

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Mariana da Silva de Lima

**ANÁLISE PROTEÔMICA, POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO E FORMAÇÃO DE
BIOFILME DE *Burkholderia* SMF090 SOB TRATAMENTO COM GASOLINA
COMERCIAL**

Sobral
2013

MARIANA DA SILVA DE LIMA

**ANÁLISE PROTEÔMICA, POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO E FORMAÇÃO DE
BIOFILME DE *Burkholderia* SMF090 SOB TRATAMENTO COM GASOLINA
COMERCIAL**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia.
Área de concentração: Biotecnologia**

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha

Sobral

2013

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

L699e Lima, Mariana da Silva de.

Análise proteômica, potencial de biodegradação e formação de biofilme de *Burkholderia* SMF090 sob tratamento com gasolina comercial. / Mariana da Silva de Lima. – 2013.
66 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. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha.

1. Biotecnologia 2. *Burkholderia*. 3. Biodegradação ambiental. I. Título.

CDD 660.6

MARIANA DA SILVA DE LIMA

**ANÁLISE PROTEÔMICA, POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO E FORMAÇÃO DE
BIOFILME DE *Burkholderia* SMF090 SOB TRATAMENTO COM GASOLINA
COMERCIAL**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia.
Área de concentração: Biotecnologia**

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha

Aprovada em ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha (Orientador)
Universidade Estadual Vale do Acaraú- UVA**

**Profa. Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle
Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA**

**Prof. Dr. João Garcia Alves Filho
Professor do Instituto Superior de Teologia Aplicada- INTA**

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos se direcionam não apenas aos que contribuíram para conclusão deste trabalho, mas também àqueles que colaboraram para meu amadurecimento e formação ao longo do Mestrado em Biotecnologia – UFC Campus Sobral:

Àquele que transcende as barreiras da ciência e do conhecimento humano, por me dar coragem, paciência e a oportunidade de conviver com tantos amigos leais e profissionais competentes;

Aos meus pais Maria Lúcia e Luís Carlos, por serem exemplos de determinação e de caráter, e por me darem o apoio mais que necessário em todas as etapas da minha vida;

Aos meus irmãos Alan, Alexandra e Tatiana, pois cada um, à sua maneira, me estimula a seguir em frente;

Ao meu companheiro Patrick Hervé Rubaud, pela apoio, carinho, amizade e compreensão ao longo deste trabalho, bem como pela assistência técnica em informática, essencial nas etapas finais da pesquisa;

Ao Professor Dr. Rodrigo Maranguape da Silva Cunha, pela confiança, paciência e por se mostrar sempre um exemplo a ser seguido como profissional e como ser humano;

Aos meus leais colaboradores, mais do que isso, cúmplices, Aurilene Gomes Cajado e Jedson Vaz de Sousa, pela dedicação e competência técnica, pelos ensinamentos na área acadêmica e fora dela;

À Mônica Valéria e Bruno Bezerra, por se mostrarem sempre prontos a ajudar nos momentos necessários;

Ao amigo Prof. Dr. João Garcia Alves Filho, pela disponibilidade nos assuntos acadêmicos, pelas nossas discussões filosóficas e por seu generoso companheirismo;

Ao laboratório de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, campus Sobral, pelo material generosamente concedido pelo prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto;

À Denyse Cruz, do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Medicina Universidade Federal do Ceará, campus Sobral, pela ajuda e pela torcida;

Ao laboratório de Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Campus Sobral, pela ajuda indispensável nas análises de formação de biofilme;

À Rafaela Bastos do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Medicina da

Universidade Federal do Ceará, por toda ajuda dada nos experimentos de formação de biofilme;

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

À NayaneHardy, por seu profissionalismo e sua dedicação nas análises proteômicas;

À Amélia Araújo, pelos conselhos na área da biorremediação;

Ao Antônio Francisco de Souza, pelos ensinamentos iniciais no laboratório de biologia molecular;

Ao Daniel de Brito, pelo pionerismo com os testes com meio mínimo BH, e por compartilhar todo o conhecimento adquirido nessa área conosco;

À todos os amigos do Laboratório de Genética Molecular, Auxiliadora, Vitória Flávia, Raulzito, Dauana, Marcos, Tatiana Farias e todos os demais;

À Carina Brunehilde, por sua amizade constante e pelos seus ensinamentos de alegria;

Às companheiras Alessandra Fernandes e Ana Lívia Abreu por todo o apoio dado;

Ao Francisco José Moreira, coordenador do eixo de recursos naturais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, pela imprescindível colaboração ao longo destes dois anos;

Aos meus colegas da turma do Mestrado em Biotecnologia, semestre 2011.1, saibam que cada um de vocês, à sua maneira, me ensinou muita coisa;

À Universidade Federal do Ceará, por tornar viável o desenvolvimento em Ciência e Tecnologia na região Norte do Ceará.

À todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com este trabalho.

“Na falta de condições materiais,
utilize aquele artefato em cima do seu pescoço.”

(Linus Pauling, 1954)

RESUMO

Os compostos pertencentes ao grupo caracterizado como BTEX (sigla para designar Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno) são largamente utilizados na indústria como matéria prima para diversos produtos como herbicidas, tintas, gasolina, corantes, borracha, dentre outras substâncias, que podem ser praticamente inertes ou potencialmente poluidoras. A utilização da atividade microbiana, como alternativa aos tratamentos convencionais de despoluição destas substâncias, tem sido bastante estudada como forma de remoção destes compostos, visto que é um processo viável e que muitas vezes deixa pouco ou nenhum resíduo secundário. Este trabalho teve como objetivo analisar a capacidade de biodegradação, por meio de curvas de crescimento, do perfil proteômico e do potencial de formação de biofilme de *Burkholderia* SMF090 submetida ao crescimento em meio mínimo BH suplementado com gasolina comercial. Curvas de crescimento foram feitas em meio BH suplementados com 2000 ppm do poluente. A análise proteômica foi feita a partir de crescimentos em meio BH suplementados com 2000 ppm de gasolina comercial. As proteínas bacterianas do referido crescimento foram extraídas a fim de realizar a eletroforese bidimensional. Foram analisadas as proteínas diferencialmente expressas entre tratamento e controle (crescimento apenas em meio BH), análise da tendência de pI e massa molecular das proteínas obtidas, e identificação das mesmas a partir do Expert Protein Analysis System (ExPASy). As curvas de crescimento mostraram que, à medida em que a bactéria é submetida ao poluente, seu crescimento é mais rápido, sugerindo uma adaptação ao poluente pela célula bacteriana. As proteínas encontradas na análise proteômica são principalmente proteínas relacionadas à síntese protéica e ao metabolismo energético bacteriano. Nos géis bidimensionais foram encontrados também proteínas pertencentes à via de degradação de compostos BTEX, presentes na gasolina. As análises prévias do potencial de formação de biofilme demonstraram alta capacidade da célula de formar esta estrutura, inclusive não havendo diferenças na formação de biofilme em presença e ausência de gasolina comercial. Os resultados sugerem que *Burkholderia* SMF 090 tem alto potencial de biodegradação dos compostos BTEX presentes na gasolina, podendo futuramente ser estudada como possível alternativa biotecnológica para fins de biorremediação.

Palavras-chave: *Burkholderia*, Biorremediação, Análise proteômica

RESUMÉ

Les composés appartenant au groupe caractérisé comme BTEX (Sigle pour désigné Benzène, Toluène, Ethylbenzène, et xylène) sont largement utilisés dans l'industrie comme matière première pour divers produits, comme herbicides, peintures, colorants, caoutchouc, et dans d'autres substances qui peuvent être pratiquement inertes ou potentiellement polluantes. L'utilisation de l'activité microbienne comme alternative aux traitements conventionnels de dépollution de ces substances, a été très étudiée comme une forme d'enlèvement de ses composés, vu que c'est un processus viable et que très souvent ne laisse que peu, ou pas, de résidu secondaire. Ce travail a eu comme objectif d'analyser la capacité de biodégradation, par le biais de courbes de croissance, du profil protéomique et du potentiel de formation de biofilm *Burkholderia* SMF090, soumis à la croissance en milieu minimum BH complété avec de l'essence commerciale. Des courbes de croissance ont été faites en milieu BH complété avec 2000 ppm d'essence. L'analyse protéomique a été faite à partir de croissances en milieu BH complété avec 2000 ppm d'essence commerciale. Il a été réalisé une extraction des protéines bactériennes de la dite croissance, et électrophorèse bidimensionnelle. Ont été analysées les protéines différenciellement produites entre traitement et contrôle (Croissance seulement en milieu BH), analyse de la tendance de pI et masse moléculaire des protéines obtenues, et identification de celle-ci à partir de la base de données ExPASy. Les courbes de croissance montrent que, au fur et à mesure que la bactérie est soumise au polluant, sa croissance est plus rapide, suggérant une adaptation au polluant par la cellule bactérienne. Les protéines rencontrées dans l'analyse protéomique, sont principalement des protéines relationnées à la synthèse protéique, et au métabolisme énergétique bactérien. Dans les gels bidimensionnels, ont été rencontrés aussi des protéines appartenant à la voie de dégradation de composés BTEX, présents dans l'essence. Les premières analyses du potentiel de formation de biofilm, ont montré la haute capacité de la cellule à former cette structure, y compris sans avoir de différences dans la formation du biofilm, entre en présence et absence d'essence commerciale. Les résultats suggèrent que *Burkholderia* SMF 090 a un haut potentiel de biodégradation des composés BTEX présents dans l'essence, pouvant dans le futur être étudié comme possible alternative biotechnologique à des fins bioremédiation.

Mots clef: *Burkholderia*, Bioremédiation, Analyse protéomique

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------|---|
| 2D | Eletroforese Bidimensional |
| BH | Meio Bushnell Haas |
| BTEX | Benzeno, tolueno, etilbenzeno e os três xileno |
| CHAPS | Ciclohexilaminodimetilamônio propano sulfonato |
| D. O. | Densidade Óptica |
| IEF | Focalização Isoelétrica |
| IPG | Gradiente de pH Imobilizado |
| IUPAC | União Internacional de Química Pura e Aplicada |
| kDa | KiloDalton |
| LMW | Marcador de Baixo Peso Molecular |
| mM | miliMolar |
| NCBI | Centro Nacional para Informação Biotecnológica |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| PI | Ponto Isoelétrico |
| ppm | Parte por Milhão |
| SDS | Dodecil sulfato de Sódio |
| SDS-PAGE | Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de Dodecil Sulfato de Sódio |
| TE | Tampão Tris-EDTA |
| TY | Triptona-Yeast |
| PHB | Polihidroxibutirato |
| RPM | Rotação por minuto |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Árvore filogenética não enraizada baseada em sequências de DNAr 16S de α -, β - e γ -proteobactérias. Os gêneros em negrito são pertencentes ao grupo *Rhizobium*.....20
- Figura 2 Árvore filogenética com a classificação das espécies de *Burkholderia* mais representativas baseadas em 16S rDNA.23
- Figura 3 Percentual de compostos BTEX na gasolina comercial.26
- Figura 4 Estrutura química das moléculas compostos BTEX. A presença do anel aromático é uma das características marcantes destes compostos. (a) Benzeno, (b) Tolueno, (c) Etilbenzeno, (d) *orto*-xileno, (e) *meta*-xileno, (f) *para*-xileno.28
- Figura 5 Reação da quebra do catecol via *meta*. A reação química ocorre com o auxílio da enzima catecol-2,3-dioxigenase, resultando na formação de Acetaldeído e piruvato.29
- Figura 6 Reação da quebra do catecol via *orto*. A reação química ocorre com o auxílio da enzima catecol-1,2-dioxigenase, resultando na formação de Acetil-CoA e Succinato.29
- Figura 7 Gráfico da curva de crescimento de *Burkholderia*SMF090, não adaptadas, em meio BH suplementado com gasolina comercial. (□) Crescimento com glicose a 1M, (●) Crescimento com gasolina comercial (2000 ppm), . Análise estatística feita no Statística 6 Workbook. Teste *t-Student*. (*) Diferenças estatísticas Gasolina-BH, (+) Diferenças Glicose-Gasolina, onde $p < 0,05$37
- Figura 8 Gráfico da curva de crescimento de *Burkholderia*SMF090 em meio BH, com bactérias adaptadas, suplementado com gasolina comercial. (●) Crescimento com gasolina comercial (2000 ppm), (□) Controle . Análise estatística feita no Statística 6 Workbook . Teste *T- Student*. (*) Médias estatisticamente diferentes. Leitura da O.D. em espectrofotômetro em $\lambda = 600$ nm. Tempo em horas. As setas mostram os pontos da curva onde foram analisadas alíquotas dos crescimentos após centrifugação.....38
- Figura 9 Gráfico da segunda curva de crescimento de *Burkholderia* SMF090, com bactérias adaptadas, em meio BH suplementado com gasolina comercial.(●) Crescimento com gasolina comercial (2000 ppm), (□) Controle. Análise estatística feita no Statística 6 Workbook . Teste one-way Anova. (*) Diferenças estatísticas: Gasolina-demaís grupos. Gráfico da segunda curva de crescimento de *Burkholderia* SMF090, com bactérias adaptadas, em meio BH suplementado com gasolina comercial.(●) Crescimento com gasolina comercial (2000 ppm), (□) Controle. Análise estatística feita no Statística 6

- Figura 10 Foto do resultado do teste de gram após curva e crescimento realizado para os diversos testes. Imagem de microscopia ótica com um aumento de 40x.42
- Figura 11 SDS PAGE em gel de poliacrilamida 12,5%. As amostras são resultantes da extração de proteínas de *Burkholderia*SMF 090 submetidas ao crescimento em meio BH. Da esquerda para a direita: MW (marcador molecular de baixo peso), Tratamento com gasolina comercial e Controle negativo.44
- Figura 12 Gel do teste piloto feito para analisar em qual faixa de pH as proteínas mais se concentram. Os spots obtidos foram observados em uma amplitude mais ácida, mostrando a necessidade de uma tira de menor faixa de pH para experimentos posteriores.45
- Figura 13 Géis bidimensionais de referência resultantes da extração de proteínas de *Burkholderia* submetidas a diferentes condições de crescimento. (A) Grupo Controle: bactérias crescidas em meio BH sem adição de gasolina comercial. (B) Grupo Tratado: bactérias crescidas em meio BH suplementado com gasolina comercial a 2000ppm.46
- Figura 14 Correlação linear entre as duplicatas dos géis bidimensionais do controle. O gráfico mostra uma similaridade de 85% entre os spots encontrados no gel para a análise de proteínas de *Burkholderia* que foram submetidas ao crescimento em meio BH sem adição de gasolina comercial.48
- Figura 15 Correlação linear entre as duplicatas dos géis bidimensionais do tratamento. O gráfico mostra uma similaridade de 86,6% entre os spots encontrados no gel para a análise de proteínas de *Burkholderia* submetidas ao crescimento em meio BH suplementado de gasolina comercial (2000ppm).49
- Figura 16 Gráfico mostrando a tendência de ponto Isoelétrico dos spots encontrados nos géis bidimensionais resultantes da extração de proteínas de *Burkholderia* submetidas a diferentes tratamentos. A distribuição encontrada mostra que os spots se concentraram principalmente no intervalo de pI com pH mais ácido tanto no controle e principalmente no tratamento.50
- Figura 17 Gráfico mostrando a tendência de massa molecular (MW) dos spots encontrados nos géis bidimensionais resultantes da extração de proteínas de *Burkholderia* submetidas a diferentes tratamentos. A distribuição encontrada mostra que os spots se concentraram principalmente no intervalo de massa molecular que compreende 20 a 60 KDa.51

- Figura 18** Gráfico mostrando a participação das classes de proteínas identificadas exclusivamente nas bactérias que foram crescidas apenas em meio BH. Ao total foram identificadas 194 proteínas. Uma maior ocorrência de proteínas do grupo das Transferases foram encontradas, seguidas de Aminoacilt-RNAsintetase e Oxiredutase. As proteínas aparecem no gráfico com seu valor percentual.57
- Figura 19** Gráfico mostrando a participação das classes de proteínas identificadas exclusivamente nas bactérias que foram crescidas em meio BH com adição de gasolina comercial. Ao total foram identificadas 338 proteínas. Uma maior ocorrência de proteínas do grupo das Transferases foram encontradas, seguidas de Ligase e Aminoacilt-RNAsintetase. As proteínas aparecem no gráfico com seu valor percentual.58
- Figura 20** Gráfico da análise da formação de biofilme de *Burkholderia*SMF090 em placas *Elisa*, em meio TY, com adição de gasolina comercial e sem o poluente.59

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1.INTRODUÇÃO | 14 |
| 2.REVISÃO DE LITERATURA..... | 17 |
| 2.1. Classificação: As Proteobactérias e o gênero <i>Burkholderia</i> | 17 |
| 2.2. Sobre a utilização de bactérias em processos de despoluição..... | 24 |
| 2.3. Gasolina..... | 26 |
| 2.4. Vias de degradação dos compostos BTEX..... | 27 |
| 3.OBJETIVOS..... | 30 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 31 |
| 4.1. Tolerância e crescimento de SMF090 em meio Bushnell-Haas em presença de gasolina..... | 31 |
| 4.2. Crescimento de <i>Burkholderia</i> SMF090 submetida à gasolina comercial para extração de proteínas | 32 |
| 4.3. Extração de proteínas intracelulares..... | 33 |
| 4.4 Eletroforese bidimensional..... | 33 |
| 4.5 Bioinformática..... | 34 |
| 4.6 Análise de formação de biofilme..... | 34 |
| 4.6.1. Crescimento bacteriano | 34 |
| 4.6.2. Revelação do biofilme com Cristal violeta..... | 35 |
| 4.7 Análise estatística..... | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES | 36 |
| 5.1 Tolerância e crescimento de SMF090 em meio Bushnel – Haas em presença de gasolina..... | 36 |
| 5.2 Análise proteômica | 43 |
| 5.2.1 Extração de Proteínas..... | 43 |
| 5.2.2 Análise dos géis bidimensionais..... | 44 |
| 5.2.3. Reprodutibilidade dos géis..... | 47 |
| 5.2.4.Tendência de pI e Massa Molecular das proteínas identificadas..... | 49 |
| 5.2.5. Identificação das proteínas diferencialmente expressas..... | 51 |
| 5.2.6. Análise quali-quantitativa das classes de proteínas..... | 57 |
| 5.3. Formação de biofilme de <i>Burkholderia</i> SMF090..... | 59 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 61 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 62 |

1. INTRODUÇÃO

Dentre os compostos orgânicos conhecidos, os benzenos e os alquibenzenos são hidrocarbonetos aromáticos constituídos de apenas um anel aromático. Pertencentes a estes hidrocarbonetos monoaromáticos, existe uma classe peculiar de compostos denominada BTEX (sigla para designar Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno).

