transferase	Biossíntese de Nucleotídeos	KAD_BURVG (A4JH80)
				2-nonaprenil-3-metil-6-metoxi-1,4-benzoquinol hidroxilase	Monooxigenase; Oxidoredutase	Biossíntese de Nucleotídeos	COQ7_BURM1 (A9AJ26)
				Deoxiribose-fosfato aldolase.	Liase	<i>Desconhecido</i>	DEOC_BURCJ (B4ENZ2)
11	1564	555.415	15248.0	Fosforibosil-AMP ciclodrolase.	Hidrolase	Biossíntese de aminoácidos	HIS3_BURMS (A1V8H6)
12	1586	577.865	15063.0	Proteína MraZ.	<i>Desconhecido</i>	<i>Desconhecido</i>	MRAZ_BURPP (B2SYY4)
				Nucleosideo difosfato quinase.	Quinase; Transferase	Biossíntese de nucleotídeos	NDK_BURP0 (A3NVX4)
13	1653	632.702	13749.0	Metilglioxal sintase.	Liase	<i>Desconhecido</i>	MGSA_BURTA (Q2SZS7)

Fonte: SOARES (2013). ID: número de identificação dos spots; pI (E): ponto isoelétrico experimental; MM(E): massa molecular experimental; NI: Spots não identificados.

As proteínas que apresentaram expressão reduzida na presença do fenol (Tabela 6) se encontram principalmente envolvidas na biossíntese de nucleotídeos (nucleosídeo difosfato quinase – (*spot* 12); adenilato quinase – (*spot* 8, 9 e/ou 10); timidilato quinase – (*spot* 10); 2-nonaprenil-3-metil-6-metoxi-1,4-benzoquinol hidroxilase – (*spot* 10) ou no processamento do RNAr (RNA ribossomal metiltransferase 2 – *spots* 6, 7, 8 e/ou 9) o que, segundo Santos, Teixeira e Sá-Correia, (2004) poderá contribuir para a canalização da energia disponível para os mecanismos de adaptação e reparação celular sob estresse por fenol.

Além disso, também foi verificada a redução na expressão de proteínas envolvidas na biossíntese dos ácidos graxos (3-oxoacil sintase 3) e do lipídeo A (UDP-3-O-[3-hidroximiristoil] N-acetilglucosamina deacetilase), os quais são processos importantes desenvolvidos pelas células no objetivo de induzir mecanismos de reparo, substituição ou alteração da composição dos ácidos graxos presentes na membrana plasmática ou na parede celular (SANTOS, TEIXEIRA, SÁ-CORREIA, 2004). Logo se sugere que o fenol na concentração testada pode ser tóxico para a célula, danificando estruturas celulares importantes como a membrana plasmática e a parede celular.

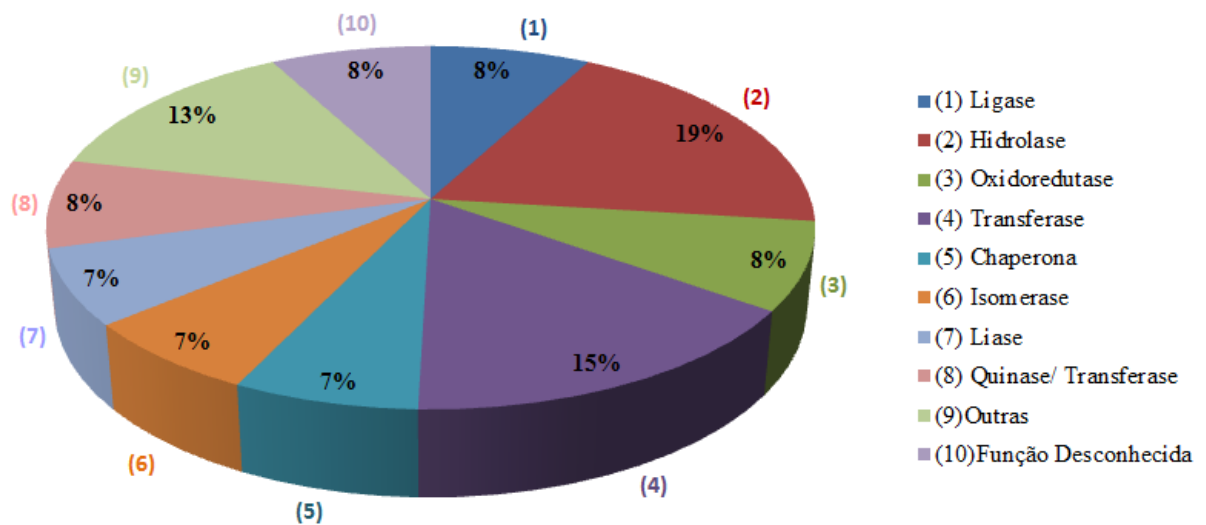
### **5.6.3 Análise das proteínas que apresentaram expressão exclusiva no grupo controle.**

Como mostrado anteriormente (Gráfico 1) uma média de 187 *spots* tiveram expressão exclusiva no grupo controle, porém foi observado através dos histogramas obtidos pelo programa *ImageMaster*<sup>TM</sup> que a expressão de alguns *spots* ocorria apenas em uma ou duas das repetições do grupo controle. Dessa forma, vale ressaltar que na figura 18 são mostradas apenas as regiões dos géis de referência para o grupo controle (C) e tratado (fenol) (T) correspondente a cada *spot* que teve sua expressão exclusiva nas três repetições do grupo controle. Um histograma localizado no lado inferior direito da região de cada *spot* analisado mostra a diferença quantitativa no volume dos referidos *spots* no grupo controle quando comparado com o grupo fenol.

Utilizando os valores de ponto de isoelétrico (pI) e massa molecular (MW),<sup>40</sup> dos 52 *spots* com expressão exclusiva nas três repetições do grupo controle, foram identificados no banco de dados *UniProt/Swiss-Prot* disponível no servidor *ExPASy*, Na Tabela 7 são mostradas as possíveis proteínas para cada *spot* que teve sua expressão exclusiva nas três repetições do grupo controle, além das suas possíveis funções e processos biológicos as quais essas proteínas podem estar envolvidas.

As proteínas que apresentaram expressão exclusiva no grupo controle e foram identificadas no banco de dados *UniProt/ Swiss-Prot* foram classificadas de acordo com a sua função biológica dentro das seguintes categorias: (1) ligase; (2) hidrolase; (3) oxidoreductase; (4) transferase; (5) chaperona; (6) isomerase; (7) liase; (8) quinase/ transferase; (9) outras; (10) função desconhecida (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Classificação funcional das proteínas que tiveram expressão exclusiva no grupo controle e foram identificadas através do banco de dados *UniProt/ Swiss-Prot*.



Fonte: SOARES (2013)

Figura 18 - Regiões dos géis de referência para o grupo controle (C) e tratado (fenol) (T) correspondente a cada *spot* que teve expressão exclusiva no grupo controle. Continua.

