LOUISE HASE GRACIOSO

**Análise das proteínas expressas em resposta ao fenol em
bactérias isoladas da zona industrial de Cubatão-SP**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título
de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2012

LOUISE HASE GRACIOSO

**Análise das proteínas expressas em resposta ao fenol em
bactérias isoladas da zona industrial de Cubatão-SP**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Elen Aquino Perpetuo

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Gracioso, Louise Hase.

Análise das proteínas expressas em resposta ao fenol em bactérias isoladas da zona industrial de Cubatão-SP / Louise Hase Gracioso. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Elen Aquino Perpetuo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Biodegradação de poluentes de origem industrial.

Versão do título para o inglês: Analysis of expressed proteins in response to phenol in bacteria isolated from the industrial area of Cubatão-SP.

1. Fenol 2. Biodegradação 3. Proteômica I. Perpetuo, Profa. Dra. Elen Aquino II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0173/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Louise Hase Gracioso.

Título da Dissertação: Análise das proteínas expressas em resposta ao fenol em bactérias isoladas da zona industrial de Cubatão-SP.

Orientador(a): Profa. Dra. Elen Aquino Perpetuo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Tem esta o objetivo de informar que o CEPEMA-POLI-USP não possui um Comitê de Ética. O CEPEMA é fruto de um TAC assinado em abril de 2004, pelo Ministério Público, a Petrobras, CETESB, USP e FUSP. Neste TAC, o prédio do CEPEMA, construído pela Petrobras, foi doado à USP. Atualmente, o CEPEMA está vinculado à Escola Politécnica da USP com a missão de trabalhar junto com os setores produtivo e público na baixada santista, na resolução de problemas relacionados ao Meio Ambiente, porém a Escola Politécnica também não possui um Comitê de Ética.

Desse modo, venho informar que o projeto desenvolvido neste trabalho de mestrado, sob minha orientação, não envolve sob nenhum aspecto o uso de animais ou experimentação em humanos.

Dr^a. Elen Aquino Perpetuo

Dedico este trabalho à minha avó Irene Valverde (*in memoriam*),
onde quer que ela esteja, sei que está orgulhosa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda paciência, por todas as alegrias, pela saúde e pela força que me concedeu para que eu pudesse chegar até aqui. Agradeço a Ele também por ter colocado em meu caminho todas as pessoas que me ajudaram e que me apoiaram nesta etapa da minha vida.

À Dra. Elen Aquino pela oportunidade, pela orientação e pela importante contribuição para o meu desenvolvimento acadêmico. Obrigada por me mostrar o melhor caminho nas horas em que os experimentos não davam certo. Só tenho a agradecer pela amizade e compreensão.

Ao Prof. Dr. Claudio Oller pela contribuição para realização deste trabalho.

À Dra. Marinalva Martins pela ajuda na área de biologia molecular, por abrir a porta do laboratório para que eu pudesse terminar os meus experimentos.

À Dra. Anita Mendes pela ajuda nas análises do MALDI/TOF e ao Rodrigo Ricardo que também muito me ajudou a utilizar e analisar os resultados do MALDI.

Ao Bruno Karolski por também me ajudar na área de biologia molecular e acima de tudo na área de bioinformática.

Quero agradecer também à Dra. Luciana Gimenez, que chegou recentemente ao laboratório, mas também me ajudou a finalizar meu trabalho, além de colocar uma pressãozinha (rs), mas tenho certeza que era por uma causa boa para que este trabalho ficasse muito bom.

Aos técnicos e amigos de laboratório. Primeiramente agradecer a amizade de todas. À Me. Ingrid Avanzi, que me ajudou, desde o trabalho de conclusão de curso até o mestrado. À Rafaela Araújo, pelos momentos de risada e descontração. À minha grande amiga Marcela Galluzzi, que me ensinou a ser rigorosa com a parte química de laboratório, além de ter me ajudado muito, chorando comigo nos momentos de desespero e pulando nos momentos de alegria. Ao Luciano, por sempre estar disposto a arrumar os equipamentos que queimavam um fusível ou algo do tipo. Ao Osmar, que chegou recentemente, mas já auxiliou nas compras de laboratório.

A meus pais que tanto amo, Eliana e Antonio, muito obrigado pelo carinho, compreensão nos meus momentos de estresse, pela força e torcida, além da grande ajuda para enfrentar os desafios.

Às minhas irmãs Livy, Ludmilla e Larissa e ao Vagner, meu irmão de consideração, obrigada pelo companheirismo, pela paciência e pela torcida.

Aos meus sobrinhos Bruno, Bárbara, Maria Eduarda e João Luis, por me darem amor e carinho, me ajudando assim a ter força para continuar.

Ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia pela concessão da bolsa.

Ao meu namorado Lucas Pizzuti, pela paciência, carinho, amor, torcida e apoio.

“Não são as espécies mais fortes que sobrevivem nem as mais inteligentes, e sim as mais suscetíveis a mudanças.”

Charles Darwin

RESUMO

Gracioso LH. Análise das proteínas expressas em resposta ao fenol em bactérias isoladas da zona industrial de Cubatão-SP. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Os compostos fenólicos pertencem a um grupo tóxico de poluentes ambientais descartados do processo de muitas indústrias tais como refinarias de óleo e indústrias químicas. Embora o fenol possua ação bactericida, alguns micro-organismos adquiriram a habilidade de se adaptar e utilizar este composto como fonte de carbono e energia, através do controle coordenado de vias metabólicas (catabólicas). A expressão destas vias pode ser regulada por: mecanismos de controle globais ou por uma via específica de resposta controlada, porém estes mecanismos ainda não são bem compreendidos. O presente trabalho pretendeu isolar e identificar micro-organismos de um ambiente contaminado para tratamento biológico de efluentes fenólicos, bem como analisar o padrão de proteínas citosólicas expressas em função da exposição à duas diferentes fontes de carbono (glicose ou fenol). As linhagens isoladas de Cubatão-SP foram identificadas pela amplificação e sequenciamento do gene 16S DNAr, resultando em 100 % de similaridade com os gêneros *Achromobacter* e *Pandoraea*. Os ensaios de biodegradação em diferentes concentrações de fenol (200 a 600 mg.L⁻¹) mostraram que as duas linhagens foram capazes de degradar 100 % do fenol. Durante a biodegradação realizada por *Achromobacter* sp. houve a formação de um intermediário identificado através de ensaio enzimático como 2 – hidroximucônico semialdeído. Em contrapartida, na biodegradação realizada por *Pandoraea* sp. não houve a formação de intermediários. Ensaios de biodegradação realizados em shaker utilizando um efluente fenólico real, oriundo de uma refinaria de petróleo, mostraram que as duas linhagens foram capazes de degradar os principais contaminantes (fenol, *o*- e *m*-cresol) em 48 h. As proteínas expressas por *Achromobacter* sp. em resposta ao fenol foram submetidas a eletroforese 2D e os resultados sugerem que a biodegradação do fenol foi realizada através da *meta* clivagem do anel aromático, pois três enzimas desta via foram identificadas (proteína degradação do fenol via *meta*-clivagem, 2- hidroximucônico semialdeído desidrogenase 1 e 4-hidroxi-2-oxovalerate aldolase). Outras enzimas envolvidas no metabolismo celular também foram identificadas, reforçando a hipótese que o fenol altera todo o metabolismo celular, envolvendo as mais diferentes vias metabólicas para que a célula possa superar o estresse celular ocasionado por esta exposição. Ensaios com *Achromobacter* sp. em biorreator, mostraram que esta linhagem pode ser utilizada para tratamento de efluentes fenólicos reais em larga escala, pois houve a completa degradação dos contaminantes fenólicos em aproximadamente 80 h. O efluente tratado biologicamente foi submetido a um pós tratamento com carvão ativo (6% m/v), para a remoção da cor e dos contaminantes residuais. Como resultado, obtivemos um efluente tratado totalmente sem cor, o qual poderia ser reaproveitado em um processo industrial, abrindo novas perspectivas para o reuso de água de uma refinaria de petróleo.

Palavra chave: Fenol. Biodegradação. Proteômica.

ABSTRACT

Gracioso LH. Analysis of expressed proteins in response to phenol in bacteria isolated from the industrial area of Cubatao-SP. [Master's thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Phenolic compounds belong to a toxic group of environmental pollutants discharged from industrial processes, such as oil refineries and chemical industries. Although phenol has bactericidal action, some microorganisms have acquired ability to adapt and use this compound as a source of carbon and energy, through controlling metabolic pathways (catabolic). These pathways' expression must be regulated by: global controlled mechanisms or specific response, but these mechanisms are not completely understood. This work aims to isolate and identify micro-organisms from a contaminated area, for biological treatment of phenolic wastewaters, as well as analyzing the standard of expressed cytosolic proteins in front of two different carbon sources (glucose or phenol). The strains isolated from Cubatao-SP were identified by amplification and sequencing of 16S rDNA, being 100% similar with genera *Achromobacter* and *Pandoraea*. Biodegradation assays at different concentrations of phenol (200 to 600 mg.L⁻¹) showed that both strains were able to degrade completely the contaminant. During *Achromobacter* sp.'s biodegradation was seen the formation of an intermediary identified by enzyme assay as 2-hydroxymuconic semialdehyde. On the other hand, during *Pandoraea* sp.'s biodegradation was seen no formation of intermediates. Biodegradation assays had been performed on shaker using phenolic wastewaters, from an oil refinery. This assay showed that the both strains were able to degrade the main contaminants (phenol, o-and m-cresol) in less than 48 h. *Achromobacter* sp.'s expressed proteins in front of phenol were subjected to 2D electrophoresis and the results suggested that biodegradation of phenol is performed using the *meta* cleavage of the aromatic ring, and three pathway's enzymes have been identified (protein degradation of phenol via *meta*-cleavage, 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase 1 and 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase). Other enzymes involved in cellular metabolism were also identified, confirmed the hypothesis that phenol modifies all cellular metabolism, including very different metabolic pathways for helping cell to overcome against stress caused by this exposure. *Achromobacter* sp.'s assays in bioreactor showed that this strain can be used for treatment of a real phenolic wastewater large-scale, due to its complete degradation of phenolic contaminants in approximately 80 h. After biologically-treatment, wastewater was treated with active carbon powders (6% m/v), and it removed all color and residual contaminants. As a result, we obtained a fully treated wastewater without color, which could be used in an industrial process, opening up new perspectives for the re-use of water from an oil refinery.

Keywords: Phenol. Biodegradation. Proteomic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química do fenol	19
Figura 2 - Vias de degradação do fenol.	28
Quadro 1 - Enzimas envolvidas da degradação dos compostos fenólicos.....	29
Figura 3 - Estratégia para identificação de proteínas por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas.....	41
Figura 4 - Foto microscópica (100 x) das duas linhagens isoladas na zona industrial de Cubatão.	45
Figura 5 - Perfil eletroforético da amplificação do gene DNAr 16S.	48
Figura 6 - Árvore filogenética baseada na seqüência do RNAr 16s construído a partir do alinhamento de dados (1400 nt), mostrando a posição da bactéria isolada do meio ambiente. Com destaque nos valores de <i>Bootstrap</i> >50%.....	49
Figura 7 - Árvore filogenética baseada na seqüência do RNAr 16s construído a partir do alinhamento de dados (1400 nt), mostrando a posição da bactéria isolada do meio ambiente. Com destaque nos valores de <i>Bootstrap</i> >50%.....	50
Figura 8 - Avaliação da biodegradação de fenol em diferentes concentrações (200 a 600 mg.L ⁻¹) por <i>Achromobater</i> sp. ao longo de 16 horas.....	52
Figura 9 - Crescimento celular de <i>Achromobater</i> sp. em meio mínimo mineral contendo diferentes concentrações de fenol como fonte de carbono e energia. 52	
Figura 10 - Cromatograma da biodegradação do fenol (600 mg.L ⁻¹) por <i>Achromobater</i> sp.	53
Figura 11 - Curva de massa seca: correlacionando as leituras de Abs.600 nm com a formação de biomassa.	55
Figura 12 - Gráfico de determinação de velocidade máxima de crescimento (µmáx) pelo tempo.	56
Figura 13 - Avaliação da biodegradação de fenol em diferentes concentrações (200 a 600 mg.L ⁻¹) por <i>Pandoraea</i> sp. ao longo de 26 horas.....	57
Figura 14 - Crescimento celular de <i>Pandoraea</i> sp. em meio mínimo mineral contendo diferentes concentrações de fenol como fonte de carbono e energia. 58	
Figura 15 - Cromatograma da biodegradação do fenol (200 mg.L ⁻¹) por <i>Pandoraea</i> sp.	58

Figura 16 - Curva de massa seca: correlacionando as leituras de Abs. (600 nm) com a formação de biomassa.	59
Figura 17 - Gráfico de determinação de velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) pelo tempo das concentrações de 200 a 400 mg.L ⁻¹	62
Figura 18 - Gráfico de determinação de velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) pelo tempo das concentrações de 500 e 600 mg.L ⁻¹	63
Figura 19 - Cromatograma mostrando que não há ação da enzima catecol dioxigenase, pois não há formação de <i>cis,cis</i> - mucônico ou 2-HMS.....	64
Figura 20 - Gráfico da biodegradação com as duas bactérias <i>Achromobater</i> sp. e <i>Pandoraea</i> sp. nas concentrações de 300 mg.L ⁻¹ a 800 mg.L ⁻¹	65
Figura 21 - Cromatograma da biodegradação do fenol (600 mg.L ⁻¹) por <i>Achromobater</i> sp. e <i>Pandoraea</i> sp.	66
Figura 22 - Cromatograma (GC/MS) da água ácida e identificação dos principais contaminantes.	67
Figura 23 - Gráfico de consumo de compostos fenólicos em 48 h e crescimento microbiano medido por absorbância (600 nm).	68
Figura 24 - Cromatograma da biodegradação de fenóis por <i>Achromobater</i> sp. (48 h).	68
Figura 25 - Gráfico de consumo de composto fenólico em 48 h e crescimento microbiano medido por absorbância (600 nm).	69
Figura 26 - Cromatograma da biodegradação de fenóis por <i>Pandoraea</i> sp. (48 h).	69
Figura 27 - Crescimento microbiano medido por absorbância em espectrofotômetro (λ = 600 nm), comprovando o consumo dos compostos fenólicos.	70
Figura 28 - Gráfico de consumo dos compostos fenólicos em 82 horas.	70
Figura 29 - Cromatograma da biodegradação. Em preto, as concentrações iniciais de fenol, <i>m</i> -cresol e <i>o</i> -cresol respectivamente.	72
Figura 30 - Gráfico de determinação de velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) pelo tempo.	73
Figura 31 - A. Efluente fenólico oriundo de uma refinaria de petróleo sem tratamento. B. Efluente após tratamento com micro-organismo <i>Achromobater</i> sp. C. Efluente após tratamento com carvão ativo.....	74

Figura 32 - Cromatograma do efluente fenólico após tratamento de biodegradação e carvão ativo.	74
Figura 33 - Gel de eletroforese 2D.	76
Figura 34 - Reação química catalisada pela enzima NADH desidrogenase.	77
Figura 35 - Reação química catalisada pela enzima acetil-CoA hidrolase.	78
Figura 36 - Reação química catalisada pela enzima Acil-CoA desidrogenase. .	78
Figura 37 - Reação química catalisada pela enzima succinato desidrogenase.	80
Figura 38 - Esquema do ciclo de Krebs.	81
Figura 39 - Reação química catalisada pela enzima 4-hidroxi-2-oxovalerate aldolase.	82
Figura 40 - Esquema das clivagens do fenol.	82
Figura 41 - Taxa de formação de 2-HMS a partir do catecol como substrato pela ação da catecol 2,3 dioxigenase, comprovado pelo aumento da absorbância a 360 nm.	84
Figura 42 - Cromatograma comparativo do intermediário (2-HMS) gerado durante a degradação do fenol (rosa) e pela ação da catecol 2,3 dioxigenase tendo o catecol como substrato (preto).	85
Figura 43 - Em negrito as proteínas encontradas no gel de eletroforese 2-D, podendo assim elucidar a via de degradação do fenol da cepa <i>Achromobater</i> sp. (via <i>meta</i> clivagem).	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais parâmetros cinéticos de <i>Achromobacter</i> sp. utilizando fenol como substrato único.	55
Tabela 2 - Principais parâmetros cinéticos de <i>Pandoraea</i> sp. utilizando fenol como substrato único.	60
Tabela 3 - Relação das proteínas de <i>Achromobacter</i> sp. expressas na presença de fenol.	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCR – Reação em cadeia da polimerase
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DNAr – Ácido desoxirribonucleico ribossomal
RNAr – Ácido ribonucleico ribossomal
UFCC – Unidades de Craqueamento Catalítico Fluidizado
ETE – Estação de Tratamento de Efluentes Industriais
ATP – Adenosina trifosfato
ACN - Acetonitrila
mPH – Fenol hidroxilase multi-componente
1,2 CDO – Catecol 1,2 dioxigenase
2,3 CDO – Catecol 2,3 dioxigenase
Tris – Tris (hidroximetil) aminometano
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
SDS – Dodecil sulfato de sódio
DTT – Ditionitrito
dNTPs – Desoxinucleotídeo trifosfato
TAE - Tampão Tris-Acetato-EDTA
CG/MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
rpm – Rotações por minuto
TCA – Ácido tricloroacético
pb- Pares de base
HPLC – Cromatografia de alta eficiência
DGGE – Eletroforeses em gel de gradiente desnaturante
2-HMS – 2-hidroximucônico semialdeído
NCBI - “National Center for Biotechnology Information”
BLAST – “Basic Local Alignment Search Tool”