Os compostos pertencentes ao grupo caracterizado como BTEX são largamente utilizados na indústria como matéria prima para diversos produtos como herbicidas, tintas, gasolina, corantes, borracha, dentre outras substâncias que podem ser praticamente inertes ou potencialmente poluidoras (TRIGUEIROS, 2008).

Estes compostos são conhecidos por serem prejudiciais à saúde humana, podendo causar sérios prejuízos ao sistema nervoso central, sistema respiratório, gastrointestinal e reprodutor. Dentre os compostos mencionados, a gasolina é um dos produtos mais largamente utilizados em nosso cotidiano (SOUSA *et al.* 2011).

A gasolina é um dos mais conhecidos produtos derivados do petróleo. Esta é constituída de uma diversidade de substâncias, dentre elas os compostos BTEX, o que a torna um produto potencialmente poluidor.

O Ministério da Saúde, por meio de sua portaria nº 518/2004, estipulou concentrações mínimas, de cada um destes compostos, a serem tolerados em água para consumo direto, a saber: 5ug/L para benzeno, 170ug/L para Tolueno, 200ug/L para etilbenzeno e 300 ug/L para Xilenos. No entanto, não raro surgem casos de contaminação resultante de vazamentos destes compostos em ambientes que podem ou não estar em contato direto com a sociedade (SOUSA *et al.*, 2011).

Com o desenfreado aumento de processos industriais, que resultam em substâncias com alto potencial de degradação ambiental ou com sérios riscos à saúde humana (como o referido grupo BTEX), há esforços para o desenvolvimento de processos de descontaminação e depuração de ambientes poluídos, com a finalidade de minimizar ou mesmo evitar possíveis danos. Dentre estes processos, é sabido que algumas metodologias são bastante conhecidas e utilizadas. Estas metodologias utilizam procedimentos físicos, químicos ou biológicos de descontaminação. A aplicação destes métodos de despoluição está relacionada ao seu custo e à sua eficiência. Por conta de seu custo benefício, os métodos biológicos têm sido largamente pesquisados pelo fato de serem menos onerosos e em geral mais eficientes. Os métodos biológicos de despoluição consistem na utilização de organismos (em geral micro-organismos) que são capazes de

crescer e transformar os compostos poluidores em substâncias menos reativas. Muitos destes micro-organismos crescem em ambientes poluídos, transformando as substâncias orgânicas em compostos inorgânicos que causam pouco ou nenhum tipo de dano ambiental (CAVALCA *et al.*, 2000). A utilização da atividade microbiana como alternativa aos tratamentos convencionais tem sido bastante estudada como forma de remoção destes compostos, visto que é um processo viável e que muitas vezes deixa pouco ou nenhum resíduo secundário (RESENDE, 2007).

Alguns fatores são considerados importantes para o sucesso do processo de degradação utilizando micro-organismos. A concentração do poluente no meio é de extrema relevância, pois este deve estar em quantidades suficientes a fim de permitir que o micro-organismo em questão possa utilizá-lo livremente sem que este possa ser um fator limitante para o seu crescimento. A presença de substâncias quimicamente incompatíveis com o processo catabólico de depuração do poluente deve ser levado em consideração, pois outras substâncias podem diminuir a velocidade do processo de biorremediação ou até mesmo inibi-lo.

Outro fator importante é o grau de toxicidade do poluente, pois este não pode alcançar uma toxicidade que venha a inibir o crescimento bacteriano. O grau de toxicidade está diretamente relacionado à sua concentração no meio. O que deve ser observado e conhecido é uma concentração limite com a qual se possa trabalhar, de acordo com o poluente e o organismo utilizado.

A tolerância do micro-organismo ao poluente é algo que deve ser traçado e conhecido a fim de não sobrecarregar o organismo biorremediador, inibindo assim sua capacidade de biodegradação ou diminuindo esta por conta de altas concentrações de poluente. Muitos micro-organismos são usados como organismos chaves para alguns poluentes, pelo fato de serem específicos para certas substâncias poluidoras, sendo capazes de degradar apenas determinadas substâncias ou fazê-las mais eficientemente com apenas alguns compostos. Ou seja, muitos organismos são degradadores específicos. O conhecimento desta especificidade é de extrema relevância para o sucesso da biorremediação.

Bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Burkholderia*, dentre outros gêneros estudados, são conhecidas por sua versatilidade de biodegradação em diferentes concentrações de poluentes, de diferentes substâncias poluidoras e em condições ambientais diversas (KAO; WANG, 2000; KHLEIFAT *et al.*, 2010). No entanto, a utilização destes micro-organismos como produto biotecnológico demanda conhecimento das

condições ideais em que a fisiologia destas bactérias atua, resultando em uma melhor eficiência na degradação do poluente de interesse. A depuração dos compostos BTEX em estudos de campo, por exemplo, mostram diferenças significativas na velocidade de degradação destes compostos ao longo de gradientes diferentes no solo devido a suas variações de oxigênio disponível, conteúdo de matéria orgânica, temperatura e principalmente quantidade e espécies da microbiota da área contaminada (KAO; WANG, 2000). Os parâmetros a serem utilizados para a escolha do micro-organismo como uma potencial ferramenta biotecnológica só poderão ser eficientemente definidos ao se conhecer seguramente como o organismo em questão se comporta sob condições ambientais variadas, e principalmente sua resposta molecular sob o stress de ser submetido ao poluente. Como foi acima descrito, estudos que gerem informações a respeito de qualquer interferente do processo de biodegradação são muito relevantes, pois dados que elucidem as características ecológicas, microbiológicas, fisiológicas e bioquímicas destes organismos são necessários para tornar possível o uso desta microbiota de maneira adequada.

O conhecimento das vias moleculares que participam dos processos de biorremediação é importante por uma série de razões. Primeiramente porque atualmente é sabido que há genes específicos que participam de certas vias de degradação de determinadas substâncias, o que torna possível a identificação de espécies promissoras a serem utilizadas como ferramenta biotecnológica. A partir de informações a respeito das respostas moleculares de um determinado organismo estudado, é possível determinar espécies inoculantes com alta capacidade para biodegradação e características oportunas de adaptabilidade (RESENDE, 2007). Paralelamente aos testes de biodegradação laboratoriais, atualmente são realizadas técnicas moleculares com objetivo de reconhecimento do potencial catabólico microbiano. Dentre estas técnicas, podemos citar, a análise proteômica.

A proteômica é uma técnica de análise molecular que estuda as proteínas expressas em uma célula, ou seja, o seu proteoma.

O proteoma é designado como todas as proteínas pertencentes a um determinado material biológico. Este pode sofrer alterações em resposta a estímulos externos ou até mesmo internos ao organismo (PATERSON; AEBERSOLD, 2003).

Dentre as técnicas de biologia molecular atualmente disponíveis, a análise proteômica vem se mostrando bastante eficiente quando o objetivo é testar a influência que um determinado tratamento tem em um organismo de interesse. A observação das

proteínas expressas de um organismo e sua relação com o meio circundante pode revelar um potencial biotecnológico antes desconhecido.

Diversas são as bactérias que apresentam um grande conjunto de genes que participam tanto das vias metabólicas de biodegradação como também da regulação destas vias. Estes genes são de extrema importância inclusive para a capacidade de adaptação destes micro-organismos a diferentes ambientes aeróbios e anaeróbios (BALDWIN *et al.*, 2003; MESARCH *et al.*, 2000).

A evolução da área da biorremediação com a utilização de microbiota resultante de engenharia genética, equipando bactérias solvente-tolerantes com maquinaria catabólica apropriada para depuração de poluentes específicos, é algo que há muito tempo se tornou possível graças aos avanços no conhecimento a respeito destes organismos e sua interação com os poluentes de interesse (PIEPER; REINEKE, 2000).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular e o sucesso na utilização destes micro-organismos, a tendência é que novas pesquisas sejam realizadas e novas informações na área possam surgir. O uso de bactérias biorremediadoras é bastante promissor, no entanto a instabilidade ambiental e a incerteza da eficiência de alguns inoculantes são fatores que levam a crer que mais estudos devem ser realizados para a consolidação do conhecimento gerado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação: as Proteobactérias e o gênero *Burkholderia*

Definida basicamente por análises baseadas em rRNA 16S, as bactérias do grupo das Proteobacteria são gram-negativas, podendo possuir ou não flagelos. Apesar de, presumidamente, terem surgido de um mesmo ancestral fotossintético, poucas bactérias deste grupo realizam fotossíntese, sendo seu metabolismo energético essencialmente quimio-heterotrófico (MASSON-BOIVIN *et al.*, 2009).

O grupo das Proteobactérias é dividido em subgrupos designados por letras gregas. O grupo conhecido como α -proteobactérias incluem algumas bactérias de importância agrícola, que podem realizar fixação de nitrogênio em simbiose com plantas, serem fitopatógenos ou causarem doenças em humanos. Estas bactérias incluem a maioria das bactérias que podem crescer e se desenvolver com baixos níveis de nutrientes. Este grupo apresenta importantes exemplos de micro-organismos de interesse agrícola e ambiental como as espécies do gênero *Rhizobium*, que infectam raízes de

leguminosas e conseguem aproveitar o nitrogênio atmosférico diretamente do ar fixando-o no solo, bactérias do gênero *Agrobacterium* que são importantes patógenos de plantas de interesse para a biotecnologia e as conhecidas espécies que participam ativamente do ciclo do nitrogênio: espécies do gênero *Nitrobacter* e *Nitrossomonas*. O grupo das β -proteobactérias é um grupo composto por micro-organismos que com frequência usam substâncias nutrientes que se difundem das áreas de decomposição anaeróbica de matéria orgânica, como gás hidrogênio, amônia e metano. Uma quantidade considerável de bactérias patogênicas é encontrada neste grupo como *Neisseria meningitidis*, agente causador da meningite meningocócica, *Bordetella pertussis*, bactéria que causa a coqueluche e espécies do gênero *Burkholderia*, este gênero sendo considerado inclusive um dos mais diversificados.

Outras espécies pertencentes às β -proteobactérias são importantes agentes ecológicos por participarem ativamente de processos fundamentais como os ciclos biogeoquímicos. Um exemplo é o caso das espécies de *Thiobacillus*, que oxidam o enxofre e colaboram ativamente com o ciclo do enxofre por serem capazes de obter energia por oxidação de formas reduzidas de enxofre. γ -Proteobactérias é o maior subgrupo das proteobactérias e possui espécies importantes como as do gênero *Pseudomonas*, muito comuns no solo e em diversos ambientes naturais, *Azobacter* e *Azomonas*, importantes fixadoras de nitrogênio, e micro-organismos do grupo das Enterobacteriales, grupo de extrema importância clínica que inclui espécies conhecidas como *Escherichia coli*, *Salmonella entérica* e *Enterobacter cloacae*.

Importante para o funcionamento do ciclo do enxofre, o grupo das δ -Proteobactérias é um grupo distinto por incluir algumas bactérias que são predadoras de outras bactérias. Por fim, ϵ -Proteobactérias é constituído por dois gêneros: *Campylobacter* e *Heliobacter*. Como pode ser observado, o clado das Proteobactérias é bem diversificado (TORTORA *et al.*, 2005).

O grupo de bactérias denominadas como Rizóbios são bactérias que possuem a enzima nitrogenase, a qual é responsável pela fixação de nitrogênio por estas bactérias em simbiose com raízes de determinadas plantas. É um grupo formado por algo em torno de 12 gêneros e mais de 70 espécies atualmente conhecidas. Estas espécies são pertencentes aos grupos anteriormente mencionados α - e β - proteobactérias, denominadas muitas vezes como α - e β -rhizobium (Figura 1). As β - proteobactérias são os micro-organismos que mais se tem relato da atividade noduladora em raízes de leguminosas. De acordo com a literatura, são principalmente do gênero *Burkholderia* a

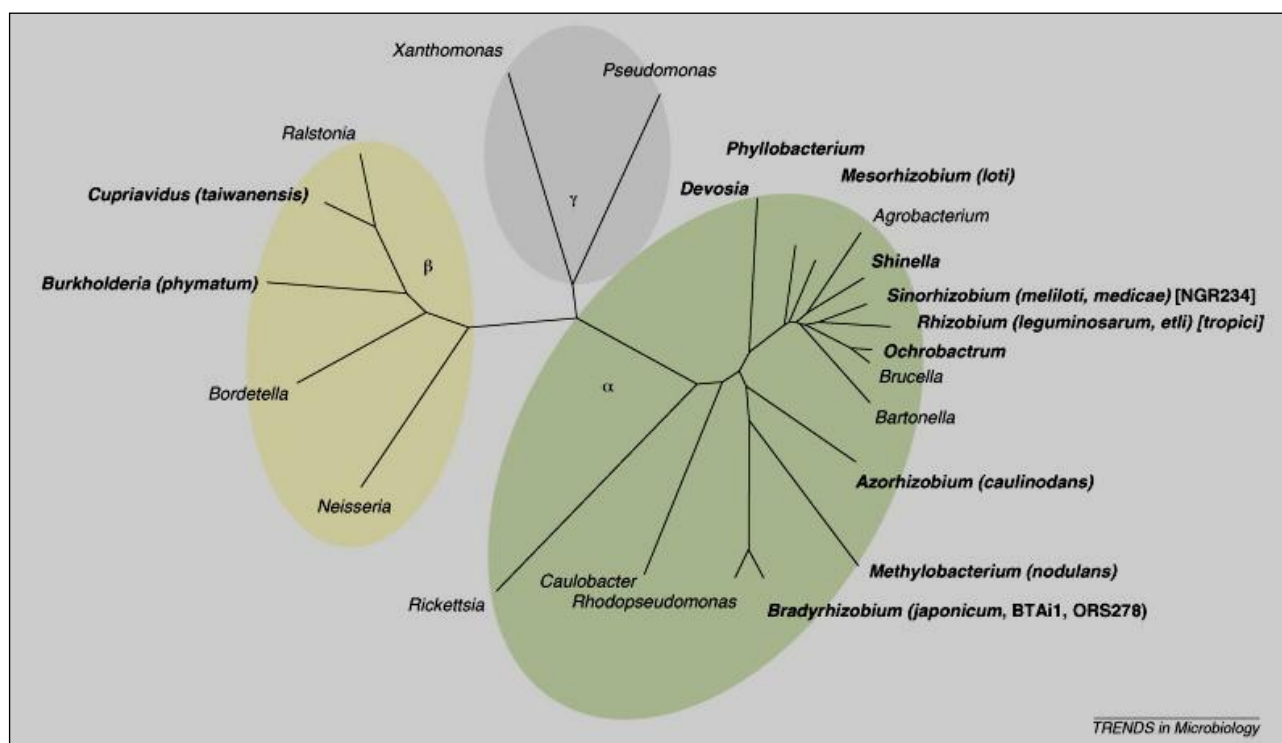
maior atividade de fixação de nitrogênio, sendo as espécies deste gênero dominantes dentre as espécies que habitam os nódulos das raízes de espécies de Fabaceae. Especialmente espécies tropicais como as plantas do gênero *Mimosa*, encontradas majoritariamente nas regiões de Caatinga e Cerrado (CHEN *et al.*, 2008). Todos os gêneros α -rhizobium pertencem à ordem Rhizobiales, enquanto todos os gêneros β -rhizobium pertencem à ordem Burkholderiales (MASSON-BOIVIN *et al.*, 2009). O que estas bactérias têm em comum é a capacidade de conseguir fixar o nitrogênio atmosférico diretamente do ar, em simbiose com algumas tipos de plantas como as do grupo Fabaceae. Dentre as espécies mais pesquisadas de Rizóbios, estão as pertencentes à ordem Burkholderiales (MOULIN *et al.*, 2001).

A ordem Burkholderiales pertence à subclasse das β -proteobactérias, grupo este constituído pelas famílias Burkholderiaceae, Oxalobacteraceae, Alcaligenaceae e Comamonadaceae, os quais são em geral organismos de metabolismo aeróbico, anaeróbico facultativo ou quimiotróficos. Dentre os dados de genoma sequenciados até agora disponíveis nos bancos de dados, esta ordem é a uma das mais estudadas (SCHONMANN *et al.*, 2009, PEREZ-PANTOJA *et al.*, 2012). Uma breve análise dos estudos recentemente disponíveis torna perceptível que a ordem Burkholderiales, dentre os grupos estudados de micro-organismos, é a ordem de bactérias que possui um maior potencial para o catabolismo biodegradador, visto que muitas espécies deste grupo apresentam uma grande quantidade de genes codificadores de enzimas oxigenases que participam do catabolismo de compostos aromáticos.

As espécies do gênero *Burkholderia* ocupam uma larga amplitude de nichos, atuando como patógenos de plantas, como degradadoras de compostos aromáticos, na ciclagem de nutrientes do solo e até mesmo como patógenos de interesse para a medicina (COENYE; VANDAMME, 2003). O grupo possui mais de 40 espécies atualmente conhecidas, as quais têm despertado o interesse para pesquisas que comprovem sua vocação biotecnológica para diversos fins que vão desde o melhoramento dos aspectos nutricionais do solo até a possível obtenção de novas linhagens que tenham a maquinaria molecular para a degradação de compostos potencialmente poluidores (SCHONMANN *et al.*, 2009). Os organismos deste gênero têm sido muito utilizados em pesquisas relacionadas à degradação de compostos aromáticos pelo fato de possuírem diversos genes que atuam no catabolismo destas substâncias (PEREZ-PANTOJA *et al.*, 2012). Entretanto, este gênero também possui espécies que com alto potencial patogênico para o homem, sendo algumas espécies já bem conhecidas

e estudadas na área da biotecnologia médica. Um grupo de aproximadamente 9 variedades de *Burkholderia* filogeneticamente muito próximas, que compõem o complexo de espécies de *Burkholderia cepacia* (CBc) é constituído por patógenos oportunistas de pacientes de fibrose cística imunossuprimidos. CBc é considerado como um dos grupos de bactérias mais resistentes em ambientes hospitalares, sendo muito comum infecção de soluções hospitalares, inclusive anti-sépticos (COENYE *et al.*, 2001). Outras espécies de *Burkholderia* têm se manifestado como patógenos de plantas. *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia glumae* e *Burkholderia plantarii* são as espécies mais conhecidas como fitopatógenos (GONZALEZ *et. al*, 2007).

Figura 1 – Árvore filogenética não enraizada baseada em sequências de DNAr 16S de α -, β - e γ -proteobactérias. Os gêneros em negrito são pertencentes ao grupo *Rhizobium*. As espécies que tiveram seu genoma completamente sequenciado estão em parêntese.



Fonte: Masson-Boivin *et al.* (2009).

A taxonomia e identificação das espécies do gênero *Burkholderia* inicialmente foi determinado por meio de análises polifásicas (COENYA; VANDAMME, 2003). Os estudos polifásicos são caracterizados por uma união de métodos diferentes, objetivando identificações mais conclusivas das bactérias estudadas. O objetivo destas análises foi gerar um sistema que refletisse as relações evolutivas entre os organismos aproximando a classificação microbiana, ao máximo possível, da realidade biológica. Para tanto, o uso da

homologia DNA-DNA foi associada a uma variedade de características ecológicas e fenotípicas.

