UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

STEFANIA PEGORIN BRAGA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE TRANSFORMAÇÃO
DE COMPOSTOS TÓXICOS POR ISOLADOS DE
GORDONIA PARAFFINIVORANS E *GORDONIA SIHWENSIS*
PROVENIENTES DE COMPOSTAGEM**

2018

STEFANIA PEGORIN BRAGA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE TRANSFORMAÇÃO
DE COMPOSTOS TÓXICOS POR ISOLADOS DE
GORDONIA PARAFFINIVORANS E *GORDONIA SIHWENSIS*
PROVENIENTES DE COMPOSTAGEM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Renata Castiglioni Pascon

São Paulo

2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Braga, Stefania Pegorin

Avaliação do potencial de transformação de
compostos tóxicos por isolados de *Gordonia*
paraffinivorans e *Gordonia sihwensis* provenientes
de compostagem / Stefania Pegorin Braga;
orientadora Renata Castiglioni Pascon. -- São
Paulo, 2018.

121 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *Gordonia paraffinivorans*. 2. *Gordonia*
sihwensis. 3. Borracha sintética. 4.
Hidrocarbonetos. 5. Biorremediação.. I. Pascon,
Renata Castiglioni, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidata: Stefania Pegorin Braga

Título da Dissertação: Avaliação do potencial de transformação de compostos tóxicos por isolados de *Gordonia paraffinivorans* e *Gordonia sihwensis* provenientes de compostagem

Orientadora: Renata Castiglioni Pascon

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

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

À minha mãe Silvia Pegorin Braga (*in memoriam*) pelo exemplo de vida, dedicação, energia, inteligência e coragem. Sua personalidade sempre organizada e ao mesmo tempo inventiva e generosa e o amor incondicional que sempre demonstrou serão eternamente uma lembrança e um incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Silvia (*in memoriam*) e Maurício e à minha irmã Isabella por acreditarem na minha competência, por serem minha base e me darem certeza de que não estou sozinha nessa caminhada.

Agradeço também:

A minha orientadora Doutora Renata Castiglioni Pascon por todo conhecimento, instrução e amizade durante essa jornada. Aos professores do LIMic, principalmente ao Professor Doutor Marcelo Afonso Vallim, pelo apoio e colaborações.

Ao meu marido Alisson por toda paciência, carinho e compreensão e por estar sempre ao meu lado nos dias fáceis e difíceis.

A minha querida família que é responsável pelo que me tornei e por nunca me deixar desistir, acreditando sempre no meu potencial.

Agradeço à jornalista Flávia Pegorin pelos conselhos e ajuda que ultrapassaram a revisão ortográfica e gramatical.

Agradeço aos amigos do LIMic Alexandre Paes, Amanda Teixeira, Beatriz Domingos, Crislaine Calvete, Gabrielle Felizardo, João Miguel, Kevin Martho, Rafael Tomita, Sônia Ueda e Yasmin Gonzales pela amizade e pelo incentivo.

Agradeço aos professores da UNIFESP, principalmente ao Professor Doutor Diogo de Oliveira Silva e à aluna Heloísa Gonçalves. Agradeço ao Professor Doutor Elliot Watanabe Kitajima (ESALQ/USP) e à técnica Cátia Mieko Fukumoto (CESM-ICAQF/UNIFESP).

Agradeço à Universidade de São Paulo, à Universidade Federal de São Paulo, à Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP), à FAPESP e à CAPES por me darem oportunidade e acreditarem em meu potencial.

E, por fim, agradeço a todos os amigos que de alguma forma tornaram possível a realização deste trabalho.

“Não há problema em não saber todas as respostas. É melhor admitir nossa ignorância do que acreditar em respostas que podem estar erradas. Fingir que sabe tudo fecha a porta para a descoberta do que realmente estava lá”

Neil deGrasse Tyson

RESUMO

BRAGA, S. P. **Avaliação do potencial de transformação de compostos tóxicos por isolados de *Gordonia paraffinivorans* e *Gordonia sihwensis* provenientes de compostagem.** 2018. 121 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A biorremediação é uma metodologia eficiente na recuperação de ambientes poluídos. Ela emprega organismos capazes de degradar compostos tóxicos transformando-os em substâncias menos agressoras. Dentre os microrganismos que são utilizados para este fim, o gênero *Gordonia* tem se destacado bastante devido a sua grande versatilidade metabólica, o que permite a utilização de substratos complexos e tóxicos como fonte energética, eliminando-os do meio ambiente. O sequenciamento e a análise dos genomas de dois isolados de *G. paraffinivorans* (MTZ041 e 052) e de um isolado de *G. sihwensis* (MTZ096), provenientes da compostagem, demonstrou que esses microrganismos possuem os elementos genéticos que conferem a habilidade de degradar hidrocarbonetos, borracha sintética e borracha natural. Para comprovar a capacidade desses isolados em utilizar estas diferentes fontes de carbono, foram realizados ensaios contendo um indicador de óxido redução (2,6 DCPIP), cinéticas de crescimento, análises químicas (Cromatografia Gasosa, CG), qPCR e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os três isolados usados neste trabalho foram capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte única de carbono. Os resultados dos ensaios cromatográficos demonstram que *G. paraffinivorans* MTZ041 consumiu 28,92% do hexadecano presente no meio, contra 69,80% consumido por *G. sihwensis* MTZ096 ao longo de 168 horas. As curvas de crescimento também demonstraram que a biomassa acumulada por *G. sihwensis* MTZ096 é 3,3 vezes maior do que a biomassa de *G. paraffinivorans* MTZ041 para o tratamento com hexadecano, totalizando 3,68 mg/ml e 1,11 mg/ml, respectivamente. Conforme esperado, mediante estas observações, a presença de hexadecano como fonte única de carbono no meio de cultivo, levou ao aumento da expressão dos genes responsáveis pela degradação de hidrocarbonetos. Para o sistema CYP 153, os genes FER, CYP 153 e FER RED tiveram sua expressão aumentada 750, 232 e 110 vezes, respectivamente. Já os genes *alkB*, *rubA3*, *rubA4*, *rubB* e *alkU* do sistema alceno hidroxilase tiveram sua expressão aumentada em 248, 1576, 1296, 6,6 e 20 vezes respectivamente. Estes

resultados confirmam dados prévios da literatura de que os isolados de *Gordonia* tem grande potencial para biotransformação de hidrocarbonetos. Em relação à capacidade de assimilação de borracha sintética e natural, as análises *in silico* demonstraram que somente os isolados da espécie *G. paraffinivorans* possuem o gene Lcp (Látex Clearing Protein) responsável pelo primeiro passo da assimilação destes substratos. As curvas de crescimento em borracha natural e sintética como fonte única de carbono foram realizadas ao longo de 11 semanas e demonstram a capacidade destes substratos em suportar o crescimento robusto. Durante 80 dias, foi possível evidenciar a presença de bacilos e a formação de biofilme na borracha sintética e natural por meio de MEV. Este é o primeiro relato na literatura de *G. paraffinivorans* assimiladora de borracha e a terceira espécie do gênero *Gordonia* com esta habilidade metabólica. Dada a grande complexidade deste substrato e a escassez de microrganismos com esta capacidade, a descrição e a caracterização deste isolado são de grande originalidade e relevância biotecnológica.

Palavras-chave: *Gordonia paraffinivorans*, *Gordonia sihwensis*, borracha sintética, hidrocarbonetos, hexadecano, biorremediação.

ABSTRACT

BRAGA, S. P. **Evaluation of the potential for transformation of toxic compounds by *Gordonia paraffinivorans* and *Gordonia sihwensis* isolated from composting.** 2018. 121 f.

Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, ano.

Bioremediation is an efficient methodology on recovery of polluted environments. It acts employing microorganisms capable of degrading toxic compounds into less aggressive substances. Among the microorganisms used in bioremediation, the genus *Gordonia* has stood out due to its great metabolic versatility, which allows the use of complex toxic substrates as energy source, eliminating them from the environment. Sequencing and analysis of the genomes of two isolates of *G. paraffinivorans* (MTZ041 and 052) and an isolate of *G. sihwensis* (MTZ096) from composting, demonstrated that these microorganisms possess the genetic factors that confer the ability to degrade hydrocarbons, synthetic and natural rubber. To prove the capacity of growth of the isolates in these carbon sources, growth tests were carried out containing an oxide reduction indicator (2,6 DCPIP), kinetics growth, chemical analysis (gas chromatography, CG), qPCR and scanning electron microscopy (SEM). The three isolates used in this study were able to utilize hydrocarbons as sole carbon source. The results of the chromatographic assays show that *G. paraffinivorans* MTZ041 consumed 28.92% of the hexadecane present in the medium, against 69.80% consumed by *G. sihwensis* MTZ096 over 168 hours. The growth curves also showed that the biomass accumulated by *G. sihwensis* MTZ096 is 3.3 times higher than the biomass of *G. paraffinivorans* MTZ041 for the hexadecane treatment, resulting in 3.68 mg/ml and 1.11 mg/ml, respectively. As expected by these observations, the presence of hexadecane as carbon source in the medium led to an increased expression of the genes responsible for the degradation of hydrocarbons. For the CYP 153 System, genes FER, CYP 153 and FER RED had an increased expression of 750, 232 e 110 times, respectively. As for the Alkane Hydroxylase System, genes *alkB*, *rubA3*, *rubA4*, *rubB* and *alkU* had an increased expression of 248, 1576, 1296, 6,6 e 20 times, respectively. These results confirm previous data from the literature that *Gordonia* isolates have a great potential for biotransformation of hydrocarbons. Regarding assimilation of synthetic rubber and natural, *in silico* analysis demonstrated that only the isolates from the species *G. paraffinivorans* have the Lcp gene (latex Clearing

Protein) responsible for the first step of the assimilation of these substrates. The growth curves in natural and synthetic rubber as carbon source were conducted over 11 weeks and demonstrate the ability of these substrates to support the robust growth of *G. paraffinivorans*. During 80 days, it was possible to evidence the presence of bacilli and the formation of biofilms on natural and synthetic rubber by SEM. This is the first report in the literature of *G. paraffinivorans* as a rubber degrader and the third species of the genus *Gordonia* with this ability. Given the complexity of this substrate and the shortage of micro-organisms with this capacity the description and characterization of this isolate is of great originality and biotechnological relevance.

Keywords: *Gordonia paraffinivorans*, *Gordonia sihwensis*, synthetic rubber, hydrocarbons, hexadecane, bioremediation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Consumo mundial de petróleo em 2016.....	19
Figura 2. Processo de refino de petróleo.....	21
Figura 3. Produtos derivados do petróleo.....	22
Figura 4. Fórmula estrutural do <i>cis</i> -1,4-poliisopreno	24
Figura 5. Polimerização do isopreno	25
Figura 6. Vulcanização do isopreno	26
Figura 7. Sistema AH	31
Figura 8. Oxidação terminal.....	32
Figura 9. Clivagem de <i>cis</i> -1,4-poliisopreno pela proteína secretada pelo gene <i>Lcp</i>	33
Figura 10. Metabolismo de degradação de <i>cis</i> -1,4-poliisopreno por <i>G. polyisoprenivorans</i> VH2.	35
Figura 11. Curvas de crescimento dos isolados <i>G. paraffinivorans</i> MTZ041, <i>G. paraffinivorans</i> MTZ052 e <i>G. sihwensis</i> MTZ096.....	52
Figura 12. Avaliação do crescimento de <i>G. paraffinivorans</i> MTZ041 e padronização de concentrações de 2,6 DCPIP.	54
Figura 13. Curva de crescimento dos isolados <i>G. paraffinivorans</i> MTZ041 e <i>G. sihwensis</i> MTZ096 em 168 horas na presença de frutose e hexadecano.....	57
Figura 14. Cromatografia gasosa para determinação do tempo de retenção do hexadecano.....	60
Figura 15. Análise do consumo de hexadecano como fonte única de carbono por <i>G. paraffinivorans</i> MTZ041 por cromatografia gasosa.....	62
Figura 16. Representação do sistema CYP153 em <i>G. sihwensis</i> MTZ096.	63
Figura 17. Representação do sistema AH em <i>G. sihwensis</i> MTZ096..	64
Figura 18. qPCR dos genes ferredoxina (FER), CYP 153, ferredoxina redutase (FER RED), alceno-1-monooxigenase (<i>alkB</i>), rubredoxina (<i>rubA3</i>), rubredoxina (<i>rubA4</i>), rubredoxina redutase (<i>rubB</i>) e regulador transcricional (<i>alkU</i>) de <i>G. sihwensis</i> MTZ096.	65
Figura 19. Representação do gene <i>Lcp</i> em <i>G. paraffinivorans</i>	67
Figura 20. Árvore filogenética da proteína <i>Lcp</i> das espécies de actinomicetos.	67
Figura 21. Padrão de crescimento de <i>G. paraffinivorans</i> em meio de borracha como fonte única de carbono.....	69
Figura 22. Curvas de crescimento dos isolados <i>G. paraffinivorans</i> MTZ041 e <i>G. paraffinivorans</i> MTZ052 em borracha sintética como fonte de carbono.....	71

Figura 23. Gradiente de cor do meio de cultura com borracha sintética ao longo de 80 dias.....	72
Figura 24. Curvas de crescimento dos isolados <i>G. paraffinivorans</i> MTZ041 e <i>G. paraffinivorans</i> MTZ052 em borracha natural como fonte de carbono.	73
Figura 25. Gradiente de cor do meio de cultura com borracha natural ao longo de 80 dias.....	74
Figura 26. Fragmentos de látex natural após a coloração de Schiff.....	75
Figura 27. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 4 dias e aumento de 450x.....	78
Figura 28. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 2 semanas e aumento de 450x.	79
Figura 29. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 3 semanas e aumento de 450x.....	80
Figura 30. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 4 semanas e aumento de 450x.....	81
Figura 31. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 6 semanas e aumento de 450x.....	82
Figura 32. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 9 semanas e aumento de 450x.....	83
Figura 33. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 11 semanas e aumento de 450x	84
Figura 34. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 4 dias e aumento de 5000x.....	85
Figura 35. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 2 semanas e aumento de 5000x.....	86
Figura 36. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 3 semanas e aumento de 5000x.....	87
Figura 37. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 4 semanas e aumento de 5000x.....	88
Figura 38. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 6 semanas e aumento de 5000x.....	89
Figura 39. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 9 semanas e aumento de 5000x.....	90
Figura 40. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 11 semanas e aumento de 5000x	91

Figura 41. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha natural em 2 semanas e aumento de 450x.....	94
Figura 42. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha natural em 4 semanas e aumento de 450x.....	95
Figura 43. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha natural em 6 semanas e aumento de 450x.....	96
Figura 44. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha natural em 9 semanas e aumento de 450x.....	97
Figura 45. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha natural em 11 semanas e aumento de 450x.....	98
Figura 46. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha natural em 2 semanas e aumento de 5000x.....	99
Figura 47. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha natural em 4 semanas e aumento de 5000x.....	100
Figura 48. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha natural em 6 semanas e aumento de 5000x.....	101
Figura 49. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha natural em 9 semanas e aumento de 5000x.....	102
Figura 50. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha natural em 11 semanas e aumento de 450x.....	103
Figura 51. Expressão do gene Lcp.	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características das borrachas natural e sintética	24
Tabela 2. Balanço do derramamento de petróleo no Golfo do México	27
Tabela 3. Lista de bactérias degradadoras de borracha	34
Tabela 4. Organização dos sistemas alcano hidroxilase e CYP153 em <i>Gordonia</i> ...	37
Tabela 5. Organização do gene Lcp em <i>Gordonia</i>	39
Tabela 6. Sequência de oligonucleotídeos para verificação da presença dos genes do Sistema CYP 153 e Sistema AH	47
Tabela 7. Dados da curva de crescimento em peso seco de <i>Gordonia sihwensis</i> MTZ096	56
Tabela 8. Padronização de solvente para extração de hexadecano do meio de cultivo.	60
Tabela 9. Consumo de diferentes concentrações de hexadecano por <i>G. paraffinivorans</i> MTZ041	61
Tabela 10. Taxa de consumo de hexadecano para os isolados <i>G. paraffinivorans</i> MTZ041 e <i>G. sihwensis</i> MTZ096	63

LISTA DE SIGLAS

2,6-DCPIP	2,6 diclorofenol-indofenol
AH	alcano-hidroxilase
BH	Meio mínimo de sais minerais Bushnell Haas
BLAST	Basic Local Alignment
BMS	Meio mínimo de sais basais
cDNA	DNA complementar
CG	Cromatografia a gás
CG-MS	Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas
CoA	Coenzima A
CT	Cycle Threshold
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
FPZSP	Parque Zoológico de São Paulo
gDNA	DNA genômico
HPA	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
IR	Borracha sintética de isopreno (Isoprene Rubber)
LB	Meio rico Luria-Bertani
Lcp	Latex clearing protein
LIMic	Laboratório de Interações Microbianas
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótideo fosfato
NR	Borracha natural (Natural Rubber)
OD	Densidade óptica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	PCR quantitativo
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
UPCO	Unidade de Produção de Compostos Orgânicos

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	11
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. O SETOR PETROLÍFERO	19
2.2. O PETRÓLEO	20
2.2.1. Combustíveis	22
2.2.2. Petroquímicos	23
2.2.2.1. Borracha natural e borracha sintética	23
2.3. DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS CONTAMINANTES E BIORREMEDIAÇÃO	26
2.4. BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS	29
2.4.1. Metabolismo dos hidrocarbonetos	30
2.5. BIODEGRADAÇÃO DE BORRACHA NATURAL E SINTÉTICA	32
2.5.1. Metabolismo da borracha	32
2.6. O GÊNERO <i>GORDONIA</i>	36
2.6.1. <i>Gordonia paraffinivorans</i> e <i>Gordonia sihwensis</i>	40
OBJETIVO GERAL	41
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1. MATERIAIS	42
3.1.1. Lista de soluções e meios utilizados no trabalho	42
3.2. MÉTODOS	43
3.2.1. Microrganismos usados neste trabalho	43
3.2.2. Condições de cultivo dos microrganismos	43
3.2.3. Curva de crescimento microbiano em presença de açúcares	43
3.2.4. Ensaio de assimilação de hidrocarbonetos	44
3.2.5. Avaliação do crescimento pelo método de peso seco	44
3.2.6. Análises cromatográficas	44
3.2.7. Condições de cultivo e extração de RNA total	45
3.2.8. Expressão gênica por qPCR	46
3.2.9. Análises de bioinformática	48
3.2.10. Avaliação do crescimento em presença de borracha como fonte única de carbono	48
3.2.11. Coloração com reagente de Schiff	49

3.2.12. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1. CURVA DE CRESCIMENTO MICROBIANO EM PRESENÇA DE AÇÚCARES	51
4.2. ENSAIO DE ASSIMILAÇÃO DE HIDROCARBONETOS	53
4.3. CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>G. SIHWENSIS</i> MTZ096 PARA DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETO MODELO	55
4.4. CURVA DE CRESCIMENTO PARA <i>G. SIHWENSIS</i> MTZ096 E <i>G. PARAFFINIVORANS</i> MTZ041	56
4.5. PADRONIZAÇÃO DAS ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	59
4.5.1. Padronização da concentração de hidrocarbonetos	61
4.6. EXPRESSÃO GÊNICA DOS SISTEMAS ENVOLVIDOS NO CONSUMO DE HIDROCARBONETOS EM <i>G. SIHWENSIS</i>	63
4.7. ESTUDO DO CONSUMO DE BORRACHA POR <i>G. PARAFFINIVORANS</i>	66
4.8. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>G. PARAFFINIVORANS</i> EM BORRACHA COMO FONTE ÚNICA DE CARBONO.....	68
4.9. CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>GORDONIA PARAFFINIVORANS</i> MTZ041 E MTZ052 EM PRESENÇA DE BORRACHA COMO FONTE ÚNICA DE CARBONO	70
4.10. COLORAÇÃO COM REAGENTE DE SCHIFF	75
4.11. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	76
4.12. EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE LCP ENVOLVIDO NA DEGRADAÇÃO DE BORRACHA	104
5. CONCLUSÕES.....	107
REFERÊNCIAS.....	108
ANEXO.....	117
APÊNDICES.....	118

1. INTRODUÇÃO

O Laboratório de Interações Microbianas da UNIFESP tem se dedicado a identificar microrganismos de compostagem que tenham a capacidade de assimilar resíduos contaminantes do meio ambiente. O composto utilizado como ponto de partida para o isolamento de microrganismos cultiváveis e metagenômica é proveniente da Unidade de Produção de Compostos Orgânicos do Parque Zoológico de São Paulo. Os estudos desenvolvidos desde 2009 pelo nosso grupo mostram que este material é rico em microrganismos com alta diversidade metabólica, os quais são úteis para produção de enzimas hidrolíticas e em processos de degradação de contaminantes e biorremediação (ANTUNES, 2016; BITENCOURT et al., 2010; DUTRA; PASCON; VALLIM, 2013; MARTINS et al., 2013; PASCON et al., 2011; TRAMA et al., 2014).