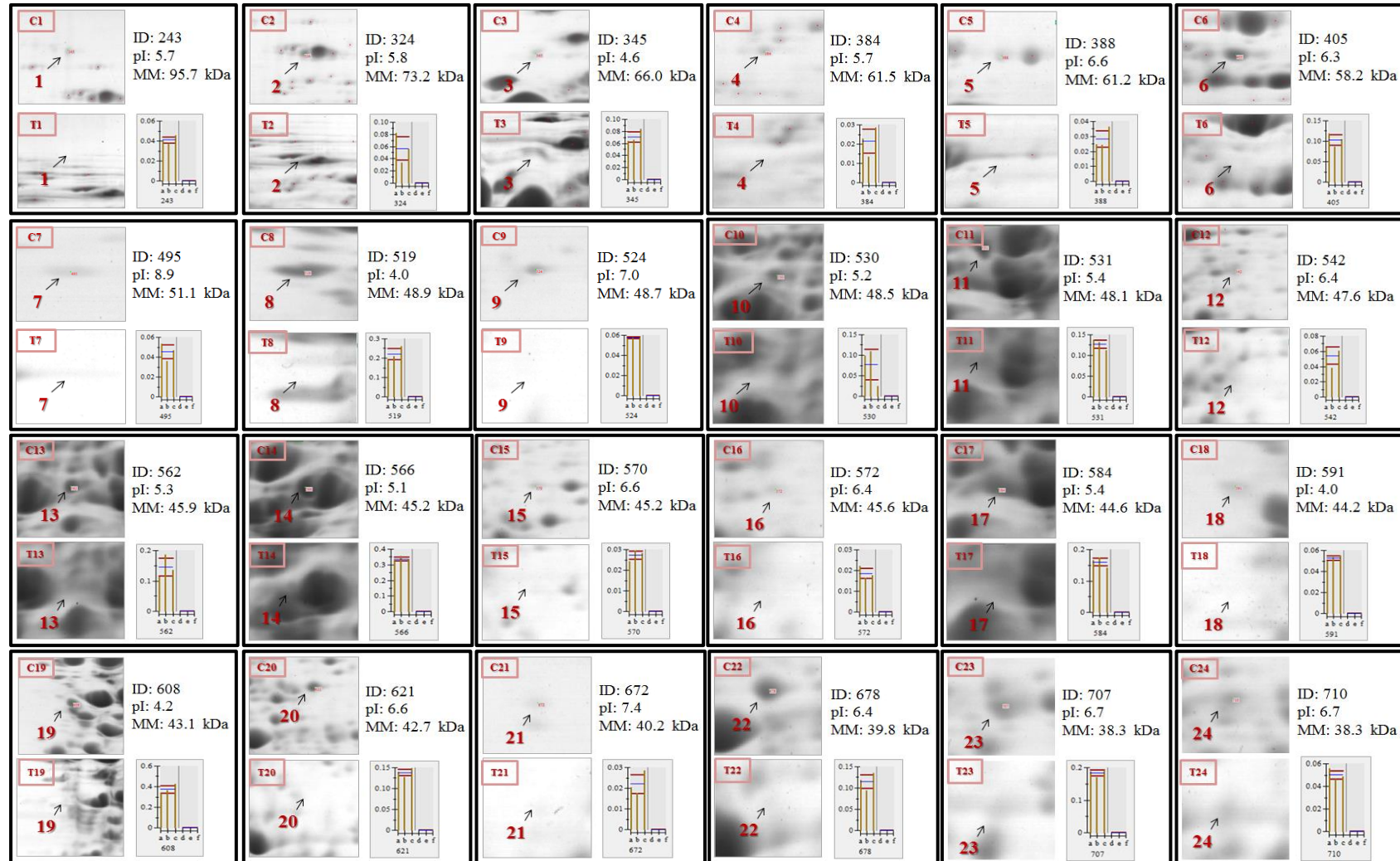
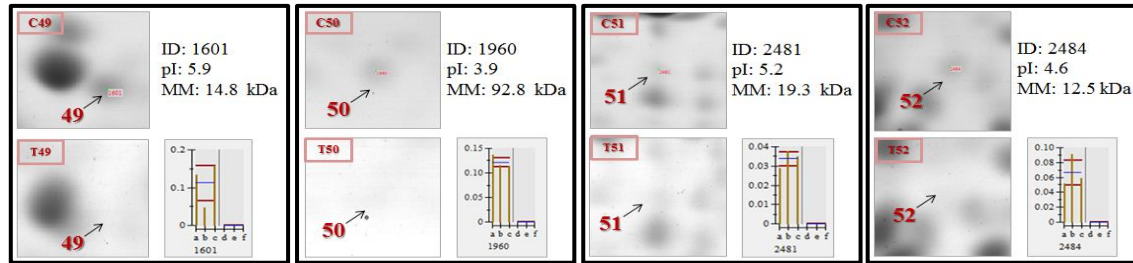


Figura 18 - Regiões dos géis de referência para o grupo controle (C) e tratado (fenol) (T) correspondente a cada *spot* que teve expressão exclusiva no grupo controle. Continua.



Figura 18 - Regiões dos géis de referência para o grupo controle (C) e tratado (fenol) (T) correspondente a cada *spot* que teve expressão exclusiva no grupo controle. Continua.



Fonte: SOARES (2013). C1 a C52: região do gel de referência do grupo controle; T1 A T52: região do gel de referência do grupo fenol (tratado); Setas e números: mostram os *spots* que apresentaram alterações quantitativas nos níveis de expressão; ID: identificação do *spot*; pI: ponto isoelétrico; MM: massa molecular; Letras a, b e c na base do histograma: correspondem às réplicas 1, 2 e 3 do grupo controle; Letras d, e e f na base do histograma: correspondem às réplicas 1, 2 e 3 do grupo fenol (tratado).

Tabela 7 - Identificação das possíveis proteínas intracelulares de *Burkholderia* sp. SMF 07 com expressão exclusiva no grupo controle identificadas com base no banco de dados *UniProt/Swiss-Prot*. Continua.

Nº do spot	ID	pI (E)	MM (E)	Nome da Proteína	Função Molecular	Processo Biológico	Número de Acesso
1	243	570.873	95710.0	Leucina-RNAt ligase.	Aminoacil-RNAt sintetase	Biossíntese de proteínas	SYL_BURP6 (A3NDK5)
				Alanina-RNAt ligase.	Aminoacil-RNAt sintetase	Biossíntese de proteínas	SYA_BURVG (A4JDM9)
2	324	584.122	73219.0	Enzima MnmG de modificação do RNAt uridina 5-carboximetilaminometil(mnmG)	<i>Desconhecida</i>	Processamento do RNAt	MNMG_BURVG (A4JA22)
				Treonina-RNAt ligase.	Aminoacil-RNAt sintetase;	Biossíntese de proteínas	SYT_BURP8 (B2JJJ7)
				Acetil coenzima A sintetase.	Ligase	<i>Desconhecido</i>	ACSA_BURTA (Q2T3N9)
3	345	463.775	66000.0	<i>NI</i>			
4	384	573.081	61596.0	CTP sintase.	Ligase	Biossíntese da Pirimidina	PYRG_BURCH (A0K8N3)
5	388	662.145	61210.0	Urease – subunidade $\alpha$ . Colina desidrogenase.	Hidrolase Oxidoreductase	<i>Desconhecido</i>	BETA_BURCH (A0B2F7)

Tabela 7 - Identificação das possíveis proteínas intracelulares de *Burkholderia* sp. SMF 07 com expressão exclusiva no grupo controle identificadas com base no banco de dados *UniProt/Swiss-Prot*. Continua.

Nº do spot	ID	pI (E)	MM (E)	Nome da Proteína	Função Molecular	Processo Biológico	Número de Acesso
6	405	638.591	58212.0	Poliprenil p-hidroxibenzoato descarboxilase	Descarboxilase; Liase	Biossíntese da Ubiquinona	UBID_BURP1 (Q3JPM4)
7	495	898.055	51128.0	<i>NI</i>			
8	519	406.730	48929.0	<i>NI</i>			
9	524	709.253	48725.0	Glutamil-RNAt redutase.	Oxidoreductase	Biossíntese da Porfirina	HEM1_BURPP (B2SZ26)
10	530	527.813	48521.0	Proteína ribossomal S12 metiltiotransferase RimO.	Transferase	<i>Desconhecida</i>	RIMO_BURCH (A0K7Q6)
				GTPase MnmE de modificação do RNAt(MnmE)	Hidrolase	Processamento do RNAt	MNME_BURMS (A1V7D3)
				Unfoldase HslU	Chaperona	Resposta ao estresse	HSLU_BURVG (A4JIR3)
11	531	549.895	48117.0	Argininosuccinato sintase.	Ligase	Biossíntese dos aminoácidos	ASSY_BURCH (A0AYH4)
				Homogentisato 1,2-dioxigenase.	Dioxigenase; Oxidoreductase	Catabolismo da Fenilalanina	HGD_BURCC (B1JWJ3)
				UDP-N-acetilmuramato-L-alanina ligase (murC)	Ligase	Síntese do Peptideoglicano	MURC_BURA4 (B1YSS5)
12	542	642.639	47616.0	Fosfoglucosamina mutase.	Isomerase	<i>Desconhecida</i>	GLMM_BURTA (Q2SUW3)
13	562	538.118	45952.0	Timidina fosforilase. 3-fosfosiquimato 1-carboxiviniltransferase	Glicosiltransferase; Transferase Transferase	<i>Desconhecida</i> Biossíntese de aminoácidos	TYPH_BURCH (A0KQC9) AROA_BURXL (Q13VC2)
14	566	513.091	45283.0	Histidinol desidrogenase.	Oxidoreductase	Biossíntese de aminoácidos	HISX_BURS3 (Q39K91)
15	570	660.673	45283.0	Timidina fosforilase. Serina hidroximetiltransferase 2.	Glicosiltransferase; Transferase Transferase	<i>Desconhecida</i> Biossíntese de aminoácidos	TYPH_BURMS (A1UY21) GLYA2_BURTA (Q2T437)
16	572	645.584	45664.0	Serina hidroximetiltransferase 1.	Transferase	Biossíntese de aminoácidos	GLYA1_BURTA (Q2SYS4)

Tabela 7 - Identificação das possíveis proteínas intracelulares de *Burkholderia* sp. SMF 07 com expressão exclusiva no grupo controle identificadas com base no banco de dados *UniProt/Swiss-Prot*. Continua.