Inicialmente, as características filogenéticas, fenotípicas e genotípicas poderiam colaborar com a identificação de um determinado organismo nos métodos polifásicos, no entanto, a hibridização do DNA-DNA sempre foi considerada de fundamental importância no processo de delineamento de espécies (VANDAMME, 1996). Mais recentemente as bactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia* têm sido classificadas por meio de análises de genes específicos que teriam um grau de importância significativo na classificação do grupo como o gene já amplamente conhecido rRNA 16S, este sendo a base utilizada para a classificação da maioria das espécies de bactérias. Este gene é importante por ser essencial no metabolismo dos organismos, já que está relacionado à síntese proteica. Desta forma, é muito eficaz para a classificação em níveis taxonômicos como família, classe e ordem, já que ao longo da evolução este gene sofreu relativamente poucas mutações quando comparado a outros genes com maior heterogeneidade. Os genes codificadores da região do rRNA, por serem essenciais para o organismo, evoluem de maneira mais lenta (BUSO, 2005). Atualmente outra região codificadora tem mostrado sua eficácia na elucidação da identificação destas bactérias, mas desta vez a nível de espécie. O gene *rec A*, diferentemente do tão utilizado 16S rDNA, é eficiente para mostrar a proximidade filogenética em um grau taxonômico a nível de espécie, já que evolui relativamente de maneira mais rápida (CHAN, 2003). Payne *et al.* (2005) estudando genomas sequenciados de várias espécies de bactérias do gênero *Burkholderia*, combinados com uma extensiva coleção do gene *recA* do complexo Bcc (*Burkholderia cepacia* complex), obtiveram sucesso em elucidar um pouco mais a identificação das espécies de *Burkholderia* atualmente conhecidas, confirmando Bcc como um grupo de espécies muito próximas e gerando informações a respeito da sistemática de espécies de *Burkholderia* com alto interesse para a biotecnologia. Estes autores concluíram que cepas muito conhecidas por terem um alto potencial biorremediador, estão proximamente relacionadas à *B. vietnamensis*, uma das bactérias pertencentes ao grupo Bcc. Dados como estes são importantes para prospectar novas espécies que possam ter uma competência metabólica para a biorremediação, a partir da proximidade filogenética com espécies já largamente utilizadas para este fim. Filogeneticamente, o grupo taxonômico *Burkholderia* está bem consolidado (Figura 2.) (COENYA; VANDAMME, 2003). Atualmente novas espécies de *Burkholderia* têm sido mencionadas na literatura, o que aumenta o leque de possibilidades para esta área da biorremediação, pois até o presente

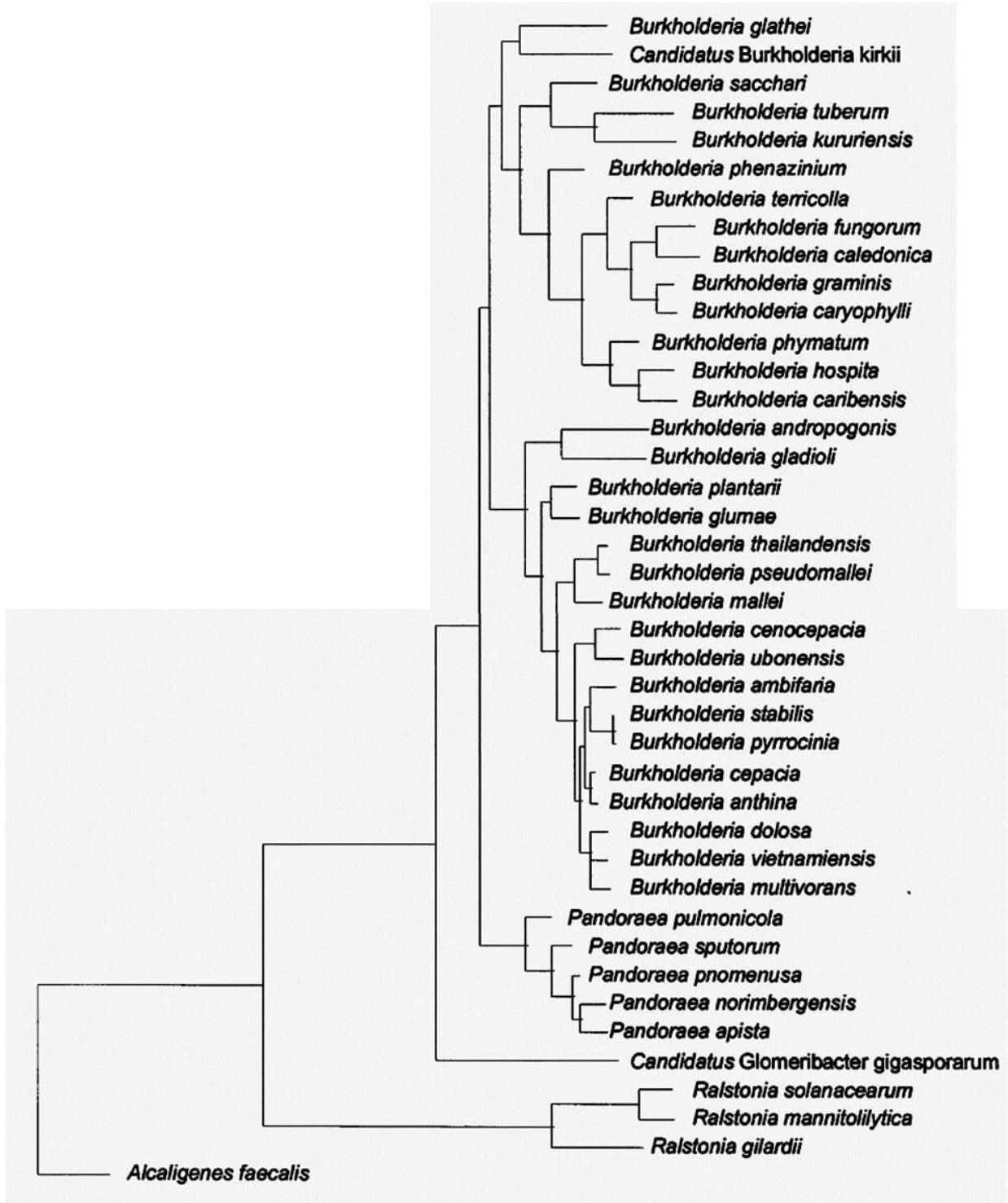
momento, praticamente todas as espécies deste gênero que se tem conhecimento, em maior ou em menor grau, possuem em sua carga genética sequências responsáveis pela degradação de algum tipo de composto considerado poluente (VAN HAMME *et al.*, 2003, HOWIESON *et al.*, 2013).

Apesar de possuir muitas vias moleculares conhecidas e estudadas, a ausência de uma identificação precisa e confiável de muitas cepas com potencial biotecnológico tem dificultado o avanço das pesquisas. Porém, alguns avanços no sequenciamento do genoma de algumas bactérias deste gênero, ou mesmo projetos com perspectivas de resultados para um futuro próximo, já sinalizam para a obtenção de resultados que permitirão outras possibilidades de conhecimento da diversidade funcional e evolutiva e como os mecanismos moleculares já conhecidos se relacionam entre diferentes espécies (RESENDE, 2007; TRIGUEIROS, 2008) .

As espécies do gênero *Burkholderia* são naturalmente muito abundantes no ambiente e sua resiliência genômica torna estas bactérias facilmente adaptáveis a diferentes nichos ambientais. Algumas destes micro-organismos, por exemplo, podem ser usados como biofertilizantes. O uso de *Burkholderia* como eficientes promotores de aumento de biomassa vegetal é devido basicamente a dois fatores: 1) Estas bactérias, quando inoculadas nas raízes de algumas plantas, protegem os vegetais de outros micro-organismos oportunistas que possam vir a ser fitopatógenos e 2) Estas bactérias podem aumentar a disponibilidade de alguns nutrientes como nitrogênio, fósforo e ferro. (COMPANT *et al.*, 2008).

A conhecida flexibilidade metabólica do gênero *Burkholderia* demonstra várias possibilidades da utilização destes micro-organismos como produto biotecnológico. Bactérias como *Burkholderia ambifaria* são reconhecidamente eficientes para fins de controle biológico em certos cultivares e algumas espécies pertencentes à Bcc ajudam na obtenção de aumentos significativos na produtividade de culturas como o arroz e milho, ao serem utilizadas como antagonistas de fungos fitopatogênicos que habitam a rizosfera destas plantas (COENYA; VANDAMME, 2003). No entanto, é o seu potencial biorremediador que mais tem despertado o interesse de muitos microbiologistas e biólogos moleculares. Este grupo tem se mostrado promissor pela sua diversidade de espécies e genômica e por sua resistência a ambientes quimicamente estressantes.

Figura 2 – Árvore filogenética com a classificação das espécies de *Burkholderia* mais representativas baseadas em 16S rDNA.



Fonte: Coenya e Vandamme (2003).

2.2 Sobre a utilização de bactérias em processos de despoluição.

Biodegradação pode ser definido como a capacidade que um organismo possui de quebrar um composto orgânico em seus componentes inorgânicos. Diversas são as espécies de micro-organismos estudadas com a finalidade de se obter cepas eficientes na transformação de compostos poluentes em substâncias pouco reativas e inofensivas ao meio ambiente. Espécies do gênero *Pseudomonas*, por exemplo, são bastante conhecidas por sua capacidade em biodegradar compostos aromáticos, inclusive sendo este gênero usado até hoje como modelo para estudos de biorremediação pelo fato de já se conhecer uma grande quantidade de informações a respeito do seu metabolismo quando submetidas ao crescimento em meio a compostos aromáticos. Além das espécies deste gênero, diversas outras já têm sido extensivamente estudadas e utilizadas individualmente e em consórcio com espécies diferentes (DIÁZ *et al.*, 2001, JIMÉNEZ *et al.*, 2002, PEREZ-PANTOJA, 2012). Os consórcios têm sido considerados uma alternativa eficiente, pois diversas são as espécies de bactérias capazes de degradar um único composto, resultando em compostos intermediários que ainda são tóxicos. Estes intermediários são metabolizados por outras espécies. A associação de diferentes tipos de bactérias em um consórcio visa aumentar a eficácia da biorremediação, já que muitos micro-organismos não possuem todo o aparato enzimático para metabolizar completamente uma determinada substância tóxica. Os consórcios bacterianos têm sido uma ferramenta muito útil na despoluição de ambientes degradados. A Tabela 2 mostra exemplos de bactérias que têm aparato molecular para degradação de algum dos compostos BTEX, em cultura pura. Algumas destas bactérias inclusive têm potencial de degradar mais de um composto (RESENDE, 2007).

Intuitivamente, é possível inferir que, em solos contaminados por determinado tipo de poluente, os micro-organismos encontrados nestas áreas possuem a resiliência necessária para suportar o composto tóxico presente em seu ambiente, ou mesmo têm a capacidade de metabolizá-lo. Cavalca *et al.*(2000), em seus experimentos, encontrou quinze linhagens de bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Alcaligenes*. Após obtenção das cepas, o DNA destas bactérias foi devidamente extraído e submetido a amplificação por PCR convencional. O resultado obtido pelos autores foi a presença de alguns genes importantes para a biodegradação de compostos BTEX, como os genes para as enzimas tolueno dioxigenase, xileno monooxigenase, e catecol 2,3 dioxigenase. Dentre as espécies com presenças mais significativas entre as cepas encontradas no estudo,

estavam *Pseudomonas aureofaciens*, *P. putida*, *P. aeruginosa* e *Alcaligenes xylosoxidans*. O crescimento em laboratório das cepas isoladas em presença dos compostos poluentes confirmou a capacidade degradadora destas bactérias já previamente observadas por meio de dados moleculares.

Em experimentos de análise da capacidade de degradação de uma bactéria, os resultados têm mostrado que o sucesso de uma cepa em metabolizar um determinado poluente está relacionado ao seu grau de resistência à substância poluidora. Este grau de resistência muitas vezes é aumentado por um processo de adaptação prévia da bactéria. Esta adaptação é conseguida submetendo o organismo estudado a uma concentração do poluente menor daquelas que realmente se quer testar. Um contato prévio com o poluente pode tornar as bactérias mais resistentes, e conseqüentemente mais eficientes na realização da biodegradação. Singh e Celin (2010), estudando cepas provenientes de solos ricos em hidrocarbonetos e seu potencial de biodegradação dos compostos BTEX isoladamente, encontraram uma alta capacidade de depuração destas bactérias, principalmente do tolueno, chegando a despoluir 100% deste poluente. No referido estudo, as bactérias foram previamente adaptadas às concentrações de 1% (v/v) a 10% de tolueno (overnight) antes do experimento de despoluição. O autor mostrou a importância da adaptação das cepas antes de submetê-las à análise de biorremediação.

Tabela 1 – Principais grupos de bactérias envolvidos na degradação de compostos do grupo BTEX.

| Bactéria (linhagem) | Condições |
|--|--------------------------------|
| BENZENO | |
| <i>Dechloromonas</i> spp. Linhagens RCB e JJ | Anaeróbias – Nitrato redutoras |
| <i>Anthrobacter</i> sp. HCB | Aeróbias |
| <i>Burkholderia pickettii</i> K 01 | Aeróbias |
| <i>Planococcus</i> sp. ZD22 | Aeróbias |
| TOLUENO | |
| <i>Pseudomonas putida</i> F1 | Aeróbias |
| <i>Burkholderia pickettii</i> K 01 | Aeróbias |
| <i>Pseudomonas mendocina</i> KR1 | Aeróbias |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> OX1 | Aeróbias |
| <i>Antrobacter</i> sp. HCB | Aeróbias |
| <i>Pseudomonas putida</i> mt-2 | Aeróbias |
| <i>Cycloclasticus pugetti</i> PS-1 | Aeróbias |

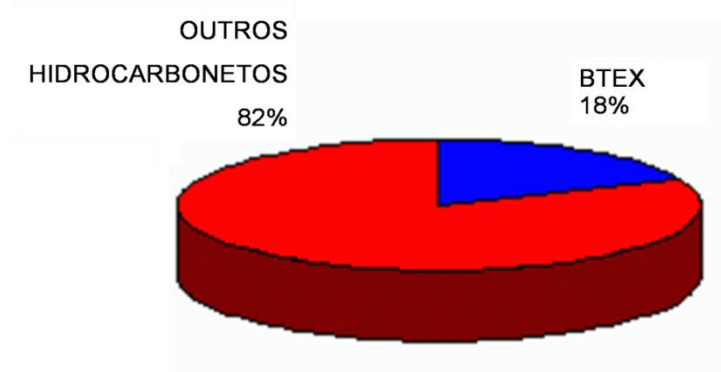
| ETILBENZENO | Aeróbias |
|--|--------------------------------|
| Linhagem EbN1 e EB1 relacionadas ao gênero <i>Thauera</i> | Anaeróbias - Nitrato redutoras |
| Proteobactéria marinha, linhagem EbS7 | Anaeróbia - Sulfato redutoras |
| <i>Pseudomonas</i> sp. NBM21 | Aeróbias |
| XILENOS | |
| Linhagens oXyS1 relacionadas às espécies <i>Desulfobacterium acetonicum</i> e <i>D. variabilis</i> | Anaeróbia - Sulfato redutoras |
| Linhagem mXyS1 do grupo Proteobacteria <i>Thauera</i> spp. e <i>Azoarcus</i> spp. | Anaeróbias - Nitrato redutoras |
| <i>Pseudomonas</i> sp. NBM21 | |

Fonte: (RESENDE, 2007).

2.3 Gasolina

Das substâncias derivadas do petróleo utilizadas atualmente na indústria e no cotidiano moderno, a gasolina é a mais largamente consumida no Brasil e no mundo (ANP 2010). Quimicamente, são os hidrocarbonetos os constituintes da gasolina comercial. Estes são em sua maioria, compostos de cadeias contendo entre quatro a doze carbonos, podendo ser classificados em alifáticos ou aromáticos. Exemplos de compostos alifáticos são o butano (C4), penteno (C5) e octeno (C8). Os compostos BTEX encontram-se no grupo dos aromáticos, perfazendo quase um quarto da gasolina comercial (MARCHETTI, 2009; SILVA *et al*, 2009) (Figura 3).

Figura 3. Percentual de BTEX na gasolina comercial.



Fonte: (MARCHETTI, 2009).

Além dos hidrocarbonetos já mencionados, a gasolina é composta de outros tipos de substâncias como os compostos oxigenados, compostos de enxofre, compostos de nitrogênio, bem como também os compostos metálicos. No entanto, todos estes compostos encontram-se em pequenas concentrações. Com a finalidade de implementar o desempenho e tornar a gasolina mais estável, são adicionados aditivos e misturas de diversos solventes ao complexo de hidrocarbonetos. Ao final do processo produtivo, a gasolina transforma-se em uma substância contendo mais de 150 compostos (HARPER; LICCIONE, 1995).

Atualmente são produzidos diversos tipos de gasolina, sendo utilizada tecnologia própria para fabricar as diversas frações de petróleo que formam esse combustível e misturá-las entre si e com os aditivos, através de formulações convenientemente definidas para atender aos requisitos de qualidade do produto.

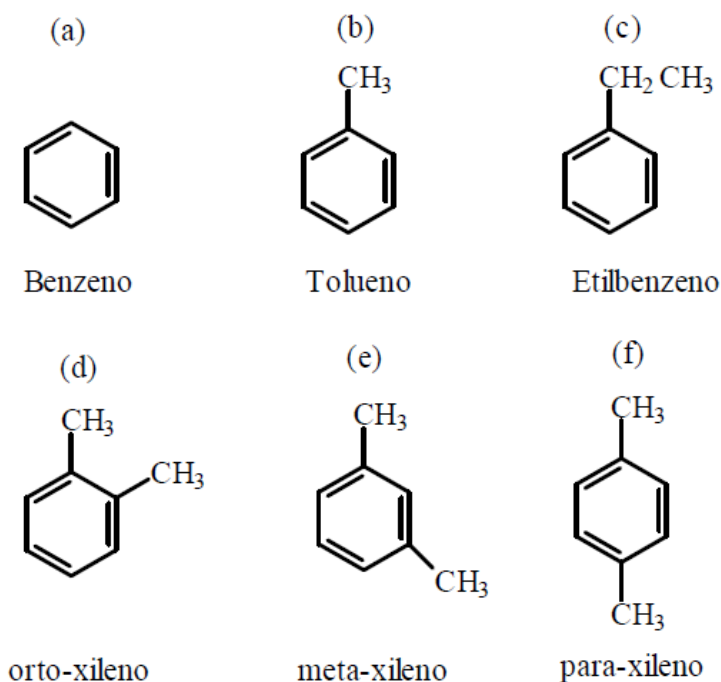
Pela grande variedade de substâncias presentes na gasolina comercial, ressalta-se a importância de se conhecer o comportamento de organismos biorremediadores quando em contato direto com este produto. É de grande relevância se analisar também a forma como potencialmente o poluente irá chegar como substrato ao micro-organismo utilizado.