LISTA DE FÓRMULAS E SÍMBOLOS

FeSO_4 – sulfato de ferro

MgSO_4 – sulfato de magnésio

CaCl_2 – cloreto de cálcio

NH_4Cl – cloreto de amônia

Na_2HPO_4 – hidrogenofosfato de sódio

KH_2PO_4 - diidrogenofosfato de potássio

HCl – ácido clorídrico

NH_4HCO_3 – Bicarbonato de potássio

KHCO_3 – bicarbonato de amônio

CO_2 – dióxido de carbono

D – Ácido aspártico

E – Ácido glutâmico

R – Arginina

N – Asparagina

Q – Glutamina

H – Histidina

k – Lisina

S – Serina

Y – Tirosina

T – Treonina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Efluentes fenólicos	20
1.2 Isolamento e identificação dos micro-organismos	21
1.3 Biodegradação do fenol	23
1.4 A proteômica como ferramenta no entendimento da resposta regulatória global	30
2 OBJETIVOS	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Meios e soluções	35
3.2 Isolamento e identificação dos micro-organismos	35
3.1.1 Reação de sequenciamento Sanger	36
3.1.2 Reação de precipitação para sequenciamento Sanger	36
3.3 Micro-organismos, meio e condições de cultivo	37
3.4 Caracterização do efluente fenólico	37
3.5 Ensaios de biodegradação do fenol	38
3.6 Ensaios de biodegradação de efluentes fenólicos	39
3.7 Ensaios de biodegradação de efluentes fenólico em biorreator	39
3.8 Tratamento com carvão ativo	39
3.9 Peso seco	39
3.10 Preparação das amostras para Eletroforese 2D	40
3.11 Eletroforese 2D	41
3.12 Digestão com tripsina	42
3.13 Identificação das proteínas através das massas dos peptídeos - “ <i>fingerprinting</i> ” - e busca em banco de dados	43
3.14 Ensaio enzimático	43
3.14.1 Preparação do extrato celular	43
3.14.2 Atividade catecol 1,2 dioxigenase	44
3.14.3 Atividade catecol 2,3 dioxigenase	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Identificação dos micro-organismos	45
4.2 Biodegradação do fenol	50
4.2.1 <i>Achromobacter sp.</i>	50

4.2.2 <i>Pandoraea sp.</i>	56
4.2.3 Ensaio enzimático <i>Pandoraea sp.</i>	63
4.2.4 Consórcio microbiano.....	64
4.2.5 Biodegradação do efluente fenólico em “shaker”.....	66
4.2.6 Biodegradação do efluente fenólico em biorreator.....	70
4.3 Protômica da linhagem de <i>Achromobater sp</i>	75
5 CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS*	89
ANEXO - Autorização de coleta de material microbiológico.....	96

1 INTRODUÇÃO

Os compostos aromáticos podem ser definidos como moléculas contendo um ou mais anéis aromáticos, e são considerados um dos mais presentes e persistentes poluentes distribuídos no meio ambiente. Entre eles, os compostos fenólicos são considerados os mais importantes, pois são provenientes de vários segmentos industriais tais como: indústrias químicas, petroquímicas, resina epóxi, coquerias e como solventes em algumas indústrias de tintas. Além disso, o fenol é uma unidade estrutural básica para uma variedade de outros compostos orgânicos sintéticos, incluindo produtos químicos agrícolas e hortícolas, pesticidas e carvão (Nair et al., 2008).

Em função deste grande uso, estes compostos são listados como principais poluentes ambientais pelas agências de proteção ambiental de vários países (Monteiro et al., 2000). Particularmente, devido à presença de um grande pólo industrial, os compostos fenólicos são poluentes comuns na região de Cubatão - SP.

Os fenóis são compostos orgânicos que possuem o grupo hidroxila (- OH), ligado de forma direta ao carbono do núcleo benzênico (Fig. 1). O grupo OH também é denominado hidróxi, por isso os fenóis também são chamados de hidroxibenzenos.

O fenol apresenta alta solubilidade em água (82 g.L^{-1}), é sólido, incolor, apresenta caráter ácido, sendo extremamente tóxico ao homem e a fauna aquática. Possui ação bactericida, devido ao mecanismo de coagular proteínas de micro-organismos, como as bactérias e fungos, mas apesar disto, muitos micro-organismos são capazes de utilizá-lo como fonte primária de carbono e energia (biodegradação), transformando-os em produtos menos tóxicos.

Figura 1 - Estrutura química do fenol

1.1 Efluentes fenólicos

Os efluentes de plantas industriais, tais como refinarias, gaseificadores de coque e plantas petroquímicas, frequentemente contêm elevados teores de compostos orgânicos, entre eles os compostos fenólicos. Suas concentrações podem variar muito, podendo estar entre 0 a 22 mg.L⁻¹ para água de produção de petróleo e gás, ou ainda variar entre 100 a 1000 mg.L⁻¹ para outros processos industriais. A água ácida que é gerada nas Unidades de Craqueamento Catalítico Fluidizado (UFCC) de uma refinaria de petróleo, representa um dos principais exemplos de efluentes fenólicos que ainda não possuem tratamento adequado, uma vez que não pode ser alinhada para a Estação de Tratamento de Efluentes Industriais (ETE), pois está contaminada principalmente por fenóis e também por H₂S, NH₃, HCN, mercaptanas, hidrocarbonetos e outros, em menor proporção. Mais especificamente, as águas ácidas são soluções fenólicas aquosas contendo H₂S e NH₃, sendo o teor de H₂S geralmente de até 10.000 mg.L⁻¹. Apesar dos ácidos serem predominantes, geralmente o pH da água ácida é maior que 7,0, devido a presença de amônia (base forte). Por estas razões, estas águas residuárias necessitam de um tratamento especial, pois consomem altos valores de oxigênio e conseqüentemente os aeradores da Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) não conseguiriam fornecer oxigênio necessário para manter os micro-organismos ativos. Porém, estas águas, se tratadas, podem ser reutilizadas voltando ao processo como água de reposição para purga de torre de resfriamento, por exemplo.

Uma boa solução para tratar este problema é procurar no ambiente, micro-organismos que possuam os dispositivos metabólicos apropriados para iniciar a degradação ou diminuir o efeito tóxico de determinados compostos ou que sejam capazes de promover a mineralização destes contaminantes à níveis aceitáveis para seu descarte.

Até 1999, com a publicação da Resolução CEPRAM 2113, o limite de concentração de fenóis para descarte no efluente final era de 10 mg.L⁻¹, porém a resolução CONAMA nº 357 (2005) definiu como padrão de lançamento para efluentes industriais o teor de 0,5 mg.L⁻¹ de fenóis totais. No Brasil, o Ministério da Saúde determinou que o limite máximo permitido de fenol em águas destinadas ao abastecimento público seja de 0,1 µg.L⁻¹ (Brasil, 1990) a fim de evitar danos à saúde humana (Britto et al., 2008).

1.2 Isolamento e identificação dos micro-organismos

Na natureza os micro-organismos encontram-se formando populações mistas (vários tipos de micro-organismos que pertencem a um mesmo habitat). Por outro lado, o desenvolvimento da microbiologia assim como todos os procedimentos laboratoriais para o diagnóstico depende da obtenção do crescimento dos micro-organismos na forma de populações puras, que quando crescidas em meios de cultura denominam-se culturas puras ou axênicas (populações homogêneas quanto ao tipo de micro-organismo, cultivados em meios de cultura sem a presença de outras formas de vida contaminantes). A obtenção de uma cultura pura a partir de uma cultura mista denomina-se isolamento, conseguido através da semeadura dos micro-organismos na superfície de meios de cultura sólidos em placas de Petri, o que permitirá a formação de colônias (que são populações isoladas que crescem na superfície destes meios (Demain, Davies, 1999)).

O sucesso de um programa de biorremediação de áreas contaminadas dependerá, em parte, de um bom planejamento inicial sobre isolamento e seleção de um micro-organismo ou de um consórcio de micro-organismos eficiente na degradação da molécula em estudo. O isolamento permite estudar com mais detalhes as vias metabólicas, enzimas, produtos intermediários e etc. Solos, sedimentos e águas contaminadas com compostos xenobióticos são substratos adequados para isolamento de micro-organismos já adaptados. Geralmente esses xenobióticos são moléculas sintéticas novas, as quais nos fornecem a oportunidade para se estudar a evolução microbiana das novas vias de degradação (Melo, Azevedo, 1997).

O uso de micro-organismos isolados tem como finalidade, em muitos casos, a biorremediação. Para que ocorra a biorremediação em determinada área contaminada, é necessário estimular o crescimento de micro-organismos naturais ou introduzidos nesta área e, assim, fornecer um contato direto, entre micro-organismos e contaminantes.

O isolamento inicia-se com a escolha da fonte mais provável de conter o micro-organismo desejado, podendo variar desde solo até águas, ar, lodo, alimentos, etc. As características que o organismo possui para se desenvolver em determinado ambiente são usadas como fatores seletivos no processo de isolamento. A pressão seletiva é muitas vezes utilizada no isolamento de micro-organismos que se

desenvolvem preferencialmente em determinado substrato, na presença de certos compostos ou no cultivo sob condições que são adversas a outros micro-organismos que não são de interesse (Stanbury et al., 1995).

Tradicionalmente, a detecção e a identificação de bactérias eram realizadas de acordo com os principais meios de obtenção de carbono e energia, suas exigências nutricionais e meio de cultivo para seu crescimento, além da observação direta via microscópio (Herbert, 1990; Kennedy, 1999). No entanto, a utilização dessas metodologias fornecia informações limitadas com necessidade de maior refinamento (Zak et al., 1994). Como alternativas para esses métodos, foram desenvolvidas várias técnicas, dentre as quais se destacam aquelas baseadas nos ácidos nucléicos.

Os métodos moleculares receberam grande impulso com o desenvolvimento da técnica conhecida como PCR. Essa técnica descrita por Saiki et al. (1985), permite amplificar pequenos e específicos segmentos do genoma, permitindo a obtenção, *in vitro*, de várias cópias de determinada região do DNA. Como a reação de PCR é específica, pode-se obter a amplificação de sequências de nucleotídeos-alvo mesmo em uma amostra com grande diversidade de sequências, permitindo a detecção de organismos específicos em misturas heterogêneas.

Já os ácidos ribonucleicos ribossomais (RNAr) são considerados os biopolímeros mais adequados para estudos de diversidade. Seus genes, os DNAr, são universalmente distribuídos entre os diferentes grupos de seres vivos, sendo a molécula com o maior grau de conservação existente. Sua variabilidade pode apresentar-se em maior ou menor extensão em diferentes regiões da molécula (Lane et al., 1985). Uma das vantagens de se usar informações sobre as sequências do RNAr é sua disponibilização em bases de dados (RDP, Gen-Bank, EMBL), na maioria dos casos, acessíveis gratuitamente, permitindo a comparação de novas sequências obtidas com as sequências presentes nessas bases (Coutinho et al., 1999).

O 16S RNAr (± 1500 nucleotídeos) gera grande quantidade de informações úteis para inferências filogenéticas. Apesar de o 23S RNAr (± 3000 nucleotídeos) conter duas vezes mais informação e, portanto, gerar maior segurança nas inferências filogenéticas, a molécula menor (16S RNAr), por causa da maior facilidade de sequenciamento, tornou-se referência. Porém, o 23S RNAr tem sido

utilizado como suplemento para os dados gerados do 16S RNAr em estudos de organismos intimamente relacionados (Stahl, 1997).

1.3 Biodegradação do fenol

O termo biodegradação é utilizado para descrever todo tipo de transformação de uma molécula, seja pela oxidação completa de compostos orgânicos a CO_2 , H_2O , NO_3 e outros compostos inorgânicos, ou pela transformação dos compostos iniciais até mesmo em produtos mais tóxicos (Atlas, Bartha, 1998). A biodegradação é considerada uma tecnologia viável para biorremediação de poluentes orgânicos, pois utiliza a versatilidade metabólica dos micro-organismos para degradar os compostos tóxicos. Neste sentido, as bactérias, que evoluíram há mais de 3 bilhões de anos, desenvolveram estratégias para obtenção de energia a partir de praticamente todos os compostos, mesmo os tóxicos. Elas desempenham um papel crucial no desenvolvimento sustentável da biosfera e no ciclo biogeoquímico. A abundância de micro-organismos, juntamente com a sua grande capacidade para a transferência horizontal de genes e suas altas taxas de crescimento, de mutação e recombinação, lhes permitiu evoluir rapidamente e se adaptar às condições do ambiente em mudança, até mesmo para ambientes extremos que não permite a proliferação de outros organismos vivos. A grande diversidade genética dos micro-organismos é a grande responsável por suas versatilidades metabólicas (De Lorenzo, 2011; Lovley, 2003; Timmis et al., 1999).

O crescimento de micro-organismos ocorre a partir do fornecimento de nutrientes adequados e substratos, como fonte de carbono e energia, na presença de condições favoráveis. Os micro-organismos precisam de macronutrientes para síntese de componentes celulares, tais como nitrogênio para síntese de aminoácidos e enzimas, fósforo para síntese de ATP e DNA, enxofre para síntese de algumas co-enzimas, cálcio para estabilização da parede celular e magnésio para estabilização dos ribossomos. Também necessitam de micronutrientes como traços de ferro, níquel, cobalto, molibdênio e zinco, para a realização de funções metabólicas. Além disso, o controle das condições favoráveis de temperatura, pH, aeração e agitação são fundamentais, pois estas variáveis também influenciam fortemente na atividade microbiana. Diversos fatores influenciam os micro-organismos a utilizar poluentes como substratos ou co-substratos. Portanto, a compreensão das vias catabólicas,

mecanismos e enzimas responsáveis é uma maneira eficaz para definir fatores importantes para que haja uma biodegradação eficiente.

O processo de biodegradação baseia-se em reações de oxido-redução biológica, em presença de um aceptor de elétrons e nutrientes, capazes de decompor a matéria orgânica em substâncias mais simples. A transferência de elétrons é essencial para a respiração celular e libera a energia (ATP) necessária para funções vitais aos micro-organismos. As bactérias aeróbicas utilizam oxigênio como aceptor de elétrons, produzindo gás carbônico e água, e as bactérias anaeróbicas utilizam outros compostos, como nitrato (NO_3^-), íon Fe ($3+$) e sulfato (SO_4^{2-}), produzindo metano e água (Thigueros, 2008).

Na literatura, os micro-organismos mais estudados nos processos de biodegradação do fenol pertencem ao gênero *Pseudomonas*. Bactérias do gênero *Pseudomonas*, pertencem ao grupo de micro-organismos que conseguem utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia. Elas são capazes de colonizar os mais diferentes ambientes e neles têm sido isoladas, tais como água, solo e rizosfera de plantas. Muitas Pseudomonaceae adquiriram a capacidade de utilizar substratos exóticos e/ou tóxicos para seu crescimento, como compostos aromáticos ou hidrocarbonetos. Deste modo, desempenham um papel chave na degradação de poluentes de áreas contaminadas e um grande número de estudos comprova que este gênero é capaz de utilizar o fenol como única fonte de carbono e energia (Kurbatov et al., 2006). Um estudo realizado por Agarry et al. (2008) utilizou duas espécies de *Pseudomonas* para o tratamento de efluente de um refinaria de petróleo nigeriana. Os resultados demonstraram que a espécie *P. aeruginosa* degradou 94,5% de fenol em uma concentração de 100 mg.L^{-1} em 72 horas e a espécie *P. fluorescência* degradou 69,4% de fenol na mesma concentração inicial e no mesmo tempo. Do mesmo modo, Ojumu et al. (2005), relataram uma mineralização completa de 30 mg.L^{-1} de fenol (ou seja, 100% de fenol removido) dentro de 60 h e 84 h utilizando as mesmas espécies de *P. aeruginosa* e *P. fluorescência*, respectivamente.