Nos últimos dois anos foram isolados microrganismos desta compostagem capazes de degradar hidrocarbonetos. Desse trabalho resultou a descrição de dois isolados de *Gordonia paraffinivorans* e um isolado de *Gordonia sihwensis*, capazes de assimilar alcanos de cadeia linear longa, cíclicos e celulose como fonte única de carbono (OLIVEIRA, 2015; PAGANINI, 2015). O sequenciamento dos genomas desses isolados revelou a existência de dois clusters de genes homólogos já descritos, como o sistema alcano hidroxilase (AH) e o sistema CYP 153 (FUJII et al., 2004; FUJII et al., 2006). A expressão do sistema CYP 153 em *E. coli* demonstrou que esse organismo recombinante é capaz de converter alcanos em álcoois, o que representa o primeiro passo na assimilação desses compostos pela ação da monoxigenase CYP153, ferredoxina e ferredoxina redutase (FUJII et al., 2006). Oliveira (2015) comprovou que, pelo menos um componente do sistema, tem a expressão gênica induzida pela presença de alcanos de cadeia longa no meio de cultura (OLIVEIRA, 2015).

Além dos trabalhos com alcanos, os genomas destes isolados foram usados para pesquisar a presença de elementos genéticos que indicassem a capacidade de degradação de borracha. Os isolados de *G. paraffinivorans* (MTZ041 e MTZ052) possuem o gene *Lcp* (Latex Clearing Protein), o qual codifica a proteína que catalisa o primeiro passo na assimilação da borracha sintética, *cis*-1,4-poliisopreno. Esse gene foi identificado e reportado na literatura para outras espécies de *Gordonia*, mas não

para *G. paraffinivorans* (HIESSL et al., 2012). Portanto, o estudo dessa via de degradação é inédito na espécie.

Considerando a grande versatilidade metabólica das espécies do gênero *Gordonia*, a disponibilidade de isolados inéditos provenientes de compostagem (dos quais se tem o genoma sequenciado), bem como a necessidade de ampliar os conhecimentos sobre os mecanismos genéticos que controlam importantes passos metabólicos de alto potencial biotecnológico para biorremediação, o aprofundamento dos estudos dos isolados de *G. paraffinivorans* e *G. sihwensis* representa uma oportunidade valiosa de pesquisa aplicada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O SETOR PETROLÍFERO

O setor petrolífero é essencial à economia mundial, pois movimenta diversos mercados consumidores. Além disso, os países que detêm reservas de petróleo possuem vantagens competitivas – por serem capazes de proporcionar segurança econômica a diversos setores internos, como transporte, produção de energia e até exportação (BRASIL, 2014).

Vale mencionar ainda que o volume de petróleo consumido no mundo em 2016 foi de 96,6 milhões de barris/dia, o que corresponde a um aumento de 1,6% em relação ao ano anterior. Os 10 países que mais consomem petróleo correspondem a mais de 60% do mercado mundial (Figura 1). O aumento na exploração de recursos acaba por esgotar as reservas naturais e gera resíduos no ambiente que são difíceis de serem removidos e acabam se acumulando (BRITISH PETROLEUM, 2017).

Figura 1. Consumo mundial de petróleo em 2016

Fonte: Adaptado de British Petroleum (2017)

O setor petrolífero constitui a principal fonte de matéria-prima para diversos produtos industrializados, como plásticos e combustíveis fósseis, e é responsável pela

geração de 40% de toda energia mundial. Porém, apesar de todas as vantagens, durante a exploração, o refino, o transporte e outras operações envolvendo petróleo, vazamentos ocorrem, causando contaminação do ambiente (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010; MAPELLI et al., 2017; SPIES; MUKHTASOR; BURNS, 2017).

2.2.O PETRÓLEO

O óleo cru extraído das jazidas de petróleo é uma mistura de compostos químicos – os hidrocarbonetos e as resinas (MULLIGAN, 2005). Os hidrocarbonetos predominantes no petróleo são os alcanos, formados por carbono e hidrogênio que podem assumir diferentes configurações: n-alcanos (cadeias lineares), ciclo-alcanos (cadeias cíclicas) e iso-alcanos (cadeias ramificadas). Além desses, os hidrocarbonetos aromáticos (benzeno e derivados) e pequenas quantidades de nitrogênio, oxigênio e compostos sulfurosos também fazem parte da composição do óleo (JOHNSEN; WICK; HARMS, 2005; SPEIGHT, 2014).

Dependendo do número de carbonos, os alcanos, em temperatura ambiente, podem ser gasosos (1 a 4 C), líquidos (5 a 17 C) ou sólidos (18 ou mais C) (VAN BEILEN et al., 2001).

Embora pouco utilizado em seu estado natural, o petróleo, quando refinado, dá origem aos mais diversos produtos, como combustíveis, plásticos, cosméticos, borracha sintética, detergentes, tintas, medicamentos, fertilizantes, tecidos sintéticos, entre outros (BRASIL, 2014; BRASIL, 2016; MARTINS et al., 2015). Mas antes de dar origem a todos esses tipos de produtos, o petróleo passa por um processo de refinamento para que possam ser separadas as diversas frações do óleo (SZKLO; ULLER; BONFÁ, 2012).

O refino do petróleo consiste na separação físico-química do óleo por meio de uma coluna de destilação. O óleo cru é aquecido com um trocador de calor e em seguida passa por uma coluna de destilação vertical, onde cada fração será retirada de acordo com sua temperatura de condensação. Na Figura 2 é possível observar que o gás e a nafta são retirados no topo da coluna de destilação, devido a sua menor densidade. Já os óleos lubrificantes, gasóleo e outros resíduos, que são mais densos e têm maior temperatura de ebulição, são retirados na base da coluna (SZKLO; ULLER; BONFÁ, 2012).

Figura 2. Processo de refino de petróleo
Fonte: Galp (2015)

De acordo com Szklo; Uller e Bonfá (2012), os produtos finais gerados a partir do refino de petróleo podem ser divididos em três categorias:

1. Combustíveis: correspondem a 90% dos produtos finais gerados. Incluem diesel, gasolina, querosene, óleos residuais, entre outros.
2. Produtos finais não-combustíveis: como graxa, asfalto, solventes e lubrificantes.
3. Produtos intermediários: nafta, eteno, propeno, buteno, propano, etano, entre outros.

Ainda, Speight (2014) divide os produtos em combustíveis e petroquímicos, sendo o segundo grupo formado por compostos que são de grande valor para a indústria química – e dão origem aos mais diversos produtos (Figura 3).

Figura 3. Produtos derivados do petróleo
 Fonte: Adaptado de Speight (2014)

2.2.1. Combustíveis

Os combustíveis, diferentemente dos petroquímicos, são produtos do petróleo que têm valor como produto final e não são intermediários na produção de outros bens. A demanda por combustíveis é a principal força que impulsiona a indústria do petróleo. A importância desses derivados é tanta que, gasolina, diesel, querosene e gás natural não somente proporcionam combustível para carros, caminhões, navios e aviões, mas também são utilizados para aquecimento e geração de eletricidade (SPEIGHT, 2014).

Dentre os combustíveis, a gasolina é o mais utilizado em carros devido à energia liberada em sua combustão. Sua composição se baseia em hidrocarbonetos com cadeias de 4 a 12 átomos de carbono, sendo o principal o octano. Já o óleo diesel possui em sua composição hidrocarbonetos com 8 a 16 carbonos em suas cadeias – e o componente mais abundante é o hexadecano (COSTA, 2006; SPEIGHT, 2014).

2.2.2. Petroquímicos

A nafta é uma fração gerada na destilação do óleo cru do petróleo que dá origem a diversos produtos na indústria química. Eteno, propeno, amônia e vários outros são considerados produtos básicos do processamento da nafta. Além de serem utilizados diretamente na indústria, também dão origem a subprodutos como plásticos, embalagens, borracha sintética, eletrônicos, fertilizantes, cosméticos e tintas (PETROBRAS, 2014). Na Figura 3 é possível observar alguns dos produtos que utilizam essa matéria prima.

2.2.2.1. Borracha natural e borracha sintética

Dentre os produtos gerados a partir da nafta, podemos destacar a borracha sintética, que foi desenvolvida com o intuito de substituir a borracha natural. A necessidade de desenvolver uma borracha sintética foi influenciada pelo setor de transportes, que, com o aumento da industrialização, necessitava de uma matéria prima que pudesse suprir as exigências do mercado para produção de pneus (COSTA et al., 2001).

Em 1909 o alemão Fritz Hoffman desenvolveu a primeira borracha sintética, conhecida como borracha metílica. Desde então foram desenvolvidos mais de 500 tipos de borrachas sintéticas, sendo a mais semelhante à natural, em relação à estrutura química, a borracha sintética de isopreno (PINTO et al., 2012). Apesar dos esforços, a borracha natural não pode ser totalmente substituída devido às suas propriedades únicas (Tabela 1). Além disso, Rippel (2009) destaca que a disponibilidade e o preço do petróleo, que serve como matéria prima para produção da borracha sintética, são fatores que afetam o uso do material. Normalmente, existe uma mistura das duas borrachas na produção de materiais.

Tabela 1. Características das borrachas natural e sintética

	Borracha natural	Borracha sintética de isopreno
Matéria prima	Látex extraído das seringueiras	Sintetizada a partir do petróleo
Características	Resiliência Elasticidade Flexibilidade Resistência a abrasão e impacto Capacidade de dispersar calor Dura e quebradiça a baixas temperaturas Impermeabilidade	Baixa resistência mecânica Maior pureza Facilidade no processamento Envelhecimento mais rápido Não sofre endurecimento durante armazenamento
Porcentagem de <i>cis</i>-1,4-poliisopreno	94%	97%

Fonte: Adaptado de Rippel (2009) e Sun; Isayev (2007)

O látex natural é produzido por mais de 2500 espécies de plantas, sendo a *Hevea brasiliensis* a mais importante comercialmente. O látex extraído dessa árvore é coagulado e passa por diversos processos na indústria para se tornar borracha natural. Devido ao grande consumo desse material, as florestas de seringueiras não são capazes de suprir toda a demanda, o que forçou a indústria a buscar um polímero alternativo que se aproximasse ao máximo da borracha natural (RIPPEL, 2009).

As borrachas natural e sintética são compostas por unidades de C_5H_8 (isopreno), cada uma contendo uma dupla ligação na configuração *cis* (Figura 4). Na borracha natural, esses polímeros correspondem a 94% de sua composição. Já na borracha sintética, a porcentagem de *cis*-1,4-poliisopreno sobe para cerca de 97% (ROSE; STEINBÜCHEL, 2005; ROY et al., 2006; STEVENSON; STALLWOOD; HART, 2008).

Figura 4. Fórmula estrutural do *cis*-1,4-poliisopreno
Fonte: Da Silva; Pasquini (2015)

A borracha sintética de isopreno é obtida a partir do craqueamento térmico da fração nafta do petróleo. Essa técnica consiste em utilizar pressão e temperatura para quebrar grandes moléculas de hidrocarbonetos em moléculas menores. Em seguida ocorre o processo de polimerização do material, que junta as moléculas de 2-metil-1,3-butadieno, também conhecidas como isopreno, por meio de um catalizador de Ziegler – Natta. Esse catalizador geralmente é formado por compostos de titânio e alumínio que tornam a reação de polimerização mais energeticamente favorável (Figura 5) (MELLO et al., 2004; WANG et al., 2017).

Figura 5. Polimerização do isopreno
Fonte: Florencio (2014)

Antes de serem utilizados na indústria, ambos os materiais (borracha sintética e natural) passam por um processo de vulcanização, que consiste em aquecer a borracha em temperaturas altas na presença de enxofre, formando pontes de sulfeto entre as cadeias poliméricas de isopreno (Figura 6). As pontes podem conter até 5 átomos de enxofre, que são inseridos com a quebra de duplas ligações contidas no polímero. A vulcanização confere ao produto final as propriedades físicas desejadas, como maior resistência térmica e elasticidade e melhor capacidade de manter a forma (ROSE; STEINBÜCHEL, 2005; ROY et al., 2006; STEVENSON; STALLWOOD; HART, 2008).

Figura 6. Vulcanização do isopreno

Fonte: Florencio (2014)

2.3. DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS CONTAMINANTES E BIORREMEDIAÇÃO

Apesar de todas as vantagens obtidas do petróleo, esse tipo de exploração vem causando desastres, como: derramamento de petróleo em águas e solos, contaminação do solo e lençóis freáticos por vazamentos de postos de combustíveis e aterros sanitários, entre outros. Os resíduos, além de serem difíceis de serem tratados, são tóxicos. (MAPELLI et al., 2017; SPIES; MUKHTASOR; BURNS, 2017).

Se analisarmos as consequências do derramamento de petróleo, perceberemos que são catastróficas, pois é muito difícil de ser contido, se espalhando por grandes extensões. O petróleo leva aves à morte e interfere nas migrações. Animais marinhos também morrem devido ao petróleo que fica impregnado em seus corpos ou indiretamente por meio do consumo de animais contaminados. A camada densa de petróleo que se forma impossibilita a penetração de raios solares, interferindo na fotossíntese realizada pelas algas. E quando o derramamento ocorre próximo à costa, interfere no trabalho dos pescadores e no turismo local, já que as praias ficam impróprias para banho (BARRON, 2012; SUMMERHAYES, 2011).

Além dos extensos danos ambientais, se observarmos o balanço do acidente de derramamento de petróleo no Golfo do México, por exemplo (Tabela 2), podemos ver que esses acidentes também causam diversos prejuízos financeiros às empresas. Dos 4,9 milhões de barris derramados no acidente de 2010, menos de 20% foram recuperados. A área costeira afetada abrangeu cinco estados e motivou milhares de

pedidos de indenizações. Para arcar com tantas despesas, a empresa responsável provisionou um gasto de cerca de US\$ 32 bilhões (SUMMERHAYES, 2011; VIEGAS, 2010).

Tabela 2. Balanço do derramamento de petróleo no Golfo do México

Acidente em números		Impacto financeiro	
Período de vazamento	87 dias	Gastos com indenização	US\$ 368 milhões
Vazamento total (barris)	4,9 milhões	Prejuízo do óleo derramado	US\$ 360 milhões
Capturado/Queimado (barris)	827 mil	Gastos na resposta	US\$ 6,1 bilhões
Dispersantes lançados (litros)	1.850 mil	Gastos totais provisionados	US\$ 32,2 bilhões
Linha costeira afetada	665 milhas		

Fonte: Adaptado de Summerhayes (2011) e Viegas (2010)

Mas os danos ao ambiente não são restritos aos grandes derramamentos de petróleo. Os vazamentos de combustíveis de postos de gasolina também causam diversos danos, já que os hidrocarbonetos contaminam o solo e chegam até o lençol freático, comprometendo as fontes de abastecimento de água (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

Não são somente os combustíveis ou o petróleo cru os responsáveis pelos danos ambientais. Os resíduos sólidos que têm origem no petróleo, como os pneus produzidos a partir da borracha sintética, também são problemáticos, pois são de difícil manejo. Além disso, se acumulam por longos períodos de tempo, ocupando grandes áreas (EVANS, 1997). Em 2016, somente no Brasil, foram produzidos mais de 67 milhões de pneus (ASSOCIAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PNEUMÁTICOS. 2016). Ainda, não existe tempo de degradação determinado para este tipo de resíduo e seu descarte em aterros sanitários é proibido devido aos riscos de incêndio e de contaminação de solos e lençóis freáticos. Por isso, muitas vezes os pneus são queimados, gerando produtos tóxicos. Porém, mesmo após isso, ainda restam hidrocarbonetos nas cinzas produzidas (CONAMA, 2009; RODRIGUES JORGE; FERREIRA; CLARO NETO, 2004).

Com base em todos os prejuízos causados pela contaminação do ambiente por derivados de petróleo, diversas técnicas vêm sendo desenvolvidas para remoção desses contaminantes. Nesse contexto, a biorremediação é uma metodologia bem aceita pela comunidade acadêmica e muito eficiente na recuperação de ambientes poluídos com compostos xenobióticos como os hidrocarbonetos (DESAI; BANAT, 1997). Essa técnica se baseia na degradação bioquímica dos contaminantes por meio

da atividade metabólica de microrganismos, limpando águas subterrâneas, solos, lagos e processos para tratamento de esgotos, revitalizando os ambientes (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010; BOOPATHY, 2000; VARJANI, 2017).

Os tratamentos de biorremediação podem ser *ex situ*, em que ocorre a remoção física do material contaminado seguida do tratamento em outro local; já na técnica *in situ*, o material contaminado é remediado onde ocorreu a contaminação, o que faz com que o processo seja mais econômico e cause menos impactos ambientais na área contaminada (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010; TRINDADE et al., 2005).

A biorremediação pode ser feita de diversas maneiras:

- I) Biorremediação passiva com microrganismos nativos da área;
- II) Bioestimulação, em que são adicionados nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio ao local para promover o crescimento de microrganismos úteis para remoção de compostos tóxicos;
- III) Bioaugmentação, que é o termo usado para descrever a adição de microrganismos cultivados, que são capazes de biodegradar o poluente em um substrato contaminado. A bioaugmentação é uma alternativa interessante para a biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos e compostos fenólicos (MORGAN; WATKINSON, 1989; PROVIDENTI; LEE; TREVORS, 1993). Nesse caso, a capacidade de degradar uma área contaminada é incrementada pela introdução de uma espécie ou um consórcio microbiano, capazes de reduzir a substância poluente (GUARINO; SPADA; SCIARRILLO, 2017; NZILA; RAZZAK; ZHU, 2016). A eficiência da bioaugmentação é determinada por fatores abióticos (biodisponibilidade de nutrientes: nitrogênio, fósforo e potássio, estrutura química e concentração do poluente) e bióticos, como a seleção dos microrganismos adequados, sua capacidade de assimilação dos contaminantes e capacidade de competição com a microbiota nativa (ROJO, 2009);
- IV) “Landfarming”, que é um método de biorremediação para solos que utiliza uma combinação das 3 técnicas anteriores, descrita por Moreira e Siqueira (2002), em uma área restrita onde o resíduo contaminado fica contido. Os microrganismos utilizados são nativos da área contaminada ou são introduzidos. Eles podem, ainda, ser geneticamente modificados ou não.

Microrganismos com capacidade para biorremediação foram isolados de ambientes contaminados por poluentes (MROZIK; PIOTROWSKA-SEGET, 2010; ROJO, 2009). Entretanto, pouco tem sido feito para seleção de microrganismos e/ou comunidades microbianas com relevância para biorremediação fora desse ambiente.

2.4. BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS

Com a exploração e a comercialização do petróleo, vazamentos ocorrem, gerando graves danos ao meio ambiente – o que torna imprescindível o desenvolvimento de tratamentos eficazes (MALAKOFF, 2012).

Além de serem abundantes no óleo fóssil, os hidrocarbonetos podem ser encontrados em plantas e no solo, porém em menores quantidades. Alguns microrganismos, como bactérias, fungos e leveduras, podem assimilar esses compostos como fonte única de carbono - como *Pseudomonas putida* GPO1, que consome alcano transformando essa substância complexa em produtos mais simples que sejam intermediários de suas vias metabólicas (JACQUES et al., 2007; VAN BEILEN et al., 2001). Um levantamento realizado no PubMed, em fevereiro de 2018, revelou 2724 artigos publicados envolvendo biorremediação de petróleo.

Entretanto, a maior barreira para a assimilação de hidrocarbonetos pelos microrganismos é sua baixa solubilidade (ROJO, 2009). Uma maneira de aumentá-la é por meio do uso de biosurfactantes, que possuem partes hidrofílicas e hidrofóbicas que diminuem a tensão da superfície óleo/água, aumentando assim a biodisponibilidade e o metabolismo de hidrocarbonetos por microrganismos (EL MAHDI; AZIZ, 2017).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) também são importantes constituintes do óleo cru, dos quais são derivados os combustíveis fósseis. Estes são ubíquos na natureza e compostos por um ou dois anéis benzênicos e/ou pentacíclicos aromáticos (GUO et al., 2005).

Os HPAs podem ser assimilados por microrganismos que os utilizam como fonte energética para o seu crescimento (JACQUES, 2005). A degradação bacteriana de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) também tem sido amplamente descrita (HUESEMANN; HAUSMANN; FORTMAN, 2004). Alguns HPAs, especialmente os compostos de alto peso molecular, são tóxicos para alguns microrganismos devido à sua intrínseca estabilidade química e resistência à várias rotas de biodegradação (COLLINS; DAUGULIS, 1999). Muitas estratégias de

biorremediação consistem na aplicação de microrganismos que podem degradar HPA (JACQUES et al., 2007).