2.4 Vias de degradação dos compostos BTEX

Certas vias moleculares da degradação dos compostos BTEX são atualmente bem elucidadas. O ataque ao anel aromático para a subsequente formação de compostos secundários é comum à todos estes compostos. A diferença nos compostos secundários formados e nas vias metabólicas acessadas depende muito da enzima que inicialmente estará atuando no início da biodegradação. Consequentemente, dependerá do organismo atuante na transformação.

Uma das dificuldades em se degradar os compostos aromáticos é exatamente a presença do anel aromático nestes compostos, uma estrutura química estável e de difícil reação (Fig 3). No processo de biodegradação destes compostos, uma molécula de oxigênio é introduzida no anel aromático pela enzima oxigenase do organismo degradador, transformando a substância em um composto intermediário. Este composto resultante é um dihidroxi-aromático.

Figura 4 – Estrutura química das moléculas compostos BTEX. A presença do anel aromático é uma das características marcantes destes compostos. (a) Benzeno, (b) Tolueno, (c) Etilbenzeno, (d) *orto*-xileno, (e) *meta*-xileno, (f) *para*-xileno.

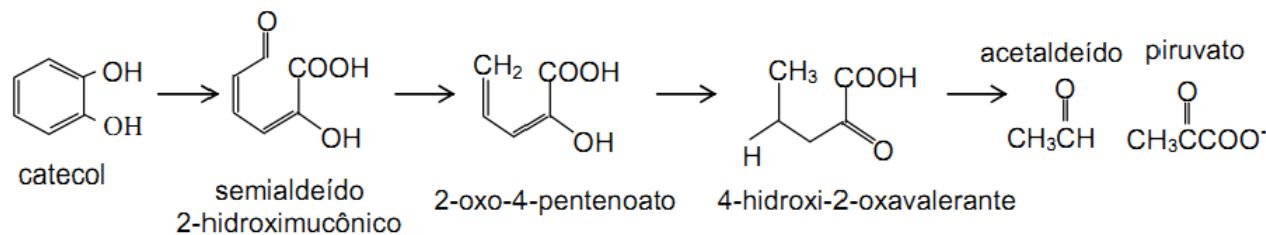


Fonte: Resende (2007).

Um dos dihidroxi-aromáticos mais comumente formados nas reações de biodegradação é o catecol. A partir do catecol, o micro-organismo pode direcionar seu metabolismo para duas principais vias degradadoras do catecol formado. Estas duas vias são conhecidas como via *orto* e via *meta* Fig. 4 e Fig 5.

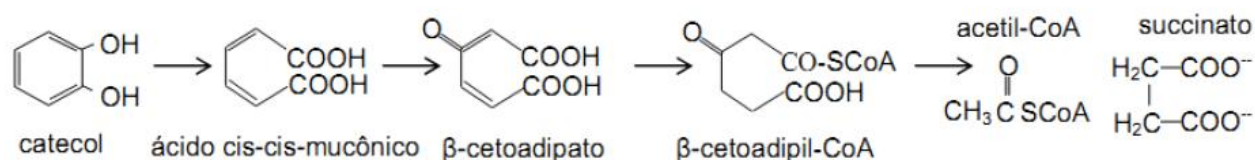
De acordo com Hendrickx *et al.* (2006), a via *meta* se dá quando os catecóis resultantes do processo de biorremediação têm a ligação entre o átomo de carbono adjacente ao grupo hidroxila quebrada pela enzima catecol-2,3-dioxigenase. O resultado desse processo será a formação de um semialdeído 2-hidroxiacético. Formando, a seguir, Piruvato e Acetaldeído. Já na via *orto*, há formação de outras moléculas de interesse energético por meio da quebra do catecol pela enzima catecol-1,2- dioxigenase. O resultado será a formação do intermediário *cis*-muconato e a conseqüente formação de acetil-CoA e Succinato. Em ambos os casos, temos a formação de moléculas que são utilizadas no metabolismo energético do organismo em questão. Todas as moléculas mencionadas estão envolvidas no ciclo do Ácido Cítrico, mostrando a potencialidade destas vias de serem utilizadas como alternativa para obtenção de energia pelos microorganismos que utilizam essas vias ou mesmo serem usadas por estes organismos para o formação de outros compostos orgânicos de interesse.

Figura 5 – Reação da quebra do catecol via *meta*. A reação química ocorre com o auxílio da enzima catecol-2,3-dioxigenase, resultando na formação de Acetaldeído e piruvato.



Fonte: Resende (2007).

Figura 6 – Reação da quebra do catecol via *orto*. A reação química ocorre com o auxílio da enzima catecol-1,2-dioxigenase, resultando na formação de Acetil-CoA e Succinato.



Fonte: Resende (2007).

Algumas bactérias possuem genes específicos que são induzidos, pela presença de compostos BTEX, a expressarem proteínas que são usadas nos processos de biorremediação mencionados. De acordo com BALDWIN *et al.* (2003), genes da família TOD (tolueno dioxigenase) e TOM (tolueno orto-monooxigenase), além de alguns genes NAH (dinitrotoluenodioxigenase) e BPH4 (bifenildioxigenase), são fortemente expressos em micro-organismos submetidos a compostos BTEX. Em especial NAH e BPH4, presentes em experimentos com gasolina comercial.

Embora individualmente os diferentes compostos BTEX possuam estruturas químicas muito similares, atualmente é sabido que a maioria das espécies tem a capacidade de degradar apenas um único tipo de composto. No entanto, algumas exceções a este fato já tem sido relatadas na literatura. Exemplo disto é a espécie *Pseudomonas putida* CM23, a qual é capaz de degradar o benzeno, tolueno e m-xileno, por meio de duas vias metabólicas de degradação (CAVALCA *et al.*, 2000).

O estudo das moléculas expressas e da dinâmica do crescimento das bactérias potencialmente biorremediadoras é de fundamental importância para a utilização destes organismos como ferramenta biotecnológica de despoluição.

3. OBJETIVOS:

Avaliar o potencial de biodegradação de *Burkholderia* SMF090 quando submetida ao crescimento com gasolina comercial como única fonte de carbono, para fins de descobrir seu potencial biotecnológico para a biorremediação.

Objetivos Específicos:

- Caracterizar os perfis de crescimento do isolado SMF 090 em meio de cultura mineral (BH) e em BH suplementado com gasolina;
- Obter perfis de géis bidimensionais de bactérias crescidas na presença e ausência de gasolina comercial, ambos em meio BH;
- Identificar as proteínas diferencialmente expressas de bactérias crescidas na presença de gasolina;
- Identificar proteínas de vias metabólicas de degradação dos compostos aromáticos da gasolina,
- Analisar se o potencial de formação de biofilme de *Burkholderia* SMF090 é influenciado pela presença de gasolina comercial

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O isolado do gênero *Burkholderia* que foi utilizada no presente trabalho e foi previamente identificada como SMF 090, pertence à coleção de beta-rizóbios do Dr. Sérgio Miana de Farias (Embrapa Agrobiologia). A referida bactéria foi isolada de raízes do gênero *Mimosa*.

A cepa foi submetida ao crescimento em meio TY (Tryptone-Yeast Medium), em estufa a 28°C (TOLEDO *et al.*, 2009) e com uma velocidade de agitação de 250 rpm. A seguir, foram acondicionadas em tubos eppendorfs com glicerol a 20% e os estoques foram armazenados a -80°C.

4.1 Tolerância e crescimento de SMF090 em meio Bushnell-Haas em presença de gasolina

Dois experimentos foram feitos para analisar a tolerância de *Burkholdeira* SMF090 à gasolina. Primeiramente foi feito um pré-inóculo da referida cepa, a partir dos estoques armazenados, em 50mL de meio TY em estufa agitadora a 28°C submetidas a uma agitação de 250rpm. Ao alcançar uma densidade ótica de 1,0 as bactérias foram lavadas três vezes com solução NaCl 0,85%, ressuspendidas em 25 mL da mesma solução salina e submetidas ao crescimento em meio mineral Bushnell-Hass (meio BH) – composição 1g de KH_2PO_4 , 1g de K_2HPO_4 , 1g de NH_4NO_3 , 0,2g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05g de FeCl_3 , 0,02g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, para 1L de H_2O (ATLAS, 1995). O experimento foi realizado em garrafas com capacidade de 500 mL, contendo 250 mL de meio BH cada um. Em cada garrafa foi adicionado 1 mL da solução salina contendo as bactérias. Os seguintes tratamentos foram testados: tratamento com gasolina comercial a uma concentração de 2000 partes por milhão (500uL de gasolina em 250 mL de meio BH) e controle negativo (ausência de gasolina). A seguir, o crescimento bacteriano foi acompanhado, sendo feita a leitura da densidade ótica a cada 3 horas em espectrofotômetro (*Gene Quant Healthcare*) até os crescimentos atingirem a fase estacionária. Cada tratamento foi feito em triplicata.

O segundo experimento consistiu no teste de tolerância ao poluente por bactérias previamente adaptadas à gasolina comercial. Um pré-inóculo em 50mL de meio TY, em estufas a 28°C e submetidas a uma agitação de 250 rpm, por 24h. O pré-inóculo foi feito com a adição de 50 μL de gasolina comercial (1000 partes por milhão) a fim de adaptar a cepa ao poluente testado. A análise da proliferação celular no meio foi feita por meio de

espectrofotômetro a uma OD_{600} . Para atestar a pureza da cultura obtida, foi feito teste de Gram. Ao alcançar uma densidade ótica de 1,0 as bactérias foram lavadas três vezes com solução NaCl 0,85%, ressuspendidas em 25 mL da mesma solução salina e submetidas ao crescimento em meio mineral Bushnell-Hass (meio BH). O experimento foi realizado em garrafas com capacidade de 500 mL, contendo 250 mL de meio BH cada um. Em cada garrafa foi adicionado 1 mL da solução salina contendo as bactérias adaptadas. Os seguintes tratamentos foram testados: tratamento com gasolina comercial a uma concentração de 2000 partes por milhão (500 μ L de gasolina em 250 mL de meio BH), e controle negativo (ausência de gasolina). A seguir, o crescimento bacteriano foi acompanhado, sendo feita a leitura da densidade ótica a cada 3 horas em espectrofotômetro (*Gene Quant Healthcare*) até os crescimentos atingirem a fase estacionária. Cada tratamento foi feito em triplicata.

Posteriormente, uma segunda curva foi feita a partir de bactérias da primeira curva, com o dobro da concentração de poluente (1 mL de gasolina em 250 mL de meio BH) a fim de testar uma possível adaptação a maiores concentrações de gasolina. Neste experimento os tratamentos foram feitos em triplicata e o crescimento foi acompanhado por meio da leitura da densidade ótica a cada 3h até atingirem a fase estacionária.

4.2 Crescimento de *Burkholderia* SMF090 submetida à gasolina comercial para extração de proteínas

A partir dos estoques armazenados inicialmente a -20° C de *Burkholderia* SMF090, foi feito um pré-inóculo em 200 mL de meio TY, em erlenmeyers de 500mL. Para o pré-inóculo foi adicionado 1,5 mL de solução estoque da bactéria e 200 μ L de gasolina comercial para adaptação da cepa ao poluente. O cultivo foi feito em estufa agitadora, a 28° C e a uma velocidade de rotação de 250 rpm. Após 24h de crescimento, as bactérias foram lavadas em solução NaCl a 0,85%, ressuspendida em 32 mL de solução salina. A partir desta solução bacteriana, foram adicionados 4 mL em erlenmeyers de 2 L contendo 1 L de meio BH e 2 mL de gasolina comercial. Os seguintes tratamentos foram feitos para este experimento: gasolina comercial a uma concentração de 2000 partes por milhão (2 mL de gasolina em 1L de meio BH) e controle negativo (ausência de gasolina). O crescimento foi acompanhado fazendo-se leituras diárias em espectrofotômetro calibrado a uma OD_{600} . Ao se alcançar a densidade ótica da fase estacionária, o crescimento foi interrompido, centrifugadas a 5000g por 30 minutos e armazenadas a -20° C.

4.3 Extração de proteínas intracelulares

A partir do crescimento estocado a -20°C , foi feita a extração de proteínas intracelulares das bactérias. O procedimento de extração foi feito segundo Riedel et al. (2006). O precipitado bacteriano foi lavado 2 vezes com 10 mL de Tris/HCl 50mM pH 7,5. Após as lavagens foi adicionado 10 mL de Tris/HCl 50mM pH 7,5 acrescido de 40 μL do Inibidor de Protease Mix (GE HealthcareTM). As células foram lisadas por sonicação (10 pulsos de 20 segundos com intervalos de 1 minuto entre cada pulso – com 20% de amplitude). Após serem sonicadas, as células foram centrifugadas a 12000 g por 1 hora e 30 minutos a 4°C . Ao sobrenadante foi adicionado 1 mL de fenol e a mistura foi incubada a 70°C por 10 minutos. As amostras foram resfriadas em gelo por 5 minutos e as fases foram separadas por centrifugação a 4000 g por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado 2 vezes com acetona gelada 100%. Após as lavagens, o precipitado repousou em temperatura ambiente para evaporação da acetona e foi ressuspensão em uréia 7 M/ tiouréia 2 M. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) e a integridade protéica foi analisada por SDS-PAGE.

4.4 Eletroforese Bidimensional

Para a primeira dimensão foram adicionados 130 μg de proteína de cada amostra ao tampão de reidratação [uréia 7 M/ tiouréia 2 M, 1% CHAPS, 1% DTT; 0,5% (v/v) anfólitos (pH de 3-10) e azul de bromofenol] em um volume final de 125 μL por amostra. As tiras com gradiente de pH imobilizado (IPG) de 13 cm de comprimento e pH de 3-10 foram reidratadas, com solução contendo as proteínas, em temperatura ambiente por 16 horas. A seguir foi realizada a Focalização Isoelétrica - IEF usando o sistema de focalização *EttanIPGphor III* (GE-Healthcare) nas seguintes condições: etapa 1 (500 V por 30 minutos); etapa 2 (4000 V por 2:30 horas) e etapa 3 (8000 V até atingir 18.000 V horas totais). As tiras foram armazenadas a -80°C .

Na segunda dimensão a tira de IPG foi equilibrada com a solução I (Uréia 6 M, Tris 50 mM, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol, e DDT) por 15min e em seguida, com a solução de equilíbrio II (Uréia 6 M, Tris 50 mM, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol e iodoacetamida) por 15min. Posteriormente a tira foi colocada em um gel de poliacrilamida a 12,5%. A tira foi selada com uma solução de agarose (0,5% de agarose e

0,002% de azul de bromofenol). O marcador de baixo peso molecular (LMW) foi aplicado em um poço criado no lado ácido da tira. A segunda dimensão da eletroforese foi realizada na unidade de eletroforese vertical *Hofer SE 600 Ruby* por aproximadamente 5 horas. Após a corrida, o gel foi submerso na solução corante contendo Comassie G 250 (*BlueSilver*) (CANDIANO, 2004) por 24 horas sob agitação e armazenados em solução de ácido acético 5%. Para a digitalização dos géis, foi utilizado o equipamento *ImageScanner III* gerenciado pelo programa *LabScan 6.0* (ambos da *GE Healthcare*). As imagens obtidas foram analisadas no programa *ImageMaster 2D Platinum6.0* (*GE Healthcare*).

Este procedimento foi feito primeiramente como teste piloto, em uma tira de 13 cm, pH de 3-10, para se conhecer a amplitude de pH onde as proteínas mais se concentrariam. Posteriormente os experimentos válidos para a identificação de proteínas foram feitos em tiras de 7cm, pH 4-7.

4.5 Bioinformática

Os géis digitalizados a 300 dpi foram analisados pelo software *ImageMaster 2D Platinum 6.0* (*GE Healthcare*). Foi feita a detecção automática de spots seguida da identificação dos spots mais significativos (em volume e intensidade) por meio dos valores de pI/MW de cada spot. A identificação foi feita através do banco de dados *ExPasy*. Os valores teóricos foram encontrados utilizando a ferramenta *Compute pI/MW* do *ExPASy*.

4.6 Análise da formação de biofilme

4.6.1 Crescimento bacteriano

A partir dos estoques de SMF 090, 300µL de estoque bacteriano foram adicionados a 10mL de meio TY e encubados em estufa agitadora a 28°C, a uma agitação de 250rpm por 24h. Após esse período, uma alíquota de 300µL foram retirados deste crescimento, inoculado em 10 ml de meio TY e mantido a 28°C sob agitação constante, de 250 rpm, pelo período necessário para que o crescimento chegasse na fase exponencial, nesse caso aproximadamente 12h.

Com o crescimento nessa fase, as células foram lavadas com solução 0,85% NaCl por três vezes. As células foram ressuspensas em meio TY numa concentração de 10^8 /mL. Para a análise do crescimento do biofilme, foi usada uma placa para leitor de *Elisa*

de 96 pocos, onde foram dispostos em colunas meio de cultura suplementado com gasolina e o controle contendo apenas meio de cultura e células bacterianas. A placa foi mantida por 24h a 28°C sob constante agitação de 250 rpm.

4.6.2 Revelação do biofilme com cristal violeta

O meio de cultura foi retirado dos poços cuidadosamente a fim de não prejudicar a integridade do biofilme. Em seguida, os poços foram lavados com água destilada e deixados em repouso para secar em temperatura ambiente. 200 µL de metanol foram colocados em cada poço e mantidos por 15 minutos. Posteriormente o metanol foi descartado e adicionado 200 µL de cristal violeta por 10 minutos. O cristal violeta foi retirado dos poços e estes foram lavados com água destilada. Em seguida, 200 µL de ácido acético a 33% foram adicionados e mantidos por 10 minutos. O ácido acético foi transferido para outra placa de 96 poços e sua absorbância mensurada em leitor de ELISA.

4.7 Análise estatística

A análise estatística para avaliar os resultados da curva de crescimento em meio BH foi feita por meio do teste *t-Student*, com $p \leq 0,05$ sendo considerado como estatisticamente diferente. O referido teste foi feito no Statistica 6.0 e a construção da curva foi feita a partir do GraphPad Prisma 3.0.

Análise estatística dos géis 2D para atestar a similaridade das repetições intra-classe foi feito por meio de análise de correlação linear, onde o índice satisfatório é uma correlação igual ou maior a 0,85.