Annadurai et al. (2002) estudaram a capacidade máxima degradação do fenol por *Pseudomonas putida*, relatando que esta linhagem foi capaz de mineralizar 85% do fenol em uma concentração de 500 mg.L^{-1} , porém não citando o tempo de degradação. González et al. (2001) também relataram a capacidade máxima de

degradação em outra linhagem de *P. putida*, sendo esta considerada mais eficiente por degradar 1000 mg.L⁻¹ em aproximadamente 260 horas.

Afzal et al. (2007) também isolaram, de águas residuárias, duas linhagens capazes de degradar altas concentrações de fenol. Estas linhagens foram identificadas como *P. aeruginosa* e *P. pseudomallei*. *P. aeruginosa* foi capaz de degradar uma concentração inicial de fenol de 2600 mg.L⁻¹, enquanto *P. pseudomallei* degradou 1500 mg.L⁻¹ em aproximadamente 150 horas.

Um trabalho realizado por Shawabked et al. (2007), mostrou que uma linhagem de *Klebsiella oxytoca* foi capaz de biodegradar 75% do fenol em uma concentração inicial de 100 mg.L⁻¹, em 72 horas.

Um estudo realizado por Jiang et al. (2007) com *Alcaligenes faecalis*, isolada de lodo ativado, mostrou que esta linhagem foi capaz de mineralizar 1600 mg.L⁻¹ de fenol em apenas 76 horas, quando foi utilizado um inóculo na fase exponencial. Esta cepa de *A. faecalis* secretou e acumulou uma vasta quantidade de fenol hidroxilase e catecol 1,2 dioxigenase quando estava na metade de sua fase exponencial e continuou até termino desta fase. O fenol foi assimilado até 3-oxoadipate mostrando que *A. faecalis* degradou o fenol através da *orto* clivagem do catecol.

Na literatura, há relatos de uma variedade de outros micro-organismos capazes de degradar fenol, tais como: *Cryptococcus elinovic* (Morsen, Rehm, 1990), *Fusarium flocciferum* (Anselmo et al., 1985), *Alcaligenes eutrophus* (Leonard, Lindly, 1998), *Bacillus sterothermophilus* (Buswell, 1975), *Burkholderia cepacia* G4 (Solomon et al., 1994), *Pseudomonas putida* (Kotturi et al., 1991), *Acinetobacter* sp. strain W-17 (Abd-El-Haleem et al., 2003).

Porém, embora sejam capazes de biodegradar estes compostos, pouco se sabe sobre a origem destes micro-organismos, bem como as mudanças fisiológicas que ocorrem durante o crescimento nestes substratos. Em geral, este crescimento microbiano é complexo e pouco explorado, sendo que diferentes vias de degradação podem ser ativadas.

A via clássica da biodegradação aeróbia de um composto fenólico é iniciada através de sua hidroxilação para então formar catecol (Fig. 2 via 1) (Harayama et al., 1992). Este passo é catalisado pela fenol hidroxilase (fenol 2-monooxigenase, E.C. 1.14.13.7), o qual é considerado um passo limitante na via degradativa. Existem 2 tipos de fenol hidroxilases bacterianas, uma uni-componente e outra multi-componente. Entre elas, a fenol hidroxilase multi-componente (mPH) é considerada

a maior enzima existente no meio ambiente natural (Futamata et al., 2001). Muitos genes que codificam para mPH têm sido clonados e sequenciados de bactérias que degradam fenol. Todas essas mPHs são similares em sua estrutura enzimática, possuem 6 subunidades, entre as quais o sítio catabólico que está na maior subunidade (aproximadamente 60 kDa). Algumas destas enzimas têm exibido diferentes especificidades aos substratos fenólicos (Teramoto et al., 1999). O segundo passo é a quebra do intermediário formado (catecol) através da abertura do anel aromático, pela ação das catecol dioxigenases, onde o catecol é degradado pelas vias *orto* clivagem (Fig 2 via 5) pela enzima catecol 1,2 dioxigenase (1,2 CDO) ou *meta* clivagem (Fig 2 via 4) pela enzima catecol 2,3 dioxigenase (2,3 CDO) (Nair et al., 2008). Os produtos gerados a partir desta quebra são transformados em produtos do metabolismo celular, até a formação de CO₂ e água (mineralização). Em alguns casos, pode haver degradação parcial ou ainda simplesmente a biotransformação de um composto aromático em outros intermediários, que podem ao invés de diminuir, aumentar a toxicidade do meio ambiente (Kalbitz et al., 2003). Por esta razão, é muito importante que haja o monitoramento de todos os intermediários formados durante todo o processo de biodegradação.

Apesar da via mais conhecida de biodegradação de fenol, ser através da sua conversão em catecol, um estudo enzimático realizado por Jones et al. (1995) propôs duas vias de metabolização do fenol em *Aspergillus fumigatus* (Fig. 2 via 2). Em uma rota, o fenol é degradado pela via clássica (*orto* hidroxilação) para então formar catecol (Fig. 2 - B); e na outra via, o fenol é hidroxilado na posição 3 (*para* hidroxilação) produzindo hidroquinona (Fig. 2 - E) que posteriormente é convertida em 1,2,4-trihidroxibenzeno, o qual pela ação da 1,2,4-trihidroxibenzeno dioxigenase, é convertido em maleilacetato.

Apesar de diferentes vias serem utilizadas pelos micro-organismos para a biodegradação do fenol, sempre há a formação de um intermediário aromático, seja catecol ou hidroquinona, antes que haja a abertura do anel benzênico. Somente em um estudo realizado por Zhu et al. (2008), foi relatada a conversão direta de fenol em 2- hidroximucônico semialdeído (2-HMS) através da ação da enzima catecol 2,3 dioxigenase. Neste estudo *Alcaligenes faecalis* IS-46 foi capaz de degradar o fenol (Fig. 2 via 3) pela via *meta* diretamente em 2-HMS.

No presente trabalho, verificamos que a linhagem isolada de *Achromobacter* sp. também degradou o fenol diretamente em 2-HMS, sendo esta a primeira vez que tal resultado é descrito no gênero *Achromobacter*.

Além das enzimas específicas, como a fenol hidroxilase ou as catecol-dioxigenases, muitas outras enzimas podem estar envolvidas no processo de biodegradação do fenol. O Quadro 1 mostra que, entre essas enzimas, encontram-se oxigenases hidrolases, peroxidases, tirosinases e oxidases.

Figura 2 - Vias de degradação do fenol.

A. Fenol; B. Catecol; C. 2-hidroximucônico semialdeído; D. *cis,cis* - mucônico; E. Hidroquinona; F. 1,2,4- trihidroxibenzeno; G. maleilacetato; H. 2- hidroximuconato; I. 2- oxalocronato; J. Muconolactona; K. Acetil CoA 1. *orto* hidroxilação do fenol formando catecol. 2. *para* hidroxilação formando hidroquinona. 3. Fenol sendo degradado por *meta* clivagem formando diretamente 2- hidroximucônico semialdeído. 4. *meta* clivagem do catecol. 5. *orto* clivagem do catecol.

Quadro 1 - Enzimas envolvidas da degradação dos compostos fenólicos.

Composto alvo	Enzima	Referência
Fenol	Fenol hidroxilase	Gurujeyalaksmi e Oriel (1988)
Fenol	Polifenol oxidase	Cano et al. (1997) Shashirekha et al. (1997) Luke e Burton (2001) Edwards et al. (1999) Garzillo et al. (1998) Steffens (2002)
Fenol	Fenol oxidase	Okeke et al. (1997) Johjima et al. (2003)
Fenol	Catecol 2,3 dioxigenase	Ali et al. (1998) Zhu et al. (2008)
Fenol	Lacase	Schneider et al. (1999) Hublik e Schinner (2000) Robles et al. (2000)
Metoxifenol	Lacase	Setti et al. (1999)
Fenol	Catecol 1,2 oxigenase	Na et al. (2001)
Bisfenol	Peroxidase	Sakurai et al. (2001)
Lignofenol	Peroxidase	Xia et al. (2003)
Fenol	Tirosinase	Xiangchun (2003)

Fonte: Nair et al., 2008.

Segundo os estudos descritos no Quadro 1, existem algumas enzimas que são capazes de utilizar o fenol como substrato principal e que podem ser utilizadas para os processos de biodegradação.

Considerando o fato da região de Cubatão possuir um grande histórico de poluição ambiental e sendo os compostos aromáticos um dos poluentes mais comuns, os micro-organismos ali presentes, possivelmente, adquiriram uma grande capacidade de utilizar estes poluentes como fonte carbono e para isso desenvolveram um sistema enzimático altamente especializado.

Esta utilização de diferentes fontes de carbono e energia requer o controle coordenado de vias metabólicas (catabólicas). A expressão destas vias pode ser regulada por (a) mecanismos de controle globais ou (b) por uma via específica de resposta controlada. Uma série de fatores e mecanismos provavelmente está envolvida nas alterações celulares sofridas em resposta à pressão ambiental (Morales et al., 2004; Ruiz-Manzano et al. 2005; Shingler, 2003). Como os compostos aromáticos não são os substratos preferenciais dos micro-organismos, a expressão (indução) de genes que codificam para estas vias degradativas é regulada (reprimida) dependendo da disponibilidade e/ou concentração das fontes de carbono (Collier et al., 1996; Duetz et al., 1994, 1996; Shingler, 2003).

Este mecanismo regulatório, normalmente chamado de repressão catabólica ao carbono (CR) é bem descrito para *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, onde esta CR é somente uma parte da resposta regulatória global da bactéria à pressão ambiental. Embora a CR seja o resultado de uma complexa resposta regulatória global, há evidentes diferenças nestes processos tanto em *E. coli* como em *B. subtilis* (Saier, 1998; Stulke, Hillen, 2000).

Para entender estas diferenças, é possível usar a técnica da proteômica em busca de proteínas que possam estar envolvidas nos mecanismos regulatórios afetados pelas diferentes fontes de carbono.

1.4 A proteômica como ferramenta no entendimento da resposta regulatória global

Recentemente, a proteômica tem sido empregada em muitos estudos de microbiologia ambiental e têm tido um grande impacto nos campos da biodegradação e biorremediação (Seung et al., 2007). A proteômica é uma técnica

efetiva que permite a identificação das proteínas envolvidas nos processos de biodegradação, bem como de suas funções. Através da proteômica é possível saber quais proteínas estão sendo realmente expressas num determinado momento, por uma determinada célula (análise do proteoma). O termo proteoma, é um termo relativamente novo, inicialmente definido em analogia ao termo genoma, e que significa o conjunto de proteínas expressas por um genoma. O genoma de um organismo é praticamente constante, independente de qual célula está sendo analisada. Por outro lado, o proteoma sofre influências diretas de estímulos externos, como ação de drogas, poluição, exposição a compostos tóxicos, etc.

O proteoma é, portanto, o resultado da expressão de um conjunto de genes e das modificações pós-traducionais das proteínas produzidas em resposta a condições ambientais definidas. Em qualquer genoma, 30 a 50% dos genes preditos não apresentam similaridade com outros transcritos conhecidos, ou a similaridade é muito baixa, sugerindo que se trata de proteínas hipotéticas ou desconhecidas. Uma das vantagens da análise proteômica, além do estudo do nível de expressão gênica em condições específicas, é a identificação de proteínas que sofrem modificações pós-traducionais e que não são detectadas por análise do genoma (Abhilash, 2009).

Deste modo, o novo desafio é atribuir função a cada proteína e elucidar sua interação com outras proteínas e macromoléculas na célula. As proteínas não são moléculas solitárias, pelo contrário suas funções são mediadas por suas interações com outras moléculas. Assim, permitem que etapas diferentes em um processo biológico sejam combinadas. Mantendo as enzimas na forma de um complexo, uma série de reações enzimáticas torna-se mais eficiente e também mantém possíveis intermediários tóxicos dentro do complexo, limitando possíveis danos as outras partes da célula.

Com o desenvolvimento das técnicas de espectrometria de massas para a identificação de quantidades ínfimas de proteínas, juntamente com o desenvolvimento de técnicas modernas de 2D-PAGE (eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida), a caracterização de misturas complexas de proteínas refletindo vários sistemas biológicos, ou seja, proteomas, tornou-se uma realidade (Leonard, Gallop, 1969).

Na eletroforese bidimensional, a amostra proteica é solubilizada e as proteínas são desnaturadas previamente à separação por focalização isoeletrica. Na focalização isoeletrica, com a aplicação de corrente elétrica as subunidades

polipeptídicas carregadas migram em um suporte (fita) de gel de poliacrilamida, que contém um gradiente de pH imobilizado, até alcançarem o pH no qual sua carga elétrica líquida é neutra (pI), gerando, assim, uma fita de gel com bandas proteicas distintas ao longo de sua extensão (primeira dimensão). Essa fita é, então, aplicada sobre uma placa retangular de gel de sulfato de dodecila sódico (SDS)-poliacrilamida, para onde as proteínas focalizadas migram por meio da aplicação de corrente elétrica e assim são separadas de acordo com a sua massa molecular (segunda dimensão). O gel resultante pode ser corado com azul de Coomassie, prata ou corantes fluorescentes, e os *spots* proteicos podem ser avaliados a olho nu ou por um analisador de imagens. A identificação de proteínas por espectrometria de massas baseia-se, de forma geral, na determinação precisa das massas dos peptídeos oriundos da digestão proteolítica de uma dada proteína. Com o passar dos anos, a prática da utilização de espectrômetros de massas para a identificação de proteínas evoluiu juntamente com o aperfeiçoamento dos instrumentos e com o aumento do número de depósitos de sequências em bancos de dados de DNA/proteínas (Ho et al., 2008).

A identificação de proteínas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF é, em geral, feita pela determinação da razão entre massa e carga (m/z) dos peptídeos, predominantemente com carga +1. A mistura de peptídeos é aplicada sobre uma placa de MALDI para co-cristalização com uma solução saturada de matriz, em seguida a placa é introduzida na câmara de vácuo do espectrômetro, em que cada amostra aplicada sobre a placa recebe um pulso de um raio *laser*, o que faz com que os peptídeos sejam transferidos para a fase gasosa por ionização. Geralmente, a ionização gerada por MALDI torna os peptídeos identicamente monocarregados e, assim, estes voam pelo tubo TOF, que mede o tempo que íons levam para viajar da fonte até o detector, a uma velocidade proporcional às suas massas. Então, o analisador de massas disparado pelo pulso de *laser* registra o sinal detectado e o tempo de voo e esses valores são transformados em razão m/z e, em última instância, na massa do íon peptídico (Ho et al., 2008).

As massas dos peptídeos presentes na digestão com tripsina são identificadas, os contaminantes conhecidos eliminados dos dados e a lista de massas de íons resultantes é, então, comparada com as massas de todos os peptídeos gerados pela clivagem virtual com a tripsina de todas as proteínas

presentes nos bancos de dados, possibilitando a identificação da(s) proteína(s) presentes na amostra (Ho et al., 2008).

Neste contexto, este trabalho teve como um dos objetivos, analisar o padrão de proteínas citosólicas de micro-organismos isolados de ambientes contaminados na região de Cubatão, capazes de biodegradar altas concentrações de fenol. Para isso, utilizamos técnicas de eletroforese 2D e análise em espectrometria de massas (MALDI-TOF). A análise das proteínas putativas ou a demonstração de suas funções biológicas podem ajudar a elucidar o mecanismo pelos quais estes micro-organismos apresentam tolerância ao fenol e qual a proteção celular utilizada contra este composto lipofílico.

A importância do entendimento sobre as informações geradas pelo perfil de expressão protéica e a investigação detalhada do papel biológico das mesmas como determinantes desta resistência ao fenol, são de fundamental importância, considerando a poluição ambiental de solos e águas causadas pelas atividades industriais ou mesmo por contaminações acidentais de óleos e solventes. Estas informações poderão ter um grande impacto no desenvolvimento de estratégias para os processos de biorremediação e biotransformação de meios contendo estes contaminantes.

2 OBJETIVOS

- Isolar e identificar gêneros de bactérias com alta capacidade de biodegradar fenol presentes em ambientes contaminados na região de Cubatão-SP;
- analisar a capacidade de biodegradação de efluentes fenólicos reais;
- analisar as diferenças do perfil de expressão de proteínas citosólicas em função da fonte de carbono utilizada para crescimento (glicose ou fenol);
- identificar as proteínas expressas em resposta ao fenol;
- identificar as rotas metabólicas utilizadas pelos micro-organismos isolados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meios e soluções

Meio mínimo mineral (MM) – 10 mL de FeSO_4 a 1 mM, 1mL de MgSO_4 a 1M, 0,5 mL de CaCl_2 a 1M e 10 mL de M2 (Iwaki, Hasegawa, 2007).