Os microrganismos que apresentam capacidade de utilizar hidrocarbonetos como fonte energética são de interesse biotecnológico na medida em que podem ser incorporados a processos de biorremediação de solos e águas, promovendo a remoção desses compostos do meio ambiente por assimilação e mineralização (ROJO, 2009).

Os sedimentos ambientais típicos, como solo, areia e sedimentos oceânicos, possuem uma quantidade apreciável de microrganismos capazes de metabolizar hidrocarbonetos. A diversidade e o número total de microrganismos capazes de exercer essa função aumentam muito em áreas contaminadas com óleo cru e seus derivados. Grande parte desses microrganismos também tem a capacidade de utilizar outros substratos como fonte de carbono, possuindo uma versatilidade metabólica bastante importante (HEAD; JONES; RÖLING, 2006). Por exemplo: espécies como *Alcanivorax borkumensis* são capazes de assimilar alcanos lineares e ramificados, mas não consomem hidrocarbonetos aromáticos, açúcares, ácidos graxos e a maioria dos substratos energéticos mais comuns (ROJO, 2009; SCHNEIKER et al., 2006). Dentre os microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos, podem ser citados diversos gêneros, entre eles *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Thermomonospora*, *Nocardia*, *Gordonia*, *Acinetobacter*, *Pseudoxanthomonas*, *Luteimonas*, *Alkanindiges*, *Corynebacterium* e *Mycobacterium* (BENDINGER et al., 1993; PEREIRA; GOMES; SEMÊDO, 2012; ZHENG et al., 2018)

2.4.1. Metabolismo dos hidrocarbonetos

O metabolismo de hidrocarbonetos em actinomicetos tem sido amplamente descrito (FUJII et al., 2004; PEREIRA; GOMES; SEMÊDO, 2012; QUATRINI et al., 2008). Um dos sistemas que confere essa habilidade aos microrganismos é o sistema Alcano Hidroxilase (AH). Não existe um consenso sobre a composição precisa do sistema, sendo necessários pelo menos um gene *alkB* (que codifica uma monooxigenase), uma rubredoxina e uma rubredoxina redutase. A rubredoxina redutase capta elétrons do NAD(P)H e, com o auxílio da rubredoxina, transfere esses elétrons para a alcano hidroxilase (Figura 7). O alcano será convertido ao álcool correspondente, depois ao aldeído e, por fim, ao ácido carboxílico, antes de prosseguir para a β -oxidação (PEREIRA; GOMES; SEMÊDO, 2012; QUATRINI et al., 2008).

Figura 7. Sistema AH

Fonte: Adaptado de El Mahdi; Aziz (2017)

Eggink et al. (1987) descreveram o sistema AH em *Pseudomonas oleovorans* e relataram que a alcano 1-monooxigenase, codificada pelo gene *alkB* nesse microrganismo, é a primeira enzima para degradação de alcanos de cadeia curta. Smits et al. (2002) relatou que o sistema alcano hidroxilase de *Pseudomonas putida* GPo1 compreende três componentes: uma alcano hidroxilase (*alkB*), uma rubredoxina (*alkG*) e uma rubredoxina redutase (*alkTF*). Lo Piccolo et al. (2011) relatou a existência de um cluster de genes, em *Gordonia* sp. SoCg, homólogos ao sistema AH, constituído por 5 genes: alcano-1-monooxigenase (*alkB*), rubredoxina (*rubA3*), rubredoxina (*rubA4*), rubredoxina redutase (*rubB*) e um regulador transcricional do tipo TetR (*alkU*).

Outro sistema responsável pela utilização de hidrocarbonetos por microrganismos é o citocromo P450, comumente conhecido como CYP153. Esse sistema é composto por três genes – ferredoxina, CYP 153 e ferredoxina redutase – e foi descrito por Maier et al. (2001) em *Acinetobacter* sp. EB104. A ferredoxina redutase recebe os elétrons doados por NAD(P)H e, juntamente com a ferredoxina, transporta os elétrons para a proteína codificada pelo gene CYP 153 (monooxigenase), que intermedeia a hidroxilação terminal dos alcanos, transformando hidrocarbonetos em álcoois, aldeídos e ácidos, sucessivamente (Figura 8) (FUJII et al., 2006; MAIER et al., 2001).

Figura 8. Oxidação terminal
 Fonte: Adaptado de Ji et al. (2013)

2.5. BIODEGRADAÇÃO DE BORRACHA NATURAL E SINTÉTICA

Além da contaminação de solos e águas por hidrocarbonetos, o acúmulo de derivados de borracha sintética e natural tem preocupado os ambientalistas, por se tratarem de resíduos de difícil manejo. A reciclagem tem sido uma alternativa – e a borracha descartada de pneus, que representa a vasta maioria desse tipo de resíduo, pode ter como destino a composição do asfalto e outras possibilidades (MASHAAN et al., 2014). No que tange à biorremediação, poucos são os microrganismos capazes de degradar esse substrato, sendo essa característica limitada aos actinomicetos, com exceção do gênero *Xanthomonas* (JENDROSSEK; TOMASI; KROPPESTEDT, 1997).

Nesse sentido, têm se destacado os gêneros *Streptomyces*, *Gordonia*, *Actinomyces*, *Micromonospora* e *Nocardia* (YIKMIS; STEINBÜCHEL, 2012). No entanto, os relatos na literatura são escassos se comparados com outros compostos de difícil degradação, como os hidrocarbonetos.

2.5.1. Metabolismo da borracha

Existem dois tipos de microrganismos degradadores de borracha (Tabela 3). O primeiro grupo, formado por bactérias dos gêneros *Gordonia*, *Mycobacterium* e *Nocardia*, só é capaz de crescer de forma aderida à borracha, formando um biofilme. Os microrganismos presentes nesse grupo são considerados os degradadores mais

potentes. O segundo grupo consiste em microrganismos que secretam enzimas, não necessitando estar em contato direto com o substrato. Fazem parte desse grupo os microrganismos dos gêneros *Actinoplanes*, *Streptomyces* e *Micromonospora*. Esse grupo pode ser identificado pela formação de halos translúcidos no ágar contendo *cis*-1,4-poliisopreno (BRÖKER et al., 2008; HIESSL et al., 2012; IBRAHIM et al., 2006).

Hiessl et al. (2012) relataram os principais passos da via de degradação da borracha em *G. polyisoprenivorans* VH2. Aparentemente, essa característica requer inicialmente um ou mais genes da família Lcp (Latex Clearing Protein), que produzem a proteína responsável pela assimilação do *cis*-1,4-poliisopreno. A enzima codificada pelo gene Lcp cliva a molécula de isopreno, adicionando O₂ nas ligações duplas, formando duas moléculas derivadas de isopreno – uma com um grupo aldeído e uma com um grupo cetona (Figura 9). Essa enzima é necessária para degradação da borracha pelos dois grupos de microrganismos.

Figura 9. Clivagem de *cis*-1,4-poliisopreno pela proteína secretada pelo gene Lcp, resultando em duas moléculas com grupos cetona (esquerda) e aldeído (direita).
Fonte: Linos et al. (2000)

Parte dessas moléculas será oxidada, gerando Acetil-CoA, que será incorporado ao metabolismo central em reações subsequentes. O Acetil-CoA, juntamente com o piruvato, dá origem ao oxalacetato, que será essencial para o Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos, gerando outros precursores necessários para o metabolismo celular. Outros produtos gerados nessas reações podem também ser incorporados na via de β -oxidação, como pode ser observado na Figura 10 (LINOS et al., 2000).

A bactéria gram negativa *Xanthomonas* sp 35Y não possui o gene Lcp, mas é capaz de degradar borracha por meio do gene RoxA. As proteínas produzidas por Lcp e RoxA não possuem nenhuma semelhança, mas ambas clivam *cis*-1,4-poliisopreno por um mecanismo oxidativo. Até o momento o gene RoxA foi descrito apenas para

essa espécie, que pertence ao segundo grupo de degradação (YIKMIS; STEINBÜCHEL, 2012).

Tabela 3. Lista de bactérias degradadoras de borracha

Espécies de bactérias	Tipo de degradação	Referência
<i>Actinomadura</i> sp. E6	B	JENDROSSEK; REINHARDT, 2003
<i>Actinomyces candidus</i>	?	NETTE; POMORTZEVA; KOZLOVA, 1959
<i>Actinomyces elastica</i>	?	SÖHNGEN; FOL, 1914
<i>Actinomyces fuscus</i>	?	SÖHNGEN; FOL, 1914
<i>Actinoplanes</i> (três espécies)	B	JENDROSSEK; REINHARDT, 2003
<i>Dactylosporangium</i> sp.	B	IBRAHIM et al. 2006
<i>Gordonia polyisoprenivorans</i> VH2	A	LINOS et al., 2000
<i>Gordonia polyisoprenivorans</i> Y2K	A	ARENSKÖTTER et al., 2003
<i>Gordonia westfalica</i> Kb1	A	LINOS et al., 2002
<i>Micromonospora aurantiaca</i> W2b	B	LINOS et al., 2000
<i>Micromonospora</i> (five strains)	B	JENDROSSEK; REINHARDT, 2003
<i>Mycobacterium fortuitum</i> NF4	A	LINOS et al., 2000
<i>Nocardia</i> sp. 835	?	TSUCHII; SUZUKI; TAKEDA, 1985
<i>Nocardia farcinica</i> S3	A	IBRAHIM et al. 2006
<i>Proactinomyces ruber</i>	?	NETTE; POMORTZEVA; KOZLOVA, 1959
<i>Streptomyces</i> (31 cepas)	B	JENDROSSEK; REINHARDT, 2003
<i>Streptomyces</i> sp. K30	B	ROSE; TENBERGE; STEINBÜCHEL, 2005
<i>Thermomonospora</i> sp. E5	B	IBRAHIM et al. 2006
<i>Xanthomonas</i> sp. 35Y	B	TSUCHII; TAKEDA, 1990

(A) grupo de bactérias que degradam borracha crescendo adesivamente, formando biofilme; (B) grupo de bactérias degradadoras que formam um halo transparente em placas de ágar; (?) tipo de degradação não conhecido.

Fonte: Adaptado de: Yikmis; Steinbüchel (2012)

Figure 10. Metabolismo de degradação de *cis*-1,4-poliisopreno por *G. polyisoprenivorans* VH2.

Fonte: Hiesl et al. (2012)

Portanto, é possível prever, pela análise genômica, os microrganismos que têm potencial para degradação de borracha natural e sintética. Até o momento, somente *G. polyisoprenivorans* e *G. westfalica* foram identificadas dentro do gênero *Gordonia* com estas características. Por meio da tecnologia do DNA recombinante, é possível transferir o gene para outras espécies, mostrando as potencialidades desses estudos do ponto de vista aplicado (HIESSL et al., 2012).

2.6.O GÊNERO *GORDONIA*

O gênero *Gordona*, mais tarde renomeado *Gordonia*, foi proposto pela primeira vez por Tsukamura (1971), na tentativa de dissociar essas bactérias dos gêneros *Mycobacterium* e *Nocardia*. O nome *Gordona* foi uma homenagem a Ruth E. Gordon, cujas pesquisas expressavam a importância de nomear e classificar bactérias capazes de resistir à coloração com ácido.

Atualmente, o gênero *Gordonia* consiste em 40 espécies (<http://www.bacterio.net/gordonia.html>). Apesar de algumas dessas espécies serem consideradas patogênicas, causando doenças em indivíduos saudáveis e imunocomprometidos, outras são de grande interesse biotecnológico devido a sua capacidade de degradar compostos tóxicos ao ambiente e produzir subprodutos de interesse industrial (ANDALIBI; FATAHI-BAFGHI, 2017).

Algumas das bactérias desse gênero produzem carotenoides (que podem ser utilizados na indústria farmacêutica), biosurfactantes (que são essenciais para a degradação de hidrocarbonetos e outras substâncias hidrofóbicas), além de diversos outros compostos (ANDALIBI; FATAHI-BAFGHI, 2017).

Diversas espécies de *Gordonia* foram descritas como degradadoras de hidrocarbonetos. Um levantamento realizado por Oliveira (2015) demonstrou que, das 27 espécies com o genoma sequenciado, pelo menos um dos dois genes de alcano monooxigenase (*alkB* ou CYP153) pode ser encontrado em todas as espécies (Tabela 4). Apenas três bactérias do gênero *Gordonia* possuem os dois sistemas, sendo que apenas o isolado *Gordonia* sp. TF6, que não foi identificado no nível de espécie, foi descrito na literatura como degradador de hidrocarboneto (OLIVEIRA, 2015).

Tabela 4. Organização dos sistemas alcano hidroxilase e CYP153 em *Gordonia*

Microrganismo	Acesso	alkB	CYP153	Sistema AH	Sistema CYP153	Relatos de degradação	Referências
<i>Gordonia aichiensis</i>	BANR01000003.1	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia alkanivorans</i>	NZ_BACI01000060.1 NZ_BACI01000030.1	SIM	SIM	NÃO	SIM	SIM	Romanowska et al., 2010
<i>Gordonia amarae</i>	BAED01000002.1	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	Pagilla et al., 2002
<i>Gordonia amicalis</i>	BANS01000037.1 BANS01000032.1	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia araii</i>	BAEE01000047.1	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia bronchialis</i>	CP001802.1	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	Al-Maillem et al., 2015
<i>Gordonia effusa</i>	BAEH01000014.1	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia hirsuta</i>	BANT01000025.1	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia kroppenstedtii</i>	NZ_AQYG01000051.1 NZ_AQYG01000046.1	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM	Kim et al., 2009
<i>Gordonia malaquae</i>	BAOP01000005.1 BAOP01000011.1	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia namibiensis</i>	BAHE01000002.1	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia neofelifaecis</i>	AEUD01000009.1	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia otitidis</i>	BAFB01000008.1	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	BAOQ01000036.1	NÃO	SIM	NÃO	SIM	SIM	Xue et al., 2003
<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	NZ_BAEI01000007.1	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	SIM	Linos et al., 1999
<i>Gordonia rhizosphera</i>	NZ_BAHC01000124.1	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia rubripertincta</i>	NZ_BAHB01000065.1 BAHB01000109.1	SIM	SIM	NÃO	SIM	SIM	Mikolasch et al., 2015
<i>Gordonia shandongensis</i>	NZ_AUHE01000003.1	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia sihwensis</i>	NZ_BANU01000017.1	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia soli</i>	NZ_BANX01000003.1	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia</i> sp. NB4-1Y	APHK01000053.1	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia</i> sp. 9	NZ_JZDP01000002.1	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia</i> sp. KTR9	CP002907.1	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia</i> sp. SoCg	HQ026811.1	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	Piccolo et al., 2011
<i>Gordonia</i> sp. TF6	AB112870.1 AB220915.1	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	Fujii et al., 2004
<i>Gordonia sputi</i>	BAFC01000117.1	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	Przybulewska et al., 2006
<i>Gordonia terrae</i>	BAFD01000037.1	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	Mikolasch et al., 2003

Fonte: Adaptado de Oliveira (2015)

Além de serem descritas como bactérias capazes de consumir hidrocarbonetos, algumas espécies de *Gordonia* têm capacidade de degradar outros compostos, como é o caso de *Gordonia polyisoprenivorans* e de *Gordonia westfalica*, que podem utilizar *cis*-1,4 poliisopreno como fonte única de carbono devido à presença do gene Lcp (LINOS et al., 1999, LINOS et al., 2002).

Um levantamento realizado em abril de 2018 (Tabela 5) demonstrou que, de 34 espécies do gênero *Gordonia*, 24 possuem o gene Lcp, mas somente duas espécies, *Gordonia polyisoprenivorans* e *Gordonia westfalica*, foram descritas como degradadoras de borracha. Isso, demonstra que o gene Lcp é bastante prevalente, sugerindo que a assimilação de borracha possa ser uma atividade metabólica corriqueira no gênero. No entanto, poucos estudos foram conduzidos para provar que além da presença do gene Lcp, estas espécies do gênero *Gordonia*, de fato, conseguem utilizar este substrato como fonte única de carbono e energia, mostrando assim um amplo campo de estudos.

Tabela 5. Organização do gene Lcp em *Gordonia*

Microrganismo	Acesso	Gene Lcp	Relatos de degradação	Referências
<i>Gordonia aichiensis</i>	BANR01000003.1 / NZ_BANR00000000.1	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia alkanivorans</i>	NZ_BACI01000060.1 / NZ_BACI01000030.1	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia amarae</i>	BAED01000002.1	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia amicalis</i>	BANS01000037.1 / BANS01000032.1	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia araii</i>	BAEE01000047.1	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia bronchialis</i>	CP001802.1	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia desulfuricans</i>	NZ_BCNF00000000.1	NÃO	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia effusa</i>	BAEH01000014.1	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia hirsuta</i>	BANT01000025.1	NÃO	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia hydrophobica</i>	NZ_BCWU00000000.1	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia iterans</i>	NZ_CP027433.1	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia jacobaea</i>	KNA92267.1	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia kroppenstedtii</i>	NZ_AQYG01000051.1 NZ_AQYG01000046.1	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia lacunae</i>	NZ_NGFO01000001.1	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia malaquae</i>	BAOP01000005.1 / BAOP01000011.1	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia namibiensis</i>	BAHE01000002.1	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia neofelifaecis</i>	AEUD01000009.1	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia otitidis</i>	BAFB01000008.1	NÃO	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	BAOQ01000036.1	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia phthalatica</i>	NZ_CP011853.1	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia polyisoprenivorans</i> VH2	NZ_BAEI01000007.1	SIM	SIM	Linos et al., 1999
<i>Gordonia rhizosphaera</i> NBRC 16068	NZ_BAHC01000124.1	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia rubripertincta</i>	NZ_BAHB01000065.1 / BAHB01000109.1	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia shandongensis</i>	NZ_AUHE01000003.1	NÃO	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia sihwensis</i>	NZ_BANU01000017.1	NÃO	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia soli</i>	NZ_BANX01000003.1	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia</i> sp. 9	NZ_JZDP01000002.1	NÃO	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia</i> sp. KTR9	CP002907.1	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia</i> sp. NB4-1Y	APHK01000053.1	NÃO	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia</i> sp. SoCg	HQ026811.1	NÃO	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia</i> sp. TF6	AB112870.1/ AB220915.1	NÃO	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia sputi</i>	BAFC01000117.1	NÃO	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia terrae</i>	NZ_CP016594.1 / BAFD01000037.1	SIM	NÃO	Inexistente
<i>Gordonia westfalica</i>	ABV68924.1	SIM	SIM	Linos et al., 2002

2.6.1. *Gordonia paraffinivorans* e *Gordonia sihwensis*

Gordonia paraffinivorans foi descrita pela primeira vez por Xue et al. (2003), como uma espécie de *Gordonia* capaz de crescer na presença de parafina. No mesmo ano, *Gordonia sihwensis* foi descrita por Kim et al. (2003). Uma pesquisa na base de dados PubMed mostra que até o presente momento foram publicados 2 artigos de *G. paraffinivorans* e 7 de *G. sihwensis*, demonstrando que se trata de um campo de pesquisa bastante amplo que ainda precisa de desenvolvimento, principalmente quando se considera o potencial biotecnológico do gênero, o qual foi amplamente demonstrado nesta revisão de literatura. O sequenciamento dos genomas dos isolados de compostagem pertencentes a essas espécies (MTZ041, MTZ052 e MTZ096) demonstrou que eles possuem os elementos genéticos necessários ao consumo dos hidrocarbonetos, como a existência de dois clusters de genes já descritos, como a alcano hidroxilase (AH) e o sistema CYP 153 em *G. sihwensis* (MTZ096) e o sistema CYP153 em *G. paraffinivorans* (MTZ041 e MTZ052). Até o momento não existe nenhuma evidência na literatura sugerindo que esses microrganismos sejam capazes de degradar qualquer tipo de borracha, mas a disponibilidade das sequências genômicas abre esta possibilidade, a qual foi explorada neste trabalho.

OBJETIVO GERAL

Estudar o potencial de biodegradador dos isolados *G. paraffinivorans* e *G. sihwensis* de compostagem.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

G. sihwensis

Estudar os mecanismos de regulação gênica do sistema alceno hidroxilase (AH) por qPCR na presença e na ausência de hidrocarbonetos.

Clonagem e expressão do sistema AH de *G. sihwensis* em *E. coli*.

Avaliar o potencial desse sistema de bioconversão para alcanos de cadeia curta, longa e cíclica em seus respectivos álcoois por CG-MS e CG.

Comparar o desempenho desse sistema ao CYP153 de *G. paraffinivorans*.

G. paraffinivorans

Análise *in silico* dos elementos genéticos necessários para bioconversão de borracha natural e sintética dos isolados de *G. paraffinivorans* utilizando ferramentas de bioinformática.