A análise estatística dos biofilmes foram feitos pelo teste *t-Student*, com $p \leq 0,05$ sendo considerado estatisticamente diferente. O teste foi feito no Statistica 6.0 e a construção dos gráficos de leitura do *ELISA* foram feitos no GraphPad 3.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Tolerância e crescimento de SMF090 em meio Bushnel – Haas em presença de gasolina

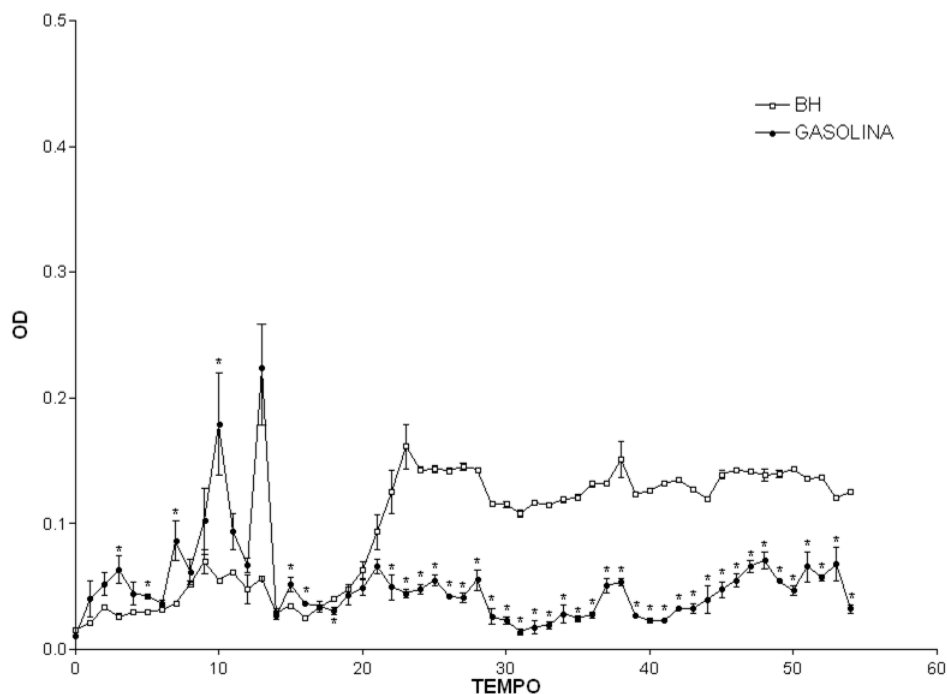
Nas três situações a qual foi submetida, a bactéria apresentou comportamento bem diverso. No cultivo sem nenhum tipo de fonte de carbono, a bactéria, apresentou seu platô numa densidade óptica de 0,166. Este resultado demonstra que a bactéria apresenta crescimento, mesmo que pequeno, em meio mínimo. No entanto, não houve acúmulo de biomassa, visto que o meio não possuía fonte de carbono necessária para a multiplicação mais intensa de suas células. O crescimento observado na bactéria em meio BH pode ser explicado pela utilização de substâncias de reserva. As bactérias do táxon genérico *Burkholderia* são conhecidas por armazenarem um tipo de substância de reserva chamada polihidroxibutirato (LIMA, 2001).

O polihidroxibutirato (PHB) é um grupo bastante diversificado de polímeros que são constantemente acumulados nas células de muitas bactérias, dentre elas as espécies do gênero *Burkholderia* (CASTELLANOS, 2010). Isto sugere que estas bactérias têm uma fonte alternativa de carbono na falta de carbono no ambiente onde estão se proliferando.

Mendonça (2009), estudando a capacidade de *Burkholderia sacchari* de produzir o PHB, encontrou resultados positivos na síntese de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato a partir de ácido hexanóico e glicose, inclusive em quantidades comercialmente utilizáveis. Isto mostra que estas bactérias têm a capacidade de produzir e acumular tal substância em quantidade razoável para suportar algumas horas de crescimento sem fonte externa de carbono, o que explica o crescimento, ainda que modesto da curva controle (Figura 7).

Mesmo possuindo uma reserva deste polímero, para que a bactéria venha a acessar esta fonte energética, deduz-se que é necessário um estímulo externo como alguns fatores que instiguem sua proliferação (no nosso caso, temperatura e agitação) e a percepção, por meio das células bacterianas, de que não há outra fonte para a obtenção de energia, levando o micro-organismo a acessar esta alternativa como fonte energética. Castellanos (2010), estudou a capacidade de desmobilização de poli-3-hidroxibutirato pela bactéria *B. sacchari*. O autor encontrou uma diversidade de genes responsáveis pela mobilização deste polímero, reforçando ainda mais a presença desta reserva e a capacidade de espécies de *Burkholderia* de armazená-lo como alternativa energética.

Figura 7 – Gráfico da curva de crescimento de *Burkholderia* SMF090, não adaptadas, em meio BH suplementado com gasolina comercial. (□) Crescimento com glicose a 1M, (●) Crescimento com gasolina comercial (2000 ppm), . Análise estatística feita no Statística 6 Workbook. Teste *t-Student*. (*) Diferenças estatísticas Gasolina-BH, (+) Diferenças Glicose-Gasolina, onde $p < 0,05$.

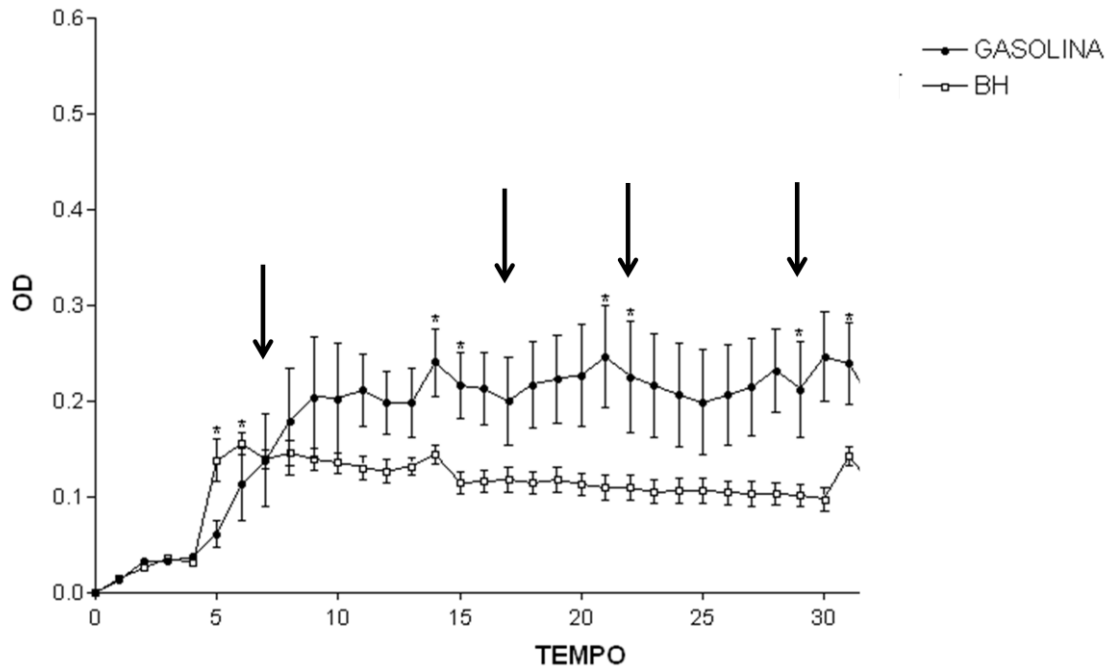


Fonte: autor

A curva de crescimento das bactérias submetidas à gasolina comercial demonstrou um crescimento ainda menor, apresentando sua fase estacionária em uma O.D. média de 0,068. Neste crescimento foi perceptível que a o metabolismo bacteriano respondeu ao suplemento de gasolina como um fator estressante, e não como uma fonte de carbono, visto que o tratamento com gasolina comercial se mostrou com uma formação de biomassa ainda menor. É importante lembrar que esta curva foi feita com bactérias que não foram previamente adaptadas à gasolina (Fig. 7). Este resultado corrobora com os dados de Trigueiros (2008), que estudando a cinética de biodegradação de compostos BTEX, observou que algumas bactérias tinham seu crescimento suprimido quando o poluente era adicionado em concentrações muito elevadas.

No experimento seguinte, as cepas foram previamente adaptadas em gasolina, em concentrações de 1000ppm, em meio TY, antes de serem submetidas ao meio mínimo BH para os testes de tolerância a uma concentração maior de gasolina. Como já era esperado, a curva apresentou médias de crescimento maiores tanto no tratamento com gasolina como no tratamento controle (Figura 8).

Figura 8 – Gráfico da curva de crescimento de *Burkholderia* SMF090 em meio BH, com bactérias adaptadas, suplementado com gasolina comercial. (●) Crescimento com gasolina comercial (2000 ppm), (□) Controle. Análise estatística feita no Statistica 6 Workbook. Teste *T-Student*. (*) Médias estatisticamente diferentes. Leitura da O.D. em espectrofotômetro em $\lambda = 600$ nm. Tempo em horas. As setas mostram os pontos da curva onde foram analisadas alíquotas dos crescimentos após centrifugação. Após a ressuspensão e leitura do sobrenadante, não se observou diferenças nos valores de O.D.



Fonte: autor

O crescimento com gasolina comercial a 2000ppm, com as células previamente adaptadas a 1000ppm por 24h, apresentou um platô com média de crescimento em torno de 0,255. Ao contrário da curva do primeiro experimento, a curva de crescimento do tratamento com gasolina superou a curva do controle negativo. Esta obteve uma fase estacionária com valores médios de 0,143, muito próximo dos valores médios do tratamento controle da curva anteriormente apresentada. Supõe-se, a partir do que foi observado, que uma adaptação prévia da célula bacteriana é fundamental para que esta possa crescer em meio contendo o poluente, sem que este prejudique o seu metabolismo, inclusive sendo a substância poluente usada como uma possível fonte de carbono. Vale salientar que esta curva ainda é considerada como uma fase adaptativa, visto que os crescimentos não foram estatisticamente diferentes. No entanto, o aumento do valor médio da biomassa conseguida no crescimento já é um sinal que mostra que a célula se

adaptou bem ao poluente, desenvolvendo no mínimo uma resistência maior para crescer de maneira satisfatória em meio sem fonte de carbono e apenas com compostos BTEX como potencial substância energética externa. Roma-Rodrigues *et al.* (2010), estudando o as características de crescimento de células de *Pseudomonas putida* KT2440 e sua capacidade de resistência e degradação do fenol, observaram que um período de adaptação é fundamental para o sucesso das células bacterianas. Sem essa adaptação prévia à substância poluente, é pouco provável que as bactérias retomem um crescimento satisfatório, segundo os resultados destes autores.

Ao longo do crescimento bacteriano em meio considerado estressante, há a possibilidade do desenvolvimento de uma tolerância ao novo ambiente ao qual a bactéria é submetida, bem como também a síntese de polímeros ou quaisquer outro tipo de substância resultante da modificação do metabolismo do organismo. Este fato nos leva a pensar na hipótese que, ao longo do crescimento, as cepas analisadas podem estar liberando substâncias no meio, o que atrapalharia a precisão das leituras, e conseqüentemente, das análises de crescimento. Os testes para analisar se o aumento da O.D. realmente estava sendo resultado do aumento do número de células mostram que, após centrifugação, ressuspensão do pellet e nova leitura no espectrofotômetro em quatro pontos da curva, as leituras não foram diferentes das leituras de alíquotas retiradas dos crescimentos e imediatamente submetidas à leitura da O.D. O teste foi feito em quatro pontos da curva, um na fase log e três na fase estacionária (Figura 8). Em ambas as leituras, a O.D. apresentou medidas muito próximas (Tabela 2).

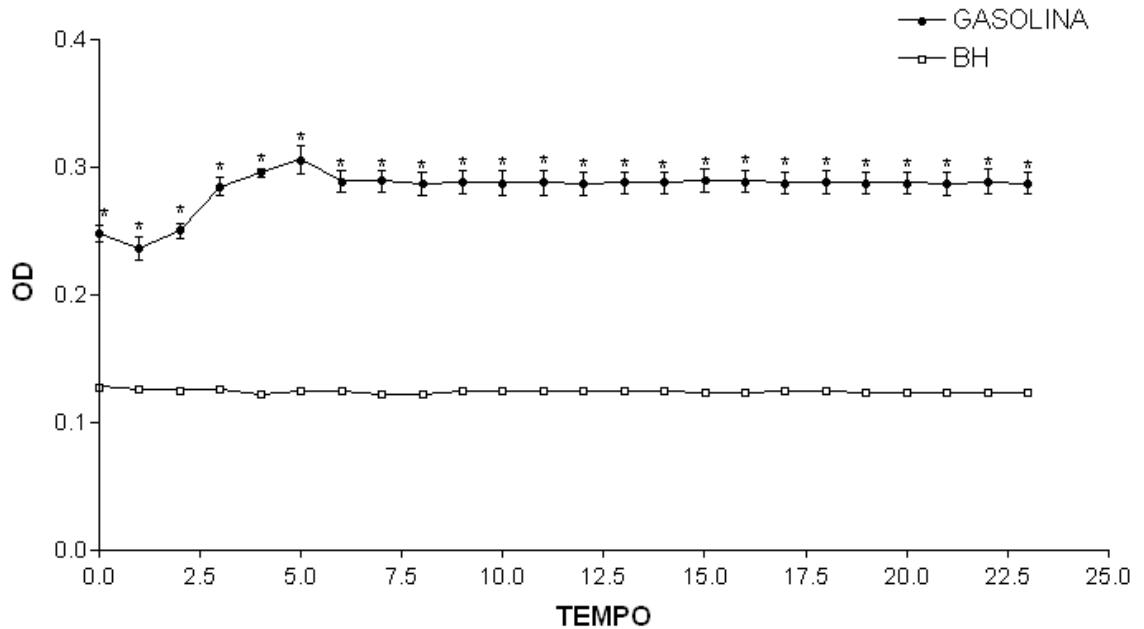
Tabela 2 – Densidade Ótica das alíquotas provenientes do crescimento de *Burkholderia* SMF090 submetidas à gasolina comercial e crescidas apenas em meio BH. As leituras foram feitas em quatro momentos do crescimento e não mostraram nenhuma diferença entre as medidas de OD das alíquotas imediatamente submetidas à leitura do espectrofotômetro e alíquotas centrifugadas e ressuspensas previamente, atestando a validade do crescimento bacteriano. Após centrifugação, a O.D. do sobrenadante de todas as alíquotas centrifugadas foram lidas, mostrando não haver partículas detectadas a $\lambda=600\text{nm}$.

| Fase da curva | Tratamento | | | Controle | | |
|---------------------------------|-----------------------------|-------------------------|--|-----------------------------|-------------------------|--|
| | Alíquotas não centrifugadas | Alíquotas centrifugadas | Sobrenadante das alíquotas centrifugadas | Alíquotas não centrifugadas | Alíquotas centrifugadas | Sobrenadante das alíquotas centrifugadas |
| Log | 0,131 | 0,135 | 0,002 | 0,129 | 0,127 | 0,00 |
| Estacionária (leitura 1) | 0,231 | 0,230 | 0,003 | 0,152 | 0,150 | 0,001 |
| Estacionária (leitura 2) | 0,240 | 0,239 | 0,002 | 0,150 | 0,148 | - |
| Estacionária (leitura 3) | 0,245 | 0,247 | - | 0,152 | 0,150 | - |

Fonte: autor

Vale salientar que retirando uma alíquota de bactérias da fase estacionária do crescimento com gasolina e re-inoculando essa alíquota em um novo meio com gasolina, a curva de crescimento obtida mostra um crescimento bacteriano mais rápido e com maior biomassa (Figura 9). Os resultados deste terceiro experimento demonstram o quanto esta bactéria é resiliente, se adaptando cada vez mais ao poluente, à medida que aumenta seu tempo de exposição a este. O gráfico resultante mostra um aumento na biomassa ao longo da curva que leva a um pico de crescimento de 0,321 e a uma fase estacionária de média de 0,298. As cepas desta curva, quando submetidas ao meio contendo apenas meio BH, não mostraram um aumento significativo de biomassa, mantendo as médias de crescimento da curva anterior (Figura 9). Nesta curva, as médias de crescimento demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os valores de O.D. do controle e do tratamento, validando um maior aumento de biomassa em bactérias adaptadas submetidas ao crescimento com gasolina comercial. Morlett-Chavez et al. (2010), também observaram a importância da aclimação das células bacterianas antes de submetê-las a determinado tipo de poluente. Com o objetivo de entender os genes envolvidos no processo de biodegradação, os autores utilizaram cepas isoladas de um consórcio bacteriano e adaptaram estas células por um período de 8h antes do experimento de biodegradação. As espécies *Pseudomonas putida* e *Escherichia coli* mostraram resultados bastante promissores pós adaptação, degradando, quando em consórcio, até 99% do poluente testado após um período de 60h. Singh e Celin (2010), estudando as cepas denominadas Bb5 e sua capacidade de biodegradar compostos BTEX, adaptaram os micro-organismo antes de submetê-los às concentrações maiores do poluente. No referido experimento, as bactérias foram submetidas inicialmente à uma concentração de 1% de tolueno v/v por um período em torno de 16h. A seguir, foram submetidas individualmente a cada um dos compostos BTEX. O resultado mostrou que as bactérias, quando submetidas ao poluente, antes da análise de biorremediação, parecem desenvolver uma maior resistência, aumentando sua eficiência de proliferação, corroborando com os nossos resultados.

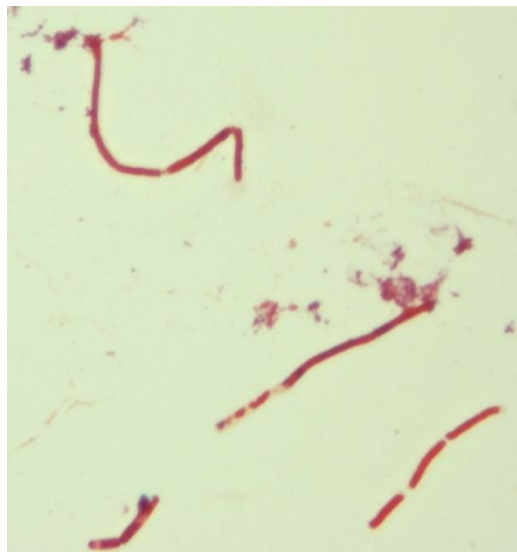
Figura 9 – Gráfico da segunda curva de crescimento de *Burkholderia* SMF090, com bactérias adaptadas, em meio BH suplementado com gasolina comercial.(●) Crescimento com gasolina comercial (2000 ppm), (□) Controle. Análise estatística feita no Statística 6 Workbook . Teste one-way Anova. (*) Diferenças estatísticas: Gasolina-demaís grupos.



Fonte: autor

Os resultados do teste de Gram de todos os crescimentos feitos ao longo dos experimentos não apresentaram nenhum tipo de contaminante (Figura 10).

Figura 10 – Foto do resultado do teste de gram após curva e crescimento realizado para os diversos testes. Imagem de microscopia ótica com um aumento de 400x.