M2 - 5 g/L de NH_4Cl , 17,4 g/L de Na_2HPO_4 , 10,6 g/L de KH_2PO_4 .

Meio mínimo mineral sólido - 10 mL de FeSO_4 a 1 mM, 1mL de MgSO_4 a 1M, 0,5 mL de CaCl_2 a 1M e 10 mL de M2 e 15 g/L de ágar.

Tampão Ws – 10 mM de Tris, 5 mM de EDTA, 5 μL de inibidor de protease, pH 8.

Tampão 1 – 7 M de Uréia, 2 M tiouréia, 2% (m/v) CHAPS, 2% (v/v) tampão IPG e 0,002% de azul de bromofenol.

Solução de equilíbrio – 75 mM Tris-HCl, 6 M Uréia, 29,3 % (v/v) glicerol, 2 % (m/v) SDS, 75 mM DTT, 135 mM Iodoacetamida e azul de bromofenol.

Tampão 2 – 0,33 M Tris-HCl, pH 7,6.

Tampão 3 – 50 mM Tris-HCl, pH 8.

Tampão 4 – 50 mM Tris-HCl, pH 7,5.

TAE- tris 0,02 M, ácido acético glacial 0,02 M, EDTA 0,5 mM, pH 8.

3.2 Isolamento e identificação dos micro-organismos

O isolamento dos micro-organismos tolerantes e com potencial para utilização do fenol como fonte de carbono presentes em Cubatão, foi realizado utilizando uma solução com meio mínimo mineral contendo 25 mg.L^{-1} de fenol. Esta solução foi exposta ao meio ambiente durante 30 dias para que houvesse a seleção dos micro-organismos de interesse. Após os 30 dias, uma alíquota desta solução, foi semeada em placa de Petri contendo meio mínimo mineral sólido e concentrações crescentes de fenol (25, 100, 1000 mg.L^{-1} de fenol). As colônias crescidas nas placas foram isoladas com base em sua morfologia, cor e tamanho, visualizados ao microscópio ótico.

Para identificação das linhagens foi utilizada a técnica do RNAr 16S. A reação de PCR foi realizada diretamente com uma colônia bacteriana retirada da placa de cultura e colocada na solução da reação de polimerização em cadeia, com o auxílio

de um palito autoclavado. Para a reação de amplificação foi utilizado (concentrações finais): 0,04 U/ μ L (unidades por microlitro) da enzima Taq polimerase, 1 X do tampão da enzima Taq (GE), 0,2 mM dNTPs, iniciador 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'), iniciador 1492-R (5' ACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'). As amostras foram submetidas a 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 53 °C por 30 s, 72 °C por 2 min em um termociclador. Os resultados de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para verificação de eficiência de amplificação e tamanho do produto amplificado. Os experimentos foram realizados em gel de agarose 0,8%, conforme descrito por Sambrook et al. (1989), confeccionado com TAE diluído para 0,5X. A tensão utilizada foi de 80 V por 30 minutos para géis de 25 mL (cuba de eletroforese Horizon 11.14 – GibcoBRL LifeTechnologies – Grand Island, NY., Estados Unidos). Após a migração dos fragmentos, o gel foi corado em solução de 0,5 μ g/L de brometo de etídio por 1 minuto e lavado em água para retirar o excesso de brometo por 10 minutos. Para visualização da migração, o gel foi fotografado por um fotodocumentador (L-Pix – Locus biotecnologia- Cotia, SP., Brasil) e os fragmentos analisados.

3.1.1 Reação de sequenciamento Sanger

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se o Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems – Life Technologies) de acordo com as especificações do fabricante. Para cada reação foram utilizados 10 pmol de iniciadores. Os iniciadores utilizados para essa reação foram 27-F e 1492-R para sequenciamento “*forward*” e “*reverse*”, respectivamente. A reação foi feita em termociclador PTC-100 MJ Research, Inc.

3.1.2 Reação de precipitação para sequenciamento Sanger

Para este procedimento, foram adicionados à reação de sequenciamento 80 μ L de isopropanol 65%. A placa foi agitada durante 10 segundos e incubada à temperatura ambiente no escuro por 20 minutos. Após este período, a placa foi centrifugada a 2114 g (centrífuga Hettich Universal 30F) durante 45 minutos sendo o sobrenadante descartado e a placa deixada invertida sobre papel toalha para retirada de excessos. Foram adicionados 150 μ L de etanol 60% gelado e novamente

a placa foi centrifugada a 2114 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a placa foi submetida a uma rápida centrifugação posicionada invertidamente sobre papel toalha até que as rotações atingissem o máximo de 8 g sendo a centrífuga então parada. A placa foi seca no escuro durante 1 hora e guardada em papel alumínio à -20 °C.

Para o sequenciamento, as amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida e desnaturadas a 95 °C por 5 minutos. O sequenciamento foi realizado no equipamento ABI 3730 (Applied Biosystems – Life Technologies).

As seqüências de nucleotídeos do gene que codifica o RNAr 16S obtidas foram comparadas com a ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). A afiliação taxonômica das seqüências foi feita comparando-se as seqüências de DNAr 16S com as seqüências depositadas no *Ribossomal Database Project* (<http://rdp.cme.msu.edu>).

3.3 Micro-organismos, meio e condições de cultivo

Foram utilizadas duas linhagens bacterianas, *Achromobater* sp. e *Pandoraea* sp., as quais foram isoladas da zona industrial de Cubatão. Estas linhagens foram crescidas em meio mínimo mineral contendo fenol (300 mg.L⁻¹) como única fonte de carbono, 37 °C e agitação constante de 150 rpm. O inóculo foi preparado um dia antes dos ensaios, a partir da retirada de uma colônia diretamente do meio sólido (MM).

3.4 Caracterização do efluente fenólico

A água residuária (efluente fenólico) oriunda do processo de craqueamento catalítico fornecida por uma refinaria de petróleo foi analisada qualitativamente em um cromatógrafo a gás – GC/MS-(Varian 450GC - Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos) acoplado a um espectrômetro de massa (Varian 240MS), equipado com detector *Ion trap*, injetor *split/splitless* e coluna VF-5ms (Varian) composta por 5% difenil e 95% dimetil Polisiloxano (30m x 0.25mm x 0,25 µm). O gás de arraste utilizado foi o hélio com um fluxo de 1,0 mL min⁻¹, no modo *split* de 600 vezes. A temperatura de operação foi de 260 °C no injetor. O programa de temperatura da coluna foi 100 °C durante 3 min, aumento de temperatura para

250 °C a 15 °C/min permanecendo durante 10 min, aumento novamente para 300 °C a 5 °C/min e permanecendo assim por 1 min, resultando em uma rampa de aquecimento de 34 min. Para a quantificação dos compostos identificados pelo GC/MS, foi utilizado um cromatógrafo líquido (HPLC-Shimadzu – São Paulo, SP., Brasil) com detecção UV-visível em 254 nm. Uma curva de calibração foi construída através do uso de padrões, os quais foram analisados numa coluna de fase reversa (C₁₈ ACE 121-2546, 250 x 4,6 mm) e, como fase móvel, gradiente de acetonitrila/H₂O, com fluxo de 0,8 mL/min. O gradiente utilizado foi: 22% acetonitrila, 0-3 min; 50% acetonitrila, 3-5 e de 5-10 min; 22% acetonitrila de 10-12 e de 12-14 min.

3.5 Ensaios de biodegradação do fenol

Para comprovar a biodegradação do fenol em meio líquido por *Achromobacter* sp. e *Pandoraea* sp., ensaios envolvendo crescimento celular e consumo de fenol em meio mínimo foram realizados.

Os ensaios em batelada foram realizados em frascos de vidro de 500 mL, com volume final de 100 mL. As concentrações de fenol variaram de 200 a 600 mg.L⁻¹. Os ensaios foram realizados em um *shaker* de bancada (CT-712RN – Cientec – Piracicaba, SP., Brasil) e 1 mL de amostra foi retirada para análise (sendo retirados até o máximo de 20% do volume total do ensaio). As amostras foram retiradas de hora em hora, sendo o crescimento celular monitorado em espectrofotômetro (Shimadzu) pela medida da absorbância a 600 nm e o consumo de fenol através da atividade das enzimas que degradam fenol, conforme descrito anteriormente por Thakur et al., 2002. Para isso, as amostras foram filtradas em 0,22 µm e submetidas à um sistema cromatografia líquida- HPLC (Shimadzu SPD-20A) com detecção UV-visível em 254 nm, em uma coluna de fase reversa (C₁₈ ACE 121-2546, 250 x 4,6 mm) e, como fase móvel, gradiente de acetonitrila/H₂O, com fluxo de 0,8 mL/min. O gradiente utilizado foi: 22% acetonitrila, 0-3 min; 50% acetonitrila, 3-5 e de 5-10 min; 22% acetonitrila de 10-12 e de 12-14 min.

3.6 Ensaios de biodegradação de efluentes fenólicos

Nos ensaios de biodegradação do efluente fenólico real (água residuária), o cultivo microbiano foi realizado com o efluente sem qualquer diluição, o qual representaria as condições reais de um processo. As condições do ensaio foram: 40 mL água residuária (260 mg.L⁻¹ de fenol, 100 mg.L⁻¹ de *m*-cresol e 100 mg.L⁻¹ de *o*-cresol) acrescida de 200 µL de [1mM] FeSO₄, 20 µL de [1M] MgSO₄, 1 µL de [1M] CaCl₂ e 200 µL de M2, 150 rpm de agitação à 37 °C, também realizado em *shaker* (Cientec) de bancada.

As amostras coletadas foram analisadas quanto ao crescimento celular e biodegradação, conforme descrito na seção anterior.

3.7 Ensaios de biodegradação de efluentes fenólico em biorreator

As condições de cultivo para ensaios com o efluente em um biorreator (Bioflo/Celligen 115 - New Brunswick – New Brunswick, NJ., Estados Unidos), foram: 500 mL água residuária (260 mg.L⁻¹ de fenol, 100 mg.L⁻¹ de *m*-cresol e 100 mg.L⁻¹ de *o*-cresol), 5 mL de [1mM] FeSO₄, 500 µL de [1M] MgSO₄, 250 µL de [1M] CaCl₂ e 5 mL de M2, 150 rpm de agitação à 37 °C. Foi retirado 1 mL de amostra diariamente para análise (sendo retirados até o máximo de 20% do volume total do ensaio) quanto ao crescimento celular e biodegradação.

3.8 Tratamento com carvão ativo

Após o tratamento biológico, submetemos o efluente a um tratamento final (polimento) para remoção de possíveis contaminantes residuais e da cor. Para isso, foi utilizado carvão ativo na proporção de 6% (m/v). Neste procedimento, o efluente permaneceu em contato com o carvão ativo durante 5 minutos e em seguida foi centrifugado.

3.9 Peso seco

Para determinação do peso seco do cultivo microbiano foram utilizadas membranas GS em éster de celulose, 0,22 µm de poro, 47 mm de diâmetro,

brancas, lisas, *triton-free* (Millipore – Merck – São Paulo, SP., Brasil). As membranas foram secas em micro-ondas a uma potência de 360 W por 20 minutos e pesadas. Após a pesagem, as membranas foram colocadas sobre um dispositivo de filtração ligado à bomba de vácuo. Foram filtrados aproximadamente 40 mL da amostra em diferentes estágios do crescimento celular. Após a filtração, as membranas foram secas novamente em micro-ondas e pesadas, para a construção de uma curva correlacionando os valores de absorbância com o peso seco.

3.10 Preparação das amostras para Eletroforese 2D

Para realização do gel de eletroforese 2D, o cultivo microbiano foi realizado tanto em meio mínimo contendo glicose ou fenol em uma concentração de 500 mg.L⁻¹ (Fig. 03). As células microbianas foram coletadas na fase de crescimento exponencial (Abs. de 0,5 a 0,8) através de centrifugação a 2114 g à 4 °C, lavadas duas vezes com tampão Ws 4 °C e então utilizadas imediatamente para realização do gel ou estocadas a -80 °C. Para a preparação do extrato celular, o *pellet* foi ressuspenso em 500 µl de tampão Ws 4 °C e rompido através de sonicação em gelo (10x por 15 segundos com intervalos de 45 segundos) utilizando um *probe* ultrassônico com potência de 400 W, frequência de 20 kHz e amplitude de 10% do total (Digital Sonifier 450, Branson). O extrato foi clarificado por centrifugação durante 30 min a 20.000 g à 4 °C. A concentração de proteínas do extrato celular foi determinada pelo método 2-D Quant Kit (GE Healthcare – São Paulo, SP., Brasil). As proteínas foram precipitadas com 10% de ácido tricloroacético (TCA) em acetona e 20 mM de DTT no volume de 2:1 e lavadas duas vezes com acetona e 20 mM de DTT.

Figura 3 - Estratégia para identificação de proteínas por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas.

Adaptado de Kalume et al., 2005

3.11 Eletroforese 2D

A eletroforese 2D foi realizada segundo Santos et al. (2005). Para a focalização isoeletrica, as amostras de proteínas (aproximadamente 250 µg) foram diluídas em 250 µL de tampão 1 (GE Healthcare) e aplicadas em fitas imobilizadas (Immobiline DryStrip, 13 cm) com gradiente de pH variando de 3 a 10 por 16 horas. Para a primeira dimensão foi utilizado o Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare), sendo focalização isoeletrica realizada em 4 etapas (500 V até o acúmulo de 500 V.h, 1000 V até o acúmulo de 800 V.h, 6000 V até o acúmulo de 7000 V.h e 8000 V até o acúmulo de 16000 V.h). Após a completa focalização isoeletrica, as fitas de IPG foram incubadas em solução de equilíbrio por 15 min. A segunda dimensão foi realizada em um gel SDS PAGE 12% utilizando um sistema GE Healthcare (SE 600 Ruby, 14x16 cm).

Os géis contendo as proteínas foram corados com azul de Coomassie, escaneados e analisados por um sistema de aquisição de imagens conectado a um micro computador. As imagens foram analisadas através do software (Image Master Classic 2D, GE Healthcare).

3.12 Digestão com tripsina

Spots das proteínas de interesse foram recortados dos géis de poliacrilamida com tamanhos aproximados de 1 mm³. Para a descoloração, os *spots* recortados foram inseridos em tubos do tipo *eppendorf* e lavados com tampão de lavagem por 4 horas, sendo este passo repetido mais uma vez por 16 horas. Após este passo, foram adicionados aos tubos 200 µL de 25 mM NH₄HCO₃ em 50% ACN sendo estes agitados intensamente por 10 min. Os *spots* descoloridos foram então secos por 30 min em um Speed Vac (Heto dry winner - Maxy dry Iyo). Para redução e alquilação foram realizadas as seguintes etapas: foram adicionados 40 µL (ou o suficiente para recobrir os pedaços) de 10 mM de DTT em 25 mM NH₄HCO₃ e incubado por 1 hora a 56 °C, sendo o sobrenadante removido e o tubo deixado em temperatura ambiente. Após este passo foi adicionado ao mesmo volume 55 mM iodocetamida em 25 mM NH₄HCO₃, incubado a temperatura ambiente por 45 min no escuro e agitando-se intensamente e ocasionalmente. Este sobrenadante foi removido e lavado com 100 µL de 25 mM NH₄HCO₃ sendo agitado intensamente por 10 min. Para desidratar os pedaços do gel, foram utilizados 100 µL de 25 mM NH₄HCO₃ em 50% ACN, agitando-se intensamente por 5 min, removendo e descartando o sobrenadante. Os dois últimos passos foram repetidos e então os pedaços dos géis foram secos com auxílio de um Speed Vac.

Os géis secos foram digeridos com 25 µL de 12,5 ng/µL de tripsina em 25 mM NH₄HCO₃. Após aproximadamente 15 min o excesso da solução foi removido e descartado e adicionou-se ao mesmo volume 25 mM NH₄HCO₃ sem tripsina. Então os pedaços dos géis foram imersos e incubados a 37 °C por 16 horas. Para recuperação dos peptídeos dos géis, foram adicionados 30 µL de 5% de ácido fórmico em 50% de ACN agitando-se a temperatura ambiente de 30 a 60 min. Posteriormente, esta solução foi então removida e armazenada em um tubo de silicone limpo (tubo A). Ao tubo contendo os géis (tubo B) foram adicionados 15 µL

de 5% de ácido fórmico, incubando-se a temperatura ambiente por 10 min, e então adicionou-se mais 15 µL de 100% de ACN.

O conteúdo dos dois tubos A e B foram misturados e secos em Speed Vac (Shevchenko et al., 1996). Após os peptídeos serem secos até o volume de 5 µL eles foram misturados com 15 µL de ácido fórmico 0,1% e 15 µL de acetonitrila.