Estabelecer a metodologia e testar a capacidade desses isolados de usar *cis*-1,4-poliisopreno como fonte única de carbono.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Esse projeto foi aprovado pelas instâncias técnico-científicas do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo e pela Fundação Parque Zoológico de São Paulo (Apêndices 1 e 2).

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Lista de soluções e meios utilizados no trabalho

Meio Bushnell Haas – Difco (257820)	3,27 g/L
Meio LB – BioBasic (S516)	20 g/L
Meio Ágar Nutriente – Difco (213000)	20 g/L

Solução de Fucsina para Coloração de Schiff

Fucsina	10 g/L
Ácido acético glacial	250 mL
Metabissulfito de sódio	50 g/L
HCl 0.1 N	500 mL
Água milli-Q	250 mL

Solução de Sulfito para Coloração de Schiff

Metabissulfito de sódio	50 g/L
HCl concentrado (37 %)	50 mL
Água milli-Q q.s.p.	1 L

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Microrganismos usados neste trabalho

Foram usados 3 isolados do gênero *Gordonia*: *Gordonia paraffinivorans* MTZ041 e MTZ052 e *Gordonia sihwensis* MTZ096. Todos os isolados foram obtidos pelas alunas de mestrado Thais Paganini e Aline Márcia de Oliveira a partir de cultivo enriquecido com celulose e/ou n-hexadecano tendo como inóculo compostagem da célula ZC4 proveniente da Unidade de Produção de Compostos Orgânicos (UPCO) do Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP). A composição e a descrição da composteira foi previamente relatada (ANTUNES, 2016; MARTINS et al., 2013).

3.2.2. Condições de cultivo dos microrganismos

Os cultivos dos isolados de *Gordonia* foram feitos a 30°C por tempos variados a depender da fonte de carbono empregada. Quando em meio líquido, as culturas foram agitadas em shaker a 150 rpm. Os isolados foram cultivados em meio nutriente ou LB líquido ou sólido quando houve necessidade de expansão da cultura ou em meio de sais sintético BH (Bushnell Haas) contendo a fonte de carbono sob análise [alcanos ou *cis*-1,4-poliisopreno] segundo as formulações de Hiesl et al. (2012), Kubota et al. (2008) e Linos et al. (2000).

3.2.3. Curva de crescimento microbiano em presença de açúcares

Os isolados foram cultivados em meio mínimo BH, conforme descrito no item 3.2.2, contendo as seguintes fontes de carbono: glicose 2% (Synth), frutose 2% (Dinâmica), sacarose 2% ou sem fonte de carbono como controle negativo.

Os inóculos foram feitos em 30 mL de meio LB em shaker com rotação de 150 rpm e 30°C por 16 horas. As culturas foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos e lavadas duas vezes com água destilada estéril. Depois, o pellet foi resuspenso em 5 mL de água milli-Q estéril e inoculado em 20 mL de cada meio de cultivo descrito para obtenção de OD_{600 nm} de 0,1. As culturas foram incubadas a 30°C com rotação 150 rpm por 168 horas. Nos tempos 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas, foram retiradas alíquotas de 1 mL para medição da densidade óptica.

3.2.4. Ensaio de assimilação de hidrocarbonetos

Os ensaios com 2,6 DCPIP foram realizados em 100 µl de meio BH contendo os seguintes substratos como fonte única de carbono: frutose 2%, hexano 1%, decano 1%, dodecano 1%, pentadecano 1%, hexadecano 1% e eicosano 1%. As concentrações de 2,6 DCPIP utilizadas para o ensaio foram 80 µg/mL e 100 µg/mL. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e técnica - primeiramente em placas de 96 poços e depois em placas de 36 poços.

3.2.5. Avaliação do crescimento pelo método de peso seco

As curvas de crescimento foram realizadas durante 168 h em shaker com rotação de 150 rpm e 30 °C em triplicata. Os inóculos foram preparados como descrito anteriormente no item 3.2.2. Foram recolhidas amostras de 20 mL (erlenmeyers de 50 mL) em cada tempo, as quais foram filtradas com a ajuda de um funil de Buchner e uma bomba de vácuo em membrana GV Durapore, (0.22 µm), as membranas foram secas em estufa a 60°C e pesadas até atingirem peso constante (ALVES et al., 2005; ALVES; PAIXÃO, 2014; MIKOLASCH et al., 2015). O meio utilizado foi o meio mínimo de sais BH, com adição das fontes de carbono: decano 1%, pentadecano 1%, hexadecano 1% e eicosano 0,1%. A frutose foi escolhida para servir como controle positivo e foi utilizada na concentração de 2%. O controle negativo foi um cultivo sem fonte de carbono.

3.2.6. Análises cromatográficas

Os equipamentos utilizados foram o CG/Fid Agilent HP6890 e Trace 1310 Cromatógrafo Gasoso (Thermo Scientific) do Laboratório da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). O espectro foi obtido pelo método de ionização de elétrons (70 eV) e as colunas capilares utilizadas foram HP-5M5 (30 m X 0,25 mm ID X 0,25 µm, Agilent) para o primeiro equipamento e TR-1 Dimetil polissiloxano (30 m X 0,25 mm ID X 0,25 µm, Thermo Scientific) para o segundo equipamento, com nitrogênio ultra puro como gás carreador e vazão de 20 mL/min. A rampa de aquecimento utilizada iniciou com uma temperatura de 150°C, com razão de aquecimento de 20°C/min até a temperatura de 230°C, 70°C/min para a temperatura de 300°C mantida por 1 minuto. A temperatura do injetor e do detector foi de 250°C e 350°C, respectivamente. Foi injetado o volume de 1 µL da amostra na coluna, utilizando o modo split (1/20). Os

produtos foram identificados por correspondência dos tempos de retenção com os espectros obtidos (FUJII et al., 2004).

Para determinação do tempo de retenção do hexadecano, foi realizado um controle negativo, sem adição do hidrocarboneto e um tratamento com adição de hexadecano.

Os solventes acetato de etila, etanol e isopropanol foram submetidos à análise por cromatografia gasosa em dois tratamentos diferentes: (i) solvente e hexadecano e (ii) solvente, hexadecano e meio de cultivo. Em ambos os casos foram utilizados 50 µl de hexadecano, que corresponde a 1% do volume de meio (5 mL) e 15 mL de solvente. Agitou-se vigorosamente e uma alíquota de 1 mL foi retirada para análise cromatográfica, injetando-se 1 µl no equipamento.

3.2.6.1. Padronização da concentração de hidrocarbonetos nas análise química

A padronização foi feita partindo-se das seguintes concentrações: 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1% e 3% de hexadecano em meio de cultivo (BH) e inóculo ($OD_{600nm} = 0,1$). Os tubos foram incubados a 30°C, 150 rpm nos tempos de 0 e 144 horas. A cada ponto retirado, adicionou-se 3 volumes de isopropanol à amostra, agitou-se vigorosamente e transferiu-se 1 mL para tubo próprio para cromatografia gasosa.

3.2.6.2. Análise química do consumo de hidrocarbonetos por isolados de *Gordonia*

Os cultivos foram feitos em 10 mL de meio BH e 1% de hexadecano em Erlenmeyers de 50 mL com inóculo igual a 0,1 (OD_{600}), a 30°C e a uma rotação de 150 rpm. Foram retiradas 9 amostras ao longo de 168 horas de cultivo. A cada ponto retirado, adicionou-se 3 volumes de isopropanol à amostra, agitou-se vigorosamente e transferiu-se 1 mL para tubo próprio para cromatografia gasosa. O restante da amostra foi estocado em freezer -20°C. Como controle negativo, foi usado um tratamento sem inóculo.

3.2.7. Condições de cultivo e extração de RNA total

Uma colônia isolada de cada microrganismo foi inoculada em 30 mL de LB e incubada a 30°C com rotação 150 rpm overnight. O inóculo foi transferido para um tubo plástico de rosca de 50 mL e centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, mantendo o pellet. As células foram lavadas 2 vezes com 50 mL de água milli-Q estéril, a 5000 rpm por 15 minutos. Depois, o pellet foi

resuspendido em 5 mL de água milli-Q estéril e o número de células foi ajustado para 5×10^9 com auxílio da escala McFarland (Probac do Brasil). As células foram inoculadas em 10 mL de meio mínimo (BH) contendo as seguintes fontes únicas de carbono, separadamente: 2% de frutose, 1% de *n*-hexadecano, 1% de borracha sintética ou 1% de borracha natural. As culturas em condições induzidas e não induzidas foram incubadas em frascos erlenmeyers, a 30°C e rotação 150 rpm por 2 e 24 horas, no caso da borracha sintética e natural. No tempo de 24 horas a concentração de células foi normalizada para 5×10^9 nos dois tratamentos, visto que, após este período de incubação o tratamento com frutose apresenta maior crescimento que os demais. O mínimo de quatro réplicas biológicas foram feitas para cada tratamento.

A extração de RNA foi realizada com o “RNeasy Midi Kit” (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante, com a adição de 60 minutos de incubação em banho-maria a 37°C para lise celular.

Para eliminar o DNA genômico residual após a extração do RNA, foi feita uma digestão utilizando “DNase I, RNase free” (Thermo Scientific), segundo as instruções do fabricante. O controle da eficiência da DNase foi feito por meio de amplificação por PCR da subunidade menor do ribossomo (16S) - utilizando como template o RNA a 50 ng/μL e gDNA como controle positivo da reação. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (250 μg/mL solução estoque) e visualizados em luz ultravioleta com filtro laranja.

3.2.8. Expressão gênica por qPCR

A síntese de cDNA foi feita com o kit RevertAid First Strand cDNA (Thermo Scientific) utilizando hexameros como iniciadores e a enzima Transcriptase reversa, segundo as especificações do fabricante.

A quantificação dos transcritos do sistema AH e do sistema CYP153 foi feita por PCR em tempo real em termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System da Applied Biosystems e em placas MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, utilizando SyberGreen como agente intercalante, o qual foi utilizado conforme protocolo do fabricante, adicionando 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) à reação devido ao alto conteúdo de CG (citosina/guanina) presente nas amostras. Os

primers específicos para cada gene estão descritos na Tabela 5. O material genético utilizado foram 3µg de cDNA diluído 1:10 em água MilliQ estéril. A validação dos primers foi feita conforme protocolo pré-estabelecido no Laboratório de Interações Microbianas. O normalizador interno foi o gene que codifica a subunidade 16S do ribossomo, que é um dos genes endógenos de controle mais comumente usados em estudos de expressão gênica em bactérias (CARVALHO et al., 2014; FUJII et al., 2004; INDEST; CROCKER; ATHOW, 2007; LINH et al., 2017; PROCÓPIO et al., 2013). A quantificação foi relativa à condição basal de crescimento (frutose) pelo método de $\Delta\Delta\text{Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 6. Sequência de oligonucleotídeos para verificação da presença dos genes do Sistema CYP 153 e Sistema AH

Primer	Gene	Sequência (5' - 3')	Sentido	CG	T _m (°C)	Concentração	Amplicon
PRCP078	Ferredoxina redutase	GATCATCTTGGACTTGCCGC	F	55%	62	600 nM	328pb
PRCP079		CGCTGGTCGAAGCTCTATC	R	57,8%	60	600 nM	
PRCP080	CYP153	GAGGCGTACCACATCACTAC	F	55%	62	600 nM	333pb
PRCP081		CGGCTTCGATCTGATCACC	R	57,8%	60	600 nM	
PRCP082	Ferredoxina	GTTTCGACGATCAAGCCGTCC	F	60%	64	600 nM	228pb
PRCP083		TGCAGGTCGCGACCAACAAC	R	60%	64	600 nM	
PRCP084	<i>alkB</i>	CGTCTCCAAGATCGGTCTG	F	57%	60	600 nM	343pb
PRCP085		CTTCAGGACGTCGTTGCTCG	R	60%	64	300 nM	
PRCP086	<i>rubA3</i>	CGAAGTGTGCGAGTACGTC	F	57,8%	60	600 nM	134pb
PRCP087		CGAAATCGATCTTCTCGCGG	R	55%	62	600 nM	
PRCP088	<i>rubA4</i>	CTTCCGTTGCATGCAGTGC	F	57,8%	60	600 nM	151pb
PRCP089		CTCGACCATCTCGAAGTCG	R	57,8%	60	600 nM	
PRCP092	<i>alkU</i>	GCAGGCAGACCGTGTACAAC	F	60%	64	600 nM	317pb
PRCP093		GTCGATGGCGATCCACGAC	R	63,1%	62	600 nM	
PRCP094	Lcp	GAAGTTCCGCATCACCGTCG	F	63,1%	62	2000nM	343pb
PRCP095		CACCTACCTCGGCGTCATC	R	63,1%	66	2000 nM	
PRCP096	16S	GTATTACCGCGGCTGCTGGC	F	65%	66	600 nM	183 pb
PRCP097		CCAGACTCCTACGGGAGGCAGC	R	75%	64	300 nM	
PRCP098	<i>rubB</i>	GCTGTCTGAAGGATCTGCTC	F	60%	64	600 nM	333pb
PRCP099		AGTTCCAGGCCGATCAGCC	R	63,1%	62	600 nM	

As condições da amplificação foram ajustadas por meio do StepOne Software V2.3 utilizando as configurações padrão para o método Cycle Threshold (CT) em triplicata técnica para cada amostra.

3.2.9. Análises de bioinformática

Foi realizado o levantamento com base na literatura de todos os genes que possam estar envolvidos na degradação de borracha natural e sintética em todos os microrganismos onde houver registro de tal atividade metabólica. As sequências de aminoácidos foram catalogadas e usadas para pesquisar o genoma das *G. paraffinivorans* (MTZ041 e MTZ052) pela ferramenta BLASTp. Uma árvore filogenética foi construída por meio do programa MegAlign (DNA Star Lasergene) para observar como as proteínas Lcp se organizam nas espécies bacterianas degradadoras de borracha.

3.2.10. Avaliação do crescimento em presença de borracha como fonte única de carbono

Para determinar a qual grupo degradador pertenciam os isolados *Gordonia paraffinivorans* MTZ041 e MTZ052 foram realizados cultivos em meio sólido. O meio BH foi suplementado com 20 g/L de ágar e serviu como base para os seguintes preparos adaptados de Banh; Arenskötter; Steinbüchel, (2005) e Birke; Röther; Jendrossek (2017): ágar BH foi coberto por uma fina camada de solução 3% de borracha sintética (descrita abaixo) e, após a evaporação do solvente, o filme de borracha foi coberto com uma camada extra de ágar BH, formando uma placa sanduíche de borracha sintética. Alternativamente, a solução de IR foi espalhada como uma fina película diretamente no ágar BH. O ágar BH com látex natural foi preparado de acordo com as formulações de Bröker et al. (2008) e Jendrossek; Tomasi; Kroppenstedt (1997). Ágar BH com 1% de frutose foi sobreposto por uma fina camada de látex concentrado dispersado em ágar BH em uma concentração de 0,2%. As placas foram incubadas a 30° C por 5 dias. O controle negativo de BH não teve nenhuma fonte de carbono adicionada e o controle positivo teve um acréscimo de 2% de frutose.

Avaliou-se o crescimento dos isolados MTZ041 e MTZ052 em cultura líquida contendo borracha sintética e borracha natural. Os inóculos para as curvas de crescimento foram feitos como descrito anteriormente. As fontes de carbono foram preparadas segundo Linos et al. (2000). Brevemente: pedaços de luva de látex natural foram cortados e pesados (0,25 g/fragmento); as impurezas foram extraídas durante 24 horas com 100 mL de acetona. Os fragmentos de luva foram lavados, secados e adicionados aos erlenmeyers com meio de cultura BH e autoclavados. Para o preparo

da borracha sintética: 3 g de *cis*-1,4-poliisopreno (Sigma-Aldrich ref. 182141) foram extraídos em 100 mL de acetona por 24 horas e depois diluídos em 100 mL de clorofórmio por 48 horas, até formar uma solução de 3% de borracha. Foram cortados fragmentos de alumínio de 1 cm², os quais foram imersos na solução de borracha, formando várias camadas de borracha sintética que cobriram totalmente o alumínio. Esses pedaços foram esterilizados com álcool absoluto por alguns segundos e adicionados ao meio previamente autoclavado. As curvas de crescimento foram realizadas durante 80 dias em shaker com rotação de 150 rpm e 30°C em 100 mL de meio BH contendo as seguintes fontes de carbono separadamente: borracha natural e borracha sintética. O controle negativo foi feito sem fonte de carbono. Cada tratamento foi inoculado com uma OD_{600 nm} final de 0,1. A cada ponto de medição, uma alíquota de 1 mL foi retirada e a densidade óptica foi medida.

3.2.11. Coloração com reagente de Schiff

Ao final das curvas de crescimento os fragmentos de borracha natural foram retirados e corados de acordo com o protocolo descrito por Linos et al. (2000). Em um frasco fechado hermeticamente, foram adicionados 10 mL do reagente de fucsina para cada fragmento de luva e a coloração procedeu por 10 minutos. O excesso do reagente foi descartado e 10 mL da solução de sulfito foram adicionados para a descoloração. Os fragmentos de luva foram lavados com água destilada e secados no fluxo de ar.

3.2.12. Microscopia Eletrônica de Varredura

Os fragmentos de alumínio recobertos com borracha sintética e de luva de borracha natural descritos anteriormente foram retirados das culturas líquidas nos tempos de análise e fixados com uma solução de 2,5% glutaraldeído em tampão fosfato 0.1 M pH 7.4 por 24 horas. Após o tempo de fixação, os fragmentos foram lavados com água estéril e desidratados por 10 minutos em etanol (30, 50, 70, 90% e etanol absoluto). As amostras desidratadas foram secadas na Câmara de Ponto Crítico (Autosamdri 815, TOUSIMIS) com CO₂ líquido. Em seguida foram montadas em “stubs” de alumínio usando fita condutiva de carbono e metalizados (Desk V) com uma camada de ouro. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6610LV) com elétrons secundários a 20kV de aceleração e

aumentos de 450 e 5000 vezes. As análises de MEV foram feitas no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica de Varredura da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) campus Diadema.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CURVA DE CRESCIMENTO MICROBIANO EM PRESENÇA DE AÇÚCARES

As curvas de crescimento na presença de açúcares foram realizadas com os isolados de *Gordonia paraffinivorans* MTZ041 e MTZ052 e com o isolado de *Gordonia sihwensis* MTZ096. O objetivo do experimento foi determinar qual açúcar permitia o melhor crescimento para que essa fonte fosse utilizada como referência para os ensaios seguintes. Os isolados foram testados em meio BH (meio mínimo de sais) sem fonte de carbono para o controle negativo e com adição de glicose 2%, frutose 2% e sacarose 2%, conforme mostra a Figura 11.

Para os três isolados, a fase lag é muito curta no meio de cultura contendo frutose, não podendo ser observada nos tempos de medição realizados, e, a partir de 24 horas, os tratamentos de frutose apresentaram diferença significativa ($p < 0,0001$) em relação ao controle negativo (Figura 11).

Para o isolado MTZ041 a fase lag dos tratamentos de glicose e sacarose se prolongaram por 24 horas (Figura 11A). No ponto final de 168 horas não houve diferença significativa entre os três tratamentos de açúcar.

Já o isolado MTZ052 teve uma fase lag para a glicose de 48 horas (Figura 11B). Em 168 horas todos os tratamentos obtiveram diferença significativa ($p < 0,001$) entre si.

Para o isolado *Gordonia sihwensis* MTZ096, a partir de 72 horas todos os tratamentos entraram em fase estacionária (Figura 11C). Esse comportamento foi semelhante para os isolados MTZ041 e MTZ052, com exceção do tratamento de glicose que, ao final das 168 horas, ainda não havia entrado em fase estacionária para os isolados de *Gordonia paraffinivorans*.

Figura 11. Curvas de crescimento dos isolados (A) *G. paraffinivorans* MTZ041, (B) *G. paraffinivorans* MTZ052 e (C) *G. sihwensis* MTZ096 no meio BH sem fonte de carbono, BH com glicose 2%, BH com frutose 2% e BH com sacarose 2% até 168 horas.

Um estudo realizado por Kim et al. (2003) com *Gordonia sihwensis* SPR2, testou a capacidade desse isolado em utilizar diversos substratos, como glicose, galactose, sacarose, arabitol, ribose, entre outros, como fonte única de carbono. Os resultados demonstraram que esse isolado tem capacidade de utilizar glicose, galactose, sacarose e arabitol, mas não tem a habilidade de utilizar ribose como fonte única de carbono. Nesse estudo não foi testada a capacidade do isolado em utilizar frutose.

Xue et al. (2003) descreveram a espécie *Gordonia paraffinivorans* pela primeira vez. No estudo, o isolado *Gordonia paraffinivorans* HD321 foi capaz de utilizar os açúcares glicose, galactose e sacarose como fonte única de carbono.