Fonte:autor

5.2 Análise Proteômica

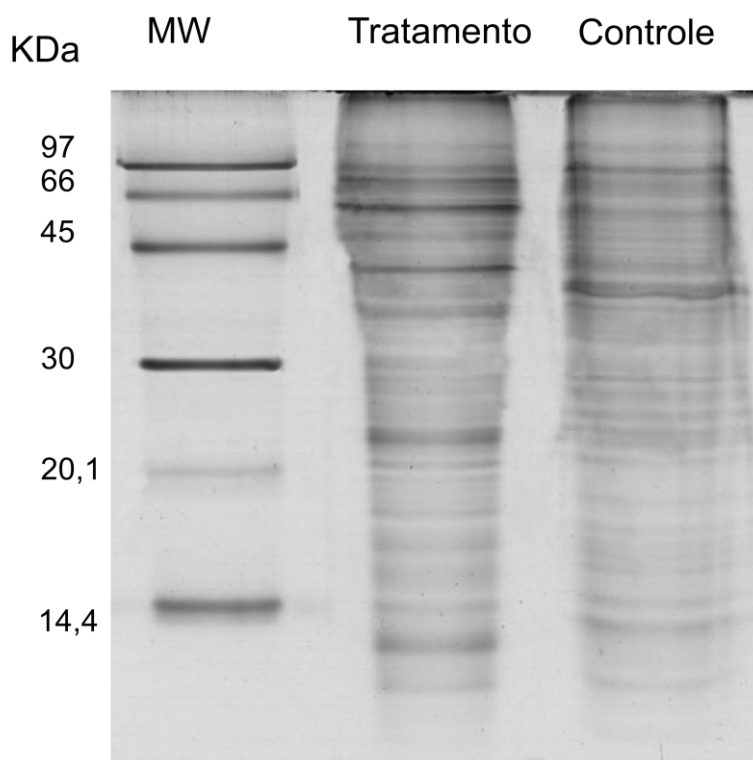
5.2.1 Extração de Proteínas

A metodologia utilizada na extração das proteínas foi satisfatória quando considerado seu aspecto qualitativo. No entanto, com relação à quantidade do material obtido, os resultados mostraram que uma possível otimização do processo deve ser futuramente estudada. A quantidade média de proteínas observada pelo teste de Bradford mostrou uma concentração de $5,73 \mu\text{g}/\mu\text{L} \pm 1,5$ nas amostras extraídas das bactérias submetidas ao crescimento em BH suplementado com gasolina comercial (2000 ppm) e $3,10 \mu\text{g}/\mu\text{L} \pm 2,1$ nas amostras extraídas dos micro-organismos submetidos ao crescimento apenas em meio BH, sem nenhuma fonte externa de carbono. Brito (2012), ao estudar proteínas extraídas da mesma cepa de *Burkholderia* em meio TY, obteve um rendimento médio de $16,8 \mu\text{g}/\mu\text{L} \pm 2,38$ de proteínas provenientes de crescimento em meio TY sem gasolina e $13,12 \mu\text{g}/\mu\text{L} \pm 0,92$ obtidos de crescimentos em meio TY com gasolina comercial a uma concentração de 1000 ppm. Alguns fatores podem ter colaborado para as diferenças de concentração mencionadas. Um destes fatores é o meio utilizado para viabilizar o crescimento da bactéria. O meio TY é um meio de extrato de levedura e caseína hidrolisada, contém nutrientes suficientes para o crescimento bacteriano, desde que este seja submetido à temperaturas adequadas. O meio BH é considerado um tipo de meio mínimo, onde apenas substâncias minerais estão presentes, sem fonte de carbono para o crescimento bacteriano. Em meio TY, o suplemento de gasolina é um fator estressante, já que o próprio meio de crescimento já é uma fonte de carbono. Em meio BH a gasolina comercial adicionada se torna a única fonte de carbono disponível para os micro-organismos, enquanto no crescimento apenas com meio BH as bactérias só podem contar com sua reserva intracelular.

Por meio de SDS-PAGE, a integridade das proteínas foi avaliada. Como o rendimento da extração de proteínas foi baixo, o experimento de SDS-PAGE foi feito apenas na diluição de 1:10. O gel resultante mostra bandas íntegras em ambos os tratamentos. É perceptível também as diferenças entre as bandas do tratamento e do controle (Figura 11). As colunas que mostram as proteínas obtidas de *Burkholderia* SMF090 parecem acumular bandas na região de maior peso molecular. As bandas de maior intensidade parecem se concentrar mais entre 40 KDa e 97KDa. Além disso, bandas intensas foram perceptíveis, no tratamento, entre 20,1KDa e 30 KDa e abaixo de

14,4KDa. O resultado do experimento mostrou a integridade das amostras obtidas e diferenças visualmente perceptíveis entre os crescimentos submetidos a tratamentos distintos.

Figura 11 – SDS PAGE em gel de poliacrilamida 12,5%. As amostras são resultantes da extração de proteínas de *Burkholderia* SMF 090 submetidas ao crescimento em meio BH. Da esquerda para a direita: MW (marcador molecular de baixo peso), Tratamento com gasolina comercial e Controle negativo.



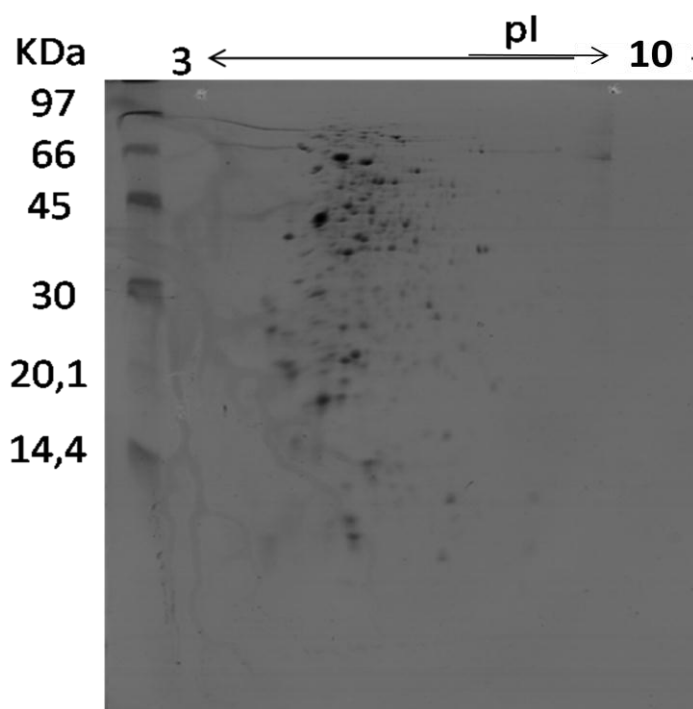
Fonte: autor

5.2.2 Análise dos géis bidimensionais

A partir do gel obtido do teste piloto com tira de 13 cm (pH 3-10), foi observado a distribuição das proteínas, ao longo da faixa de pH, para se obter uma amplitude mais específica de distribuição dos *spots*. Os resultados mostraram que as proteínas se concentram em uma faixa de pH mais ácida (Figura 12). Os resultados corroboram com nossa hipótese de que *Burkholderia* SMF090, assim como em estudos anteriores, também apresentou uma maior quantidade de proteínas em menor faixa de pH. Testes como estes são importantes para se assegurar a qualidade dos géis de experimentos posteriores, visto que, à medida em que a faixa de pH de uma determinada tira é menor, a resolução dos resultados obtidos será maior, aumentando a precisão das identificações e assim, a qualidade dos dados obtidos. Seguindo o gel do teste piloto, os experimentos

foram feitos em tiras de 7 cm, com amplitude de pH de 4-7, visto que a resolução dos *spots* obtidos seriam de maior qualidade, e a precisão das identificações por pI e massa ficariam bem mais confiáveis.

Figura 12 – Gel do teste piloto feito para analisar em qual faixa de pH as proteínas mais se concentram. Os *spots* obtidos foram observados em uma amplitude mais ácida, mostrando a necessidade de uma tira de menor faixa de pH para experimentos posteriores.

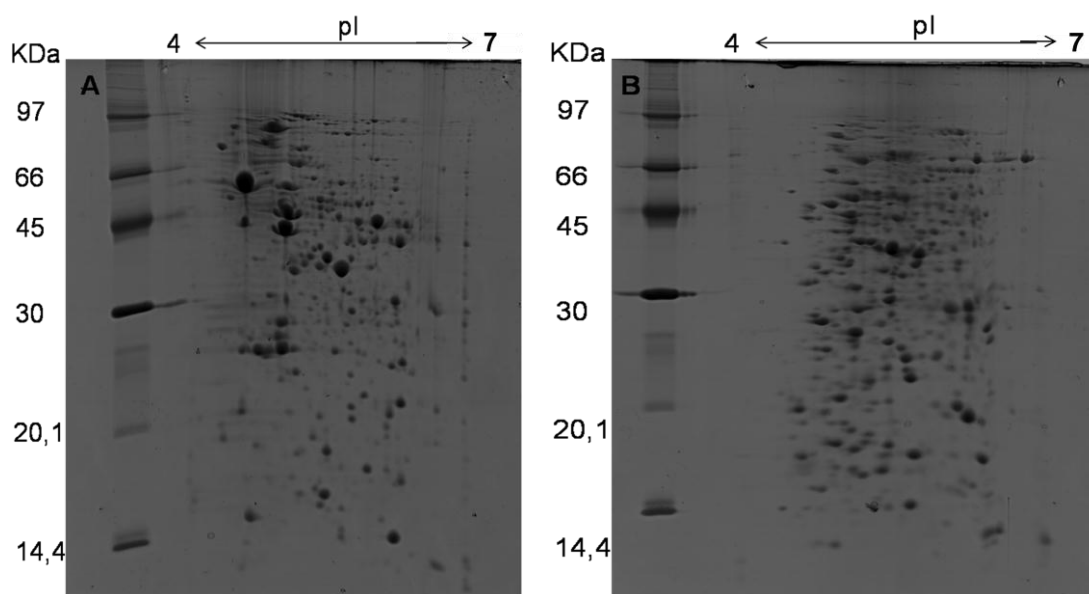


Fonte: autor

Dentre os géis obtidos do experimento de eletroforese bidimensional, para cada tratamento analisado, foram escolhidos géis de referência por meio dos quais se analisou diferenças das proteínas expressas nos dois tratamentos aos quais as bactérias foram submetidas (Figura 13). No tratamento com gasolina comercial, um total de 527 *spots* foram identificados como proteínas bacterianas. No gel que foi obtido do controle foi possível observar 194 *spots*, tendo uma redução de 68% dos *spots* no gel. Isso é um indício de que *Burkholderia* SMF090 tem um maior número de proteínas expressas em meio com gasolina comercial. Diferentemente de Brito (*op. cit.*) que trabalhando com o mesmo poluente e a mesma cepa, encontrou uma quantidade maior de proteínas em meio sem gasolina comercial (542 *spots*) quando comparado ao crescimento realizado em nossos experimentos com gasolina comercial (256 *spots*). Mais uma vez a diferença do meio de crescimento utilizado foi relevante, o meio TY. O tratamento do referido trabalho, sem gasolina comercial, se comporta como um meio de crescimento não estressante e

com fonte de carbono. Nossos resultados que mostram maior número de *spots* também possuem fonte de carbono externa, porém esta fonte é o poluente em questão. É importante salientar também que a concentração usada em nossos experimentos foi o dobro (2000ppm).

Figura 13 – Géis bidimensionais de referência resultantes da extração de proteínas de *Burkholderia* submetidas a diferentes condições de crescimento. (A) Grupo Controle: bactérias crescidas em meio BH sem adição de gasolina comercial. (B) Grupo Tratado: bactérias crescidas em meio BH suplementado com gasolina comercial a 2000ppm.



Fonte: autor

Pesquisas têm mostrado que a introdução do poluente no meio de crescimento é um fator que ativa a produção de proteínas que participam da biorremediação da substância a ser degradada (SINGH, 2006). Kwok *et al.* (2007), ao estudar *Burkholderia cepacia* e seu potencial biodegradador, demonstrou que a adição de poluentes halogenados influencia no aumento da produção de proteínas diversas, inclusive proteínas que participam do metabolismo energético e que auxiliam na síntese de novas proteínas. Kim *et al.* (2006) ao estudar *Pseudomonas putida* e a capacidade desta bactéria de biodegradar compostos BTEX isoladamente, testou a hipótese que substâncias poluentes específicas eram capazes de induzir um gene alvo para a produção de proteínas específicas, aumentando assim o número de proteínas expressas. Os resultados deste estudo mostraram um aumento da síntese de proteínas, bem como uma especificidade entre proteína expressa e poluente utilizado no experimento. Em nossos resultados, *Burkholderia* SMF090 mostrou um número maior de proteínas no

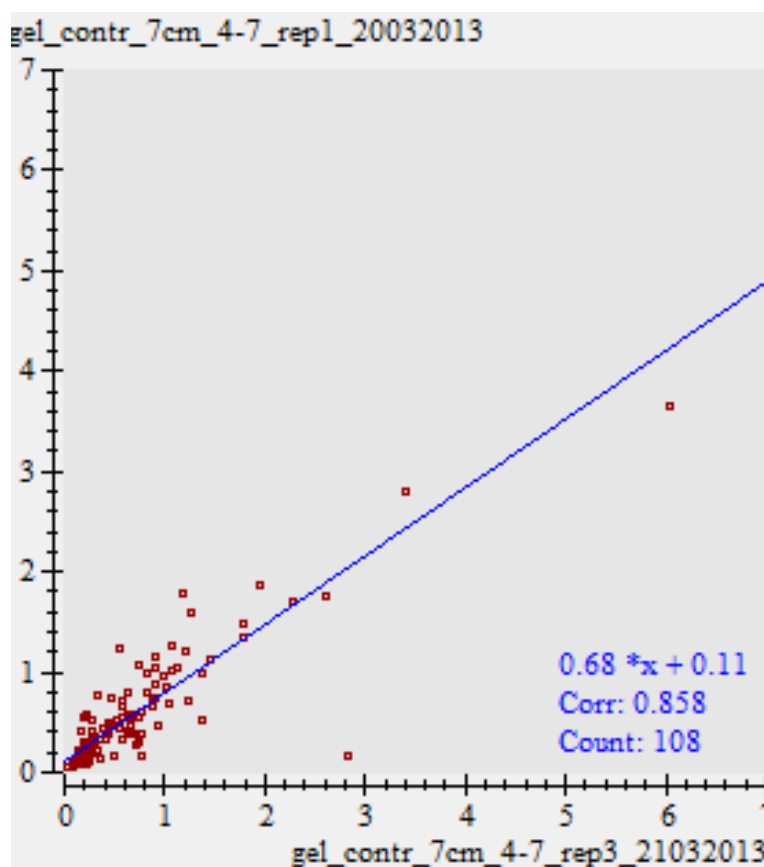
crescimento com gasolina comercial, corroborando com estudos anteriores e reforçando nossa hipótese de aumento do número de proteínas expressas em crescimentos suplementados com gasolina, quando comparados a crescimentos apenas em meio mínimo.

5.2.3 Reprodutibilidade dos géis

O alinhamento entre as repetições foi feito com a finalidade de analisar a reprodutibilidade dos géis bidimensionais. Para cada tratamento, um gráfico de dispersão (*scatterplot*) foi gerado utilizando os spots correspondentes (*matches*) de cada repetição feita em cada tratamento. Nos géis pertencentes ao grupo controle, 144 *spots* (85%) foram identificados em ambas as repetições, sendo caracterizados como *matches* (Figura 14). A análise dos géis do grupo tratamento apresentou uma correlação linear de 0,86, o que caracteriza uma correspondência de 453 *spots* entre as repetições (Figura 15). O índice utilizado para validar os resultados foi a correlação de Pearson. Este índice é uma correlação linear que é traçada entre duas variáveis x e y , indicando o grau de intensidade entre estas duas variáveis, e mostrando ainda se esta correlação é positiva ou negativa. Valores de r próximos de -1 ou $+1$ indicam uma correlação forte, enquanto valores próximos de zero indicam uma fraca correlação. O coeficiente de Pearson considera uma correlação satisfatória aquela que resulta em um r igual ou maior do que 0,85 (VIEIRA, 1980). Dentro da escala deste índice, nossos resultados se enquadram em uma correlação forte positiva, tornando válidas as réplicas intra-classes dos géis bidimensionais. Os dados mostram que a técnica de eletroforese bidimensional foi realizada de maneira satisfatória, dando confiabilidade às demais análises realizadas, pois os géis intra-classe, de fato, têm a distribuição dos *spots* de maneira a serem seguramente tratados como réplicas sem comprometer a validade dos demais resultados.

Os demais *spots* que não foram significativamente similares entre os géis de mesmo tratamento, podem estar relacionados à variações experimentais, visto que estes podem ser influenciados por uma quantidade considerável de fatores relacionados à prática do procedimento. A técnica de eletroforese bidimensional tem etapas bem distintas. Uma das etapas mais sensíveis é a focalização isoelétrica, a qual é responsável pela maioria das variações que ocorrem nas pesquisas envolvendo 2D. Em nossos experimentos, a focalização isoelétrica foi feita de forma a diminuir possíveis variações, focalizando todas as *strips* exatamente em um mesmo momento.

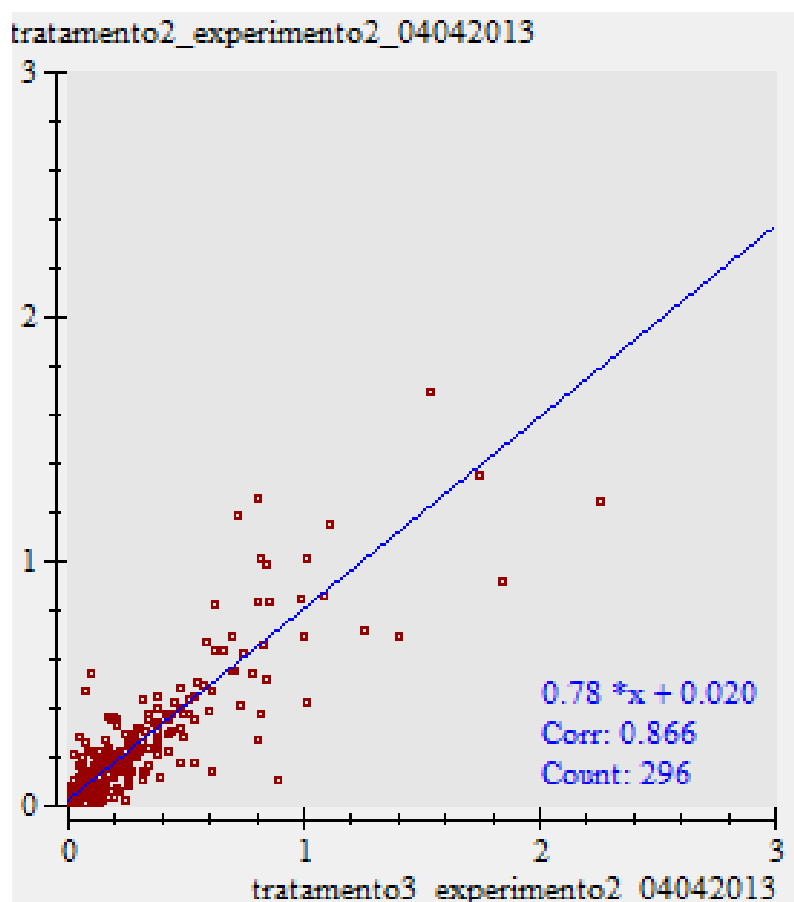
Figura 14 – Correlação linear entre as duplicatas dos géis bidimensionais do controle. O gráfico mostra uma similaridade de 85% entre os spots encontrados no gel para a análise de proteínas de *Burkholderia* que foram submetidas ao crescimento em meio BH sem adição de gasolina comercial.