3.13 Identificação das proteínas através das massas dos peptídeos - “*fingerprinting*” - e busca em banco de dados

Os peptídeos foram transferidos para uma placa do MALDI-TOF utilizando uma solução matriz contendo 10 mg de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico dissolvido em 1 mL de uma solução contendo 50% acetonitrila e 0,5% de ácido trifluoacético. As amostras dos peptídeos foram analisadas pelo modo TOF-MS e TOF-MS/MS (AXIMA Confidence - Shimadzu), UV (355 nm) com laser Nd: YAG com repetição de 200 Hz. Para análise da sequência dos peptídeos, a dissociação foi induzida utilizando ar como gás de colisão. A energia de colisão foi definida como 1 kV. Os espectros dos peptídeos gerados foram analisados pelo software Mascot e comparados com o banco de dados do NCBI.

3.14 Ensaio enzimático

3.14.1 Preparação do extrato celular

A fim de determinar a via de clivagem do fenol (*meta* ou *orto*) pela ação da catecol dioxigenase, foi realizado um ensaio bioquímico segundo o método de Fiest e Hegeman, 1969.

As células crescidas em fenol (300 mg.L⁻¹) foram centrifugadas (2114 g, 10 min) e o *pellet* foi lavado duas vezes com tampão 2. As células foram rompidas através de sonicação por 4 minutos (30 s ligado, 30 s desligado) e centrifugadas a 13224 g por 20 min à 4 °C. O extrato celular foi mantido em gelo e o ensaio para atividade da catecol dioxigenase foi realizado o mais rápido possível.

3.14.2 Atividade catecol 1,2 dioxigenase

A *orto* clivagem do catecol é realizada pela catecol 1,2 dioxigenase e é medida pela formação imediata do ácido *cis,cis* - mucônico. Os reagentes adicionados a uma cubeta de quartzo foram: 2 mL de tampão 3; 0,7 mL de água destilada; 0,1 mL de 2-mercaptoetanol (100 mM) e 0,1 mL do extrato celular. O conteúdo foi misturado por inversão e então 0,1 mL de catecol (1 mM) foi adicionado. Quando há produção do ácido *cis,cis* - mucônico, há o aumento da absorbância a 260 nm no período de 5 minutos.

3.14.3 Atividade catecol 2,3 dioxigenase

A atividade da catecol 2,3 dioxigenase foi medida pela formação de 2-hidroximucônico semialdeído, sendo este o produto da *meta* clivagem do catecol. Os reagentes adicionados a uma cubeta de plástico foram: 2 mL de tampão 4, 0,6 mL de água destilada e 0,2 mL de extrato celular. O conteúdo foi misturado por inversão e 0,2 mL de catecol (100 mM) adicionados. A produção de 2- hidroximucônico semialdeído foi medida pelo aumento da absorbância a 375 nm no período de 5 minutos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação dos micro-organismos

Através da semeadura em placa seletiva, em diferentes concentrações de fenol, isolamos duas linhagens bacterianas que se mostraram capazes de tolerar e biodegradar altas concentrações de fenol. Análises morfológicas e microscópicas (Fig. 4) revelaram diferenças entre as duas linhagens selecionadas, mostrando serem distintas. Estas foram então separadas para os ensaios de biodegradação e identificação molecular (amplificação do gene RNAr 16S).

Figura 4 - Foto microscópica (100 x) das duas linhagens isoladas na zona industrial de Cubatão.

A. *Achromobater* sp. e B. *Pandoraea* sp.

A amplificação do material genético das duas linhagens obtida com iniciadores universais que codificam o gene do RNAr 16S resultou em fragmentos de aproximadamente 1500 pb (Fig. 5). Estes produtos de amplificação foram então sequenciados e as sequências obtidas comparadas com a ferramenta BLAST.

As análises das sequências resultaram nos gêneros *Achromobater* e *Pandoraea* ambas Gram negativas, aeróbicas pertencentes à classe Betaproteobacteria. Comparando as seqüências na ferramenta BLAST obteve-se, para o gênero *Achromobater*, 99% de similaridade com a espécie *Achromobater xylosoxidans* e para o gênero *Pandoraea* obteve-se 98% de similaridade com a espécie *Pandoraea pnomenusa*.

A presença destes gêneros em amostras ambientais mostrou-se interessante, pois estes diferem do principal exemplo de gênero envolvido nos processos de biodegradação do fenol, que é representado por *Pseudomonas* sp.

Assim como o gênero *Pseudomonas*, a grande maioria dos micro-organismos utilizados na biodegradação de xenobióticos também é aeróbia, uma vez que são mais eficientes em degradar compostos tóxicos, transformando-os em produtos inócuos, como CO₂, H₂O (Bai et al., 2007). Além disso, são facilmente cultiváveis em estações de tratamento de efluentes que normalmente são construídas em condições de aerobiose. Neste sentido, *Achromobacter* sp. e *Pandoraea* sp. também podem representar boas opções para tratamento aeróbio de efluentes *in situ*.

O gênero *Achromobacter* hoje é dividido em 6 espécies: *Achromobacter denitrificans*, *A. insolitus*, *A. piechaudii*, *A. ruhlandii*, *A. spanius* e *A. xylosoxidans*. Essas espécies têm sido isoladas de diferentes fontes, principalmente de águas e solos, mas também de amostras clínicas.

Este gênero foi descrito por Yabuuchi et al. (1974) e foi previamente listado como *Alcaligenes denitrificans* subespécie *xylosoxidans* e bactérias oligotróficas. A taxonomia desses dois gêneros está intimamente ligada. Recentemente este gênero tem sido isolado de sedimentos, os quais tem capacidade para degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Wan et al., 2006).

O genoma da *Achromobacter xylosoxidans* A8 foi completamente sequenciado por Strnad et al. (2010). Esta linhagem foi isolada de solo contaminado com bifenilas e demonstrou ser capaz de degradar 2-clorobenzoato e 2,5 diclorobenzoato. O genoma dessa espécie consiste em um cromossomo circular (7 Mb) e dois plasmídeos (pA81 e pA82) sendo o pA81 um plasmídeo conjugativo. Neste último estão presente os genes de resistência a metal pesado e genes relacionados à biodegradação (Jencova et al., 2008), como também genes relacionados a biodegradação de clorocatecol (Jencova et al., 2004).

No entanto, existem poucos trabalhos relacionando o uso deste gênero aplicado a processos de biodegradação de compostos fenólicos.

O gênero *Pandoraea* foi descrito por Coenye et al. (2000) e dividido em 5 espécies: *P. apista*, *P. pulmonicola*, *P. pnomenusa*, *P. sputorum* e *P. norimbergensis* e uma espécie ainda não nomeada. Daneshvar et al. (2001) descreveu ainda mais três espécies não nomeadas. Então até o presente o gênero *Pandoraea* consiste de cinco espécies com publicações validadas e quatro ainda não nomeadas.

A maioria da literatura disponível para *Pandoraea* sp. refere-se a estudos clínicos, e poucos relatos têm descrito o envolvimento desse gênero nos processos de biodegradação. Embora esse gênero tenha sido recentemente estabelecido, os estudos disponíveis sugerem que o gênero *Pandoraea* spp. poderia ser um gênero promissor no biodegradação juntamente com outros grupos dominantes, como *Pseudomonas* spp. e *Ralstonia* spp.

Por se tratar de um gênero relativamente novo, somente em 2009 foi publicado o primeiro trabalho com a descrição da análise bioquímica e molecular de genes envolvidos no processo de degradação de clorobenzenos (Jiang et al., 2009). Ainda assim, até o momento não há nenhum genoma sequenciado deste gênero disponível nos bancos de dados existentes. Este fato, de certa forma, dificulta a procura de genes promissores, mas reforça a busca por proteínas que estejam envolvidas no processo de biodegradação do fenol. A partir da análise de proteínas expressas em função da exposição ao fenol, podemos tentar elucidar o mecanismo de tolerância deste gênero a compostos xenobióticos.

As sequências obtidas do gene RNAr 16S também foram utilizadas para a construção de árvores filogenéticas tanto para *Achromobacter* (Fig. 6) como para *Pandoraea* (Fig. 7).

A consistência de uma árvore filogenética é baseada no valor de *bootstrap*. O valor de *bootstrap* é obtido por uma re-amostragem das sequências que utiliza os dados de alinhamento para testar a reprodutibilidade dos ramos. Quanto maior este valor, mais consistente é o agrupamento que segue à direita do número. A bactéria mais próxima na árvore filogenética com a linhagem de *Achromobacter* sp. isolada neste trabalho, com valor de *bootstrap* igual a 100, é uma *Achromobacter* sp. NCW, isolada a partir de águas residuais de uma refinaria de petróleo (Guo et al., 2008). Esta linhagem apresentou similaridade também com duas linhagens de *Alcaligenes*, sendo uma com valor de *bootstrap* maior que 50 e outra abaixo. A linhagem que apresentou um valor maior de *bootstrap* foi isolada de uma fruta (Zazpel et al., 2008) e a que apresentou um valor menor foi isolada de uma área de mineração de ouro, mostrando ter potencial para oxidação de arsenito (Yoon et al., 2009).

Analizando a árvore filogenética construída a partir da sequência de 16S RNAr de *Pandoraea* sp. é possível dizer que a linhagem isolada neste trabalho

possui similaridade com *Pandoraea pnomenusa* - MCB032 a qual possui capacidade de degradar clorobenzeno (Baptista et al., 2008), com valores de *bootstrap* igual a 100. Esta bactéria possui também similaridade com sequências de bactérias do gênero *Burkholderia*, porém os valores de *bootstrap* foram abaixo de 50. No entanto, esta linhagem específica de *Burkholderia* sp. HY-4 está relacionada com degradação de compostos farmacêuticos e de compostos usados nos cuidados pessoais (Cui, Hu, 2009).

Relacionando-a com a bactéria mais distante na árvore filogenética, *Pandoraea pnomenusa* - LX-1, verificamos que esta também possui estudos com degradação de xenobióticos, utilizando o diclorometano como fonte de carbono (Xiao et al., 2012).

Figura 5 - Perfil eletroforético da amplificação do gene DNAr 16S.

A. amplificação do gene do gênero *Achromobacter*, em B. amplificação do gene do gênero *Pandoraea* e em C. Marcador de peso molecular de DNA (Ladder 1KB, Fermentas).

Figura 6 - Árvore filogenética baseada na sequência do RNAr 16s construído a partir do alinhamento de dados (1400 nt), mostrando a posição da bactéria isolada do meio ambiente. Com destaque nos valores de *Bootstrap* >50%.

Figura 7 - Árvore filogenética baseada na sequência do RNAr 16s construído a partir do alinhamento de dados (1400 nt), mostrando a posição da bactéria isolada do meio ambiente. Com destaque nos valores de *Bootstrap* >50%.

4.2 Biodegradação do fenol

Ensaio envolvendo biodegradação do fenol foram realizados em triplicata separadamente com cultivos de *Achromobacter* sp. e *Pandoraea* sp. e também com as duas linhagens juntas, para avaliar se o consórcio microbiano aumentava a eficiência da biodegradação.

4.2.1 *Achromobacter* sp.

Ensaio de biodegradação do fenol em meio mínimo foram realizados em diferentes concentrações, variando de 200 a 600 mg.L⁻¹ de fenol como única fonte de carbono. Nestes ensaios, foram monitorados o crescimento celular através da leitura da Absorbância em 600 nm e o consumo de fenol, através da análise em HPLC. Como resultado, a linhagem de *Achromobacter* sp. conseguiu degradar uma concentração de aproximadamente 200 mg.L⁻¹ de fenol em apenas 12 horas, atingindo uma Abs. de 0,539 (Figs. 8 e 9). Em 23 horas, numa concentração de 600

mg.L⁻¹, o fenol foi totalmente consumido atingindo uma Abs. de 1,64. Esta linhagem mostrou ser mais efetiva em altas concentrações, do que os outros gêneros já descritos. Como citado anteriormente o trabalho realizado por Afzal et al. (2007) descrevia duas espécies diferentes de *Pseudomonas* (*P. Aeruginosa* e *P. pseudomallei*) as quais toleravam maiores concentrações de fenol (1500 e 2600 mg.L⁻¹, respectivamente) porém levavam 150 horas para mineralizá-lo. Em um trabalho com *Alcaligenes faecalis* (Jiang et al., 2007) esta degradou 1600 mg.L⁻¹ de fenol em 76 horas. A degradação do fenol nestes dois gêneros foi muito mais lenta do que na linhagem de *Achromobacter* sp. isolada neste trabalho. Do ponto de vista industrial, a velocidade de degradação é um fator muito importante, pois representa a rápida retirada dos contaminantes dos efluentes, permitindo o seu descarte ou mesmo reutilização em outros processos.

Durante o processo de biodegradação do fenol, observamos que todo o fenol foi consumido e houve a formação de um único intermediário (Fig. 10), que não corresponde aos principais produtos relatados na literatura (catecol ou hidroquinona).

Espécies que consomem fenol, normalmente o convertem a um intermediário comum, denominado catecol (*meta* –hidroxilação) ou em casos mais raros , o fenol é convertido em hidroquinona (*para*-hidroxilação).

Figura 8 - Avaliação da biodegradação de fenol em diferentes concentrações (200 a 600 mg.L⁻¹) por *Achromobacter* sp. ao longo de 16 horas.

Condições do ensaio: Meio mínimo mineral e fenol como fonte de carbono, 37 °C, 150 rpm. Alíquotas retiradas e submetidas a análise em HPLC.

Figura 9 - Crescimento celular de *Achromobacter* sp. em meio mínimo mineral contendo diferentes concentrações de fenol como fonte de carbono e energia.

Condições de crescimento: 37 °C e 150 rpm. Avaliação do crescimento celular através da leitura de 1 mL de amostra em espectrofotômetro Varian ajustado para comprimento de onda de 600 nm, ao longo de 16h.

Figura 10 - Cromatograma da biodegradação do fenol (600 mg.L^{-1}) por *Achromobacter* sp.

Condições do ensaio: Meio mínimo mineral e fenol como única fonte de carbono, 37°C , 150 rpm. Alíquotas analisadas nos tempos inicial (em preto) e final (em rosa), e submetidas à análise em HPLC.

Ensaio de biodegradação em concentrações maiores do que 600 mg.L^{-1} , mostraram que o fenol apresentou efeito tóxico e inibitório sobre o crescimento celular. Nos ensaios contendo 700 mg.L^{-1} de fenol, somente 14% foi degradado em 15 dias (dados não mostrados).

Para efeitos comparativos, utilizamos os dados obtidos para a realização dos cálculos de rendimento e velocidade específica de crescimento celular.

Através do cálculo do peso seco, pudemos correlacionar às leituras de absorbância ($\lambda = 600 \text{ nm}$) com o crescimento celular (mg). Deste modo, pudemos estimar a taxa de conversão do substrato consumido por célula formada (Fig. 11).

Também calculamos o rendimento total ($Y_{X/S}$) o qual representa o coeficiente de rendimento de biomassa em relação ao substrato, ou seja, quanto de substrato foi convertido em massa celular. Os resultados são apresentados na Tabela 1, onde verificamos que o rendimento médio foi de 50%, ou seja, 50% do substrato foi convertido em biomassa e 50% foi utilizado para a manutenção celular.

As velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foram determinadas através da construção do gráfico $\text{Ln}(\text{Abs.})$ em função do tempo,

obtendo-se o valor de $\mu_{\text{máx}}$ pelo coeficiente angular da reta ajustada aos dados experimentais na fase exponencial de crescimento, conforme a equação abaixo:

$$\ln(\text{Abs.}) = \mu_{\text{máx}} \cdot t$$

Na Figura 12, é apresentado o gráfico para determinação da $\mu_{\text{máx}}$ para *Achromobacter* sp. mostrando que não há diferença significativa na velocidade máxima de crescimento (aproximadamente $0,23 \text{ h}^{-1}$) para as concentrações de 200 a 400 mg.L^{-1} de fenol. Em contrapartida, para a concentração de 600 mg.L^{-1} , a $\mu_{\text{máx}}$ decai para $0,17 \text{ h}^{-1}$, comprovando a toxicidade do fenol. Os coeficientes de correlação (R^2) das regressões lineares foram elevados (0,96), mostrando bom ajuste aos dados experimentais.

Diversos estudos têm sido realizados com *Achromobacter* sp. para biodegradação de compostos tóxicos, porém nenhum relata a biodegradação de fenol isoladamente, nem as enzimas envolvidas neste processo. Estudos relatam o isolamento de *Achromobacter* sp. a partir de solo contaminado com diferentes compostos tóxicos, sendo utilizado na degradação de fenantreno, antraceno (Al-Thani et al., 2009) e 3,5 diclorocatecol. Particularmente neste estudo, uma nova enzima que faz a *meta*-clivagem do anel aromático foi descrita – a 1,6 catecol oxigenase (Horvath, 1970).