Alves e Paixão (2014) realizaram um experimento para determinar a preferência de fonte de carbono para *Gordonia alkanivorans* 1b utilizando a medição da densidade óptica. Na comparação entre glicose, frutose e sacarose, o tratamento com frutose apresentou a fase exponencial mais curta, durando aproximadamente 2,5 dias, enquanto a fase exponencial da cultura em sacarose e em glicose durou 8 dias, somente então entrando na fase estacionária. Desse modo, *Gordonia alkanivorans* 1b foi capaz de crescer 3.6 vezes mais rápido na presença de frutose do que glicose e sacarose. Os autores relataram que esse isolado possui um perfil frutolítico, que também pode ser observado para os isolados MTZ041, MTZ052 e MTZ096. Apesar dos tratamentos com glicose terem apresentado uma O.D. maior ao longo do tempo, a rapidez na utilização da frutose fez com que essa fonte de carbono fosse escolhida como referência para os experimentos seguintes.

4.2. ENSAIO DE ASSIMILAÇÃO DE HIDROCARBONETOS

A capacidade de assimilação de fontes nutricionais e, por conseguinte, a avaliação do crescimento microbiano, pode ser acessada de maneira rápida, simples e barata por meio de um indicador de óxido-redução. Durante a assimilação de substratos, o NADH que foi utilizado no metabolismo é oxidado em NAD⁺. Os elétrons doados são transferidos por uma cadeia transportadora para aceptores de elétrons tais como oxigênio, nitrato e outros. Neste trabalho foi utilizado o reagente 2,6 DCPIP comoceptor final de elétrons. É possível verificar a capacidade de um microrganismo de utilizar hidrocarbonetos observando a mudança de cor de 2,6 DCPIP do azul (forma oxidada) para incolor (forma reduzida). No entanto, a literatura diverge quanto à

concentração exata de 2,6 DCPIP para os ensaios de assimilação de hidrocarbonetos (EL HANAFY et al., 2016; HANSON; DESAI; DESAI, 1993; KUBOTA et al., 2008). Inicialmente, padronizou-se a concentração de 2,6 DCPIP com o isolado *G. paraffinivorans* MTZ041. A Figura 12 demonstra os resultados colorimétricos do ensaio após 72 horas de incubação a 30 °C com o meio BH como controle negativo e o mesmo meio com frutose como controle positivo, contendo de 0 a 160 µg/mL de 2,6 DCPIP.

Substrato	0 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	80 µg/ml	100 µg/ml	160 µg/ml
BH						
Frutose						

Figura 12. Avaliação do crescimento de *G. paraffinivorans* MTZ041 e padronização de concentrações de 2,6 DCPIP. Gradiente de cores denota o crescimento do microrganismo em diferentes concentrações de 2,6 DCPIP. Coloração azul representa falta de crescimento e transparente crescimento. Resultados mostrados após 72 horas.

Os resultados mostraram que, na ausência do indicador (0 µg/mL 2,6 DCPIP), a coloração é transparente, como esperado. As concentrações 20 µg/mL e 40 µg/mL foram consideradas insuficientes, visto que é muito parecida com o controle sem 2,6 DCPIP. As concentrações 80 µg/mL e 100 µg/mL foram consideradas eficientes e adequadas, uma vez que o indicador só mudou de cor no controle positivo (frutose) e se manteve no controle negativo (BH). A concentração 160 µg/mL foi considerada muito alta, pois não houve mudança na coloração entre a frutose e BH; provavelmente, houve inibição do crescimento nessa condição. Com base nesses resultados apresentados na Figura 12, as concentrações escolhidas para os ensaios de 2,6 DCPIP foram de 80 µg/mL e 100 µg/mL.

Os ensaios com 2,6 DCPIP foram realizados com meio BH contendo os seguintes substratos como fonte única de carbono: hexano, decano, dodecano, pentadecano, hexadecano e eicosano. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e técnica, primeiramente em placas de 96 poços e depois em placas de 36 poços.

Segundo Kubota et al. (2008), os ensaios com 2,6 DCPIP são qualitativos e são geralmente confirmados por um método quantitativo, como CG-MS, por exemplo.

Dessa forma, os resultados foram correlacionados e se mostraram consistentes para ambas análises, segundo os autores.

Nossos experimentos demonstraram que esse método sofreu muita variação, não gerando resultados consistentes. Em vista disso, decidimos prosseguir com a medição do peso seco durante as curvas de crescimento como método para avaliar o crescimento em hidrocarbonetos como fonte única de carbono.

4.3. CURVA DE CRESCIMENTO DE *G. SIHWENSIS* MTZ096 PARA DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETO MODELO

Para a determinação de qual hidrocarboneto teria o melhor desempenho com o isolado de *G. sihwensis*, foram realizadas curvas de crescimento pelo método do peso seco (triplicata). O meio com BH sem fonte de carbono serviu como controle negativo. O tratamento com adição de 2% de frutose, que serviu como controle positivo, foi o único a apresentar diferença significativa ($p < 0,01$) em relação ao controle negativo já em 24 horas (ANEXO I).

O controle positivo apresentou crescimento exponencial até 48 horas, quando entrou na fase estacionária. Foi necessário fazer um ajuste na concentração de eicosano de 1% para 0,1%, pois a maior concentração inibiu o crescimento do isolado. O tratamento com eicosano apresentou o menor crescimento entre os hidrocarbonetos, entrando em fase estacionária a partir de 48 horas. O tratamento com decano seguiu o mesmo padrão do eicosano, porém apresentou crescimento ligeiramente maior. Não houve diferença significativa entre os dois tratamentos.

O perfil de utilização do pentadecano demonstrou que a partir de 120 horas há um ligeiro decaimento no crescimento (Tabela 7). O tratamento com pentadecano exibiu perfil de consumo muito parecido com o tratamento de hexadecano, sendo que o único ponto em que houve diferença significativa ($p < 0,005$) entre os dois tratamentos foi em 168 horas.

O tratamento com hexadecano apresentou o melhor desempenho entre os hidrocarbonetos testados, ainda apresentando crescimento exponencial em 168 horas e sendo significativamente diferente das outras amostras ($p < 0,001$), incluindo o controle positivo de frutose ($p < 0,01$), no último ponto de medição.

Tabela 7. Dados da curva de crescimento em peso seco de *Gordonia sihwensis* MTZ096

Tempo (h)	BH		Frutose 2%		Hexadecano 1%		Decano 1%		Pentadecano 1%		Eicosano 0,1%	
	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
0	0,070	0,007	0,260	0,020	0,035	0	0,037	0,010	0,09	0,007	0,077	0,003
24	0,067	0,010	0,584	0,095	0,337	0,081	0,402	0,045	0,232	0,017	0,387	0,060
48	0,095	0,014	1,685	0,043	1,267	0,159	0,835	0,035	1,275	0,035	0,712	0,123
72	0,070	0	1,540	0,130	1,355	0,113	0,977	0,024	1,555	0,558	0,565	0,028
120	0,085	0,007	1,535	0,108	1,665	0,084	0,730	0,091	1,897	0,449	0,722	0,123
168	0,087	0,003	1,477	0,053	2,005	0,275	1,0	0,042	1,087	0,144	0,622	0,194

Média em mg/ml; D.P. = Desvio Padrão

Portanto, foi concluído que todos os hidrocarbonetos usados foram capazes de promover o crescimento do isolado MTZ096, em especial o hexadecano. Com base nesses resultados e no apoio da literatura, que descreve o hexadecano como modelo para degradação de hidrocarbonetos, esse composto foi selecionado como padrão para todos os ensaios seguintes (COSTA, 2006).

4.4. CURVA DE CRESCIMENTO PARA *G. SIHWENSIS* MTZ096 E *G. PARAFFINIVORANS* MTZ041

A linhagem MTZ041 foi incluída neste ensaio uma vez que seu padrão de consumo de hexadecano já era conhecido (OLIVEIRA, 2015) e serviu como comparativo para a linhagem em questão (MTZ096). Foram realizadas novas curvas de crescimento (triplicata), desta vez utilizando o isolado de *G. sihwensis* MTZ096 e um dos isolados de *G. paraffinivorans* (MTZ041) para que fossem comparadas as habilidades de degradação das duas espécies (Figura 13). O hexadecano já havia sido descrito por Oliveira (2015) como hidrocarboneto preferencial para o isolado MTZ041.

Figura 13. Curva de crescimento dos isolados *G. paraffinivorans* MTZ041 (A) e *G. sihwensis* MTZ096 (B) em 168 horas na presença de frutose e hexadecano. O crescimento foi aferido mediante a avaliação do peso seco.

O controle negativo de BH se manteve inalterado durante o experimento para ambos os isolados e o perfil de utilização da frutose foi o mesmo observado nos experimentos anteriores (Figura 11A e 11C).

Para o isolado *G. paraffinivorans* MTZ041, o peso seco máximo observado para o tratamento de frutose foi de 1,75 mg/ml, enquanto para o tratamento de hexadecano

foi de 1,11 mg/ml, sendo o primeiro 1,5 vezes maior. A partir de 48 horas houve diferença significativa ($p < 0,0001$) entre os dois tratamentos. Nesse ponto também foi possível observar que o tratamento com frutose entrou em fase estacionária. O tratamento com hexadecano seguiu em crescimento exponencial até o fim do experimento, mas não alcançou os níveis de biomassa do tratamento com frutose. É possível concluir que o isolado MTZ041 é capaz de utilizar hexadecano como fonte de carbono e energia, mas que o substrato preferencial nesse caso é a frutose.

Para o isolado *G. sihwensis* MTZ096, o tratamento com a frutose apresentou peso seco máximo de 1,47 mg/ml em 168 horas, em contrapartida o peso seco máximo observado para o tratamento com hexadecano foi de 3,68 mg/mL. Apenas no último ponto de medição houve diferença significativa ($p < 0,0001$) entre os tratamentos de frutose e hexadecano. Enquanto o tratamento de frutose entrou em fase estacionária a partir de 48 horas, a amostra com hexadecano se manteve em crescimento exponencial até o fim do experimento. A biomassa do tratamento com hexadecano foi 2,5 vezes maior do que o controle positivo com frutose.

O maior acúmulo de biomassa na presença de hexadecano em relação às fontes de carbono mais simples, como a glicose, foi descrito anteriormente na literatura (CHÉNIER et al., 2003; COSTA, 2006). Chénier e colaboradores (2003) afirmam que os microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos geralmente são encontrados em locais contaminados com esses compostos e por isso estariam mais adaptados a utilizarem essas fontes de carbono. Costa (2006) relatou que o isolado *Bacillus pumilus* UFPEDA 831 apresentou crescimento 5 vezes maior em meio mínimo contendo hexadecano do que com meio mínimo na presença de glicose. Esses relatos condizem com o resultado apresentado na Figura 13B.

Lo Piccolo e colaboradores (2011) realizaram curvas de crescimento na presença de hexadecano em meio mínimo para o isolado *Gordonia* sp. SoCg e foi observado crescente acúmulo de biomassa nas primeiras 46 horas, atingindo 3,4 mg/mL em seu ponto máximo, seguido de declínio no crescimento. Análises cromatográficas demonstraram consumo abundante do hidrocarboneto, que foi correlacionado com o aumento da biomassa neste estudo.

Comparando o desempenho dos isolados MTZ041 e MTZ096 é possível notar que, tanto no controle negativo de BH como no controle positivo de frutose, não existe diferença significativa entre os isolados em nenhum ponto do experimento. Em relação aos tratamentos com hexadecano, é possível observar que existe diferença

significativa ($p < 0,0001$) a partir de 48 horas, que continua até o final do experimento. A biomassa do isolado *G. sihwensis* MTZ096 é 3,3 vezes maior do que a biomassa de *G. paraffinivorans* MTZ041 para o tratamento com hexadecano. A diferença no crescimento dos isolados pode ser explicada geneticamente. Enquanto *G. sihwensis* MTZ096 possui o sistema AH e o sistema CYP 153 completos, o isolado de *G. paraffinivorans* MTZ041 possui apenas o sistema CYP 153 e não possui nenhum componente do sistema AH. Isso poderia justificar porque *G. sihwensis* cresce 3 vezes mais na presença de hexadecano do que *G. paraffinivorans*.

4.5. PADRONIZAÇÃO DAS ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Na cromatografia gasosa, um gás inerte carrega a substância a ser analisada de acordo com a sua polaridade: quanto mais polar, mais retida a substância ficará na sílica, então o gás irá demorar mais tempo para arrastá-la por toda a coluna de cromatografia. A substância será identificada pelo tempo de retenção e, a partir da intensidade do pico, é possível determinar a área, o que permite o cálculo da quantidade daquele composto (FUJII et al., 2004). Portanto, essa metodologia pode ser empregada para se determinar o quanto de uma fonte de carbono, nesse caso o hexadecano, foi consumido pelo metabolismo microbiano durante um certo tempo.

A primeiro passo para se alcançar tal objetivo foi selecionar um solvente que proporcione a maior eficiência de extração do hexadecano do meio de cultivo aquoso. Primeiramente, foi necessário determinar qual volume de solvente seria utilizado. Para isso, foram feitos experimentos com proporções de 1:1, 1:2 e 1:3 de hexadecano com meio de cultivo e os solventes testados (isopropanol, acetato de etila e etanol). Foi possível observar gotículas de hexadecano segregadas quando foram utilizados 1 e 2 volumes de isopropanol, acetato de etila e etanol. Essas gotículas somente desapareceram quando foi utilizado um volume 3 vezes maior do solvente em relação ao volume do meio, fazendo com que a proporção 1:3 fosse adotada. Uma vez determinado o volume a ser utilizado, foi feita uma análise para selecionar o solvente cuja extração proporcionou valores mais próximos entre o hexadecano e o hexadecano mais meio de cultivo, o que representa a eficiência do solvente durante a extração.

Os resultados na Tabela 8 correspondem à área dos picos em cada tratamento. Nesse caso, o solvente mais eficiente foi o isopropanol, pois os valores estão mais próximos entre si do que o acetato de etila e o etanol.

Tabela 8. Padronização de solvente para extração de hexadecano do meio de cultivo.

Solvente	Hexadecano (A)	Hexadecano com meio (A)
Acetato de Etila	10,696	20,237
Etanol	13,661	29,775
Isopropanol	42,583	50,598

(A) representa área.

Jayakrishnan e Shah (1983) descrevem a importância de obter emulsões contendo óleo e água utilizando surfactantes para solubilizar compostos hidrofóbicos. Nos experimentos realizados, os autores observaram que 4 mL de isopropanol foi capaz de solubilizar, juntamente com um surfactante, 10 mL de hexadecano em 5,9 mL de água, criando uma emulsão homogênea.

Nesse estudo não foi necessário o uso de surfactantes devido à baixa concentração de hexadecano nas amostras. Porém, dada a grande quantidade de água, foi necessário um volume maior de solvente, que garantiu a formação de uma emulsão homogênea.

Uma vez que o uso do solvente foi estabelecido, o tempo de retenção do hexadecano foi determinado. Como pode ser observado no tratamento controle na Figura 14A, é possível identificar somente o pico do solvente no cromatograma (seta preta), como era esperado. Na Figura 14B, além deste, é possível ver o pico referente ao hexadecano (seta vermelha) no tempo de retenção de 3,370 minutos.

Figura 14. Cromatografia gasosa para determinação do tempo de retenção do hexadecano. Controle negativo sem hexadecano (A) e na presença de hexadecano (B). Setas pretas representam o pico do solvente e a seta vermelha representa o pico de hexadecano.

4.5.1. Padronização da concentração de hidrocarbonetos

Uma vez determinado o solvente, o tempo de retenção e os volumes usados, foi necessário determinar a melhor concentração de hexadecano no meio de cultivo de forma que fosse possível observar o decaimento do substrato em função do metabolismo. Para isso, foram realizadas análises nos tempos 0 e 144h. Os tratamentos utilizados foram 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1% e 3% de hexadecano. Os resultados apresentados na Tabela 9 mostram que os tratamentos com 0,001% e 0,01% foram excluídos, pois o hexadecano não pode ser detectado, provavelmente, devido à baixa concentração. Os tratamentos de 0,1% e 1% demonstram um decaimento na área em 144h, indicando que houve consumo de hexadecano para ambos os tratamentos. Para a concentração de 3% não houve consumo após 144 horas, o que pode significar que essa concentração inibe o crescimento do isolado, e, portanto, este não consumiu a fonte de carbono.

Tabela 9. Consumo de diferentes concentrações de hexadecano por *G. paraffinivorans* MTZ041 segundo o cálculo da área do pico correspondente ao hexadecano detectado por cromatografia gasosa.

Hexadecano	Tempo (horas)	Área	Taxa de consumo (%)
0,1%	0	5,451	0
	144	-	100
1%	0	36,304	0
	144	31,116	14,29

Como pode ser observado na Figura 15B, o hexadecano a 0,1% foi totalmente consumido após 144 horas, não sendo possível observar o mesmo pico de identificação do tempo 0 horas (Figura 15A), apenas a linha de ruído do equipamento. No tratamento contendo 1%, é possível ver o pico de hexadecano no tempo 0 (Figura 15C) e uma diminuição de 14% da área do mesmo no tempo de 144 horas (Figura 15D), o que indica que o hexadecano foi parcialmente consumido.

A concentração de 1% foi escolhida como padrão para as curvas de crescimento, pois foi possível observar seu decaimento ao longo do tempo, o que permite estender a curva e observar o decaimento gradativamente.

Figura 15. Análise do consumo de hexadecano como fonte única de carbono por *G. paraffinivorans* MTZ041 por cromatografia gasosa. Tempo inicial (T0) e tempo final de cultivo (T144). Em (A) 0,1% em T0, em (B) 0,1% T144, em (C) 1 % T0 e em (D) 1% T144.

4.5.2. Análise química do consumo de hidrocarbonetos por isolados de *Gordonia*

Para determinar o consumo de hexadecano ao longo do tempo, foram feitas análises do decaimento da concentração do mesmo em função do crescimento microbiano. Um controle negativo sem inóculo foi feito para determinar se haveria perda do hexadecano por agitação ou volatilização. Os experimentos foram feitos em triplicata.

Os resultados demonstram que não houve queda na concentração do hexadecano e os níveis se mantiveram estáveis durante as 168 horas, não apresentando nenhum decaimento significativo. O isolado MTZ041 foi capaz de degradar 28,92% do hexadecano presente no meio. Porém, o isolado que apresentou a melhor capacidade de degradar hexadecano foi MTZ096, que consumiu 69,80% do hidrocarboneto (Tabela 10).

Esses resultados demonstram que *G. paraffinivorans* MTZ041 e *G. sihwensis* MTZ096 são capazes de consumir o hexadecano como fonte única de carbono, e no caso de MTZ096, o consumo está associado ao aumento de massa celular (Figura 13), comprovando a ideia de que esses isolados têm valor para biorremediação.

Tabela 10. Taxa de consumo de hexadecano para os isolados *G. paraffinivorans* MTZ041 e *G. sihwensis* MTZ096

Tempo (h)	Branco		MTZ041			MTZ096		
	Concentração (μmol/mL)	Desvio Padrão	Concentração (μmol/mL)	Desvio Padrão	Taxa de consumo (%)	Concentração (μmol/mL)	Desvio Padrão	Taxa de consumo (%)
0	8,93	0,19	8,09	0,78	0	8,40	0,98	0
24	8,55	1,04	8,67	0,39	-07,19	7,91	0,80	05,82
48	9,02	0,84	7,83	1,02	03,15	7,39	1,3	12,03
72	8,74	0,97	7,34	0,59	09,23	5,57	2,44	33,70
120	8,63	0,87	7,02	0,62	13,24	5,30	3,60	36,94
168	8,83	0,70	5,75	2,08	28,92	2,53	0,74	30,20

Segundo a pesquisa dos genomas, os dois isolados codificam o sistema CYP 153, porém somente *G. sihwensis* MTZ096 possui o sistema AH. Possivelmente, a presença dos dois sistemas nesse isolado confere uma capacidade maior de degradação de hidrocarboneto, que pode ser correlacionado com esse experimento.

Lo Piccolo et al. (2011) analisaram por meio de cromatografia gasosa o consumo de hexadecano pelo isolado *Gordonia* sp. SoCg. Ao final de 96 horas, foi possível observar o consumo de 88,9% do hexadecano presente na amostra. Os experimentos também demonstraram que o consumo de substrato é seguido por aumento da biomassa.

4.6. EXPRESSÃO GÊNICA DOS SISTEMAS ENVOLVIDOS NO CONSUMO DE HIDROCARBONETOS EM *G. SIHWENSIS*

A análise genômica de *G. sihwensis* revelou que essa espécie possui dois “clusters” de genes já descritos na literatura como sendo importantes para a degradação de hidrocarbonetos (FUJII et al., 2004; FUJII et al., 2006). O primeiro (CYP153) é formado por três genes: ferredoxina (FER), citocromo P450 (CYP153) e uma ferredoxina redutase (FER RED), como mostra a Figura 16. Esse sistema foi descrito na literatura como um dos responsáveis pela degradação de hidrocarbonetos (FUJII et al., 2004; MAIER et al., 2001).