Fonte: autor

Outra etapa que pode gerar pequenas variações nos resultados é a segunda dimensão. Esta pode ter os resultados comprometidos quando as corridas de géis intra-classe são feitas em momentos distintos ou usando tampões diferentes. A interferência ocorre principalmente na resistência que o tampão exerce sobre corrente elétrica responsável pelo deslocamento das proteínas no gel. Um tampão diferente ou até mesmo a temperatura ambiente podem aumentar ou diminuir a resistência exercida sobre a corrente elétrica, o que poderia alterar os resultados. Por fim, um fator que pode influenciar os resultados é uma possível contaminação da amostra por sal, o que foi remediado pela purificação prévia das amostras antes mesmo da focalização isoeletrica. Todos estes fatores podem influenciar os resultados, no entanto, como mencionado, os experimentos foram realizados de forma a minimizar estas variações.

Figura 15 – Correlação linear entre as duplicatas dos géis bidimensionais do tratamento. O gráfico mostra uma similaridade de 86,6% entre os spots encontrados no gel para a análise de proteínas de *Burkholderia* submetidas ao crescimento em meio BH suplementado de gasolina comercial (2000ppm).



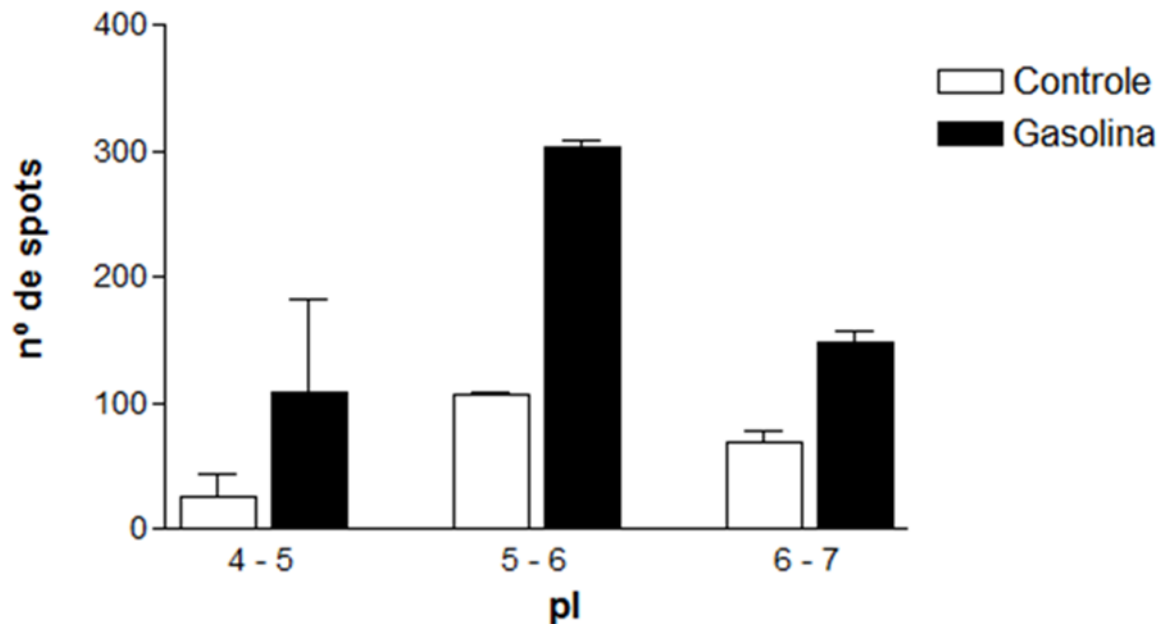
Fonte: autor

Desta forma, a pequena porcentagem de *spots* que não está em correspondência estatística entre as réplicas (em torno de 15%) não é considerada relevante para invalidar os resultados obtidos.

5.2.4 Tendência de *pI* e massa molecular das proteínas identificadas

Os *spots* identificados em cada gel de referência foram distribuídos em categorias de ponto isoelétrico e massa molecular. Uma clara tendência foi observada na distribuição obtida. No grupo controle, a tendência observada foi a de *spots*, em sua maioria, na categoria de *pI* no pH entre 5 e 7. Já no grupo do tratamento com gasolina os *spots* apresentaram uma distribuição similar, porém com uma forte tendência de *pI* no pH entre 4 e 6 (Figura 16).

Figura 16 – Gráfico mostrando a tendência de ponto Isoelétrico dos spots encontrados nos géis bidimensionais resultantes da extração de proteínas de *Burkholderia* submetidas a diferentes tratamentos. A distribuição encontrada mostra que os spots se concentraram principalmente no intervalo de pI com pH mais ácido tanto no controle e principalmente no tratamento.

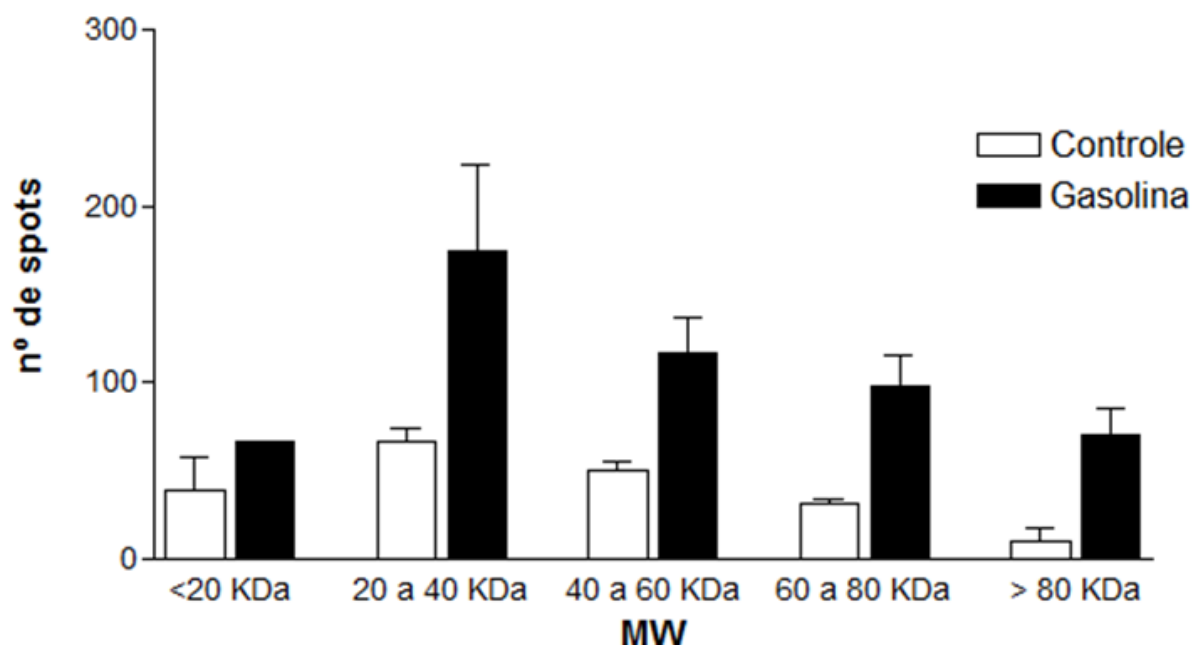


Fonte: autor

A análise da distribuição da massa molecular mostrou um resultado mais heterogêneo. O grupo controle não apresentou tendência para nenhum das classes de maneira mais específica, apresentando *spots* em todas as classes, sem diferenças significativas no número de proteínas por classe.

O grupo de proteínas do tratamento com gasolina mostrou uma forte tendência para as classes que compreendem 20 KDa a 80 KDa, tendo uma menor ocorrência nas classes de massa molecular extremas (abaixo de 20 KDa e acima de 80 KDa) (Figura 17).

Figura 17 – Gráfico mostrando a tendência de massa molecular (MW) dos spots encontrados nos géis bidimensionais resultantes da extração de proteínas de *Burkholderia* submetidas a diferentes tratamentos. A distribuição encontrada mostra que os spots se concentraram principalmente no intervalo de massa molecular que compreende 20 a 60 KDa.



Em estudos de análise proteômica, um dos principais dados a se observar é a distribuição isoelétrica das proteínas identificadas e sua massa molecular. O ponto isoelétrico é o valor de pH onde a carga total de uma proteína é zero. O pI é importante pois é neste valor em que a proteína de interesse possui a menor solubilização em água. Na literatura ainda não tem sido feito com frequência este tipo de análise de distribuição dos spots em classes de pI.

A distribuição da massa molecular em classes mostrou um resultado mais homogêneo. Os spots analisados mostraram uma distribuição entre 20 KDa e 80 KDa, sendo menos freqüente em categorias de massas moleculares extremas (menor do que 20 KDa e maior do que 80 KDa). Este tipo de análise também não é muito freqüente na literatura disponível atualmente em análises proteômicas.

5.2.5 Identificação das proteínas diferencialmente expressas

A partir do banco de dados ExPASy, foi feita a identificação das proteínas por meio dos valores de pI e massa molecular obtidos. As identificações foram feitas por meio dos valores mais próximos encontrados no banco de dados. Um total de 19 proteínas foram

identificadas em ambos os tratamentos (*matches*). Destas, nove proteínas mostraram maior intensidade dos *spots* no grupo tratado com gasolina comercial (Tabela 3).

As proteínas identificadas têm relação direta com o metabolismo energético e síntese de proteínas. O que já era esperado devido às possíveis mudanças metabólicas extremas na célula bacteriana.

Dez proteínas tiveram uma maior expressão no grupo controle, como é possível observar na Tabela 4.

As proteínas expressas nos dois tratamentos enfatizam vias metabólicas que são comuns às células bacterianas submetidas à gasolina comercial e submetidas a uma condição de ausência de fonte de carbono. Vias metabólicas pertencentes ao metabolismo energético, com a presença de proteínas cinase, e proteínas que auxiliam na síntese de outras proteínas como fatores de maturação de ribossomos, já eram esperados como resultados dos testes de biorremediação. Ambas as situações são estressantes para bactéria, no entanto o micro-organismo estudado parece crescer mais satisfatoriamente em meio contendo compostos BTEX, enquanto uma mudança aparentemente mais drástica na expressão de proteínas parece ocorrer quando a bactéria é submetida ao meio sem fonte de carbono.

Dentre as proteínas expressas exclusivamente no grupo tratado com gasolina comercial, seis *spots* apresentaram um número de pI e massa muito próximos de proteínas envolvidas na via de degradação do catecol (Tabela 5). Como estas proteínas foram encontradas apenas no grupo tratado, os resultados sugerem que a suplementação de compostos BTEX no meio de crescimento podem ativar genes específicos presentes no genoma bacteriano, mas que se expressam apenas quando a célula bacteriana entra em contato com a substância poluente. Esta parece funcionar como um sinal ambiental para a bactéria sintetizar proteínas que auxiliem na depuração destas substâncias potencialmente poluidoras, mas que para a bactéria é uma fonte de carbono.

Um dos pressupostos mais conhecidos da biologia é o princípio da economia máxima. Este princípio postula que um organismo não irá investir energia produzindo qualquer que seja a molécula, se esta não for essencial para sua sobrevivência. Os resultados apresentados enfatizam o potencial biotecnológico de *Burkholderia* SMF090, já que esta parece conter genes que participam da via do catecol, além de crescer e produzir biomassa em quantidade maior quando em presença de compostos BTEX, como observado nas curvas de crescimento.

Tabela 3 – Spots diferencialmente expressos nos géis bidimensionais. Houve um aumento de expressão (intensidade dos spots no gel) dos spots mostrados abaixo no gel do tratamento.

| Número de Acesso | Spot ID | Proteína | pI | | Massa | |
|------------------|---------|--|---------|---------|---------|---------|
| | | | Teórico | Prático | Teórico | Prático |
| A9AGC0 | 729 | Proteína GrpE | 5.4 | 5.5 | 21995 | 22072 |
| Q3JP41 | 744 | Fosfoheptose isomerase | 5,8 | 5.98 | 20784 | 21026 |
| Q39K84 | 791 | Fosforibosil-AMP ciclohidrolase | 5.47 | 5.5 | 15900 | 17182 |
| A0K3V7 | 686 | Fosforibosil formino-5-aminoimidazol carboxiamida ribotida isomerase | 4.4 | 4.4 | 26570 | 25414 |
| Q13Z15 | 701 | Protease proteolítica dependente de ATP (Clp), subunidade 2 | 5.7 | 5.7 | 23829 | 23981 |
| Q146B7 | 793 | Proteína exportadora de proteína SecB | 4.5 | 4.5 | 17232 | 17271 |
| Q13UD3 | 803 | Endoribonuclease YbeY | 4.8 | 4.9 | 16965 | 16499.0 |

| | | | | | | |
|--------|-----|--|-----|-----|-------|-------|
| B2JKT6 | 806 | Fator de maturação de Ribossomo (Rimp) | 5 | 5 | 17021 | 16177 |
| B2SX18 | 814 | Proteína exportadora de proteína SecB | 4.5 | 4.5 | 17218 | 15551 |

Fonte: autor

Tabela 4 – Spots diferencialmente expressos nos géis bidimensionais. Houve um aumento de expressão (intensidade dos spots no gel) dos spots abaixo no controle, mostrando a resposta molecular das bactérias quando submetidas ao crescimento sem fonte externa de carbono.

| Número de Acesso | Spot ID | Proteína | pI | | Massa | |
|------------------|---------|--|---------|---------|---------|---------|
| | | | Teórico | Prático | Teórico | Prático |
| Q146G6 | 591 | Quinase pantetoato Tipo III | 6.4 | 6.4 | 28053 | 27600.0 |
| B2T5I2 | 584 | Acil-[acyl-carrier-protein]-UDP-N-Acetil glucosamina O-aciltransferase | 6.2 | 6.2 | 27719 | 27357 |
| Q390V3 | 651 | 5`-nucleotidase SurE | 5.3 | 5.3 | 27870 | 27875 |
| Q13Z72 | 661 | 5`-nucleotidase SurE | 5.2 | 5.2 | 26994 | 26966 |

| | | | | | | |
|--------|-----|---|-----|-----|-------|-------|
| B4ECC9 | 706 | Proteína acessória Urease UreF | 5.3 | 5.3 | 24061 | 24038 |
| Q3JQ61 | 720 | Proteína Maf BURPS1710b_2911 | 5.9 | 5.9 | 22934 | 23061 |
| B2SXI3 | 752 | Adenina fosforibosiltransferase | 5.3 | 5.3 | 20431 | 20436 |
| B2JCN4 | 767 | Fosfopanteteína Adenililtransferase | 6.1 | 6.1 | 19005 | 19142 |
| B2JKT6 | 782 | Fator de maturação de ribossomo (RimP) | 5 | 5 | 17021 | 17929 |
| | 821 | Urease (subunidade beta) | 6.2 | 6.2 | 15244 | 15247 |

Fonte: autor

Tabela 5 – Spots exclusivamente expressos em *Burkholderia* SMF090 submetidas ao crescimento em meio suplementado com gasolina comercial após 72h de crescimento. Seis spots tiveram seus valores de pI e massa molecular próximos aos valores teóricos de proteínas envolvidas na via de degradação do catecol.

| Número de acesso | Spot ID | Proteína | pI | | MW | |
|---------------------|---------|-----------------------------|---------|---------|---------|---------|
| | | | Teórico | Prático | Teórico | Prático |
| A0KBG7 | 592 | Catecol 1,2- dioxigenase | 5,2 | 5,2 | 32,974 | 33,573 |

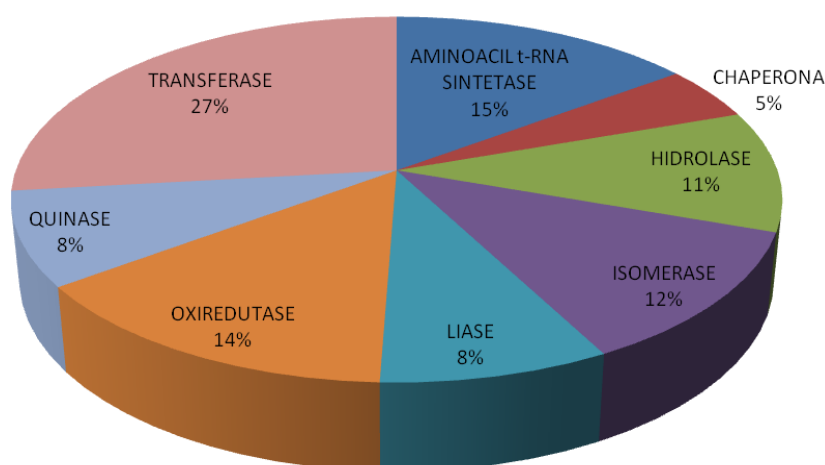
| | | | | | | |
|--------|-----|----------------------------|-----|-----|--------|--------|
| A0K437 | 535 | Muconato cicloisomerase | 5,5 | 5,7 | 40,189 | 39,747 |
| A0K437 | 525 | Muconato cicloisomerase | 5,5 | 5,6 | 40,189 | 40,814 |
| A0K437 | 521 | Muconato cicloisomerase | 5,5 | 5,7 | 40,189 | 40,746 |
| A0K437 | 520 | Muconato cicloisomerase | 5,5 | 5,3 | 40,189 | 41,153 |
| A0K437 | 519 | Muconato cicloisomerase | 5,5 | 5,2 | 40,189 | 41,632 |

Fonte: autor

5.2.6 Análise quali-quantitativa das classes de proteínas

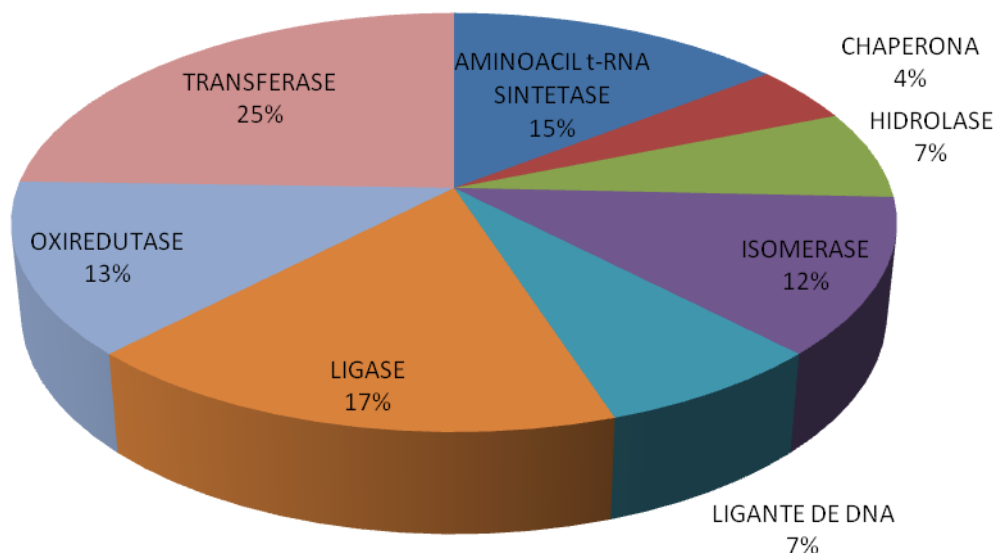
As proteínas identificadas foram distribuídas em classes de acordo com sua função molecular. No grupo controle, um total de 194 *spots* foram identificados pelo banco de dados ExPASy. Oito classes de proteínas tiveram uma maior abundância de *spots*, sendo as Transferases, Aminoacil-tRNAsintetase e Oxiredutase as classes com maior porcentagem de proteínas (Figura 18). O perfil de classes de proteínas dos géis resultou em uma distribuição parecida com aquela do controle (Figura 19), estando as transferases com maior número de proteínas, seguidas das Aminoacil-tRNAsintetase. A diferença considerável é a alta ocorrência de Ligases, suplantando a classe das oxiredutases. As proteínas caracterizadas como Transferases são moléculas que têm função primordial em vários processos celulares, pois estas basicamente transferem grupos funcionais de uma molécula a outra. Em nossos experimentos, os principais transferases encontradas são responsáveis pelo processamento de tRNA, a (Dimethylallyl) adenosine tRNA methylthiotransferase MiaB. Aminoacil-tRNAsintetase, segunda classe com maior porcentagem, em ambos os tratamentos, também está ligada com a síntese protéica. Em ambos os casos, a célula bacteriana se encontra em ambiente que demanda uma grande mudança metabólica seja por ter que acessar fontes de carbono internas como o polihidroxitubirato, já que não há fonte de carbono externa (caso do controle), seja por ter que se adaptar a utilizar compostos BTEX como fonte de carbono.