Quan et al. (2004) estudaram os efeitos da adição de fenol na remoção de 2,4 diclorofenol em diferentes modos de alimentação (batelada e contínua) em culturas de *Achromobacter* sp. Na cultura contínua, a taxa de carga do 2,4 diclorofenol foi mantida em torno de 30 mg/dia , mas a taxa de fenol foi aumentando gradualmente de $325,56$ a $602,79 \text{ mg/dia}$. Os resultados mostraram que com o aumento das taxas de carga de fenol, a eficiência de remoção de 2,4 diclorofenol diminuiu de 100% para 87,9%, enquanto que de fenol manteve-se em cerca de 99,6%. A presença de fenol na cultura inibiu a degradação do 2,4 diclorofenol, deslocando as principais vias de degradação do 2,4 diclorofenol para as vias de degradação do fenol.

No presente estudo, identificamos a faixa de concentração ideal para a biodegradação do fenol isoladamente, determinamos as velocidades específicas de crescimento de *Achromobacter* sp., além de identificarmos as principais enzimas envolvidas no processo de biodegradação através da técnica de proteoma.

Estes parâmetros são muito importantes para elucidar o via de degradação do fenol por este gênero especificamente. Por ter sido uma linhagem isolada do meio

ambiente, este representante de *Achromobacter* sp. pode ter mecanismos diferentes de tolerância ao fenol, tornando-o altamente especializado em degradar compostos tóxicos e usá-los como fonte de carbono e energia.

Tabela 1 - Principais parâmetros cinéticos de *Achromobacter* sp. utilizando fenol como substrato único.

[Carbono inicial] ($\mu\text{g/mL}$)	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	$Y_{x/s}$ ($\mu\text{g cé.}/\mu\text{g subst.}$)	Biomassa final ($\mu\text{g/mL}$)
17140	0,237	0,47	8050
25170	0,238	0,40	10890
32290	0,231	0,31	10280
49500	0,170	0,56	27820

Figura 11 - Curva de massa seca: correlacionando as leituras de Abs.600 nm com a formação de biomassa.

Figura 12 - Gráfico de determinação de velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) pelo tempo.

Condições de crescimento: 37 °C e 150 rpm. Construção do gráfico através de Ln (Abs.) calculando o valor de $\mu_{\max}$ pelo coeficiente angular da reta ajustada aos dados experimentais na fase exponencial de crescimento.

4.2.2 *Pandoraea* sp.

Ensaio de biodegradação do fenol realizados com *Pandoraea* sp., mostraram que esta linhagem consegue mineralizar o fenol em baixas concentrações em menor tempo que *Achromobacter* sp. e também em menor tempo que outros gêneros descritos. Na concentração de 200 mg.L⁻¹, *Pandoraea* sp. degradou 100 % do fenol em 9,2 horas (Fig. 13) atingindo uma Abs. de 0,316 (Fig. 14). Em um trabalho realizado com duas espécies diferentes de *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* e *P. fluorescens*) 94,5% e 69,4%, respectivamente, de 100 mg.L⁻¹ de fenol foram degradados em 72 horas (Durojaiye et al., 2008). E um trabalho realizado com *Klebsiella oxytoca* (Shawabked et al., 2007) degradou o fenol na mesma concentração o no mesmo tempo que a cepa *Pseudomonas*, ou seja, 8 vezes mais demorada que a cepa *Pandoraea* sp. isolada neste trabalho.

Também em altas concentrações de fenol (acima de 500 mg.L⁻¹) esta linhagem de *Pandoraea* sp mostrou-se eficiente, porém requerendo um maior tempo para a total biodegradação. Na concentração de 600 mg.L⁻¹ de fenol, 63% foi degradado em 25,7 horas (Fig. 13).

Figura 13 - Avaliação da biodegradação de fenol em diferentes concentrações (200 a 600 mg.L⁻¹) por *Pandoraea* sp. ao longo de 26 horas.

Condições do ensaio: Meio mínimo mineral e fenol como fonte de carbono, 37 ° C, 150 rpm. Alíquotas retiradas e submetidas à análise em HPLC.

Nos ensaios de biodegradação do fenol por *Pandoraea* sp., quase não houve formação de intermediários. A Figura 15 ilustra o cromatograma referente às análises em HPLC. Em preto, perfil cromatográfico da amostra inicial e em rosa 8 horas depois.

Figura 14 - Crescimento celular de *Pandoraea* sp. em meio mínimo mineral contendo diferentes concentrações de fenol como fonte de carbono e energia.

Condições de crescimento: 37°C e 150 rpm. Avaliação do crescimento celular através da leitura de 1 mL de amostra em espectrofotômetro Varian ajustado para $\lambda=600$ nm, ao longo de 26 horas.

Figura 15 - Cromatograma da biodegradação do fenol (200 mg.L⁻¹) por *Pandoraea* sp.

Condições do ensaio: Meio mínimo mineral e fenol como única fonte de carbono, 37 °C, 150 rpm. Alíquotas analisadas nos tempos inicial (em preto) e final (em rosa), e submetidas à análise em HPLC.

Através da correlação da Absorbância ($\lambda = 600 \text{ nm}$) com o peso (mg/mL) pudemos obter resultados do rendimento, ou seja, quanto de substrato foi convertido em biomassa. A Figura 16 representa a correlação entre as medidas de absorbância da amostra com a formação de biomassa. O rendimento total ($Y_{x/s}$) médio desta linhagem foi de 80%, ou seja, 80% do substrato foi convertido em biomassa e 20% foi utilizado para a manutenção celular (Tabela 2). Na concentração de 600 mg.L^{-1} de fenol obtivemos um rendimento de 60%, porém este rendimento foi calculado quando apenas 67% do fenol havia sido degradado.

Figura 16 - Curva de massa seca: correlacionando as leituras de Abs. (600 nm) com a formação de biomassa.

Tabela 2 - Principais parâmetros cinéticos de *Pandoraea* sp. utilizando fenol como substrato único.

[Carbono inicial] ($\mu\text{g/mL}$)	$\mu_{\text{máx.}}$ (h^{-1})	$Y_{x/s}$ ($\mu\text{g cé.}/\mu\text{g de subst.}$)	Biomassa final ($\mu\text{g/mL}$)
16330	0,206	0,88	14400
24070	0,207	0,82	19820
30290	0,218	0,77	23390
38120	0,040	0,83	31720
47130	0,041	0,60	28740

As Figuras 17 e 18 apresentam os gráficos para determinação da $\mu_{\text{máx}}$ para *Pandoraea* sp., mostrando que não há diferença significativa na velocidade máxima de crescimento (aproximadamente $0,21 \text{ h}^{-1}$) para as concentrações de 200 a 400 mg.L^{-1} de fenol. Em contrapartida, para a concentrações de 500 mg.L^{-1} e 600 mg.L^{-1} , a $\mu_{\text{máx}}$ decai para $0,04 \text{ h}^{-1}$, comprovando a toxicidade do fenol. Os coeficientes de correlação (R^2) das regressões lineares foram elevados (0,9), mostrando bom ajuste aos dados experimentais.

Um estudo realizado por Baptista et al. (2008) mostrou que este gênero é um grupo emergente no campo da biodegradação. Este estudo mostrou uma sucessão das espécies durante a biodegradação de clorobenzeno em biorreatores confirmando a presença desta linhagem de *Pandoraea pnomenusa* sp. nas amostras retiradas ao longo do tempo, principalmente dentro do biofilme. A sucessão foi atribuída ao comportamento cinético competitivo, que exibiu um crescimento mais rápido e maior afinidade ao substrato. Eletroforeses em gel de gradiente desnaturante (DGGE) forneceram evidências de que a sucessão de espécies ocorreu no início do período de funcionamento. A aplicação destas ferramentas biomoleculares destacou a notável estabilidade desta nova linhagem durante os 15 meses de operação do reator. Um trabalho similar ao de Baptista et al. (2008), mostrando a sucessão das espécies em biorreator, porém utilizado para

biodegradação de fenol, mostrou que o gênero *Pandoraea* foi dominante no biofilme, sendo esta a responsável pela degradação de 30% a 50% do fenol (em uma concentração de 250 mg.L^{-1}) no biorreator (Jiang et al., 2004).

Também foi reportado que, uma linhagem deste gênero foi capaz de catalisar a descarboxilação 2,6 dihidroxibenzoato, e também catalisar a carboxilação de 1,3-dihidroxibenzeno para 2,6-dihidroxibenzoato. A reação de carboxilação é dependente da concentração de KHCO_3 , portanto na presença de 3M de KHCO_3 , 48% de 1,3-dihidroxibenzeno foi transformado em 2,6-dihidroxibenzoato. A alta eficiência e a estabilidade da 2,6-dihidroxibenzoato decarboxilase de *Pandoraea* sp. foi um importante fator para o acúmulo de 2,6-dihidroxibenzoato num curto período de tempo (Matsui et al., 2006).

Em outro estudo, uma espécie nova de *Pandoraea* sp. isolada de solo contaminado com hidrocarboneto, foi capaz de mineralizar 100% de fenol em uma concentração de 50 mg.L^{-1} em 3 dias. Porém, numa concentração de 100 mg.L^{-1} , o fenol mostrou-se tóxico, e a capacidade de remoção do fenol foi de apenas 15%. Neste mesmo trabalho, adicionalmente realizaram uma PCR para amplificação do gene da fenol-hidroxilase, sugerindo assim a existência de genes de mono-oxigenases responsáveis pela degradação do fenol (Amer, 2008).

Figura 17 - Gráfico de determinação de velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) pelo tempo das concentrações de 200 a 400 mg.L⁻¹.

Condições de crescimento: 37 °C e 150 rpm. Construção do gráfico através de Ln (Abs.) calculando o valor de $\mu_{\text{máx}}$ pelo coeficiente angular da reta ajustada aos dados experimentais na fase exponencial de crescimento.

Figura 18 - Gráfico de determinação de velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) pelo tempo das concentrações de 500 e 600 mg.L⁻¹.

Condições de crescimento: 37 °C e 150 rpm. . Construção do gráfico através de Ln (Abs.) calculando o valor de $\mu_{\text{máx}}$ pelo coeficiente angular da reta ajustada aos dados experimentais na fase exponencial de crescimento.

4.2.3 Ensaio enzimático *Pandoraea* sp.

Ensaio enzimáticos foram realizados para verificar a presença ou ausência de catecol dioxigenases em *Pandoraea* sp. Como resultado, verificamos a ausência de ambas as catecol dioxigenases, pois não houve a formação de nenhum intermediário (*cis,cis* - mucônico no comprimento de onda de 260 nm ou 2-hidroximucônico semialdeído no comprimento de onda de 375 nm) a partir do catecol como substrato (Fig. 19).

Figura 19 - Cromatograma mostrando que não há ação da enzima catecol dioxigenase, pois não há formação de *cis,cis* - mucônico ou 2-HMS.

Em verde o ensaio enzimático sem o extrato celular (controle) e em azul com extrato celular para formação do *cis,cis* - mucônico medido no comprimento de onda de 260 nm. Em vermelho o ensaio enzimático sem extrato celular (controle) e em preto com extrato celular para a formação de 2- hidroximucônico semialdeído medido no comprimento de onda de 375 nm.

4.2.4 Consórcio microbiano

Ensaio de biodegradação com as duas linhagens juntas (*Achromobacter* sp. e *Pandoraea* sp.) resultaram num aumento de tolerância em relação à concentração do fenol, sendo eficientes em biodegradar até 800 mg.L⁻¹, porém num maior tempo (mais de 70 h). Na concentração de 600 mg.L⁻¹ todo o fenol foi mineralizado em aproximadamente 70 horas, e com 800 mg.L⁻¹ somente 50% foi degradado neste mesmo tempo (Fig. 20). Porém, apesar do maior tempo, não houve a formação de nenhum intermediário (Fig. 21). Provavelmente, o intermediário formado durante a degradação por *Achromobacter* sp. seja substrato para as enzimas de *Pandoraea* sp. Este resultado é muito interessante do ponto de vista ambiental, pois neste caso há

a completa mineralização do fenol, podendo ser considerado o meio final totalmente livre de contaminantes.

Figura 20 - Gráfico da biodegradação com as duas bactérias *Achromobacter* sp. e *Pandoraea* sp. nas concentrações de 300 mg.L⁻¹ a 800 mg.L⁻¹.

Condições de cultivo: 150 rpm e 37 °C. Sendo 1 mL de amostra retirado para análise em HPLC.

Figura 21 - Cromatograma da biodegradação do fenol (600 mg.L^{-1}) por *Achromobacter* sp. e *Pandoraea* sp.

Condições do ensaio: Meio mínimo mineral e fenol como única fonte de carbono, 37°C , 150 rpm. Alíquotas analisadas nos tempos inicial (em preto) e final (em rosa), e submetidas à análise em HPLC.

4.2.5 Biodegradação do efluente fenólico em “shaker”

A água residuária (efluente fenólico) fornecida por uma refinaria de petróleo foi caracterizada pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (GC/MS) e quantificada por cromatografia líquida (HPLC) através da construção de uma curva de calibração com concentrações conhecidas (0 a 500 mg.L^{-1}) de soluções padrão de fenol, *m*-cresol e *o*-cresol. As concentrações encontradas nesta água foram: 260 mg.L^{-1} de fenol, 100 mg.L^{-1} de *m*-cresol e 100 mg.L^{-1} de *o*-cresol.

Figura 22 - Cromatograma (GC/MS) da água ácida e identificação dos principais contaminantes.

Fenol com tempo de retenção (RT) de 8,095 min, o-cresol (RT 8,829) e m-cresol (RT 9,026).

Os ensaios de biodegradação da água residuária contendo fenóis como única fonte de carbono demonstraram que *Achromobacter* sp. e *Pandoraea* sp. foram capazes de consumir cerca de 500 mg.L^{-1} de uma mistura de compostos fenólicos (fenol, *m*-cresol e *o*-cresol) em apenas 48 h (Figs. 23 a 25). É importante ressaltar, que além dos fenóis como contaminantes, este efluente também contém quantidades significativas de amônia, sulfetos e eventualmente cianetos, o que o torna extremamente recalcitrante. Por estas razões este efluente é estocado, não podendo ser direcionado para a Estação de Tratamento de Efluentes. Os gráficos abaixo ilustram o crescimento bacteriano (Figs. 23 e 25) usando os fenóis como fonte de carbono e a redução destes compostos na amostra (Figs. 24 e 26). Novamente, *Achromobacter* sp. formou um intermediário ainda desconhecido durante a biodegradação dos fenóis, enquanto que *Pandoraea* sp. conseguiu mineralizar totalmente o efluente, sem que houvesse formação de intermediários.

Figura 23 - Gráfico de consumo de compostos fenólicos em 48 h e crescimento microbiano medido por absorbância (600 nm).

Figura 24 - Cromatograma da biodegradação de fenóis por *Achromobacter sp.* (48 h).

Em preto, as concentrações iniciais de fenol, *m*-cresol e *o*-cresol, respectivamente. Em rosa, a redução total dos contaminantes e a formação de um intermediário desconhecido.

Figura 25 - Gráfico de consumo de composto fenólico em 48 h e crescimento microbiano medido por absorbância (600 nm).

Figura 26 - Cromatograma da biodegradação de fenóis por *Pandoraea sp.* (48 h).

Em preto, as concentrações iniciais de fenol, *m*-cresol e *o*-cresol, respectivamente. Em rosa, a redução total dos contaminantes sem a formação de intermediários.

4.2.6 Biodegradação do efluente fenólico em biorreator

Uma vez que *Achromobater* sp. foi capaz de degradar o fenol em um tempo menor, e em maiores concentrações, esta linhagem foi utilizada para os ensaios de biodegradação da água residuária em uma escala maior, utilizando biorreator (volume útil 1,2L). O gráfico abaixo ilustra o crescimento bacteriano (Fig. 27) usando os fenóis como fonte de carbono e a redução destes compostos na amostra, sendo a cepa *Achromobater* sp. capaz de consumir cerca de 550 mg.L⁻¹ de uma mistura de compostos fenólicos (fenol, *m*-cresol e *o*-cresol) em apenas 82 h. O substrato preferencial utilizado é o fenol, sendo o primeiro a ser consumido, seguidos pelo *m*-cresol e *o*-cresol (Fig. 28).

Figura 27 - Crescimento microbiano medido por absorbância em espectrofotômetro ($\lambda = 600$ nm), comprovando o consumo dos compostos fenólicos.

