

LOUISE HASE GRACIOSO

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

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Elen Aquino Perpetuo

Versão original

São Paulo
2012

RESUMO

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

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

Palavra chave: Fenol. Biodegradação. Proteômica.

ABSTRACT

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

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

Keywords: Phenol. Biodegradation. Proteomic.

1 INTRODUÇÃO

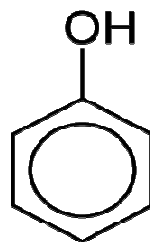
Os compostos aromáticos podem ser definidos como moléculas contendo um ou mais anéis aromáticos, e são considerados um dos mais presentes e persistentes poluentes distribuídos no meio ambiente. Entre eles, os compostos fenólicos são considerados os mais importantes, pois são provenientes de vários segmentos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

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

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

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

Figura 1 - Estrutura química do fenol



1.1 Efluentes fenólicos

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

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

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

1.2 Isolamento e identificação dos micro-organismos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3 Biodegradação do fenol

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

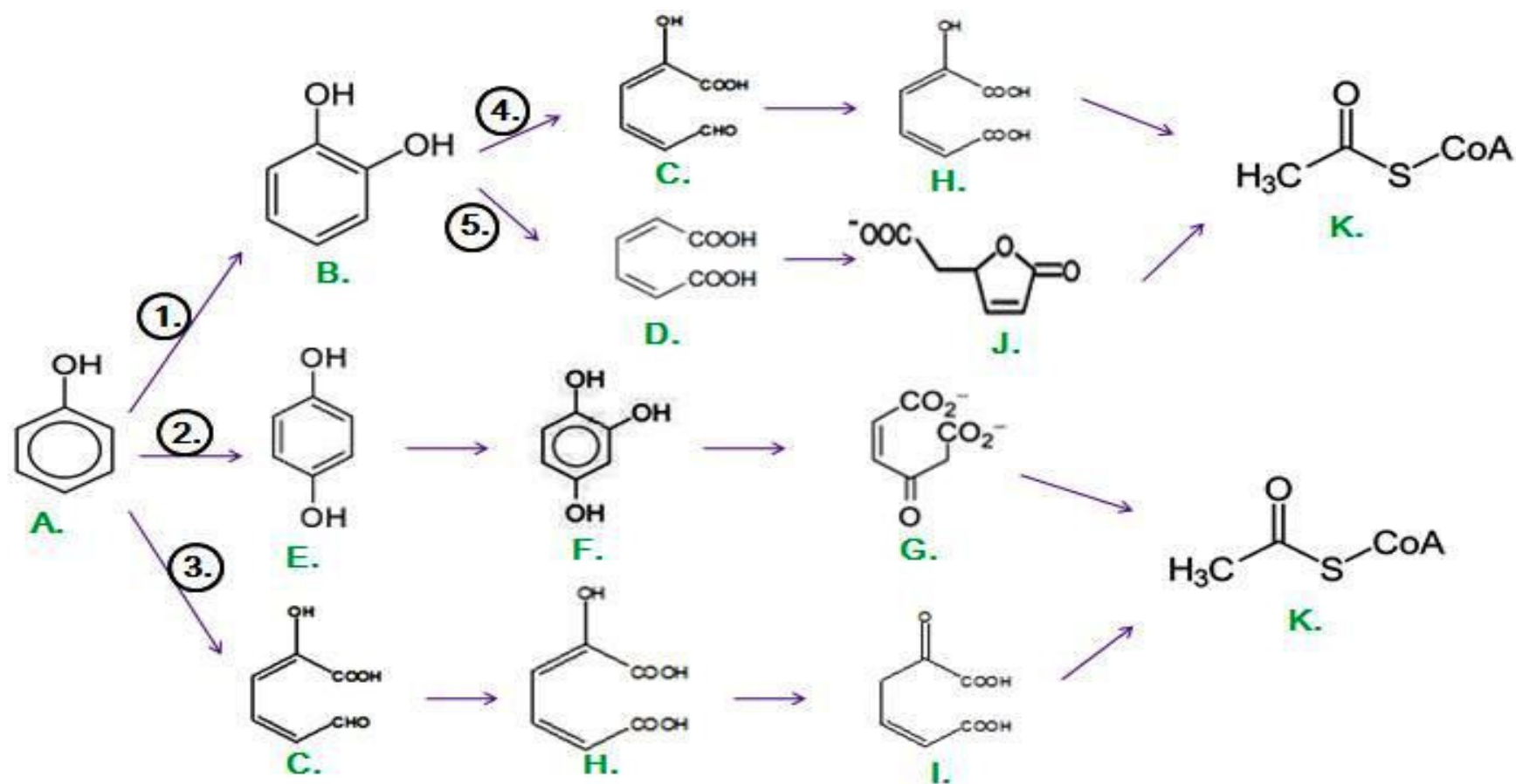
Apesar da via mais conhecida de biodegradação de fenol, ser através da sua conversão em catecol, um estudo enzimático realizado por Jones et al. (1995) propôs duas vias de metabolização do fenol em *Aspergillus fumigatus* (Fig. 2 via 2). Em uma rota, o fenol é degradado pela via clássica (*orto* hidroxilação)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

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

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

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

Figura 2 - Vias de degradação do fenol.



A. Fenol; B. Catecol; C. 2-hidroxi-3-oxo-6-oxociclohex-2-en-1-carboxilato; D. *cis,cis*-mucônico; E. Hidroquinona; F. 1,2,4-trihidroxi-3,5-dihidroxi-6-oxociclohex-2-en-1-carboxilato; G. maleilacetato; H. 2-hidroxi-3-oxo-6-oxociclohex-2-en-1-carboxilato; I. 2-oxalocronato; J. Muconolactona; K. Acetil CoA 1. *orto* hidroxilação do fenol formando catecol. 2. *para* hidroxilação formando hidroquinona. 3. Fenol sendo degradado por *meta* clivagem formando diretamente 2-hidroxi-3-oxo-6-oxociclohex-2-en-1-carboxilato. 4. *meta* clivagem do catecol. 5. *orto* clivagem do catecol.

Quadro 1 - Enzimas envolvidas da degradação dos compostos fenólicos.

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

Fonte: Nair et al., 2008.

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

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

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

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

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

1.4 A proteômica como ferramenta no entendimento da resposta regulatória global

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2 CONCLUSÃO

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

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

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

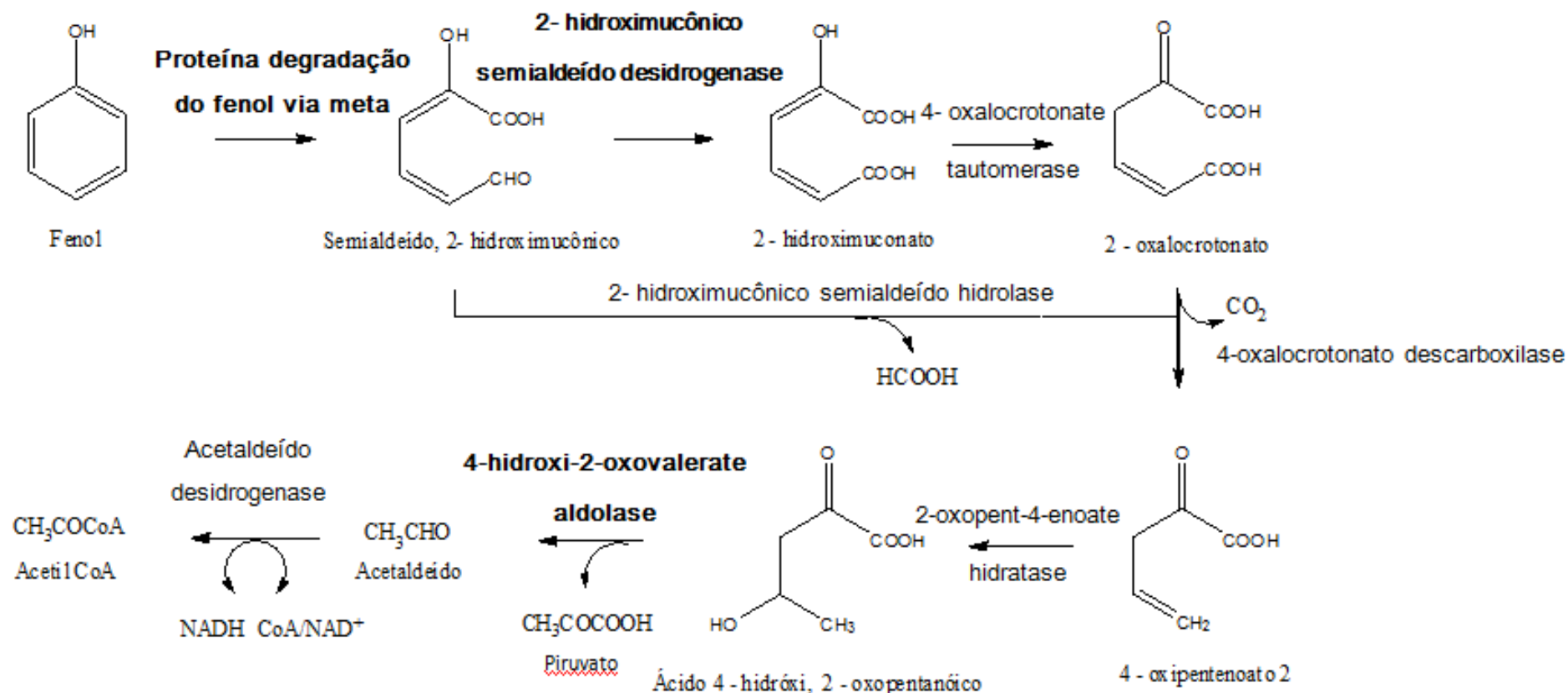
Os resultados obtidos através da eletroforese 2-D e identificação das principais proteínas envolvidas na biodegradação mostraram que *Achromobater* sp. realiza a *meta* clivagem do fenol, pois três enzimas presentes nesta via foram identificadas (Fig. 43) (proteína degradação do fenol via *meta*- clivagem,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

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

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

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

Figura 3 - Em negrito as proteínas encontradas no gel de eletroforese 2-D, podendo assim elucidar a via de degradação do fenol da cepa *Achromobater* sp. (via *meta* clivagem).



REFERÊNCIAS*

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

*De acordo com:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Ojumu TV, Bello OO, Sonibare JA, Solomon BO. Evaluation of microbial systems for bioremediation of petroleum refinery effluents in Nigeria. *Afr J Biotechnol.* 2005;4(1):31–5.
- Quan X, Shi H, Zhang Y, Wang J, Qian Y. Biodegradation of 2,4-dichlorophenol and phenol in an airlift inner-loop bioreactor immobilized with *Achromobater sp.* *Separ Purifi Technol.* 2004;34:97-103.
- Ramos J L, Duque E, Gallegos MT, Godoy P. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:743-68.
- Ruiz-Manzano A, Yuste L, Rojo F. Levels and activity of the *Pseudomonas putida* global regulatory protein CRC vary according to growth conditions. *J Bacteriol.* 2005;187(11): 3678-86.
- Saier MHJr. Multiple mechanisms controlling carbon metabolism in bacteria. *Biotechnol Bioengin.* 1998;5:170-74.
- Saiki RK, Scarf F, Faloona FA, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Washington, DC: Science; 1985. p. 1350-54.
- Sambrook R, Fritsch EF, Maniatis. T. *Molecular Cloning: a laboratory.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1982. p. 2344.
- Santos KS, Santos LD, Mendes MA, Souza BM, Malaspina O, Palma MS. Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nursehoneybees (*Apis mellifera* L.). *Insect Biochem Molecular Biology.* 2005;35:85-91.
- Schaechter M. View from here group. *Microbiol Molecular Biology Rev.* 2001;65:119-30.
- Seung Il K, Jong-Soon C, Hyung-Yeel K. A Proteomics Strategy for the Analysis of Bacterial Biodegradation Pathways. *J Integr Biol.* 2007;11:3.
- Shawabked R, Khaled M, Kheifat. Rate of biodegradation of phenol by *Klebsiella oxytoca* in minimal medium and nutrient broth conditions. *Biorem J.* 2007;11:13-9.
- Sheppard T. The TCA cycle. Available from: <http://www.blobs.org/science/article.php?article=31>. [2012 Jul 15].
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Neubauer G, Shevchenko A, Mortensen P, Mann M. A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone. *Biochem Society Transac.* 1996;24,(3):893-6.
- Shingler V. Integrated regulation in response to aromatic compounds: from signal sensing to attractive behavior. *Environ Microbiol.* 2003;5,(12):1226-41.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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