Figura 18 – Gráfico mostrando as classes de proteínas identificadas exclusivamente nas bactérias crescidas apenas em meio BH. Uma maior ocorrência de proteínas do grupo das Transferases foram encontradas, seguidas de Aminoacil-tRNAsintetase e Oxiredutase. As classes aparecem em seu valor percentual.



Fonte:autor

Figura 19 – Gráfico mostrando a participação das classes de proteínas identificadas exclusivamente nas bactérias que foram crescidas em meio BH com adição de gasolina comercial. Ao total foram identificadas 338 proteínas. Uma maior ocorrência de proteínas do grupo das Transferases foram encontradas, seguidas de Ligase e Aminoacil-t-RNAsintetase. As proteínas aparecem no gráfico com seu valor percentual.



Fonte: autor

A classe das oxiredutases também foi consideravelmente freqüente em ambos os tratamentos. Esta classe de proteínas é responsável pelas reações redox intracelulares, reações estas que podem ser importantes para a célula em processos de desintoxicação celular ou mesmo qualquer tipo de *stress* metabólico. Por fim, as proteínas pertencentes à classes das Ligases, com alta porcentagem no grupo tratado, está relacionada basicamente à alta quantidade de divisões celulares e na formação de parede celular, processos realizados pela enzima UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase, a proteína ligase mais freqüente em nossos dados.

Alguns estudos mostram que a técnica de Eletroforese bidimensional é capaz de detectar diferenças, na expressão de proteínas, entre microorganismos submetidos à ambientes contaminados e ambientes sem poluição (SINGH; NAGARAJ, 2006; WANG *et al.*, 2000). Em nossos resultados, foi perceptível a diferença entre o crescimento com gasolina comercial e o crescimento apenas em meio mínimo. As diferenças foram principalmente na quantidade de proteínas expressas, na intensidade de algumas proteínas e na presença de enzimas que atuam na degradação do catecol no crescimento suplementado com gasolina comercial. Kim *et al.* (2006) identificaram em torno de oitenta proteínas diferencialmente expressas em *Pseudomonas putida* KT2440 submetidas ao

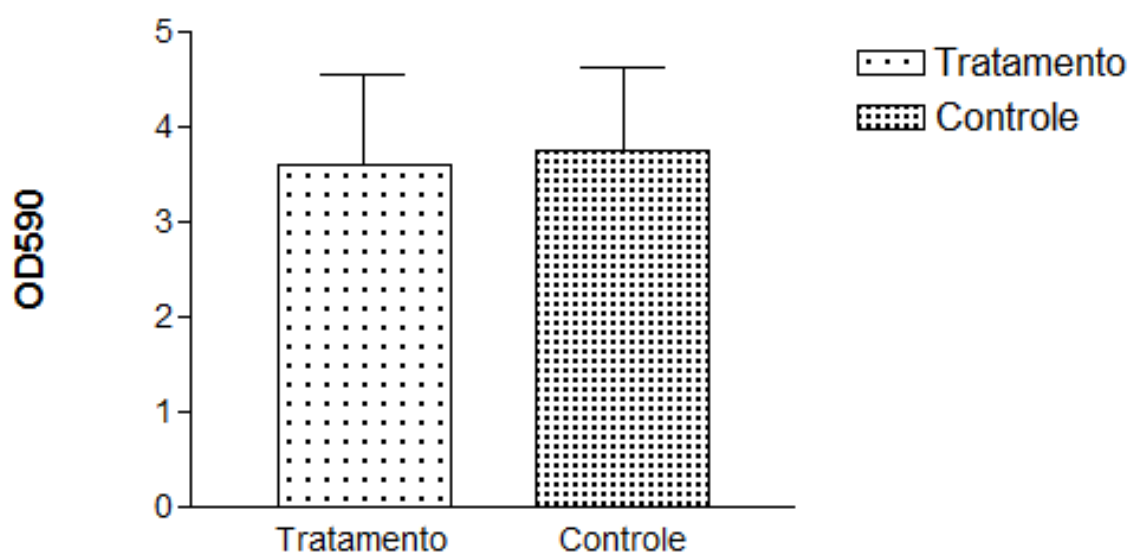
crescimento com seis diferentes tipos de poluentes. A espécie de mesmo gênero *Burkholderia cepacia* MBA4, também mostrou ser bastante resiliente a ambientes contaminados ao expressar proteínas unicamente durante o processo de degradação do monocloroacetato. As diferenças de expressão destas proteínas foi claramente sensível à técnica de eletroforese bidimensional (KWON *et al.*, 2007).

A técnica de 2D se mostrou bastante eficiente em mostrar o potencial biotecnológico de biodegradação de *Burkholderia* SMF090 à gasolina comercial, principalmente se for utilizada como análise prévia para futuras investigações em espectrometria de massa.

5.3 Formação de biofilme de *Burkholderia* SMF090

Os experimentos para analisar a formação de biofilme demonstraram um grande potencial da bactéria na formação de biofilme em presença e ausência de gasolina comercial (Figura 20). Os resultados sugerem que o poluente estudado não interfere na formação de biofilme pela bactéria, visto que não parece haver diferenças entre os crescimentos no grupo controle e tratado.

Figura 20 – Gráfico da análise da formação de biofilme de *Burkholderia* SMF090 em placas *Elisa*, em meio TY, com adição de gasolina comercial e sem o poluente.



Devido às suas características como tamanhos reduzidos, elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares que as protegem do meio circundante, as bactérias são, dentre todos os micro-organismos, consideradas como excelentes produtoras de biofilme (CHARACKLIS *et al.*, 1990).

A formação destas estruturas é extremamente relevante quanto ao potencial de utilização da bactéria como biorremediador, inclusive sugerindo a possibilidade do uso de consórcios de bactérias na biorremediação, uma alternativa também muito promissora e mais eficiente (AL-BADER *et al.*, 2013).

Análises mais acuradas devem ser realizadas a fim de determinar a capacidade de associação destas bactérias na formação destas estruturas biológicas.

6. CONCLUSÕES

Burkholderia SMF090 tem a capacidade de se proliferar em meio contendo apenas gasolina comercial como fonte de carbono, no entanto, sua eficiência no aumento de biomassa é maior à medida que o tempo de exposição ao poluente também aumenta, o que sugere a necessidade de uma prévia adaptação da célula bacteriana.

O perfil proteômico da bactéria é diferente quando esta é submetida à gasolina comercial. As diferenças são na maior quantidade de proteínas expressas e nas proteínas que participam da via de degradação do catecol, exclusivamente expressas nas bactérias submetidas ao crescimento com gasolina.

A bactéria tem potencial de formação de biofilme, sendo este resultado passível de maiores estudos futuramente.

7. REFERÊNCIAS:

ATLAS, R. M. Fate of petroleum pollutants in arctic ecosystems. **Water Science Technology**, vol. 18 (2), p. 59-67, 1995.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO (ANP). Vendas, pelas distribuidoras associadas ao Sindicom e Mercado ANP, dos derivados Combustíveis de Petróleo e Etanol Hidratado- 2000-2010 (m3), 2010. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=4236>. Acesso dia 20/09/2010.

BALDWIN, B. R., NAKATSU, C. H., NIES, L.. Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time pcr. **Applied Environmental Microbiology**. Vol.69, n.6, p.3350-3358. Jun, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRITO, D.D. Avaliação do potencial de biodegradação de gasolina por bactérias do gênero *Burkholderia*. 2012. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) 72f. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Sobral. 2012.

BUSO, G. S. C. Marcadores Moleculares e Análise Filogenética. **Documento 137**, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília –DF. 22p. dez. 2005.

BORDEL, S.; MUÑOZ, R.; DÍAZ, L. F.; VILLAVERDE, S.. New insights on toluene biodegradation by *Pseudomonas putida* F1: influence of pollutant concentration and excreted metabolites. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.74, n.4, p.857-866, nov. 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**. vol. 25, p. 1327-1333, mai. 2004.

CASTELLANOS, N. A. M.. **Avaliação do sistema de mobilização de poli-3-hidroxibutirato em *Burkholderia sacchari***. 2010. Tese (Doutorado em Biotecnologia). 112f. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.

CAVALCA, L.; GENNARO, P.; COLOMBO, M.; ANDREONI, V.; BERNASCONI, S.; RONCO, I., BESTETTI, G. Distribution of catabolic pathways in some hydrocarbon-degrading bacteria from a subsurface polluted soil. **Research in Microbiology**. v. 151, p. 877-887. jul.2000.

CHAN, C., STEAD, D.E., COUTTS, R.H.A. Development of a species-specific *recA*-based PCR test for *Burkholderia fungorum*. **FEMS Microbiology Letters**. n. 224, p.133-138, jun. 2003.

COENYE, T., VANDAMME, P., GOVAN, J.R.W., AND LIPUMA, J.J. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal Clinical Microbiology**. v.39,

n. 10. p. 3427–3436. out. 2001.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**. v.5, n. 9. p. 719–729. jul. 2003.

COMPANT, S.; NOWAK, J.; COENYA, T.; CLEMENT, C.; BARKA, E. A. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. **FEMS Microbiology Reviews** v. 32. N. 4. p. 607-626. abr. 2008.

DIÁZ, E., FERRÁNDEZ, A., PRIETO, M. A. AND GARCÍA, J. L. Biodegradation of Aromatic Compounds by *Escherichia coli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** v. 65, n. 4. p. 523-569. dez. 2001.

GONZALEZ, C.F., VENTURI, V., AND ENGLEADOW, A.S. The phytopathogenic *Burkholderia*. In **Burkholderia: Molecular Microbiology and Genomics**. Coenye, T., and Vandamme, P. (eds). Norfolk. UK: Horizon Bioscience, pp. 153–177. 2007.

HENDRICKX, B.; Juncac, H.; Vosahlovad, J.; Lindnere, A.; Rüeggf, I.; Bucheli-Witschelf, M.; Faberg, F.; Eglif, T.; Maue, M.; Schlömanne, M.; Brennerovad, M.; Brennerd, V.; Pieperc, D. H.; Topb, E. M.; Dejonghea, W.; Bastiaensa, L.; Springael, D.. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: Distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. **Journal of Microbiological Methods**. v. 64, n. 2, p. 250-265, fev. 2006.

HOWIESON, J. G.; DEMEYER, S. E.; VIVAS-MARFISI, A.; RATNAYAKE, S.; ARDLEY, J. K.; YATES, R. J.. Novel *Burkholderia* bacteria isolated from *Lebeckia ambigua* – A perennial suffrutescent legume of the fynbos. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 60. p. 55-64. mai.2013.

JIMÉNEZ, J. I.; MIÑAMBRES, B.; GARCÍA, J. L.; DÍAZ E. Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. **Environmental Microbiology**. v. 4, n. 12. p. 824-841. dez. 2002.

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

KAO, C. M.; WANG, C. C. Control of BTEX migration by intrinsic bioremediation at a gasoline spill site. **Water Research**. v.34, n.13, p.3413-3423, set. 2000.

KIM, Y. H.; CHO, K.; YUN, S.H.; KIM, J. Y.; KWON, J. S.; KIM, S. I. Analysis of aromatic catabolic pathways in *Pseudomonas putida*KT 2440 using a combined proteomic approach: 2-DE/MS and cleavable isotope-coded affinity tag analysis. **Proteomics**. n. 6. p.1301-1318. fev. 2006.

KWON, S.Y.; SIU, A. F.; NGAI, S.M.; CHE, C. M.; TCHANG, J. S. H. Proteomic analysis of *Burkholderia cepacia* MBA4 in the degradation of monochloroacetate. **Proteomics**. n.7, p.1107-1116. mar. 2007.

MARCHETTI, M. D. **Tratamento de águas subterrâneas contaminadas por BTEX utilizando processo oxidativo de fenton**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica).

2009. 89f. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2009.

MASSON-BOIVIN, C.; GIRAUD, E.; PERRET, X.; BATUT, J. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? **Trends in Microbiology** v. 17, n. 10, p. 458-466. out. 2009.

MENDONÇA, T. T. **Avaliação do potencial de *Burkholderia sacchari* produzir o copolímero biodegradável poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato)**. Dissertação (Mestrado em Ciências). 2009. 131f. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 2009.

MERSACH, M. B.; NAKATSU, C.; NIES, L. Development of catechol 2,3- dioxygenase-specific primers for monitoring bioremediation by competitive quantitative pcr. **Applied Environmental Microbiology**. vol. 66, n.2, p. 678-683. fev. 2000.

MORLETT-CHÁVEZ, J. A.; ASCACIO-MARTÍNEZ, J. A.; RIVAS-ESTILLA, A. M.; VELÁZQUEZ-VADILLO, J. F.; HASKINS, W. E.; BARRERA-SALDAÑA, H. A.; ACUÑA-ASKAR, K. Kinetics of BTEX biodegradation by a microbial consortium acclimatized to unleaded gasoline and bacterial strains isolated from it. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v.64, n.7, p.581-587. out. 2010.

PAYNE, G.W.; VANDAMME, P.; MORGAN, S.H.; LIPUMA, J.J.; COENYE, T.; WEIGHTMAN, A.J.; .Development of a *rec A* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. **Applied Environmental Microbiology**. v.71. n. 7. 3917–3927. jul. 2005.

PÉREZ-PANTOJA. D.; DONOSO, R.; AGULLÓ, L.; CÓRDOVA, M.; SEEGER, M.; PIEPER, D. H.; GONZÁLEZ, B. Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in *Burkholderiales*. **Environmental Microbiology**. v. 14, n. 5. p.1091-1117. mai. 2012.

PIEPER, D., REINEKE, W. Engineering bacteria for bioremediation. **Current Opinion Biotechnology**. v.11.n.3. p. 262-270 , jun. 2000.

RESENDE, A. A. **Mecanismos gerais de degradação bacteriana dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX)**. 2007. 64f. Monografia (Especialização em Microbiologia Ambiental e Industrial). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2007.

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, n.1. p. 207-218, jan. 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. **Jornal of proteomics**, v. 73. n. 8. p. 1461-1478. jun. 2010.

SCHÖNMANN, S., LOY, A., WIMMERSBERGER, C., SOBEK, J., AQUINO, C., VANDAMME, P., FREY, B., REHRAUER, H., EBERL, L. 16S rRNA gene-based phylogenetic microarray for simultaneous identification of members of the genus

Burkholderia. **Environmental Microbiology**. v. 11, n. 4. p. 779-800. abr. 2009.

SILVA, F. L. N.; JR, J. R. S.; NETO, J. M. M.; DA SILVA, R. L. G. P.; FLUMIGNAN, D. L.; OLIVEIRA, J. E. Determinação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos em gasolina comercializada nos postos do estado do Piauí. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 56-60, 2009.

SINGH, O. V., NAGARA J, N. S. Transcriptomics, proteomics and interactomics: unique approaches to track the insights of bioremediation. **Briefings Functional Genomic**.v.4, n.4, 355–362. fev. 2006.

SINGH, R.; CELIN, M. Biodegradation of BTEX (Benzene, Toluene, EthylBenzene and Xylene) Compounds by Bacterial Strain under Aerobic Conditions. **Journal of Ecobiotechnology**. v.4. n.2. p.27-32. ago. 2010.

SINGH, O.V. Proteomics and metabolomics: The molecular make-upof toxic aromatic pollutant bioremediation. **Proteomics**. n. 6. p. 5481-5492. jun.2006.

SOUSA, F. W. **Estimativa da exposição e risco de câncer a compostos carbonílicos e BTEX em postos de gasolina na cidade de Fortaleza, CE**. 2011. 212f. Tese (doutorado Saneamento Ambiental). Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2011.

SOUSA, F.W.; CARACAS, I. B.; NASCIMENTO, R. F.; CAVALCANTE, R. M. Exposure and cancer risk assessment for formaldehyde and acetaldehyde in the hospitals, Fortaleza-Brazil. **Building and Environment**, vol. 46, n. 11, p. 2115-2120, nov. 2011.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª Edição. Editora Artmed. Porto Alegre. 894p. 2005.

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

VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., DE VOS, P., KERSTERS, K., SWINGS, J. Polyphasictaxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 60. n. 2. p. 407– 38. jun. 1996.

VAN HAMME, J., SINGH, A., and WARD, O. P. Recent Advances in Petroleum Microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.67, n.4, p. 503-549. dez. 2003.

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

WANG, R. F., WENNERSTROM, D., CAO, W. W., KHAN, A. A., CERNIGLIA, C. E. Cloning, Expression, and Characterization of the *katG* Gene, Encoding Catalase-Peroxidase, from the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1. **Applied Environmental Microbiology**. n.66. n.10. p. 4300–4304. out. 2000.