Figura 28 - Gráfico de consumo dos compostos fenólicos em 82 horas.

Ensaio realizado em biorreator com controle de pH, aeração (150 rpm), oxigênio e temperatura (37 °C).

A Figura 29 ilustra o cromatograma do consumo dos contaminantes. Em preto o cromatograma da amostra inicial e em rosa o cromatograma da amostra final, mostrando a redução dos contaminantes e a formação de um intermediário ainda não identificado.

Figura 29 - Cromatograma da biodegradação. Em preto, as concentrações iniciais de fenol, *m*-cresol e *o*-cresol respectivamente.

Em rosa, a redução total dos contaminantes e a formação de um intermediário ainda desconhecido.

A Figura 30 mostra o gráfico utilizado para determinação da $\mu_{\text{máx}}$. Como neste efluente há mais de uma fonte de carbono, o micro-organismo apresenta duas velocidades máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$). Após o consumo do primeiro substrato (mais biodegradável), o micro-organismo volta à fase de adaptação aos outros substratos (menos biodegradáveis) e inicia uma nova fase estacionária, podendo novamente ser calculado outro $\mu_{\text{máx}}$. Em vermelho, observamos a $\mu_{\text{máx}}$ do micro-organismo quando o fenol foi utilizado como substrato ($\mu_{\text{máx}} = 0,091 \text{ h}^{-1}$). Em azul, a $\mu_{\text{máx}}$ referente ao consumo de *m*-cresol e *o*-cresol ($\mu_{\text{máx}} = 0,072 \text{ h}^{-1}$). Podemos observar que houve diminuição da $\mu_{\text{máx}}$ quando *m*- e *o*-cresol foram utilizados como substrato, comprovando maior toxicidade destes compostos.

Figura 30 - Gráfico de determinação de velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) pelo tempo.

Condições de crescimento: 37 °C e 150 rpm. Construção do gráfico através de Ln (Abs.) calculando o valor de $\mu_{\text{máx}}$ pelo coeficiente angular da reta ajustada aos dados experimentais na fase exponencial do crescimento.

Ao final do tratamento biológico (biodegradação), foi adicionado ao efluente carvão ativo (6% m/v) para retirada de sua coloração característica e de possíveis contaminantes residuais.

A Figura 31 ilustra que o uso do carvão ativo é efetivo no final do processo. A Figura 31 A., mostra o efluente antes do tratamento em biorreator, em B. o efluente tratado biologicamente em biorreator e em C. o efluente final após os 2 tratamentos (biodegradação e adsorção em carvão ativo).

Após os 2 tratamentos (biodegradação e adsorção), o efluente final foi reanalisado em HPLC (Fig. 32), e os resultados analíticos comprovaram que o uso de *Achromobacter* sp. para a remoção dos compostos fenólicos e o pós-tratamento com carvão ativo foi efetivo na remoção da cor e dos contaminantes residuais. Deste modo, podemos afirmar que a integração dos 2 processos resultou num efluente final incolor e com concentrações seguras tanto para o seu descarte como para seu reuso em uma refinaria de petróleo.

Figura 31 - A. Efluente fenólico oriundo de uma refinaria de petróleo sem tratamento. B. Efluente após tratamento com micro-organismo *Achromobacter* sp. C. Efluente após tratamento com carvão ativo.

Figura 32 - Cromatograma do efluente fenólico após tratamento de biodegradação e carvão ativo.

Em rosa cromatograma após o tratamento de biodegradação e em azul após o tratamento com carvão ativo.

4.3 Protêomica da linhagem de *Achromobacter* sp.

A análise dos géis de eletroforese 2D detectaram aproximadamente 57 proteínas citosólicas na presença de glicose e 46 proteínas na presença de fenol (Fig. 33). Das 46 proteínas detectadas na presença de fenol, apenas 15 eram proteínas comuns às duas fontes de carbono.

De todas as proteínas detectadas, somente as expressas na presença de fenol foram analisadas por espectrometria de massas (MALDI/TOF). Utilizando o software Mascot foi possível identificar as massas dos peptídeos, considerados como *fingerprinting*, e com ajuda do banco de dados do NCBI foi possível identificar as proteínas. Na Tabela 03 estão listadas as proteínas que foram identificadas, as sequências de aminoácidos que foram analisadas e a % de cobertura.

Figura 33 - Gel de eletroforese 2D.

No gel controle estão as proteínas que foram expressas na presença de glicose e no gel tratado as proteínas expressas na presença de fenol, representando os *spots* recortados e digeridos com tripsina. (Marcador de peso molecular: Amersham Low Molecular Weight Calibration kit for SDS Electrophoresis).

No *spot 1*, identificamos com uma cobertura de 85% uma proteína hipotética que possui uma região conservada, com função de reguladora de transdução de sinal. Provavelmente, o fenol age como sinal, ou seja, fará com que a célula tenha mudanças nos parâmetros intra e extracelular, gerando uma resposta, uma mudança no metabolismo e ativando enzimas para a degradação do fenol.

No *spot 3*, detectamos uma proteína da família Nod. Estas proteínas são lipoproteínas do sistema de efluxo localizado na membrana externa. Estas proteínas funcionam como um transportador de ATPase de membrana (ABC) e um adaptador chamado de proteína de fusão de membrana. A maioria dos membros desta família exportam moléculas fundamentalmente pequenas, mas também estão envolvidas na secreção de proteínas da membrana externa, Tolc e PrtF. Em *E. coli*, Tolc é conhecida como componente da membrana externa e é responsável pelo sistema de efluxo de diferente drogas, conferindo resistência às mais variadas drogas (Nishino et al., 2003) e solventes (Ramos et al., 2002).

No *spot 5*, identificamos a enzima NADH desidrogenase, a qual está presente em mitocôndrias e bactérias aeróbicas. É uma enzima responsável pela energia metabólica, sua função é reduzir o NADH em NAD⁺ (Fig. 34), deslocando prótons e ajudando a construir o potencial eletroquímico utilizado para produzir ATP. O aumento da expressão de proteínas envolvidas com a energia metabólica pode ser explicado pelo fato da célula requerer uma energia extra para a adaptação ao fenol. De fato, sabe-se que o estresse ambiental pode causar uma diminuição transitória da carga de energia das células, resultando na ativação da reação de regeneração de ATP e na inibição da reação da utilização do ATP (Schaechter et al., 2001).

Figura 34 - Reação química catalisada pela enzima NADH desidrogenase.

No *spot 4*, foi identificada a enzima acetil-CoA hidrolase, que tem a função de catalisar a formação de acetato a partir de acetil-CoA e vice e versa (Fig. 35). Esta enzima pertence à família das hidrolases, especificamente aquelas que agem sobre

as ligações tioéster, que são intermediários comuns em muitas reações biossintéticas incluindo a formação e degradação de ácidos graxos. Como esta enzima também participa da biossíntese de ácidos graxos, o aumento da expressão desta enzima pode indicar um aumento na taxa da biossíntese dos ácidos graxos, e isso pode representar o mecanismo de recuperação da membrana fosfolipídica danificada, decorrente do estresse oxidativo induzido pelo fenol, uma vez que este composto é lipossolúvel (Santos et al., 2004).

Figura 35 - Reação química catalisada pela enzima acetil-CoA hidrolase.

A enzima acil-CoA desidrogenase (*spot 6*) tem a função de catalisar a α,β oxidação dos ácidos graxos formando trans-enoyl-CoA e tem como cofator o FAD, os elétrons removidos pela oxidação passam pela cadeia respiratória e deixam como produto a água (Fig. 36). A β -oxidação do ácido graxo inicia com a adição de uma coenzima-A para o ácido graxo e termina quando restam dois ou três carbonos (como acetil-CoA ou propionil-CoA, respectivamente).

Figura 36 - Reação química catalisada pela enzima Acil-CoA desidrogenase.

Tabela 3 - Relação das proteínas de *Achromobater* sp. expressas na presença de fenol.

<i>Spot</i>	Proteína provável	Sequência de aminoácido analisada pelo MS	Cobertura (%)	pI/PM (kDa)	nº acesso
1	proteína hipotética KYC_22646	DIAESFGAKVVLTR	85	7,04/69,73	ZP_09302358.1
2	4-hidroxi-2-oxovalerato aldolase	AAPTPAEAKAGLVAR	66	7,3/36,84	YP_003980341.1
3	família de transportador de efluxo NodT	LAALYAQRDVAERTIAQRR NQLAALLGKGPD	100	7,04/50,8	ZP_06686885.1
4	acetil-CoA hidrolase	RALCIPPPPAASAGR	53	6,6/54,15	ZP_09298057.1
5	NADH desidrogenase	AGGREHRRVTGAARGVAR	38	5,82/46,99	YP_003981571.1
6	acil-CoA desidrogenase 2- hidroximucônico	EY RSGSRFFTIG MK	42	6,73/42,57	YP_003981811.1
7	semialdeído desidrogenase 1	AMSEVMNRDDFKIFVDLK	77	6,25/51,79	YP_003978563.1
8	succinato desidrogenase subunidade flavoproteína	QASLETVLRGRRLAEK	82	5,9/65,04	EGP45057.1
9	proteína degradação do fenol via <i>meta</i> clivagem	LIQIRGRVTQVTGTIIK	52	5,94/35	EGP43713.1

Já a enzima succinato desidrogenase subunidade flavoproteína (*spot 8*) tem como função catalisar a formação de fumarato a partir de succinato (Fig. 37) e esta é uma das reações do ciclo de Krebs que tem como co-fator o FAD. Esta enzima também canaliza elétrons para a cadeia respiratória.

Figura 37 - Reação química catalisada pela enzima succinato desidrogenase.

A expressão destas enzimas na presença de fenol indica que este composto é degradado até a formação dos ácidos carboxílicos, os quais são incorporados no Ciclo de Krebs (Fig. 38), ou seja, o fenol é mineralizado completamente até CO₂ e água por *Achromobacter* sp.

Figura 38 - Esquema do ciclo de Krebs.

Fonte: Sheppard, 2010.

Particularmente, em relação às enzimas usadas diretamente na biodegradação do fenol, foram identificadas três principais proteínas.

No *spot* 9 foi encontrada uma proteína envolvida na degradação do fenol através da *meta* clivagem do anel aromático. As proteínas identificadas nos *spot* 7 e 2 corroboram com esta hipótese de *meta* clivagem, pois representam as enzimas 2-hidroximucônico semialdeído desidrogenase 1 e a 4-hidroxi-2-oxovalerate aldolase, respectivamente. A enzima 2- hidroximucônico semialdeído desidrogenase 1 tem a função de converter o ácido 2-hidroximucônico semialdeído em 2- hidroximuconato, sendo esta a segunda etapa da degradação do fenol de sete etapas que são

conhecidas. E a enzima 4-hidroxi-2-oxovalerate aldolase catalisa a penúltima etapa da *meta* clivagem do fenol, transformando o 4 hidroxi-2-oxopentanoato em acetaldeído e piruvato (Fig. 39).

Figura 39 - Reação química catalisada pela enzima 4-hidroxi-2-oxovalerate aldolase.

Figura 40 - Esquema das clivagens do fenol.

Fonte: adaptada de Semple et al., 1999 apud Campos, 2008.

Após revisão na literatura das diferentes vias de clivagem do fenol (*orto* e *meta*) (Fig. 40), encontramos que o fenol é mais comumente degradado pela via *orto*. Porém esta linhagem de *Achromobater* sp. além de fazer a *meta* clivagem do fenol (via menos estudada) ela também produz um intermediário não comum.

Como já mencionado anteriormente um estudo realizado por Zhu et al. (2008), mostrou que uma cepa de *Alcaligenes faecalis* IS-46 foi capaz de transformar o fenol pela via *meta* diretamente em 2- hidroximucônico semialdeído (2-HMS) através da

ação da enzima catecol 2,3 dioxigenase. Em *Achromobacter* sp. é a primeira vez que este fato é descrito. Isto pode explicar a alta eficiência na biodegradação do fenol, uma vez que ao transformar o fenol diretamente em 2-HMS, a bactéria “pula” uma etapa de biodegradação, que seria a transformação do fenol em catecol.

Este resultado foi confirmado pelo ensaio enzimático com a linhagem de *Achromobacter* sp. Neste ensaio, não houve a formação do ácido *cis,cis* - mucônico a partir do catecol e sim a formação de 2-HMS (Fig. 41). A análise cromatográfica desta amostra confirmou que o tempo de retenção do intermediário gerado a partir da biodegradação do fenol coincidiu a formação do 2-HMS (Fig. 42). Deste modo, podemos concluir que *Achromobacter* sp. transforma fenol diretamente em 2-HMS através da ação da enzima catecol 2,3 dioxigenase. Provavelmente, a enzima de degradação do fenol (*meta* clivagem) encontrada no proteoma de *Achromobacter* sp. seja uma catecol 2,3 dioxigenase, com a mesma função da enzima encontrada em *Alcaligenes faecalis* IS-46, uma vez que *Achromobacter* sp. deriva da família Alcaligenaceae (**Reino:** Bacteria- **Filo:** Proteobacteria- **Classe:** Beta-Proteobacteria - **Ordem:** Burkholderiaceae – **Família:** Alcaligenaceae - **Gênero:** *Achromobacter*).

Figura 41 - Taxa de formação de 2-HMS a partir do catecol como substrato pela ação da catecol 2,3 dioxigenase, comprovado pelo aumento da absorbância a 360 nm.

Figura 42 - Cromatograma comparativo do intermediário (2-HMS) gerado durante a degradação do fenol (rosa) e pela ação da catecol 2,3 dioxigenase tendo o catecol como substrato (preto).

Em rosa, o cromatograma da amostra de 600 mg.L⁻¹ de fenol após 23 horas com a formação de 2-HMS e em preto, o cromatograma da amostra do ensaio enzimático com a presença do 2-HMS e catecol.

5 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos, podemos sugerir que *Achromobacter* sp. e *Pandoraea* sp. podem utilizar o fenol como única fonte de carbono em diferentes concentrações (200-600 mg.L⁻¹) utilizando diferentes vias para a biodegradação. Em *Achromobacter* sp. verificamos a formação do intermediário 2-HMS e em *Pandoraea* sp. não houve a formação de nenhum intermediário.

Os resultados também sugerem que estas linhagens, especialmente *Achromobacter* sp. que degrada o fenol mais rápido em maiores concentrações, podem ser utilizadas para o tratamento de efluentes fenólicos reais, com concentração de até 550 mg.L⁻¹ de fenóis (fenol, *m*- e *o*- cresol). Esta biodegradação dos fenóis dos efluentes, aliada à remoção da cor e dos outros contaminantes residuais com carvão ativo, pode permitir o seu reaproveitamento, abrindo novas perspectivas para o reuso de água de uma refinaria, por exemplo.

O isolamento de linhagens locais pode aumentar significativamente a chance de sucesso de um processo de biorremediação de efluentes, e assim diminuir os impactos negativos que os compostos fenólicos causam ao meio ambiente.

Os resultados obtidos através da eletroforese 2-D e identificação das principais proteínas envolvidas na biodegradação mostraram que *Achromobacter* sp. realiza a *meta* clivagem do fenol, pois três enzimas presentes nesta via foram identificadas (Fig. 43) (proteína degradação do fenol via *meta*- clivagem, 2-hidroximucônico semialdeído desidrogenase 1 e 4-hidroxi-2-oxovalerate aldolase). Além disso, outras enzimas envolvidas no metabolismo celular foram identificadas, comprovando que o fenol altera todo o metabolismo celular, envolvendo as mais diferentes vias metabólicas necessárias para que a célula possa superar o estresse celular ocasionado por esta exposição.

Neste sentido, a análise comparativa do proteoma pode ser uma ferramenta de rastreio muito útil para elucidar o metabolismo bacteriano na biodegradação de xenobióticos.

Através do ensaio enzimático foi possível identificar o 2-hidroximucônico semialdeído como intermediário formado por *Achromobacter* sp. durante a biodegradação do fenol, confirmando a hipótese que *Achromobacter* sp realiza a *meta* clivagem do fenol.

Comparando-se o intermediário formado durante a biodegradação do fenol, com o intermediário formado no ensaio enzimático da enzima catecol dioxigenase, verificamos que ambos apresentaram o mesmo tempo de retenção em HPLC, confirmando a sua identidade de 2-HMS. Através destes resultados é possível afirmar que a enzima utilizada por *Achromobacter* sp. para degradar o fenol se trata de uma catecol 2,3 dioxigenase. Esta via já havia sido anteriormente descrita por Zhu et al. (2008) em *Alcaligenes faecalis* IS-46, porém é a primeira vez que é descrita em *Achromobacter* sp.