Nº do spot	ID	pI (E)	MM (E)	Nome da Proteína	Função Molecular	Processo Biológico	Número de Acesso
17	584	547.687	44677.0	L-ramnonato desidratase. Fator de Elongação Tu.	Liase Fator de Elongação	<i>Desconhecida</i> Biossíntese de Proteínas	RHMD_BURA4 (B1YMY4) EFTU_BURXL (Q13TF5)
				Glutamato-1-semialdeído 2,1-aminomutase <i>NI</i>	Isomerase	Biossíntese da Porfirina	GSA_BURXL (Q13V40)
18	591	408.938	44291.0	<i>NI</i>			
19	608	421.083	43156.0	<i>NI</i>			
20	621	666.562	42722.0	8-amino-7-oxononanoate sintase.	Transferase	Biossíntese da biotina	BIOF_BURM1 (A9AE46)
21	672	749.369	40268.0	<i>NI</i>			
22	678	646.688	39806.0	Uroporfirinogênio descarboxilase.	Descarboxilase; Liase	Biossíntese da Porfirina	DCUP_BURPP (B2T7J6)
23	707	676.130	38395.0	<i>NI</i>			
24	710	661.041	38897.0	Provável cobalto-precorrina 6A sintase	Transferase	Biossíntese de Cobalamina	CBID_BURVG (A4JEB6)
				Proteína MetN 1 importadora de metionina ATP ligante	Hidrolase	Transporte de aminoácidos	METN1_BURXL (Q13VD7)
25	714	729.495	38618.0	Proteína UgpC importadora de sn-glicerol-3-fosfato ATP ligante .	Hidrolase	Transporte de Açúcar	UGPC_BURCH (A0K3S5)
26	718	412.618	38673.0	<i>NI</i>			
27	721	578.970	38451.0	Alifático amidase. S-adenosilmetionina: RNAt ribosiltransferase-isomerase. Corismato sintase.	Hidrolase Transferase	Desconhecida Biossíntese da Queosina	AMIE_BURCH (A0B137) QUEA_BURCH (A0K4P9)
				Provável cobalto-precorrina-6A sintase	Liase Transferase	Biossíntese dos aminoácidos Biossíntese da Cobalamina	AROC_BURM1 (A9ABG9) CBID_BURXL (Q13MI0)



Tabela 7 - Identificação das possíveis proteínas intracelulares de *Burkholderia* sp. SMF 07 com expressão exclusiva no grupo controle identificadas com base no banco de dados *UniProt/Swiss-Prot*. Continua.

Nº do spot	ID	pI (E)	MM (E)	Nome da Proteína	Função Molecular	Processo Biológico	Número de Acesso
28	728	615.037	37411.0	Fenilalanina-RNA <sub>t</sub> ligase (subunidade $\alpha$ )	Aminoacil-RNA <sub>t</sub> sintetase	Biossíntese das proteínas	SYFA_BURTA (Q2SVE2)
				L-treonina 3-dehidrogenase.	Oxidoredutase	<i>Desconhecida</i>	TDH_BURCH (A0B459)
				UDP-N-acetilenoilpiruvilglucosamina redutase.	Oxidoredutase	Ciclo celular	MURB_BURCH (A0K9X7)
				Proteína TtcA. Biossíntese do RNA <sub>t</sub> 2-tiocitidina (ttcA)	<i>Desconhecida</i>	Processamento do RNA <sub>t</sub>	TTCA_BURA4 (B1YP61)
29	729	495.426	38174.0	ADP-L-glicero-D-mano-heptose-6-epimerase.	Isomerase	Metabolismos carboidratos	HLDD_BURPP (B2T625)
				Biotina sintase.	Transferase	Biossíntese da biotina	BIOB_BURA4 (B1YNS2)
30	746	572.345	37142.0	3-dehidroquinato sintase.	Liase	Biossíntese dos aminoácidos	AROB_BURCH (A0K3S0)
				Protein TtcA – Biossíntese do RNA <sub>t</sub> 2-tiocitidina	<i>Desconhecida</i>	Processamento do RNA <sub>t</sub>	TTCA_BURCH (A0KB51)
				Antranilato fosforibosiltransferase.	Glicosiltransferase; Transferase	Biossíntese dos aminoácidos	TRPD_BURMS (A1UW99)
31	762	519.716	36769.0	Fosforibosilformilglicinamidina ciclo-ligase.	Ligase	Biossíntese da Purina	PUR5_BURM1 (A9AGA9)
				Selenide, água diquinase. Sintase da Biotina	Quinase; Transferase	<i>Desconhecida</i> Biossíntese da Biotina	SELD_BURPS (Q63NL2) BIOB_BURVG (A4JIB7)
32	809	642.639	34958.0	RNA Ribossomal metiltransferase H (subunidade menor) – (rsmH)	Metiltransferase; Transferase	Processamento do RNA <sub>r</sub>	RSMH_BURMS (A1V0S6)
				Coproporfirinogene-III oxidase, aeróbico.	Oxidoredutase	Biossíntese da Porfirina	HEM6_BURP0 (A3NT46)
				Porfobilinogene deaminase.	Transferase	Biossíntese da Porfirina	HEM3_BURVG (A4JGV4)
				Glicerol-3-fosfato desidrogenase [NAD(P)+].	Oxidoredutase	Biossíntese de Lipídeos	GPDA_BURVG (A4JI41)

Tabela 7 - Identificação das possíveis proteínas intracelulares de *Burkholderia* sp. SMF 07 com expressão exclusiva no grupo controle identificadas com base no banco de dados *UniProt/Swiss-Prot*. Continua.

Nº do spot	ID	pI (E)	MM (E)	Nome da Proteína	Função Molecular	Processo Biológico	Número de Acesso
33	811	526.341	35009.0	Sulfato adenililtransferase subunidade2.	Nucleotidiltransferase;	<i>Desconhecido</i>	CYSD_BURS3 (Q39EM7)
				Ornitina carbamoiltransferase.	Transferase	Biossíntese dos aminoácidos	OTC_BURS3 (Q39DI7)
				Transaldolase.	Transferase	Desvio da pentose	TAL_BURS3 (Q39E45)
34	822	489.537	34259.0	<i>NI</i>			
35	853	594.059	33429.0	Lipase.	Hidrolase	Metabolismo dos lipídeos	LIP_BURGL (Q05489)
				Proteína BMASAVP1_A0080 ligante do nucleotídeo UPF0042	<i>Desconhecida</i>	Desconhecida	Y1880_BURMS (A1UZM9)
				3-carboxietilcatecol 2,3-dioxigenase	Dioxigenase; Oxidoreductase	Catabolismo dos hidrocarbonetos aromáticos	MHPB_BURVG (A4JPY0)
				Proteína I Exportadora do fator Nod ATP ligante	Hidrolase	Transporte	NODI_BURTA (Q2SVP3)
				Metiltransferase L11 – Proteína ribossomal	Metiltransferase; Transferase	<i>Desconhecida</i>	PRMA_BURCH (A0K4C9)
36	856	454.574	33141.0	Acetilglutamato quinase.	Quinase; Transferase	Biossíntese dos aminoácidos	ARGB_BURMS (A1V7K1)
37	871	509.779	32713.0	<i>NI</i>			
38	916	475.552	30968.0	Provável fosfoenolpiruvato sintase	Quinase; Transferase	<i>Desconhecida</i>	PSRP_BURCH (A0K8C7)
				GTP ciclohídroxilase folE2.	Hidrolase	<i>Desconhecida</i>	GCH4_BURMS (A1UYQ5)
39	924	555.415	30834.0	Bis (5'-nucleosil)-tetrafosfatase, simétrica.	Hidrolase	<i>Desconhecida</i>	APAH_BURMS (A1V209)
40	956	767.035	29738.0	Proteína PstB importadora de fosfato ATP ligante	Hidrolase	Transporte	PSTB_BURSP (Q9XBG1)
41	970	724.711	29264.0	Pseudouridina RNAt sintase A (truA)	Isomerase	Processamento do RNAt	TRUA_BURVG (A4JMC2)

Tabela 7 - Identificação das possíveis proteínas intracelulares de *Burkholderia* sp. SMF 07 com expressão exclusiva no grupo controle identificadas com base no banco de dados *UniProt/Swiss-Prot*. Continua.

Nº do spot	ID	pI (E)	MM (E)	Nome da Proteína	Função Molecular	Processo Biológico	Número de Acesso
42	979	659.937	28629.0	Proteína UreD acessório a Urease	Chaperona	Inserção do Níquel	URED_BURMS (A1V1H0)
				3-deoxi-manno-octulosonato citidililtransferase.	Nucleotidiltransferase; Transferase	Biossíntese dos Lipopolissacarídeos	KDSB_BURMS (A1V116)
				Proteína TauB 3 importadora de taurina ATP ligante	Hidrolase	Transporte	TAUB3_BURXL (Q13IS7)
				Pantotenato quinase tipo III.	Quinase; Transferase	Biossíntese da Coenzima A	COAX_BURXL (Q146G6)
43	988	486.961	28379.0	Proteína SsuB 2 importadora de sulfonatos alifáticos ATP ligante	Hidrolase	Transporte	SSUB2_BURCA (Q1BG75)
				Clorocatecol 1,2-dioxigenase.	Dioxigenase; Oxidoreductase	Catabolismo dos hidrocarbonetos aromáticos	TFDC_BURCE (P0A397)
				2-ceto-4-pentenoato hidratase.	Liase	Catabolismo dos hidrocarbonetos aromáticos	MHPD_BURXL (Q13VU0)
				Fosfonoacetaldeído hidrolase.	Hidrolase	<i>Desconhecido</i>	PHNX_BURXL (Q13YI8)
44	1013	656.993	27642.0	Fosfogliceratomutase 2,3-bisfosfoglicerato dependente.	Isomerase	Glicólise	GPMA_BURVG (A4JI45)
				Fator RimM de maturação do Ribossomo.	Chaperona	Biogênese do Ribossomo	RIMM_BURPP (B2T606)
				Proteína TauB 3 importadora de taurina ATP ligante	Hidrolase	Transporte	TAUB3_BURXL (Q13IS7)
45	1100	550.999	25284.0	Detiobiotina sintetase BioD ATP dependente	Ligase	Biossíntese da Biotina	BIOD_BURM1 (A9AE45)
				3-demetilubiquinona-9 3-metiltransferase.	Metiltransferase; Transferase	Biossíntese da Ubiquinona	UBIG_BURP8 (B2JEZ6)
46	1131	539.590	24520.0	Fator RimM de maturação do Ribossomo.	Chaperona	Biogênese do Ribossomo	RIMM_BURVG (A4JCJ8)
				Proteína UreF acessória a uréase Ribose-5-fosfato isomerase A.	Chaperona Isomerase	Inserção do Níquel <i>Desconhecido</i>	UREF_BURCJ (B4ECC9) RPIA_BURXL (Q13ZQ5)

Tabela 7 - Identificação das possíveis proteínas intracelulares de *Burkholderia* sp. SMF 07 com expressão exclusiva no grupo controle identificadas com base no banco de dados *UniProt/Swiss-Prot*. Continua.

Nº do spot	ID	pI (E)	MM (E)	Nome da Proteína	Função Molecular	Processo Biológico	Número de Acesso
47	1490	418.875	16503.0	<i>NI</i>			
48	1539	580.442	15700.0	Fosforibosil-AMP ciclohidrolase.	Hidrolase	Biossíntese dos aminoácidos	HIS3_BURCJ (B4E642)
				Cianate hidratase.	Liase	<i>Desconhecido</i>	CYNS_BURMS (A1V0I2)
				D-tirosil-RNAt (Tyr) deacilase.	Hidrolase	<i>Desconhecido</i>	DTD_BURM1 (A9AH76)
49	1601	591.483	14845.0	Nucleosídeo difosfato quinase.	Quinase; Transferase	Metabolismo dos Nucleotídeo	NDK_BURCH (A0K7T9)
50	1960	399.001	9280.00	<i>NI</i>			
51	2481	522.660	19356.0	Ureidoglicolato hidrolase.	Hidrolase	Metabolismo da Purina	ALLA_BURCE (Q9AP01)
				Adenina fosforibosiltransferase.	Glicosiltransferase; Transferase	Resgate da Purina	APT_BURPP (B2SXI3)
				ProteínaGrpE.	Chaperona	Resposta ao Estresse	GRPE_BURXL (Q145F3)
52	2484	469.664	12565.0	Proteína CyaY	<i>Desconhecida</i>	<i>Desconhecido</i>	CYAY_BURVG (A4JAS8)
				Aspartato 1-descarboxilase( cadeia $\alpha$ )	Descarboxilase; Liase	Biossíntese do Pantotenato	PAND_BURP8 (B2JEQ8)
				Proteína UPF0345 Bxeno_C1292.	<i>Desconhecida</i>	<i>Desconhecido</i>	Y9292_BURXL (Q13FB9)
				Aspartil/glutamil-RNAt(Asn/Gln) amidotransferase subunidade C.	<i>Desconhecida</i>	<i>Desconhecido</i>	GATC_BURTA (Q2T294)

Fonte: SOARES (2013). ID: número de identificação dos *spots*; pI (E): ponto isoelétrico experimental; MM(E): massa molecular experimental; NI: *Spots* não identificados.

De acordo com os resultados mostrados na figura 18 e na tabela 7, foi possível verificar que a exposição das bactérias *Burkholderia* sp. SMF 07 ao fenol ocasionou a inibição da expressão de várias proteínas envolvidas em funções biológicas importantes, tais como, a biossíntese de aminoácidos, proteínas, lipídeos, ubiquinona, purinas e pirimidinas; além de proteínas que participam do processamento do RNAt, síntese do peptideoglicano e resposta ao estresse.

A inibição da expressão das proteínas leucina-RNAt ligase (ID: 243), alanina-RNAt ligase (ID: 243), treonina RNAt ligase (ID: 324) e fenilalanina-RNAt ligase (ID: 721), que participam da biossíntese de outras proteínas (Tabela 7), que possivelmente podem participar da constituição da membrana plasmática das células bacterianas ou do mecanismo de sinalização celular podem estar relacionada a resposta a toxicidade do fenol a célula, uma vez que o fenol já é conhecido por ser tóxico a bactérias devido ao seu uso como desinfetante e anti-séptico e por participar do processo de desnaturação de proteínas (EPA, 2002).

As proteínas *mmnG* (ID: 324), *mmnE* (ID: 530) , *truA* (ID: 970) , *ttcA*(ID: 728 e/ou 746) enzimas envolvidas no processamento do RNA transportador (RNAt) e, a proteína *rsmH* (ID: 809) que participa do processamento do RNA ribossômico (RNAr), apresentaram expressão inibida quando *Burkholderia* sp. SMF 07 foi exposta ao fenol. Tanto o RNAt, quanto o RNAr são moléculas essenciais no processo de tradução de proteínas, uma vez que os RNAt é um tipo de RNA molecular que traduz fielmente a mensagem do RNAm em uma sequência específica de aminoácidos, as moléculas precursoras das proteínas, e os RNAr são os componentes dos ribossomos, os complexos onde é realizada a síntese de proteínas (NELSON; COX, 2008).

As bases nitrogenadas purinas e pirimidinas são componentes essenciais detodas as células vivas, necessárias para o metabolismo energético e biossíntese de RNA e DNA. As pirimidinas ainda participam da síntese da CDP-diacilglicerol fosfoglicerídeo uma molécula que participa da construção das membranas celulares (BROWN *et al.* 2011; TRAUT, 1994). Como mostrado na tabela 7, à proteína CTP sintase (ID: 384), que participa da biossíntese das purinas e as proteínas fosforibosilformilglicinamídina ciclo-ligase (ID: 762) e ureidoglicolato hidrolase (ID: 2481), que participam da biossíntese das pirimidinas tiveram sua expressão inibida na presença de fenol. Esses dados reforçam a ideia de que o fenol na concentração testada pode ser tóxico, inibindo proteínas fundamentais na biossíntese de moléculas essenciais para o desenvolvimento bacteriano, tais como o RNA e o DNA. Assim, sugerimos que a dose de fenol utilizada está induzindo estresse metabólico na bactéria, sendo necessária a readaptação metabólica para prevenção dos danos ocasionados pela presença do fenol.

O *spot* 11 (Tabela 7) foi identificado como sendo possivelmente a proteína *murC* (ID: 531) uma enzima envolvida na síntese do peptidoglicano, uma estrutura integrante do envelope celular bacteriano, que confere rigidez à parede celular mantendo sua integridade e protegendo-a da lise osmótica. Essa estrutura é vital para a sobrevivência da maioria das espécies bacterianas (SCHEURWATER; BURROWS, 2011). A inibição da expressão dessa proteína quando a bactéria *Burkholderia* sp. SMF 07 foi exposta ao fenol demonstra que está ocorrendo uma reordenação da estrutura celular, influenciando na composição da parede celular.

O *spot* 6 (Tabela 7) foi identificado como sendo possivelmente a proteína poliprenil p-hidroxibenzoato decarboxilase (ID: 405), uma enzima que participa da biossíntese da Ubiquinona. A ubiquinona, também conhecida como Coenzima Q, está presente em todas as membranas de todas as células. Dentre as diversas funções desempenhadas por esta molécula, talvez a mais conhecida seja a capacidade de transportar elétrons nas reações de oxidação-redução que conduzem a síntese de ATP. Porém, a ubiquinona também já foi mencionada como sendo uma molécula essencial na defesa antioxidante em organismos aeróbios e por participar da introdução de ligações dissulfeto nas proteínas bacterianas (BENTINGER; TEKLE; DALLNER, 2010; TURUNENA; OLSSON; DALLNER, 2004). Portanto a inibição da expressão dessa proteína por *Burkholderia* sp. SMF 07 quando exposta ao fenol, pode comprometer a síntese de ATP e conseqüentemente o desempenho de vários processos biológicos ligados à vida, tais como, o crescimento, o movimento e a reprodução, que para sua execução, necessitam da energia armazenada na forma de ATP. Além disso, pode ocorrer o comprometimento da estrutura das proteínas bacterianas prejudicando o desempenho de suas funções.

Dois *spots* foram identificados como sendo proteínas envolvidas nos mecanismos de resposta ao estresse. O *spot* 10 (ID: 530) foi identificado como sendo possivelmente o Unfoldase HslU (Tabela 7) um complexo proteolítico dependente de adenosina trifosfato (ATP) que realiza a degradação e a remoção de proteínas danificadas irreversivelmente do ambiente celular bacteriano (GOTTESMAN, 1999). Segundo Botton (2007) a remoção destas proteínas não-funcionais é fundamental para um funcionamento celular adequado. Já a proteína *grpE* (*spot* 51 - ID: 2481), também conhecida como cofator da chaperona Hsp70, participa ativamente na resposta ao estresse hiperosmótico e por choque térmico, prevenindo a agregação de proteínas desnaturadas (Tabela 7). Dessa forma, a inibição da expressão de Unfoldase HslU e da proteína *grpE* por *Burkholderia* sp. SMF 07 quando exposta ao fenol,

pode possivelmente, alterar a eficiência do funcionamento dessas células na condição estudada.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem as seguintes conclusões:

- A cepa bacteriana *Burkholderia* sp. SMF 07 apresentou capacidade de tolerar o fenol nas concentrações testadas quando cultivada em meio nutritivo, porém não apresentou capacidade de utilizar o fenol como única fonte de carbono, uma vez que esta cepa não foi capaz de se desenvolver em meio de cultivo contendo como única fonte carbono, o fenol.
- O fenol pode influenciar na expressão protéica de *Burkholderia* sp. SMF 07, uma vez que a análise proteômica revelou proteínas que apresentaram expressão aumentada na presença do fenol, entre essas a 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolase (enzima envolvida na via meta de degradação do fenol); proteínas que tiveram sua expressão reduzida na presença do fenol, estando estas envolvidas principalmente nos mecanismos de manutenção da estrutura da membrana plasmática ou da parede celular; e, proteínas que apresentaram expressão inibida na presença do fenol, entre essas, aquelas envolvidas no metabolismo energético e na manutenção da estrutura bacteriana.



## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, I. M.G.; BERIAM, L. O.S.; SANNAZZARO, A. M.; RODRIGUES NETO, J. Mancha bacteriana em *Ruscus* sp. causada por *Burkholderia andropogonis* no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p. 339-342, 2009.
- ATLAS R.M.; BARTHA R. **Microbial Ecology: Fundamentals and Applications**, 4 ed. CA, USA. Redwood, Benjamin Cumins, 1998.
- ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological Profile for Phenol** (2008). Disponível em: <  
<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=148&tid=27>> . Acesso em: 23 setembro 2012.
- AVANZI, I. R.; GRACIOSO, L. H.; PERPETUO, E. A. Isolamento e identificação de bactéria degradadora de fenol da Zona Industrial de Cubatão-SP, através da técnica de amplificação do 16s. **Revista Ceciliana**, v. 1, p. 66-70, 2009.
- 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.
- BASHA, K. M.; RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V. Recent advances in the Biodegradation of Phenol: A review. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, v. 1, p. 219-234, 2010.
- BEGLEY, T.P.; KINSLAND, C.; STRAUSS, E. The biosynthesis of coenzyme A in bacteria. **Vitamins & Hormones**, v. 61, p.157-171, 2001.
- BENTINGER, M.; TEKLE, M.; DALLNER, G. Coenzyme Q – Biosynthesis and functions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.396, p. 74–79, 2010.
- BEZERRA, M. S. **Levantamento e Avaliação de critérios para ampliação de escala da produção de biossurfactantes utilizando melão como substrato**. 2006. 101f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Rn.
- BOHÁČOVÁ, V.; GODOCIKOVA, J.; POLEK, B. Biodegradation of phenol substances by pure and mixed culture. **Biology**, v.56, p.263-269, 2001.
- BONSHTIEN, A. L.; PARNAS, A.; SHARKIA, R.; NIV, A.; MIZRAHI, I.; AZEM, A.; WEISS, C. Differential effects of co-chaperonin homologs on cpn60 oligomers. **Cell Stress and Chaperones**, v.14, p. 509–519, 2009.
- BOTTON, L. M. P. G. **Estudos estruturais de proteínas de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* por Ressonância Magnética Nuclear**. 2007. 298f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Sp.

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

BRASIL, Lei Nº 6.938, de 31 de agosto de 1981. Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, 2 set. 1981. Disponível em: <<http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/leis/1981/lei%206.938%20-%201981.xml>>. Acesso em: 05 dez. 2012.

BROWN, A. M.; HOOPEES, S. L.; WHITE, R. H.; SARISKY, C. A. Purine biosynthesis in archaea: variations on a theme. **Biology Direct**, v. 6; p.1-21, 2011.

BRITO, D. **Avaliação do Potencial de Biodegradação de Gasolina por bactérias do gênero *Burkholderia***. 2012. 67f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará (UFC), Sobral, Ce.

BURKHOLDER, W. H. Three bacterial plant pathogens. *Phytophthora caryophyllis* sp.n., *Phytophthora alliiicola* sp.n. and *Phytophthora manihotis* (Artaud, Berthet and Bondar) Viegas. **Phytopathology**, v.32, p. 141–149, 1942.

BURKHOLDER, W. H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**, v.40, p. 115-117, 1950.

CABALLERO-MELLADO, J.; ONOFRE-LEMUS, J.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; AGUILAR, L. M. The Tomato Rhizosphere, an Environment Rich in Nitrogen-Fixing *Burkholderia* Species with Capabilities of Interest for Agriculture and Bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 5308–5319, 2007.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**. v. 25, n. 9, p. 1327-33, 2004.

CALDAS, T. D.; YAAGOUBI, A. E.; RICCHARME, G. Chaperone Properties of Bacterial Elongation Factor EF-Tu. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 273, n. 19, p.11478–11482, 1998.

CAPLAN A. J. What is a co-chaperone?. **Cell Stress Chaperones**, n.8, v. 2, p. 105-107, 2003.

CERNIGLIA, C.E. **Microbial transformations of aromatic hydrocarbons**. In: Atlas, R.M. Petroleum Microbiology: 1 ed., New York, Macmillan, 1984.

CERQUEIRA, V. S.; HOLLENBACH, E. B.; MABONI, F.; CAMARGO, F. A. O.; PERALBA, M. C. R.; BENTO, F. M. Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1203–1222, 2012.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Águas superficiais: Variáveis de qualidade das águas.** Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguas-superficiais/34-variaveis-de-qualidade-das-aguas---old#fenois>>. Acesso em: 18 set. 2012.

CHEN, W.M.; FARIA, S. M.; CHOU, J. H.; JAMES, E. K.; ELLIOTT, G. N.; SPRENT, J. I.; BONTEMPS, C.; J. YOUNG, P. W.; VANDAMME, P. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 2174–2179, 2008.

CHEN, Y.; SIEWERS, V.; NIELSEN, J. Profiling of Cytosolic and Peroxisomal Acetyl-CoA Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS ONE**, v.7, p.1-9, 2012.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **International Microbiology**, v.3, p. 3–8, 2000.

COENYE, T.; MAHENTHIRALINGAM, E.; HENRY, D., LIPUMA, J. J.; LAEVENS S.; GILLIS, M.; SPEERT, D. P.; VANDAMME, P. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p.1481–1490, 2001.

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

COUTINHO, B. C.; MIRANDA, G. B.; SAMPAIO, G. R.; SOUZA, L. B. S.; SANTANA, W. J. ; COUTINHO, H. D. M. A. Importância e as vantagens do polihidroxiturato (plástico biodegradável). **Holos**, ano 20, 2004.

CONTRERAS, L.; MOENNE, A.; GAILLARD, F.; POTIN, P.; CORREA, J. A. Proteomic analysis and identification of copper stress-regulated proteins in the marine alga *Scytosiphon gracilis* (Phaeophyceae). **Aquatic Toxicology**, v. 96, p.85–89, 2010.

DAMASCENO, E. P.; PINHEIRO, Z. B.; SAMPAIO, G. M. M. S.; RODRIGUES, K.; ARAÚJO, R. S. Tratamento biológico de efluentes de indústria petroquímica em reatores em batelada com biomassa dispersa e imobilizada com *Aspergillus niger* AN400. In: Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, 2., 2007, João Pessoa. **Anais do II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica**. João Pessoa: CEFET – PB, 2007.

DI GREGORIO S.; ZOCCA C.; SIDLER S.; TOFFANIN A.; LIZZARI D.; VALLINI G. Identification of two new sets of genes for dibenzothiophene transformation in *Burkholderia* sp. DBT1. **Biodegradation**, v.15, p.111–123, 2004.

DIAS, L. L. C.; FLOH, E. I. S.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Proteômica comparativa aplicada à cultura de tecidos de plantas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, p. 2002-2008, 2007.

DIAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. **International Microbiology**, v. 7, p.173–180, 2004.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V.O.; ALCÂNTARA, I. **Protocolo da Embrapa Agrobiologia para Produção de Inoculante para Leguminosa**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, (Embrapa-CNPAB. Documentos, 97). 6 p,1999.

DONG, X. J; HONG, Q.; HE, L.J.; JIANG, X.; LI, S.P. Characterization of phenol degrading bacterial strains isolated from natural soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 62, p. 257–262, 2008.

EPA - U.S. Environmental Protection Agency. **Toxicological Review of Phenol** (CAS No. 108-95-2) (2002).Disponível em:<<http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0088tr.pdf>>Acesso em: 17fev. 2013.

ERHAN, E., YER E., AKAY G., KESINKLER B. KESINKLER D. Phenol degradation in a fixed-bed bioreactor using micro-cellular polymer-immobilized *Pseudomonas syringae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v.79, p. 195-206, 2004.

FERREIRA, G. C.; FRANCO, R.; LLOYD, S. G.; MOURA, I.´; MOURA, J. J. G.; HUYNH, B.H. Structure and Function of Ferrochelataze. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 27, n. 2, p. 221 – 229, 1995.

FIALOVA A., BOSCHKE E., BLEY T. Rapid monitoring of the biodegradation of phenol-like compounds by the yeast *Candida maltosa* using BOD measurements. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 54, p. 69-76, 2004.

FRANCHE, C.; LINDSTRÖM K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant Soil**, v. 321.p.35–59, 2009.

FRYDMAN, J. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. **AnnualReview of Biochemistry**, v. 70, p. 603-647, 2001.

GAD, N. S.; SAAD, A. S. Effect of Environmental Pollution by Phenol on Some Physiological Parameters of *Oreochromis niloticus*. **Global Veterinaria**, v. 6, n.2, p. 312-319, 2008.

GATTÁS, E. A. L.; PERES, M. F.S. Produção de glicerol-3-fosfato desidrogenase de levedura de panificação. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.14, n.2, p. 205-209, 2003.

GAYRLARDE, C. C.; BELLINASO, M. L. MANFIO, G. P. Biorremediação. **Biocologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 34, p. 36-43, 2005.

GENG, A.; SOH, A. E. W.; LIM, C. J.; LOKE, L. C. T. Isolation and characterization of a phenol-degrading bacterium from an industrial activated sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 728–735, 2006.

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 *Burkholderiu vietnarniensis* sp. nov. for N,-Fixing Isolates from Rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 274-289, 1995.

GOTTESMAN, S. Regulation by proteolysis: developmental switches. **Current Opinion in Microbiology**, v.2, p.142-147, 1999.

GURUJEYALEKSHMI, G; OREIL, P. Isolation of phenol degrading *Bacillus stearothermophilus* and partial characterization of the phenol hydroxylase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 500-502, 1988.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. **Blood**, v. 92, n. 9, 3006-3018, 1998.

HARAYAMA, S.; KOK, M.; NEIDLE, E.L. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. **Annual Review of Microbiology**, v.46, p.565–601, 1992.

HARWOOD, C.S.; PARALES, R.E. The  $\beta$ -Ketoadipate Pathway and the Biology of Self-Identity. **Annual Review of Microbiology**, v.50, p.553-590, 1996.

IM, W.; BAE, H.; YOKOTA, A.; LEE, S. *Herbaspirillum chlorophenicum* sp. nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 851-855, 2004.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, n.4, p. 1192-1201, 2007.

JACQUES, R.J.S. **Biorremediação de antraceno, fenantreno e pireno em um argissolo**. 2005. 170f. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) – Programa de Pós-graduação em Ciências do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul(UFRGS). Porto Alegre – Rs.

JAME, S. A.; ALAM, A. K.M. R.; ALAM, M. K.; FAKHRUDDIN, A.N.M. Isolation and Identification of Phenol and Monochlorophenols-Degrading Bacteria: *Pseudomonas* and *Aeromonas* Species. **Bangladesh Journal of Microbiology**, v. 25, p. 41-44, 2008.

JIANG, M. H. L.; TAY, J. H.; TAY, S. T. L. Aggregation of immobilized activated sludge cells into aerobically grown microbial granules for the aerobic biodegradation of phenol. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 439-445, 2002.

JONES, A. M.; DODD, M. E.; GOVAN, J. R. W.; BARCUS, V.; DOHERTY, C. J.; MORRIS, J.; WEBB, A. K. *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: influence on survival in cystic fibrosis. **Thorax**, v.59, p. 948–951, 2004.

KILANI-FEKI, O.; CULIOLI, G.; ORTALO-MAGNE, A.; ZOUARI, N.; BLACHE, Y.; JAOUA, S. Environmental *Burkholderia cepacia* Strain Cs5 Acting by Two Analogous Alkyl-Quinolones and a Didecyl-Phthalate Against a Broad Spectrum of Phytopathogens Fungi. **Current Microbiology**, v.62, p.1490–1495, 2011.

KIM, S. I.; CHOI, J. S.; KAHNG, H. Y. A Proteomics Strategy for the Analysis of Bacterial Biodegradation Pathways. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 11, n. 3, p. 280-294, 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p. 680-685, 1970.

LAINE M.; JORGENSEN K. Straw compost and bioremediated soil as inocula for the bioremediation of chlorophenol contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n.5, p.1507-1515, 1996.

LEITE, L. C.; PEREIRA, C. D. S.; VICENTE, S. J. V.; CORTEZ, F. S.; PUSCEDDU, F. H. Avaliação Ecotoxicológica de Compostos Fenólicos em Ambientes Marinhos. **UNISANTA BioScience**, v. 1, n. 2, p.76 – 81, 2012.

LESSIE, G.L.; HENDRICKSON, W.; MANNING, B.D.; DEVEREUX, R. Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 144, p. 117–128, 1996.

LI, Y.; LI, J; WANG, C; WANG, P. F. Growth kinetics and phenol biodegradation of psychrotrophic *Pseudomonas putida* LY1. **Bioresource Technology**, v.101, p. 6740-6744, 2010.

LIRA, S. A. **Análise de correlação: abordagem teórica e de construção dos coeficientes com aplicações**. 2004. 209f. Dissertação (Mestrado). Curso de Pós-Graduação em Métodos Numéricos em Engenharia dos Setores de Ciências Exatas e de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Pr.

MAGDELDIN, S.; ZHANG, Y.; XU, B.; YOSHIDA, Y.; YAMAMOTO, T. **Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis - A Practical Perspective, Gel Electrophoresis - Principles and Basics**, 2012. Ed. Dr. Sameh Magdeldin, ISBN: 978-953-51-0458-2, InTech, Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics/two-dimensional-polyacrylamide-gel-electrophoresis-a-practical-perspective>>. Acesso em: 5 fev. 2013.

MANDRI, T.; LIN, J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n.1, p. 23-27, 2007.

MARIANO, A. P. **Avaliação do Potencial de Biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com Óleo Diesel**. 2006. 162f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Geociências e Meio Ambiente (PPGGMA), – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, Sp.

MARTINS, M. G. Q. **Biodegradação de ácido 2,4-diclorofenoxiacético por *Burkholderia sp.*** 2012. 113p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará (UFC), Sobral, Ce.

MONTEIRO, A. M. G. **Degradação Biológica do Fenol com bactérias imobilizadas num suporte de poros largos**. 1998. 556f. Tese (Doutorado). Programa de Doutorado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal.

MONTI, M.; ORRÙ, S.; PAGNOZZI, D.; PUCCI, P. Functional proteomics. **Clinica Chimica Acta**, v. 357, 140–150, 2005.

MOORE, R. A.; TUANYOK, A.; WOODS, D. Survival of *Burkholderia pseudomallei* in Water. **BMC Research Notes**, v. 1, n. 11, p. 1-6, 2008.

MOUSSAVI, M. Effect of polar substituents on autoxidation of phenols. **Water Research**, v.13, p.1125–1128, 1979.

MURRAY, J. **Mathematical Biology: An Introduction**. Secaucus, N J, USA: Springer Verlag, New York, 2002.

NAIR, C. I.; JAYACHANDRAN, K.; SHASHIDHAR, S. Biodegradation of phenol. **African Journal of Biotechnology**. v. 7, p. 4951-4958, 2008.

NANDISH M. S. **Microbial degradation of phenol and pentachlorophenol**. 2005. Dissertation (Master's Degree). Department of Agricultural Microbiology - College of Agriculture - University of Agricultural Sciences, Dharwad, Karnataka.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger - principles of biochemistry**. 5. ed. New York: Worth Publishers, 2008. 1158p.

NPI - National Pollutant Inventory. **Phenol: Environmental effects** (2013). Disponível em: <<http://www.npi.gov.au/substances/phenol/environmental.html>>. Acesso em: 15 março 2013.

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

OKOH, A.I.; TREJO-HERNANDEZ, M.R. Remediation of petroleum hydrocarbon polluted systems: exploiting the bioremediation strategies. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 2520–2525, 2006.

PAISIO, C. E.; AGOSTINI, E.; GONZÁLEZ, P. S.; BERTUZZI, M. L. Lethal and teratogenic effects of phenol on *Bufo arenarum* embryos. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, p. 64–68, 2009.

PALZKILL, T. **Proteomics**, Kluwer Academic, Boston. 2002.

PARK, K.H.; LEE, O.M.; JUNG, H.I.; JEONG, J.H.; JEON, Y. D.; HWANG, D.Y.; LEE, C.Y.; SON, H. J. Rapid solubilization of insoluble phosphate by a novel environmental stress-tolerant *Burkholderia vietnamiensis* M6 isolated from ginseng rhizospheric soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 947–955, 2010.

PASSOS, C. T.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. isolada de um solo contaminado do sul do Brasil. **Química Nova**, v. 32, p. 950-954, 2009.

PAYNE, G.W.; RAMETTEZ, A.; ROSE, H.L.; WEIGHTMAN, A.J.; JONES, T.H.; TIEDJE, J.M.; MAHENTHIRALINGAM, E. Application of a recA gene-based identification approach to the maize rhizosphere reveals novel diversity in *Burkholderia* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 259, p.126-132, 2006.

PERRON, N.; WELANDER, U. Degradation of phenol and cresols at low temperatures using a suspended-carrier biofilm process. **Chemosphere**, v.55, p. 45-50, 2004

POWLOWSKI, J.; SHINGLER, V. Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF 600. **Biodegradation**, v.5, p. 219–236, 1994.

PRASAD, M.; GARG, A; MAHESHWARI, R. Decontamination of Polluted Water Employing Bioremediation Processes: A Review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 1, n. 3, p. 11-21, 2012.

PRASAD, S.; ELLIS, E. *In vivo* characterization of catechol ring cleavage in cell cultures of *Glycine max*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 187–190, 1978.

PRPICH, G. P.; DAUGULIS, A. J. Enhanced biodegradation of phenol by a microbial consortium in a solid–liquid two phase partitioning bioreactor. **Biodegradation**, v. 16, p.329–339, 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**, v. 6, p. 207-218, 2006.

RIGO, M.; COUTINHO, M. R.; ALVAREZ, D. C.; BEZERRA, J. R. M.V.; BRANCO, I. G.; ALEGRE, R. M. Biodegradação de Fenol por *Candida parapsilopsis* em Reator Contínuo (CSTR) Pressurizado. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 8, p. 153-162, 2006.

RIZZO, A.C.L.; LEITE, S.G.F.; SORIANO, A.U.; SANTOS, R. L. C.; SOBRAL, L. G. S. **Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores. Série tecnologia Ambiental. STA-37, CETEM/MCT, 2006.**

ROMA-RODRIGUES, C.; SANTOS, P. M.; BENNDORF, D.; RAPP, E.; SÁ-CORREIA, I. Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to phenol at the level of membrane proteome. **Journal of Proteomics**, v. 73, p. 1461 – 1478, 2010.

SAA, L.; JAUREGIBEITIA, A.; LARGO, E.; LLAMA, M. J.; SERRA J. L. Cloning, purification and characterization of two components of phenol hydroxylase from *Rhodococcus erythropolis* UPV-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.86, p. 201–211, 2010.

SANDHU, A.; HALVERSON, L. J.; BEATTIE, G. A. Identification and Genetic Characterization of Phenol-Degrading Bacteria from Leaf Microbial Communities. **Microbial Ecology**, v. 57, p. 276–285, 2009.

SANTOS, V.; LINARDI, V. Biodegradation of phenol by filamentous fungi isolated from industrial effluents – identification and degradation potential. **Process Biochemistry**, v.39, p. 1001-1006, 2004.

SANTOS, E. R. **Caracterização química, microbiológica e toxicidade do lodo de esgoto da estação mangueira, Pernambuco, Brasil.** 2009. 68f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Recife, Pe.



SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C, SÁ-CORREIA, I. A análise Proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a estresse químico em microrganismos. **Boletim de Biotecnologia**, v.77, p.7–17. 2004.

SANTOS, P.M.; BENNDORF, D.; SÁ-CORREIA, I. Insights into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol-induced stress by quantitative proteomics. **Proteomics**, v.4, p. 2640–2652, 2004.

SATHISHKUMAR, M.; BINUPRIYA, A. R.; BAIK, S. H.; YUN, S. E. Biodegradation of Crude Oil by Individual Bacterial Strains and a Mixed Bacterial Consortium Isolated from Hydrocarbon Contaminated Areas. **Clean**, v. 36, p. 92 – 96, 2008.

SCHEURWATER, E. M.; BURROWS, L. L. Maintaining network security: how macromolecular structures cross the peptidoglycan layer. **FEMS Microbiology Letters**, v.318, p.1–9, 2011.

SCHULTZ, D. P.; SCHULTZ, S. E. **História da psicologia moderna**. 16. ed. São Paulo: Cultrix, 1992. 439 p.

SENGUPTA, N.; ALAM, S. I.; KUMAR, B.; KUMAR, R. B.; GAUTAM, V.; KUMAR, S.; SINGH, L. Comparative Proteomic Analysis of Extracellular Proteins of *Clostridium perfringens* Type A and Type C Strains. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 9, p. 3957–3968, 2010.

SILVA, C.L.S.P. Eletroforese bidimensional: Princípios e Aplicações. **Ciências Agrárias e da Saúde - FEA**, v. 2, n. 1, p 74 - 78, 2002.

SILVA, M. A.; MELO e SOUZA, R.; SOUZA, R. R. Biodegradação de Resíduos Agrícolas como alternativa á redução de Riscos Ambientais no Semi-Árido Sergipano. *In*: Encontro da Associação Nacional de Pós-Graduação e Pesquisa em Meio Ambiente e Sociedade, 2., 2004, Indaiatuba. **Anais do II Encontro da Associação Nacional de Pós-Graduação e Pesquisa em Meio Ambiente e Sociedade**. Indaiatuba: ANPPS, 2004. Disponível em: <[http://www.anppas.org.br/encontro\\_anual/encontro2/](http://www.anppas.org.br/encontro_anual/encontro2/)>. Acesso em: 01 out. 2012.

SOARES, M. A. A. **Caracterização das alterações proteômicas de *Burkholderia* sp. Em resposta ao fenol**. 2013. 99p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará (UFC), Sobral, Ce.

SOUSA, M. V.; FONTES, W.; RICART, C. A. O. Análise de Proteomas. **Revista Biotecnologia**, n. 7, p. 12-14, 1999.

SRIVASTAVA, V.C.; SWAMY, M.M.; MALL, I.D.; PRASAD, B.; MISHRA, I.M. Adsorptive removal of phenol by bagasse fly ash and activated carbon: Equilibrium, kinetics and thermodynamics. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.272, p.89 – 104, 2005.

STANIER, R. Y.; ORNSTON, L.N. The  $\beta$ -Ketoadipate Pathway. **Advances in Microbial Physiology**, v.9, p.89-151, 1973.

- STRONG, P.J.; BURGESS, J.E. Treatment methods for wine-related ad distillery wastewaters: a review. **Bioremediation Journal**, v.12, p. 70-87, 2008.
- SUENAGA, H.; KOYAMA, Y.; MIYAKOSHI, M.; MIYAZAKI, R.; YANO, H.; SOTA, M.; OHTSUBO, Y.; TSUDA, M.; MIYAZAKI, K. Novel organization of aromatic degradation pathway genes in a microbial community as revealed by metagenomic analysis. **The ISME Journal**, v.3, p.1335–1348, 2009.
- THAPA, B.; KC, A. K.; GHIMIRE, A. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. **Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology**, v. 8, n. 1, p. 164-170, 2012.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R. CASE, C.L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.894p.
- TRAUT, T. W. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 140, p.1-22, 1994.
- TSIROGIANNI, E.; AIVALIOTIS, M.; PAPASOTIRIOU, D. G.; KARAS, M.; TSOTIS, G. Identification of inducible protein complexes in the phenol degrader *Pseudomonas* sp. strain phDV1 by blue native gel electrophoresis and mass spectrometry. **Amino Acids**, v.30, p. 63–72, 2006.
- TURUNENA, M.; OLSSON, J.; DALLNER, G. Metabolism and function of coenzyme Q. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1660, p.171– 199, 2004.
- VANDAMME, P.; MAHENTHIRALINGAM, E.; HOLMES, B.; COENYE, T.; HOSTE, B.; VOS, P.; HENRY, D.; SPEERT, D. P. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* Genomovar IV). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1042–1047, 2000.
- VANDAMME, P.; MAHENTHIRALINGAM, E. Strains from the *Burkholderia cepacia* Complex: Relationship to Opportunistic Pathogens. **Journal of Nematology**, v. 35, p. 208–211, 2003.
- VANDAMME, P.; HENRY, D.; COENYE, T.; NZULA, S.; VANCANNEYT, M.; LIPUMA, J. J.; SPEERT, D. P.; GOVAN, J. R.W.; MAHENTHIRALINGAM, E. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 33, p.143-149, 2002.
- VANDAMME, P.; HOLMES, B.; COENYE, T.; GORIS, J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; LIPUMA, J.J.; GOVAN, J.R. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.– a new twist to an old story. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 91–96, 2003.
- VANDAMME, P.; HOLMES, B.; VANCANNEYT, M.; COENYE, T.; HOSTE, B.; COOPMAN, R.; REVETS, H.; LAUWERS, S.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; GOVAN, J. R. W. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 1188-1200, 1997.

VANLAERE, E.; BALDWIN, A.; GEVERS, D.; HENRY, D.; BRANDT, E.; LIPUMA, J. J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; SPEERT, D. P.; DOWSON, C.; VANDAMME, P. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 102–111, 2009.

VANLAERE, E.; VAN DER MEER, J. R.; FALSEN, E.; SALLES, J. F.; BRANDT, E.; VANDAMME, P. *Burkholderia sartisoli* sp. nov., isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 420–423, 2008.

VERMIS, K.; COENYE, T.; LIPUMA, J. J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; NELIS, H. J.; VANDAMME, P. Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar VI as *Burkholderia dolosa* sp. Nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 689–691, 2004.

VIAL, L.; CHAPALAIN A.; GROLEAU M. C.; DÉZIEL E. The various lifestyles of the *Burkholderia cepacia* complex species: a tribute to adaptation. **Environmental Microbiology**, v. 13, p. 1–12, 2011.

VIAL, L.; GROLEAU, M.C.; DEKIMPE, V. DEZIEL, E. *Burkholderia* diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p.1407-1429, 2007.

WANG, P.; QU, Y.; ZHOU, J. Biodegradation of mixed phenolic compounds under high salt conditions and salinity fluctuations by *Arthrobacter* sp. W1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 159, p. 623–633, 2009.

WEBER, K.; OSBORN, M. The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n.16, p. 4406-4412, 1969.

WENZEL, J. B.; WENZEL, P.C.S.; LOPES-SHIKIDA, S.A.R.; SOARES, I.A. **Isolamento e caracterização do fungo filamentosso isolado de peças anatômicas conservados em formol**. 2006. Monografia. (Especialização em Microbiologia Aplicada) - Universidade Paranaense, Toledo, 2006.

WHITE, N. J. Melioidosis. **The Lancet**, v. 361, 1715–1722, 2003.

WILKINS, M.R.; PASQUALI, C.; APPEL, R.D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J.C.; YAN, J.X.; GOOLEY, A.A.; HUGHES, G.; HUMPHERY-SMITH, I.; WILLIAMS, K.L.; HOCHSTRASSER, D. F. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology**, v.14, p.61–65, 1996.

WILLIAMS, R. J.; EVANS, W.C. The metabolism of benzoate by *Moraxella* sp. through anaerobic nitrate respiration. **Biochemical Journal**, v. 148, p.1-10, 1975.

WONG-VILLARREAL, A.; CABALLERO-MELLADO, J. Rapid identification of nitrogen-fixing and legume-nodulating *Burkholderia* species based on PCR 16S rRNA species-specific oligonucleotides. **Systematic and Applied Microbiology**, v.33, p. 35–43, 2010.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen.nov.and transfer of 7 species of the genus *Pseudomonas* homology group-II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v. 36, p. 1251–1275, 1992.

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

YIN, C.; TENG, Y.; LUO, Y.; CHRISTIE, P. Proteomic response of wheat embryos to fosthiazate stress in a protected vegetable soil. **Journal of Environmental Sciences**, v.10, n.24, p.1843–1853, 2012.

ZHANG, H.; HANADA, S.; SHIGEMATSU, T.; SHIBUYA, K.; KAMAGATA, Y.; KANAGAWA, T.; KURANE, R. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p.743-749, 2000.

ZHU, X.; TIAN, J.; CHEN, L. Phenol degradation by isolated bacterial strains: kinetics study and application in coking wastewater treatment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v.87, p.123–129, 2012.

ZÍDKOVÁ, L.; SZOKÖL, J.; RUCKÁ, L.; PÁTEK, M.; NESVERA, J. Biodegradation of phenol using recombinant plasmid-carrying *Rhodococcus erythropolis* strains. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.05.017>.