Figura 16. Representação do sistema CYP153 em *G. sihwensis* MTZ096. As setas maiores representam os genes e as setas menores a posição dos primers que foram desenhados para as amplificações por PCR.

Além do sistema CYP153, *G. sihwensis* MTZ096 possui outro sistema, denominado alceno hidroxilase (AH), o qual também foi reportado como relevante

para a degradação de hidrocarbonetos por microrganismos (FUJII et al., 2006). De acordo com a literatura, cinco genes fazem parte desse sistema. O sistema AH, representado na Figura 17, contém os genes alceno-1-monooxigenase (*alkB*), rubredoxina (*rubA3*), rubredoxina (*rubA4*), rubredoxina redutase (*rubB*) e um regulador transcricional do tipo TetR (*alkU*).

Figura 17. Representação do sistema AH em *G. sihwensis* MTZ096. As setas grades e coloridas representam os genes e as setas menores, a posição dos primers que foram desenhados para realizar as amplificações.

No caso dos isolados de *G. paraffinivorans* MTZ041 e MTZ052, sabe-se que a expressão do sistema CYP153 é ativada na presença de hexadecano como fonte única de carbono e, provavelmente, é responsável pelo consumo desse substrato (OLIVEIRA, 2015). Neste trabalho, o objetivo foi determinar se a transcrição dos sistemas CYP153 e AH é ativada no isolado *G. sihwensis* MTZ096 na presença de hexadecano. Para tanto, a expressão relativa de cada gene foi analisada por meio de PCR quantitativo (Figura 18).

Para o sistema CYP 153, os resultados demonstram que todos os genes do sistema foram induzidos na presença de hexadecano. Os genes ferredoxina (FER), CYP 153 e ferredoxina redutase (FER RED) tiveram sua expressão aumentada 750, 232 e 110 vezes, respectivamente, na presença do alceno (Figura 18A).

Oliveira (2015) relatou uma expressão 50 vezes maior para os genes ferredoxina e CYP 153 na presença de hexadecano para o isolado *G. paraffinivorans* MTZ041. Para o isolado *G. paraffinivorans* MTZ052, os resultados indicaram uma expressão 2 vezes maior para o gene ferredoxina e 15 vezes maior para o gene CYP153. Nenhum dos dois isolados apresentou expressão do gene ferredoxina redutase.

Comparando os resultados de expressão para *Gordonia sihwensis* MTZ096, com dados produzidos anteriormente pelo nosso laboratório para *Gordonia paraffinivorans* MTZ041, podemos observar que a expressão do gene ferredoxina é 15 vezes maior para o isolado MTZ096; para o gene CYP153, a expressão é 4,6 vezes

maior. O gene ferredoxina redutase não foi expresso em *Gordonia paraffinivorans* MTZ041, impossibilitando a comparação desse gene entre as espécies.

Figura 18. (A) qPCR dos genes ferredoxina (FER), CYP 153, ferredoxina redutase (FER RED), (B) alceno-1-monooxigenase (*alkB*), rubredoxina (*rubA3*), rubredoxina (*rubA4*), rubredoxina redutase (*rubB*) e regulador transcricional (*alkU*) de *G. sihwensis* MTZ096. O tratamento referência foi a frutose (2%) e o teste foi o hexadecano (1%). O normalizador interno foi a subunidade menor do ribossomo (16S). (** $p < 0,001$; *** $p < 0,0002$; **** $p < 0,0001$). Para todos os genes testados, o tratamento de referência (frutose) foi considerado como 1.

Para os genes do sistema alcano hidroxilase, foi possível observar um aumento de 248 vezes na expressão relativa do gene *alkB*. Os genes *rubA3*, *rubA4* e *alkU* tiveram sua expressão aumentada em 1567, 1296 e 20 vezes respectivamente. O gene *rubB* não apresentou aumento significativo da expressão relativa, sendo considerado, portanto, como tendo uma expressão constitutiva. (Figura 18B).

Procópio et al. (2013) descreveram o sistema AH de *Dietzia cinnamea* P4 contendo 2 genes: *alkU* e *alkB-rub*, sendo o segundo uma fusão natural dos genes *alkB* (alcano-1-monooxigenase) e *rubB* (rubredoxina). A quantificação da expressão desse sistema na presença de hexadecano e seus resultados indicam que, após duas horas de indução, os genes *alkB-rub* e *alkU* foram expressados 4,6 e 43 vezes mais do que no controle com glicose, respectivamente.

Lo Piccolo et al. (2011) realizaram a quantificação dos genes do sistema AH de *Gordonia* sp. SoCg e relataram que os genes *alkB*, *rubA3*, *rubA4* e *rubB* foram mais expressados na presença de hexadecano do que frutose, sendo o gene *alkU* o único do sistema que não apresentou diferença significativa entre o controle com frutose e tratamento com hexadecano.

Com base na literatura e nos resultados obtidos nesse experimento, pode-se concluir que ambos os sistemas são altamente induzidos na presença do substrato (hexadecano) e estão presentes e ativos em *G. sihwensis* MTZ096. Esse aumento na expressão, assim como a presença de um sistema adicional, poderia justificar o consumo mais rápido e mais efetivo do hexadecano (Tabela 10) quando comparado ao consumo por *G. paraffinivorans* MTZ041.

4.7. ESTUDO DO CONSUMO DE BORRACHA POR *G. PARAFFINIVORANS*

A análise da sequência genômica de *G. paraffinivorans* mostrou que os isolados MTZ041 e MTZ052 possuem os elementos genéticos necessários para a assimilação da borracha como fonte de carbono. Por meio da bioinformática, identificou-se o gene *Lcp* representado na Figura 19, que é descrito na literatura como o gene responsável pela utilização da borracha sintética em outras espécies de *Gordonia* (HIESSL et al., 2012; IBRAHIM et al., 2006; LINOS et al., 2000; ROSE; STEINBÜCHEL, 2005). Porém, não há relatos na literatura sobre a capacidade de *G. paraffinivorans* utilizar a borracha como fonte única de carbono – e é justamente a isso que esta parte do trabalho se propõe. O genoma do isolado de *G. sihwensis*

MTZ096 também foi pesquisado para a presença desse gene, porém o mesmo não foi identificado.

Figura 19. Representação do gene Lcp em *G. paraffinivorans*. A seta grade representa o gene Lcp e as setas menores a posição dos primers usados para qPCR.

Utilizando o programa MegAlign (DNA Star Lasergene), foi possível construir uma árvore filogenética para observar como a proteína Lcp dos isolados MTZ041 e MTZ052 se organiza entre as espécies de actinomicetos (Figura 20).

Figura 20. Árvore filogenética da proteína Lcp das espécies de actinomicetos.

Algumas espécies de bactérias presentes na lista são descritas como degradadoras de borracha, como é o caso de *Gordonia polyisoprenivorans* VH2, *Gordonia westfalica*, *Nocardia farcinica* NVL3, *Nocardia farcinica* E1, *Streptomyces* sp. CFMR 7 e *Streptomyces* sp. K30 (HIESSL et al., 2012; IBRAHIM et al., 2006; LINH et al., 2017; LINOS et al., 2002; NANTHINI; ONG; SUDESH, 2017; ROSE; TENBERGE; STEINBÜCHEL, 2005). Os isolados *G. paraffinivorans* MTZ041 e MTZ052 possuem sequências de aminoácidos idênticas para a proteína Lcp. No

fenograma apresentado na Figura 20, é possível observar que Lcp dos isolados estão muito próximos dos outros Lcp das *Gordonias* capazes de degradar borracha, sendo mais próximo, filogeneticamente, de *G. westfalica* do que de *G. polyisoprenivorans*.

4.8. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *G. PARAFFINIVORANS* EM BORRACHA COMO FONTE ÚNICA DE CARBONO

Para determinar a qual grupo de degradadores pertencem os isolados MTZ041 e MTZ052, foi realizada a avaliação do crescimento em borracha em meio sólido. As placas foram semeadas pelo método de esgotamento – com exceção das placas com uma camada interna de borracha sintética, em que o meio foi furado até atingir essa camada interna para que os microrganismos fossem capazes de chegar no substrato.

Como pode ser observado na Figura 21, para ambos os isolados houve crescimento mínimo nas placas sem fonte de carbono (A e B); houve crescimento abundante na presença de frutose (C e D). Apesar de haver crescimento nas placas com camada interna de solução de borracha (E e F), não observou-se halos translúcidos no meio. Já nas placas com a camada superficial de borracha foi possível observar crescimento abundante (G e H). Nas placas com uma camada de ágar BH suplementado com 0,2% de látex natural não houve formação de halos translúcidos que são característicos do segundo grupo de degradação. Portanto, esses dados indicam que *G. paraffinivorans* utiliza borracha como fonte única de carbono e pertence ao primeiro grupo, isto é, aquele que necessita de uma superfície recoberta por borracha sintética para crescer e não forma halos.

Figura 21. Padrão de crescimento de *G. paraffinivorans* em meio de borracha como fonte única de carbono. Isolado MTZ041 na linha superior, isolado MTZ052 na linha inferior. Meio BH sem fonte de carbono (A e B), meio BH com adição de 2% de frutose (C e D), meio BH “sanduíche” com solução de borracha 3% (E e F), meio BH com camada superficial de solução de borracha 3% (G e H) e meio BH com camada de látex natural (I e J).

De acordo com Linos et al. (2000) e Birke; Röther; Jendrosseck (2017), para diferenciação das duas estratégias de degradação apresentadas por microrganismos foram utilizadas placas com ágar mineral “sanduíche” (uma camada inferior de meio mínimo, uma camada de solução de borracha 3% e uma camada superior de meio mínimo), placas com uma camada superficial de borracha e placas com 0,2% de látex natural. Os microrganismos que cresceram nas placas sanduíche e nas placas com látex natural e formaram halos translúcidos no meio, capazes de crescer sem o contato direto com a borracha, foram consideradas do grupo que degrada borracha com menor eficiência. Os microrganismos capazes de crescer diretamente na superfície de borracha pertencem ao grupo que só cresce de forma aderida ao material, sendo degradadores muito mais potentes. Esses microrganismos não formavam halos translúcidos no meio.

Arenskötter, Bröker e Steinbüchel (2004) relatam que as espécies *Gordonia polyisoprenivorans* e *Gordonia westfalica* são capazes de crescer adesivamente, mas não formam halos translúcidos no ágar com látex natural, colocando essas espécies de *Gordonia* no primeiro grupo de degradadoras, assim como este trabalho coloca os isolados de *G. paraffinivorans* MTZ041 e MTZ052 nesse mesmo grupo.

4.9. CURVA DE CRESCIMENTO DE *GORDONIA PARAFFINIVORANS* MTZ041 E MTZ052 EM PRESENÇA DE BORRACHA COMO FONTE ÚNICA DE CARBONO

Com base nos resultados de crescimento em meio sólido, curvas de crescimento em meio líquido foram realizadas. Para o isolado *G. paraffinivorans* MTZ052, as curvas foram feitas em triplicata e para o isolado MTZ041 em duplicata. Nos primeiros 5 dias foram retiradas amostras para medição a cada 24 horas; depois, apenas 2 medições por semana foram realizadas. Os resultados para ambos isolados seguem um perfil muito parecido. A borracha sintética promove um crescimento rápido, sendo que a fase exponencial é muito curta, atingindo a fase estacionária logo nos primeiros 5 dias (Figura 22A e 22B).

Hiessl et al. (2012) realizaram curvas de crescimento com *Gordonia polyisoprenivorans* VH2 em meio líquido contendo pedaços de borracha sintética e relataram que, em 10 dias, o isolado havia entrado na fase estacionária. O crescimento foi rápido, atingindo O.D. _{600 nm} 1,0 em apenas 5 dias. Nesse experimento, somente foram retirados pontos de medição a cada 5 dias, sendo então impossível dizer se *Gordonia polyisoprenivorans* VH2 possui o mesmo perfil inicial de crescimento que os isolados MTZ041 e MTZ052.

Após os 5 dias iniciais, o crescimento foi decaindo, até se igualar com o controle sem borracha. Durante o crescimento em borracha há produção de pigmentos no meio de cultura, o que se presume ser proveniente de pigmentos carotenoides. Apesar da diminuição do crescimento, é possível observar um gradiente crescente de cores nos meios de cultura, sugerindo que a cultura continua se desenvolvendo. Uma explicação é que os microrganismos formem o biofilme na superfície da borracha e fiquem isolados pela matriz, liberando no meio apenas o excedente das células e os subprodutos que geram essa coloração. Desse modo, haveria uma diminuição na O.D., pois não haveriam células livres; mas, ainda assim, haveria crescimento ocorrendo dentro do biofilme.

Linós et al. (2000) realizaram curvas de crescimento com pedaços de alumínio recobertos com solução de borracha sintética, analisando os resultados por microscopia eletrônica de varredura. Após uma semana de incubação, a superfície da borracha sintética inoculada com *Gordonia polyisoprenivorans* VH2 foi completamente coberta por biofilme. Outra espécie, *Gordonia westfalica* Kb2, apresentou um comportamento semelhante, cobrindo o material com biofilme após 7 dias.

Figura 22. Curvas de crescimento dos isolados *G. paraffinivorans* MTZ041 (A) e *G. paraffinivorans* MTZ052 (B) em borracha sintética como fonte de carbono.

O gradiente de cores demonstra uma coloração rosada típica de *Gordonia paraffinivorans*, devido a produção do que se presume ser proveniente de pigmentos

carotenoides (Figura 23). É possível observar que o controle mantém a mesma cor ao longo do experimento.

Figura 23. Gradiente de cor do meio de cultura com borracha sintética ao longo de 80 dias. Controle sem inóculo (A); *G. paraffinivorans* MTZ041 (B) e *G. paraffinivorans* MTZ052

As curvas de crescimento em borracha natural tem um perfil muito parecido para ambos os isolados (MTZ041 e MTZ052). O crescimento em borracha natural tem uma fase lag que dura cerca de 10 dias e só então entra em crescimento exponencial (Figura 24A e 24B). Há um aumento da densidade óptica no controle não inoculado de borracha natural. Acredita-se que esse aumento ocorra devido à liberação de algumas substâncias da própria borracha, e não por contaminação. Durante o ensaio foram retiradas alíquotas desse tratamento, as quais foram plaqueadas em meio de cultivo rico para evidenciar qualquer contaminante. Porém, os resultados comprovaram a esterilidade do meio até o fim do experimento.

Por volta de 21 dias de experimento o crescimento dos isolados na presença de borracha se distancia estatisticamente ($p < 0,0001$) dos controles não inoculados e há aumento exponencial do crescimento até o final da curva, e mesmo após 80 dias, a fase estacionária não foi alcançada. O crescimento para o isolado MTZ052 foi ligeiramente maior na borracha natural quando comparado ao isolado MTZ041, com uma diferença de densidade óptica de 1,0 em O.D. $_{600\text{ nm}}$. Nas semanas finais do experimento foi possível observar pedaços minúsculos flutuando no meio de cultura.

Acredita-se que eles sejam pedaços da luva que começaram a se desintegrar. Essa afirmação é suportada por Linos et al. (2000), que coraram esses pedaços minúsculos e comprovaram serem pedaços da degradação da borracha.

Figura 24. Curvas de crescimento dos isolados *G. paraffinivorans* MTZ041 (A) e *G. paraffinivorans* MTZ052 (B) em borracha natural como fonte de carbono.

O gradiente de cores da curva de crescimento demonstra que o controle fica mais escuro ao longo do tempo, mas sem tons rosados que são típicos de *G. paraffinivorans* (Figura 25A).

Figura 25. Gradiente de cor do meio de cultura com borracha natural ao longo de 80 dias. Controle sem inóculo (A); *Gordonia paraffinivorans* MTZ041 (B) e *Gordonia paraffinivorans* MTZ052

Pode-se concluir que ambos isolados são capazes de crescer na presença de borracha sintética e natural, apresentando um crescimento mais acentuado para a borracha natural.

Ibrahim et al. (2006) descreveram comportamento similar ao observado nos isolados MTZ041 e MTZ052 para o microrganismo *Nocardia farcinica* E1. Por meio das curvas de crescimento realizadas com fragmentos de borracha sintética e natural, foi constatado que o microrganismo conseguiu crescer mais na presença de borracha natural do que na presença de borracha sintética ao longo de 50 dias.

Berekaa et al. (2000) relataram que, nas curvas de crescimento para *Gordonia westfalica* Kb2, a colonização dos pedaços de luva de borracha natural aumentaram ao longo do tempo. Apesar do fragmento estar completamente coberto por um denso biofilme após a primeira semana de cultivo, o número de células planctônicas na cultura foi quase zero. Somente a partir da terceira semana de cultivo houve aumento na densidade óptica do meio – e ao final de 8 semanas houve um número significativo de células planctônicas no meio de cultura.

4.10. COLORAÇÃO COM REAGENTE DE SCHIFF

Ao término das curvas de crescimento, os fragmentos de luva de borracha natural foram retirados e corados de acordo com o protocolo descrito por Linos et al. (2000). A coloração rosada produzida pelo reagente de Schiff comprova a presença de grupos aldeídos que são produzidos durante a degradação da borracha e formação do biofilme (LINOS et al., 2000; TSUCHII; SUZUKI; TAKEDA, 1985).

Conforme pode ser observado na Figura 26A, o fragmento de luva do controle negativo (sem inóculo) não apresentou coloração, enquanto os fragmentos de luva provenientes dos cultivos com MTZ041 (Figura 26B) e MTZ052 (Figura 26C) apresentaram coloração rosa, conforme esperado, em caso de formação de biofilme.

Figura 26. Fragmentos de borracha natural após a coloração de Schiff. Controle não inoculado (A), inoculado com *G. paraffinivorans* MTZ041 (B) e inoculado com *G. paraffinivorans* MTZ052 (C). Barras: 1 cm.

De acordo com Linos et al. (2000), nos experimentos com *G. polyisoprenivorans* VH2 e *G. westfalica* K2b, após 6 semanas em meio líquido, os pedaços de borracha natural foram corados com reagente de Schiff. Nos tratamentos com inóculo, toda a superfície da luva foi corada indicando a formação de biofilme por toda a superfície. Os controles não inoculados continuaram na cor original.

4.11. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Com base nos resultados positivos obtidos nas curvas de crescimento e na coloração de Schiff, foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura nos fragmentos de borracha sintética e natural nos tempos de 4 dias, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 9 semanas e 11 semanas. Em cada tempo as imagens das amostras foram registradas nos aumentos de 450x e 5000x. Os detalhes citados no texto estão indicados com setas e círculos vermelhos em suas respectivas imagens.

No tratamento com borracha sintética, é possível observar que o controle negativo (borracha não inoculada) continua inalterado durante todo o período do experimento (Figuras 27A, 28A, 29A, 30A, 31A, 32A, 33A). Pequenas bolhas podem ser observadas na estrutura do material, mas acredita-se que sejam provenientes da evaporação do clorofórmio da solução de borracha durante o preparo dos fragmentos. Nos aumentos de 5000x (Figuras 34A, 35A, 36A, 37A, 38A, 39A e 40A) não foi possível observar nenhuma célula bacteriana aderida ao material, assim como não foi possível observar um aumento na densidade óptica nas curvas de crescimento (Figura 22A). Esses resultados demonstram que não há degradação da borracha nem mudança na estrutura do material durante os 80 dias no controle não inoculado.

Para o tratamento de borracha sintética com *G. paraffinivorans* MTZ041, é possível observar a presença de células nos primeiros 4 dias (Figura 27B). As células de *G. paraffinivorans* MTZ041 em forma de bacilos não estavam dentro do biofilme (Figura 34B), mas foi possível observar algumas células começando a aderir à borracha sintética. A maior parte das bactérias ainda estava suspensa no meio, o que pode explicar por que a densidade óptica das curvas é tão elevada nesse estágio (Figura 22A).

A partir da segunda semana, é possível observar uma diferença na textura da borracha sintética (Figura 28B), que foi confirmada pelo aumento de 5000x como crescimento bacteriano (Figura 35B). Nesse estágio, o biofilme começou a se desenvolver e algumas células se aderiram ao material. Ainda foi possível observar a morfologia e a divisão de algumas dessas células.

Com o desenvolvimento do biofilme na terceira semana, estruturas tridimensionais semelhantes a hexágonos começaram a se formar (Figura 29B) e microcolônias puderam ser observadas no material (Figura 36B). Na quarta semana

do experimento a estrutura do biofilme continuou a crescer (Figura 30B) – e no aumento de 5000x é possível observar que as células estão aderidas a borracha (Figura 37B).