Figura 43 - Em negrito as proteínas encontradas no gel de eletroforese 2-D, podendo assim elucidar a via de degradação do fenol da cepa *Achromobater* sp. (via *meta* clivagem).

REFERÊNCIAS*

- Abd-El-Haleem D, Beshay U, Abdelhamid AO, Moawad H, Zaki S. Effects of mixed nitrogen sources on biodegradation of phenol by immobilized *Acinetobacter* sp. strain (W-17). *Afr J Biotechnol*. 2003;2:8–12.
- Abhilash M. Applications of proteomics. *Inter J Genomics Proteomics*. 2009;4:1-10.
- Afzal M, Iqbal S, Rauf S, Khalid Z. Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas pseudomallei*. *J Haz Mat*. 2007;149:60–6.
- Agarry SE, Durojaiye AO, Yusuf RO, Aremu MO. Biodegradation of phenol in refinery wastewater by pure cultures of *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 950 and *Pseudomonas fluorescence* NCIB 3756. *Int J Environ Pollution*. 2008;32(1):3-11.
- Al-Thani RF, Abd-El-Haleem DAM, Al-Shammri M. Isolation and characterization of polyaromatic hydrocarbons-degrading bacteria from different Qatari soils. *Afr J Microbiol Res*. 2009;3(11): 761-66.
- Amer RA. Newly Isolated *Pandora* sp. capable of phenol biodegradation. *Res J Microbiol*. 2008;3(10):622-29.
- Annadurai G, Juang RS, Lee DJ. Microbiological degradation of phenol using mixed liquors of *Pseudomonas putida* and activated sludge. *Waste Manage*. 2002;22:703–10.
- Anselmo AM, Mateus M, Cabral JMS, Novais JM. Degradation of phenol by immobilized cells of *Fusarium flocciferum*. *Biotechnol Lett*. 1985;7:889–94.
- Atlas, R.M.; Bartha, R. Microbial ecology. 4th ed. Menlo Park: The Benjamin/Cummings; 1998. p. 533.
- Bai J, Wen JP, Li HM, Jiang Y. Kinetic modeling of growth and biodegradation of phenol and m-cresol using *Alcaligenes faecalis*. *Process Biochem*. 2007;42:510–17.
- Baptista IIR, Zhou NY, Emanuelsson EAC, Peeva LG, Leak DJ, Mantalaris A, Livingston AG. Evidence of species succession during chlorobenzene biodegradation. *Biotechnol Bioeng*. 2008;99(1):68-74.
- Britto JM, Rangel MdoC. Processos avançados de oxidação de compostos fenólicos em efluentes indústrias. *Quim Nova*. 2008;31(1):114-22.
- Buswell JA. Metabolism of phenol and cresols by bacillus stearothermophiles. *J Bacteriol*. 1977;124:1077–83.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [update 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

Campos SGC. Aspectos oxidativos e de biotransformação do poluente fenol na microalga *Minutocellus polymorphus*. [tese (Doutor em Ciência Bioquímica)]. São Paulo, SP: Instituto de Química, Universidade de São Paulo; 2008.

Coenye T, Falsen E, Hoste B, Ohlén M, Goris J, Govan JRW, Gillis M, Vandamme P. Description of *Pandoraea* gen. nov. with *Pandoraea apista* sp. nov., *Pandoraea pulmonicola* sp. nov., *Pandoraea pnomenusa* sp. nov., *Pandoraea sputorum* sp. nov. and *Pandoraea norimbergensis* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2000;50:887-99.

Collier DN, Hager PW, Phibbs PVJr. Catabolite repression control in the *Pseudomonads*. Res Microbiol. 1996;147:551-61.

Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 357. Diário Oficial da União. 2005;53:58-63.

Coutinho HLC, Oliveira VM, Manfio GP, Rosado AS, Daneshvar MI, Hollis DG, Steigerwalt AG, Whitney AM, Spangler L, Douglas MP, Jordan JG, MacGregor JP, Hill BC, et al. Assignment of CDC weak oxidizer group 2 (WO-2) to the genus *Pandoraea* and characterization of three new *Pandoraea* genomospecies. J Clin Microbiol. 2001;39:1819-26.

Cui CZ, Hu HY, Yu YQ, Yu Y. Isolation of a Bacterial Strain Capable of Carbamazepine-degrading and Biodegradation Characteristics. Microb Weisheng Tongbao. 2009;36(4):557-62.

De Lorenzo V. Cleaning up behind us. EMBO. Rep. 2011;2:357–59.

Demain AL, Davies JE. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2 nd ed., Washington, D.C.: ASM Press; 1999. p. 830.

Duetz WA, Marqués S, Wind B, Ramos JL, Van Andel JG. Catabolite repression of the toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* harboring pWW0 under various conditions of nutrient limitation in chemostat culture. Appl Environ Microbiol. 1996;62:601-06.

Feist CF, Hegeman. Phenol and benzoate metabolism by *Pseudomonas putida*: regulation of tangential pathways. J Bacteriol. 1969;100:869-77.

Futamata H, Harayama S, Watanabe K. Group-specific monitoring of phenol hydroxylase genes for a functional assesmente of phenol-stimulated trichloroethylene bioremediation. Appl Environ Microbiol. 2011;67,(10):4671-77.

González G, Herrera G, García MaT. Biodegradation of phenol industrial wastewater in a fluidized bed bioreactor with immobilized cells of *Pseudomonas putida*. Biores Technol. 2001;80:137–42.

Guo W, Li D, Zhong Q, Tao Y. Aerobic co-metabolism of carbazole by two novel bacterial consortia isolated from the oil refinery wastewater. Curr Microbiol. 2008;57:251–57.

Harayama S, Kok M, Neidle EL. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Ann Rev Microbiol.* 1992;46:565-601.

Herbert RA. Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments. In: Norris, J.R. & Grigorova, R. (Ed.). *Methods in Microbiology: Techniques in Microbial Ecology*. San Diego, CA: Academic Press, Inc.; 1990. p. 1-40.

Ho PL, Azevedo ILMJ, Serrano SMT. Genômica, transcriptômica e proteômica. In: Ulrich H, Colli W, Ho PL, Faria M, Trujillo. *Bases Moleculares da biotecnologia*. São Paulo: Roca; 2008. p. 125-52.

Horvath RS. Co-metabolism of methyl and chloro-substituted catechols by an *Achromobacter* sp. Possessing a new meta-cleaving oxygenase. *Biochem J.* 1970;119:871-76.

Iwaki H, Hasegawa Y. Degradation of 2-nitrobenzoate by *Burkholderia terrae* strain KU-15. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007;71:145–51.

Jencova V, Strnad H, Chodora Z, Ulbrich P, Hickey WJ, Paces V. Chlorocatechol catabolic enzymes from *Achromobacter xylosoxidans* A8. *Int Biodeterioration Biodegrad.* 2004;54:175-81.

Jencova V, Strnad H, Chodora Z, Ulbrich P, Vlcek C, Hickey WJ, Paces V. Nucleotide sequence, organization and characterization of the (halo)aromatic acid catabolic plasmid pA81 from *Achromobacter xylosoxidans* A8. *Res Microbiol.* 2008;159:118-27.

Jiang HL, Tay JH, Maszenan AM, Tay STL. Bacterial diversity and function of aerobic granules engineered in a sequencing batch reactor for phenol degradation. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(11):6767-75.

Jiang XW, Liu H, Xu Y, Wang SJ, Leak DJ, Zhou NY. Genetic and biochemical analyses of chlorobenzene degradation gene clusters in *Pandoraea* sp. strain MCB032. *Arch Microbiol.* 2009;191:485-92.

Jiang Y, Wen J, Bai J, Jia X, Hu Z. Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*. *J Hazardous Mater.* 2007;147:672–76.

Jones KH, Trudgill PW, Hopper DJ. Evidence of two pathways for the metabolism of phenol by *Aspergillus fumigatus*. *Arch Microbiol.* 1995;163:176-81.

Kalbitz K, Schwesing D, Schmerwitz J, Kaiser K, Haumaier L, Glaser B, Ellerbrock R, Leinweber P. Changes in properties of soil-derived dissolved organic matter induced by biodegradation. *Soil Biol Biochem.* 2003;35:1129-42.

Kalume DE, Okulate M, Zhong J, Reddy R, Suresh S, Deshpande N, Kumar N, Pandey A. A proteomic analysis of salivary glands of female *Anopheles gambiae* mosquito. *Proteomics.* 2005;5(14):3765-77.

- Kennedy AC. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agricult Ecosys Environ.* 2004;74:65-76.
- Kotturi G, Robinson CW, Inniss WE. Phenol degradation by a psychrotrophic strain of *Pseudomonas putida*, *Appl Microbial Biotechnol.* 1991;34:539–43.
- Kurbatov L, Albrecht D, Herrmann H, Petruschka L. Analysis of the proteome of *Pseudomonas putida* KT2440 grown on different sources of carbon and energy. *Environ Microbiol.* 2006;8(3):466-78.
- Lane DL, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington: DC; 1985. p. 6955-59.
- Leonard J, Gallop PM. Sequence analysis of arginyl peptides by mass spectrometry. *Anal Biochem.* 1969;29:203-9.
- Leonard D, Lindley ND. Carbon and energy flux constraints in continuous cultures of *Alcaligenes eutrophus* grown on phenol. *Microbiology.* 1998;144:241–48.
- Lovley DR. Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nature Rev Microbiol.* 2003;1:35–44.
- Matsui T, Yoshida T, Yoshimura T, Nagasawa T. Regioselective carboxylation of 1,3-dihydroxybenzene by 2,6-dihydroxybenzoate decarboxylase of *Pandoraea* sp. 12B-2. *Appl Environ Microbiol.* 2006;73:95-102.
- Melo IS, Azevedo JL. Como isolar microrganismos degradadores de moléculas xenobióticas. In: *Microbiologia ambiental*. Jaquariúna: Emprapa – CNPMA; 1997. p. 167-81.
- Monteiro AAMG, Boaventura RAR, Rodrigues AE. Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a batch reactor. *Biochem Engin J.* 2000;6:45–9.
- Morales G, Linares JF, Beloso A, Albar JP, Martinez JL, Rojo F. The *Pseudomonas putida* CRC global regulator controls the expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds. *J Bacteriol.* 2004;186:1337–44.
- Morsen A, Rehn HJ. Degradation of phenol by a defined mixed culture immobilized by adsorption on activated carbon and sintered glass. *Appl Microbial Biotechnol.* 1990;33:206–12.
- Nair IC, Jayachandran K, Shashidhar S. Biodegradation of phenol. *Afr J Biotechnol.* 2008;7(25):4951–58.
- Nishino K, Yamada J, Hirakawa H, Hirata T, Yamaguchi A. Roles of TolC-dependent multidrug transporters of *Escherichia coli* in resistance to beta-lactams. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:3030-33.

Ojumu TV, Bello OO, Sonibare JA, Solomon BO. Evaluation of microbial systems for bioremediation of petroleum refinery effluents in Nigeria. *Afr J Biotechnol.* 2005;4(1):31–5.

Quan X, Shi H, Zhang Y, Wang J, Qian Y. Biodegradation of 2,4-dichlorophenol and phenol in an airlift inner-loop bioreactor immobilized with *Achromobacter sp.* *Separ Purif Technol.* 2004;34:97-103.

Ramos J L, Duque E, Gallegos MT, Godoy P. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:743-68.

Ruiz-Manzano A, Yuste L, Rojo F. Levels and activity of the *Pseudomonas putida* global regulatory protein CRC vary according to growth conditions. *J Bacteriol.* 2005;187(11): 3678-86.

Saier MHJr. Multiple mechanisms controlling carbon metabolism in bacteria. *Biotechnol Bioengin.* 1998;5:170-74.

Saiki RK, Scarf F, Faloona FA, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Washington, DC: Science; 1985. p. 1350-54.

Sambrook R, Fritsch EF, Maniatis. T. *Molecular Cloning: a laboratory.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1982. p. 2344.

Santos KS, Santos LD, Mendes MA, Souza BM, Malaspina O, Palma MS. Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nursehoneybees (*Apis mellifera* L.). *Insect Biochem Molecular Biology.* 2005;35:85-91.

Schaechter M. View from here group. *Microbiol Molecular Biology Rev.* 2001;65:119-30.

Seung Il K, Jong-Soon C, Hyung-Yeel K. A Proteomics Strategy for the Analysis of Bacterial Biodegradation Pathways. *J Integr Biol.* 2007;11:3.

Shawabked R, Khaled M, Kheifat. Rate of biodegradation of phenol by *Klebsiella oxytoca* in minimal medium and nutrient broth conditions. *Biorem J.* 2007;11:13-9.

Sheppard T. The TCA cycle. Available from: <http://www.blobs.org/science/article.php?article=31>. [2012 Jul 15].

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Neubauer G, Shevchenko A, Mortensen P, Mann M. A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone. *Biochem Society Transac.* 1996;24,(3):893-6.

Shingler V. Integrated regulation in response to aromatic compounds: from signal sensing to attractive behavior. *Environ Microbiol.* 2003;5,(12):1226-41.

Solomon BO, Posten C, Harder MPF, Hetch V, Deckwer WD. Energetics of *Pseudomonas cepacia* growth in a chemostat with phenol imitation. J Chemical Technol Biotechnol. 1994;60:275–82.

Stahl DA. Molecular approaches for the measurement of density, diversity, and phylogeny. In: Hurst CJ, Knudsen GR, Mcinerney MJ, Stetzenbach LD, Water MW. Manual of environmental microbiology. Washington: ASM Press; 1997. p. 102-14.

Stanbury PF, Whitaker A, Hall S.J. Principles of fermentation technology. 2 nd ed. Oxford, Butterworth Heinemann: Elsevier Science; 1995. p. 357.

Strnad H, Ridl J, Paces J, Kolar M, Vlcek C, Paces V. Complete genome sequence of the haloaromatic acid-degrading bacterium *Achromobacter xylosoxidans* A8. J Bacteriol. 2010;193(3):791-8.

Stülke J, Hillen W. Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. Annual Rev Microbiol. 2000;54:849-80.

Teramoto M, Futamata H, Harayama S, Watanabe K. Characterization of a high-affinity phenol hydroxylase from *Comamonas testosteroni* R5 by gene cloning, and expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1c. MGG. 1999;262(3):552-8.

Thakur IS, Venna P, Upadhayaya K. Molecular cloning and characterization of pentachlorophenol-degrading monooxygenase genes of *Pseudomonas* sp. from the chemostat. Biochem. Biophys. Res Commun. 2002;290:770-4.

Timmis KN, Pieper DH. Bacteria designed for bioremediation. Trends Biotechnol. 1999;17:200–4.

Trigueros DEG. Avaliação da cinética de biodegradação dos compostos tóxicos: benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno (BTEX) e fenol. [dissertação (Mestrado em Engenharia Química)]. Toledo, PR: Universidade Estadual do Oeste do Paraná; 2008.

Xiao FL, Feng JY, Meng CJ. A new bacteria LX-1 was isolated from the aerobic activated sludge, and it grew well when Dichloromethane served as the sole carbon. Biological and Environ Engin. 2012;32(7):1563-71.

Wan N, Gu J, Yan Y. Degradation of *p*-nitrophenol by *Achromobacter xylosoxidans* Ns isolated from wetland sediment. Int Biodeterior Biodegradation. 2007;59:90-6.

Yabuuchi E, Yano I, Goto S, Tanimura E, Ito T, Ohyama A. Description of *Achromobacter xylosoxidans*. Int J System Bacteriol. 1974;24:470-7.

Yoon IH, Chang JS, Lee JH, Kim KW. Arsenite oxidation by *Alcaligenes* sp. strain RS-19 isolated from arsenic-contaminated mines in the Republic of Korea. Environ Geochem Health. 2009;31:109-17.

Zaspel JM, Hoy MA. Microbial Diversity Associated with the Fruit-Piercing and Blood-Feeding Moth *Calyptra thalictri* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann Entomol Soc Am*. 2008;101(6):1050-5.

Zak JC, Willig MR, Moorhead DL, Wildman HG. Functional diversity of bacterial communities: a quantitative approach. *Soil Biology Biochem*. 1994;26:1101-8.

Zhu C, Zhang L, Zhao L. Molecular cloning, genetic organization of gene cluster encoding phenol hydroxylase and catechol 2,3- dioxygenase in *Alcaligenes faecalis* IS-46. *World J Microbiol Biotechnol*. 2008;24:1687-95.

ANEXO - Autorização de coleta de material microbiológico

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 30524-1	Data da Emissão: 11/08/2011 18:03
Dados do titular	
Nome: Elen Aquino Perpetuo	CPF: 022.542.769-99

Ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para Importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Táxons registrados

Nível taxonômico	Táxon(s)
REINO	Bactéria

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 44836658

Página 1/1