Conforme a formação do biofilme evoluiu, as microcolônias se formaram e os microrganismos deixaram de ser planctônicos. As microcolônias produziram, o que acredita-se ser, matriz polissacarídica, a qual serviu como substrato para que outras células pudessem aderir ao material e formar o biofilme propriamente dito (Figura 38B). Na sexta semana o pedaço de alumínio recoberto com borracha foi quase totalmente tomado por biofilme bacteriano (Figura 31B), mas ainda foi possível observar algumas partes do material original, caracterizados pela textura lisa e alguns pontos de evaporação do clorofórmio. Nos aumentos de 5000x (Figura 33B), a matriz do biofilme foi observada como uma estrutura tridimensional e variável, com buracos e canais por onde o meio pode passar para garantir a sobrevivência das células.

As células aderidas ao biofilme continuaram se multiplicando e a ausência de células flutuando livres no meio explica porque a densidade óptica a partir de 20 dias (Figura 22A) teve uma redução, apesar do crescimento observado.

As imagens obtidas na nona semana de tratamento consolidam o padrão observado na sexta semana: o biofilme foi totalmente formado, mas ainda é possível observar algumas partes de borracha sintética (Figura 32B). Na Figura 39B observa-se que a morfologia das células mudou dentro do biofilme, se tornando mais arredondadas.

No último tempo de tratamento é possível observar que os fragmentos foram totalmente cobertos por biofilme, não sendo possível observar a borracha sintética (Figura 33B). No aumento de 5000x, todas as células bacterianas se encontram dentro do biofilme, não sendo observadas células planctônicas e sendo impossível distinguir células individuais (Figura 40B).

Figura 27. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 4 dias e aumento de 450x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *G. paraffinivorans* MTZ041.

Figura 28. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 2 semanas e aumento de 450x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *G. paraffinivorans* MTZ041.

Figura 29. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 3 semanas e aumento de 450x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *G. paraffinivorans* MTZ041.

Figura 30. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 4 semanas e aumento de 450x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *G. paraffinivorans* MTZ041.

Figura 31. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 6 semanas e aumento de 450x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *G. paraffinivorans* MTZ041.

Figura 32. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 9 semanas e aumento de 450x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *G. paraffinivorans* MTZ041.

Figura 33. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 11 semanas e aumento de 450x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *Gordonia paraffinivorans* MTZ041.

A **B**

Figura 34. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 4 dias e aumento de 5000x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *G. paraffinivorans* MTZ041.

Figura 35. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 2 semanas e aumento de 5000x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *G. paraffinivorans* MTZ041.

Figura 36. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 3 semanas e aumento de 5000x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *G. paraffinivorans* MTZ041.

Figura 37. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 4 semanas e aumento de 5000x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *G. paraffinivorans* MTZ041.

Figura 38. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 6 semanas e aumento de 5000x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *G. paraffinivorans* MTZ041.

Figura 39. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 9 semanas e aumento de 5000x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *G. paraffinivorans* MTZ041.

Figura 40. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha sintética em 11 semanas e aumento de 5000x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *G. paraffinivorans* MTZ041.

Flemming (1998) descreve a formação de biofilme tanto como uma estratégia bacteriana para sobrevivência em ambientes com poucos nutrientes assim como para utilização de um substrato sólido. Nesse experimento foi utilizado um meio mínimo de sais e a única fonte de carbono presente são os fragmentos de borracha sintética sólida.

Arenskötter, Bröker e Steinbüchel (2004) relataram que a produção de ácidos micólicos e biosurfactantes são essenciais para a formação de biofilmes, que permitem o contato direto das células bacterianas com a borracha sintética, possibilitando a degradação do material por espécies de *Gordonia*.

Xue et al. (2003), quando descreveu *Gordonia paraffinivorans*, identificou a bactéria como produtora de ácidos micólicos com comprimentos de 52 a 62 átomos de carbono. Com base nessa literatura, podemos inferir que o isolado MTZ041 também produz esses ácidos que são essenciais para formação de biofilme.

Kondo et al. (2000) descobriram durante o isolamento de *Gordonia* sp. Y-102 que o microrganismo era capaz de produzir um ácido polissacarídico chamado gordonan – que foi capaz de induzir agregação celular na linhagem de células de inseto no BM-N4. Os polissacarídeos são produzidos por diversas espécies de bactérias para formação de biofilme, sendo o composto orgânico mais presente nessas situações.

Linos et al. (2000) descreveram o comportamento de degradação de borracha sintética para *Gordonia polyisoprenivorans* VH2 e *Gordonia westfalica* Kb2 e relataram que após 4 dias houve colonização do material pelas duas espécies e, em uma semana, os fragmentos de borracha foram completamente cobertos por biofilme. Nas imagens obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura observou-se que as células foram incorporadas no biofilme e mescladas com a borracha sintética. Estes autores também reportaram que o biofilme continuou crescendo por mais 6 semanas; e 4 semanas após o início do experimento mais de 50% do composto havia sido degradado. Os autores concluíram que existe um mecanismo de utilização da borracha na membrana celular, já que o material sólido não pode ser transportado para o interior da célula antes de ser quebrado em moléculas menores.

Com base nos resultados do experimento e na literatura, pode-se afirmar que o microrganismo *Gordonia paraffinivorans* MTZ041 é capaz de colonizar borracha sintética e formar biofilme para que possa degradar o material.

Os fragmentos de luva de borracha natural incubados na presença ou ausência de *Gordonia paraffinivorans* MTZ041 foram analisados a partir da segunda semana de cultivo. Os controles não inoculados desses fragmentos (Figuras 41A, 42A, 43A, 44A e 45A) apresentaram textura mais áspera em relação aos controles de borracha sintética, mas mesmo com uma superfície mais irregular foi possível observar a diferença entre o controle negativo e o tratamento. Nos aumentos de 5000x, percebe-se que o material é formado por pequenas fissuras e borracha em pequenos grumos (Figuras 46A, 47A, 48A, 49A e 50A).

Na segunda semana de crescimento não foi possível observar grandes mudanças na estrutura da borracha natural no menor aumento (Figura 41B), porém no aumento de 5000x algumas células aderidas ao material podem ser observadas (Figura 46B).

Em quatro semanas de tratamento, alguns sulcos puderam ser notados (Figura 42B) e, quando analisados em maior aumento, é possível observar um aglomerado de bactérias formando biofilme no interior do material.

Em 6 semanas de crescimento foi possível observar (Figura 43B) pequenos buracos na superfície da luva de borracha que demonstraram ser colonizados por células bacterianas, levando a crer que são locais de degradação do composto (Figura 40B).

Os buracos na superfície da luva aumentaram gradativamente (Figura 44B), e em 9 semanas foi observada a formação de biofilme no interior desses espaços (Figura 49B). Algumas células de *Gordonia paraffinivorans* MTZ041 podem ser distinguidas da borracha, mas grande parte da cultura se encontra dentro da matriz de biofilme.

No último tempo examinado do cultivo, notou-se buracos nos fragmentos de luva relativamente mais profundos do que vistos anteriormente (Figura 45B). Na Figura 50B, com aumento de 5000x, foi possível ver algumas células aderidas ao material, mas como já havia sido descrito em tempos anteriores, a maioria das células estava dentro da matriz do biofilme.

Figura 41. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha natural em 2 semanas e aumento de 450x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *G. paraffinivorans* MTZ041.

Figura 42. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha natural em 4 semanas e aumento de 450x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *G. paraffinivorans* MTZ041.

Figura 43. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha natural em 6 semanas e aumento de 450x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *G. paraffinivorans* MTZ041.

Figura 44. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha natural em 9 semanas e aumento de 450x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *G. paraffinivorans* MTZ041.

Figura 45. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha natural em 11 semanas e aumento de 450x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *G. paraffinivorans* MTZ041.

Figura 46. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha natural em 2 semanas e aumento de 5000x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *G. paraffinivorans* MTZ041.

Figura 47. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha natural em 4 semanas e aumento de 5000x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *G. paraffinivorans* MTZ041.

Figura 48. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha natural em 6 semanas e aumento de 5000x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *G. paraffinivorans* MTZ041.

Figura 49. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha natural em 9 semanas e aumento de 5000x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *G. paraffinivorans* MTZ041.

Figura 50. Microscopia eletrônica dos fragmentos de borracha natural em 11 semanas e aumento de 450x. (A) Controle negativo não inoculado; (B) Tratamento com *G. paraffinivorans* MTZ041.

Tsuchii, Suzuki e Takeda (1985) estudaram a degradação de diversos produtos derivados de borracha natural por *Norcardia* sp. 835A e seus resultados indicaram que houve perda de peso desses produtos entre 50 a 95% após um período de 8 semanas de cultivo. O crescimento nas luvas de borracha começou entre 3 e 6 dias, e, em 14 dias, 75% de borracha havia sido degradada. Em 17 dias, o material perdeu mais de 90% do seu peso inicial. Os autores concluíram que a colonização ocorreu na superfície da luva e que o micélio do organismo estava firmemente ligado à borracha durante o crescimento.

Linós et al. (2000) realizaram experimentos com fragmentos de luva de borracha para *Gordonia polyisoprenivorans* VH2 e *Gordonia westfalica* Kb2 e relataram que em duas semanas era possível observar crescimento bacteriano e degradação do material, porém a formação de biofilme só foi relatada a partir da sexta semana. Os autores concluíram que essas espécies de *Gordonia* são capazes de degradar as luvas de borracha natural, que são compostos complexos, pois passam pelo processo de vulcanização. O mecanismo proposto pelos autores, por meio de experimento com espectroscopia de infravermelho, envolve a quebra das duplas ligações de *cis*-1,4-poliisopreno por ataque do oxigênio, formando um grupo cetona e um grupo aldeído de cada lado da molécula.

Com base na literatura e nos resultados obtidos no experimento, podemos concluir que *Gordonia paraffinivorans* MTZ041 é capaz de crescer e formar biofilme na superfície de luvas de borracha natural e, apesar de não serem realizados experimentos de quantificação da degradação, as Figuras 37B, 38B e 39B demonstram claramente que houve perda de material ao longo de 11 semanas.

4.12. EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE LCP ENVOLVIDO NA DEGRADAÇÃO DE BORRACHA

Uma vez que a análise da sequência genômica de *G. paraffinivorans* MTZ041 demonstrou que esse isolado possui o gene *Lcp*, descrito como responsável pela assimilação de borracha como fonte de carbono (HIESSL et al., 2012; IBRAHIM et al., 2006; LINOS et al., 2000; ROSE; STEINBÜCHEL, 2005), e os resultados obtidos nas curvas de crescimento assim como microscopia eletrônica de varredura confirmaram a capacidade desse microrganismo em crescer na presença de borracha, foi realizada a quantificação da expressão gênica do *Lcp*.

Para o tratamento com borracha sintética e indução de 2 horas, a expressão em relação ao controle positivo de frutose foi de 0,9 vezes (Figura 51). O tratamento com borracha natural em 2 horas também apresentou leve diminuição, sendo 0,76 vezes o valor da frutose. Para o tratamento de borracha sintética com 24 horas de indução, a expressão foi 1,14 vezes maior e para o tratamento de borracha natural, com 24 horas, foi de 0,76 vezes. Esses valores, quando comparados ao tratamento de referência (frutose) não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

Para comprovar que os fragmentos amplificados na reação de qPCR correspondiam a expressão gênica, as amplificações foram analisadas em gel de agarose, onde os fragmentos dos genes testados apresentaram o tamanho esperado e não foi observada a formação de dímeros e nem de bandas inespecíficas.

Figura 51. Expressão do gene Lcp. A condição de referência foi a frutose como fonte única de carbono. O gene normalizador foi o que codifica a subunidade menor do ribossomo (16S). Os dados representam a média de 4 réplicas biológicas feitas em triplicata técnica. O valor de p foi maior que (0,1).

As curvas de crescimento em borracha sintética revelaram que *G. paraffinivorans* MTZ041 apresenta crescimento exponencial nas primeiras 24 horas, e nesse ponto a densidade óptica chega a 1,0. Isso é sugestivo de que este microrganismo utiliza borracha como fonte de carbono nesse estágio e, conseqüentemente, a proteína Lcp, que permite essa habilidade, deve ser expressa. A comparação dos níveis de expressão entre os tratamentos com borracha e frutose

(24 horas) indica que o gene *Lcp* não sofre indução na presença do substrato, sugerindo que o mesmo tem expressão constitutiva em *G. paraffinivorans* MTZ041.

Ibelli et al. (2009) descreve genes constitutivos como genes que apresentam expressão constante, independentemente do tecido ou tratamento utilizado. Esse perfil pode ser observado a partir dos tratamentos de borracha sintética e borracha natural nos diferentes tempos testados para *G. paraffinivorans* MTZ041.

Linh et al. (2017) estudaram a expressão do gene *Lcp* em *Nocardia* sp. NVL3 na presença de borracha sintética e relataram um aumento de 1596 vezes na expressão quando comparado ao controle sem borracha.

Yikmis et al. (2008) relataram aumento na transcrição do gene *Lcp* para *Streptomyces* sp. K30 na presença de *cis*-1,4-poliisopreno quando comparado ao controle com glicose, em que pode ser observada uma banda nítida no gel de agarose, referente ao gene *Lcp* no tratamento com borracha e apenas uma leve banda é observada no tratamento com glicose. Porém, os autores não apresentaram dados de quantificação. Bröker et al. (2008) também relataram aumento qualitativo na expressão do gene *Lcp* para *G. polyisoprenivorans* VH2 na presença de *cis*-1,4-poliisopreno quando comparado ao controle com acetato de sódio por meio de gel de agarose. Até o momento, a expressão do gene *Lcp* em espécies de *Gordonia* não havia sido quantificada. Ainda, em todos os outros casos em que a quantificação do *Lcp* foi reportada, a condição de referência foi distinta daquela utilizada neste trabalho o que pode ter contribuído para as diferenças observadas.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados é possível concluir que *Gordonia sihwensis* MTZ096 acumula mais biomassa e consome mais hexadecano do que *Gordonia paraffinivorans* MTZ041, provavelmente devido a presença de dois sistemas de assimilação de alcanos, CYP 153 e AH, os quais são induzidos pela presença do substrato. *Gordonia paraffinivorans* pode ser considerada uma espécie degradadora de borracha, uma vez que tem o gene Lcp, cresce na presença de borracha sintética e natural como fontes únicas de carbono formando biofilme na superfície dos substratos. Curiosamente o gene Lcp parece ser constitutivo para esta espécie. Os isolados estudados neste trabalho, *G. paraffinivorans* MTZ041 e MTZ052 e *G. sihwensis* MTZ096, são ótimas ferramentas de aplicação biotecnológica.

REFERÊNCIAS

- ALVES, Luís et al. Desulfurization of dibenzothiophene, benzothiophene, and other thiophene analogs by a newly isolated bacterium, *Gordonia alkanivorans* strain 1B. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, Lisboa, v. 120, n. 3, p. 199–208, 2005.
- ALVES, Luís; PAIXÃO, Susana M. Fructophilic behaviour of *Gordonia alkanivorans* strain 1B during dibenzothiophene desulfurization process. **New Biotechnology**, Lisboa, v. 31, n. 1, p. 73–79, 2014.
- ANDALIBI, Fatemeh; FATAHI-BAFGHI, Mehdi. *Gordonia*: isolation and identification in clinical samples and role in biotechnology. **Folia Microbiologica**, Teerã, v. 62, n. 3, p. 245–252, 2017.
- ANDRADE, Juliano de Almeida; AUGUSTO, Fabio; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética Química**, Campinas, v. 35, n. 3, p. 17–43, 2010.
- ANTUNES, Luciana Principal. **Metagenômica e metatranscriptômica da microbiota da compostagem do Parque Zoológico de São Paulo**. 2016. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- ARENSKÖTTER, Matthias; BRÖKER, Daniel; STEINBÜCHEL, Alexander. Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*. **Applied and Environmental Microbiology**, Münster, v. 70, n. 6, p. 3195–3204, 2004.
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PNEUMÁTICOS. **Relatório de produção e vendas 2016**. [s.l: s.n.].
- BANH, Quyen; ARENSKÖTTER, Matthias; STEINBÜCHEL, Alexander. Establishment of Tn5096-based transposon mutagenesis in *Gordonia polyisoprenivorans*. **Applied and Environmental Microbiology**, Münster, v. 71, n. 9, p. 5077–5084, 2005.
- BARRON, Mace G. Ecological Impacts of the Deepwater Horizon Oil Spill: Implications for Immunotoxicity. **Toxicologic Pathology**, Gulf Breeze, v. 40, n. 2, p. 315–320, 2012.
- BENDINGER, B. et al. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. **Applied and Environmental Microbiology**, Wageningen, v. 59, n. 11, p. 3973–3977, 1993.
- BEREKAA, Mahmoud M. et al. Effect of pretreatment of rubber material on its biodegradability by various rubber degrading bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Münster, v. 184, n. 2, p. 199–206, 2000.
- BIRKE, Jakob; RÖTHER, Wolf; JENDROSSEK, Dieter. RoxB is a novel type of rubber oxygenase that combines properties of rubber oxygenase RoxA and latex clearing protein (Lcp). **Applied and Environmental Microbiology**, Stuttgart, v. 83, n. 14, p. 1–13, 2017.

BITENCOURT, Ana Luisa V et al. Core sampling test in large-scale compost cells for microorganism isolation. **Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 4, n. 15, p. 1631–1634, 2010.

BOOPATHY, R. Formation of aniline as a transient metabolite during the metabolism of tetryl by a sulfate-reducing bacterial consortium. **Current Microbiology**, Thibodaux, v. 40, n. 3, p. 190–193, 2000.

BRASIL. **Petróleo e derivados constituem base da economia produtiva mundial**. 2014. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/infraestrutura/2011/11/petroleo-e-derivados-constituem-base-da-economia-mundial>>. Acesso em: 5 fev. 2018.

BRASIL. **Produção de derivados de petróleo e processamento de gás natural**. 2016. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/producao-de-derivados-de-petroleo-e-processamento-de-gas-natural>>. Acesso em: 5 fev. 2018.

BRITISH PETROLEUM. BP Statistical Review of World Energy 2017. **British Petroleum**, [s. l.], n. 66, p. 1–52, 2017.

BRÖKER, Daniel et al. The genomes of the non-clearing-zone-forming and natural-rubber-degrading species *Gordonia polyisoprenivorans* and *Gordonia westfalica* harbor genes expressing Lcp activity in *Streptomyces* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Münster, v. 74, n. 8, p. 2288–2297, 2008.

CARVALHO, Daiane M. et al. Reference genes for RT-qPCR studies in *Corynebacterium pseudotuberculosis* identified through analysis of RNA-seq data. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, Salvador, v. 106, n. 4, p. 605–614, 2014.

CHÉNIER, Martin R. et al. Impact of seasonal variations and nutrient inputs on nitrogen cycling and degradation of hexadecane by replicated river biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, Saskatoon, v. 69, n. 9, p. 5170–5177, 2003.

COLLINS, Lisa D.; DAUGULIS, Andrew J. Simultaneous biodegradation of benzene, toluene, and p-xylene a two-phase partitioning bioreactor: Concept demonstration and practical application. **Biotechnology Progress**, Ontario, v. 15, n. 1, p. 74–80, 1999.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. Resolução No 416, de 30 de Setembro de 2009. 2009, p. 1–20.

COSTA, Samantha Pinheiro da. **Biodegradabilidade de n-hexadecano por bactérias livres e imobilizadas em quitosana**. 2006. Recife, 2006.

COSTA, Reginaldo Brito da et al. Melhoramento e conservação genética aplicados ao Desenvolvimento Local – o caso da seringueira (*Hevea* sp). **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, Campinas, v. 1, p. 51–58, 2001.

DA SILVA, Carlos Juliano; PASQUINI, Celio. Comparing near-infrared conventional diffuse reflectance spectroscopy and hyperspectral imaging for determination of the

bulk properties of solid samples by multivariate regression: determination of Mooney viscosity and plasticity indices of natural rubber. **The Analyst**, Campinas, v. 140, n. 2, p. 512–522, 2015.

DESAI, J. D.; BANAT, Ibrahim M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, Al-Ain, v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997.

DUTRA, Elisangela S.; PASCON, Renata C.; VALLIM, Marcelo A. So Paulo Zoo composting as a source of bacteria with bioremediation potential. **African Journal of Microbiology Research**, Diadema, v. 7, n. 45, p. 5200–5206, 2013.

EGGINK, G. et al. Controlled and functional expression of the *Pseudomonas oleovorans* alkane utilizing system in *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, Groningen, v. 262, n. 36, p. 17712–17718, 1987.

EL HANAFY, Amr Abd El Mooti et al. Isolation and identification of bacterial consortia responsible for degrading oil spills from the coastal area of Yanbu, Saudi Arabia. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, Jeddah, v. 30, n. 1, p. 69–74, 2016.

EL MAHDI, Abdullah Mohammed; AZIZ, Hamidi Abdul. Hydrocarbon Biodegradation Using Agro-Industrial Wastes as Co-Substrates. In: **Handbook of Research on Inventive Bioremediation Techniques**. Hershey, 2017.

EVANS, Joyce J. Rubber tire leachates in the aquatic environment. In: **Reviews of environmental contamination and toxicology**. Springer, New York, NY, 1997. p. 67–115.

FLEMMING, Hans-Curt. Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials*. **Polymer Degradation and Stability**, Mülheim, v. 59, n. 1–3, p. 309–315, 1998.

FLORENCIO, Antônio. **Borracha Vulcanizada**. 2014. Disponível em: <<http://www.ensinandoeaprendendo.com.br/quimica/borracha-vulcanizada-polimero>>. Acesso em: 12 jan. 2018

FUJII, Tadashi et al. Biotransformation of various alkanes using the *Escherichia coli* expressing an alkane hydroxylase system from *Gordonia* sp. TF6. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, Iwata, v. 68, n. 10, p. 2171–7, 2004.

FUJII, Tadashi et al. Production of α,ω -Alkanediols Using *Escherichia coli* Expressing a Cytochrome P450 from *Acinetobacter* sp. OC4. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Iwata, v. 70, n. 6, p. 1379–1385, 2006.

GALP. **O processo de refinação**. 2015. Disponível em: <<http://www.galpenenergia.com/PT/agalpenenergia/os-nossos-negocios/Refinacao-Distribuicao/ARL/Refinacao/Paginas/Didatico-Refinacao.aspx>>. Acesso em: 28 jan. 2018.

GUARINO, C.; SPADA, V.; SCIARRILLO, R. Assessment of three approaches of bioremediation (Natural Attenuation, Landfarming and Bioaugmentation – Assisted Landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. **Chemosphere**, Benevento, v. 170, p. 10–16, 2017.

GUO, C. L. et al. Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. **Marine Pollution Bulletin**, Kowloon, v. 51, n. 8–12, p. 1054–1061, 2005.

HANSON, K. G.; DESAI, Jitendra D.; DESAI, Anjana J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, Baroda, v. 7, n. 10, p. 745–748, 1993.

HEAD, Ian M.; JONES, D. Martin; RÖLING, Wilfred F. M. Marine microorganisms make a meal of oil. **Nature reviews. Microbiology**, Newcastle, v. 4, n. 3, p. 173–182, 2006.

HIESSL, Sebastian et al. Involvement of two latex-clearing proteins during rubber degradation and insights into the subsequent degradation pathway revealed by the genome sequence of *Gordonia polyisoprenivorans* strain VH2. **Applied and Environmental Microbiology**, Münster, v. 78, n. 8, p. 2874–2887, 2012.

HUESEMANN, Michael H.; HAUSMANN, Tom S.; FORTMAN, Tim J. Does bioavailability limit biodegradation? A comparison of hydrocarbon biodegradation and desorption rates in aged soils. **Biodegradation**, Sequim, v. 15, n. 4, p. 261–274, 2004.

IBELLI, A. M. G. et al. Seleção de genes constitutivos para estudos de expressão gênica em linfonodo de bovinos infestados com carrapato *Rhipicephalus* (B.) microplus. São Carlos, p. 9, 2009.

IBRAHIM, Ebaid M. A. et al. Identification of poly(cis-1,4-isoprene) degradation intermediates during growth of moderately thermophilic actinomycetes on rubber and cloning of a functional lcp homologue from *Nocardia farcinica* strain E1. **Applied and Environmental Microbiology**, Münster, v. 72, n. 5, p. 3375–3382, 2006.

INDEST, Karl J.; CROCKER, Fiona H.; ATHOW, Rebecca. A TaqMan polymerase chain reaction method for monitoring RDX-degrading bacteria based on the xplA functional gene. **Journal of Microbiological Methods**, Huntsville, v. 68, n. 2, p. 267–274, 2007.

JACQUES, Rodrigo Josemar Seminoti et al. **Biorremediação de antraceno, fenantreno e pireno em um argissolo**. Porto Alegre, 2005

JACQUES, Rodrigo Josemar Seminoti et al. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, Porto Alegre, v. 37, n. 4, p. 1192–1201, 2007.

JAYAKRISHNAN, A.; K., Kalaiaarasi; SHAH, D. O. Microemulsions: Evolving technology for cosmetic applications. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, Gainesville, v. 34, n. 7, p. 335–350, 1983.

JENDROSSEK, Dieter; TOMASI, Gianpaolo; KROPPESTEDT, Reiner M. Bacterial degradation of natural rubber: A privilege of actinomycetes? **FEMS Microbiology Letters**, Braunschweig, v. 150, n. 2, p. 179–188, 1997.

Jl, Yurui et al. Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. **Frontiers in Microbiology**, Tianjin, v. 4, n. March, p. 1–13, 2013.

JOHNSEN, Anders R.; WICK, Lukas Y.; HARMS, Hauke. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, Lausanne, v. 133, n. 1, p. 71–84, 2005.

KIM, Kwang Kyu et al. *Gordonia sihwensis* sp. nov., a novel nitrate-reducing bacterium isolated from a wastewater-treatment bioreactor. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Taejeon, v. 53, n. 5, p. 1427–1433, 2003.

KONDO, T. et al. Gordonan, an acidic polysaccharide with cell aggregation-inducing activity in insect BM-N4 cells, produced by *Gordonia* sp. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, Bunkyo-ku, v. 64, n. 11, p. 2388–94, 2000.

KUBOTA, Kenzo et al. Phylogenetic analysis of long-chain hydrocarbon-degrading bacteria and evaluation of their hydrocarbon-degradation by the 2,6-DCPIP assay. **Biodegradation**, Kusatsu, v. 19, n. 5, p. 749–757, 2008.

LINH, Dao Viet et al. Characterization and functional expression of a rubber degradation gene of a *Nocardia* degrader from a rubber-processing factory. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Hanoi, v. 123, n. 4, p. 412–418, 2017.

LINOS, Alexandros et al. *Gordonia polyisoprenivorans* sp. nov., a rubber-degrading actinomycete isolated from an automobile tyre. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Münster, v. 49, n. 4, p. 1785–1791, 1999.

LINOS, Alexandros et al. Biodegradation of cis-1,4-Polyisoprene Rubbers by Distinct Actinomycetes : Microbial Strategies and Detailed Surface Analysis. **Applied and environmental microbiology**, Münster, v. 66, n. 4, p. 1639, 2000.

LINOS, Alexandros et al. *Gordonia westfalica* sp. nov., a novel rubber-degrading actinomycete. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Münster, n. 2002, p. 1133–1139, 2002.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, Pullman, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LO PICCOLO, Luca et al. Involvement of an Alkane Hydroxylase System of *Gordonia* sp. Strain SoCg in Degradation of Solid n -Alkanes. **Applied and Environmental Microbiology**, Palermo, v. 77, n. 4, p. 1204–1213, 2011.

MAIER, Thomas et al. Molecular characterization of the 56-kDa CYP153 from *Acinetobacter* sp. EB104. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Leipzig, v. 286, n. 3, p. 652–658, 2001.

MALAKOFF, David. BP criminal case generates record payout for science and restoration. **Science**, [s. l.], v. 338, n. 6111, p. 1137, 2012.

MAPELLI, Francesca et al. Biotechnologies for Marine Oil Spill Cleanup: Indissoluble Ties with Microorganisms. **Trends in Biotechnology**, Milan, v. 35, n. 9, p. 860–870, 2017.

MARTINS, Layla Farage et al. Metagenomic Analysis of a Tropical Composting Operation at the São Paulo Zoo Park Reveals Diversity of Biomass Degradation Functions and Organisms. **PLoS ONE**, São Paulo, v. 8, n. 4, 2013.

MARTINS, Silas Sarkiz da Silva et al. Produção De Petróleo E Impactos Ambientais: Algumas Considerações. **Holos**, [s. l.], v. 6, p. 54, 2015.

MASHAAN, Nuha Salim et al. A Review on Using Crumb Rubber in Reinforcement of Asphalt Pavement. **The Scientific World Journal**, Kuala Lumpur, v. 2014, n. i, p. 1–21, 2014.

MELLO, Ivana L. et al. Polimerização 1,4-cis de butadieno com sistemas catalíticos Ziegler-Natta à base de neodímio. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 2, p. 277–286, 2004.

MIKOLASCH, Annett et al. Enrichment of aliphatic, alicyclic and aromatic acids by oil-degrading bacteria isolated from the rhizosphere of plants growing in oil-contaminated soil from Kazakhstan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Greifswald, v. 99, n. 9, p. 4071–4084, 2015.

MORGAN, P.; WATKINSON, R. J. Microbiological methods for the cleanup of soil and ground water contaminated with halogenated organic compounds. **FEMS Microbiol. Rev.**, Sittingbourne, v. 63, p. 277–300, 1989.

MROZIK, Agnieszka; PIOTROWSKA-SEGET, Zofia. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. **Microbiological Research**, Katowice, v. 165, n. 5, p. 363–375, 2010.

MULLIGAN, Catherine N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, Montreal, v. 133, n. 2, p. 183–198, 2005.

NANTHINI, Jayaram; ONG, Su Yean; SUDESH, Kumar. Identification of three homologous latex-clearing protein (lcp) genes from the genome of *Streptomyces* sp. strain CFMR 7. **Gene**, Penang, v. 628, p. 146–155, 2017.

NZILA, Alexis; RAZZAK, Shaikh Abdur; ZHU, Jesse. Bioaugmentation: An emerging strategy of industrial wastewater treatment for reuse and discharge. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Dhahran, v. 13, n. 9, 2016.

OLIVEIRA, Aline Márcia Silva Araújo. **Isolamento de microrganismos de compostagem degradadores de hidrocarboneto e substâncias xenobióticas**. 2015. Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2015.

PAGANINI, Thaís. **Isolamento de microrganismos celulolíticos de compostagem pelo método de enriquecimento**. 2015. Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2015.

PASCON, Renata C. et al. Amylolytic Microorganism from São Paulo Zoo Composting: Isolation, Identification, and Amylase Production. **Enzyme Research**, São Paulo, v. 2011, p. 1–8, 2011.

PEREIRA, Drielle Seabra; GOMES, Rosana Canuto; SEMÊDO, Luzia Teixeira a. S. Potencial das Actinobactérias na Biodegradação de Hidrocarbonetos. **Revista Eletrônica TECEN**, Vassouras, v. 5, n. 2, p. 71–95, 2012.

PETROBRAS. **Conheça os derivados do petróleo que fazem parte do cotidiano**. 2014. Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br/fatos-e-dados/conheca-os-derivados-do-petroleo-que-fazem-parte-do-cotidiano.htm>>. Acesso em: 5 fev. 2018.

PINTO, José Carlos et al. **Impactos ambientais causados pelos plásticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: E-papers, 2012.

PROCÓPIO, Luciano et al. Transcriptional profiling of genes involved in n-hexadecane compounds assimilation in the hydrocarbon degrading Dietzia cinnamea P4 strain. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 2, p. 633–641, 2013.

PROVIDENTI, Miguel A.; LEE, Hung; TREVORS, Jack T. Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. **Journal of Industrial Microbiology**, Ontario, v. 12, n. 6, p. 379–395, 1993.

QUATRINI, P. et al. Isolation of Gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline. **Journal of Applied Microbiology**, Palermo, v. 104, n. 1, p. 251–259, 2008.

RIPPEL, Marcia Maria. Borracha natural e nanocompósitos com argila. **Química Nova**, Campinas, v. 32, n. 3, p. 818–826, 2009.

RODRIGUES JORGE, Mara Regina Pagliuso; FERREIRA, Osny Pellegrino; CLARETO NETO, S. Aproveitamento de borracha de pneus inservíveis na produção de componentes para construção. In: **Congresso Brasileiro de Ciência e tecnologia em resíduos e Desenvolvimento Sustentável**. 2004.

ROJO, Fernando. Degradation of alkanes by bacteria: Minireview. **Environmental Microbiology**, Madrid, v. 11, n. 10, p. 2477–2490, 2009.

ROSE, Karsten; STEINBÜCHEL, Alexander. Biodegradation of natural rubber and related compounds: Recent insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Münster, v. 71, n. 6, p. 2803–2812, 2005.

ROSE, Karsten; TENBERGE, Klaus B.; STEINBÜCHEL, Alexander. Identification and characterization of genes from *Streptomyces* sp. strain K30 responsible for clear zone formation on natural rubber latex and poly(cis-1,4-isoprene) rubber degradation. **Biomacromolecules**, Münster, v. 6, n. 1, p. 180–188, 2005.

ROY, Ram Vinod et al. Comparative studies on rubber biodegradation through solid-state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, Kharagpur, v. 41, n. 1, p. 181–186, 2006.

SCHNEIKER, Susanne et al. Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. **Nature Biotechnology**, Bielefeld, v. 24, n. 8, p. 997–1004, 2006.

SMITS, Theo H. M. et al. Functional Analysis of Alkane Hydroxylases from Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria Functional Analysis of Alkane Hydroxylases from Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. **Journal of bacteriology**, Zurique, v. 184, n. 6, p. 1733–1742, 2002.

SPEIGHT, James G. **The Chemistry and Technology of Petroleum**. 5. ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2014.

SPIES, R. B.; MUKHTASOR, M.; BURNS, K. A. The Montara Oil Spill: A 2009 Well Blowout in the Timor Sea. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, Little River, v. 73, n. 1, p. 55–62, 2017.

STEVENSON, Keri; STALLWOOD, Bethan; HART, Adam G. Tire rubber recycling and bioremediation: A review. **Bioremediation Journal**, Bath, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2008.

SUMMERHAYES, Colin. Deep Water – The Gulf Oil Disaster and the Future of Offshore Drilling. **Underwater Technology**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 113–115, 2011.

SUN, Ximei; ISAYEV, Avraam I. Ultrasound devulcanization: Comparison of synthetic isoprene and natural rubbers. **Journal of Materials Science**, Akron, v. 42, n. 17, p. 7520–7529, 2007.

SZKLO, Alexandre Salem; ULLER, Victor Cohen; BONFÁ, Marcio Henrique P. **Fundamentos do Refino de Petróleo**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2012.

TRAMA, Bianca et al. The evaluation of bioremediation potential of a yeast collection isolated from composting. **Advance in Microbiology**, Diadema, v. 4, n. September, p. 796–807, 2014.

TRINDADE, P. V. O. et al. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: A comparison study. **Chemosphere**, Rio de Janeiro, v. 58, n. 4, p. 515–522, 2005.

TSUCHII, A.; SUZUKI, T.; TAKEDA, K. Microbial degradation of natural rubber vulcanizates. **Applied and Environmental Microbiology**, Tsukuba, v. 50, n. 4, p. 965–970, 1985.

TSUKAMURA, M. Proposal of a new genus, *Gordona*, for slightly acid-fast organisms occurring in sputa of patients with pulmonary disease and in soil. **Journal of General Microbiology**, Obu, v. 68, n. 1, p. 15–26, 1971.

VAN BEILEN, J. B. et al. Analysis of *Pseudomonas putida* alkane degradation gene clusters and flanking insertion sequences: Evolution and regulation of the alk-genes. **Microbiology (United Kingdom)**, Honggerberg, v. 147, n. 2001, p. 1621–1630, 2001.

VARJANI, Sunita J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, Gandhinagar, v. 223, n. October, p. 277–286, 2017.

VIEGAS, Thales. **O balanço do vazamento de petróleo no Golfo do México**. 2010. Disponível em: <<https://infopetro.wordpress.com/2010/08/23/a-bp-e-as-alternativas-do-desastre-a-esperanca/>>. Acesso em: 2 fev. 2018.

WANG, Zhaowei et al. Synthesis of cis-1,4-polyisoprene with Al-Ti catalysts modified by different electron donor reagent. **Journal of Applied Polymer Science**, Guangzhou, v. 134, n. 1, p. 2–6, 2017.

XUE, Yanfen et al. *Gordonia paraffinivorans* sp. nov., a hydrocarbon-degrading actinomycete isolated from an oil-producing well. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Tianjin, v. 53, n. 5, p. 1643–1646, 2003.

YIKMIS, Meral et al. Secretion and transcriptional regulation of the latex-clearing protein, Lcp, by the rubber-degrading bacterium *Streptomyces* sp. strain K30. **Applied and Environmental Microbiology**, Münster, v. 74, n. 17, p. 5373–5382, 2008.

YIKMIS, Meral; STEINBÜCHEL, Alexander. Historical and recent achievements in the field of microbial degradation of natural and synthetic rubber. **Applied and Environmental Microbiology**, Münster, v. 78, n. 13, p. 4543–4551, 2012.

ZHENG, Jun et al. Characterization of bacterial composition and diversity in a long-term petroleum contaminated soil and isolation of high-efficiency alkane-degrading strains using an improved medium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Shanghai, v. 34, n. 2, p. 34, 2018.

ANEXO IAnálise de significância dos tratamentos da curva de crescimento para *G. sihwensis* MTZ096

Tratamentos	24 horas	48 horas	72 horas	120 horas	168 horas
BH vs. Frutose 2%	*	****	****	****	****
BH vs. Hexadecano 1%		****	****	****	****
BH vs. Decano 1%		***	****	**	****
BH vs. Pentadecano 1%		****	****	****	****
BH vs. Eicosano 0,1%		**	*	**	*
Frutose 2% vs. Hexadecano 1%					*
Frutose 2% vs. Decano 1%		****	**	****	*
Frutose 2% vs. Pentadecano 1%					
Frutose 2% vs. Eicosano 0,1%		****	****	****	****
Hexadecano 1% vs. Decano 1%				****	****
Hexadecano 1% vs. Pentadecano 1%					****
Hexadecano 1% vs. Eicosano 0,1%		**	****	****	****
Decano 1% vs. Pentadecano 1%			**	****	
Decano 1% vs. Eicosano 0,1%					
Pentadecano 1% vs. Eicosano 0,1%		**	****	****	*

(* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001)

APÊNDICES**CARTA DE APROVAÇÃO DA FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO**

Ofício nº 34/2016/FPZSP

Governo do Estado de São Paulo
Secretaria do Meio Ambiente

São Paulo, 24 de fevereiro de 2016.

Senhora Pesquisadora,

Informamos Vossa Senhoria que o Projeto de Pesquisa intitulado **“Avaliação do Potencial de Transformação de Compostos Tóxicos por Isolados de *Gordonia paraffinivirans* e *Gordonia sihwensis* provenientes de Compostagem.”**, a ser desenvolvido nesta Fundação, foi analisado e aprovado pelas instâncias técnico-científicas da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, sob o registro de Projeto nº 375.

Aproveitamos a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de elevada estima e distinta consideração.

Prof. Dr. João Batista da Cruz
Diretor Técnico Científico

À Senhora
Profa. Dra. **RENATA CASTIGLIONI PASCON**
UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

c/c: Executora do Projeto: Aluna de Bacharelado **Stefania Pegorin Braga (USP)**
Departamento de Pesquisas Aplicadas - FPZSP
Setor de Gestão Ambiental - FPZSP

FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO
Av. Miguel Stéfano, 4241 – CEP: 04301-905 – Caixa Postal 12.918 – CEP: 04010-970
Tel.: (0xx11) 5073-0811 – Fax.: (0xx11) 5058-0564 – 5073-7238
São Paulo – SP – Brasil
<http://www.zoologico.sp.gov.br>

CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

São Paulo, 26 de janeiro de 2016
CEP N 3641141215

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Stefania Pegorin Braga
Depto/Disc: Departamento De Ciências Biológicas
Renata C. Pascon (orientador)

Título do projeto: "Avaliação do potencial de transformação de compostos tóxicos por isolados de *Gordonia paraffinivorans* e *Gordonia sihwensis* provenientes de compostagem".

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa UNIFESP/HSP

A biorremediação é uma metodologia eficiente na recuperação de ambientes poluídos. Ela age empregando microrganismos capazes de degradar compostos tóxicos transformando-os em outras substâncias. Dentre os microrganismos que são utilizados na biorremediação o gênero *Gordonia* tem se destacado bastante devido a sua grande versatilidade metabólica, o que permite a utilização de substratos complexos e tóxicos como em fonte energética, eliminando-os do meio ambiente. O sequenciamento e a análise dos genomas de dois isolados de *G. paraffinivorans* (MTZ 041 e 052) e de um isolado *G. sihwensis* (MTZ 096), provenientes da compostagem, demonstrou que estes microrganismos possuem os fatores genéticos que conferem a habilidade de degradar hidrocarbonetos, látex sintético e borracha natural. Este trabalho de mestrado propõe expressar o sistema alceno hidroxilase (AH) de *G. sihwensis* MTZ096 em *E. coli*, o qual é conhecido por conferir a capacidade de assimilação dos hidrocarbonetos em outros Actinomicetos. Além disso, faz parte dos objetivos deste trabalho explorar o potencial biodegradador de borracha natural e latex sintético dos isolados de *G. paraffinivorans*.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 23/12/2015, **ANALISOU e APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** ao CEP até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Miguel Roberto Jorge

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo