

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

JÚLIO NINO DE SOUZA NETO

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE *Acinetobacter junii* SB132 DEGRADADORA
DE DIESEL E SUA INTERAÇÃO COM SUBSTRATOS HIDROFÓBICOS**

MANAUS

2019

JÚLIO NINO DE SOUZA NETO

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE *Acinetobacter junii* SB132 DEGRADADORA
DE DIESEL E SUA INTERAÇÃO COM SUBSTRATOS HIDROFÓBICOS**

Tese apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia, Área de Concentração: Agroflorestal

Orientador: Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade

MANAUS

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729c Souza Neto, Júlio Nino de
Caracterização genômica de *Acinetobacter junii* SB132
degradadora de diesel e sua interação com substratos hidrofóbicos
/ Júlio Nino de Souza Neto. 2019
153 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Edmar Vaz de Andrade
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Genoma. 2. Bioinformática. 3. Poluente. 4. Biofilme. I. Andrade,
Edmar Vaz de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

JÚLIO NINO DE SOUZA NETO

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE *Acinetobacter junii* SB132 DEGRADADORA
DE DIESEL E SUA INTERAÇÃO COM SUBSTRATOS HIDROFÓBICOS**

Tese apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia, Área de Concentração: Agroflorestal

Aprovado em: 19 / 07 / 2019

BANCA EXAMINADORA

Dr. Edmar Vaz de Andrade, Presidente
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Dr. Marcelo de Macedo Brígido, Membro
Universidade de Brasília (UnB)

Dr^a. Márcia Neiva, Membro
Centro Universitário do Norte (UniNorte)

Dr^a. Alessandra Karisa Costa Lima do Nascimento, Membro
Centro Universitário do Norte (UniNorte)

Dr. André Luiz Willerding, Membro
Secretaria de Planejamento, Desenvolvimento, Ciência, Tecnologia e Inovação
(SEPLANCTI)

Aos meus queridos pais, Nivaldo e Izabel,
pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Vida e tudo que nela existe que contribui com a evolução biológica e “espiritual” dos seres vivos.

Aos meus pais, Izabel e Nivaldo, que nunca mediram esforços a fim de proporcionarem-me a oportunidade de crescer na vida científica e sempre me apoiando. Serei eternamente grato e sinto-me orgulhoso por ser filho deles.

A todos os meus familiares que também sei que sempre estiveram torcendo por mim. Um agradecimento especial a três pessoas muito importantes: Joana, Neurilene e Fernando. São pessoas que fazem parte da minha vida!

Ao meu orientador, professor Doutor Edmar Vaz de Andrade, que fez mais do que orientar-me para a vida acadêmica, ele foi um grande amigo. Serei eternamente grato a ele.

Aos professores Doutor Spartaco Astolfi Filho e Doutor José Odair Pereira, pela oportunidade que me deram de fazer parte dos seus grupos de pesquisa, bem como pela confiança em mim investida.

Aos meus companheiros de trabalho do Centro de Apoio Multidisciplinar, Paulo Abraão, Dina, Elen e Carmem Lúcia, pela boa e saudável convivência no dia a dia, pois sem isso eu não teria conseguido.

Aos meus amigos, Maurício, Jeff, Genilton, Filipe, Anita e Belle, que assim como eles torcem por mim, também torço por eles para que alcancem seus objetivos.

À Doutora Tainá Raiol e Doutora Ana Carolina Paulo Vicente pela colaboração nesta pesquisa.

À UFAM por existir e sempre fornecer oportunidades para que cientistas possam realizar suas pesquisas com qualidade e onde, atualmente, sou servidor.

Ao Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM), seus servidores e laboratórios, tais como Laboratório de Tecnologias de DNA, Laboratório de Esterilização, Laboratório de Genômica, Laboratório de Purificação de Biomoléculas, entre outros, pela existência. Sem o CAM não seria possível realizar pesquisas na área de Biotecnologia na UFAM.

Ao Instituto Oswaldo Cruz pela colaboração durante o desenvolvimento de minha pesquisa.

À CAPES pelo auxílio financeiro, a qual cedeu-me uma bolsa de estudos até que eu pudesse assumir meu cargo público (início em 2017). Sem este auxílio, as atividades de pesquisa seriam mais difíceis.

Aos órgãos financiadores da pesquisa, CNPq, CAPES e FAPESP.

E, finalmente, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, torceram por mim!

Muito Grato a Todos!

A dependência mata a criatividade, a criatividade brinca com o desconhecido. Não existem estratégias que possam abranger o reino infinito do novo. Apenas a confiança em si mesmo pode te levar além dos seus medos e do que já é conhecido.

Filme Velvet Buzzsaw

RESUMO

Derrames acidentais de petróleo podem ter consequências catastróficas em ambientes naturais. No entanto, algumas populações nativas de bactérias podem prosperar nestas condições, utilizando componentes do petróleo bruto em seu metabolismo. Esta capacidade natural das bactérias pode ser usada na obtenção de informações genéticas e metabólicas para contribuir com o desenvolvimento de novas tecnologias de biorremediação, como, por exemplo, na limpeza de resíduos industriais. Assim, nesta pesquisa foi investigado o potencial de biodegradação da *Acinetobacter junii* SB132, por procedimentos experimentais e análises genômicas, para entender seus mecanismos de interação, absorção e metabolização de compostos hidrofóbicos do óleo diesel. Esta cepa bacteriana, previamente isolada por seleção em substrato contendo petróleo e identificada por análises morfológicas e moleculares, teve a capacidade de crescer em óleo diesel como sua única fonte de carbono e energia. Além disso, em testes laboratoriais foram observadas camadas de emulsão entre o sobrenadante de cultura, livre de células, e compostos hidrofóbicos. Adicionalmente, células frescas, livres de óleo, foram capazes de aderir aos substratos hidrofóbicos, bem como formar biofilme sobre a superfície de placa de poliestireno. O rascunho do genoma desta bactéria teve um tamanho de 3,5 Mb, tamanho este equivalente aos genomas das cepas deste gênero depositados no GenBank, e sua anotação revelou subsistemas relacionados ao metabolismo de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. Assim, é possível que a *A. junii* SB132 utilize mecanismos de adesão celular, via formação de biofilme, para entrar em contato com os substratos hidrofóbicos presentes no óleo diesel e, assim, poder metabolizá-los pelas vias de degradação destes compostos.

Palavras-chave: Genoma. Bioinformática. Poluente. Biofilme.

ABSTRACT

Accidental spills of crude oil can have catastrophic consequences in natural environments. However, some native bacterial populations can thrive under these conditions by utilizing crude oil components in their metabolism. This natural ability of bacteria can be used to gather genetic and metabolic information to contribute to the development of new bioremediation technologies, such as cleaning industrial waste. Thus, this research investigated the biodegradation potential of *Acinetobacter junii* SB132, by experimental procedures and genomic analyzes, to understand its mechanisms of interaction, absorption and metabolization of hydrophobic compounds of diesel oil. This bacterial strain, previously isolated by selection on petroleum-containing substrate and identified by morphological and molecular analysis, had the ability to grow in diesel oil as sole carbon and energy source. In addition, in laboratory tests, emulsion layers were observed between cell free culture supernatant and hydrophobic compounds. Additionally, fresh oil-free cells were able to adhere to hydrophobic substrates as well as form a biofilm on the polystyrene plate surface. Its genome draft had a size of 3.5 Mb, which is equivalent to the genomes of the *Acinetobacter* strains deposited in GenBank, in which the annotation revealed subsystems related to the metabolism of aliphatic and aromatic hydrocarbons. Thus, it is possible that *A. junii* SB132 uses cell adhesion mechanisms, through biofilm formation, to contact the hydrophobic substrates present in diesel oil and so be able to metabolize them through the degradation pathways of these compounds.

Key words: Genome. Bioinformatic. Pollutant. Biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Derramamentos de óleo de navios petroleiros em ambiente marinho contabilizados de 1970 a 2016	18
Figura 2 -	Incidência de derramamentos de petróleo de navios petroleiros no mundo (1974-2015)	20
Figura 3 -	Faixa relativa de custos de diferentes tecnologias de remediação de solo expressas em porcentagem	32
Figura 4 -	Localização do local de coleta das macrófitas aquáticas para isolamento de bactérias endofíticas e epifíticas.....	38
Figura 5 -	Perfil de crescimento bacteriano sobre óleo diesel como única fonte de carbono	51
Figura 6 -	Avaliação da formação de biofilme pela cepa SB132.....	53
Figura 7 -	Medição da adesão bacteriana a hidrocarbonetos.....	55
Figura 8 -	Índice de emulsificação dos sobrenadantes de cultura sobre substratos hidrofóbicos	59
Figura 9 -	Avaliação da produção de agentes biosurfactantes.....	62
Figura 10 -	Perfil eletroforético do gDNA da cepa SB132.....	66
Figura 11 -	Ordenamento dos 63 <i>scaffolds</i> da montagem do genoma da cepa SB132.....	73
Figura 12 -	Análise filogenética da cepa SB132.....	77
Figura 13 -	Categorização em subsistemas das regiões codificantes do genoma da cepa SB132.....	79
Figura 14 -	Representação circular do cromossomo <i>A. junii</i> SB132.....	81
Figura 15 -	Modelo de regulação de genes que conferem a capacidade de degradação de alcanos	83
Figura 16 -	Modelo de mecanismo de ação das enzimas envolvidas com a degradação de alcanos	84
Figura 17 -	Organização dos genes monooxigenase flavina-dependente no genoma da cepa SB132.....	85
Figura 18 -	Organização dos genes alceno-1 monooxigenases no genoma da cepa SB132.....	86
Figura 19 -	Organização do gene citocromo P450 hidroxilase no genoma da cepa SB132.	88
Figura 20 -	Subsistemas preditos no genoma da cepa SB132.....	93
Figura 21 -	Localização dos genes das vias metabólicas de compostos aromáticos no genoma da cepa SB132	94
Figura 22 -	Metabolismo periférico e clivagem de anéis aromáticos em bactérias	95

Figura 23 - Organização dos genes da via de degradação de quinato no genoma da cepa SB132	97
Figura 24 - Organização dos genes da via de cloroaromáticos no genoma da cepa SB132.....	99
Figura 25 - Via da orto-clivagem (beta-cetoadipato) bacteriana.....	101
Figura 26 - Enzimas e proteínas que podem estar envolvidas no metabolismo de compostos aromáticos e alifáticos em diferentes cepas bacterianas..	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Grandes derramamentos de petróleo nos mares do mundo	19
Tabela 2 -	Teste de susceptibilidade da cepa SB132 a antimicrobianos.....	49
Tabela 3 -	Índice de emulsificação dos sobrenadantes de cultura sobre substratos hidrofóbicos.....	58
Tabela 4 -	Descrição global do sequenciamento e da montagem do genoma.....	67
Tabela 5 -	Avaliação da qualidade da montagem do genoma da cepa SB132.....	69
Tabela 6 -	Distribuição dos <i>scaffolds</i> não alinhados ao genoma de referência usando o programa Quast.....	70
Tabela 7 -	Distribuição dos <i>scaffolds</i> não alinhados ao genoma de referência usando o programa Quast e Mauve.....	74
Tabela 8 -	Alinhamento de <i>scaffolds</i> a sequências do banco de dados Genbak...	76
Tabela 9 -	Visão geral das características do genoma da cepa SB132 após anotação.....	79
Tabela 10 -	Visão quantitativa dos subsistemas anotados no genoma da cepa SB132.....	92
Tabela 11 -	Visão geral das características dos genomas de espécies bacterianas comparadas com o genoma da cepa SB132.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BH	Bushnell Haas
BTEX	Benzeno, tolueno etilbenzeno e xileno
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais)
COV	Compostos orgânicos voláteis
DME	Diagnósticos Microbiológicos Especializados
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
DP	Desvio Padrão
dsDNA	double stranded DNA (DNA dupla fita)
DWH	Deepwater Horizon
EC	Enzyme Commission (Comissão de enzimas)
FAO	Food and Agriculture Organization (Organização de Alimentos e Agricultura)
GC	Guanina e Citosina
gDNA	DNA genômico
GFF	General Feature Format (Formato Geral de Recursos)
HPA	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HTP	Hidrocarbonetos totais do petróleo
IMO	International Maritime Organization (Organização Marítima Internacional)
IТОPF	International Tanker Owners Pollution Federation Limited (Federação Internacional de Poluição de Proprietários de Petroleiros)
LB	Luria Bertan
MANS	Metabolismo de aromáticos não subcategorizados
MIAC	Metabolismo de intermediários aromáticos centrais
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia)

NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards (Comitê Nacional para Padrões de Laboratório Clínico)
NGS	New Generation Sequencing (Sequenciamento de Nova Geração)
NIH	National Institutes of Health (Instituto Nacional de Saúde)
OD	Optical density (densidade óptica)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PEG	Protein encoding gene (Gene codificador de proteína)
PES	Polietersulfona
PGT	Petroleum Geoscience Technology (Tecnologia de Geociência de Petróleo)
Ph.D	Philosophiæ Doctor (Doutor da Filosofia)
PTFE	Politetrafluoretileno
RAST	Rapid Annotation using Subsystem Technology (Anotação Rápida usando Tecnologia de Subistemas)
rDNA	DNA ribossomal
RNA	Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)
rRNA	RNA ribossomal
SARA	Saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de um Único Nucleotídeo)
TBE	Tris, borato e EDTA
tRNA	RNA transportador
UFC	Unidades formadoras de colônias
UV	Ultravioleta
VPCCA	Vias periféricas de catabolismo de compostos aromáticos
WGS	Whole Genome Shotgun (Shotgun de Genoma Completo)
WHOI	Woods Hole Oceanographic Institution (Instituição Oceanográfica do Woods Hole)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1	OS MAIORES DERRAMAMENTOS DE PETRÓLEO NO MUNDO: CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS	17
2.2	ORIGEM, COMPOSIÇÃO E IMPACTOS AMBIENTAIS DO PETRÓLEO	24
2.3	METABOLISMO BACTERIANO NA BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS	28
2.4	BIORREMEDIAÇÃO E BIODEGRADAÇÃO	30
2.5	IMPORTÂNCIA AMBIENTAL E BIOTECNOLÓGICA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Acinetobacter</i>	34
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVO GERAL	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	DADOS ANTERIORES E AMOSTRA BACTERIANA	38
4.2	PERFIL DE CRESCIMENTO E PRESERVAÇÃO	39
4.3	TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	39
4.4	EXPERIMENTOS INTERAÇÃO MICRORGANISMO-SUBSTRATOS	40
4.4.1	Meios de Cultura	40
4.4.2	Habilidade de Formação de Biofilme	41
4.4.3	Adesão Bacteriana a Hidrocarbonetos	42
4.4.4	Atividade Emulsificante de Sobrenadante de Cultura	43
4.4.5	Detecção de Produção de Biosurfactantes	44
4.5	ANÁLISE GENÔMICA	44
4.5.1	Extração, Análise e Quantificação do DNA total	44
4.5.2	Sequenciamento e Montagem do Genoma	46
4.5.3	Anotação do Genoma	46
4.5.4	Análise Filogenética	47
4.5.5	Comparação Genômica com Bactérias Biodegradadoras	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	48
5.2	EXPERIMENTOS DE INTERAÇÃO MICRORGANISMO-SUBSTRATOS HIDROFÓBICOS	51

5.2.1	Perfil de Crescimento Bacteriano em Óleo Diesel	51
5.2.2	Avaliação da Capacidade de Formação de Biofilme	53
5.2.3	Adesão Bacteriana a Hidrocarbonetos	55
5.2.4	Índice de Emulsificação	58
5.2.5	Avaliação Qualitativa da Produção de Agentes Biosurfactantes	62
5.3	ANÁLISE GENÔMICA	65
5.3.1	Quantificação e Análise por Eletroforese do DNA Total	65
5.3.2	Sequenciamento e Montagem do Genoma	67
5.3.3	Análise Filogenética	77
5.3.4	Anotação Funcional do Genoma	78
5.3.5	Genes de Enzimas de Ativação de Hidrocarbonetos Alifáticos	82
5.3.6	Genes Associados a Degradação de Compostos Aromáticos	91
5.3.6.1	Vias Periféricas de Degradação de Compostos Aromáticos	95
5.3.6.2	Metabolismo de Intermediários Aromáticos Centrais	100
5.3.7	Comparação do Genoma da Cepa SB132 com Espécies Biodegradadoras	104
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	108
	REFERÊNCIAS	111
	APÊNDICE A - Perfil de crescimento bacteriano em óleo diesel como única fonte de carbono.	136
	APÊNDICE B - Dados brutos do experimento de avaliação de formação de biofilme.	137
	APÊNDICE C - Dados brutos do experimento de aderência celular a substratos hidrofóbicos.	138
	APÊNDICE D – Dados brutos do experimento de índice de emulsificação de substratos hidrofóbicos por sobrenadante de cultura.	140
	APÊNDICE E – Espécies bacterianas do gênero <i>Acinetobacter</i> usadas na montagem da árvore filogenética	142
	APÊNDICE F - Proteínas preditas no genoma de <i>A. junii</i> SB132 que poderiam estar relacionadas com o metabolismo de hidrocarbonetos	144
	APÊNDICE G - Comparação dos subsistemas relacionados com o metabolismo de compostos aromáticos de diferentes genomas bacterianos.	147

1 INTRODUÇÃO

A poluição refere-se à presença de resíduos sólidos, líquidos ou gasosos em quantidades acima do que o ambiente consegue se recuperar, naturalmente, tornando-o impróprio para os seres vivos. Todas as diferentes formas de poluição afetam a composição e o equilíbrio da natureza, atingindo a atmosfera, as águas, do solo e do subsolo, além de interferir na cadeia alimentar. Consequentemente, alteram os mecanismos naturais de proteção do planeta, prejudicando as espécies animais e vegetais existentes, podendo ameaçar, ainda, sua reprodução (AMORIM et al, 2003).

Dentre os poluentes mais prejudiciais, temos o petróleo, bem como seus derivados, que se destacam pelos danos causados aos ecossistemas impactados, atingindo animais, plantas e microrganismos. Estes efeitos nocivos à vida devem-se à composição destes compostos orgânicos, os quais possuem elementos que, em função de suas características físico-químicas, são persistentes no ambiente, por serem pouco biodegradáveis, sendo bastante tóxicos aos organismos vivos e, em especial, aos seres humanos.

É assim que, quando acontece algum derramamento de petróleo ou derivados, ocorre, também, um processo de seleção dos microrganismos da microbiota indígena, os quais desenvolvem mecanismos adaptativos, a fim de utilizar tais compostos como fonte de carbono e energia. Por isso que estes microrganismos são tidos como potenciais agentes da biorremediação, sendo suas vias metabólicas alvos de estudo para o melhor entendimento dos processos de biodegradação, podendo gerar um produto que, futuramente, poderá ser aplicado na remediação de sítios contaminados.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 OS MAIORES DERRAMAMENTOS DE PETRÓLEO NO MUNDO: CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS

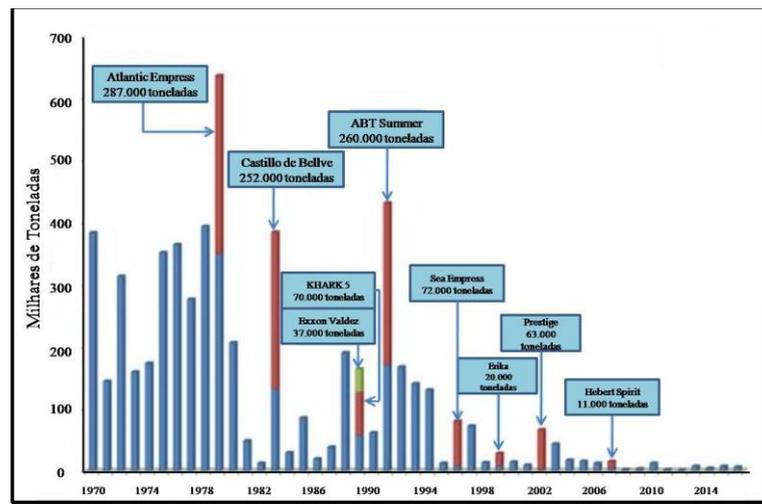
Informações a respeito de vazamentos de petróleo no mundo encontram-se disponíveis, majoritariamente, em dados de organizações e centros de pesquisas voltadas aos acidentes relacionados às águas, à segurança, ao transporte marítimo ou, ainda, à exploração e educação oceânica. Dentre as principais, podemos citar a Instituição Oceanográfica de Woods Hole (WHOI), que é uma organização sem fins lucrativos, líder mundial dedicada à pesquisa, exploração e educação oceânica; a Organização Marítima Internacional (IMO), que é uma agência especializada das Nações Unidas, responsável pela segurança do transporte marítimo e pela prevenção da poluição marinha causada pelos navios; a Federação Internacional Limitada de Proprietários de Navios-Tanque (ITOPF), que atua em equipe, em resposta aos derramamentos de óleo no mundo, avaliando danos e analisando reivindicações, além de ser uma fonte primária de informações a respeito de acidentes envolvendo navios.

No ambiente natural os efeitos em curto-prazo do petróleo derramado sobre as comunidades marinhas e seus indivíduos são bem conhecidos e preditos, uma vez que imagens de mamíferos e aves cobertos de óleos são, comumente, expostos na mídia. Além disso, existe uma grande preocupação com os efeitos do óleo em longo-prazo, como por exemplo, os efeitos dos baixos níveis de hidrocarbonetos do petróleo na reprodução das espécies (DICKS, 1998).

Mesmo que já se soubesse do problema da poluição por petróleo em águas marinhas, desde os primeiros transportes, usando navios petroleiros, apenas após o naufrágio do Tanque Torrey Canyon, na Inglaterra, em 1967, que resultou no derramamento de grande volume de óleo, é que houve a preocupação com o destino do petróleo derramado no ambiente natural e suas consequências (IMO, 2019; ROSATO, 1997). Muitos derramamentos, envolvendo navios petroleiros, aconteceram

após este acidente, porém apenas uma pequena parcela contribuiu com a maior quantidade de óleo vazado (Figura 1).

Figura 1 - Derramamentos de óleo de navios petroleiros em ambiente marinho contabilizados de 1970 a 2016. Volumes de óleos vazados de pequeno (<7 toneladas), médio (7-700 toneladas) e grande porte (>700 toneladas), com barras vermelhas indicando a contribuição de grandes vazamentos



Fonte: ITOPF (2016)

A Tabela 1, a seguir, mostra alguns acidentes, envolvendo navios petroleiros e plataformas marinhas, que levaram ao derramamento de grandes volumes de petróleo. Mesmo que o número destes acidentes tenha diminuído ao longo dos anos até os tempos atuais, possivelmente, ocorreram danos que não entraram na contabilização dos relatórios oficiais sobre os acidentes, cujas consequências podem ter perdurado por décadas, dadas as características físico-químicas do produto envolvido, isto é, o petróleo. Um exemplo disto é que mesmo após 23 anos do derramamento de petróleo do Exxon Valdez, em 1989, até em 2014 ainda se podia encontrar vestígios de óleo nas margens rochosas e abaixo da superfície (SHIGENAKA, 2014).

Segundo ITOPF (2016) dentre os derramamentos, envolvendo navios petroleiros, no período de 1970 à 2015, 95% destes foram derramamentos de pequeno (<7 toneladas) e médio (7-700 toneladas) porte e os 5% restantes foram de

grande porte (>700 toneladas). As causas e circunstâncias dos acidentes são variadas, porém seus efeitos foram significativos na quantidade final do óleo derramado.

Se consideramos os 5% dos derramamentos de petróleo de grande porte, 50% destes aconteceram quando os navios estavam em navegação em mar aberto, quando, então, houve, majoritariamente, colisões, alisões e encalhamentos (Figura 2). Além disso, 17% dos derramamentos aconteceram, quando os navios estavam em navegação em águas restritas/interiores, ou seja, em portos ou suas proximidades, em barras, baías, canais, rios, proximidades de perigos ou quaisquer outras situações em que a manobra do navio apresentava-se limitada pela estrita configuração da costa ou topografia (ITOPF, 2016; MARINHA DO BRASIL, 2011).

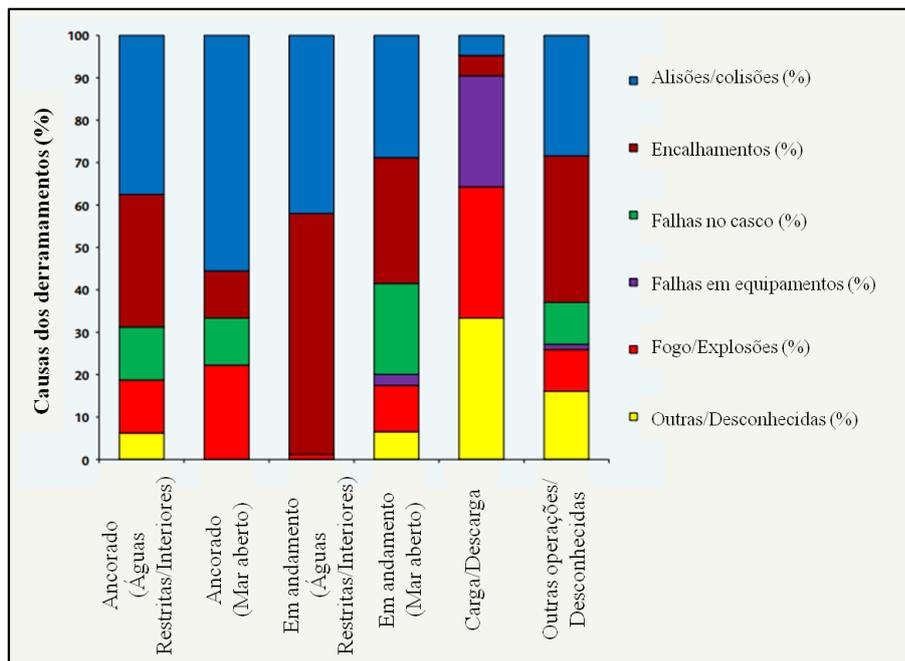
Tabela 1 - Grandes derramamentos de petróleo nos mares do mundo

	Ano	Local	Ocorrência	Volume vazado (m3)
1	2010	EUA	Plataforma Deepwater Horizon	779 mil
2	1988	Mar do Norte	Plataforma Piper Alpha	670 mil
3	1979	México	Plataforma Ixtoc 1	525 mil
4	1979	Caribe	Petroleiro Atlantic Empress	287 mil
5	1991	Angola	Petroleiro ABT Summer	260 mil
6	1983	Africa do Sul	Petroleiro Castillo de Belver	252 mil
7	1978	França	Petroleiro Amoco Cadiz	230 mil
8	2007	Inglaterra	Navio Containeiro Napoli	200 mil
9	1991	Italia	Petroleiro Haven	144 mil
10	1967	Inglaterra	Petroleiro Torrey Canyon	119 mil
11	1972	Golfo de Oman	Petroleiro Sea Star	115 ml
12	1975	Portugal	Petroleiro Jacob Maersk	85 mil
13	1989	Espanha	Petroleiro Khark 5	70 mil
14	2002	Espanha	Petroleiro Prestige	63 mil
15	1974	Chile	Petroleiro Metula	51 mil
16	1989	Alasca, EUA	Petroleiro Exxon Valdez	40 mil
17	2003	Paquistão	Petroleiro Tasman Spirit	30 mil
18	1999	França	Petroleiro Erika	20 mil
19	2007	Coréia	Petroleiro Hebei Spirit	10,5 mil
20	1978	Brasil	Petroleiro Brazilian Marina	6 mil
21	1973	Porto Rico	Petroleiro Zoe Colocotroni	5 mil
22	2004	Brasil	Navio químico Vicuña	5 mil

Fonte: CETESB (2017)

Dentre os derramamentos de grande porte, o derramamento no Golfo do México é, oficialmente, o maior acidente da história mundial. Tudo começou quando o poço Macondo quebrou a uma milha abaixo da superfície do Golfo, em 20 de abril de 2010, ocasionando explosões na plataforma *Deepwater Horizon*(DWH) – estando esta sob a responsabilidade da *British Petroleum* – causando o vazamento de 780 milhões de litros de petróleo, no Golfo do México, até 15 de julho de 2010. O óleo vazou e espalhou-se pela costa do Golfo, matando centenas de aves e peixes, causando um enorme dano à vida marinha, devido aos efeitos do petróleo bruto e dos 1,82 milhão de galões de dispersantes utilizados (ECOAGÊNCIA, 2012; MOSS, 2010; UOLNOTÍCIAS, 2010).

Figura 2 - Incidência de derramamentos de petróleo de navios petroleiros no mundo (1974-2015). Derramamentos de grande porte (>700 toneladas) por operações executadas durante o derramamento (eixo horizontal) e causas primárias (eixo vertical)



Fonte: ITOPF (2016)

Em 2012, em uma entrevista à Fundação Grupo Boticário, o biólogo Fábio Moretzsohn, Ph.D em Biodiversidade Marinha e cientista assistente de pesquisa do *Harte Research Institute for Gulf of Mexico Studies*, afirmou que os danos causados à

vida vão além dos apresentados nos relatórios oficiais. Isto porque, os documentos oficiais basearam-se apenas no número de animais vertebrados encontrados e, imediatamente, mortos no derramamento, dentre os quais constavam 1.146 tartarugas marinhas, 128 golfinhos e 8.209 aves marinhas (de 102 espécies, incluindo várias ameaçadas de extinção). Tais dados não mencionaram os danos causados aos invertebrados, plantas, algas, organismos que compõem a base da cadeia alimentar nem os organismos de grande profundidade (ECOAGÊNCIA, 2012).

No derramamento do poço Macondo do DWH, a associação dos fatores físicos e a utilização de dispersante, fez com que o óleo se mantivesse na coluna d'água, na forma de pluma de hidrocarbonetos, em profundidades que giravam em torno de 800 a 1200m. Além disso, o óleo que chegou à superfície voltou à coluna d'água, devido aos processos naturais de intemperismo, queima e utilização de dispersante na superfície. A combinação do óleo derramado e acumulado na coluna e no fundo do mar, bem como o dispersante utilizado, representou um grande risco para os ecossistemas do fundo do mar do Golfo do México, uma vez que este local é dominado por sedimentos macios, contendo meiofauna e macrofauna, além de sedimentos duros que abrigam corais (FISHER et al, 2014).

Dados indicam o efeito tóxico sinérgico do petróleo do poço de Macondo do DWH e do dispersante Corexit 9500A, sendo que este último foi utilizado no fundo do mar e na superfície, durante o derramamento do DWH (FISG, 2010). O petróleo bruto e o dispersante têm toxicidades em níveis similares, contudo quando misturados houve um efeito sinérgico de até 52 vezes sobre *Brachionus plicatilis*, indicando o quão tóxico foi o uso deste dispersante, no intuito de remediar o vazamento do DWH (RICO-MARTÍNEZ et al, 2013). Somente o petróleo do DWH causou o prolongamento do potencial de ação de cardiomiócitos isolados de juvenis de atum-rabilho e atun-albacora (BRETTE et al, 2014).

Algumas pesquisas foram feitas alguns meses após o acidente do DWH, na área do Golfo do México, a fim de avaliar o impacto ambiental causado, como mostram dados de 2011, que revelaram danos aos corais na área do Golfo, na qual se detectou injúrias e patologias graves nos organismos lá existentes, tais como pólipos localmente retraídos, perda de tecido, ramos quebrados, esqueletos nus, necrose e

sobrecrescimento de biofilme, em porções das colônias (SILVA et al, 2016). Além disso, novas colônias de corais foram descobertas nas proximidades do acidente, que, também, foram impactadas pelo derramamento (FISHER et al, 2014), bem como colônias mais próximas do local que apresentaram sinais bem distribuídos de estresse, como perda de tecidos, aumento da esclerite, excesso de produção de mucosa, ofiuroides comensais branqueados e cobertura floculante marrom (WHITE et al, 2012).

Do mesmo modo, os vertebrados da localidade apresentaram grande potencial de exposição e, conseqüente, ameaça a sua sobrevivência. Um exemplo disto é que durante o período de derramamento do poço Macondo foram coletados alguns exemplares de peixes e verificou-se que o peixe killifish do golfo (*Fundulus grandis*) apresentou uma diminuição de seus linfócitos, quando comparado com exemplares não provenientes do Golfo do México; além deste, a truta do mar (*Cynoscion nebulosus*) teve seus níveis mais elevados de etoxiresorufina-o-deetilase do que a truta marinha controle; também, os centros melanomacrófagos esplênico foram, significativamente, maiores no killifish do golfo e na truta marinha, quando comparados aos controles. Estes dados sugerem que os peixes do Golfo amostrados, que foram expostos ao petróleo bruto do poço Macondo estavam em estado linfopênico ou imunocomprometidos (ALI et al, 2014).

Outro estudo realizado, também, com o peixe killifish, coletado na área do Golfo, no período de vazamento, mostrou uma expressão gênica diferencial da proteína citocromo P4501A – enzima esta atuante na biotransformação de xenobióticos – no fígado e nos tecidos branquiais, coincidentes com o derramamento de petróleo no local, bem como houve uma superexpressão desta enzima nas brânquias, fígado, intestino e rim. Além disso, estudos feitos, em laboratório, com embriões desta espécie expostos aos sedimentos provenientes do Golfo, contaminados com petróleo, apresentaram anormalidades em seu desenvolvimento, quando comparados aos controles. Estes dados são preditivos de impactos em nível da população em peixes expostos a sedimentos de locais oleados, ao longo da costa do Golfo do México (DUBANSKY et al, 2013).

Igualmente, o derramamento do poço Macondo também afetou as plantas presentes nas regiões costeiras. Nos pântanos salinos de Barataria Bay, LA, EUA, expostos a elevados graus de petróleo, todas as plantas morreram, devido à exposição aos hidrocarbonetos durante a exposição inicial e apenas 50% recuperaram-se somente 42 meses após o acidente. Além disso, a estrutura da vegetação do pântano foi mudada de *Spartina* e *Juncus* para, predominantemente, *Spartina* (LIN et al, 2016). Danos sobre os tecidos das plantas da vegetação do pântano salino de Louisinana, EUA, também foram registrados depois de anos da ação do óleo no poço Macondo (HESTER et al, 2016).

O segundo pior derramamento de petróleo no mundo aconteceu em 1979 e perdurou até 1980, sendo este o Ixtoc I, também no Golfo do México. O poço Ixtoc I foi perfurado no sudoeste do Golfo pela Petrolífera Mexicana Pemex, o qual explodiu após uma falha na circulação da "lama de perfuração", causando ruptura, explosão e incêndio, os quais resultaram na destruição e afundamento da plataforma. O vazamento resultante foi estimado em 3,3 milhões de barris (equivalente a 525 milhões de litros), no período de 3 de junho de 1979 a 23 de março de 1980 (MOSS, 2010; UOLNOTICIAS, 2010; WHOI, 2016).

O Relatório do derramamento do poço Ixtoc I estimou que durante a fase aguda do acidente apenas 1% do óleo derramado foi queimado, 5% foi, mecanicamente, removido, 50% evaporou para a atmosfera, 12% sofreu degradação química e biológica, 6% chegou às praias mexicanas, menos de 1% chegou às praias do Texas e 25% afundou no mar. Mesmo com a falta de dados mais precisos, dado os procedimentos adotados para a montagem dos relatórios, era possível prever os efeitos agudos do petróleo sobre as espécies e os ecossistemas da área da Baía de Campeche em função da sua toxicidade química e propriedades físicas, principalmente, sobre as espécies comercialmente importantes, tais como as populações de camarões e peixes que são bastante sensíveis ao petróleo (JERNELOV; LINDÉN, 1981).

Outro acidente importante foi o vazamento do petroleiro Exxon Valdez na enseada de Príncipe William, em 26 de março de 1989, após deixar o terminal marítimo Valdez, cheio de óleo. O acidente aconteceu quando o petroleiro atingiu um recife, que rasgou seu casco, liberando 11 milhões de galões de óleo no ambiente (um valor aproximado de 40

milhões de litros de petróleo). Este acidente contaminou mais de 1.000 milhas do litoral e matou centenas de animais. Foram investidos bilhões na limpeza dos locais afetados, porém mesmo que o óleo tenha desaparecido visualmente, este permaneceu em muitas praias, permanecendo, ainda, nos dias atuais (IRVINE et al, 2014; TAYLOR, 2014).

O derramamento de petróleo no Golfo Pérsico (Oriente Médio) foi o maior derramamento não acidental do mundo, devido ao seu grande volume e está, diretamente, relacionado à Guerra do Golfo (1990-1991). No auge da guerra uma das medidas de Saddam Hussein – na época, o então presidente do Iraque – foi derramar grande quantidade de petróleo no Golfo Pérsico, sendo estes valores de 5 a 10 milhões de barris de petróleo (equivalente a 795 milhões a 1,6 bilhão de litros de petróleo), deixando a maior mancha de óleo em águas da história (EBRAICO, 2005; UOLNOTICIAS, 2010;).

Com base nos fatores históricos acima mencionados nota-se o quão impactante é o derramamento de petróleo no ambiente natural, podendo afetar as populações microbianas, a vegetação, os invertebrados, os peixes, as aves e os mamíferos (MOSBECH, 2002). Os efeitos, a curto prazo, são bem conhecidos, previstos e divulgados, todavia o mais preocupante são os efeitos a longo prazo, uma vez que não se sabe como mesmo baixos níveis de contaminantes afetariam no processo reprodutivo dos organismos (DICKS, 1998).

2.2 ORIGEM, COMPOSIÇÃO E IMPACTOS AMBIENTAIS DO PETRÓLEO

Estima-se que são produzidos, aproximadamente, 550 bilhões de toneladas de matéria orgânica, por ano, pelos organismos fitoplanctônicos e que somente 0,1% desta seja preservada nos sedimentos (MILANI et al, 2000; PGT, 2010). Devido a esta quantidade de matéria orgânica nos sedimentos, associada às condições físico-químico-biológicas adequadas, ocorrem transformações, as quais geram produtos que se acumulam nestes sedimentos.

O processo de formação do petróleo ocorre pela diagênese da matéria orgânica acumulada nos sedimentos, a qual inicia pela sua degradação por bactérias e fungos aeróbios e anaeróbios das áreas mais superficiais dos sedimentos. Os resíduos da degradação microbiana e moléculas mais resistentes passam por modificações químicas (perda de grupos funcionais e polimerização), que resultam na condensação e insolubilização desta matéria orgânica. O produto final da diagênese é o querogênio e o betume, sendo o primeiro a fração insolúvel presente nas rochas sedimentares e o segundo, uma mistura de compostos de hidrocarbonetos e não hidrocarbonetos (MILANI et al, 2000; PGT, 2010).

À medida que acontece a subsidência da bacia sedimentar (lento abatimento) o querogênio é soterrado em maiores profundidades com o conseqüente aumento da temperatura e pressão, resultando em novas condições ambientais. Por um processo chamado de catagênese, o querogênio sofre mais liberação de grupos funcionais e heteroátomos, além da perda de hidrocarbonetos alifáticos e cíclicos, e aromatização, gerando, ao final, uma grande quantidade de óleo, o chamado petróleo. No entanto, as temperaturas ainda podem aumentar ao extremo, onde o produto final desta mudança é o metano e um resíduo de matéria que não dará origem ao petróleo, sendo esta fase final denominada de metagênese (MILANI et al, 2000; PGT, 2010).

Desta forma, em função da sua formação geológica, o petróleo é uma mistura complexa que contém vários compostos, dos quais os hidrocarbonetos representam a fração majoritária, cuja composição química e propriedades físicas variam de um campo petrolífero para outro. Devido, principalmente, à complexidade desta mistura, normalmente, o tratamento de áreas contaminadas por estas substâncias torna-se bastante difícil e problemática (ANDRADE et al, 2010).

O petróleo é constituído por uma mistura de hidrocarbonetos e, em menor quantidade, derivados orgânicos sulfurados, nitrogenados, oxigenados e organometálicos, sendo que sua composição pode ser dividida em saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos (sistema SARA). Os saturados, que representam de 15 a 60% no petróleo, correspondem aos ciclo-alcanos (naftênicos), alcanos ramificados e de cadeia linear (parafinas), como ciclo-hexano, n-decano e pristano, respectivamente. Os aromáticos, que representam de 3 a 30% no petróleo,

correspondem aos hidrocarbonetos mono e poliaromáticos, incluindo as formas alquiladas, como o benzeno, metil-naftaleno e benzo [a] pireno. As resinas (valor no petróleo não determinado) que são hidrocarbonetos polares e heterocíclicos, contendo N, S e O em suas estruturas, inclui o dibenzotiofeno e o ácido naftênico. Por fim, os asfaltenos que representam em média 6% no petróleo, são compostos grandes, heterocíclicos, contendo N, S e O, contendo traços de metais pesados, tais como o vanádio (MCGENITY, 2014; ZÍLIO; PINTO, 2002).

Assim como o petróleo, seus derivados, também, possuem grande importância ambiental, por causarem amplos impactos em derramamentos acidentais. Isto porque derivados de petróleo resultam do processo de destilação fracionada, fato este que não garante que moléculas alifáticas sejam separadas das moléculas aromáticas ou, ainda, que moléculas tóxicas sejam separadas das não tóxicas. Assim sendo, os derivados do petróleo também possuem moléculas nocivas à vida e ao ambiente, como por exemplo, a gasolina e o diesel.

Em um ambiente contaminado por petróleo e seus derivados, alguns poluentes destacam-se frente aos demais, tais como os BTEX, HPA, aromáticos heterocíclicos e aromáticos substituídos. Isto porque estes compostos são liberados no ambiente natural não somente por processos petrogênicos (petróleo e derivados), mas também em processos pirogênicos (combustão) e biogênicos (biotransformações) (SEO et al, 2009). Os COV e HTP também merecem atenção especial, visto que os primeiros, por se tratar de compostos gasosos, podem causar poluição atmosférica e intoxicação pelas vias aéreas e, o segundo, por serem tóxicos, com baixa mobilidade e serem altamente persistentes no ambiente natural (ANDRADE et al, 2010).

Quando comparados os compostos aromáticos com os alifáticos de mesmo tamanho, os primeiros são mais persistentes no ambiente e mais tóxicos do que os segundos, bem como são mais solúveis em água, resultando em maior mobilidade. Por isso, dá-se maior importância aos compostos aromáticos, no que diz respeito à poluição ambiental. Prova disso são os BTEX, que atingem, mais rapidamente, as águas de mananciais de abastecimentos e apresentam uma toxicidade crônica mais significativa do que os hidrocarbonetos alifáticos (TIBURTIUS et al, 2004).

Os hidrocarbonetos aromáticos são compostos orgânicos, contendo um ou mais anéis benzênicos, arranjos de forma linear, angular ou agrupados, que podem apresentar substituições pelo enxofre, nitrogênio e oxigênio de um ou dois carbonos do seu anel aromático. Além dos processos naturais, estas moléculas podem surgir no ambiente natural por processos antropogênicos, tais como a queima de derivados de petróleo (gasolina, querosene, óleo diesel), a queima do alcatrão como subproduto do processamento industrial (efluentes petroquímicos, resíduos de refinarias e indústrias de embarcações), a queimada de florestas, a incineração de resíduos industriais, a exaustão de motores automobilísticos, a fumaça de cigarro e tabaco, entre outros (BARBIERI, 1997).

Os hidrocarbonetos monoaromáticos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) são constituintes do petróleo e derivados, gerados nas refinarias petroquímicas, possuindo grande potencial de poluição por serem os compostos mais hidrossolúveis do petróleo (MELLO, 2007). Devido aos problemas de vazamentos de gasolina de tanques subterrâneos, o BTEX tem contaminado solos e águas subterrâneas nestes locais (TIBURTIUS et al, 2004). O benzeno é considerado o mais preocupante, dentre os BTEX, para a saúde pública, segundo a IARC, órgão da Organização Mundial da Saúde, estando classificado no Grupo I, ou seja, é uma substância, comprovadamente, cancerígena, isto é, pode causar leucemia em seres humanos (ANDRADE et al, 2010).

O óleo diesel, também um derivado do petróleo, é um combustível bastante utilizado por embarcações e automóveis. Sua composição química é muito complexa e variada, sendo este formado, principalmente, por *n*-parafinas, parafinas ramificadas e cicloalcanos, contendo de um a três anéis, além de aromáticos, mono e polinucleados (HPA). Os HPA são compostos prioritários em estudos ambientais, por sua ação mutagênica e tumoral em sistemas biológicos (MEIRE et al, 2007). Estes apresentam, também, efeitos sistêmicos, tais como anemia aguda, náuseas, vômitos, convulsões, distúrbios de consciência, letargias e dermatites. De forma geral, quando ingeridos ou absorvidos, são amplamente distribuídos pelo corpo, podendo ser encontrados em qualquer órgão ou tecido, com maior frequência nos tecidos ricos em lipídeos e no trato gastrointestinal (NARDOCCI, 2010).

O estireno, juntamente com BTEX, faz parte do creosoto, sendo constituído por cerca de 85 a 90% de seus componentes aromáticos (BARBIERI, 1997). O fenol é outro composto aromático, resultante dos processos de refinamento de petróleo, o qual é formado por um anel aromático ligado a um radical hidroxila, sendo amplamente usado na indústria petroquímica, indústria química e farmacêutica, entre outras. A presença de fenol em águas residuais, geralmente, advém destes processos industriais e seu aumento representa um perigo ambiental (MARROT et al, 2006).

2.3 METABOLISMO BACTERIANO NA BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS

O metabolismo primário refere-se ao uso de compostos orgânicos como substratos para obtenção de carbono e energia. Estes compostos orgânicos serão doadores de elétrons e promoverão o crescimento e a reprodução dos microrganismos quimiorganotróficos. Estas fontes de carbono e energia, bem como a presença ou ausência dos receptores de elétrons, nutrientes, metabólitos ou substrato inibidores, condições de pH e temperatura, são os principais fatores limitantes do uso da biorremediação (BOOPATHY, 2000).

Compostos orgânicos podem ser metabolizados por fermentação, respiração ou co-metabolismo e, desta forma, a biodegradação pode ser aeróbia ou anaeróbia, requerendo oxigênio ou outro composto, quase sempre inorgânico, comoceptor final de elétrons (BARRETO, 2001). Durante o processo de biodegradação por respiração celular aeróbia, em um solo contaminado com poluentes, os microrganismos utilizam o oxigênio disponível (fator limitante) comoceptor final de elétrons. Quando este oxigênio é totalmente consumido, os microrganismos aerotolerantes e anaeróbios utilizarão outros aceptores de elétrons disponíveis, tais como nitrato, manganês, ferro, sulfatos, dióxido de carbono, entre outros. Quando o dióxido de carbono é utilizado formam-se ácidos orgânicos para gerar metano. Este processo é chamado de respiração celular anaeróbia (ANDRADE et al, 2010; TORTORA et al, 2005).

As vias de degradação de hidrocarbonetos são obtidas por meio de estudos com microrganismos que têm esta capacidade degradativa. O DNA genômico ou plasmidial destes microrganismos são extraídos, sequenciados e os genes são anotados para a verificação de vias metabólicas de interesse. Além disso, também se pode proceder com cultivos sobre substratos de interesse, seguido de extração de proteínas totais e obtenção do proteoma, com o foco em vias metabólicas de interesse. Estas informações ficam armazenadas em banco de dados de domínio público.

Como exemplo da aplicação, Seo, 2009 afirma que o naftaleno tem sido utilizado como composto modelo para verificar a habilidade de bactérias em utilizar HPA como fonte de carbono, visto que este é o mais solúvel e o mais simples. O autor mostra sua via de degradação, a qual começa com a hidroxilação por uma dioxigenase (naftaleno dioxigenase) em um dos anéis do HPA, seguido por uma sequência de passos enzimáticos para a metabolização do composto aromático até resultar em salicilato, o qual é convertido em catecol, que sofre fissão do anel (orto ou meta clivagem), dando origem aos compostos que entrarão no ciclo do ácido cítrico.

Muitos microrganismos utilizam a via do β -cetadipato para degradação de catecol. A chave deste processo é a clivagem do anel aromático pela catecol dioxigenase, com geração de acetil-CoA e succinato, no final do processo. A clivagem intradiol acontece na ligação carbono-carbono, entre os dois grupos hidroxilas (orto-clivagem), produzindo ácido mucônico, necessitando também de Fe^{3+} . A clivagem extradiol acontece na ligação carbono-carbono, adjacente aos grupos hidroxilas (meta-clivagem), produzindo hidromuconaldeído (BUGG, 2003; PÉREZ-PANTOJA et al, 2009;).

Para a degradação de hidrocarbonetos alifáticos, pode-se citar três vias para o ataque aos *n*-alcanos. A primeira é a via de oxidação monoterminal, a qual é mais representativa em espécies do gênero *Pseudomonas*. A segunda é a via de oxidação biterminal, presente em muitos fungos e bactérias, onde ambos os grupos metil terminal do *n*-alcano são hidroxilados. Por fim, a terceira é a oxidação subterminal, onde a hidroxilação acontece em um carbono subterminal. Em todos estes casos, o ataque inicial é feito por uma monooxigenase (hidroxilação) para produzir um

correspondente álcool primário ou secundário, embora sejam outras as enzimas que participam nos passos posteriores da via (JI et al, 2013; MAENG et al, 1996).

A massa molecular de um hidrocarboneto afeta sua biodegradabilidade. Um HPA de alta massa molecular (4 ou mais anéis aromáticos) possui propriedades físico-químicas e recalcitrância diferentes dos HPA de baixa massa molecular. Isto porque se aumentam as quantidades de sítios para ataque enzimático, requerendo diversas vias, além de reações complexas que requerem diferentes tipos de enzimas e, conseqüentemente, mais genes. Em função disto, poucas bactérias capazes de utilizá-los como única fonte de carbono e energia têm sido isoladas (KIM et al, 2009).

2.4 BIORREMEDIAÇÃO E BIODEGRADAÇÃO

A poluição ambiental é um dos problemas mais sérios que afeta a humanidade e outras formas de vida nos dias de hoje. Ela é definida como a “contaminação dos componentes físicos e biológicos do sistema terra/atmosfera, a tal ponto que processos ambientais normais são, adversamente, afetados”. Os poluentes, então, podem ser substâncias ou energias de ocorrência natural, mas que são considerados contaminantes, quando seus níveis excedem ao natural (AMORIM et al, 2003; MURALIKRISHNA et al, 2017).

São muitas as atividades humanas que têm descarregado no ambiente grande quantidade de contaminantes, dentre elas as refinarias de petróleo, mineração de aço, conversão de carvão, processamento têxtil, moagem de papel e celulose, efluentes de estações de tratamento de águas residuais, derramamentos acidentais, despejo ilegal e sítios de descarte de resíduos perigosos não controlados, ou seja, majoritariamente, atividades industriais. No entanto, algumas atividades dos consumidores também podem levar à poluição ambiental, tais como o consumo de gasolina, aerossóis, sprays, pesticidas e fertilizantes (WASI et al, 2012).

Especialmente na indústria petrolífera, em virtude da dependência do mundo pelo petróleo, durante a exploração, o refino, o transporte e as operações de

armazenamento, acontecem derramamentos acidentais, os quais ocasionam a contaminação dos solos, rios, dentre outros ambientes naturais. Em função dos seus efeitos a curto, médio e longo prazo, tais ocorrências motivam a realização de pesquisas relacionadas à remediação de sítios contaminados (AISLABIE et al, 2004; MARÍN et al, 2006).

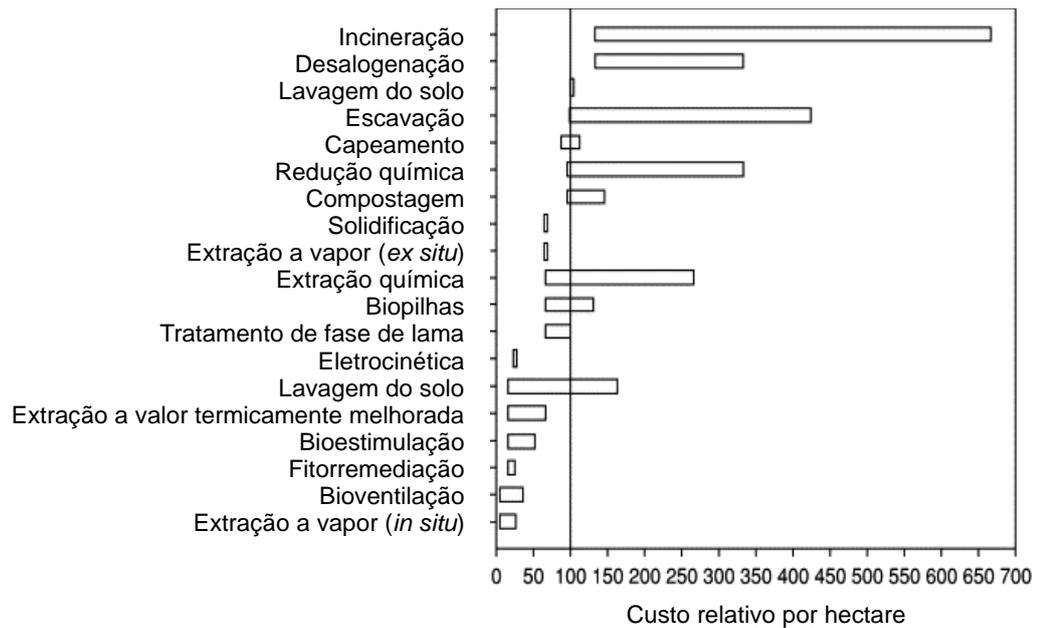
As primeiras medidas que têm sido adotadas em caso de derramamento de petróleo são a utilização de dispersantes químicos, a queima direta do óleo, a remoção mecânica do óleo, a lavagem, usando mangueiras de água quente de alta pressão e a absorção (CHANG et al, 2014). A biorremediação é uma alternativa a estas técnicas de remediação, a qual consiste em um tratamento de ambiente contaminado, baseado na degradação bioquímica dos contaminantes ou substâncias tóxicas, por meio da atividade de microrganismos nativos, ou adicionados no local de contaminação, transformando-os em substâncias menos ou não tóxicas (ANDRADE et al, 2010; BERNOTH et al, 2000).

A biorremediação é uma alternativa verde, atraente e promissora para a remediação de hidrocarbonetos em um local contaminado, visto que pode ser mais rentável, além de degradar, seletivamente, os poluentes sem danificar o local, a flora e a fauna indígena (Figura 3). Porém, deve ser salientado que a biorremediação, assim como outras técnicas de remediação, é dependente de vários fatores que devem ser revistos para que se tenha sucesso na aplicação desta técnica. Estes fatores incluem: condições físicas, químicas e biológicas do local contaminado, pois as interações dos microrganismos com o ambiente garante que estes utilizarão o poluente como fonte de carbono e energia; concentração e tipo de contaminante, pois a velocidade de degradação depende das espécies químicas que são mais ou menos susceptíveis ao arcabouço enzimático dos microrganismos; e o tempo requerido para a degradação ou a remoção do composto alvo (ANDRADE et al, 2010; AZUBUIKE et al, 2016; LOMBI et al, 2005).

A maior parte dos componentes do petróleo (60% a 90%) é biodegradável e o restante (10% a 40%), em estado bruto ou refinado, é recalcitrante. Mesmo tratando-se de uma porção menor, isto representa toneladas de poluentes impactando

ecossistemas, sendo estes bioacumulados e biomagnificados na cadeia trófica (CRAPEZ et al, 2002).

Figura 3 - Faixa relativa de custos de diferentes tecnologias de remediação de solo expressas em porcentagem. Os custos são calculados com base na área de 1 ha, 0,25 m de profundidade do solo e densidade do solo de 1,2 g cm⁻³



Fonte: Lombi e Hamon (2005).

Durante um derramamento de petróleo, a biodegradação por populações indígenas de microrganismos é o primeiro mecanismo de eliminação destes poluentes do ambiente (ACOSTA-GONZÁLEZ et al, 2015; KIMES et al, 2014). Estudos laboratoriais têm demonstrado a grande quantidade de microrganismos capazes de metabolizar o petróleo ou seus derivados, demonstrando quão grande é a fonte para isolamentos de espécies capazes de compor consórcios microbianos para aplicações como agentes biorremediadores (FARAG et al, 2018; LATHA; KALAIVANI, 2012; PARTHIPAN et al, 2015).

Derrames em condições experimentais trazem esclarecimentos quanto aos resultados de aplicações de preparações de agentes biorremediadores na natureza. Delille et al (2002), testaram a eficiência da biorremediação em petróleo derramado em uma praia da ilha Grande-Terra, no Arquipélago de Kerguelen. O experimento

mostrou que nos pontos em que foram aplicados os “agentes da biorremediação”, o tempo de recuperação foi mais rápido em relação aos pontos que não receberam estes agentes.

Adicionalmente, a biorremediação experimental realizada por Aparna et al (2010), utilizou um preparado de consórcio microbiano para descontaminar sedimentos dragados do Lago de Gandigudem, Índia. Verificou-se, neste estudo, que a bioaugmentação e a bioestimulação foram requeridas para iniciar e sustentar a degradação dos contaminantes dos sedimentos do lago, mostrando que houve utilização dos contaminantes do sedimento pelos consórcios.

Especial atenção é dada aos hidrocarbonetos aromáticos dados os seus efeitos nos sistemas biológicos (MEIRE et al, 2007). Embora diversos hidrocarbonetos aromáticos sejam considerados recalcitrantes, muitos processos contribuem para a degradação destes compostos. Fatores abióticos como a volatilização, a lixiviação e a fotodegradação contribuem para a retirada desses compostos aromáticos da natureza, entretanto o processo mais importante é a biodegradação (BARBIERI, 1997).

Alguns microrganismos, comprovadamente, crescem em culturas, contendo compostos aromáticos como única fonte de carbono e aqueles do gênero *Pseudomonas* estão entre os mais importantes a realizarem esta função (AGARRY et al, 2008; KUMAR et al, 2005). Outros microrganismos, tais como o *Flavobacterium*, *Rhodococcus*, o *Cryseobacterium*, o *Achromobacter* e o *Acinetobacter* são capazes de crescer em gasolina, óleo diesel, benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno, carbazole, fenantreno, naftaleno e imidazol, entre outras moléculas aromáticas (GUO et al, 2008; LU et al, 2006; MANDRI; LIN, 2007; RIGO et al, 2010; SILVA et al, 2009).

2.5 IMPORTÂNCIA AMBIENTAL E BIOTECNOLÓGICA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Acinetobacter*

Os derramamentos de petróleo provocam efeitos negativos sobre a biodiversidade do ambiente de água doce e marinho, mesmo muitos anos após vazamentos de óleo (AZEVEDO-SANTOS et al, 2016; IFELEBUEGU et al, 2017; KINGSTON et al, 2002). O óleo derramado pode afetar uma ampla gama de organismos, como plânctons, invertebrados, peixes, aves, mamíferos marinhos e seres humanos, bem como algumas populações de bactérias, afetando sua diversidade (ADLARD, 2016; BEYER et al, 2016; CATANIA et al, 2018; MORRIS et al, 2018; PERES et al, 2016).

Por outro lado, o derramamento de petróleo também promove a seleção de microrganismos nativos com a capacidade de metabolizar os hidrocarbonetos, aumentando sua população (ACOSTA-GONZÁLEZ et al, 2015; KIMES et al, 2014). Isto ocorre porque já existem hidrocarbonetos no ambiente, tanto de fontes naturais quanto antropogênicas, para serem usados como fonte de carbono e energia (ABDEL-SHAIFY; MANDOUR, 2016; ING; DURHAM, 2017; KIMES et al, 2014; LEA-SMITH et al, 2015). Bactérias degradadoras de óleo estão presentes em, praticamente, todos os solos e sedimentos, onde a densidade populacional aumenta em contato com o óleo contaminante (MORRIS et al, 2018; SHAHI et al, 2017).

Assim, o ambiente natural é a principal fonte de microrganismos que possuem potencial para a biorremediação, existindo mecanismos que podem combinar-se para que comunidades microbianas possam se adaptar à presença de xenobióticos, tais como: populações microbianas tolerantes a xenobióticos aumentam a população; células podem se adaptar por meio de mutações de vários tipos; e as populações bacterianas podem adquirir informações genéticas a partir de outras populações por transferência horizontal (TOP; SPRINGAEL, 2003).

A biodegradação é o primeiro mecanismo natural de retirada de poluentes do ambiente. As bactérias do gênero *Acinetobacter* são descritas como uma das principais biodegradadoras de componentes do petróleo, sendo um grupo importante

na degradação de *n*-alcanos, juntamente com as bactérias do gênero *Pseudomonas* (ABDEL-EL-HALEEM, 2003; CRAPEZ et al, 2002; GEIßDÖRFER et al, 1999). Existem estudos destas bactérias degradando fenol (AHMAD et al, 2017), ftalato (WANG et al, 2017), petróleo bruto (OHADI et al, 2017) e óleo de motor (BASUKI et al, 2011).

As espécies do gênero *Acinetobacter* pertencem ao filo *Proteobacteria*, classe *gammaproteobacteria*, ordem *Pseudomonadales* e família *Moraxellaceae*. Estas bactérias apresentam colônias encapsuladas e são, geralmente, não pigmentadas e mucoides. São quimiorganotróficas, podendo, a maioria, crescer em meio mínimo com acetato, etanol, ou lactato, sendo que poucas podem crescer em meio mínimo com glicose (HARDY DIAGNOSTICS, 2015). O gênero compreende, atualmente, 62 espécies nomeadas (<http://www.bacterio.net/Acinetobacter.html>, último acesso em maio de 2019).

As bactérias do gênero *Acinetobacter* são oxidase-negativas, catalase-positivas, nitrato-negativas, não fermentadoras de lactose em Ágar MacConkey, não-móveis, estritamente aeróbicas, Gram-negativas e aparecem como cocobacilos com arranjo diplococos ao microscópio. Elas podem usar muitas fontes de carbono para o seu crescimento, bem como podem ser cultivadas em meios, relativamente, simples, como o ágar nutriente e o ágar soja triplicaseína (ABDEL-EL-HALEEM, 2003; HARDY DIAGNOSTICS, 2015).

Estudos são realizados com foco no isolamento e na caracterização da atividade destas bactérias, sobre diversos compostos poluentes e xenobióticos, visto que são microrganismos com potencial para a biorremediação. Os substratos empregados para crescimento são fenol (ADAV et al, 2007; CORDOVA-ROSA et al, 2009; SUN et al, 2012; WANG et al, 2007), óleo de motor (BASUKI et al, 2011), óleo diesel (BENTO et al, 2003; BHAWSAR et al, 2012;), petróleo bruto (LAL; KHANNA, 1996), hidrocarbonetos alifáticos (KOMA et al, 2001; SUN et al, 2012; THRONE-HOLST et al, 2007;), clorobenzoato, clorofenol, bifenil e bifenil clorados (ADRIAENS; FOCHT, 1991; FURUKAWA; CHAKRABARTY, 1982; KIM; HAO, 1999), lignina (BUCHAN et al, 2001) e aminoácidos (KIM et al, 2001).

Estas bactérias já foram estudadas e suas enzimas envolvidas em processos de biodegradação, como catecol dioxigenase de *A. radioresistens* (BRIGANTI et al,

1997), bem como foram identificados genes de enzimas de *Acinetobacter* sp. de alcano hidroxilase, rubredoxina e rubredoxina redutase, envolvidos na degradação de n-alcenos de cadeia longa (GEISSDÖRFER et al, 1999; THRONE-HOLST et al, 2007). O gene de catechol 1,2-dioxygenase de *A. radioresistens*, envolvido na degradação de fenol, foi clonado (CAPOSIO et al, 2002) e o proteoma de *Acinetobacter* sp. crescido em benzoato como única fonte de carbono, foi obtido, onde identificaram proteínas relacionadas à via do β -cetoadipato (KIM et al, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os mecanismos de interação com substratos hidrofóbicos da bactéria *Acinetobacter junii* SB132 cultivada em diesel e sequenciar, montar e anotar funcionalmente seu genoma.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) verificar a capacidade de *A. junii* SB132 em crescer em óleo diesel como única fonte de carbono, bem como sua sensibilidade a antimicrobianos;
- b) inferir por análises experimentais os mecanismos utilizados pela *A. junii* SB132 cultivada em diesel para acessar e metabolizar substratos hidrofóbicos;
- c) sequenciar o genoma cromossomal da bactéria utilizando tecnologia de sequenciamento de nova geração;
- d) montar e anotar o genoma bacteriano para predição dos genes codificadores de proteínas e ácidos ribonucleicos, bem como as vias metabólicas presentes no genoma desta bactéria;
- e) descrever a organização estrutural dos genes associados com a biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, bem como as vias metabólicas a qual pertencem;
- f) comparar qualitativamente e quantitativamente os subsistemas de degradação de compostos aromáticos da cepa SB132 com aqueles presentes em diferentes espécies bacterianas biodegradadoras.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DADOS ANTERIORES E AMOSTRA BACTERIANA

A bactéria *Acinetobacter junii* SB132 foi selecionada a partir do grupo de bactérias endofíticas e epifíticas pela habilidade de crescimento em petróleo bruto como única fonte de carbono. Seu isolamento foi realizado por Araújo (2014), a partir da superfície das folhas da macrófita aquática *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, usando o método de isolamento descrito por Pereira et al (1993). Resumidamente, as amostras de plantas foram coletadas em água com indícios de contaminação com óleo no Rio Negro, Manaus, Amazonas, Brasil (3° 08'56.0 "S 59° 57'05.0" W. As cepas bacterianas foram obtidas por crescimento a partir de pedaços de folhas em meio Bushnell Haas Ágar (BH) (Difco) com petróleo bruto como única fonte de carbono (Figura 4). A identificação da cepa SB132 foi realizada utilizando dados de morfologia celular e colônia, sequenciamento de um fragmento da região do rDNA 16S e pelo perfil de proteínas ribossomais, utilizando espectrometria de massas (SOUZA-NETO, 2015).

Figura 4 - Localização do local de coleta das macrófitas aquáticas para isolamento de bactérias endofíticas e epifíticas. A cepa SB132 foi isoladas das filhas de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms coletada de água contaminada com óleo



Fonte: Araújo (2014)

4.2 PERFIL DE CRESCIMENTO E PRESERVAÇÃO

Células de uma única colônia foram transferidas para 5 mL de caldo Luria-Bertani (LB), com o auxílio de um palito estéril, e incubadas a 30°C, sob agitação a 150 rpm, por 24h. Em seguida, 3 mL do meio de cultura foram centrifugados por 3 min, a 10.000 g e descartado o sobrenadante. A massa celular foi ressuspensa em 300 µL de meio Bushnell Haas (BH) estéril para obtenção de uma suspensão celular livre de meio LB residual. A partir desta suspensão, foi realizado o inóculo em 50 mL de meio BH, suplementado com óleo diesel como única fonte de carbono (1% v/v) a um valor de suspensão de 0,01 a 600 nm. A cultura foi incubada a 30°C a 150 rpm e o crescimento celular foi monitorado por um período de 30 dias com três cultivos independentes. A densidade celular foi determinada a cada 24 h por absorbância a 600 nm, usando um espectrofotômetro BioMate3 (Thermo).

As culturas foram mantidas em câmara incubadora com agitação orbital (Innova®43) e as centrifugações foram realizadas na centrífuga 5415 D (Eppendorf). Em paralelo, quando necessária a preservação, 1 mL a partir de uma cultura com 4 dias de crescimento em óleo diesel foi adicionado a 1 mL de meio BH estéril a aproximadamente 50°C e concentrado duas vezes, de modo que resultasse na concentração final de óleo diesel 1 % (v/v) no modo semi-sólido. Os preservados encontram-se mantidos no Laboratório de Proteômica, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Amazonas.

4.3 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

O teste de sensibilidade a antibióticos foi realizado segundo as Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana (NCCLS, 2003), adequando-se algumas condições ao microrganismo-teste. De uma placa de bactérias crescidas por no máximo 24 h, foram retiradas algumas colônias, as quais foram

ressuspendidas em solução salina estéril (0,85% m/v). Mediu-se a densidade celular em espectrofotômetro a 600 nm, ajustando-se o volume da suspensão para 0,1 de absorbância (equivalente ao valor de 0,5 na escala de *McFarland*). Mergulhou-se um palito com algodão estéril na suspensão de células, por alguns instantes, e retirou-se o excesso pressionando-o na parede do tubo. Em seguida, inoculou-se em uma placa (140 mm de diâmetro), contendo 70 mL de meio Müller-Hinton Ágar (MH), por três vezes, girando a placa 60° a cada esfregaço. Após isto, a placa foi deixada em repouso por 3 min a fim de absorver o excesso de umidade. Em seguida, com o auxílio de uma pinça, foi colocado uma unidade de multidiscos de antibióticos (Polisensidisc, DME) sobre o meio de cultura, pressionando-o, suavemente, para assegurar o contato completo com o meio de cultura, seguido de incubação a 30° C, por 18 a 24 h.

Os resultados do teste de sensibilidade foram obtidos pela medição dos diâmetros dos halos, utilizando-se uma régua e considerando-se a área sem crescimento detectável a olho nu. Os resultados permitiram classificar a cepa como resistente, resistência intermediária e sensível aos antimicrobianos, respectivamente, segundo a classificação da instrução do fabricante dos multidiscos e da CLSI (2005). O experimento foi realizado com três réplicas técnicas e as densidades celulares foram obtidas na leitura em 600 nm, usando um espectrofotômetro BioMate3 (Thermo), cuja incubação foi realizada na incubadora TE-392/2 (Tecnal).

4.4 EXPERIMENTOS INTERAÇÃO MICRORGANISMO-SUBSTRATOS

4.4.1 Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados nesta pesquisa foram o LB e meio mineral mínimo BH caldo (Difco). O meio LB caldo foi utilizado para a obtenção de células nos pré-inóculos, bem como para a extração de DNA. Já o meio LB sólido (1,5% ágar m/v) foi utilizado para a obtenção de colônias pela técnica de esgotamento. O meio de

cultura BH foi utilizado na forma semi-sólido (0,75% ágar m/v) com óleo diesel (1% v/v) como única fonte de carbono, para a preservação das células e o BH caldo, acrescido de óleo diesel (1% v/v), para a obtenção do perfil de crescimento, verificação da produção de biosurfactantes e emulsificantes, bem como para a verificação da hidrofobicidade celular. Todos os meios foram autoclavados sem óleo diesel, a 121°C, por 15 min, à pressão de 1,5 atm para esterilização. O óleo diesel foi obtido de um posto de abastecimento, no ano de 2015 e, posteriormente, filtrado em membrana de politetrafluoroetileno (PTFE), de 0,2 µm, e adicionado em cabine de segurança biológica aos meios de cultura, previamente, autoclavados.

4.4.2 Habilidade de Formação de Biofilme

A capacidade de formação de biofilme foi avaliada em microplacas de poliestireno, adaptadas de Poimenidou et al. (2016) e Carneiro et al (2018). Colônias recentes da linhagem SB132 foram transferidas para 5 mL de caldo LB e incubadas a 30°C, com agitação a 150 rpm, por 24h. As células foram diluídas a uma suspensão de 0,1 a 600 nm (equivalente ao valor de 0,5 na escala de *McFarland*; $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) em caldo LB. Em seguida, 100 µL da suspensão bacteriana foram transferidos para os poços da placa de poliestireno de 96 poços e incubadas a 30°C, por 24h. A densidade celular foi medida em leitor de microplaca a 595 nm, os poços foram lavados duas vezes com água destilada e, em seguida, secos à temperatura ambiente durante 60 min. As células aderidas foram fixadas a 80°C, durante 10 min e, posteriormente, coradas com 150 µL de solução de cristal violeta (1% m/v), durante 20 min à temperatura ambiente. Os poços foram lavados três vezes com água destilada e, após, foram adicionados 200 µL de solução de etanol:acetona (80:20) em cada poço. A placa foi armazenada a 4°C, por 15 min e, em seguida, foram transferidos 100 µL da solução para uma nova placa para obter o valor de absorbância a 570 nm.

No experimento, o pré-inóculo foi incubado em câmara incubadora com agitação orbital (Innova®43), cuja suspensão celular foi obtida em espectrofotômetro

BioMate3 (Thermo) a 600 nm e o leitor de microplaca utilizado foi o *Chamaleon* (Hidex), para medidas de 595 e 570 nm de comprimentos de onda, respectivamente. Utilizou-se caldo LB, isento de células, como controle negativo, e utilizou-se *Staphylococcus aureus* ATCC 80958, como formador de biofilme padrão. Três culturas independentes e três réplicas técnicas por cultura para as cepas SB132 e controles foram utilizadas. As médias dos valores de formação de biofilme foram analisadas por Análise de Variância Unidirecional (ANOVA) e pelo método de Tukey, usando o software Past, versão 3.12 (HAMMER et al, 2001) e os dados foram expressos pelo software OriginPro8 SR0 (OriginLab Corporation).

4.4.3 Adesão Bacteriana a Hidrocarbonetos

A adesão celular a substratos hidrofóbicos de células, obtidas de cultivos de 1, 4 e 14 dias de crescimento, foi conduzida de acordo com Rosenberg et al (1980), com modificações. Células frescas foram obtidas segundo o protocolo da seção 4.2, onde 50 mL de cultura foi centrifugada a 3.000 g, por 30 min, a 4°C, e o sobrenadante foi reservado para experimentos adicionais. As células obtidas foram diluídas em caldo BH estéril a uma densidade celular de 0,5 a 600 nm. A adesão aos hidrocarbonetos foi realizada pela adição de 500 µL de substrato hidrofóbico (hexano, xileno ou tolueno) a 1,2 mL de suspensão bacteriana em tubo de vidro com tampa rosqueada (13 x 100 mm), seguido de mistura por 2 min. Após 1h em repouso à temperatura ambiente, a fase aquosa foi recuperada com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro e medida a suspensão celular a 600 nm. A hidrofobicidade da superfície celular foi expressa como a percentagem de aderência celular a substratos hidrofóbicos e foi calculada usando-se a fórmula: aderência celular = $[1 - (\text{absorbância da fase aquosa} / \text{absorbância da suspensão inicial})] \times 100$.

Foram feitas no experimento três culturas independentes com duas réplicas técnicas por cultura. As células crescidas em meio LB caldo por 24h foram usadas como controle experimental. As densidades celulares foram obtidas em

espectrofotômetro BioMate3 (Thermo) a 600 nm, a centrífuga utilizada foi a 5810 R (Eppendorf) e o vortex AP 56 (Phoenix) foi usado para a mistura das células com o substrato hidrofóbico. As médias de aderência celular foram analisadas por Análise de Variância Unidirecional (ANOVA) e pelo método de Tukey, usando o software Past versão 3.12 (HAMMER et al, 2001) e os dados foram expressos pelo software OriginPro 8 SR0 (OriginLab Corporation).

4.4.4 Atividade Emulsificante de Sobrenadante de Cultura

A atividade emulsificante de sobrenadante de cultura obtidas de cultivos de 1, 4 e 14 dias de crescimento foi conduzida de acordo Camacho-Chab et al (2013) e Ortega-Morales et al (2007), com modificações. O sobrenadante fresco foi obtido segundo o protocolo da seção 4.2, onde 50 mL de cultura foram centrifugadas a 3.000 g, por 30 min, a 4°C e o sobrenadante recuperado livre de células. Em seguida, 4 mL de sobrenadante de cultura foram transferidos para um tubo de vidro com tampa rosqueada (15 x 150 mm) contendo 4 mL de solvente orgânico (hexano, xileno, tolueno e óleo diesel) e testados individualmente. O óleo diesel foi adquirido, em 2015, de um fornecedor local e os solventes orgânicos foram de grau analítico (Nuclear e Cromolina). A mistura foi agitada vigorosamente durante 5 min e deixada em repouso, à temperatura ambiente, por 24h. O índice de emulsificação (E24) foi determinado usando-se a fórmula: $E24 (\%) = (\text{altura da camada de emulsão} / \text{altura da solução total}) \times 100$.

Foram feitas no experimento três culturas independentes com duas réplicas técnicas por cultura, cujas densidades celulares foram obtidas em espectrofotômetro BioMate3 (Thermo) a 600 nm, a centrífuga utilizada foi a 5810 R (Eppendorf) e o vortex AP 56 (Phoenix) foi usado para a mistura do sobrenadante com o substrato hidrofóbico. As médias de E24 (%) foram analisadas por Análise de Variância Unidirecional (ANOVA) e pelo método de Tukey, usando o software Past versão 3.12 (Hammer et al., 2001) e os dados foram expressos pelo software OriginPro 8 SR0

(OriginLab Corporation). Utilizou-se meio BH estéril como controle negativo e Triton X-100 e Tween 20 (0,5% v / v) como controles positivos.

4.4.5 Detecção de Produção de Biosurfactantes

A detecção qualitativa da produção de biosurfactantes no sobrenadante de culturas, obtidas de cultivos de 1, 4 e 14 dias de crescimento, foi conduzida de acordo com Jain et al (1991), usando como indicador o colapso de gota de sobrenadante. O sobrenadante foi obtido segundo o protocolo da seção 4.2, onde 50 mL de cultura foi centrifugada a 3.000 g, por 30 min, a 4°C e o sobrenadante recuperado livre de células foi deixado *overnight*, a 4°C. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro, a cultura foi retirada livre de óleo residual e centrifugada por 3 min a 10.000 g. O sobrenadante foi filtrado, usando-se filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,2 µm. Foram aplicados 135 µL de sobrenadante sobre um filme de vedação hidrofóbico (Parafilm) estendido sobre uma superfície para verificar a retenção da configuração de gota.

Foram feitas no experimento três culturas independentes com três réplicas técnicas por cultura, cujas centrífugas utilizadas foram a 5810 R (Eppendorf) e a 5415 D (Eppendorf). Foram usados como controles: água destilada, SDS 0,1%, 1% e 10%.

4.5 ANÁLISE GENÔMICA

4.5.1 Extração, Análise e Quantificação do DNA total

O DNA genômico das células bacterianas foi extraído e purificado, usando o *kit* PureLink® Genomic DNA (Invitrogen). Para a obtenção do lisado celular foram cultivadas células a partir de uma colônia recente da cepa SB32, em 5 mL de meio LB

caldo, a 30°C, a 150 rpm, por 14h. Em seguida, foi centrifugado 1 mL da cultura a 10.000 g, por 3 min, e descartado o sobrenadante. A massa celular foi ressuspensa em 180 µL do tampão de digestão e misturado com 20 µL de proteinase K, usando o vortex. A mistura foi incubada por 30 min a 55°C, em bloco aquecedor (Uniscience). Em seguida, foram adicionados 20 µL de RNase A, cuja mistura foi levemente agitada, usando o vortex e, após, incubada por 2 min em temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de tampão de lise/ligação e misturado bem, usando o vortex, até obter uma solução homogênea. Em seguida, foram adicionados 200 µL de etanol absoluto ao lisado e, novamente, misturou-se bem, usando vortex, para obter uma solução homogênea.

Na etapa de ligação, foram adicionados 640 µL da solução de lisado celular em uma mini coluna baseada em sílica com um tubo coletor e centrifugada a 10.000 g, por 1 min, em temperatura ambiente. O tubo coletor, contendo material não ligado, foi descartado e substituído. Na etapa de lavagem, 500 µL do primeiro tampão de lavagem com etanol foram adicionados à coluna e centrifugado a 10.000 g por 1 min. O lavado foi descartado e a coluna foi, novamente, lavada com 500 µL, usando o segundo tampão de lavagem, seguido de centrifugação, por 3 min, em força máxima da centrífuga.

Para a eluição, com um microtubo coletor novo, foi adicionado à coluna 100 µL de tampão de eluição, o qual foi incubado por 1 min e centrifugado na velocidade máxima por 1 min. Para mais detalhes do procedimento de extração e purificação do DNA genômico, recomenda-se consultar as instruções do fabricante.

Durante o procedimento, a centrífuga utilizada foi a 5415 D (Eppendorf). O DNA genômico extraído e purificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose (0,8% m/v), contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL concentração final) e tampão TBE (Tris-borato-EDTA, pH 7,5), em tampão de corrida TBE 1x. A concentração do DNA foi avaliada, usando o Kit Qubit dsDNA High-Sensitivity HS Assay (Life Technologies) e fluorímetro Qubit, usando as instruções do fabricante para a realização do referido procedimento.

4.5.2 Sequenciamento e Montagem do Genoma

O DNA genômico foi sequenciado em acordo de colaboração com a pesquisadora, Doutora Ana Carolina Paulo Vicente, do Instituto Oswaldo Cruz, do Rio de Janeiro (IOC/Fiocruz), utilizando a plataforma de sequenciamento de alta produtividade *Illumina HiSeq 2500*, pela estratégia *paired-end*. Os tratamentos dos dados brutos, bem como a montagem *de novo* foram realizados pela pesquisadora do Instituto Oswaldo Cruz, de Brasília (IOC/Fiocruz), Doutora Tainá Raiol, usando o programa Velvet, versão 1.2.10 (ZERBINO e BIRNEY, 2008). Os *scaffolds* foram submetidos à avaliação da qualidade da montagem, usando o programa Quast (Gurevich *et al.*, 2013) e o ordenamento da sintenia com o genoma de *Acinetobacter junii* 65 (FOMENKOV *et al.*, 2017) como de referência, usando o programa Mauve (DARLIN *et al.*, 2004; RISSMAN *et al.*, 2009).

4.5.3 Anotação do Genoma

Para a determinação de regiões codificantes e função gênica, os *scaffolds* foram submetidos à anotação no servidor web RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology), onde a predição de sequências foi feita no modo RAST, esquema de anotação Rast Clássico e FIGfam, versão 70, para agrupamento em subsistemas. ARNAmmer version 1.2 (LAGESEN *et al.*, 2007) e o tRNAscan-SE v.1.21 (LOWE; CHAN, 2016) foram usados para predizer sequências gênicas do rRNA 16S e tRNA, respectivamente. Os genes anotados foram extraídos do arquivo de anotação geral e separados em subsistemas, em arquivos com extensão GFF , e carregados juntos aos *scaffolds*, no programa Artemis (RUTHERFORD *et al.*, 2000) para montagem do genoma circular.

4.5.4 Análise Filogenética

A sequência completa do rDNA 16S foi prevista, usando o programa RNAmmer version 1.2 (LAGESEN et al, 2007) e alinhada com as sequências obtidas do GenBank (NCBI), usando o ClustalW (THOMPSON et al, 2002). As penalidades para o Alinhamento Emparelhado foram 10 para abertura da lacuna e 0,1 para extensão de lacunas, e as penalidades para o Alinhamento Múltiplo foram 10 para abertura de lacuna e 0,2 para extensão de lacunas, sendo o restante no modo padrão. Uma árvore de junção dos vizinhos (*Neighbor-joining*) foi gerada, usando o *software* MEGA, versão 7.0.26 (KUMAR et al, 2016). Os valores de confiança, para cada nó na árvore, foram gerados pela análise de *bootstrap*, usando 1.000 permutações dos conjuntos de dados.

4.5.5 Comparação Genômica com Bactérias Biodegradadoras

O genoma de *A. junii* SB132 foi comparado com outros genomas de bactérias que também desenvolvem funções biológicas na biodegradação. Os genomas, obtidos do GenBank do NCBI, foram os seguintes: *Alcanivorax borkumensis* SK2 (NC_008260.1); *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (NC_008726.1); *Cycloclasticus zancoles* 78-ME (NC_021917.1) e *Acinetobacter oleivorans* DR1 (NC_014259.1). Todos os genomas comparados são completos, representados por um único *contig* e dispostos em arquivos com extensão FASTA. O genoma de *Acinetobacter junii* 65 (NZ_CP019041.1) foi usado nas comparações como referência. Os genomas foram re-annotados, no servidor web RAST, nas mesmas condições do genoma da SB132. Para verificação das diferenças nos grupos de genes, os subsistemas de interesse foram extraídos e usados para a comparação na forma de um gráfico de calor.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando estudos laboratoriais agregam-se aos estudos computacionais é possível associar características fenotípicas apresentadas por microrganismos em ensaios de bancada com os dados moleculares provenientes de análises genômicas e proteômicas. Assim, os dados obtidos nesta pesquisa revelam mecanismos de interação microrganismo-substratos hidrofóbicos, que poderão ser utilizados pela cepa SB132 para os hidrocarbonetos do óleo diesel, bem como vias metabólicas e complexos estruturais associados à biodegradação.

Nesta pesquisa, a cepa SB132 foi submetida às análises laboratoriais e de bioinformática, onde foram obtidos dados de capacidade de crescimento em óleo diesel como única fonte de carbono, susceptibilidade a antimicrobianos, níveis de emulsificação de sobrenadante de cultura após crescimento em óleo diesel, aderência celular a substratos hidrofóbico e avaliação da produção de biosurfactantes. O sequenciamento do genoma foi realizado utilizando plataforma de alta produtividade, revelando o seu potencial para a biodegradação.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Bactérias do gênero *Acinetobacter* emergiram como importantes patógenos nosocomiais, podendo apresentar resistência a agentes antimicrobianos (SAHL et al, 2013). Mas, também representam um grupo de bactérias com grande versatilidade metabólica, podendo apresentar grande potencial para a biodegradação de compostos xenobióticos (BERARDINIS et al, 2009). Com base nisto, a resistência da cepa SB132 aos antimicrobianos foi avaliada e os resultados apresentados na Tabela 2.

O antimicrobiano mais eficaz contra a cepa SB132 foi a tetraciclina (30 µg; zona de inibição de 32 ± 2 mm, ponto de ruptura de 15 mm) e a menos eficaz foi a

cefazolina (30 µg, zona de inibição de 21 ± 1 mm, ponto de quebra de 18 mm). É importante ressaltar que os resultados mostram que a cepa SB132 foi sensível a todos os antimicrobianos testados. A ausência de resistência aos antimicrobianos aumenta o potencial de aplicação desta cepa nos processos de biorremediação, isoladamente ou combinada em um consórcio, uma vez que as necessidades de biossegurança são atendidas.

Tabela 2 - Teste de susceptibilidade da cepa SB132 a antimicrobianos.

Antimicrobiano	Código/ massa (µg)	Resistente (R)	Resistência Intermediária (RI)	Sensível (S)	Média Halo	DP	Resultado
Amicacina	AMI 30	≤ 14	15 a 16	≥ 17	27	1	S
Amoxicilina/ Ácido Clavulânico	AMC 30	≤ 13	14 a 17	≥ 18	28	1	S
Ampicilina	AMP 10	≤ 13	14 a 16	≥ 17	27	1	S
Aztreonam	ATM 30	≤ 17	18 a 20	≥ 21	27	2	S
Cefazolina	CFZ 30	≤ 14	-	≥ 15	21	1	S
Cefepime	CPM 30	≤ 18	-	≥ 25	33	1	S
Cefoxitina	CFO 30	≤ 14	15 a 17	≥ 18	29	1	S
Ceftazidima	CAZ 30	≤ 17	18 a 20	≥ 21	28	1	S
Ceftriaxona	CRO 30	≤ 19	20 a 22	≥ 23	29	1	S
Ciprofloxacina	CIP 05	≤ 15	16 a 20	≥ 21	33	2	S
Cloranfenicol	CLO 30	≤ 12	13 a 17	≥ 18	25	1	S
Gentamicina	GEN 10	≤ 12	13 a 14	≥ 15	22	2	S
Meropenem	MPM 10	≤ 14	15 a 17	≥ 18	25	2	S
Sulfazotrim	SUT 25	≤ 10	11 a 15	≥ 16	28	1	S
Tetraciclina	TET 30	≤ 11	12 a 14	≥ 15	32	2	S

Fonte: O Autor (2019)

O teste foi realizado segundo as Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana (NCCLS, 2003) usando multidiscos de antibióticos (Polisensidisc, DME) com concentrações padrão. Os resultados dos tamanhos dos halos foram determinados segundo os limites dos fabricantes dos multidiscos e da CLSI (2005). Ao centro da Tabela 2 estão os valores referência (R,RI e S) para determinação do resultado, sendo R para resistente, RI para resistência intermediária, S para sensível e DP para desvio padrão.

A resistência a antimicrobianos é um fenômeno biológico de adaptação dos microrganismos e revela-se como grande causador de problemas à saúde humana e animal, uma vez que microrganismos resistentes persistem no hospedeiro, podendo levar à morte (ABAT et al, 2018). Esta resistência pode resultar da mutação de genes endógenos, da aquisição de genes exógenos de resistência ou, ainda, da combinação destes dois mecanismos. Os mecanismos mais comuns que levam à resistência a antimicrobianos são os seguintes: a degradação ou alteração enzimática do antimicrobiano, a mutação no seu sítio de ação no microrganismo-alvo, a diminuição da permeabilidade da parede celular e o efluxo ativo das moléculas através da membrana celular (HARBOTTLE et al, 2006).

É possível encontrar resíduos de antimicrobianos e bactérias resistentes a estes no ambiente natural afetado por atividades antrópicas, tais como águas superficiais, solos, alimentos de origem vegetal e cursos de resíduos animais e humanos (FAO, 2018; HIRSCH et al, 1999; KUMAR et al, 2019). Esta contaminação ambiental poderia tornar os microrganismos não clinicamente importantes como reservatórios e propagadores de genes de resistência aos antimicrobianos (AL-GHEETHI et al, 2015; BAQUERO et al, 2008; OTOKUNEFOR et al, 2018; WALSH, 2013).

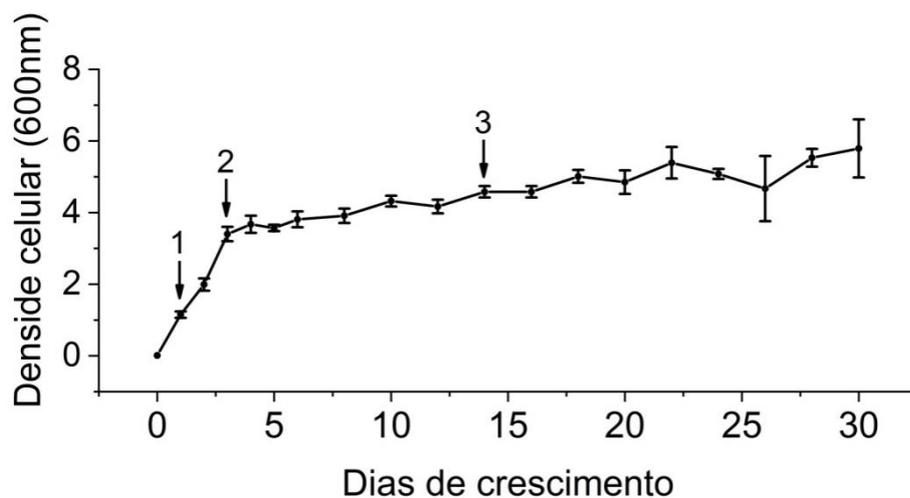
Mesmo que as bactérias do gênero *Acinetobacter* sejam vistas com grande potencial metabólico para aplicações benéficas, existem cepas do mesmo gênero, o complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (Acb), que depõem negativamente para sua utilização (WALLACE et al, 2016). Prova disto, é que em um estudo, no qual foram testadas a sensibilidade a antimicrobianos de 4.686 cepas deste gênero, isoladas de sítios de infecções hospitalares, mais de 50% das bactérias mostraram-se resistentes à maioria dos antibióticos (GALES et al, 2011).

5.2 EXPERIMENTOS DE INTERAÇÃO MICRORGANISMO-SUBSTRATOS HIDROFÓBICOS

5.2.1 Perfil de Crescimento Bacteriano em Óleo Diesel

O óleo diesel é uma mistura complexa de hidrocarbonetos, constituído de, aproximadamente, 75% de hidrocarbonetos saturados – principalmente, n-, iso- e cicloalcanos – e por cerca de 25% de hidrocarbonetos aromáticos, incluindo naftalenos e alquilbenzenos (FONDI et al, 2016). Assim sendo, o crescimento da cepa SB132 foi avaliado sobre o óleo diesel como sua única fonte de carbono, a fim de determinar sua capacidade de crescimento nesta referida fonte, contendo moléculas tóxicas (Figura 5).

Figura 5 - Perfil de crescimento bacteriano sobre óleo diesel como única fonte de carbono. Os valores de densidades celulares ao longo do período de 30 dias foram obtidos pela medida de alíquotas de cultura em espectrofotômetro a 600 nm. Os números 1, 2 e 3 indicadas pelas setas indicam as posições do início da fase exponencial, o fim da fase exponencial e fase estacionária, respectivamente



Fonte: O Autor (2019)

Com relação ao perfil de crescimento mostrado na Figura 5, partindo de um inóculo com densidade celular de 0,01 a 600 nm, a cepa SB132 atingiu densidades elevadas, alcançando valores de, aproximadamente, 4,0 ao final da fase exponencial e 6,0, após 30 dias de crescimento (APÊNDICE A). Mesmo que a taxa de crescimento (valor de crescimento celular em um intervalo de tempo, dividido pelo valor do intervalo de tempo) durante a fase exponencial tenha se mantido elevada até o terceiro dia (dados não mostrados), a designação dos pontos 1, 2 e 3 foram baseados, principalmente, na visualização do comportamento dos dados ao longo do tempo no gráfico.

Estes dados corroboram os resultados quantitativos de degradação, na análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) de sobrenadante de cultura, após o crescimento da cepa SB132, sobre o óleo diesel como única fonte de carbono, revelou as moléculas alifáticas que foram alvo do metabolismo bacteriano. Os experimentos foram conduzidos até um período de 14 dias e indicaram que houve diminuição de 59% de alcanos com 8 carbonos (C8), 86% de alcanos com 12 carbonos (C12), 78% de alcanos com 15 carbonos (C15), 79% de alcanos com 18 carbonos (C18) e 48% de alcanos com 21 carbonos (C21) (CARDENES, 2017).

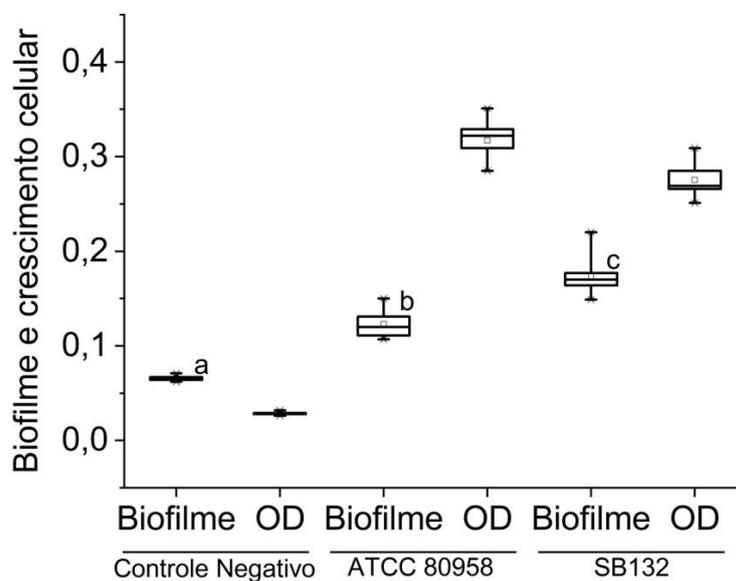
Desta forma, considera-se que a cepa SB132 possui a capacidade de crescimento em óleo diesel como sua única fonte de carbono, fato este observado pela elevada densidade celular sobre este substrato, bem como pela utilização de alguns componentes preferenciais observados por análise em CG-EM. A confirmação destes dados experimentais com os dados moleculares será abordada nas análises de bioinformática em sessões posteriores.

Com base nos dados apresentados, foi determinado que as etapas experimentais posteriores sejam realizadas com culturas de períodos de crescimento de 1, 4 e 14 dias, representando o início e o fim da fase exponencial, além de uma posição na fase estacionária, respectivamente. Estes pontos experimentais contêm quantidades de células suficientes para a experimentação, bem como representam fases metabólicas importantes nas respostas celulares ao meio circundante.

5.2.2 Avaliação da Capacidade de Formação de Biofilme

Os biofilmes são agregados de uma ou múltiplas populações de microrganismos que estão ligados a superfícies abióticas ou bióticas por componentes poliméricos extracelulares (SINGH et al, 2006). Uma vez que esta estrutura pode influenciar na capacidade degradativa, foi realizada a avaliação da formação de biofilme pela cepa SB132 sobre a superfície hidrofóbica e os resultados estão apresentados na Figura 6.

Figura 6 - Avaliação da formação de biofilme pela cepa SB132. *Boxplot* mostrando a formação de biofilme e a densidade óptica da cepa SB132 em microplacas de poliestireno. A formação de biofilme (biofilme) e o crescimento celular (OD) foram medidos em 570 nm e 595 nm de comprimentos de onda, respectivamente. Letras diferentes sobre as caixas representam diferenças significativas de formação de biofilme ($p < 0,05$, usando One-Way ANOVA, método de Tukey)



Fonte: O Autor (2019)

Com base na Figura 6, o nível de biofilme formado pela cepa SB132 (média 0,174; DP 0,02) foi significativamente diferente ($p < 0,005$) do nível do controle negativo (caldo LB, média 0,066; DP \pm 0,003) e também do formador de biofilme padrão (S.

aureus ATCC 80958, média 0,123; DP \pm 0,014). Além disso, mesmo que a taxa de crescimento celular seja maior em *S. aureus* (média 0,317; DP \pm 0,022), a relação biofilme/OD é maior para a linhagem SB132 (0,174 / 0,2756 = 0,630), indicando maior formação de biofilme do que células planctônicas, quando comparado com a cepa controle (0,123 / 0,317 = 0,388) (APÊNDICE B).

Os biofilmes são estruturas que apresentam muitas propriedades diferentes (FLEMMING et al, 2016), uma delas é sua importância na melhoria da degradação de compostos de hidrocarbonetos, tais como aqueles presentes no petróleo bruto (YUAN et al, 2018), ciclohexano, octano, hexadecano, octadecano, óleo diesel (MEHDI; GITI, 2008) e poliestireno (MOR; SIVAN, 2008). Seus efeitos benéficos também levam ao melhoramento da remediação por plantas (fitorremediação) pela inoculação de endófitos bacterianos que formam o biofilme, internamente (FATMA et al, 2016).

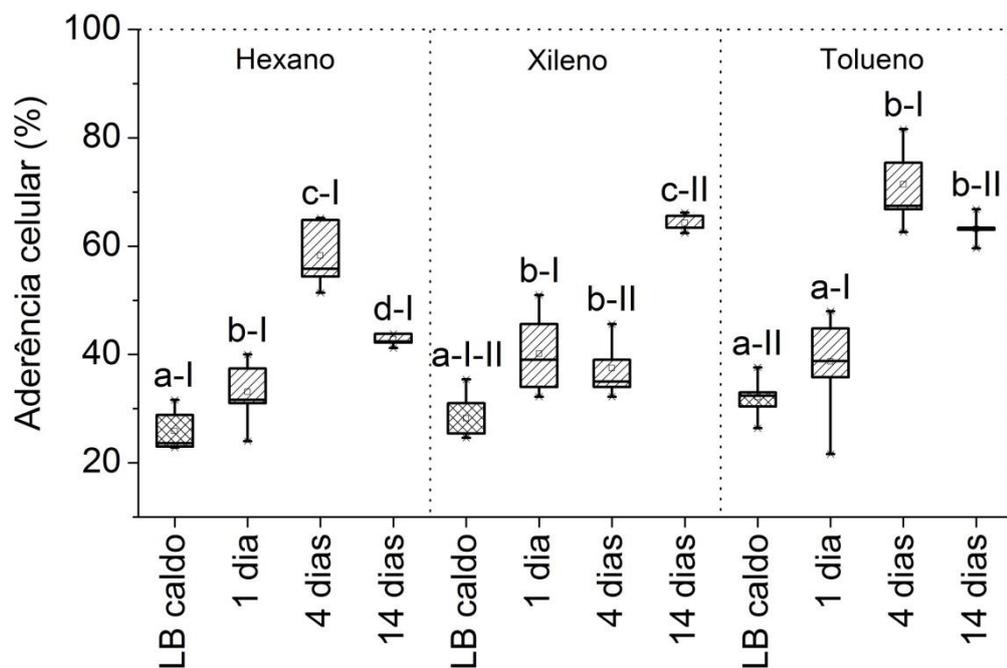
Vale ressaltar que as espécies do gênero *Acinetobacter* já foram descritas como formadoras de biofilme com participação na biodegradação. Em *Acinetobacter* sp. DR1, por exemplo, esta cepa forma biofilme, melhorando a degradação do hexadecano, por um sistema de detecção de quórum (EOM; PARK, 2017; KANG; PARK, 2010). A bactéria *Acinetobacter* sp. PDB4 foi eficiente na degradação de hidrocarboneto aromático policíclico, formando biofilme sob condições de estresse (KOTOKY et al, 2017). Da mesma forma a *A. calcoaceticus* MM5 teve a capacidade de formar biofilme em meios contendo tanto substratos hidrocarbonetos como também substratos solúveis em água como fontes de carbono (MARIN et al, 1996).

Existem evidências factuais da formação de biofilme pela cepa SB132, em cultura de BH, suplementado com óleo diesel como única fonte de carbono. Neste período, a cultura apresentou crescimento bacteriano na forma de uma película esbranquiçada aderida (dados não mostrados), diretamente, sobre a fase oleosa. Assim sendo, os resultados aqui apresentados indicam que a cepa SB132 não somente é capaz de formar biofilmes, como também que esta estrutura pode estar contribuindo para a degradação do óleo diesel.

5.2.3 Adesão Bacteriana a Hidrocarbonetos

Os níveis de biodegradação de compostos hidrocarbônicos podem estar relacionados com o grau de hidrofobicidade celular da superfície de um microrganismo (TEBYANIAN et al, 2014; MOHANTY; MUKHERJI, 2008). Desta forma, neste experimento foi medida a adesão celular da cepa SB132 cultivada em óleo diesel por 1, 4 e 14 dias aos substratos hidrofóbicos hexano, xileno e tolueno, como forma de medir o grau de hidrofobicidade da sua superfície (Figura 7).

Figura 7 -Medição da adesão bacteriana a hidrocarbonetos. *Boxplot* mostrando a aderência celular da cepa SB132 aos substratos hidrofóbicos hexano, xileno e tolueno. As células foram cultivadas em óleo diesel por 1, 4 e 14 dias e em LB por 24h para controle experimental. Letras diferentes (a, b, c e d) sobre as caixas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) nos mesmos substratos hidrofóbicos e diferentes números romanos (I e II) representam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos diferentes substratos hidrofóbicos no mesmo ponto (One-Way ANOVA, método de Tukey)



Fonte: O Autor (2019)

De acordo com a Figura 7, quando as células são cultivadas em meio LB por 24 h, estas não aderem aos substratos hidrofóbicos, não havendo, assim, diferenças

significativas ($p > 0,05$), quando comparados entre os diferentes substratos. Em contraste, as células recuperadas de culturas na presença de óleo diesel, apresentam comportamento indutivo de adesão. As células com 1 dia de crescimento apresentaram a menor adesão em todos os substratos hidrofóbicos. Com exceção da adesão ao xileno, células recuperadas de culturas com maiores períodos de crescimento (4 e 14 dias) mostraram um aumento na adesão celular. Foi observado, ainda, uma diminuição na adesão celular em hexano de células cultivadas durante 14 dias, quando comparadas com 4 dias de crescimento, mas ainda assim foi superior à cultura de 1 dia (APÊNDICE C).

A polaridade dos solventes refere-se ao grau de interação de solventes com solutos-teste polares (<http://macro.lsu.edu/howto/solvents/Polarity%20index.htm>), sendo os solventes hexano (índice de polaridade de 0,1), xileno (índice de polaridade de 2,5) e tolueno (índice de polaridade de 2,4) pouco polares. Em função disto, os solventes citados foram escolhidos para serem usados para medir o grau de hidrofobicidade da superfície celular da cepaSB132 e verificar se as células entram em contato direto com os substratos hidrofóbicos no meio de cultura.

Alguns fatores podem afetar o valor da adesão celular aos substratos hidrofóbicos, entre eles a adsorção de hidrocarbonetos na superfície celular, que poderia aumentar a hidrofobicidade e modificações adaptativas do microrganismo para garantir sua sobrevivência em um meio adverso (KRASOWSKA, SIGLER, 2014; KRACZOREK et al, 2007). No estudo feito em *Pseudomonas putida* DOT-T1E, foram observadas mudanças reversíveis nas propriedades físico-químicas da superfície celular na presença de alcanos, mudanças estas na composição de lipopolissacarídeos de superfície, por meio da liberação de vesículas, com aumento da hidrofobicidade da superfície celular (BAUMGARTEN et al, 2012). Modificações podem acontecer pela presença de biosurfactantes, como em *P. aeruginosa*, onde a presença de ramnolípídeo induziu perdas do lipopolissacarídeos da membrana externa, aumentando a hidrofobicidade celular (AL-TAHHAN et al, 2000).

Estas modificações na superfície celular são todas positivas, uma vez que refletem o potencial microbiano de adaptar-se às diferentes moléculas xenobióticas que são lançadas no ambiente natural em derramamentos acidentais. Além disso,

revelam muito dos mecanismos de interação destes com os substratos hidrofóbicos. Por exemplo, quando *Pseudomonas aeruginosa* RS1 foi exposta ao pireno (hidrocarboneto aromático policíclico de alta massa molecular), houve aumento na sua hidrofobicidade por modificações da superfície celular sem produção de agente biosurfactante e bioemulsificantes (GHOSH; MUKHERJI, 2016).

Sabe-se que espécies do gênero *Pseudomonas* podem aderir à superfície de substratos hidrofóbicos e captá-los sem a necessidade da produção de agentes bioemulsificantes ou biosurfactantes (GOSWAMI; SINGH, 1990). Porém, outras bactérias também desenvolvem os mecanismos para acessar seus substratos, em especial as bactérias do gênero *Acinetobacter*. Rosenberg e Rosenberg (1981) demonstraram que a *A. calcoaceticus* RAG-1 aderente cresceu em hexadecano como única fonte de carbono e a *A. calcoaceticus* MR-481 não-aderente não cresceu no mesmo substrato.

Linhagens bacterianas aderentes podem ser obtidas por particionamento líquido-líquido (solvente e suspensão) em solventes com diferentes graus de polaridade. Obuekwe et al (2008) demonstrou isto, fazendo o particionamento de células de *P. aeruginosa* em solventes com graus de polaridade diferentes e verificou que as células com maior capacidade degradativa foram aquelas provenientes de partições mais hidrofóbicas.

Estruturas celulares também podem ser usadas para aumentar o contato das células com os substratos hidrofóbicos. Obuekwe et al (2008) fez estudo de microscopia de escaneamento eletrônico e verificou que as células de *P. aeruginosa* mais hidrofóbicas apresentaram estruturas semelhantes a *pilus*. É sabido que estas estruturas, quando presentes, podem contribuir com a aderência celular pelo aumento da hidrofobicidade celular, pois possuem alta proporção de aminoácidos hidrofóbicos (DONLAN, 2002). As estruturas tipo *pilus* são necessárias para a aderência das células às superfícies hidrofóbicas bióticas e abióticas em *Acinetobacter baylyi* BD413 (GOHL et al, 2006).

Os resultados aqui mostrados revelam que a cepa SB132 adere aos substratos hidrofóbicos, principalmente, quando esta é cultivada em períodos prolongados em óleo diesel. Possivelmente, os mecanismos de adesão celular sejam

adotados pela cepa como uma etapa inicial para a formação de biofilme, uma vez que, como previamente discutido, houve a observação de crescimento bacteriano, diretamente, na fase oleosa, bem como a corroboração da formação de biofilme no tópico anterior.

5.2.4 Índice de Emulsificação

Os bioemulsificantes são biopolímeros de alta massa molecular que podem emulsionar misturas como óleo e água, o que, por sua vez, contribui para a degradação microbiana de moléculas hidrofóbicas (UZOIGWE et al, 2015). Com base nisso, o sobrenadante de cultura da cepa SB132 foi capaz de emulsificar substratos hidrofóbicos (Tabela 3 e Figura 8).

O experimento foi realizado pela mistura de sobrenadante de cultura com substratos hidrofóbicos e os resultados são expressos como porcentagem (%) da altura da camada de emulsão após 24h de repouso. Emulsificantes sintéticos foram usados como controles positivos a 0,5 % (v/v) e meio BH estéril foi usado como controle negativo (APÊNDICE D).

Tabela 3 - Índice de emulsificação dos sobrenadantes de cultura sobre substratos hidrofóbicos.

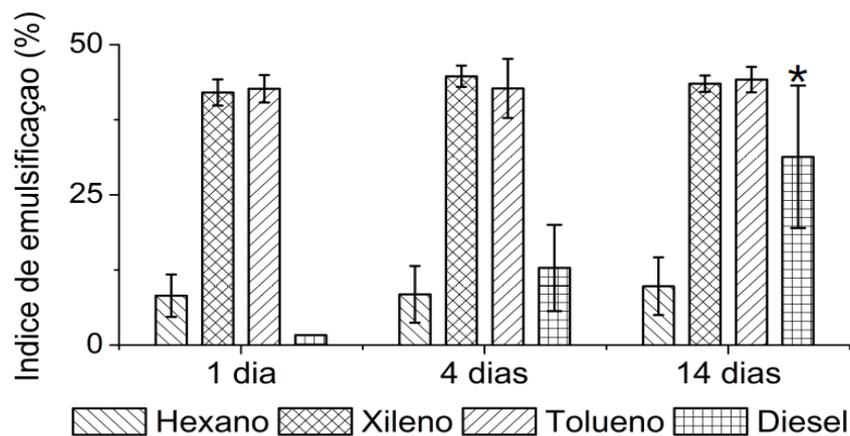
Substratos hidrofóbicos	1 dia	4 dias	14 dias	Emulsificantes sintéticos		Meio BH
				Tween 20	Triton-X-100	
Hexano	8.2 ± 3.5	8.5 ± 4.7	9.8 ± 4.8	58.2 ± 0.5	58.4 ± 1.5	0.0
Xileno	42.0 ± 2.2	44.7 ± 1.8	43.5 ± 1.3	62.7 ± 2.4	59.2 ± 2.9	0.0
Tolueno	42.7 ± 2.3	42.7 ± 4.9	44.2 ± 2.1	63.4 ± 3.0	53.9 ± 12.2	0.0
Óleo diesel	1.7 ± 0.0	12.8 ± 7.2	31.3 ± 11.9	60.6 ± 0.8	60.9 ± 1.4	0.0

Fonte: O Autor (2019)

Com base na Tabela 3, os controles positivos, Tween 20 e Triton X-100, apresentaram maior atividade emulsificante, quando comparados aos sobrenadantes de cultura sobre todos os substratos hidrofóbicos. O meio BH misturado aos

substratos hidrofóbicos não apresentou atividade emulsificante, indicando que qualquer efeito de emulsificação é resultado do metabolismo bacteriano após o crescimento celular. Todos os sobrenadantes de cultura apresentaram atividade emulsificante sobre os substratos testados (Figura 8).

Figura 8 - Índice de emulsificação dos sobrenadantes de cultura sobre substratos hidrofóbicos. O experimento foi realizado pela mistura de sobrenadante de cultura com substratos hidrofóbicos e os resultados são expressos como porcentagem (%) da altura da camada de emulsão após 24h de repouso. No gráfico, o asterisco (*) indica o único valor que foi significativamente diferente ($p < 0,05$) do mesmo substrato hidrofóbico entre os períodos de crescimento ($p < 0,05$, usando One-Way ANOVA, método de Tukey)



Fonte: O Autor (2019)

De acordo com a Figura 8 a atividade emulsificante dos sobrenadantes de cultura sobre os substratos hidrofóbicos não apresentaram diferenças significativas ao longo do período de crescimento avaliado ($p > 0,05$). A menor atividade emulsificante do sobrenadante de cultura foi observada sobre o óleo diesel do sobrenadante, após 1 dia de crescimento bacteriano (média 1,7 %; DP \pm 0,8), mas ao longo dos períodos avaliados (1, 4 e 14 dias) os resultados sobre o hexano foram os menores.

As maiores atividades emulsificantes foram observadas sobre o xileno (média 43,4%; DP \pm 1,3) e o tolueno (43,1% \pm 0,8), entretanto tais valores tiveram pouca

variação ao longo dos períodos avaliados (1, 4 e 14 dias). Em contraste, a atividade emulsificante sobre o óleo diesel aumentou de acordo com o progresso do crescimento bacteriano de 1 dia (média 1,7%; DP \pm 0,0) a 14 dias (média 31,3%, DP \pm 11,9, em 14 dias). No entanto, nestes últimos resultados é observado um grande aumento na variação dos dados em torno da média, demonstrado por grandes desvios-padrão, sendo que apenas a emulsificação de sobrenadante de 14 dias gerou uma média, significativamente, diferente ($p < 0,05$).

A produção de bioemulsificantes pode estar associada à produção de biomassa, ou seja, à medida que a quantidade de células no meio de cultura aumenta, a produção de bioemulsificantes também aumenta (GUDIÑA et al, 2015). Além disso, os bioemulsificantes podem estar associados à superfície celular, sendo liberados posteriormente, como demonstrado no trabalho de Goldman et al (1982), o qual mostrou que o polímero Emulsan, de *A. calcoaceticus* RAG-1, está presente em grande quantidade na superfície celular e em baixa quantidade no meio de cultura, durante o início da fase exponencial. Já no meio da fase exponencial e na fase estacionária há o decréscimo da quantidade do polímero na superfície celular e o aumento deste no sobrenadante de cultura.

A composição do meio de cultura pode influenciar tanto na quantidade de agentes emulsificantes produzidos (MARTINEZ-CHECA et al, 2007) como nas propriedades funcionais e na composição química dos agentes emulsificantes (SUTHERLAND et al, 2001). Estas informações dão ideia do aumento do tamanho da emulsão de sobrenadante em diferentes períodos (1, 4 e 14 dias), quando o substrato hidrofóbico foi o óleo diesel. Mudanças na composição química do meio de cultura, ao longo do tempo, poderiam gerar alterações nos agentes emulsificantes produzidos pela cepa SB132 ou os produtos do metabolismo dos hidrocarbonetos, que permanecem como residuais no sobrenadante, que poderiam não alterar os resultados de emulsificação para os substratos xileno, tolueno e hexano, mas somente para o óleo diesel. No entanto, mais dados são necessários para corroborar ou refutar esta inferência.

Os resultados de emulsificação desta pesquisa apresentam alturas de emulsão maiores sobre o xileno e o tolueno (em torno de 44%), porém abaixo de

valores apresentados na literatura para outros microrganismos. Lopes et al (2014) obteve resultado de emulsificação para *Bradyrhizobium elkanii* selvagem em torno de 30% em óleo diesel, sendo que suas mutantes alcançaram valores em torno de 70% de emulsificação. Xia et al (2015), testando *Anoxybacillus* sp., obteve emulsão em torno de 60% sobre vários substratos hidrofóbicos, entre eles hexano, heptano e petróleo bruto. Gudiña et al (2015), testando *Paenibacillus* sp., obteve emulsão maiores que 50% sobre xileno, tolueno e hexano. No entanto, o grau de pureza dos emulsificantes dos microrganismos testados pelos referidos autores, que normalmente eram formas isoladas, não permite uma comparação normalizada com os agentes emulsificantes da cepa SB132, presentes no sobrenadante de cultura.

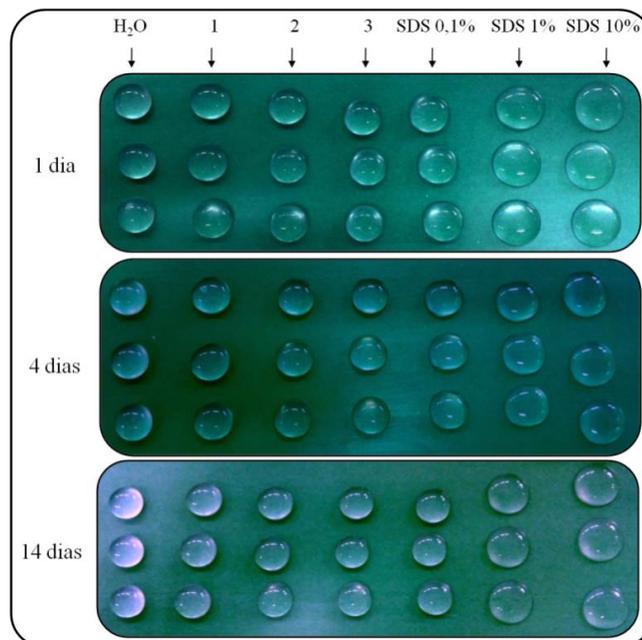
Agentes emulsificantes produzidos pelas espécies do gênero *Acinetobacter* são relatadas, bem como sua composição química determinada. A bactéria *A. radioresistens* KA53 produz um agente bioemulsificante nomeado de Alasan que possui alta massa molecular e é um complexo de polissacarídeo e proteína (TOREN et al, 2002). A bactéria *A. venetianus* RAG-1 produz um exopolissacarídeo complexo que possui atividade emulsificante eficiente em estabilizar água em óleo, na qual a fração ativa é chamada de exopolissacarídeo eletrolítico (BARNHARTA et al, 2012). A bactéria *A. calcoaceticus* BD4 produz o agente bioemulsificante chamado de Emulsan, que é composto de proteína e polissacarídeos (KAPLAN; ROSEBERG, 1987).

Os dados de emulsificação obtidos nesta pesquisa mostram que a cepa SB132 produz agentes bioemulsificantes que, baseado na literatura, poderiam auxiliar esta bactéria no contato com os substratos hidrofóbicos presentes no óleo diesel. No entanto, dado os valores de altura de emulsão, os quais, normalmente, são menores que os valores apresentados pelos microrganismos na literatura, não é possível afirmar o quão predominante é a utilização deste mecanismo durante o metabolismo de hidrocarbonetos.

5.2.5 Avaliação Qualitativa da Produção de Agentes Biosurfactantes

A produção de agentes biosurfactantes é descrito como um dos mecanismos adotados pelas bactérias para entrar em contato com os substratos hidrofóbicos por meio da formação de estruturas micelares (pseudosolubilização) (HUA; WANG, 2014), ou por alterações das propriedades físico-químicas da superfície celular bacteriana (AL-TAHHAN et al, 2000). Com base nisto, no presente estudo, foi avaliada a produção de agentes biosurfactantes pela cepa SB132 quando cultivada na presença de óleo diesel como única fonte de carbono em períodos de 1 dia, 4 dias e 14 dias (Figuras 9).

Figura 9 - Avaliação da produção de agentes biosurfactantes. Para o teste de colapso de gota, a cepa SB132 foi cultivada em óleo diesel como única fonte de carbono nos períodos de 1 dia, 4 dias e 14 dias. As culturas livres de células foram filtradas em membrana de polietersufona (PES) de 0,2 μm . Dodecil sulfato de sódio (SDS) foi utilizado como controle positivo e água destilada como controle negativo. Os resultados são expressos pela mudança de configuração de gota quando comparados com água destilada. Na Figura, 1, 2 e 3 se referem as réplicas biológicas (linhas) com três réplicas técnicas (colunas)



Fonte: O Autor (2019)

De acordo com a Figura 9 houve diferenças na configuração de gota da água destilada, quando comparada com os controles experimentais SDS 1,0 e 10,0%, em todos os tempos mostrados, indicando que os controles estão seguros para serem usados como referência de comparação. A solução de SDS na concentração de 0,1% apresentou baixo espalhamento sobre a superfície hidrofóbica, enquanto que a solução de SDS a 1% apresentou espalhamento intermediário e a solução de SDS a 10% apresentou maior espalhamento. Já os sobrenadantes de culturas avaliados no teste de colapso de gota apresentaram pouca mudança de configuração de gota, quando comparados com água destilada nos sobrenadantes dos três períodos de cultivo (1, 4 e 14 dias).

A determinação de cepas produtoras de agentes biosurfactantes pode ser feita pelo teste de colapso de gota, uma vez que utiliza da propriedade simples em romper a tensão superficial entre duas fases imiscíveis (JAIN et al, 1991; TUGRUL; CANSUNAR, 2005). Desta forma, segundo os resultados obtidos nesta pesquisa, a cepa SB132 produz pouco ou nenhum agente biosurfactante, de maneira que não rompeu a tensão superficial produzida pela água (polar) em contato com a superfície hidrofóbica (apolar).

Dadas às características físico-químicas dos hidrocarbonetos era esperado que um dos mecanismos adotados pelos microrganismos para assimilar estes compostos fosse a produção de agentes biosurfactantes. Devido a sua natureza anfipática, os biosurfactantes podem emulsionar hidrocarbonetos, aumentar a sua solubilidade em água, diminuir a tensão superficial, aumentar o deslocamento de substâncias oleosas das partículas do solo, auxiliar no transporte e translocação dos substratos insolúveis através das membranas celulares e ajudar a separar as bactérias das gotículas de óleo, após o esgotamento do hidrocarboneto utilizável (HUA; WANG, 2014).

Algumas bactérias do gênero *Acinetobacter* são descritas como produtoras de agentes biosurfactantes. Bao et al (2014), isolou a bactéria *Acinetobacter* sp. D3-2, produtora de biosurfactante, a partir de solo contaminado com petróleo e determinou a sua estrutura química, sendo esta uma mistura de diferentes lipopetídeos ou

isoformas. Zou et al (2014) caracterizou e otimizou a produção de agente biosurfactante produzido por *A. baylyi*, sendo este um lipopeptídeo.

Segundo Ozoigwe et al (2015) os termos biosurfactantes e bioemulsificantes têm sido usados de maneira intercambiáveis para descrever moléculas ativas de superfície. O mesmo autor afirma, no entanto, que estes dois termos referem-se a dois grupos de moléculas com composição química, papéis na natureza e aplicações diferentes. Além do tamanho molecular, os biosurfactantes são ótimos na redução da tensão superficial e interfacial entre diferentes fases, possuindo uma baixa concentração micelar crítica (CMC), formando emulsões estáveis. Os bioemulsificantes têm muitas propriedades em comum com os biosurfactantes, mas se diferem, principalmente, pelo tamanho molecular e pela menor capacidade em romper a tensão superficial. Por isso, medidas de tensão superficial e índice de emulsificação não são correlatos e devem ser usados para detectar diferentes grupos de moléculas (OZOIGWE et al, 2015; WILLUMSEN et al, 1997).

Com base nos dados obtidos nesta pesquisa, a cepa SB132 não apresentou produção de agentes biosurfactantes, sendo indicativo que esta cepa pode não ser uma boa produtora destas moléculas nas condições experimentais avaliadas. Possivelmente, esta bactéria utiliza, predominantemente, sua capacidade em aderir, diretamente, nos substratos hidrofóbicos presentes no óleo diesel, formando biofilme, acompanhado da produção, em níveis menores, de agentes bioemulsificantes para captar os hidrocarbonetos no óleo diesel e, assim, metabolizá-los pelas vias de degradação descritas em tópicos posteriores.

5.3 ANÁLISE GENÔMICA

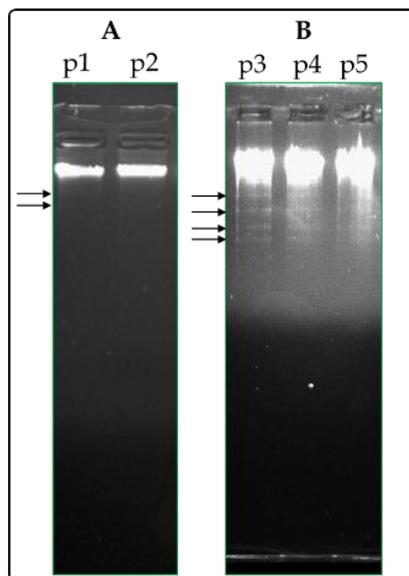
5.3.1 Quantificação e Análise por Eletroforese do DNA Total

A extração de DNA consiste em uma etapa de obtenção de material genético para ser utilizado em subseqüentes processos com propósitos analíticos ou preparativos, sendo que a obtenção de grandes quantidades de DNA genômico intacto, de fita dupla, altamente concentrado e não contaminado é pré-requisito para análises bem sucedidas e confiáveis (PSIFIDI et al, 2015; TAN; YIAP, 2009). Os resultados obtidos para extração de DNA total da cepa SB132 são apresentados na figura 10.

No gel de agarose (Figura 10 A e B) são visíveis na mesma altura de deslocamento, as bandas do gDNA e estas se encontram íntegras, sem arrastes e sem contaminação com RNA. É observado que as bandas encontram-se bastante densas, devido sua alta concentração, além disso, apresentam bandas plasmidiais, indicadas pelas setas. Possíveis contaminações foram evitadas por uma eficiente e cuidadosa execução nas etapas de purificação celular (SOUZA-NETO, 2015), preservação bacteriana, reativação das células, pré-inóculos, inóculos e extração do DNA (utilizando kits).

Mesmo que não tenha sido quantificado usando a absortividade no ultravioleta (UV), é esperado que a amostra possua alta pureza, pois, tipicamente, as amostras de DNA que foram isoladas, usando o *kit* PureLink têm uma razão de absortividade em 260/280nm maior do que 1,8. Isto porque o *kit* de extração utiliza enzimas que degradam proteínas e RNA, fazendo uso de colunas baseadas em sílica que permitem a lavagem, purificação e eluição do gDNA puro (Manual do fabricante do PureLink® Genomic DNA Kits).

Figura 10 - Perfil eletroforético do gDNA da cepa SB132. A extração foi realizada usando o kit PureLink (Invitrogen), analisado em gel de agarose 0,8% (m/v) com tampão TBE 1X e corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL (m/v)). Em A, análise de gDNA da primeira extração, os quais foram aplicados nos poços (p1 e p2) 1 µL. Em B, análise de gDNA da segunda extração, os quais foram aplicados nos poços (p3, p4 e p5) 3 µL. As setas indicam bandas de DNA plasmidial



Fonte: O Autor (2019)

A amostra de gDNA foi quantificada, usando o *kit* Qubit dsDNA High-Sensitivity HS Assay e fluorímetro Qubit, onde foram obtidos valores de 350 ng/µL para a réplica p1 e p2 (Figura 10 A). Estes valores foram satisfatórios, pois para uma alta acurácia na quantificação são necessárias quantidades maiores de DNA, quando comparado à biblioteca que será sequenciada (ROBIN et al, 2016). Além disso, são recomendadas maiores quantidades de DNA para métodos de preparação de biblioteca que utilizem a fragmentação física da amostra ou que não tenham a etapa de PCR para o enriquecimento de fragmentos ligados a adaptadores nas extremidades (DOYLE, 2015).

5.3.2 Sequenciamento e Montagem do Genoma

O genoma da cepa SB132 foi sequenciado e montado em um acordo de colaboração com pesquisadoras do Instituto Oswaldo Cruz (RJ), cujos resultados encontram-se depositados na base de dados genéticos do NIH (em português, Instituto Nacional de Saúde), sob o código SDMM00000000.1, na forma de um projeto de sequenciamento de genoma completo (WGS). Estes dados podem ser acessados pelo site do NCBI (em português, Centro Nacional de Informação Biotecnológica - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Tabela 4).

Tabela 4 - Descrição global do sequenciamento e da montagem do genoma.

Métricas	Valores
Total de nucleotídeos (Ns)	2.064.489.184
Total de <i>reads</i> (tr)	10.183.879
Reads usadas na montagem (84%)	8.559.628
Cobertura ((Ns/ct)x0.84)	502x
Comprimento total de sequências (ct)	3.454.836
Comprimento total sem <i>gaps</i>	3.454.553
Número de <i>scaffolds</i>	63
Maior <i>scaffold</i>	337.637
Menor <i>scaffold</i>	501
Tamanho médio dos <i>scaffolds</i>	54.839
<i>Scaffold</i> N50	140.974
<i>Scaffold</i> L50	8
Número de <i>contigs</i>	75
<i>Contig</i> N50	138.073
<i>Contig</i> L50	9

Fonte: O Autor (2019)

Foram sequenciados um total de 2.064.489.184 de nucleotídeos em 10.183.879 de *reads*, usando a plataforma *Illumina HiSeq 2500*, sendo que após tratamentos de qualidade foram utilizadas 8.559.628 *reads*, equivalentes à 84%. Como o sequenciamento foi no modo *paired-end*, a montagem *de novo* das *reads* gerou 63 *scaffolds*, a partir de 75 *contigs*, com cobertura de 502x. O tamanho do genoma obtido foi de 3.454.838 pb (3,45 Mb), sendo o maior *scaffold* com 337.637 pb,

e o menor, com 501 pb. O N50 e o L50 dos *contigs* foram de 138.073 e 9, respectivamente, e o N50 e o L50 dos *scaffolds* foram de 140.974 e 8, respectivamente. O conteúdo de GC obtido foi de 38,4%.

De acordo com os dados do sequenciamento e montagem do genoma mostrados na Tabela 4, as informações com relação ao tamanho e ao conteúdo de GC, corroboram com os dados disponíveis na base de dados GenBank. São 29 genomas descritos para a espécie *Acinetobacter junii*, com apenas três genomas obtidos na forma circular. O maior genoma depositado é de 3,78 Mb, para a cepa CIP 107470, e o menor, de 2,43 Mb, da cepa UBA8890, sendo que seus respectivos conteúdos de GC também são de 38,6% e 38,3%, respectivamente, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>).

Para que um procedimento de anotação genômica seja efetuado é necessário que, primeiramente, a montagem esteja pronta e critérios de qualidade sejam avaliados (YANDELL; ENCE, 2012). Desta forma, as análises de qualidade, usando o programa Quast (Tabela 5), dos 63 *scaffolds*, da cepa SB132, revelaram que apenas 79,39% da montagem apresentou cobertura no genoma de referência (*A. junii* 65), equivalente a 2.683.547 pb, de sequências de DNA. Os *scaffolds* apresentaram um total de 2.684.907 pb alinhados ao genoma de referência, sendo 100.281 pb o maior alinhamento contíguo. A taxa de duplicação foi de 1,001 ($2.684.907/2.683.547 > 1$), indicando que há sequências duplicadas nos *scaffolds* que se sobrepõem a uma mesma sequência no genoma de referência.

Adicionalmente, a montagem do genoma da cepa SB132 apresentou 86 *misassemblies* em 23 *scaffolds*, sendo todas realocações de sequências de DNA (distantes mais do que 1 kb), 89 *misassemblies* locais (distantes menos que 1 kb e mais do que 85 pb), 50.253 *mismatches* e 1.079 *indels* (2.551 pb). Além disso, em tamanho de sequência, a montagem apresentou 135.665 pb de DNA não alinhados ao genoma de referência e 634.264 pb de DNA que tiveram alinhamento parcial (*gaps* maiores que 500 pb) presentes em 30 *scaffolds*.

Tabela 5 - Avaliação da qualidade da montagem do genoma da cepa SB132.

	Métricas	Valor
	<i>Misassemblies</i>	86
	# realocações	86
	# translocações	0
<i>Misassemblies</i>	# inversões	0
	# Contigs com <i>Misassemblies</i>	23
	Comprimento dos <i>Misassemblies</i>	2.994.474
	# <i>Misassemblies</i> locais	89
	<i>Mismatches</i>	50.253
	# Inserções/deleções (<i>indels</i>)	1.079
<i>Mismatches</i>	Comprimentos dos <i>indels</i>	2.551
	# <i>indels</i> (<= 5 bp)	1.013
	# <i>indels</i> (> 5 bp)	66
	# N's	283
	# <i>Contigs</i> totalmente não alinhados	29
<i>Unaligned</i>	Comprimento total de sequências não alinhadas	135.665
	# <i>Contigs</i> parcialmente não alinhados	30
	Comprimento de não alinhados parcialmente	634.264

Fonte: O Autor (2019)

De acordo com a Tabela 5 a quantidade de *scaffolds* que não se alinhou ao genoma de referência foi 29, com uma quantidade de DNA de 4,6% do total da montagem. No entanto, este valor aumenta para 26%, quando também são contabilizadas as bases com alinhamento parcial. Concordantemente, os *scaffolds* que não alinharam, em sua maioria, possuem tamanhos de sequências abaixo de 7.000 pb (Tabela 6). Os resultados desta avaliação foram corroborados com os resultados de comparação com o genoma de *A. junii* lzh-X15, como referência, a qual resultou em 31 *scaffolds*, completamente, não alinhados ao novo genoma de referência (dados não mostrados).

Tabela 6 - Distribuição dos *scaffolds* não alinhados ao genoma de referência usando o programa Quast.

Identificação <i>Scaffolds</i>	Tamanho (pb)	Tamanho acumulado	Nx(%)	continuação...			continuação...					
				Identificação <i>Scaffolds</i>	Tamanho (pb)	Tamanho acumulado	Nx(%)	Identificação <i>Scaffolds</i>	Tamanho (pb)	Tamanho acumulado	Nx(%)	
24	337.637	337.637	10	5	58.287	3.003.770	87	45	45	2.246	3.434.673	99
19	302.623	640.260	19	11	55.361	3.059.131	89	41	41	1.848	3.436.521	99
31	226.998	867.258	25	26	52.351	3.111.482	90	48	48	1.816	3.438.337	100
14	199.742	1.067.000	31	7	50.435	3.161.917	92	39	39	1.715	3.440.052	100
29	184.238	1.251.238	36	12	47.965	3.209.882	93	58	58	1.512	3.441.564	100
20	175.689	1.426.927	41	32	44.750	3.254.632	94	49	49	1.483	3.443.047	100
23	172.261	1.599.188	46	22	33.635	3.288.267	95	50	50	1.416	3.444.463	100
13	140.974	1.740.162	50	21	30.503	3.318.770	96	16	16	1.247	3.445.710	100
8	140.649	1.880.811	54	33	22.356	3.341.126	97	52	52	974	3.446.684	100
3	130.401	2.011.212	58	4	14.229	3.355.355	97	60	60	905	3.447.589	100
25	122.383	2.133.595	62	62	14.169	3.369.524	98	46	46	886	3.448.475	100
18	102.527	2.236.122	65	57	12.450	3.381.974	98	47	47	834	3.449.309	100
10	102.509	2.338.631	68	27	9.335	3.391.309	98	55	55	826	3.450.135	100
17	101.721	2.440.352	71	34	6.671	3.397.980	98	44	44	658	3.450.793	100
2	91.649	2.532.001	73	38	6.334	3.404.314	99	54	54	658	3.451.451	100
28	91.638	2.623.639	76	35	5.587	3.409.901	99	51	51	630	3.452.081	100
30	73.070	2.696.709	78	40	5.271	3.415.172	99	43	43	589	3.452.670	100
6	65.497	2.762.206	80	36	5.161	3.420.333	99	56	56	589	3.453.259	100
15	63.770	2.825.976	82	37	4.836	3.425.169	99	42	42	554	3.453.813	100
1	59.852	2.885.828	84	53	4.805	3.429.974	99	59	59	522	3.454.335	100
9	59.655	2.945.483	85	61	2.453	3.432.427	99	63	63	501	3.454.836	100

Fonte: O Autor (2019)

Na Tabela 6, os *scaffolds* estão organizados em ordem decrescente de tamanho. O tamanho acumulado é feito pela soma acumulada, sucessiva, do primeiro ao último *scaffold* e o Nx representa a porcentagem (%) do tamanho acumulado. Quadrados marcados, em verde, indicam os *scaffolds* que não se alinharam completamente ao genoma de *A. junii* 65 como referência, usando o programa Quast.

Para entendimento dos termos acima adotados, segundo o manual do Quast (<http://quast.bioinf.spbau.ru/manual.html#sec3.1.3>) define-se como *Misassemblie*, quando uma sequência flanqueadora, à esquerda de um ponto de quebra na montagem, alinha a 1 kb de distância à direita no genoma de referência ou se sobrepoem em 1kpb (realocação) ou se alinham invertidos (inversão) ou se alinham a diferentes cadeias cromossômicas ou em diferentes genomas (translocação). Um *misassemblie* local considera que a distância de alinhamento seja menor que 1kpb, maior que o comprimento máximo de deleção (85 pb) e no mesmo cromossomo. O

termo *mismatch* refere-se às incompatibilidades encontradas no DNA da montagem, quando comparadas ao genoma referência, sem distinguir SNPs e erros de sequenciamento. O termo *unaligned* compreende os *scaffolds* que não alinham a nenhuma sequência no genoma referência (*total unaligned*) ou quando o não alinhamento é maior que 500 pb (*partial unaligned*).

Devido às limitações das tecnologias de sequenciamento de nova geração que usam *reads* curtas, a maioria dos genomas recém-sequenciados permanece como “rascunhos” na forma de *scaffolds*, que são representações incompletas do conteúdo genético. Desta forma, dificulta algumas análises genômicas e estruturais, bem como resultando na ausência de genes que ficam localizados em *gaps* ou em regiões com erros de montagem (KREMER et al, 2017). Assim, considerando as montagens contendo conjuntos de *scaffolds*, uma maneira de avaliar a qualidade da montagem em rascunhos é calcular o N50 (Tabela 6).

O N50 é o comprimento do menor *scaffold*, de um conjunto de *scaffolds*, organizados em ordem decrescente de tamanho, cujas somas, acumuladas, tenham 50% do genoma (DEL ANGEL et al, 2018; GUREVICH et al, 2013). É a métrica padrão mais frequentemente usada para avaliar montagens de genoma (Del Angel et al., 2018), sendo que, normalmente, é usada para avaliar qualidade de montagens *de novo*, ao contrário da montagem por genoma de referência que avalia a quantidade total de *reads* mapeadas e a quantidade de *reads*, unicamente, mapeadas (ZHOU; ROKAS, 2014).

Não existem regras rigorosas para o melhor valor de N50, sendo que o valor mais adequado é aquele que tiver o valor ao redor do comprimento mediano dos genes do organismo, tendo então aproximadamente 50% dos seus genes contidos em um *scaffold* (YANDELL; ENCE, 2012). No entanto, além do N50, o tamanho do maior *scaffold* também é bastante utilizado em abordagens experimentais, onde se pretende comparar ferramentas de montagem *de novo* de genomas (ILLUMINA, 2010; LI et al, 2019).

No entanto, existem problemas de ordem técnica durante a montagem *de novo* de genomas em função da presença de sequências repetidas no genoma, principalmente aquelas que são maiores que os tamanhos das *reads*. Estas repetições

podem criar *gaps*, deixando a montagem muito fragmentada e as repetições podem ser colapsadas, erroneamente, umas sobre as outras e causar rearranjos complexos e montados, também erroneamente. Tais repetições podem criar novos caminhos durante a execução do algoritmo de montagem, criando novos caminhos que resultam em sequências quiméricas. Assim, o problema essencial com as repetições é que um montador não pode distingui-las, o que significa que as regiões que as cercam podem ser facilmente, montadas incorretamente (TREANGEN; SALZBERG, 2013).

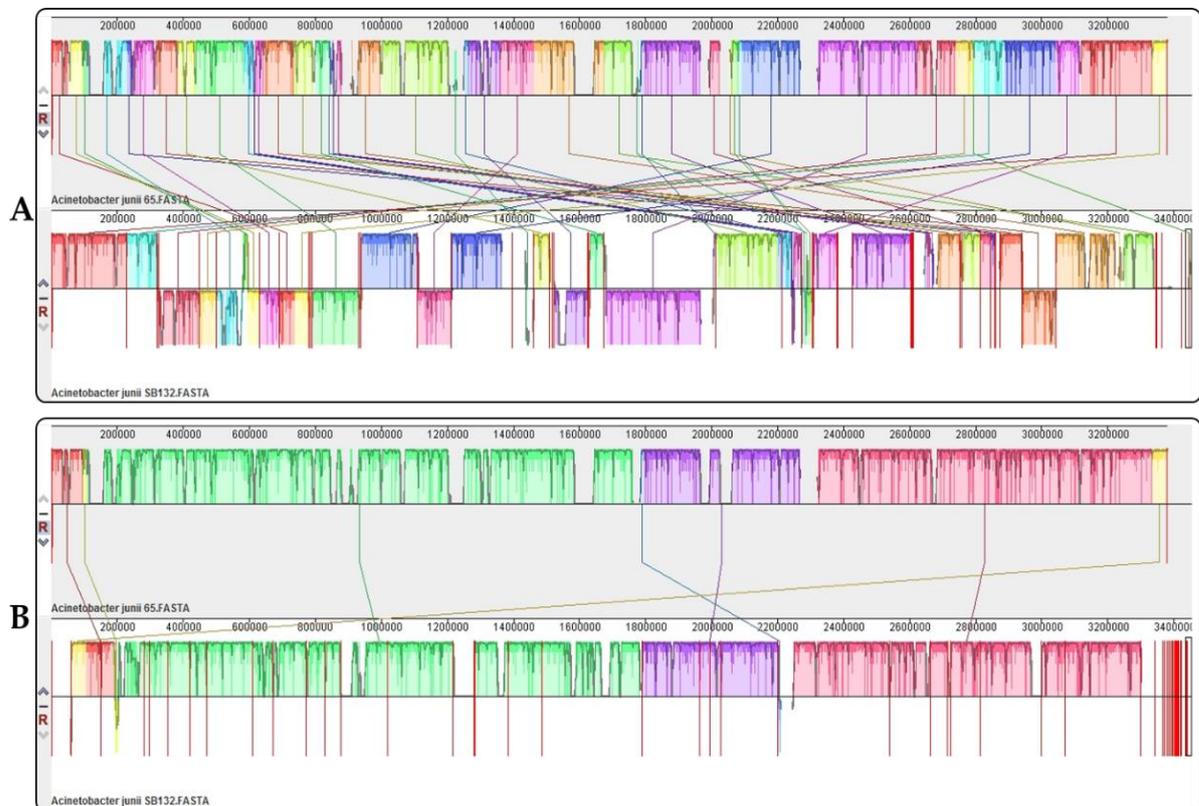
Com a finalidade de orientar os *scaffolds* em uma ordem que reflita a sintenia das sequências de DNA da montagem do genoma da cepa SB132, o ordenamento foi realizado utilizando o programa Mauve, tendo o genoma de *A. junii* 65 como referência (Figura 11). Diferentemente do Quast que utiliza o alinhador Nucmer do programa MUMmer v3.23 com algoritmo Smith-Waterman (GUREVICH et al, 2013; KURTZ et al, 2004), o Mauve utiliza abordagem heurística que resulta em um gráfico de sintenia com o ordenamento dos genomas, considerando eventos significativos de rearranjos genômicos de maneira que estes não interferiram na qualidade dos resultados (DARLING et al, 2004).

Com base na Figura 11 em “A”, antes do ordenamento, o alinhamento dos genomas da cepa SB132 e 65 apresentou um grande número de conexões entre os blocos colineares locais, indicadas pelas diversas conexões existentes entre os dois genomas. Este resultado era esperado uma vez que os *scaffolds*, provenientes do programa Velvet, são não ordenados, mesmo com a tentativa de *scaffolding*, usando os pares de *reads* (ZERBINO; BIRNEY, 2008). Além disso, o alinhamento no Mauve considera a ordem das sequências contidas em um arquivo de entrada em formato FASTA, procedendo à redistribuição somente após comando.

A melhor distribuição dos *scaffolds* foi obtida no quinto ordenamento, não havendo mais modificações deste ordenamento a partir desta análise (Figura 11 “B”). Este melhor ordenamento pode ser visualizado pelo melhor alinhamento, mostrando um menor número de blocos colineares locais, sendo 7 no total. Porém, ao lado direito da Figura em “B” são visualizadas várias linhas vermelhas verticais, indicando que existem vários *scaffolds* que não alinharam ao genoma de referência. Dados

semelhantes foram obtidos, usando a cepa *A. junii* lzh-X15 como referência, onde, após ordenamento da montagem, observa-se um perfil de ordenamento semelhante ao obtido com a cepa 65, possuindo também rearranjos estruturais (dados não mostrados).

Figura 11 - Ordenamento dos 63 *scaffolds* da montagem do genoma da cepa SB132. O ordenamento foi realizado no programa Mauve, versão 20150226, usando o genoma de *A. junii*65 como referência. Em “A” está representado o alinhamento da cepa SB132 com o genoma de referência, antes do ordenamento e, em “B”, após o ordenamento dos *scaffolds* com o genoma de referência. Cada região de cor contígua é um bloco colinear local, uma região sem rearranjo no esqueleto da sequência homóloga. Blocos colineares locais abaixo da linha central estão na orientação do complemento reverso em relação ao genoma de referência. Linhas verticais vermelhas indicam os limites dos *scaffolds*



Fonte: O Autor (2019)

O número de *scaffolds* não alinhados ao genoma de referência, usando o programa Mauve, contabiliza um total de 30 (Tabela 7). Porém, alguns *scaffolds* alinhados usando o programa Quast, não alinharam completamente, quando usado o Mauve (*scaffolds* 57, 36 e 51), bem como vice-versa (*scaffolds* 15 e 16). No entanto,

concordantemente, os *scaffolds* não alinhados são os menores do conjunto total de *scaffolds*, tal como aqueles apresentados no Quast.

Tabela 7 - Distribuição dos *scaffolds* não alinhados ao genoma de referência usando o programa Quast e Mauve

Identificação <i>Scaffolds</i>	Tamanho (pb)	Tamanho acumulado	Nx(%)	continuação...			continuação...						
				Identificação <i>Scaffolds</i>	Tamanho (pb)	Tamanho acumulado	Nx(%)	Identificação <i>Scaffolds</i>	Tamanho (pb)	Tamanho acumulado	Nx(%)		
24	337.637	337.637	10	5	58.287	3.003.770	87	45	45	2.246	3.434.673	99	
19	302.623	640.260	19	11	55.361	3.059.131	89	41	41	1.848	3.436.521	99	
31	226.998	867.258	25	26	52.351	3.111.482	90	48	48	1.816	3.438.337	100	
14	199.742	1.067.000	31	7	50.435	3.161.917	92	39	39	1.715	3.440.052	100	
29	184.238	1.251.238	36	12	47.965	3.209.882	93	58	58	1.512	3.441.564	100	
20	175.689	1.426.927	41	32	44.750	3.254.632	94	49	49	1.483	3.443.047	100	
23	172.261	1.599.188	46	22	33.635	3.288.267	95	50	50	1.416	3.444.463	100	
13	140.974	1.740.162	50	21	30.503	3.318.770	96	16	16	1.247	3.445.710	100	
8	140.649	1.880.811	54	33	22.356	3.341.126	97	52	52	974	3.446.684	100	
3	130.401	2.011.212	58	4	14.229	3.355.355	97	60	60	905	3.447.589	100	
25	122.383	2.133.595	62	62	62	14.169	3.369.524	98	46	46	886	3.448.475	100
18	102.527	2.236.122	65	57	57	12.450	3.381.974	98	47	47	834	3.449.309	100
10	102.509	2.338.631	68	27	9.335	3.391.309	98	55	55	826	3.450.135	100	
17	101.721	2.440.352	71	34	34	6.671	3.397.980	98	44	44	658	3.450.793	100
2	91.649	2.532.001	73	38	38	6.334	3.404.314	99	54	54	658	3.451.451	100
28	91.638	2.623.639	76	35	35	5.587	3.409.901	99	51	51	630	3.452.081	100
30	73.070	2.696.709	78	40	40	5.271	3.415.172	99	43	43	589	3.452.670	100
6	65.497	2.762.206	80	36	36	5.161	3.420.333	99	56	56	589	3.453.259	100
15	63.770	2.825.976	82	37	37	4.836	3.425.169	99	42	42	554	3.453.813	100
1	59.852	2.885.828	84	53	53	4.805	3.429.974	99	59	59	522	3.454.335	100
9	59.655	2.945.483	85	61	61	2.453	3.432.427	99	63	63	501	3.454.836	100

Fonte: O Autor (2019)

Sequências de DNA não alinhadas aos seus genomas de referência podem ter vários significados, tais como: erros de sequenciamento, erros de montagem, erros de alinhamento durante a análise do Quast, erros provenientes do genoma de referência, sequências de DNA próprias, sequências provenientes de transferência horizontal, sequências de DNA extracromossomal, entre outros, sendo que alguns são mais proáveis e outros menos. Por outro lado, a utilização de montagem *de novo* com dados de NGS de alta confiabilidade garante que o genoma reflita melhor a realidade, contrariamente a montagem guiada por genoma de referência onde haverá tendenciosidade, não sendo possíveis encontrar novas sequências e sujeito aos erros do genoma de referência (LISCHER; SHIMIZU, 2017).

Na Tabela 7, o tamanho dos *scaffolds* está organizado em ordem decrescente de tamanho, onde o tamanho acumulado é feito pela soma acumulada, sucessiva, do primeiro ao último *scaffold* e o Nx representa a porcentagem (%) do tamanho acumulado. Quadrados marcados indicam os *scaffolds* que não alinharam completamente ao genoma de *A. junii* 65 como referência, usando o programa Quast (verde) e Mauve (laranja), respectivamente. A linha cinza indica o N50.

Com base nos dados descritos acima, os *scaffolds* não alinhados ao genoma de referência usando os programas Quast e Mauve foram extraídos e alinhados com as sequências do banco de dados não redundante do GenBank usando BLASTn (Tabela 8). A motivação da análise se deu em virtude que em muitas montagens genômicas existem sequências de DNA plasmidiais que contaminam a amostra e interferem na qualidade da montagem. Estas sequências de DNA plasmidiais podem ser extraídas por análises computacionais a partir das sequências montadas, ou a partir do conjunto de *reads* (ROOSAARE et al, 2018).

Com base na Tabela 8, observa-se que dos 32 *scaffolds*, 12 tiveram *match* com sequências de DNA plasmidiais, sendo que a maioria dos plasmídeos é proveniente de espécies do gênero *Acinetobacter*. Adicionalmente, outros 12 *scaffolds* tiveram *match* com sequências de DNA genômicos, provenientes de espécies do gênero *Acinetobacter*, sendo algumas da mesma espécie da cepa SB132. O restante dos *scaffolds* não teve *match* com nenhuma sequência do banco de dados.

Na Tabela 8, foram utilizados os *scaffolds* que não alinharam completamente ao genoma de referência após análise nos programas Quast e Mauve. Para o alinhamento, foi utilizado o BLASTn com banco de dados *nucleotide collection* (nr/nt). Os resultados tabelados são aqueles com melhores *scores*. Linhas cinzas e amarelas indicam os *scaffolds* que tiveram *match* com sequências de DNA plasmidiais e aqueles que tiveram *match* com sequências de DNA genômico de outras espécies bacterianas, respectivamente.

Tabela 8 - Alinhamento de *scaffolds* a sequências do banco de dados Genbak

Tamanho (pb)	Scaffold	Descrição	Query Cover	E value	% Ident
63.770	15	<i>Acinetobacter pittii</i> strain AP_882 plasmid pNDM-AP_882, complete sequence	96%	0.0	96.36
1.247	16	<i>Acinetobacter</i> sp. SWBY1 chromosome, complete genome	100%	0.0	99.76
6.671	34	<i>Acinetobacter nosocomialis</i> strain 6411 plasmid p6411-66.409kb, complete sequence	33%	0.0	91.58
5.587	54	<i>Acinetobacter baumannii</i> strain AR_0052 plasmid unnamed3, complete sequence	100%	0.0	97.99
4.836	37	<i>Acinetobacter</i> sp. WCHA45 plasmid p1_010045, complete sequence	50%	0.0	84.97
6.334	38	No significant similarity found.			
1.715	39	No significant similarity found.			
5.271	40	<i>Acinetobacter baumannii</i> plasmid pA1296_2, complete sequence	56%	0.0	96.13
1.848	41	<i>Acinetobacter lwoffii</i> strain ZS207 genome	51%	0.0	79.54
554	42	<i>Acinetobacter ursingii</i> strain RIVM0051 plasmid pRIVM0051_IMP-4, complete sequence	100%	0.0	100.00
589	43	<i>Acinetobacter baumannii</i> strain WPB103 chromosome	100%	0.0	98.64
658	44	<i>Acinetobacter baumannii</i> plasmid pA1296_2, complete sequence	100%	0.0	97.26
2.246	45	<i>Dioscorea rotundata</i> mitochondrial DNA, contig: TDr_Mt_scaffold50_size2628, cultivar: TDr96_F1	83%	0.0	98.54
886	46	No significant similarity found.			
834	47	No significant similarity found.			
1.816	48	Uncultured prokaryote from Rat gut metagenome metamolilome, plasmid pRGRH0705	88%	0.0	77.12
1.483	49	<i>Acinetobacter baumannii</i> strain EH chromosome, complete genome	100%	0.0	98.72
1.416	50	<i>E.coli</i> R-plasmid aacC2 gene for aminoglycoside-(3)-N-acetyltransferase (EC 2.3.1.81)	56%	0.0	99.62
974	52	<i>Acinetobacter wuhouensis</i> strain WCHAW010062 chromosome, complete genome	100%	0.0	81.88
4.805	53	Uncultured bacterium clone BP38E2 alkane monooxygenase (alkM) gene, partial cds	10%	0.0	96.36
658	54	<i>Acinetobacter baumannii</i> plasmid pA1296_2, complete sequence	100%	0.0	98.48
826	55	<i>Acinetobacter pittii</i> strain 2014N21-145 plasmid p2014N21-145-1, complete sequence	100%	0.0	100.00
589	56	<i>Acinetobacter baumannii</i> plasmid pA1296_2, complete sequence	100%	0.0	96.10
1.512	58	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain IC001 chromosome, complete genome	93%	0.0	95.23
522	59	<i>Acinetobacter junii</i> strain lzh-X15 chromosome, complete genome	100%	0.0	98.27
905	60	No significant similarity found.			
2.453	61	<i>Acinetobacter junii</i> strain lzh-X15 chromosome, complete genome	100%	0.0	98.29
14.169	62	<i>Acinetobacter pittii</i> strain WCHAP100004 chromosome, complete genome	27%	0.0	83.43
501	63	No significant similarity found.			
5.161	36	<i>Acinetobacter junii</i> strain lzh-X15 chromosome, complete genome	100%	0.0	99.25
630	51	<i>Acinetobacter junii</i> strain WCHAJ59 chromosome, complete genome	100%	0.0	99.84
12.450	57	<i>Acinetobacter</i> sp. WCHA45 plasmid pNDM1_010045, complete sequence	66%	0.0	97.27

Fonte: O Autor (2019)

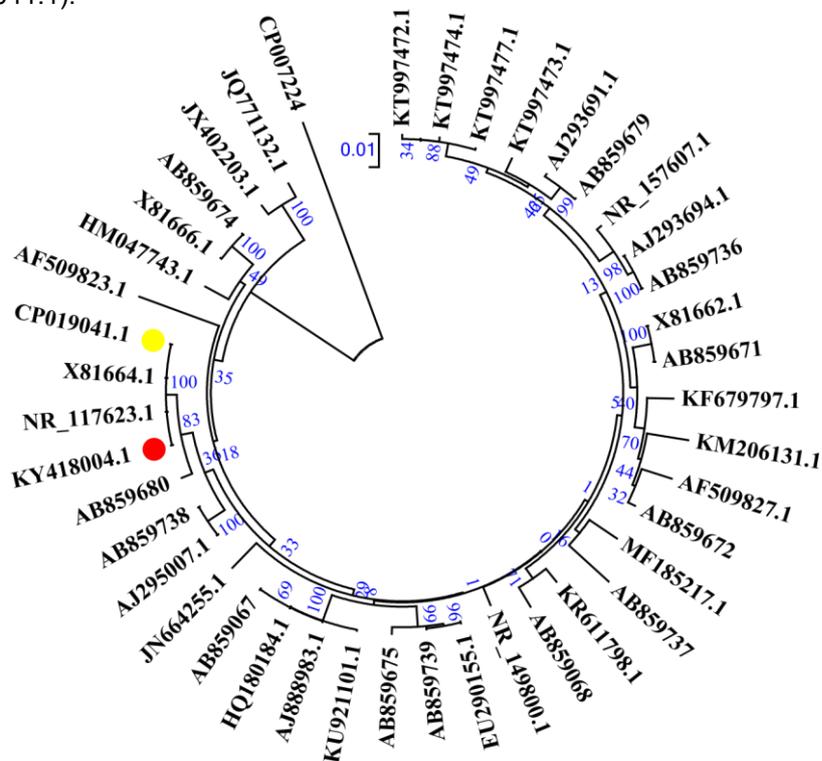
Assim, considerando os dados acima, possivelmente a montagem do genoma da cepa SB132 apresentou muitas sequências que não alinham completamente ao genoma de referência devido aos seguintes fatores: a presença de DNA plasmidial contaminante proveniente de co-extração com gDNA; sequências ausentes no genoma referência, mas presentes em outras cepas da mesma espécie, uma vez que isto foi corroborado pela análise nos programas Quast e Mauve, usando a cepa lzh-x15; possivelmente, por sequências próprias da cepa SB132 ou, ainda, erro de montagem, devido à presença de sequências de DNA que não tiveram *match* com

nenhuma sequência no banco de dados, podendo ser sequências de DNA repetitivo colapsadas em pequenos *contigs*.

5.3.3 Análise Filogenética

Para investigar a identidade molecular da cepa SB132, foi realizada a análise filogenética, comparando sua sequência do rDNA 16S com sequências de cepas do gênero *Acinetobacter*, extraídas do GenBank (Figura 12) (APÊNDICE E). A sequência do rDNA 16S, predita pelo programa RNAmmer, tem um tamanho de 1525 pb e está depositada no GenBank sob o número de acesso KY418004.1.

Figura 12 - Análise filogenética da cepa SB132. A árvore foi construída, usando o método *Neighbor Joining*, com *bootstrap* de 1000 permutações e enraizadas, usando *Pseudomonas aeruginosa* (CP007224), como grupo externo. A marcação vermelha indica a cepa SB132 (KY418004.1) e a marcação amarela indica a cepa referência 65 (CP019041.1).



Fonte: O Autor (2019)

A árvore filogenética, apresentada na Figura 12, mostra que esta sequência da cepa SB132 é mais similar com as sequências da espécie *A. junii*, sendo estas cepas ATCC 17908 (NR_117623.1), DSM6964 (X81664.1) e a referência65 (CP019041.1). A confiabilidade deste resultado é visualizada no valor das permutações (número azuis), sendo que o ramo das *A. junii* apresentaram um valor 100. Isto significa que nas 1000 permutações (*bootstrap* de 1000 permutações, ver Material e Métodos), realizadas na execução para montagem da árvore, a formação deste ramo aparece em 100% das tentativas, compreendendo o melhor resultado.

5.3.4 Anotação Funcional do Genoma

A anotação do genoma é o processo de identificação dos elementos funcionais ao longo da sequência de um genoma, dando significado a ele (ABRIL; CASTELLANO, 2019). Existem etapas de anotação do genoma, que são: anotação em nível de nucleotídeo, que é a primeira anotação realizada, a qual busca identificar a localização física das sequências de DNA, a fim de determinar onde os componentes, como genes, RNAs e elementos repetitivos, estão localizados; em seguida, procede-se com a anotação, em nível de proteína, para determinar as possíveis funções dos genes, previamente, determinados; a terceira parte busca anotar, em níveis de processos, a qual visa identificar os caminhos e processos nos quais diferentes genes interagem, montando uma anotação funcional eficiente (DE SÁ; RAMOS, 2018). Com base nisto, após a montagem, a avaliação da qualidade e o ordenamentos dos *scaffolds*, foi realizada a anotação do genoma da cepa SB132, usando o servidor web RAST (Tabela 9 e Figura 13).

Com base na Tabela 9 e na Figura 13, a anotação do genoma da cepa SB132 apresentou 3.262 PEG (*protein encoding genes*, em português, genes codificadores de proteínas) e 70 RNA. As quantidades de RNA corroboram com os valores obtidos pelos programas RNAmmer e tRNAscan-SE, revelando 6 RNA ribossômicos e 64 RNA

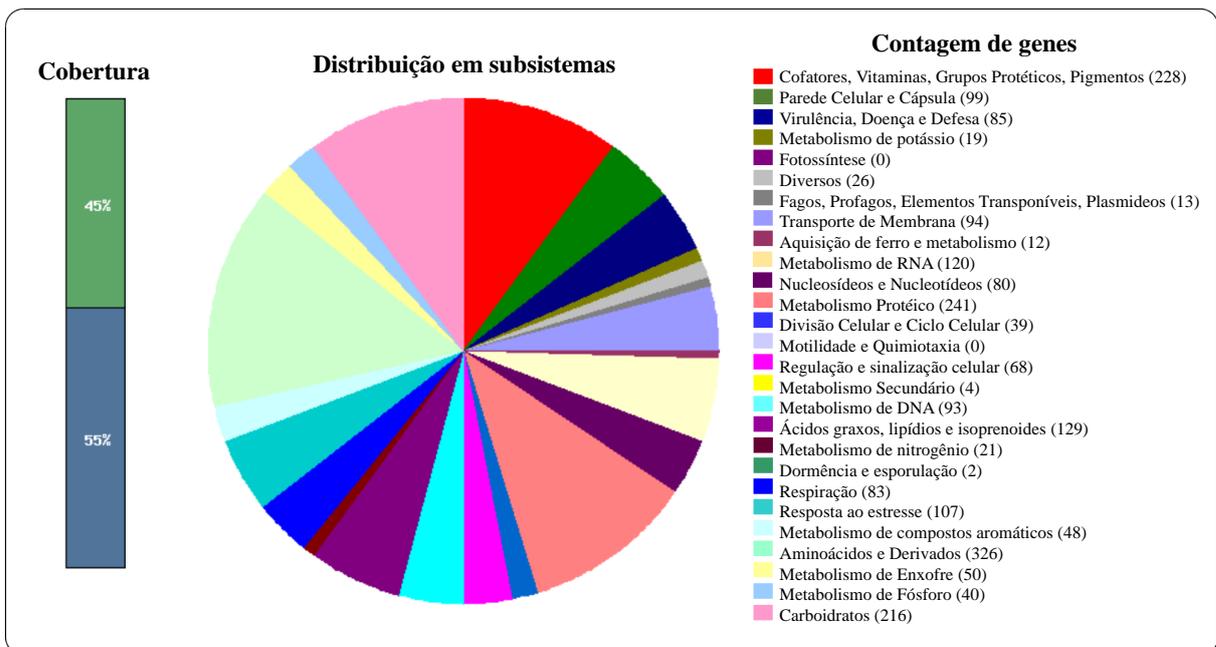
transportadores, sendo 5 rRNA 5S, 1 rRNA 16S, 1rRNA 23S, 21 tipos de tRNA transportadores, sendo específicos para 20 aminoácidos e N-formilmetionina.

Tabela 9 - Visão geral das características do genoma da cepa SB132 após anotação

	RAST	RNAmer	tRNAscan-SE
<i>Scaffolds</i> com PEG	63		
Quantidade de subsistemas	410		
PEG	3.262		
PEG em subsistemas	1.461		
%PEG em subsistemas	45		
RNA	70		
rRNA		6	
tRNA			64

Fonte: O Autor (2019)

Figura 13 - Categorização em subsistemas das regiões codificantes do genoma da cepa SB132. A anotação genômica foi realizada no servidor web RAST. À esquerda é mostrada a cobertura da categorização de todas as regiões codificantes previstas na forma de PEG (proteínas putativas e hipotéticas). No centro é mostrado o Gráfico de Pizza, sendo cada parte proporcional à quantidade de PEG, pertencentes a cada subsistema. À direita são mostrados os subsistemas com a contagem dos respectivos genes anotados



Fonte: O Autor (2019)

Os 3.262 genes codificadores de proteínas anotados foram marcados por códigos que representam uma única posição no genoma (fig|40215.59.peg.1 a fig|40215.59.peg. 3.262). Esta forma de organizar permite que os genes, que compartilham homologia de sequências, sejam distinguidos entre si, mesmo que esta homologia seja de 100% de identidade. Os RNA anotados também receberam códigos únicos (fig|40215.59.peg.1 a fig|40215.59.peg. 70) para a mesma finalidade supracitada.

Ainda com base na Figura 12, dos 3.262 genes codificadores de proteínas anotados, 979 foram preditas como hipotéticas e 2.283 como putativas. Do total de proteínas preditas, 45% (1.461) estão distribuídas em 410 subsistemas, sendo que 1.393 são putativas e 68 hipotéticas. Adicionalmente, 1.801 proteínas não foram classificadas em subsistemas, com 890 putativas e 911 hipotéticas. Proteínas hipotéticas são aquelas que foram preditas *in silico* a partir do genoma, mas não existem informações da sua função biológica, ou seja, não existem evidências experimentais (NAVEED et al, 2018). Já as proteínas putativas são também determinadas por abordagens *in silico* e compartilham similaridade de sequência com proteínas caracterizadas, porém esta similaridade de sequência é limitada (LUBEC et al, 2005).

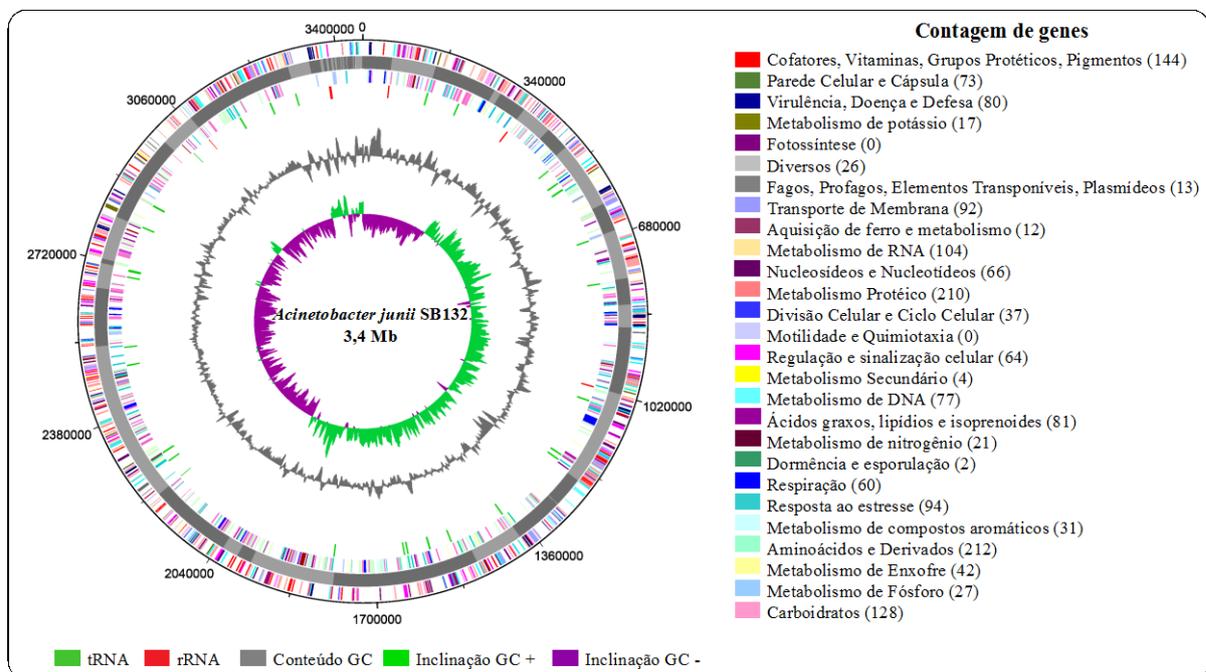
O servidor web RAST é uma ferramenta de anotação genômica que identifica genes codificadores de proteínas, genes de RNA, atribui funções, prediz quais subsistemas estão presentes e utiliza todas estas informações para construir redes metabólicas (AZIZ et al, 2008). Neste último caso, o RAST faz isto com ferramentas que alinham as sequências de proteínas preditas aos conjuntos de proteínas homólogas isofuncionais (FIGfams) (<http://blog.theseed.org/servers/presentations/t1/figfams.html>). Os FIGfams formam os subsistemas que são conjuntos de papéis funcionais que implementam um processo biológico específico ou, ainda, um complexo estrutural, podendo ser, vias metabólicas, partículas celulares, ilhas gênicas, complexos de transporte, bem como tudo aquilo que desempenha uma função na célula (OVERBEEK et al, 2005).

Pelo programa Artemis foi possível visualizar, navegar e interpretar as grandes quantidades de dados que foram produzidos na montagem e na anotação do genoma

da cepa SB132 (Figura 14). O Artemis permite localizar a posição de cada gene predito, o sentido da transcrição, a fase de leitura da região codificante, bem como se os genes estão agrupados, o conteúdo de GC e a inclinação GC (CARVER et al, 2012).

Com base na Figura 14 e considerando os dados mais relevantes para as análises posteriores, a categorização mostra que 73 genes preditos estão associados à parede celular e cápsula; 80 com virulência, doença e defesa; 92 associados com transporte de membrana, 64 com regulação e sinalização, 81 com ácidos graxos, lipídeos e isoprenoides; e 31 com o metabolismo de compostos aromáticos. O RAST ainda não possui uma categorização que mostre somente o metabolismo dos hidrocarbonetos alifáticos, estando muitos genes classificados em outras vias metabólicas ou mesmo não classificados em subsistemas.

Figura 14 - Representação circular do cromossomo *A. junii* SB132. O mapa circular foi gerado usando o programa Artemis. Círculos do centro para o exterior: inclinação GC (verde e púrpura), conteúdo GC (cinza), rRNA (vermelho), tRNA (verde), genes codificadores de proteína (PEG) coloridos por distribuição em subsistemas, obtido pela anotação no servidor RAST de 63 *scaffolds* (cinzas alternados)



Fonte: O Autor (2019)

Adicionalmente, na Figura 14, os genes de RNA transportadores e ribossomais estão distribuídos separadamente no genoma, estando alguns destes próximos uns dos outros, mas não consecutivos. A inclinação de GC no mapa, com exceção de uma pequena porção nos menores *scaffolds*, indica que o ordenamento dos *scaffolds* apresentou-se tal como o esperado em uma distribuição correta, uma vez que *replicadores* tendem a possuir uma inclinação de GC oposta (ARAKAWA; TOMITA, 2007). Assim, o posicionamento da origem e do término de replicação no mapa do genoma da cepa SB132, pode dar indícios da localização da origem de replicação e das sequências de terminação.

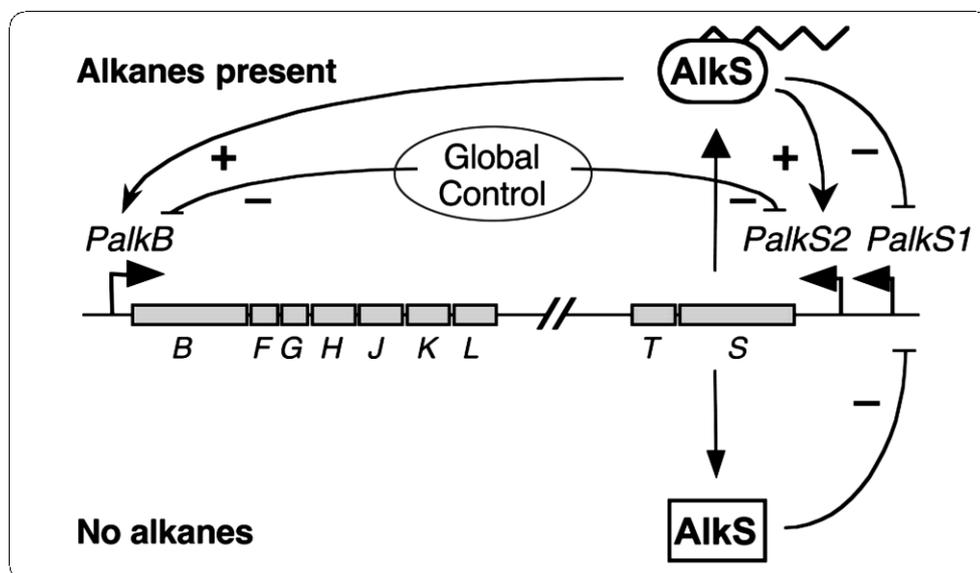
5.3.5 Genes de Enzimas de Ativação de Hidrocarbonetos Alifáticos

É descrito que no metabolismo de hidrocarbonetos, em condições de aerobiose, as oxigenases são as enzimas mais importantes, pois sem elas o catabolismo não poderia iniciar. Estas enzimas realizam a primeira etapa da oxidação de alcanos, ativando estas moléculas por hidroxilação e clivagem, tornando-as susceptíveis para outras enzimas catabólicas que, normalmente, existem, obrigatoriamente, no genoma do organismo (álcool desidrogenases, aldeído desidrogenases, acil-CoA sintetases, beta-oxidação, ciclo do ácido cítrico) (HARAYAMA et al, 1992; ROJO et al, 2009).

Monooxigenases podem usar NADH e NADPH como fonte potencial de elétrons, podendo ser classificadas como heme-dependentes, flavina-dependentes, cobre-dependentes, ferro-dependentes sem grupo heme, pterina-dependentes, dependentes de outros co-fatores e independentes de co-fatores (NOLAN; O'CONNOR, 2008; PAZMINO et al, 2010). As monooxigenases atuam nos hidrocarbonetos alifáticos e em certos hidrocarbonetos aromáticos, adicionando um átomo de oxigênio a partir do oxigênio molecular e o outro oxigênio é reduzido à água (RABUS; WIDDEL, 2001).

Um modelo de regulação de via catabólica de degradação de alcanos é completamente descrito para *P. putida* GPo1, onde um *operon* e um gene regulador, *alkBFGHJKL* e *alkST*, respectivamente, presentes no seu plasmídeo OCT, conferem a esta cepa a capacidade de degradação de alcanos (Figura 15). Na ausência de alcanos a proteína reguladora AlkS é expressa em níveis baixos pelo seu promotor *PalkS1*. Nestas condições, a proteína AlkS, então, modula negativamente a expressão do seu próprio *operon*, resultando na sua presença em baixas concentrações. Por outro lado, quando os alcanos estão presentes, a AlkS passa a ser expressa pelo promotor *PalkS2* e ativa a transcrição no promotor *PalkB* do *operon alkBFGHJKL*, gerando um *feedback* positivo para a expressão do gene *alkST* e, conseqüentemente, do *operon alkBFGHJKL*. Estes dois promotores de *alkST* são regulados, negativamente, por mecanismos de controle global, quando as células são cultivadas em substratos mais preferenciais (DINAMARCA et al, 2003).

Figura 15 - Modelo de regulação de genes que conferem a capacidade de degradação de alcanos. Estes genes estão presentes no plasmídeos OCP de *P. putida* GPo1 e agrupados em dois *operons*

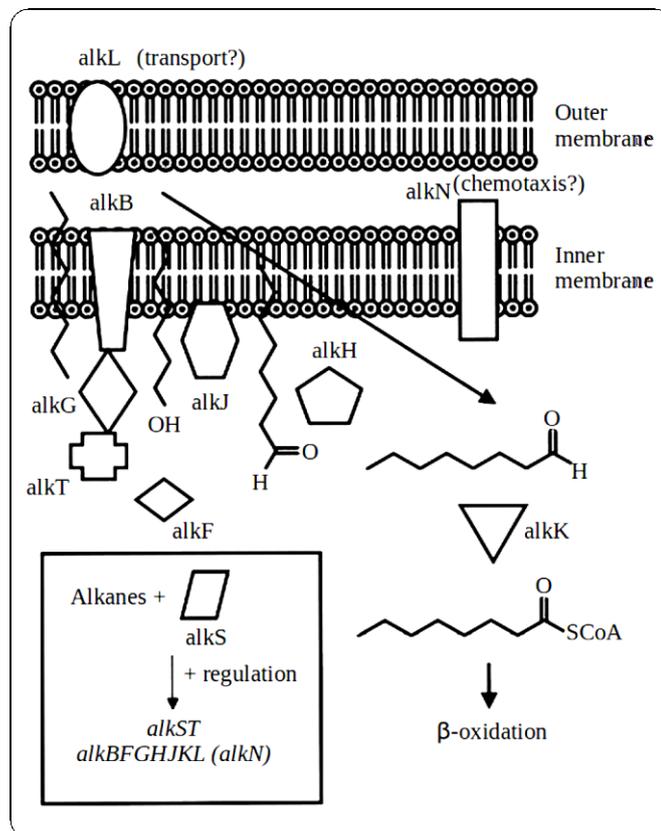


Fonte: Dinamarca et al (2003).

O *operon alkBFGHJKL*, do plasmídeo OCT de *P. putida* GPo1, codifica para um conjunto de enzimas envolvidas no metabolismo de alcanos, incluindo a AlkB

(alcano hidroxilase), AlkF e AlkG (rubredoxinas), AlkH (aldeído desidrogenase), AlkJ (álcool desidrogenase), AlkK (acil-CoA sintetase), AlkL (proteína de membrana externa que pode estar envolvida na captação), AlkN (proteína aceitadora de grupo metil que pode estar envolvida na quimiotaxia), AlkT (rubredoxina redutase) e AlkS (regulador positivo do *operon alkBFGHIJKL* e gene *alkST*(Figura 16). Neste sistema, a enzima AlkB oxida *n*-alcanos para seu correspondente álcool primário. Esta enzima utiliza duas proteínas transportadoras de elétrons, a AlkG e a AlkT. O álcool pode ser mais oxidado para aldeído, pela enzima AlkH, e em ácido carboxílico, pela enzima AlkK. O acil-CoA resultante pode entrar na via da beta-oxidação e no ciclo do ácido cítrico para a produção de energia ou biossíntese (MORENO; ROJO, 2019; VAN HAMME et al, 2003).

Figura 16 - Modelo de mecanismo de ação das enzimas envolvidas com a degradação de alcanos. Estas enzimas são expressas pelos genes do *operon alkBFGHIJKL*, do plasmídeo OCT de *P. putida* Gpo1

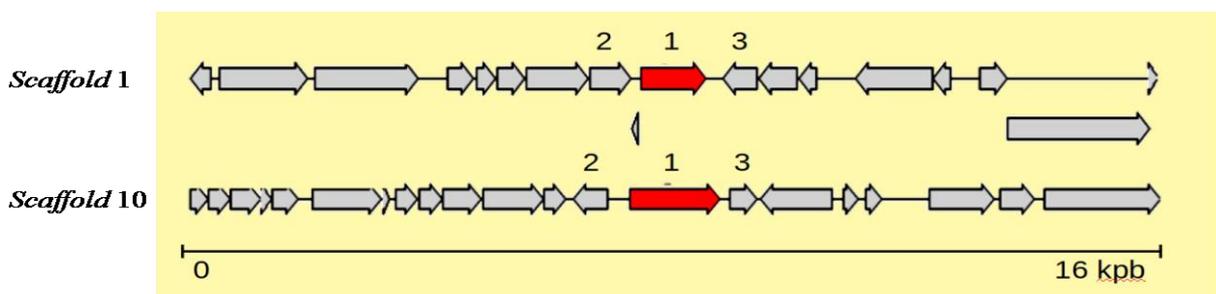


Fonte: Van Hamme et al (2003)

Existem várias variedades de monooxigenases capazes de hidroxilar alcanos, dentre estas, as alcano monooxigenases (AlkB), monooxigenases flavina-dependentes (AlmA) e as citocromo P450 hidroxilases (CYPs) são algumas das mais importantes (YANG et al, 2019). Com base nisso, a anotação do genoma da cepa SB132 foi realizada com o objetivo de identificar os principais genes envolvidos na degradação dos hidrocarbonetos alifáticos e suas posições no genoma bacteriano, dando ênfase aqueles que codificam as enzimas monooxigenases.

Nos dados genômicos de *A. junii* SB132 foram encontrados genes que codificam enzimas importantes para o processo de degradação de hidrocarbonetos (APÊNDICE F), dentre estas as monooxigenases são enzimas que podem desempenhar a importante função de hidroxilar alcanos. Assim, dentre as enzimas anotadas no genoma, podemos citar duas enzimas desta classe: as monooxigenases flavina-dependente (Figura 17), três alcano-1 monooxigenases (Figura 18) e uma citocromo P450 hidroxilase (Figura 19). Estes genes estão localizados em sequências de DNA presentes em *scaffolds* que se alinham ao genoma de referência (1, 10, 19, 20 e 1, respectivamente) e um *scaffold* (53) que não se alinhou completamente ao genoma de referência, porém teve *match* após análise no BLASTn, com bactéria não cultivável. Adicionalmente, estes genes foram preditos no genoma, mas não foram categorizadas em subsistemas pelo RAST, devido a não existência desta categoria no banco de dados.

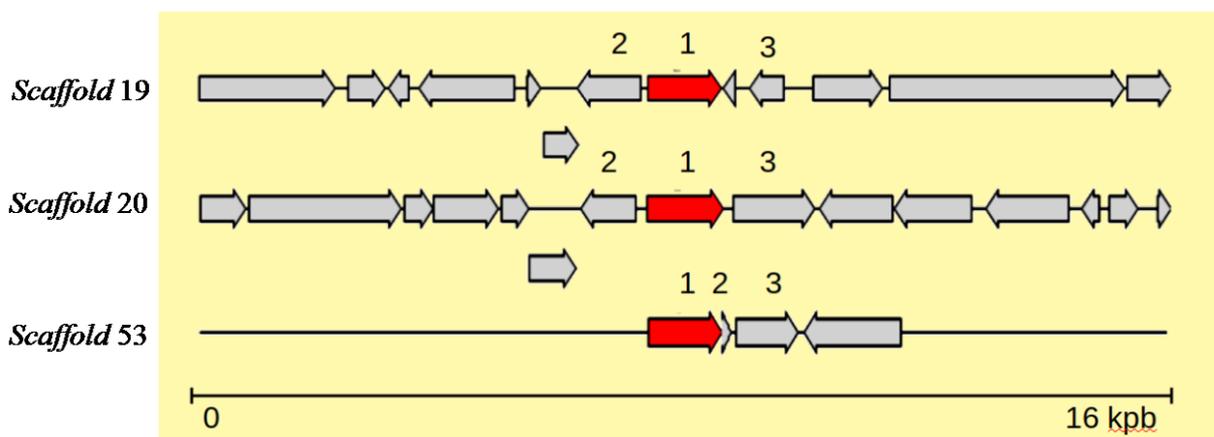
Figura 17 - Organização dos genes monooxigenase flavina-dependente no genoma da cepa SB132. Os genes foram visualizados no programa Artemis e no servidor web RAST. No *scaffold* 1 encontram-se numerados os genes que codificam as proteínas monooxigenase flavina-dependente (AlmA) (1), proteína de resistência ao arsênio (ArsH) (2) e proteína da família glioxalase (SPJ) (3). No *scaffold* 10 encontram-se os genes que codificam as proteínas monooxigenase flavina-dependente (AlmA) (1) e proteínas hipotéticas (2 e 3)



Fonte: O Autor (2019)

De acordo com a Figura 17, observa-se que os genes que flanqueiam o gene da *AlmA*, no *scaffold* 1, codificam a proteína *ArsH* e a proteína da família glioxalase, enquanto que aquelas flanqueando o mesmo gene, no *scaffold* 10, codificam duas proteínas hipotéticas. Não foi observado a 8kpb, a montante e a jusante, a presença de genes que codificam as proteínas acessórias da via de metabolismo de alcanos.

Figura 18 - Organização dos genes alcano-1 monooxigenases no genoma da cepa SB132. Os genes foram visualizados no programa Artemis e no servidor web RAST. No *scaffold* 19 encontram-se numerados os genes que codificam as proteínas alcano-1 monooxigenase (*AlkB*) (1), hélice-volta-hélice tipo *AraC* (*AraC*) (2) e uma proteína hipotética (3). No *scaffold* 20 encontram-se numerados os genes que codificam as proteínas alcano-1 monooxigenase (*AlkB*) (1), regulador transcricional *AraC* (*AraC*) (2) e glutatona redutase (*GSR*) (3). No *scaffold* 53 encontram-se numerados os genes que codificam as proteínas alcano-1 monooxigenase (*AlkB*) (1), rubredoxina (*RubA*) (2) e regulador transcricional *AraC* (*AraC*) (3)



Fonte: O Autor (2019)

Com base nisto, observa-se que os genes *almA*, nos *scaffolds* 1 e 10, não estão agrupados em um conjunto de genes relacionados com a metabolização de alcanos, uma vez que, flanqueando suas sequências, encontram-se genes não relacionados com esta função metabólica, bem como o sentido de transcrição destes genes não condiz com o que é esperado para uma unidade de transcrição. Os genes acessórios, tais como aqueles que codificam as enzimas álcool desidrogenase (*ADH*), aldeído desidrogenase (*ALDH*), rubredoxina (*RubA*), rubredoxina redutase (*RubB*), entre outras, foram preditas no genoma de *A. junii* SB132, mas não foram abordadas nesta sessão, uma vez que podem também desempenhar suas funções moleculares em vias metabólicas não relacionadas à degradação de alcanos (ROJO, 2009).

Com base na Figura 18, observa-se que os genes que flanqueiam o gene *alkB* no *scaffold* 19 codificam uma proteína hipotética e uma hélice-volta-hélice do tipo AraC. Aqueles flanqueando o mesmo gene no *scaffold* 20 codificam uma RubA e um regulador AraC. Por fim, aqueles que flanqueiam o gene *alkB* no *scaffold* 53 codificam a RubA e um regulador AraC. Com exceção do gene *alkB*, contido no *scaffold* 53, o qual está flanqueado à direita pelo gene *rubA*, não foi observada a 8kpb, a montante e a jusante, a presença de outros genes que codificam as proteínas acessórias da via de catabolismo de alcanos.

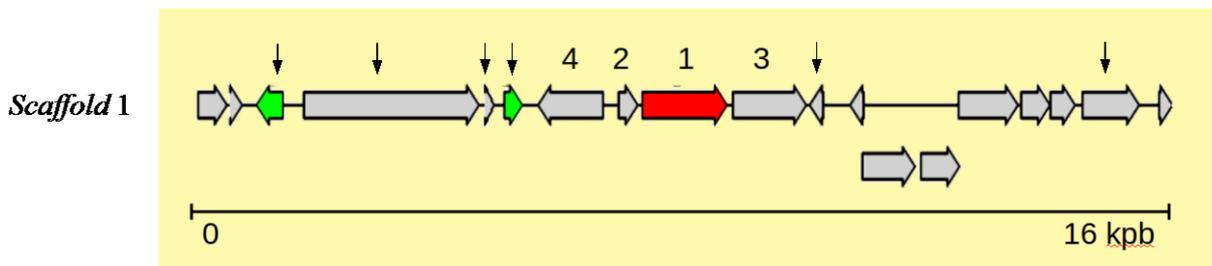
Os genes flanqueadores do gene *alkB* no *scaffold* 19 e 20 estão orientados em sentidos que não se enquadram ao que é esperado para uma unidade de transcrição, bem como não conferem funções metabólicas esperadas para o catabolismo de alcanos. O mesmo não é observado para o gene *alkB* no *scaffold* 53, pois além de possuir genes que conferem funções catabólicas de alcanos, também tem seu sentido de transcrição orientado para o mesmo sentido de *rubA*. Porém, mesmo que esteja organizado na forma de *operon*, este não estaria completo com todos os genes necessários para a metabolização de alcanos.

Com base na Figura 19, observa-se que os genes que flanqueiam o gene *cyp* codificam para FDX, FDXR e regulador transcricional AraC. Além disso, os genes que estão distribuídos a montante e a jusante são aqueles associados com os elementos transponíveis (setas), tais como proteínas de integração, recombinação e inversão. Os genes *fdx* e *fdxr* codificam as proteínas que são acessórias na atividade enzimática de uma das classes de CYPs.

A organização estrutural do gene *cyp* do genoma de *A. junii* SB132 mostra uma possível organização na forma de *operon*, mesmo que todas as enzimas necessárias para o metabolismo de alcanos não estejam presentes. Com exceção do gene regulador, estes genes apresentam o mesmo sentido de transcrição, bem como FDX e FDXR, que atuam juntamente com a CYP no metabolismo de alcanos. O gene regulador da proteína AraC, flanqueado à esquerda do gene *cyp*, tem o sentido de transcrição oposta, o que é esperado em muitos sistemas de regulação, onde a proteína reguladora está próxima aos genes que regulam (MORENO; ROJO, 2019). É importante ressaltar, também, que as sequências de DNA de elementos

transponíveis podem indicar que este grupo de genes, nas proximidades, poderia ser resultado de transferência horizontal.

Figura 19 - Organização do gene citocromo P450 hidroxilase no genoma da cepa SB132. Os genes foram visualizados pelo programa Artemis e pelo servidor web RAST. No *scaffold* 1 encontram-se numerados os genes que codificam as proteínas citocromo P450 hidroxilase (CYP) (1), ferredoxina (FDX) (2), ferredoxina redutase (FDR) (3) e regulador transcricional AraC (4). As setas indicam as seqüências de DNA associadas aos elementos transponíveis



Fonte: O Autor (2019)

A atividade das monooxigenases depende do tamanho da cadeia do hidrocarboneto alvo, podendo também haver sobreposição de tamanhos de substratos para enzimas diferentes, sendo que muitos microrganismos que são isolados, têm a capacidade de degradar hidrocarbonetos de diversos tamanhos (WENTZEL et al, 2007). Existem, ainda, aquelas que atuam sobre os hidrocarbonetos de cadeias curtas, (C1 - C4), tais como o metano monooxigenase; aquelas que atuam sobre os hidrocarbonetos de cadeias médias (C5 - C16), tais como aquelas enzimas integrais não dependentes do grupo heme ou citocromo P450; e aquelas que atuam sobre os hidrocarbonetos de cadeias longas (>C17) (FUNHOFF; VAN BEILEN, 2007).

As enzimas AlmA, uma monooxigenase flavina-dependente, encontradas no genoma de *A. junii* SB132 (fig|40215.59.peg.89) catalisam uma gama de reações de oxigenação e estão envolvidas com catabolismo, detoxificação e biossíntese de moléculas importantes. Estas enzimas catalisam, dentre outras reações de hidroxilação, a oxidação Baeyer–Villiger, sufoxidação, epoxidação e halogenação (HUIJBERS et al, 2014). Estas enzimas também são importantes nos processos metabólicos de compostos estranhos não nutritivos, conhecidos como xenobióticos (ESWAEAMOORTHY et al, 2006).

As AlmA são descritas como importantes enzimas participantes na degradação de alcanos de cadeias longas (maiores que 18 carbonos), uma vez que estas moléculas são mais persistentes no ambiente, estão em estado sólido, à temperatura ambiente e podem causar problemas, tais como o entupimento de tubos de óleo durante seu transporte (WANG;SHAO, 2012). A função molecular desta enzima pode estar relacionada à degradação de alcanos com 18 e 21 carbonos nos experimentos realizados com a cepa SB132, a qual foi cultivada por 14 dias em óleo diesel como sua única fonte de carbono (CARDENES, 2017).

A alcano-1 monooxigenase ou comumente nomeada como AlkB (fig|40215.59.peg.1035, fig|40215.59.peg.1230 e fig|40215.59.peg.2882), é outra importante enzima predita no genoma da cepa SB132 e pode ser usada como marcadora na avaliação de potencial para biorremediação (SHEN et al, 2010). Esta enzima é uma monooxigenase integral de membrana, sem grupo heme e com dois ferros em seu sítio ativo, que catalisa a primeira reação de hidroxilação de uma variedade de hidrocarbonetos alifáticos de cadeia média (C5 - □C12), na posição terminal (ROJO et al, 2009). A presença desta enzima pode estar relacionada com os resultados de degradação dos alcanos, C8 a C16, em experimentos de crescimento desta cepa em óleo diesel como única fonte de carbono (CARDENES, 2017).

Outra importante enzima, predita no genome da cepa SB132, é a citocromo P450 hidroxilase, ou CYP. Esta enzima, pertencente a uma superfamília de proteínas, a *heme ubíquas*, realiza várias reações oxidativas (KUMAR, 2011), entre estas, a clivagem oxidativa de éster, dearilação, acoplamento oxidativo de anéis, expansão de anéis, dealogenação aromática, fusão de substratos, expansão com descarboxilação, dearomatização, oxidação de elétrons de qualquer grupo arila, oxidação via isomerização, entre outras reações químicas importantes e complexas (GUENGERICH; ISIN, 2007).

As CYPs encontram-se classificadas em duas classes. A primeira, que são as enzimas de Classe I, presentes em bactérias e mitocôndrias, são formadas por três componentes citoplasmáticos: a citocromo P450 hidroxilase, a ferredoxina e a ferredoxina redutase. A segunda, que são as enzimas de Classe II, representadas pelas enzimas microsossomais do fígado em células de mamíferos, estão envolvidas no

metabolismo dos esteroides e nas vias de desintoxicação. Esta classe é formada por dois componentes: a citocromo P450 hidroxilase ligada à membrana e uma redutase (FUNHOFF; VAN BEILEN, 2005; ROBERTS et al, 2002).

Entre as reações enzimáticas catalisadas pelas CYPs a hidroxilação terminal de alcanos tem sido descrita como um importante mecanismo usado pelos microrganismos para metabolizar os hidrocarbonetos presentes no ambiente (KELLY; KELLY, 2013; MONTELLANO, 2011). Além disso, em alguns experimentos laboratoriais foram observadas expressões desta enzima em diversas condições de crescimento, todas respondendo à presença dos alcanos C12 a C36 (YANG et al, 2019). Assim, muitas bactérias são capazes de degradar hidrocarbonetos alifáticos devido à presença da citocromo P450 hidroxilase como principal enzima (ROJO et al, 2009).

Os genes das proteínas reguladoras AraC também foram preditos no genoma de *A. junii* SB132, alguns deles estavam localizados flanqueando as sequências de genes de monooxigenases, o que é esperado para sistema co-regulados (ROCHA, 2008). O total de genes para esta proteína foi de 24, sendo 26% do total de genes que codificam as proteínas reguladoras no genoma desta bactéria. A maioria dos genes *araC*, próximos aos genes das monooxigenases, estavam em sentidos opostos, um perfil indicativo de co-regulação em bactéria, tal como o apresentado na *Escherichia coli*, na qual observa-se que a maioria das unidades de transcrição co-reguladas (um *operon* e seu gene regulador), apresentaram-se principalmente na forma divergente (em sentidos opostos) (HERSHBERG et al, 2005). Desta forma, é possível que as proteínas reguladoras AraC desempenhem suas funções reguladoras da expressão dos genes monooxigenases, dos quais estão próximas.

Muitos genes bacterianos estão organizados na forma de *operons*, que consiste em um conjunto de genes agrupados, com funções celulares relacionadas, como na composição de uma via metabólica. São regulados por um único promotor e, por isso, são agrupados em uma única unidade de transcrição. Dentre as características usadas para determinar a existência de agrupamentos gênicos na forma de *operons* bacterianos utiliza-se a distância dos genes, as suas funções e suas orientações e, neste último caso, só podem fazer parte de um *operon* aqueles genes

posicionados na mesma cadeia de DNA e, conseqüentemente, com co-transcrição e mesmo sentido na tradução (ERMOLAEVA et al, 2001).

É frequente a organização não agrupada de genes envolvidos com a degradação de alcanos, fato este que torna difícil o processo de identificação dos reguladores que atuam, especificamente, neste metabolismo (MORENO; ROJO, 2019). *operons* bacterianos podem ser muito importantes na biodegradação, pois garantem que os genes sejam melhor regulados em resposta ao ambiente, podendo fazer parte do DNA extracromossomal o que possibilitaria sua transferência horizontal (FONDI et al, 2010; DINAMARCA et al, 2003). Dos reguladores já conhecidos na indução da degradação de alcanos, estes pertencem às diferentes famílias de proteínas, tais como LuxR/MalT, AraC/XylS, GntR, e outras famílias não relacionadas (ROJO, 2009).

Em *A. baylyi* ADP1 foi descrito a presença da proteína AlkR como responsável pela regulação positiva dos genes envolvidos com o metabolismo de alcanos. Para que esta cepa possa utilizar alcanos, esta deve expressar um conjunto de proteínas que incluem os RubA e RubB, monooxigenase AlkM, um regulador transcricional tipo AraC-XylS (AlkR) e uma proteína do sistema de secreção (XcpR). A AlkR é expressa, principalmente, na presença de alcanos com comprimentos de cadeia específicos, variando de C6 a C18 (RATAJCZAK et al, 1998), diferentemente da proteína reguladora AlkS de *P. putida* GPo1, agrupada na subfamília MalT, de ativadores transcricionais de LuxR, onde esta induz a expressão do *operon alkBFGHJKL* em resposta a *n*-alcanos e seus respectivos álcoois primários (DANOT, 2001; SCHNEIKER et al, 2006; WENTZEL et al, 2007).

5.3.6 Genes Associados a Degradação de Compostos Aromáticos

Ao contrário das monooxigenases discutidas previamente, as diooxigenases atuam em hidrocarbonetos aromáticos e adicionam um ou dois átomos de oxigênio a partir do oxigênio molecular nestas moléculas (RABUS; WIDDEL, 2001). Estas

enzimas são divididas em duas classes: as dioxigenases ferro-enxofre heme-dependente e as dioxigenases ferro-enxofre não heme-dependente (Rieske), sendo que neste último caso a maioria é dependente de NADH (BURTON, 2003). Além disso, mesmo que a maioria das dioxigenases utilize um metal para auxiliar na ativação do oxigênio, um pequeno número de enzimas deste grupo tem sido isolado, pelo fato de não requererem metal ou nenhum outro co-fator orgânico (BUGG, 2003).

Com base na anotação do servidor web RAST, foram preditos 31 genes associados à biodegradação de compostos aromáticos no genoma da cepa SB132 (Figura Artemis), sendo que estes estavam distribuídos nas seguintes subcategorias: vias periféricas de catabolismo de compostos aromáticos (VPCCA), metabolismo de intermediários aromáticos centrais (MIAC) e metabolismo de aromáticos não subcategorizados (MANS) (Tabela 10). Existem proteínas que desempenham funções em diferentes vias metabólicas, fazendo com que algumas estejam redundantes na categoria de degradação de compostos aromáticos do RAST, gerando um valor de 48 proteínas preditas (Figura 20).

Tabela 10 - Visão quantitativa dos subsistemas anotados no genoma da cepa SB132

Tipo de via metabólica (subcategorias)	Vias metabólicas (subsistemas)	Total de proteínas no banco de dados SEED	Quantidade de proteínas preditas	% de proteínas identificadas
Intermediários aromáticos centrais	Ramo catecol da via beta-cetoadipato	13	5	38
Intermediários aromáticos centrais	Ramo protocatecato da via beta-cetoadipato	17	14	82
Intermediários aromáticos centrais	Catabolismo de salicilato e gentisato	20	8	40
Não categorizado	Degradação de gentisato	11	5	45
Via periférica	Degradação de benzoato	29	3	10
Via periférica	Degradação de bifênilo	11	1	9
Via periférica	Via de degradação de cloroaromáticos	6	5	83
Via periférica	Degradação de p-hidroxibenzoato	2	1	50
Via periférica	Degradação de quinato	12	4	33
Via periférica	Degradação do éster de salicilato	8	2	25
	Total	129	48	

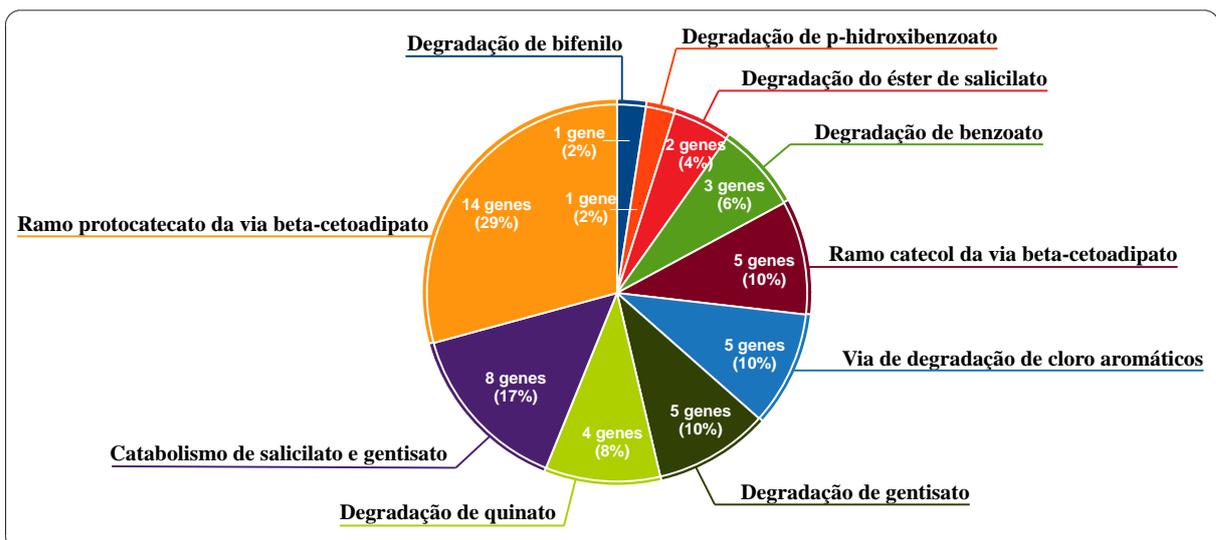
Fonte: O Autor (2019)

Na subcategoria VPCCA estão agrupados os seguintes subsistemas: degradação do éster de salicilato, degradação de quinato, degradação de bifênilo,

degradação de benzoato, degradação de p-hidroxibenzoato e via de degradação de cloroaromáticos. Na subcategoria MIAC estão agrupados os subsistemas: ramo catecol da via beta-cetoadipato, catabolismo de salicilato e gentisato e ramo protocatecato, da via beta-cetoadipato. Por fim, na subcategoria MANS está agrupado o subsistema: degradação de gentisato.

Com base na Figura 20, foram 10 subsistemas anotados envolvidos com a degradação de compostos aromáticos, mas nenhum destes apresentou todas as proteínas que seriam necessárias para completar o que está disponível no banco de dados SEED para as vias do metabolismo de compostos aromáticos (<http://rast.theseed.org/FIG/seedviewer.cgi?page=SubsystemSelect>). Dentre estes, a via de degradação de cloroaromáticos teve o maior número de proteínas anotadas neste subsistema, tendo 83% (5/6) do total de proteínas. O subsistema que teve o menor número relativo ao banco de dados foi a via de degradação de befenilo com 9,0% (1/11) do total de proteínas da via metabólica.

Figura 20 - Subsistemas preditos no genoma da cepa SB132. A anotação funcional em foi realizada no servidor web RAST. O gráfico de pizza mostra a quantidade de genes que codificam proteínas que farão parte do subsistema. Nos rótulos a porcentagem foi calculada considerando o valor total de genes independente da redundância (48 genes)

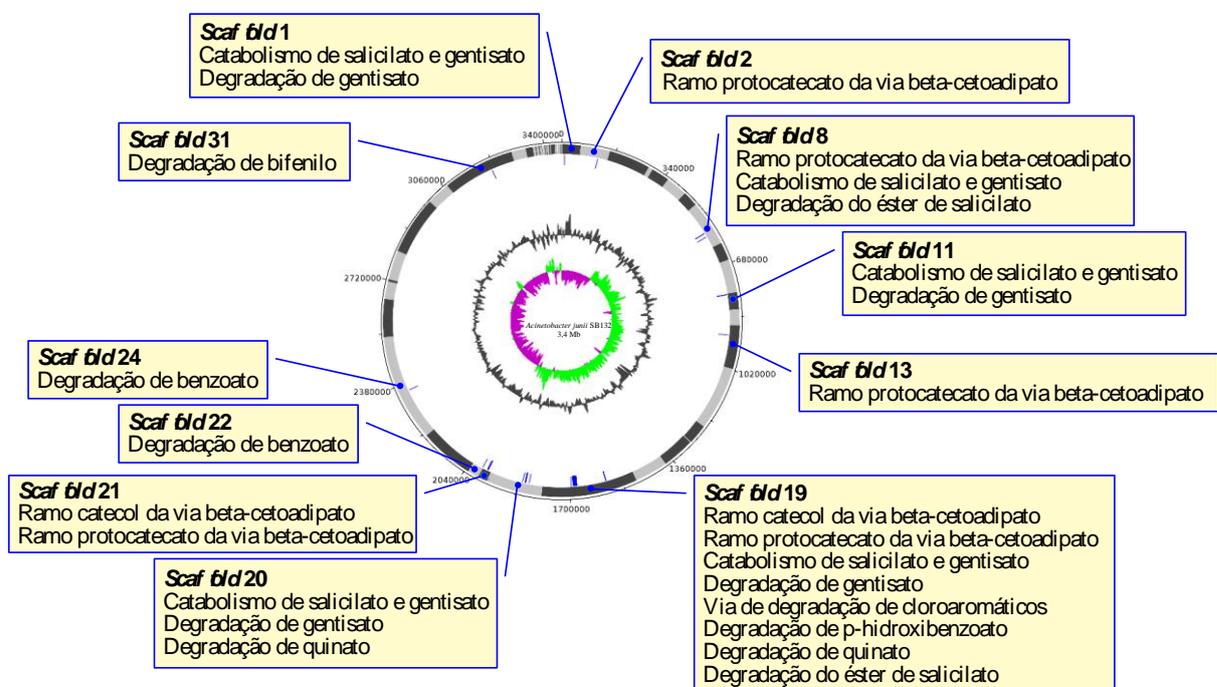


Fonte: O Autor (2019)

Adicionalmente, nos dados genômicos da cepa SB132, a localização destes genes foi determinada no conjunto de *scaffolds*, onde os genes de algumas vias aparecem no mesmo *scaffold* ou em *scaffolds* subsequentes, enquanto que os genes de outras vias encontram-se em *scaffolds* diferentes e distribuídos no genoma (Figura 21). Assim, a partir destes dados, é possível prever possíveis mecanismos regulatórios que levam à expressão do conjunto de genes associados com a biodegradação.

Com base na Figura 21, observa-se que todos os *scaffolds* contendo os genes de degradação de compostos aromáticos são aqueles que se alinham ao genoma de referência, não havendo nenhum que não tivesse se alinhado e que apresentasse o *match* com sequências de DNA plasmidial. Assim sendo, estes são genes que estão no genoma cromossomal bacteriano e, portanto, apresentam-se mais estáveis do que se estivessem em genomas extracromossomais.

Figura 21 - Localização dos genes das vias metabólicas de compostos aromáticos no genoma da cepa SB132. O mapa foi obtido usando o programa Artemis e os genes foram anotados usando o servidor web RAST. Algumas vias metabólicas possuem genes que estão distribuídos em diferentes *scaffolds*

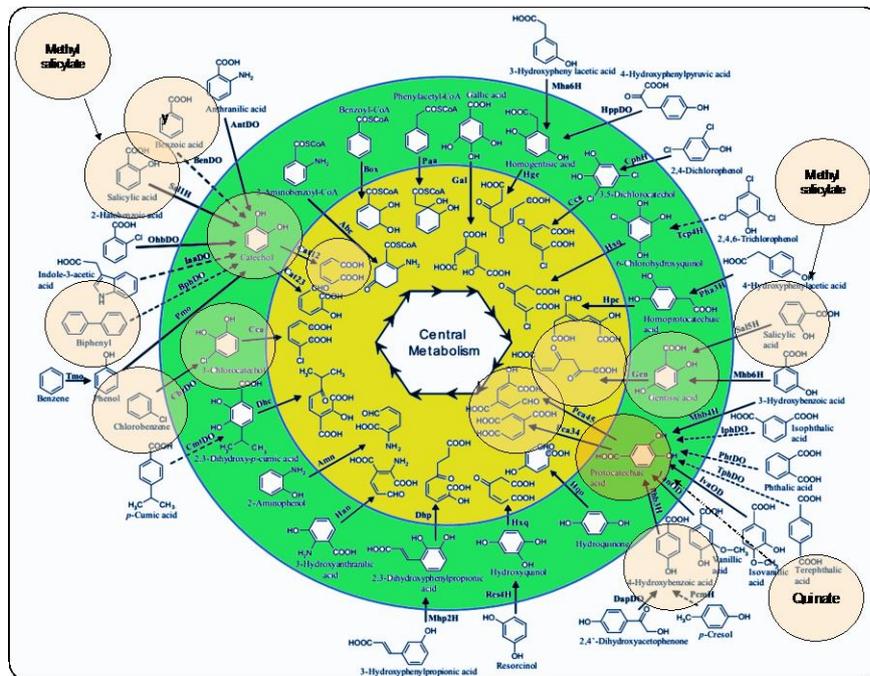


Fonte: O Autor (2019)

5.3.6.1 Vias Periféricas de Degradação de Compostos Aromáticos

A maioria dos compostos aromáticos xenobióticos é metabolizada por vias bem definidas que são, comumente, utilizadas por microrganismos para metabolizar os compostos aromáticos presentes no ambiente. Nestas vias de degradação, as moléculas aromáticas são, primeiramente, transformadas em intermediários-chave, por meio de uma série de vias periféricas, cujos produtos são mais eficientemente metabolizados por vias metabólicas centrais (CAO et al, 2009) (Figura 22). Portanto, o metabolismo periférico refere-se a uma série de reações enzimáticas que ocorrem sobre uma gama de compostos para reduzi-los a um conjunto menor de intermediários centrais (PÉREZ-PANTOJA et al, 2012).

Figura 22 - Metabolismo periférico e clivagem de anéis aromáticos em bactérias. O círculo externo mostra as moléculas interemediárias, tais como aril-CoA e produtos de clivagem de anel di-hidroxilado. As linhas pontilhadas indicam etapas sucessivas de reação. O círculo interno em amarelo mostra as moléculas produtos de clivagem (perda do anel aromático) e dearomatização (cíclicas com perda de ressonância) que produzirão intermediários para o metabolismo central. Os círculos menores indicam as vias metabólicas previstas no genoma da cepa SB132



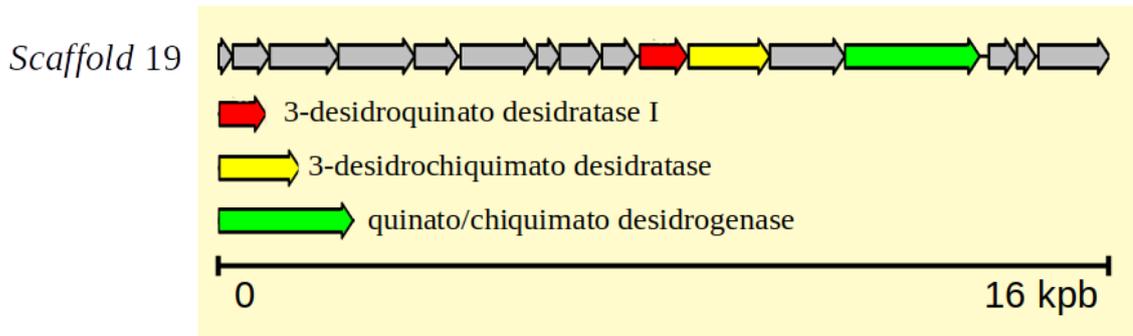
Fonte: Pérez-Pantoja et al (2012)

Na maioria das vias periféricas os compostos aromáticos sofrem uma variedade de reações de modificação do anel aromático, tendo em comum a oxigenação por monooxigenases e/ou dioxigenases para gerar compostos aromáticos di-hidroxilados, tais como catecol, protocatecato, gentisato, homoprotocatecato, homogentisato, hidroquinona, hidroquinol (via superior). Estes produtos de oxigenação poderão ser mais atacados, numa etapa limitante, por enzimas da clivagem do anel aromático, utilizando oxigênio molecular por uma dioxigenase intradiol (ortoclivagem) ou, ainda, uma dioxigenase extradiol (metaclivagem), fornecendo substratos para as reações da via central (via inferior), gerando intermediários para o metabolismo central (DÍAZ et al, 2013; DÍAZ, 2004; FRITSCHER; HOFRICHTER, 1992).

Genes de Degradação de Quinato

A conversão de quinato a protocatecato é realizada em três etapas enzimáticas, onde a primeira enzima quinato/shiquimato dehidrogenase (EC 1.1.99.25) catalisa a conversão de quinato a desidroquinato. Em seguida, a enzima 3-dehidroquinato desidratase (EC 4.2.1.10) catalisa a conversão para desidroshiquimato e, por fim, a enzima 3-desidroshiquimato desidratase (EC 4.2.1.10) catalisa a reação para gerar protocatecato. Esta enzima também pode converter desidroshiquimato, produto da segunda reação, a shiquimato que poderá, então, entrar na via de síntese de aminoácidos aromáticos (DAL et al, 2005). Todas estas proteínas supracitadas foram preditas no genoma, da cepa SB132, bem como suas posições determinadas (Figura 23).

Figura 23 - Organização dos genes da via de degradação de quinato no genoma da cepa SB132. Os genes foram visualizado no programa Artemis e no servidor web RAST. Não é mostrado o gene que codifica para a enzima 3-desidroquinato desidratase presente no *scaffold* 20



Fonte: O Autor (2019)

Genes de Degradação de Esteres de Salicilato

A degradação de esterres de salicilato (salicilatos alquilados) começa com a ação da enzima salicilato esterase para produzir salicilato. Em seguida, a enzima salicilato hidroxilase (EC 1.14.13.1) catalisa a transformação do salicilato a catecol, via hidroxilação descarboxilativa. A enzima salicilato hidroxilase foi predita no genoma da cepa SB132, no *scaffold* 19, tal como uma proteína putativa facilitadora de captação de salicilato no *scaffold* 8. O produto final desta via, o catecol, será melhor metabolizado por outras enzimas para levar à formação de intermediários, os quais entrarão no ciclo do ácido cítrico.

Genes de Degradação de Benzoato

A degradação de benzoato começa pela ação da enzima benzoato 1,2-dioxigenase para converter em cis-1,6-diidroxí-2,4-cicloexadina-1-carboxilato. Em seguida, a enzima *cis*-diol deidrogenase converte este produto em catecol, um

intermediário que poderá entrar na via inferior de degradação de compostos aromáticos (LEEWIS et al, 2016). Estas proteínas supracitadas não foram preditas no genoma da cepa SB132, mas existem indicativos que as mesmas estão presentes em regiões genômicas não anotadas ou sequenciadas. Isto porque proteínas de transporte foram preditas no genoma da cepa SB132, tais como proteína de membrana transportadora de benzoato (scaffold 24), porina específica de benzoato (scaffold 22) e transportador BenK benzoato MFS (scaffold 21).

Genes de Degradação de Bifenilo

A enzima relacionada ao bifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenase III, a única enzima desta via predita no genoma da cepa SB132 (*scaffold 31*), catalisa a reação de oxigenação sobre bifenil 2,3-diol (2,3-diidroxibifenil) para gerar 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilexa-2,4-dienoato (LEEWIS et al, 2016). Esta reação é a terceira etapa da degradação do bifenil até gerar o benzoato. Outras proteínas da via de oxidação de bifenil não foram preditas no genoma da cepa SB132.

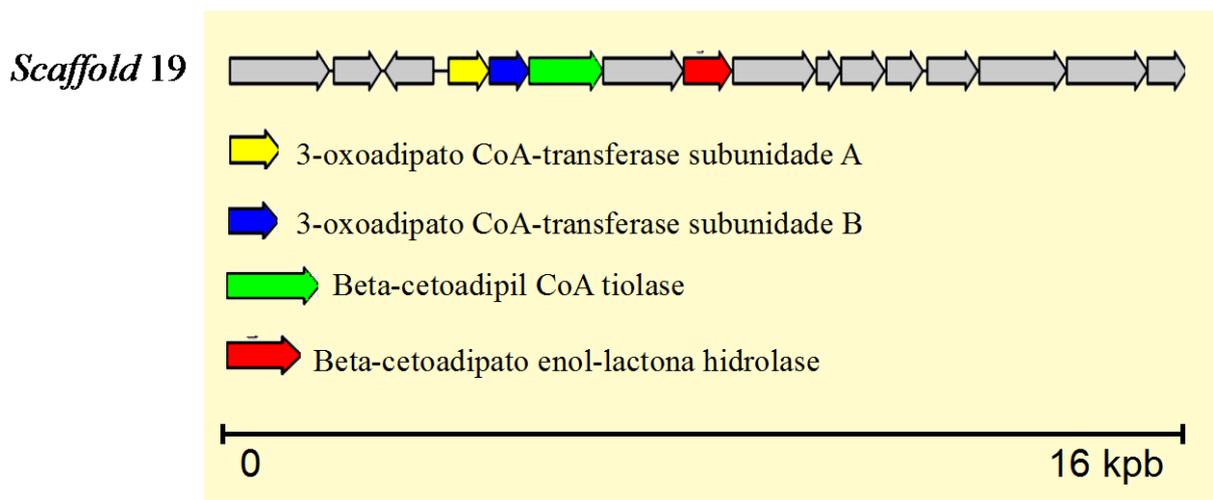
Genes de Degradação de Cloroaromáticos

A via de degradação dos cloroaromáticos é catalisada pela via do beta-cetoadipato modificada, a qual consiste em um conjunto de enzimas que evoluíram para lidar com moléculas aromáticas (HARWOOD; PARALES, 1996). Como por exemplo, na degradação de clorobenzeno, a via começa com a ação das enzimas clorobenzeno 1,2-dioxygenase e clorobenzeno-cis-1,2-diidrodiool desidrogenase, para gerar clorocatecol. Em seguida, a enzima clorocatecol 1,2-dioxygenase atua sobre o clorocatecol, para gerar 2-cloro-cis,cis muconato, sendo este um substrato da enzima cloromuconato cicloisomerase para resultar na *cis*-dienolactona. A enzima beta-

cetoadipato enol-lactona hidrolase atua sobre a cis-dienolactona para gerar maleilacetato que será um substrato da enzima maleilacetato redutase para gerar o 3-oxoadipato (beta-cetoadipato). A enzima 3-oxoadipato CoA-transferase atua sobre 3-oxadipato para gerar 3-oxoadipil-CoA, que é um substrato da beta-cetoadipil CoA tiolase que resulta em acetil-CoA e succinil-CoA que entrarão no ciclo de ácido cítrico (GÖBEL et al, 2002; NESTLER et al, 2007).

Com base na descrição da via metabólica do beta-cetoadipato modificada, somente algumas enzimas foram preditas no genoma da cepa SB132, estando estas presentes no *scaffold* 19, tais como: duas beta-cetoadipato enol-lactona hidrolase, 3-oxoadipato CoA-transferase subunidades A e B, e beta-cetoadipil CoA tiolase. A posição dos genes que codificam estas enzimas também foi analisada (Figura 24).

Figura 24 - Organização dos genes da via de cloroaromáticos no genoma da cepa SB132. Os genes foram visualizado no programa Artemis e no servidor web RAST. Não é mostrado o outro gene que codifica para a enzima beta-cetoadipate enol-lactona hidrolase localizado a montante desta região gênica



Fonte: O Autor (2019)

Genes de Degradação de p-Hidroxibenzoato

O *p*-hidroxibenzoato, a base conjugada de ácido *p*-hidroxibenzoico, é um intermediário do metabolismo de várias moléculas aromáticas, entre elas o 4-cumarato, 4-clorobenzoato, cicloexano carboxilato, chiquimato, vanilato, ferulato, 3-hidroxibenzoato, benzoato, *p*-cresol, entre outras (CAO et al, 2009). A via do metabolismo de *p*-hidroxibenzoato consiste em uma única etapa enzimática para convertê-lo em protocatecato, catalisada pela enzima *p*-hidroxibenzoato hidroxilase (EC 1.14.13.2) (NOGALES et al, 2007). Esta única enzima foi predita no genoma da cepa SB132.

5.3.6.2 Metabolismo de Intermediários Aromáticos Centrais

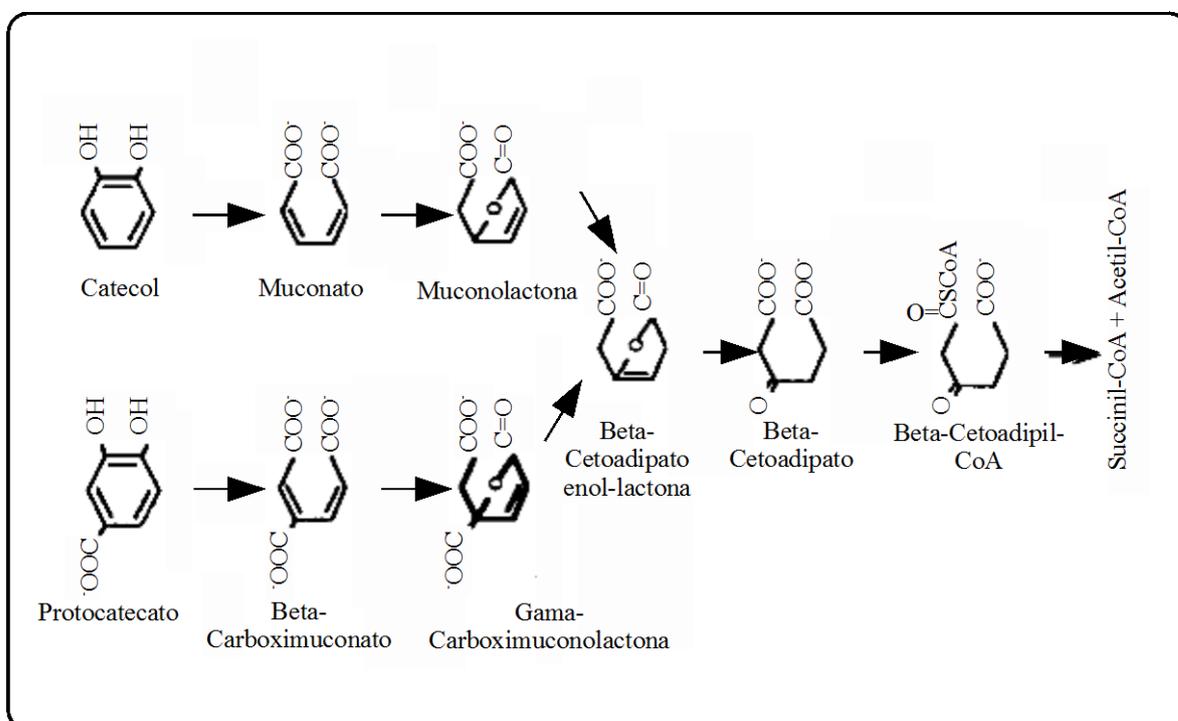
O metabolismo dos intermediários aromáticos centrais consiste nas vias metabólicas que atuam sobre os produtos finais das vias periféricas de degradação dos compostos aromáticos, começando com a clivagem do anel aromático por orto, meta ou para clivagem. O resultado destas vias é o surgimento de moléculas que entrarão no ciclo do ácido cítrico para serem utilizadas como fonte de energia ou como fonte de carbono, em rotas biossintéticas (PÉREZ-PANTOJA et al, 2012). Estes intermediários incluem moléculas di-hidroxiladas, tais como o catecol, protocatecol, gentisato, entre outras (CAO et al, 2009).

em uma via inferior, a metaclivagem, o intermediário di-hidroxilado é clivado na posição adjacente a um dos grupos hidroxil dos intermediários, como o catecol e o protocatecol. Esta via é catalisada por uma dioxigenase que também pode realizar a degradação de substratos catecólicos metilados e, por isso, tem sido bem estudada na degradação de hidrocarbonetos aromáticos metilados, tais como o tolueno e o xileno. Uma via modificada da orto-clivagem pode atuar sobre os substratos aromáticos clorados, tais como clorobenzoatos, clorobenzenos e clorofenoacetatos.

Estas duas vias para clivagens de anéis aromáticos hidroxilados são codificadas, principalmente, por plasmídeos, uma vez que estas compreendem funções celulares bem específicas (HARWOOD; PARALES, 1996).

Outra via inferior, a via da orto-clivagem (Figura 25), mais conhecida como via do beta-cetoadipato, que consiste na via de fissão do anel entre os dois grupos hidroxil, é quase sempre codificada pelo cromossomo e desempenha um papel central no processamento e na degradação de compostos aromáticos de ocorrência natural, bem como na degradação de alguns poluentes ambientais (HARWOOD; PARALES, 1996). Como exemplo, as espécies bacterianas isoladas de serrapilheira de pinheiro, as quais foram capazes de degradar a lignina, utilizando a via da orto-clivagem para degradar o protocatecato e o catecol (SONG, 2009).

Figura 25 - Via da orto-clivagem (beta-cetoadipato) bacteriana. Esta via também é uma via inferior e começa com a clivagem de intermediários metabólicos provenientes das vias periféricas do metabolismo de compostos aromáticos



Fonte: Harwood e Parales (1996)

Genes do Ramo Catecol da Via do Beta-cetoadipato

A via de degradação do intermediário aromático, catecol, poderá ser a via da orto ou metaclivagem. Considerando-se a via da orto-clivagem, a via do beta-cetoadipato (Figura 24), o catecol sofre fissão do anel aromático pela ação da enzima catecol 1,2-dioxigenase (EC 1.13.11.1) para gerar *cis,cis* muconato (muconato). Em seguida, a enzima *cis,cis*-muconato cicloisomerase (EC 5.5.1.1) atua sobre o *cis,cis* muconato, convertendo-o em muconolactona (muconolactona), o substrato da enzima muconolactona isomerase (EC 5.3.3.4), o qual vai gerar a beta-cetoadipato enol-lactona. Em seguida, a enzima enol-lactona hidrolase (EC 3.1.1.24) vai atuar sobre este último substrato convertendo-o em beta-cetoadipato. A enzima beta-cetoadipato:succinil-CoA transferase (EC 2.8.36) atuará sobre o beta-cetoadipato, convertendo-o em beta-cetoadipil-CoA, seguido da ação da enzima beta-cetoadipil-CoA tiolase (EC 2.3.1.174), gerando succinil-CoA e acetil-CoA, que entrarão no ciclo do ácido cítrico (CASPI, 2006; HARWOOD; PARALES, 1996).

Dentre as enzimas citadas, as duas enzimas beta-cetoadipato enol-lactona hidrolase (EC 3.1.1.24), a 3-oxoadipato CoA-transferase subunidades A e B (EC 2.8.8.36), e a succinil-CoA:3-cetoacido-coenzime A transferase subunidade A (EC 2.8.8.35) foram preditas no genoma da cepa SB132. Destas enzimas, a succinil-CoA:3-cetoacido-coenzime A transferase subunidade A pertence à família das 3-oxoadipato CoA-transferase subunidades A.

Genes do Ramo Protocatecato da Via Beta-cetoadipato

A via de degradação do intermediário aromático protocatecol difere em algumas enzimas daqueles da via do catecol (Figura 24). Considerando a via do beta-cetoadipato, a via começa com a ação da enzima protocatecato 3,4-dioxigenase (EC 1.13.11.3), gerando 3-carboxi-*cis,cis*-muconato cicloisomerase (beta-

carboximuconato). Em seguida, a enzima 3-carboximuconato cicloisomerase (EC 5.5.1.2) atua sobre 3-carboxi-cis,cis-muconato, gerando 2-carboxi-2,5-di-hidro-5-oxofuran-2-il)-acetato (gama-carboximuconolactona), sendo este um substrato da enzima 4-carboximuconolactona descarboxilase (EC 4.1.1.44), o qual resultará na molécula beta-cetoadipato enol-lactona. Tal como na via do catecol, a enzima enol-lactona hidrolase (EC 3.1.1.24) vai atuar sobre este último substrato, convertendo-o em beta-cetoadipato. A enzima beta-cetoadipato:succinil-CoA transferase (EC 2.8.8.36) atuará sobre o beta-cetoadipato, convertendo-o em beta-cetoadipil-CoA, seguido da ação da enzima beta-cetoadipil-CoA tiolase (EC 2.3.1.174) para gerar succinil-CoA e acetil-CoA, que entrarão no ciclo do ácido cítrico (HARWOOD; PARALES, 1996; CASPI, 2006).

No genoma da cepa SB132 foram preditas as proteínas: 3-carboxi-cis,cis-muconato cicloisomerase (EC 5.5.1.2); 3-oxoadipato CoA-transferase, subunidade A (EC 2.8.3.6); 3-oxoadipato CoA-transferase, subunidade B (EC 2.8.3.6); 4-carboximuconolactona descarboxilase (EC 4.1.1.44); beta-cetoadipato enol-lactona hidrolase (EC 3.1.1.24); beta-cetoadipil CoA tiolase (EC 2.3.1.-); transportador de ácido dicarboxílico PcaT; proteína reguladora PcaR do *regulon* Pca; proteína PhaK-like; protocatecato 3,4-dioxigenase, cadeia alfa (EC 1.13.11.3); protocatecato 3,4-dioxigenase, cadeia beta (EC 1.13.11.3) e succinil-CoA:3-cetoacido-coenzima A transferase, subunidade A (EC 2.8.3.5).

Com base nos dados descritos acima, observa-se que a cepa SB132 possui em seu genoma a via completa de degradação do intermediário aromático protocatecato, que poderá ser a via de afunilamento de intermediários, provenientes da degradação de compostos aromáticos. No entanto, levando-se em consideração a Tabela 11, a qual mostra que tais genes estão localizados em *scaffolds* diferentes (2, 8, 13, 19 e 21), pode-se inferir que os mesmos não estão organizados na forma de *operon*.

Metabolismo de Salicilato e Gentisato

As vias metabólicas “catabolismo de salicilato e gentisato” e “degradação de gentisato” não serão discutidas neste trabalho, pois suas proteínas apresentam sobreposição de atividades, ou seja, são complementares. Contudo, é necessário esclarecer que as proteínas destas vias também estão presentes no genoma da cepa SB132.

5.3.7 Comparação do Genoma da Cepa SB132 com Espécies Biodegradadoras

Com o objetivo de mensurar o potencial da cepa SB132 como biodegradadora de hidrocarbonetos, foi realizada a comparação do genoma desta bactéria com cepas descritas como tendo grande potencial para realizar a biorremediação (Tabela 11) (APÊNDICE G). As cepas comparadas foram escolhidas com base em suas peculiaridades na biodegradação, tais como a *Alcanivorax borkumensis*, que é uma bactéria marinha cosmopolita que utiliza hidrocarbonetos alifáticos do petróleo como fonte exclusiva de carbono e energia (SCHNEIKER et al, 2006); a *Mycobacterium vanbaalenii*, que foi a primeira bactéria isolada com capacidade de metabolizar o pireno, HPA de alta massa molecular (KIM et al, 2006); a *Cycloclasticus zancles*, que é uma importante bactéria hidrocarbonoclástica obrigatória marinha (OHCB), especializada na degradação de HPA (YAKIMOV et al, 2013); e a *Acinetobacter oleivorans* DR1, que pode utilizar alcanos, C12 a C30, como única fonte de carbono, mas não alcanos de cadeia curta (PARK et al, 2017).

Com base na Tabela 11, a cepa PYR-1 teve o maior número de sequências codificantes preditas e um maior número de subsistemas, comparada às outras cepas, cujos valores foram 2.271 e 445, respectivamente. Tais valores eram esperados uma vez que em procariotos a densidade de genes em bactérias está, diretamente, relacionado com o tamanho do genoma (ROCHA, 2008), tendo assim, PYR-1 um

genoma com tamanho de 6,4 Mb e outras bactérias tendo genomas com tamanhos próximos de 4 Mb ou menos.

Tabela 11 - Visão geral das características dos genomas de espécies bacterianas comparadas com o genoma da cepa SB132

Espécies bacterianas	Scaffolds Contigs	Tamanho (bp)	Conteúdo GC (%)	PEG	RNA	Subsistemas no RAST	PEGs em Subsistemas	% PEGs em subsistemas	Código GenBank
<i>Acinetobacter junii</i> SB132	63	3.454.553	38,4	3.262	70	410	1.461	45	SDMM00000000.1
<i>Acinetobacter junii</i> 65	1	3.378.307	38,6	3.227	92	414	1.451	45	NZ_CP019041.1
<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	1	3.120.143	54,7	2.888	51	438	1.585	55	NC_008260.1
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1	1	6.491.865	67,8	6.242	55	445	2.271	37	NC_008726.1
<i>Cycloclasticus zancles</i> 78-ME	1	2.613.078	41,8	2.558	38	414	1.440	57	NC_021917.1
<i>Acinetobacter oleivorans</i> DR1	1	4.152.543	38,7	3.862	89	441	1.830	48	NC_014259.1

Fonte: O Autor (2019)

As diferenças entre as bactérias anotadas são mais evidentes, quando se comparam seus diferentes tipos de subsistemas, bem como as diferentes proteínas que existem em cada uma delas (Figura 26). Vale ressaltar que as diferenças entre as cepas não podem ser obtidas na sua totalidade, uma vez que a anotação é dependente do banco de dados, sendo, portanto, dependente da quantidade de dados acurados nestes bancos.

Com base na Figura 26, observa-se que a cepa DR1 apresentou 13 subsistemas diferentes, a cepa 78-ME com 12 subsistemas diferentes, a cepa PYR-1 com 11 subsistemas, a cepa SB132 com 10 subsistemas, a cepa 65 com 8 subsistemas e a cepa SK2 com 3 subsistemas diferentes. Com relação ao conteúdo de proteínas nos subsistemas, observa-se, ainda, que a cepa DR1 apresenta maiores quadrados verdes, quando comparada com outras cepas. A cepa SB132 apresenta quantidades de quadrados verdes próximos àqueles apresentados pelas cepas 78-ME e PYR-1. As cepas 65 e SK2 apresentaram as quantidades menores de quadrados verdes.

desta via metabólica, como já discutido no tópico 4.3.6.2. No entanto, outras cepas também apresentaram subsistemas mais representados, quando comparado com a cepa SB132, tais como o subsistema de bifenilo, tendo apenas uma proteína nesta bactéria, enquanto as cepas PYR-1 e 78-ME apresentaram 10 e 9, respectivamente.

As cepas 65 e SK2 apresentaram os menores valores, tanto de tipos de subsistemas como de quantidades de proteínas diferentes em cada um, principalmente, a cepa SK2. Este resultado era esperado, uma vez que as bactérias da espécie *Alcanivorax borkumensis* são, obrigatoriamente, hidrocarbonoclásticas, com especificidade apenas para hidrocarbonetos de cadeia alifática, aumentando sua população, rapidamente, no ambiente marinho, após derramamento de óleo (SANTOS et al, 2010).

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base nos dados obtidos nesta pesquisa, a cepa SB132 não apresentou produção de agentes biosurfactantes, sendo este um indicativo de que esta cepa pode não ser uma boa produtora destas moléculas, nas condições experimentais deste trabalho. Possivelmente, esta bactéria utiliza sua capacidade em aderir, diretamente, aos substratos hidrofóbicos presentes no óleo diesel, formando biofilme, acompanhado da produção, em níveis menores, de agentes bioemulsificantes, a fim de captar os hidrocarbonetos no óleo diesel e, assim, metabolizá-los pelas vias de degradação de compostos alifáticos e aromáticos.

Em relação à degradação de hidrocarbonetos alifáticos, os dados genômicos associados à literatura, a cepa SB132 pode utilizar-se de três caminhos enzimáticos para a ativação de alcanos e sua, posterior, metabolização. No primeiro caminho, tendo como alvo os alcanos de cadeia média (<C18), a cepa pode utilizar a enzima AlkB, expressa pelos três genes *alcano-1 monooxygenase*. No segundo caminho, a cepa pode utilizar a enzima AlmA, expressa pelos dois genes *monooxygenase flavina-dependente*, tendo como alvo os alcanos de cadeia longa (> C18). Por fim, no terceiro caminho, a cepa pode utilizar a enzima CYP, expressa pelo único gene *citocromo P450 hidroxilase*, tendo como alvo os alcanos de tamanhos diversos, como também os compostos aromáticos.

Adicionalmente, com exceção do gene que codifica a proteína AlmA, todas as outras tiveram próximos dos seus *loci* a presença do gene que codifica as proteínas reguladoras do tipo AraC. É possível que estas proteínas estejam participando dos processos regulatórios, dependente de *operon* ou não, que respondam à presença de alcanos, quando a cepa SB132 estiver em um ambiente contendo alcanos. Alguns destes dados foram corroborados por estudos prévios, os quais revelaram que esta cepa bacteriana consegue metabolizar hidrocarbonetos alifáticos, além de expressar a proteína AlkB, bem como proteínas da família AraC, quando cultivadas em óleo diesel como sua única fonte de carbono.

Em relação à degradação de compostos aromáticos, a cepa SB132 apresentou vias metabólicas periféricas de degradação de compostos aromáticos, tais como aquelas que atuam na degradação de benzoato, bifenilo, cloroaromáticos, p-hidroxibenzoato, quinato e ésteres de salicilato. Esta cepa apresentou, ainda, vias metabólicas de intermediários aromáticos centrais, tais como o catecol e o protocatecato, revelando proteínas pertencentes à via do beta-cetoadipato (orto-clivagem), cujo produto deste metabolismo compreende as moléculas que entrarão no ciclo do ácido cítrico. A via do gentisato também foi predita, porém devido à sobreposição de enzimas, tais dados requerem mais investigações.

A comparação do genoma da cepa SB132 com espécies de grande potencial biodegradador revelou que esta espécie, qualitativamente, tem um potencial de degradação de compostos aromáticos equivalente aos apresentados pelas cepas *M. vanbaalenii* PYR-1 e *C. zancles* 78-ME, duas espécies com alto potencial de degradação de compostos aromáticos. Análises experimentais, tais como verificação dos níveis de degradação de compostos aromáticos, usando cromatografia, bem como estudos funcionais, como a obtenção do transcriptoma, são necessárias para corroborar estes dados.

É importante que análises computacionais mais apuradas sejam realizadas, utilizando-se os dados do genoma da cepa SB132 para que mecanismos regulatórios sejam estabelecidos, tais como aqueles envolvidos na degradação de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos. Tais informações serão importantes para a utilização destes mecanismos na biotecnologia, como, por exemplo, na proposição de tecnologias de remediação via biosensor, bem como, na proposição de organismos geneticamente modificados para degradar compostos xenobióticos alvos ou, ainda, na montagem de um consórcio microbiano que poderá ser usado como agente biorremediador.

Adicionalmente, a bactéria *A. junii* SB132 também pode ser avaliada experimentalmente quanto a sua capacidade em crescer em vários substratos xenobióticos puros, tais como hidrocarbonetos alifáticos com tamanhos de cadeia variados, moléculas aromáticas de alta massa molecular e, por fim, intermediários metabólicos das moléculas anteriores. Estes resultados poderão corroborar as vias

metabólicas preditas no genoma desta cepa através do espectro de capacidade degradativa, ou revelar os caminhos enzimáticos adotados pela bactéria ao metabolizar tais moléculas intermediárias.

REFERÊNCIAS

ABAT, C., FOURNIER, P. E., JIMENO, M. T., ROLAIN, J. M., & RAOULT, D. (2018). Extremely and pandrug-resistant bacteria extra-deaths: myth or reality? *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 37(9), 1687–1697. doi.org/10.1007/s10096-018-3300-0

ABDEL-EL-HALEEM, D. (2003). Minireview *Acinetobacter* : environmental and biotechnological applications, 2(April), 71–74.

ABDEL-SHAFY, H. I., & MANSOUR, M. S. M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(1), 107–123. doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011

ABRIL, J. F., & CASTELLANO, S. (2018). Genome annotation. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, 1–15. doi.org/10.1007/978-1-4939-6622-6_5

ACOSTA-GONZÁLEZ, A., MARTIRANI-VON ABERCRON, S.-M., ROSSELLÓ-MÓRA, R., WITTICH, R.-M., & MARQUÉS, S. (2015). The effect of oil spills on the bacterial diversity and catabolic function in coastal sediments: a case study on the Prestige oil spill. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(20), 15200–15214. doi.org/10.1007/s11356-015-4458-y

ADAV, S. S., CHEN, M.-Y., LEE, D.-J., & REN, N.-Q. (2007). Degradation of phenol by *Acinetobacter* strain isolated from aerobic granules. *Chemosphere*, 67(8), 1566–72. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.11.067

ADLARD, E. R. (2016). Yejun Wu (Ed.): *Oil Spill Impacts. Taxonomic and Ontological Approaches. Chromatographia*, 79(17–18), 1207–1208. doi.org/10.1007/s10337-016-3111-3

ADRIAENS, P., FOCHT, D.D. (1991). Cometabolism of 3,4-dichlorobenzoate by *Acinetobacter* sp. strain 4-CB1. *Applied and Environment Microbiology*, 57(1):173-179.

AGARRY, S.E., SOLOMON, B.O., & LAYOKUN, S.K. (2008). Kinetics of batch microbial degradation of phenols by indigenous binary mixed culture of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescence*. *African Journal of Biotechnology*, 14: 2417-2423.

AHMAD, S.A., SHAMAAN, N.A., SYED, M.A., DAHALAN, F.A., KHALIL, K.A., RAHMAN, N.A.A., SHUKOR, M.Y. (2017). Phenol degradation by *Acinetobacter* sp. in the presence of heavy metals. *J.Natn.Sci.Foundation Sri Lanka*, 45(3), 247 – 253. doi.org/10.4038/jnsfsr.v45i3.8189

- AISSLABIE, J.M., BALKS, M.R., FOGHT J.M., & WATERHOUSE, E.J. (2004). Hydrocarbon spills on Antarctic soils: effects and management. *Environmental Science & Technology*, 38: 1265-1274.
- AL-GHEETHI, A., NOMAN, E., ISMAIL, N., SAL-GHEETHI, A. A., MOLHIT, A., & BALA DAVID, J. (2015). Prevalence of Antimicrobial Resistance Bacteria in Non-Clinical Environment. *International Conference on Environmental Research and Technology*, (January 2017). Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/281393855>
- AL-TAHHAN, R. A., SANDRIN, T. R., BODOUR, A. A., & MAIER, R. M. (2000). Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: Effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3262–3268. doi.org/10.1128/AEM.66.8.3262-3268.2000
- ALI, A.O., HOHN, C., ALLEN, P. J., FORD, L., DAIL, M. B., PRUETT, S., & PETRIE-HANSON, L. (2014). The effects of oil exposure on peripheral blood leukocytes and splenic melano-macrophage centers of Gulf of Mexico fishes. *Marine Pollution Bulletin*. 79, 87–93. doi.org/ 10.1016/j.marpolbul.2013.12.036
- AMORIM, W., ALBUQUERQUE, R.N., COSTA, P.C., SANTOS, O.V., MELLO, J.S., MONÇÃO, G. S. ... AMORIM, V.M. (2003). *Poluição. Série 1. Programa de educação ambiental: Geama*, 24p.
- AMORIM, W., ALBUQUERQUE, R.N., COSTA, P.C., SANTOS, O.V., MELLO, J.S., MONÇÃO, G. S., ...AMORIM, V.M. (2003). *Poluição. Série 1. Programa de educação ambiental: Geama*, 24p.
- ANDRADE, J.A., AUGUSTO, F., & JARDIM, I.C.S. (2010). Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética Química*, 35(3): 17 – 43. doi.org/10.1590/S0100-46702010000300002
- APARNA, C., SARITHA, P., HIMABINDU, V., ALOK B., & ANJANEYULU, Y. (2010). Evaluation of bioremediation effectiveness on sediments Contaminated with industrial wastes. *international journal of environmental sciences*, 1(4): 607-620.
- ARAKAWA, K., & TOMITA, M. (2007). The GC Skew Index A Measure of Genomic Compositional Asymmetry and the Degree of Replicational Selection. *Evolutionary Bioinformatics*, 3, 159–168.
- ARAÚJO, S.P. (2014). Produção de inóculo microbiano, obtido de macrófitas aquáticas na Amazônia, com potencial de degradação de hidrocarbonetos de petróleo. Tese de doutorado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 157p.

- AZEVEDO-SANTOS, V. M., GARCIA-AYALA, J. R., FEARNSIDE, P. M., ESTEVES, F. A., PELICICE, F. M., LAURANCE, W. F., & BENINE, R. C. (2016). Amazon aquatic biodiversity imperiled by oil spills. *Biodiversity and Conservation*, 25(13), 2831–2834. doi.org/10.1007/s10531-016-1192-9
- AZIZ, R. K., BARTELS, D., BEST, A., DEJONGH, M., DISZ, T., EDWARDS, R. A., ... ZAGNITKO, O. (2008). The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9, 1–15. doi.org/10.1186/1471-2164-9-75
- AZUBUIKE, C. C., CHIKERE, C. B., & OKPOKWASILI, G. C. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11), 1–18. doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x
- BAO, M., PI, Y., WANG, L., SUN, P., LI, Y., & CAO, L. (2014). Lipopeptide biosurfactant production bacteria *Acinetobacter* sp. D3-2 and its biodegradation of crude oil. *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, 16(4), 897–903. doi.org/10.1039/c3em00600j
- BAQUERO, F., MARTÍNEZ, J. L., & CANTÓN, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 260–265. doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006
- BARBIERI, S.M. (1997). Biodegradação de compostos aromáticos. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. *Microbiologia ambiental*. Jaguariúna. Embrapa-CNPMA, p. 211-242.
- BARBIERI, S.M. (1997). Biodegradação de compostos aromáticos. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. *Microbiologia ambiental*. Jaguariúna. Embrapa-CNPMA, p. 211-242.
- BARNHART, D., KAPLAN, D. L., WINTER, W. T., PANILAITIS, B. J., & KIEMLE, D. J. (2012). Structural details of the Polyelectrolytic Exopolysaccharide (APE), the stabilizing component of the *Acinetobacter venetianus* RAG-1 emulsan complex. *Carbohydrate Polymers*, 88(1), 257–262. doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.006
- BARRETO, D. (2001). Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). *Investigação para remediação*. In.: Manual de gerenciamento de áreas contaminadas. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas/manual-degerenciamento-de-ACs/7->>. Acesso em 22/03/14.
- BASUKI, W., SYAHPUTRA, K., SURYANI, A. T., & PRADIPTA, I. (2011). Biodegradation of Used Engine Oil by *Acinetobacter junii* TBC 1 . 2, 16(2), 132–138.
- BAUMGARTEN, T., VAZQUEZ, J., BASTISCH, C., VERON, W., FEUILLOLEY, M. G. J., NIETZSCHE, S., ... HEIPIEPER, H. J. (2012). Alkanols and chlorophenols cause different physiological adaptive responses on the level of cell surface properties and

membrane vesicle formation in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(2), 837–845. doi.org/10.1007/s00253-011-3442-9

BENTO, F. M., ANASTÁCIO, F., CAMARGO, D. O., OKEKE, B., & FRANKENBERGER-JÚNIOR, W. T. (2003). Bioremediation of soil contaminated by diesel oil, 34, 65–68.

BERARDINIS, V. DE, DUROT, M., WEISSENBACH, J., & SALANOUBAT, M. (2009). *Acinetobacter baylyi* ADP1 as a model for metabolic system biology. *Current Opinion in Microbiology*, 12(5), 568–576. doi.org/10.1016/j.mib.2009.07.005

BERNETH, L., FIRTH, I., MCALLISTER, P., & RHODES, S. (2000). Biotechnologies for remediation and pollution control in the mining industry. *Minerals and Metallurgical Processing*, 17: 105-111. doi.org/10.1007/BF03402836

BEYER, J., TRANNUM, H. C., BAKKE, T., HODSON, P. V., & COLLIER, T. K. (2016). Environmental effects of the Deepwater Horizon oil spill: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 110(1), 28–51. doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.027

BHAWSAR, S.D., CHOPADE, B.A., & CAMEOTRA, S.S. (2012). Degradation of Diesel by *Acinetobacter* genospecies Isolated from Rhizosphere of Wheat. *Journal of Advances in Developmental Research*, 3(1): 70-76

BOOPATHY, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74(1), 63–67. doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00144-3

BRETTE, F., MACHADO, B., CROS, C., INCARDONA, J. P., SCHOLZ, N. L., & BLOCK, B.A. (2014). Crude Oil Impairs Cardiac Excitation-Contraction Coupling in Fish. *Science*. 343(617), 772-776. doi.org/10.1126/science.1242747

BRIGANTI, F., PESSIONE, E., GIUNTA, C., & SCOZZAFAVA, A. (1997). Purification, biochemical properties and substrate specificity of a catechol 1,2-dioxygenase from a phenol degrading *Acinetobacter radioresistens*. *FEBS Letters*, 416(1), 61–64. doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01167-8

BUCHAN, A., NEIDLE, E.L., & MORAN, M.A. (2001). Diversity of the Ring-Cleaving Dioxygenase Gene *pcaH* in a Salt Marsh Bacterial Community. *Applied and Environment Microbiology*, 67(12): 5801–5809. doi.org/ 10.1128/AEM.67.12.5801–5809.2001

BUGG, T. D. H. (2003). Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron*, 59(36), 7075–7101. doi.org/10.1016/S0040-4020(03)00944-X

BURTON, S.G. (2003). Oxidizing enzymes as biocatalysts. *Trends in Biotechnology*, 21(12): 543-549. doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.10.006

CAMACHO-CHAB, J., GUÉZENNEC, J., JESUS CHAN-BACAB, M., RÍOS-LEAL, E., SINQUIN, C., MUÑIZ-SALAZAR, R., ... OTTO ORTEGA-MORALES, B. (2013). Emulsifying Activity and Stability of a Non-Toxic Bioemulsifier Synthesized by *Microbacterium* sp. MC3B-10. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18959–18972. doi.org/10.3390/ijms140918959

CAO, B., NAGARAJAN, K., & LOH, K. (2009). Biodegradation of aromatic compounds : current status and opportunities for biomolecular approaches, 207–228. doi.org/10.1007/s00253-009-2192-4

CAPOSIO, P., PESSIONE, E., GIUFFRIDA, G., CONTI, A., LANDOLFO, S., GIUNTA, C., & GRIBAUDO, G. (2002). Cloning and characterization of two catechol 1,2-dioxygenase genes from *Acinetobacter radioresistens* S13. *Research in Microbiology*, 153(2), 69–74. doi.org/10.1016/s0923-2508(01)01290-6

CARDENES, G. O., (2017). AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE ACINETOBACTER JUNII SB132 NA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DO DIESEL. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS, MANAUS. 92P.

CARNEIRO, F. C., WEBER, S. S., SILVA, O. N., JACOBOWSKI, A. C., RAMADA, M. H. S., MACEDO, M. L. R., ... PARACHIN, N. S. (2018). Recombinant Inga Laurina Trypsin Inhibitor (ILTI) Production in *Komagataella Phaffii* Confirms Its Potential Anti-Biofilm Effect and Reveals an Anti-Tumoral Activity. *Microorganisms*, 6(2), 37. doi.org/10.3390/microorganisms6020037

CARVER, T., HARRIS, S. R., BERRIMAN, M., PARKHILL, J., & MCQUILLAN, J. A. (2012). Artemis: An integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics*, 28(4), 464–469. doi.org/10.1093/bioinformatics/btr703

CASP, R. (2006). MetaCyc Pathway: aromatic compounds degradation via β -keto adipate. Disponível em: <<https://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-5431&detail-level=2>>. Último acesso em 20/06/2019.

CATANIA, V., CAPPELLO, S., DI GIORGI, V., SANTISI, S., DI MARIA, R., MAZZOLA, A., ... QUATRINI, P. (2018). Microbial communities of polluted sub-surface marine sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 131(March), 396–406. doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.015

CETESB – COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. PRINCIPAIS ACIDENTES INTERNACIONAIS. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://CETESB.SP.GOV.BR/EMERGENCIAS-QUIMICAS/WP-CONTENT/UPLOADS/SITES/22/2013/12/PRINCIPAIS-ACIDENTES-INTERNACIONAIS.PDF](https://cetesb.sp.gov.br/emergencias-quimicas/wp-content/uploads/sites/22/2013/12/principais-acidentes-internacionais.pdf)>. ÚLTIMO ACESSO EM 13/03/2019.

CHANG, S. E., STONE, J., DEMES, K., & PISCITELLI, M. (2014). Consequences of oil spills: A review and framework for informing planning. *Ecology and Society*, 19(2). doi.org/10.5751/ES-06406-190226

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. PERFORMANCE STANDARDS FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING; FIFTEENTH INFORMATIONAL SUPPLEMENT. CLSI DOCUMENT M100-S15 (ISBN 1-56238-556-9). CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 940 WEST VALLEY ROAD, SUITE 1400, WAYNE, PENNSYLVANIA 19087-1898 USA, 2005.

CORDOVA-ROSA, S. M., DAMS, R. I., CORDOVA-ROSA, E. V., RADETSKI, M. R., CORRÊA, A. X. R., & RADETSKI, C. M. (2009). Remediation of phenol-contaminated soil by a bacterial consortium and *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from an industrial wastewater treatment plant. *Journal of Hazardous Materials*, 164(1), 61–66. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.07.120

CRAPEZ, M.A.C., BORGES, A.L.N., BISPO, M.G.S., & PEREIRA, D.C. (2002). Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. *Ciência hoje*, 30(179), 32-37.

CRAPEZ, M.A.C., BORGES, A.L.N., BISPO, M.G.S., & PEREIRA, D.C. (2002). Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. *Ciência hoje*, 30(179): 32-37.

DAL, S., TRAUTWEIN, G., & GERISCHER, U. (2005). Transcriptional organization of genes for protocatechuate and quinate degradation from *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 1025–1034. doi.org/10.1128/AEM.71.2.1025-1034.2005

DANOT, O. (2001). A complex signaling module governs the activity of MalT, the prototype of an emerging transactivator family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(2), 435–440. doi.org/10.1073/pnas.98.2.435

DARLING, A. C. E., MAU, B., BLATTNER, F. R., & PERNA, N. T. (2004). Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements. *Genome Research*, 14, 1394–1403. doi.org/10.1101/gr.2289704.tion

DE SÁ, P. H. C. G., GUIMARÃES, L. C., DAS GRAÇAS, D. A., DE OLIVEIRA VERAS, A. A., BARH, D., AZEVEDO, V., ... RAMOS, R. T. J. (2017). Next-generation sequencing and data analysis: Strategies, tools, pipelines and protocols. *Omics Technologies and Bio-engineering: Towards Improving Quality of Life*, 1, 191–207. doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00011-7

DEL ANGEL, V. D., HJERDE, E., STERCK, L., CAPELLA-GUTIERREZ, S., NOTREDAME, C., VINNERE PETTERSSON, O., ... LANTZ, H. (2018). Ten steps to get started in Genome Assembly and Annotation. *F1000Research*, 7, 148. doi.org/10.12688/f1000research.13598.1

DELILLE, D., DELILLE, B., & PELLETIER, E. (2002). Effectiveness of bioremediation of crude oil contaminated subantarctic intertidal sediment: the microbial response. *Microbial ecology*, 44:118-126. doi.org/10.1007/s00248-001-1047-z

DÍAZ, E. (2004). Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology*, 7(3), 173–180. doi.org/im2304027 [pii]

DÍAZ, E., JIMÉNEZ, J. I., & NOGALES, J. (2013). Aerobic degradation of aromatic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, 24, 431–442. doi.org/10.1016/j.copbio.2012.10.010

DICKS, B. (1998). The environmental impact of marine oil spills - effects, recovery and compensation. The International Tanker Owners Pollution Federation Ltd. Paper presented at the International Seminar on Tanker Safety, Pollution Prevention, Spill Response and Compensation, 6 November 1998, Rio de Janeiro, Brazil, 8p. Disponível em: <<https://www.itopf.org/knowledge-resources/documents-guides/document/the-environmental-impact-of-marine-oil-spills-effects-recovery-and-compensation-1998/>>. Último acesso dia 13/03/2019.

DINAMARCA, M. A., ARANDA-OLMEDO, I., PUYET, A., & ROJO, F. (2003). Expression of the *Pseudomonas putida* OCT Plasmid Alkane Degradation Pathway Is Modulated by Two Different Global Control Signals : Evidence from Continuous Cultures. *Journal of Bacteriology*, 185(16), 4772–4778. doi.org/10.1128/JB.185.16.4772

DONLAN, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Diseases*. *Emerg Infect Dis.*, 8(9), 881–890. doi.org/10.3201/eid0809.020063

DOYLE, K. (2015). DNA Quantitation in Next-Generation Sequencing Library Workflows. Disponível em: <<http://www.promega.com.br/resources/pubhub/dna-quantitation-in-next-generation-sequencing-library-workflows/>>. Acesso em 23/06/2019.

DUBANSKY, B.; WHITEHEAD, A.; MILLER, J.T.; RICE, C. D.; GALVEZ, F. 2013. MULTITISSUE MOLECULAR, GENOMIC, AND DEVELOPMENTAL EFFECTS OF THE DEEPWATER HORIZON OIL SPILL ON RESIDENT GULF KILLIFISH (*FUNDULUS GRANDIS*). *ENVIRON SCI TECHNOL*. 2013 MAY 21;47(10):5074-82. DOI.ORG/10.1021/ES400458P. EPUB 2013 MAY 9.

EBRAICO, P. R. B. M. (2005). As opções de geopolítica americana : o caso do Golfo Pérsico / Paula Rubea Bretanha Mendonça Ebraico; orientador: Nizar Messari. – Rio de Janeiro : PUC, Departamento de Relações Internacionais. 136 f.

ECOAGÊNCIA. (2012). Vazamento no Golfo do México deixa marcas profundas na biodiversidade marinha. Disponível em:

<<http://www.ecoagencia.com.br/?open=noticias&id=VZISXRVVONIYHZFTT1GdXJFbKVVVB1TP>>. Último acesso em 13/03/2019.

EOM, H. J., & PARK, W. (2017). Inhibitory Effect of Taurine on Biofilm Formation During Alkane Degradation in *Acinetobacter oleivorans* DR1. *Microbial Ecology*, 74(4), 821–831. doi.org/10.1007/s00248-017-1010-2

ERMOLAEVA, M. D., WHITE, O., & SALBERG, S. L. (2001). Prediction of *operons* in microbial genomes. *Nucleic Acids Research*, 29(5), 1216–1221. doi.org/10.1093/nar/29.5.1216

ESWARAMOORTHY, S., BONANNO, J. B., BURLEY, S. K., & SWAMINATHAN, S. (2007). Mechanism of action of a flavin- containing monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(26), 9832–9837. doi.org/doi/10.1073/pnas.0706514104

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. (2018). Antimicrobial resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 3. Retrieved from <http://jac.oxfordjournals.org/content/54/2/311.short>

FARAG, S., SOLIMAN, N., & ABDEL-FATTAH, Y. (2018). Enhancement of Crude Oil Biodegradation by Immobilized Bacterial Consortium in Small Batch and Continuous Bioreactor Modes. *Egyptian Journal of Chemistry*, 61(6), 1019–1030. doi.org/10.21608/ejchem.2018.3820.1336

FATIMA, K., IMRAN, A., AMIN, I., KHAN, Q. M., & AFZAL, M. (2016). Plant species affect colonization patterns and metabolic activity of associated endophytes during phytoremediation of crude oil-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(7), 6188–6196. doi.org/10.1007/s11356-015-5845-0

FISG - THE FEDERAL INTERAGENCY SOLUTIONS GROUP. (2010). Oil Budget Calculator, Technical Documentation, (November). Disponível em: <https://www.restorethegulf.gov/sites/default/files/documents/pdf/OilBudgetCalc_Full_HQ-Print_111110.pdf>. Último acesso em 15/03/2019.

FISHER, C. R., HSING, P.-Y., KAISER, C. L., YOERGER, D. R., ROBERTS, H. H., SHEDD, W. W., ... BROOKS, J. M. (2014). Footprint of Deepwater Horizon blowout impact to deep-water coral communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(32), 11744–11749. doi.org/10.1073/pnas.1403492111

FLEMMING, H.-C., WINGENDER, J., SZEWZYK, U., STEINBERG, P., RICE, S. A., & KJELLEBERG, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575. doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94

FOMENKOV, A., VINCZE, T., DEGTYAREV, S. K., & ROBERTS, R. J. (2017). Complete Genome Sequence and Methylome Analysis of *Acinetobacter calcoaceticus* 65. *Genome Announcements*, 5(12), 1–2. doi.org/10.1128/genomea.00060-17

FONDI, M., BACCI, G., BRILLI, M., PAPALEO, C. M., MENGONI, A., VANECHOUTTE, M., ... FANI, R. (2010). Exploring the evolutionary dynamics of plasmids: the *Acinetobacter* pan-plasmidome. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 59. doi.org/10.1186/1471-2148-10-59

FONDI, M., VANECHOUTTE, M., MAIDA, I., NEGRONI, A., FANI, R., ZANAROLI, G., ... ORLANDINI, V. (2016). Genomic and phenotypic characterization of the species *Acinetobacter venetianus*. *Scientific Reports*, 6(1), 1–6. doi.org/10.1038/srep21985

FRITSCH, W., & HOFRICHTER, M. (2000). Aerobic Degradation by Microorganisms. In *Biotechnology: Environmental Processes II* (2nd ed., pp. 144–167). Jean, Germany. doi.org/10.1002/9783527620951.ch6

FURUKAWA, K., & CHAKRABARTY, M. (1982). Involvement of Plasmids in Total Degradation of Chlorinated Biphenyls. *Applied And Environmental Microbiology*, 44(3): 619-626.

GALES, A.C., JONES, R.N., & SADER, H.S. (2011). Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006–09). *Journal Antimicrob Chemother*, 66: 2070–2074.

GEISSDÖRFER, W., KOK, R.G., RATAJCZAK, A., HELLINGWERF, K.J., & HILLEN, W. (1999). The genes *rubA* and *rubB* for alkane degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 are in an *operon* with *estB*, encoding an esterase, and *oxyR*. *Journal of Bacteriology*, 81(14), 4292–4298.

GHOSH, I., & MUKHERJI, S. (2016). Diverse effect of surfactants on pyrene biodegradation by a *Pseudomonas* strain utilizing pyrene by cell surface hydrophobicity induction. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 108, 67–75. doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.12.010

GÖBEL, M., KASSEL-CATI, K., SCHMIDT, E., & REINEKE, W. (2002). Degradation of aromatics and chloroaromatics by *Pseudomonas* sp. strain B13: purification and characterization of 3-oxoadipate:succinyl-coenzyme A (CoA) transferase and 3-oxoadipyl-CoA thiolase. *J Bacteriol*, 184(1), 216–223. doi.org/10.1128/JB.184.1.216

GOHL, O., FRIEDRICH, A., HOPPERT, M., & AVERHOFF, B. (2006). The thin pili of *Acinetobacter* sp. strain BD413 mediate adhesion to biotic and abiotic surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1394–1401. doi.org/10.1128/AEM.72.2.1394-1401.2006

GOLDMAN, S., SHABTAI, Y., & RUBINOVITZ, C. (1982). Emulsan in *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1: Distribution of cell-free and cell-associated cross-reacting material. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(1), 165–170.

GOSWAMI, P., & SINGH, H. D. (1991). Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. *Biotechnology and Bioengineering*, 37(1), 1–11. doi.org/10.1002/bit.260370103

GUDIÑA, E. J., PEREIRA, J. F. B., COSTA, R., EVTUGUIN, D. V., COUTINHO, J. A. P., TEIXEIRA, J. A., & RODRIGUES, L. R. (2015). Novel bioemulsifier produced by a *Paenibacillus* strain isolated from crude oil. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1–11. doi.org/10.1186/s12934-015-0197-5

GUO, W., LI, D., TAO, Y., GAO, P., & HU, J. (2008). Isolation and description of a stable carbazole-degrading microbial consortium consisting of *Chryseobacterium* sp. NCY And *Achromobacter* sp. NCW. *Current Microbiology*, 57: 251–257. doi.org/10.1007/s00284-008-9185-x

GUREVICH, A., SAVELIEV, V., VYAHHI, N., & TESLER, G. (2013). QCAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072–1075. doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086

GUREVICH, A., SAVELIEV, V., VYAHHI, N., & TESLER, G. (2013). QCAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072–1075. doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086

HAMMER, ØYVIND., HARPER, D.A.T., & RYAN, P.D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp.

HARAYAMA, S., & KOK, M. (1992). Functional and evolutionary relationships among diverse oxycienases. *Annu. Rev. Microbiol.*, 46, 565–601.

HARBOTTLE, H., THAKUR, S., ZHAO, S., & WHITE, D. G. (2006). Genetics of antimicrobial resistance. *Animal Biotechnology*, 17(2), 111–124. doi.org/10.1080/10495390600957092

HARDY DIAGNOSTICS. 2015. ACINETOBACTER, (HTTPS://CATALOG.HARDYDIAGNOSTICS.COM/CP_PROD/CONTENT/HUGO/ACINETOBACTER.HTM). ACESSO EM 22//06/2019.

HARWOOD, C. S., & PARALES, R. E. (1996). The B-Ketoadipate Pathway and the Biology of Self-Identity. *Annual Review of Microbiology*, 50(1), 553–590. doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.553

HERSHBERG, R., YEGER-LOTEM, E., & MARGALIT, H. (2005). Chromosomal organization is shaped by the transcription regulatory network. *Trends in Genetics*, 21(3), 138–142. doi.org/10.1016/j.tig.2005.01.003

HESTER, M. W., WILLIS, J. M., ROUHANI, S., STEINHOFF, M. A., & BAKER, M. C. (2016). Impacts of the Deepwater Horizon oil spill on the salt marsh vegetation of Louisiana. *Environmental Pollution*, 216, 361-370. doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.065.

HIRSCH, R., TERNES, T., HABERER, K., & KRATZ, K. L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 225(1–2), 109–118. doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00337-4

HUA, F., & WANG, H. Q. (2014). Uptake and trans-membrane transport of petroleum hydrocarbons by microorganisms. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 28(2), 165–175. doi.org/10.1080/13102818.2014.906136

HUIJBERS, M. M. E., MONTERSINO, S., WESTPHAL, A. H., TISCHLER, D., & BERKEL, W. J. H. VAN. (2014). Flavin dependent monooxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 544, 2–17. doi.org/10.1016/j.abb.2013.12.005

IFELEBUEGU, A. O., UKPEBOR, J. E., AHUKANNAH, A. U., NNADI, E. O., & THEOPHILUS, S. C. (2017). Environmental effects of crude oil spill on the physicochemical and hydrobiological characteristics of the Nun River, Niger Delta. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(4). doi.org/10.1007/s10661-017-5882-x

ILLUMINA (2010). DE NOVO ASSEMBLY USING ILLUMINA READS. TECHNICAL NOTE: SEQUENCING. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.ILLUMINA.COM/DOCUMENTS/PRODUCTS/TECHNOTES/TECHNOTE_DENOVO_ASSEMBLY_ECOLI.PDF](https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_denovo_assembly_ecoli.pdf)>. ACESSO EM 23/06/2019.

IMO – INTERNATIONAL MARITIME ORGANIZATION. (2019). Background. Disponível em: <<http://www.imo.org/en/ourwork/environment/pollutionprevention/oilpollution/pages/background.aspx>>. Último acesso dia 13/03/2019.

IRVINE, G.V., MANN, D.H., CARLS, M., REDDY, C., & NELSON, R.K. (2014). Exxon Valdez Oil after 23 Years on Rocky Shores in the Gulf of Alaska: Boulder Armor Stability and Persistence of Slightly Weathered Oil. 2014 Ocean Sciences Meeting. Poster presentation. Disponível em: <<http://www.sgmeet.com/osm2014/viewabstract.asp?AbstractID=18111>>. Último acesso em 14/03/2019.

ISIN, E. M., & GUENGERICH, F. P. (2007). Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770, 314–329. doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.07.003

ITOPF - INTERNATIONAL TANKER OWNERS POLLUTION FEDERATION LIMITED. (2016). Oil tanker spill statistics 2016. Disponível em: <http://www.itopf.org/fileadmin/data/Documents/Company_Lit/Oil_Spill_Stats_2016.pdf>. Último acesso dia 13/03/2019.

JAIN, D. K., COLLINS-THOMPSON, D. L., LEE, H., & TREVORS, J. T. (1991). A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 13(4), 271–279. doi.org/10.1016/0167-7012(91)90064-W

JERNELÖV, A., LINDÉN, O. (1981). Ixtoc I: A Case Study of the World's Largest Oil Spill. *Ambio*, 10(6), 299-306. <http://www.jstor.org/stable/4312725>.

JI, Y., MAO, G., WANG, Y., & BARTLAM, M. (2013). Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. *Frontiers in Microbiology*, 4(March), 1–13. doi.org/10.3389/fmicb.2013.00058

KACZOREK, E., CHRZANOWSKI, PIJANOWSKA, A., & OLSZANOWSKI, A. (2008). Yeast and bacteria cell hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation in the presence of natural surfactants: Rhamnolipides and saponins. *Bioresource Technology*, 99(10), 4285–4291. doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.049

KANG, Y. S., & PARK, W. (2010). Contribution of quorum-sensing system to hexadecane degradation and biofilm formation in *Acinetobacter* sp. strain DR1. *Journal of Applied Microbiology*, 109(5), 1650–1659. doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04793.x

KAPLAN, N., ZOSIM, Z., & ROSENBERG, E. (1987). Reconstitution of emulsifying activity of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 emulsan by using pure polysaccharide and protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(2), 440–446. doi.org/10.1103/PhysRevB.73.193408

KELLY, S. L., & KELLY, D. E. (2013). Microbial cytochromes P450 : biodiversity and biotechnology . Where do cytochromes P450 come from , what do they do and what can they do for us ? *Phil Trans R Soc B*, 368(20120476), 1–17.

KIM, M.H., & HAO, O.J. (1999). Cometabolic degradation of chlorophenols by *Acinetobacter* species. *Water Research*, 33(2): 562-574

KIM, S. IL, SONG, S. Y., KIM, K. W., HO, E. M., & OH, K. H. (2003). Proteomic analysis of the benzoate degradation pathway in *Acinetobacter* sp. KS-1. *Research in Microbiology*, 154(10), 697–703. doi.org/10.1016/j.resmic.2003.09.003

KIM, S. IL, YOO, Y. C., & KAHNG, H. Y. (2001). Complete nucleotide sequence and overexpression of *cat1* gene cluster, and roles of the putative transcriptional activator CatR1 in *Acinetobacter lwoffii* K24 capable of aniline degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288(3), 645–649. doi.org/10.1006/bbrc.2001.5818

KIM, S. J., KWEON, O., JONES, R. C., FREEMAN, J. P., EDMONDSON, R. D., & CERNIGLIA, C. E. (2007). Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on systems biology. *Journal of Bacteriology*, 189(2), 464–472. doi.org/10.1128/JB.01310-06

KIM, S.J., KWEON, O., & CERNIGLIA, C.E. (2009). Proteomic applications to elucidate bacterial aromatic hydrocarbon metabolic pathways. *Current Opinion in Microbiology*, 12: 301–309.

KIMES, N. E., CALLAGHAN, A. V., SUFLITA, J. M., & MORRIS, P. J. (2014). Microbial transformation of the deepwater horizon oil spill-past, present, and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 5(NOV), 1–11. doi.org/10.3389/fmicb.2014.00603

KING, G. E., & DURHAM, D. (2017). Hydrocarbon Emissions: Anthropogenic and Natural Sources. *Environmental Issues Concerning Hydraulic Fracturing* (1st ed., Vol. 1). Elsevier Inc. doi.org/10.1016/bs.apmp.2017.08.006

KINGSTON, P. F. (2002). Long-term Environmental Impact of Oil Spills Introduction: Origin and Nature of Oil. *Spill Science & Technology Bulletin*, 7(02), 53–61. Retrieved from https://ac.els-cdn.com/S1353256102000518/1-s2.0-S1353256102000518-main.pdf?_tid=b81283af-98a6-49e0-8c8e-10b94d798aad&acdnat=1520686956_5418ce2eb4e1816d6d0eb33af139e5ad

KOMA, D., HASUMI, F., YAMAMOTO, E., OHTA, T., CHUNG, S. Y., & KUBO, M. (2001). Biodegradation of long-chain n-paraffins from waste oil of car engine by *Acinetobacter* sp. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(1), 94–96. doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80120-1

KOTOKY, R., DAS, S., SINGHA, L. P., PANDEY, P., & SINGHA, K. M. (2017). Biodegradation of Benzo(a)pyrene by biofilm forming and plant growth promoting *Acinetobacter* sp. strain PDB4. *Environmental Technology and Innovation*, 8, 256–268. doi.org/10.1016/j.eti.2017.07.007

KRASOWSKA, A., & SIGLER, K. (2014). How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(August), 1–7. doi.org/10.3389/fcimb.2014.00112

KREMER, F. S., MCBRIDE, A. J. A., & PINTO, L. DA S. (2017). Approaches for in silico finishing of microbial genome sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 40(3), 553–576. doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0230

- KUMAR, A., KUMAR, S., & KUMAR, S. (2005). Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochemical Engineering Journal* 22(2): 151–159. doi.org/10.1016/j.bej.2004.09.006
- KUMAR, S. (2010). Engineering cytochrome P450 biocatalysts for biotechnology, medicine and bioremediation. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 6(2), 115–131. doi.org/10.1517/17425250903431040
- KUMAR, S., STECHER, G., & TAMURA, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. doi.org/10.1093/molbev/msw054
- KURTZ, S., PHILLIPPY, A., DELCHER, A. L., SMOOT, M., SHUMWAY, M., ANTONESCU, C., & SALZBERG, S. L. (2004). Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome biology*, 5(2). doi.org/10.1186/gb-2004-5-2-r12
- LAGESEN, K., STÆRFELDT, H.-H., ROGNES, T., HALLIN, P., USSERY, D. W., & RØDLAND, E. A. (2007). RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Research*, 35(9), 3100–3108. doi.org/10.1093/nar/gkm160
- LAL, B., & KHANNA, S. (1996). Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*. *Microbiology & Molecular Genetics Unit*, 81(4): 355-362.
- LATHA, R., & KALAIVANI, R. (2012). Bacterial Degradation of Crude Oil by Gravimetric Analysis. *Advances in Applied Science Research*, 3(5), 2789–2795.
- LEA-SMITH, D. J., BILLER, S. J., DAVEY, M. P., COTTON, C. A. R., PEREZ SEPULVEDA, B. M., TURCHYN, A. V., ... HOWE, C. J. (2015). Contribution of cyanobacterial alkane production to the ocean hydrocarbon cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(44), 13591–13596. doi.org/10.1073/pnas.1507274112
- LEEWIS, M. C., UHLIK, O., & LEIGH, M. B. (2016). Synergistic Processing of Biphenyl and Benzoate: Carbon Flow Through the Bacterial Community in Polychlorinated-Biphenyl-Contaminated Soil. *Scientific Reports*, 6(October 2015), 1–12. doi.org/10.1038/srep22145
- LI, R., ZHU, H., RUAN, J., QIAN, W., FANG, X., SHI, Z., ... WANG, J. (2009). De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing. *Genome Research*, 20(2), 265–272. doi.org/10.1101/gr.097261.109
- LIN, Q., MENDELSSOHN, I. A., GRAHAM, S. A., HOU, A., FLEEGER, J. W., & DEIS, D. R. (2016). Response of salt marshes to oiling from the Deepwater Horizon spill:

Implications for plant growth, soil surface-erosion, and shoreline stability. *Sci Total Environ.* 557-558, 369-77. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.049.

LISCHER, H. E. L., & SHIMIZU, K. K. (2017). Reference-guided de novo assembly approach improves genome reconstruction for related species. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 1–12. doi.org/10.1186/s12859-017-1911-6

LOMBI, E., & HAMON, R. E. (2005). Remediation of Polluted Soils. CSIRO Land and Water, Glen Osmond, SA, Australia. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/profile/.../lombi2005.pdf>>. Acesso em 01/06/2019

LOPES, E. M. (2014). Emulsification Properties of Bioemulsifiers Produced by Wild-Type and Mutant *Bradyrhizobium elkanii* Strains. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 05(06). doi.org/10.4172/2155-6199.1000245

LOWE, T. M., & CHAN, P. P. (2016). tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W54–W57. doi.org/10.1093/nar/gkw413

LU, S.J., WANG, H.Q., & YAO, Z.H. (2006). Isolation and characterization of gasolinedegrading bacteria from gas station leaking-contaminated soils. *Journal of Environmental Sciences*, 18: 969-972. doi.org/10.1016/S1001-0742(06)60023-5

LUBEC, G., AFJEHI-SADAT, L., YANG, J., PAUL, J., & JOHN, P. (2005). Searching for hypothetical proteins : Theory and practice based upon original data and literature, 77, 90–127. doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.10.001

MAENG, J. U. N. H. O., SAKAI, Y., & TANI, Y. (1996). Isolation and Characterization of a Novel Oxygenase That Catalyzes the First Step of n -Alkane Oxidation in *Acinetobacter* sp . Strain M-1. *Journal of Bacteriology*, 178(13), 3695–3700.

MANDRI, T., & LIN, J. (2007). Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African Journal of Biotechnology*, 6(1): 023-027.

MARÍN, J. A., MORENO, J. L., HERNÁNDEZ, T., & GARCÍA, C. (2006). Bioremediation by composting of heavy oil refinery sludge in semiarid conditions. *Biodegradation*, 17(3), 251–261. doi.org/10.1007/s10532-005-5020-2

MARIN, M., PEDREGOSA, A., & LABORDA, F. (1996). Emulsifier production and microscopical study of emulsions and biofilms formed by the hydrocarbon-utilizing bacteria *Acinetobacter calcoaceticus* MM5. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44(5), 660–667. doi.org/10.1007/BF00172500

MARINHA DO BRASIL. (2011). Normas da Autoridade Marítima para Navegação e Cartas Náuticas – NORMAN 28 / DHN. 1ª Edição. Brasil. 57p. Disponível em:

<https://www.marinha.mil.br/dhn/sites/www.marinha.mil.br/dhn/files/normam/normam_28.pdf>. Último acesso em 13/03/2019.

MARROT, B., BARRIOS-MARTINEZ, A., MOULIN, P., & ROCHE, N. (2006). Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an immersed membrane bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 30: 174–183.

MARTÍNEZ-CHECA, F., TOLEDO, F. L., EL MABROUKI, K., QUESADA, E., & CALVO, C. (2007). Characteristics of bioemulsifier V2-7 synthesized in culture media added of hydrocarbons: Chemical composition, emulsifying activity and rheological properties. *Bioresource Technology*, 98(16), 3130–3135. doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.026

MCGENITY, T. J. (2014). Hydrocarbon biodegradation in intertidal wetland sediments. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 46–54. doi.org/10.1016/j.copbio.2013.10.010

MEHDI, H., & GITI, E. (2008). Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 62(2), 170–178. doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.01.004

MEIRE, R. O., AZEREDO, A., PAULO, J., & TORRES, M. (2007). Aromáticos. *Oecol. Bras.*, 11(2), 188–201.

MEIRE, R.O., AZEREDO, A., PAULO, J., & TORRES M. (2007). Aspectos Ecotoxicológicos De Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. *Oecol. Bras.*, 11(2): 188-201.

MELLO, J.M.M. (2007). Biodegradação dos compostos BTEX em um reator com biofilme. *Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina. 151p.*

MESSINA, E., DENARO, R., CRISAFI, F., SMEDILE, F., CAPPELLO, S., GENOVESE, M., ... YAKIMOV, M. M. (2016). Genome sequence of obligate marine polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading bacterium *Cycloclasticus* sp. 78-ME, isolated from petroleum deposits of the sunken tanker Amoco Milford Haven, Mediterranean Sea. *Marine Genomics*, 25, 11–13. doi.org/10.1016/j.margen.2015.10.006

MILANI, E.J., BRANDÃO, J.A.S.L., ZALÁN, P.V., & GAMBOA, L.A.P. (2000). Petróleo na margem continental brasileira: geologia, exploração, resultados e perspectivas. *Brazilian Journal of Geophysics*, 18(3): 351-396.

MOHANTY, G., & MUKHERJI, S. (2008). Biodegradation rate of diesel range n-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 61(3), 240–250. doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.06.011

MONTELLANO, P. R. O. DE. (2011). Hydrocarbon Hydroxylation by Cytochrome P450 Enzymes Paul. Chem rev, 110(2), 1–10.

MOR, R., & SIVAN, A. (2008). Biofilm formation and partial biodegradation of polystyrene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*: Biodegradation of polystyrene. *Biodegradation*, 19(6), 851–858. doi.org/10.1007/s10532-008-9188-0

MORENO, R. & ROJO, F. (2009). Genetic Features and Regulation of n-Alkane Metabolism. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 1141–1154. doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-50418-6_23 521

MORRIS, L., O'BRIENB, A., NATERAC, S. H. A., LUTZC, A., ROESSNERC, U., & LONG, S. M. (2018). Structural and functional measures of marine microbial communities: An experiment to assess implications for oil spill management. *Marine Pollution Bulletin*, 131(May), 525–529. doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.054

MOSBECH, A. (2002). Potential environmental impacts of oil spills in Greenland. NERI Technical Report No. 415.

MOSS, L. (2010). The 13 largest oil spills in history. Disponível em: <<http://www.mnn.com/earth-matters/wilderness-resources/stories/the-13-largest-oil-spills-in-history>>. Acesso em 08/01/2017.

MURALIKRISHNA, I. V., & MANICKAM, V. (2017). Chapter One – Introduction,. In: Muralikrishna, I. V., Manickam, V. *Invironmental Management: Science and Engineering for Industry*. 2017, 4p.

NARDOCCI, A.C. (2010). Avaliação probabilística de riscos de exposição aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) para a população da cidade de São Paulo. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 71p.

NAVEED, M., CHAUDHRY, Z., ALI, Z., AMJAD, M., ZULFIQAR, F., & NUMAN, A. (2018). Annotation and curation of hypothetical proteins: prioritizing targets for experimental study. *Advancements in Life Sciences*, 5(3), 73–87.

NCCLS. PERFORMANCE STANDARDS FOR ANTIMICROBIAL DISK SUSCEPTIBILITY TESTS; APPROVED STANDARD—EIGHTH EDITION. NCCLS DOCUMENT M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 WEST VALLEY ROAD, SUITE 1400, WAYNE, PENNSYLVANIA 19087-1898 USA. 2003.

NESTLER, H., KIESEL, B., KASCHABEK, S. R., MAU, M., SCHLÖMANN, M., & BALCKE, G. U. (2007). Biodegradation of chlorobenzene under hypoxic and mixed hypoxic-denitrifying conditions. *Biodegradation*, 18(6), 755–767. doi.org/10.1007/s10532-007-9104-z

- NOGALES, J., MACCHI, R., FRANCHI, F., BARZAGHI, D., FERNÁNDEZ, C., GARCÍA, J. L., ... DÍAZ, E. (2007). Characterization of the last step of the aerobic phenylacetic acid degradation pathway. *Microbiology*, 153(2), 357–365. doi.org/10.1099/mic.0.2006/002444-0
- NOLAN, L. C., & O'CONNOR, K. E. (2008). Dioxygenase- and monooxygenase-catalysed synthesis of cis-dihydrodiols, catechols, epoxides and other oxygenated products. *Biotechnology letters*, 30(11), 1879–91. doi.org/10.1007/s10529-008-9791-5
- OBUEKWE, C. O., AL-JADI, Z. K., & AL-SALEH, E. S. (2008). Comparative hydrocarbon utilization by hydrophobic and hydrophilic variants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*, 105(6), 1876–1887. doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03887.x
- OHADI, M., DEGHANNOUDEH, G., SHAKIBAIE, M., BANAT, I. M., POURNAMDARI, M., & FOROOTANFAR, H. (2017). Isolation, characterization, and optimization of biosurfactant production by an oil-degrading *Acinetobacter junii* B6 isolated from an Iranian oil excavation site. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12(March), 1–9. doi.org/10.1016/j.bcab.2017.08.007
- ORTEGA-MORALES, B. O., SANTIAGO-GARCÍA, J. L., CHAN-BACAB, M. J., MOPPERT, X., MIRANDA-TELLO, E., FARDEAU, M. L., ... GUEZENNEC, J. (2007). Characterization of extracellular polymers synthesized by tropical intertidal biofilm bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), 254–264. doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03085.x
- OTOKUNEFOR, K., AGBUDE, P., & OTOKUNEFOR, T. V. (2018). Non-clinical isolates as potential reservoirs of antibiotic resistance in Port Harcourt, Nigeria. *Pan African Medical Journal*, 30, 1–8. doi.org/10.11604/pamj.2018.30.167.14261
- OVERBEEK, R., BEGLEY, T., BUTLER, R. M., CHOUDHURI, J. V., CHUANG, H. Y., COHOON, M., ... VONSTEIN, V. (2005). The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Research*, 33(17), 5691–5702. doi.org/10.1093/nar/gki866
- PARK, C., SHIN, B., JUNG, J., LEE, Y., & PARK, W. (2017). Metabolic and stress responses of *Acinetobacter oleivorans* DR1 during long-chain alkane degradation. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1809–1823. doi.org/10.1111/1751-7915.12852
- PAZMIÑO, D. E. T., WINKLER, M., GLIEDER, A., & FRAAIJE, M. W. (2010). Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. *Journal of biotechnology*, 146(1–2), 9–24. doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.01.021

PEREIRA, J. O., AZEVEDO, J. L., PETRINI, O. (1993). Endophytic Fungi of *Stylosanthes*: A First Report. *Mycologia*. 85, 362-364.

PERES, L. C., TRAPIDO, E., RUNG, A. L., HARRINGTON, D. J., ORAL, E., FANG, Z., ... PETERS, E. S. (2016). The Deepwater Horizon Oil Spill and physical health among adult women in southern Louisiana: The Women and Their Children's Health (WaTCH) study. *Environmental Health Perspectives*, 124(8), 1208–1213. doi.org/10.1289/ehp.1510348

PÉREZ-PANTOJA D., GONZÁLEZ B., & PIEPER D.H. (2010) Aerobic Degradation of Aromatic Hydrocarbons. In: Timmis K.N.

PÉREZ-PANTOJA, D., DONOSO, R., AGULLÓ, L., CÓRDOVA, M., SEEGER, M., PIEPER, D. H., & GONZÁLEZ, B. (2012). Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in Burkholderiales. *Environmental Microbiology*, 14(5), 1091–1117. doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02613.x

PETROLEUM GEOSCIENCE TECHNOLOGY (PGT). 2010. GEOLOGIA DO PETROLEO. DISPONÍVEL EM: <HTTPS://ALBERTOWJ.FILES.WORDPRESS.COM/2010/03/GEOLOGIA_DO_PETROLEO.PDF>. ACESSO EM 06/03/2013

POIMENIDOU, S. V, CHRYSADAKOU, M., TZAKONIATI, A., BIKOULI, V. C., NYCHAS, G.-J., & SKANDAMIS, P. N. (2016). Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless steel and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 237, 164–171. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.029

PSIFIDI, A., DOVAS, C. I., BRAMIS, G., LAZOU, T., RUSSEL, C. L., ARSENOS, G., & BANOS, G. (2015). Comparison of eleven methods for genomic DNA extraction suitable for large-scale whole-genome genotyping and long-term DNA banking using blood samples. *PLoS ONE*, 10(1), 1–18. doi.org/10.1371/journal.pone.0115960

RATAJCZAK, A., GEISSDÖRFER, W., & HILLEN, W. (1998). Expression of alkane hydroxylase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1 is induced by a broad range of n-alkanes and requires the transcriptional activator AlkR. *Journal of Bacteriology*, 180(22), 5822–5827.

RICO-MARTÍNEZ, R., SNELL, T.W., & SHEARER, T.L. (2013). Synergistic toxicity of Macondo crude oil and dispersant Corexit 9500A(®) to the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera). *Environ Pollut*. 173, 5-10. doi.org/10.1016/j.envpol.2012.09.024.

RIGO, M., MONTE-ALEGRE, R., VIDAL BEZERRA, J. R. M. V., COELHO, N., & BASTOS, R. G. (2010). Catechol biodegradation kinetics using *Candida parapsilopsis*. 53: 481-486. doi.org/10.1590/S1516-89132010000200029

RISSMAN, A. I., MAU, B., BIEHL, B. S., DARLING, A. E., GLASNER, J. D., & PERNA, N. T. (2009). Reordering contigs of draft genomes using the Mauve Aligner. *Bioinformatics*, 25(16), 2071–2073. doi.org/10.1093/bioinformatics/btp356

ROBERTS, G. A., GROGAN, G., GRETER, A., FLITSCH, S. L., & TURNER, N. J. (2002). Identification of a new class of cytochrome P450 from a *Rhodococcus* sp. *Journal of Bacteriology*, 184(14), 3898–3908. doi.org/Doi 10.1128/Jb.184.14.3898-3908.2002

ROBIN, J. D., LUDLOW, A. T., LARANGER, R., WRIGHT, W. E., & SHAY, J. W. (2016). Comparison of DNA Quantification Methods for Next Generation Sequencing. *Nature Publishing Group*, 1–10. doi.org/10.1038/srep24067

ROCHA, E. P. C. (2008). The Organization of the Bacterial Genome. *Annual Review of Genetics*, 42, 211–233. doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091653

ROJO, F. (2009). Minireview Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology*, 11(April), 2477–2490. doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x

ROOSAARE, M., PUUSTUSMAA, M., MÖLS, M., VAHER, M., & REMM, M. (2018). PlasmidSeeker: identification of known plasmids from bacterial whole genome sequencing reads. *PeerJ*, 6, e4588. doi.org/10.7717/peerj.4588

ROSATO, Y.B. (1997). Biodegradação de petróleo. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. *Microbiologia ambiental*. Jaguariúna. Embrapa-CNPMA, Cap. 14, p. 307-334.

ROSENBERG, M., & ROSENBERG, E. (1981). Role of adherence in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *Journal of Bacteriology*, 148(1), 51–57.

ROSENBERG, M., GUTNICK, D., & ROSENBERG, E. (1980). Adherence of Bacteria to Hydrocarbons: A Simple Method for Measuring Cell-Surface Hydrophobicity, 9, 29–33.

RUTHERFORD, K., PARKHILL, J., CROOK, J., HORSNELL, T., RICE, P., RAJANDREAM, M. A., & BARRELL, B. (2000). Artemis: Sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, 16(10), 944–945. doi.org/10.1093/bioinformatics/16.10.944

SAHL, J. W., GILLECE, J. D., SCHUPP, J. M., WADDELL, V. G., DRIEBE, E. M., ENGELTHALER, D. M., & KEIM, P. (2013). Evolution of a Pathogen: A Comparative Genomics Analysis Identifies a Genetic Pathway to Pathogenesis in *Acinetobacter*. *PLoS ONE*, 8(1), e54287. doi.org/10.1371/journal.pone.0054287

SANTOS, V. M., SABIROVA, J., TIMMIS, K. N., YAKIMOV, M. M. & GOLYSHIN, P. N. (2010). *Alcanivorax borkumensis*. In: Timmis K.N.

SCHNEIKER, S., DOS SANTOS, V. A. M., BARTELS, D., BEKEL, T., BRECHT, M., BUHRMESTER, J., ... GOLYSHIN, P. N. (2006). Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Nature Biotechnology*, 24(8), 997–1004. doi.org/10.1038/nbt1232

SEO, J., KEUM, Y., & LI, Q. X. (2009). Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. doi.org/10.3390/ijerph6010278

SHAHI, A., INCE, B., AYDIN, S., & INCE, O. (2017). Assessment of the horizontal transfer of functional genes as a suitable approach for evaluation of the bioremediation potential of petroleum-contaminated sites: a mini-review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(11), 4341–4348. doi.org/10.1007/s00253-017-8306-5

SHEN, F. T., YOUNG, L. SEN, HSIEH, M. F., LIN, S. Y., & YOUNG, C. C. (2010). Molecular detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-monooxygenase gene from *Gordonia* spp. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(2), 53–59. doi.org/10.1016/j.syapm.2009.11.003

SHIGENAKA, G. (2014). Twenty-Five Years After the Exxon Valdez Oil Spill: NOAA's Scientific Support, Monitoring, and Research. Seattle: NOAA Ofce of Response and Restoration. 78 pp. Disponível em: <https://response.restoration.noaa.gov/sites/default/files/Exxon_Valdez_25YearsAfter_508_0.pdf>. Último acesso em 13/03/2019.

SILVA, H. H. B., SCHNEIDER, A. L. S., WISBECK, E., & FURLAN, S. A. (2009). Biodegradation of 2,4 dichlorophenol by *Pleurotus ostreatus* DSM 1833. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52: 1563-1570. doi.org/10.1590/S1516-89132009000600028

SILVA, M., ETNOYER, P. J., & MACDONALD, I. R. (2016). Coral injuries observed at Mesophotic Reefs after the Deepwater Horizon oil discharge. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 129, 96–107. doi.org/10.1016/j.dsr2.2015.05.013

SINGH, R., PAUL, D., & JAIN, R. K. (2006). Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology*, 14(9), 389–397. doi.org/10.1016/j.tim.2006.07.001

SONG, Y.-J. (2009). Characterization of Aromatic Hydrocarbon Degrading Bacteria Isolated from Pine Litter. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, 37(4), 333–339

SOUZA-NETO, J.N. (2015). Perfil Proteômico De *Acinetobacter junii* Cultivada Em Petróleo e Diesel. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas. 117p.

SUN, J. Q., XU, L., TANG, Y. Q., CHEN, F. M., & WU, X. L. (2012). Simultaneous degradation of phenol and n-hexadecane by *Acinetobacter* strains. *Bioresource Technology*, 123(3), 664–668. doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.072

SUTHERLAND, I. W. (2001). Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 663–674. doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00112-1

TAN, S. C., & YIAP, B. C. (2009). DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009, 1–10. doi.org/10.1155/2009/574398

TAYLOR, A. (2014). The Exxon Valdez Oil Spill: 25 Years Ago Today. *The Atlantic*. Disponível em: <<https://www.theatlantic.com/photo/2014/03/the-exxon-valdez-oil-spill-25-years-ago-today/100703/>>. Último acesso em 14/03/2019.

TEBYANIAN, H., MIRHOSSEINY, S. H., SARRAFI, O., & ALIAKBARI, E. (2014). Relationship between cell surface hydrophobicity and degradation of hexadecane. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(5), 1613–1619.

THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., & HIGGINS, D. G. (2003). Recognizing Functional Domains: Multiple Sequence Alignment Using ClustalW and ClustalX. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2.3.1-2.3.22.

THRONE-HOLST, M., WENTZEL, A., ELLINGSEN, T. E., KOTLAR, H. K., & ZOTCHEV, S. B. (2007). Identification of novel genes involved in long-chain n-alkane degradation by *Acinetobacter* sp. strain DSM 17874. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10), 3327–3332. doi.or/10.1128/AEM.00064-07

TIBURTIUS, E. R. L., PERALTA-ZAMORA, P., & LEAL, E. S. (2004). Contaminação de águas por BTXS e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Química Nova*, 27(3), 441–446.

TOP, E.M., & SPRINGAEL, D. (2003). The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, 14: 262–269.

TOREN, A., ORR, E., PAITAN, Y., RON, E. Z., & ROSENBERG, E. (2002). The active component of the bioemulsifier alasan from *Acinetobacter radioresistens* KA53 is an OmpA-like protein. *Journal of Bacteriology*, 184(1), 165–170. doi.org/10.1128/JB.184.1.165-170.2002

TORTORA, G. J., FUNKE, B.R., & CASE, C.L. (2005). *Microbiologia*. 8ª ed. Porto Alegre: Ed. Artmed. 920p.

TREANGEN, T. J., & SALZBERG, S. L. (2013). Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Unfallheilkunde/Traumatology*, 13(1), 36–46. doi.org/doi.org/10.1038/nrg3117

TUGRUL, T., & CANSUNAR, E. (2005). Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(6–7), 851–853. doi.org/10.1007/s11274-004-5958-y

UOLNOTÍCIAS. VAZAMENTO DA BP DERRAMOU 780 MILHÕES DE LITROS DE PETRÓLEO, SEGUNDO NOVA ESTIMATIVA DOS EUA, 2010. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://NOTICIAS.UOL.COM.BR/INTERNACIONAL/ULTIMAS-NOTICIAS/2010/08/02/VAZAMENTO-DA-BP-DERRAMOU-780-MILHOES-DE-LITROS-DE-PETROLEO-SEGUNDO-NOVA-ESTIMATIVA-DOS-EUA.HTM](https://noticias.uol.com.br/internacional/ultimas-noticias/2010/08/02/vazamento-da-bp-derramou-780-milhoes-de-litros-de-petroleo-segundo-nova-estimativa-dos-eua.htm)>. ACESSO EM: 08/01/2017.

UZOIGWE, C., BURGESS, J. G., ENNIS, C. J., & RAHMAN, P. K. S. M. (2015). Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Frontiers in Microbiology*, 6(April), 1–6. doi.org/10.3389/fmicb.2015.00245

VAN BEILEN, J. B., & FUNHOFF, E. G. (2005). Expanding the alkane oxygenase toolbox: New enzymes and applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(3 SPEC. ISS.), 308–314. doi.org/10.1016/j.copbio.2005.04.005

VAN BEILEN, J. B., & FUNHOFF, E. G. (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(1), 13–21. doi.org/10.1007/s00253-006-0748-0

VAN HAMME, J. D., SINGH, A., & WARD, O. P. (2003). Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 67(4), 503–549. doi.org/10.1128/MMBR.67.4.503

WALLACE, L., DAUGHERTY, S. C., NAGARAJ, S., JOHNSON, J. K., HARRIS, A. D., & RASKO, D. A. (2016). Use of Comparative Genomics To Characterize the Diversity of *Acinetobacter baumannii* Surveillance Isolates in a Health Care Institution. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(10), 5933–5941. doi.org/10.1128/aac.00477-16

WALSH, F. (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in Microbiology*, 4(MAR), 3389. doi.org/10.3389/fmicb.2013.00047

WANG, J., JIANG, L. H., ZHOU, Y., & YE, B. C. (2017). Enhanced biodegradation of di-n-butyl phthalate by *Acinetobacter* species strain LMB-5 coated with magnetic nanoparticles. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 116, 184–190. doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.10.024

WANG, W., & SHAO, Z. (2012). Diversity of flavin-binding monooxygenase genes (almA) in marine bacteria capable of degradation long-chain alkanes. *FEMS Microbiology Ecology*, 80(3), 523–533. doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01322.x

WASI, S., TABREZ, S., & AHMAD, M. (2013). Toxicological effects of major environmental pollutants: An overview. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(3), 2585–2593. doi.org/10.1007/s10661-012-2732-8

WENTZEL, A., ELLINGSEN, T. E., KOTLAR, H. K., ZOTCHEV, S. B., & THRONE-HOLST, M. (2007). Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(6), 1209–1221. doi.org/10.1007/s00253-007-1119-1

WHITE, H. K., HSINGB, P-Y., CHOC, W., SHANKC, T. M., CORDESD, E. E., QUATTRINID, A. M., ... FISHERB, C. R. (2012). Impact of the Deepwater Horizon oil spill on a deep-water coral community in the Gulf of Mexico. *PNAS*.109 (50), 20303–20308. doi.org/10.1073/pnas.1118029109

WHOI – WOOD HOLE OCEANOGRAPHIC INSTITUTION. (2016). What Happened to Deepwater Horizon Oil? Did dispersants help microbes break down oil? Disponível em: <<http://www.whoi.edu/page.do?pid=7342&tid=7342&cid=249069>>. Último acesso em 13/03/2019.

WIDDEL, F., & RABUS, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current opinion in biotechnology*, 12(3), 259–76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11404104>

WILLUMSEN, P. A., & KARLSON, U. (1997). Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers Pia A. Willumsen & Ulrich Karlson, 415–423.

XIA, W., DONG, H., ZHENG, C., CUI, Q., HE, P., & TANG, Y. (2015). Hydrocarbon degradation by a newly isolated thermophilic Anoxybacillus sp. with bioemulsifier production and new alkB genes. *RSC Advances*, 5(124), 102367–102377. doi.org/10.1039/c5ra17137g

YANDELL, M., & ENCE, D. (2012). A beginner's guide to eukaryotic genome annotation. *Nature Reviews Genetics*, 13(5), 329–342. doi.org/10.1038/nrg3174

YANG, R., ZHANG, G., LI, S., MOAZENI, F., LI, Y., WU, Y., ... WU, X. (2019). Degradation of crude oil by mixed cultures of bacteria isolated from the Qinghai-Tibet plateau and comparative analysis of metabolic mechanisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(2), 1834–1847. doi.org/10.1007/s11356-018-3718-z

YUAN, X., ZHANG, X., CHEN, X., KONG, D., LIU, X., & SHEN, S. (2018). Synergistic degradation of crude oil by indigenous bacterial consortium and exogenous fungus

Scenedosporium boydii. *Bioresource Technology*, 264(May), 190–197.
doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.072

ZERBINO, D. R., & BIRNEY, E. (2008). Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*, 18(5), 821–829.
doi.org/10.1101/gr.074492.107

ZHOU, X., & ROKAS, A. (2014). Prevention, diagnosis and treatment of high-throughput sequencing data pathologies. *Molecular Ecology*, 23(7), 1679–1700.
doi.org/10.1111/mec.12680

ZÍLIO, E.L., & PINTO, U.B. (2002). Identificação e distribuição dos principais grupos de compostos presentes nos petróleos brasileiros. *Boletim Técnico Petrobras*, 45(1): 21-25.

ZOU, C., WANG, M., XING, Y., LAN, G., GE, T., YAN, X., & GU, T. (2014). Characterization and optimization of biosurfactants produced by *Acinetobacter baylyi* ZJ2 isolated from crude oil-contaminated soil sample toward microbial enhanced oil recovery applications. *Biochemical Engineering Journal*, 90, 49–58.
doi.org/10.1016/j.bej.2014.05.007

APÊNDICE A - Perfil de crescimento bacteriano em óleo diesel como única fonte de carbono. As medidas foram realizadas a cada 24h usando espectrofotômetro a 600 nm. O volume do frasco foi de 150 mL e o volume de meio BH com óleo diesel foi de 50 mL.

Days	Flask 1	Flask 2	Flask 3	Average	DP
0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
1	1,05	1,21	1,19	1,15	0,09
2	1,94	1,85	2,18	1,99	0,17
3	3,17	3,55	3,49	3,40	0,20
4	3,9	3,43	3,69	3,67	0,24
5	3,63	3,47	3,62	3,57	0,09
6	3,76	3,62	4,05	3,81	0,22
8	4,13	3,73	3,88	3,91	0,20
10	4,35	4,45	4,15	4,32	0,15
12	4,17	3,98	4,36	4,17	0,19
14	4,73	4,41	4,59	4,58	0,16
16	4,73	4,41	4,59	4,58	0,16
18	5,21	4,89	4,92	5,01	0,18
20	4,95	4,48	5,12	4,85	0,33
22	5,83	5,39	4,96	5,39	0,44
24	5,1	4,93	5,21	5,08	0,14
26	3,77	4,65	5,59	4,67	0,91
28	5,64	5,24	5,71	5,53	0,25
30	6,62	5,0	5,75	5,79	0,81

APÊNDICE B - Dados brutos do experimento de avaliação de formação de biofilme. O experimento foi realizado com três réplicas biológicas e três réplicas técnicas. Meio de cultura LB não inoculado foi utilizado como controle negativo e *Staphylococcus aureus* ATCC 80958 foi usado como controle positivo. A densidade celular foi medida a 595 nm e a formação de biofilme foi medida a 570 nm em espectrofotômetro.

	Biofilm – Negative control	Optical density – Negative control	Biofilm - ATCC 80958	Optical density – ATCC 80958	Biofilm – Strain SB132	Optical density – Strain SB132
Tube1-1	0,071	0,028	0,120	0,351	0,177	0,272
Tube1-2	0,069	0,029	0,114	0,336	0,170	0,269
Tube1-3	0,065	0,029	0,124	0,322	0,173	0,255
Tube2-1	0,062	0,032	0,107	0,309	0,220	0,266
Tube2-2	0,064	0,028	0,138	0,325	0,184	0,268
Tube2-3	0,064	0,031	0,111	0,287	0,156	0,251
Tube3-1	0,064	0,029	0,150	0,329	0,169	0,305
Tube3-2	0,067	0,026	0,111	0,285	0,149	0,285
Tube3-3	0,065	0,028	0,131	0,309	0,164	0,309
Average	0,066	0,029	0,123	0,317	0,174	0,276
DP	0,003	0,002	0,014	0,022	0,020	0,020

APÊNDICE C - Dados brutos do experimento de aderência celular a substratos hidrofóbicos. O experimento foi realizado com três réplicas biológicas e duas réplicas técnicas. Foram utilizadas células de cultivo de 1, 4 e 14 dias de crescimento, livres de óleo e agitadas com os substratos hidrofóbicos hexano, xileno e tolueno. As densidades celulares foram medidas em aparelho espectrofotômetro a 600 nm

1 day of growth		Absorbance			Cell Aderence (%)		
	Tube	Hexane	Xylene	Toluene	Hexane	Xylene	Toluene
Flask 1	1	0,342	0,339	0,392	31,6	32,2	21,6
	2	0,380	0,330	0,321	24,0	34,0	35,8
Flask 2	1	0,327	0,245	0,306	34,6	51,0	38,8
	2	0,345	0,305	0,284	31,0	39,0	43,2
Flask 3	1	0,313	0,305	0,260	37,4	39,0	48,0
	2	0,300	0,272	0,276	40,0	45,6	44,8
	Average	0,335	0,299	0,307	33,1	40,1	38,7
	DP	0,028	0,035	0,047	5,6	7,1	9,4
4 days of growth		Absorbance			Cell Aderence (%)		
	Tube	Hexane	Xylene	Toluene	Hexane	Xylene	Toluene
Flask 1	1	0,174	0,339	0,092	65,2	32,2	81,6
	2	0,176	0,330	0,166	64,8	34,0	66,8
Flask 2	1	0,228	0,305	0,163	54,4	39,0	67,4
	2	0,221	0,325	0,187	55,8	35,0	62,6
Flask 3	1	0,209	0,305	0,123	58,2	39,0	75,4
	2	0,243	0,272	0,127	51,4	45,6	74,6
	Average	0,209	0,313	0,143	58,3	37,5	71,4
	DP	0,028	0,024	0,035	5,6	4,8	7,0

14 day of growth	Tube	Absorbance			Cell Adherence (%)		
		Hexane	Xylene	Toluene	Hexane	Xylene	Toluene
Flask 1	1	0,288	0,172	0,183	42,4	65,6	63,4
	2	0,294	0,169	0,166	41,2	66,2	66,8
Flask 2	1	0,282	0,183	0,184	43,6	63,4	63,2
	2	0,281	0,188	0,185	43,8	62,4	63,0
Flask 3	1	0,289	0,177	0,185	42,2	64,6	63,0
	2	0,281	0,183	0,202	43,8	63,4	59,6
	Average	0,286	0,179	0,184	42,8	64,3	63,2
	DP	0,005	0,007	0,011	1,1	1,5	2,3

APÊNDICE D – Dados brutos do experimento de índice de emulsificação de substratos hidrofóbicos por sobrenadante de cultura. experimento foi realizado com três réplicas biológicas e duas réplicas técnicas. Foram utilizados sobrenadantes livres de células a partir de cultivos de 1, 4 e 14 dias de crescimento, livres de óleo e agitados com os substratos hidrofóbicos hexano, xileno, tolueno e óleo diesel. O valor do índice foi obtido pela porcentagem da altura da emulsão em relação a altura total

	Tube	Hexane						Xileno						Tolueno						Diesel oil					
		Total height	Water height	Oil height	Emulsion height	%E	Sum	Total height	Water height	Oil height	Emulsion height	%E	Sum	Total height	Water height	Oil height	Emulsion height	%E	Sum	Total height	Water height	Oil height	Emulsion height	%E	Sum
Flask 1	1	6,40	2,90	3,00	0,5	7,8	6,40	6,00	3,00	0,50	2,50	41,67	6,00	6,30	2,90	0,80	2,60	41,27	6,30	6,00	2,80	3,10	0,10	1,67	6,00
	2	6,40	3,00	2,90	0,5	7,8	6,40	6,30	3,10	0,60	2,60	41,27	6,30	6,00	3,00	0,50	2,50	41,67	6,00	6,00	2,80	3,10	0,10	1,67	6,00
Flask 2	1	6,40	3,00	2,90	0,5	7,8	6,40	6,20	3,00	0,50	2,70	43,55	6,20	6,30	3,10	0,60	2,60	41,27	6,30	6,00	2,90	3,00	0,10	1,67	6,00
	2	6,00	2,80	2,30	0,9	15,0	6,00	6,20	3,00	0,60	2,60	41,94	6,20	6,40	3,20	0,60	2,60	40,63	6,40	6,00	3,00	2,90	0,10	1,67	6,00
Flask 3	1	6,40	3,20	2,80	0,4	6,3	6,40	6,20	3,20	0,60	2,40	38,71	6,20	6,10	3,20	0,10	2,80	45,90	6,10	6,00	3,00	2,90	0,10	1,67	6,00
	2	6,40	3,20	2,90	0,3	4,7	6,40	6,20	3,20	0,20	2,80	45,16	6,20	6,40	3,30	0,20	2,90	45,31	6,40	6,00	3,00	2,90	0,10	1,67	6,00
					Average	8,2					Average	42,0					Average	42,7					Average	1,7	
	Tube				DP	3,5					DP	2,2					DP	2,3					DP	0,0	
		Total height	Water height	Oil height	Emulsion height	%E	Sum	Total height	Water height	Oil height	Emulsion height	%E	Sum	Total height	Water height	Oil height	Emulsion height	%E	Sum	Total height	Water height	Oil height	Emulsion height	%E	Sum
Flask 1	1	6,00	2,90	2,50	0,60	10,00	6,00	6,40	3,30	0,10	3,00	46,88	6,40	6,30	3,20	0,40	2,70	42,86	6,30	6,30	3,20	2,10	1,00	15,87	6,30
	2	6,50	3,30	2,90	0,30	4,62	6,50	6,10	3,00	0,30	2,80	45,90	6,10	6,20	3,10	0,40	2,70	43,55	6,20	5,90	2,80	2,00	1,10	18,64	5,90
Flask 2	1	5,90	2,90	2,70	0,30	5,08	5,90	6,20	3,10	0,40	2,70	43,55	6,20	6,20	3,20	0,40	2,60	41,94	6,20	6,20	3,30	2,10	0,80	12,90	6,20
	2	5,90	2,80	2,90	0,20	3,39	5,90	6,20	3,20	0,40	2,60	41,94	6,20	6,20	3,20	0,60	2,40	38,71	6,20	5,80	2,60	2,90	0,30	5,17	5,80
Flask 3	1	6,30	3,00	2,40	0,90	14,29	6,30	6,00	2,80	0,50	2,70	45,00	6,00	6,10	2,80	1,00	2,30	37,70	6,10	5,90	2,90	2,80	0,20	3,39	5,90
	2	6,00	2,70	2,50	0,80	13,33	6,00	6,20	2,90	0,50	2,80	45,16	6,20	6,20	2,00	1,00	3,20	51,61	6,20	5,70	2,80	1,70	1,20	21,05	5,70
					Average	8,5					Average	44,7					Average	42,7					Average	12,8	

	Tube				DP	4,7					DP	1,8				DP	4,9				DP	7,2			
		Total height	Water height	Oil height	Emulsion height	%E	Sum	Total height	Water height	Oil height	Emulsion height	%E	Sum	Total height	Water height	Oil height	Emulsion height	%E	Sum	Total height	Water height	Oil height	Emulsion height	%E	Sum
Flask 1	1	5,80	3,10	2,40	0,30	5,17	5,80	6,40	3,20	0,40	2,80	43,75	6,40	6,10	3,10	0,40	2,60	42,62	6,10	6,20	3,10	1,50	1,60	25,81	6,20
	2	6,00	3,00	2,80	0,20	3,33	6,00	6,30	3,20	0,50	2,60	41,27	6,30	6,20	3,20	0,40	2,60	41,94	6,20	6,20	3,10	0,40	2,70	43,55	6,20
Flask 2	1	5,90	3,00	2,30	0,60	10,17	5,90	6,30	3,10	0,50	2,70	42,86	6,30	6,30	3,00	0,40	2,90	46,03	6,30	6,40	3,20	0,50	2,70	42,19	6,40
	2	6,10	3,10	2,00	1,00	16,39	6,10	6,30	3,00	0,50	2,80	44,44	6,30	5,90	2,80	0,30	2,80	47,46	5,90	6,30	3,20	0,60	2,50	39,68	6,30
Flask 3	1	5,80	3,00	2,10	0,70	12,07	5,80	6,20	3,10	0,30	2,80	45,16	6,20	6,20	3,10	0,40	2,70	43,55	6,20	6,20	3,20	1,80	1,20	19,35	6,20
	2	6,00	3,20	2,10	0,70	11,67	6,00	6,20	3,00	0,50	2,70	43,55	6,20	6,20	3,10	0,40	2,70	43,55	6,20	6,30	3,20	2,00	1,10	17,46	6,30
					Average	9,8					Average	43,5				Average	44,2				Average	31,3			
					DP	4,8					DP	1,3				DP	2,1				DP	11,9			

APÊNDICE E – Espécies bacterianas do gênero *Acinetobacter* usadas na montagem da árvore filogenética. Uma cepa da espécie *Pseudomonas aeruginosa* foi usada como grupo externo

Espécie	Código
> <i>Acinetobacter albensis</i> strain ANC 4874	(KR611798.1)
> <i>Acinetobacter apis</i> strain HYN18	(JX402203.1)
> <i>Acinetobacter baumannii</i> strain MTCC 9829	(AB859680)
> <i>Acinetobacter baylyi</i> strain MTCC 9822	(AB859675)
> <i>Acinetobacter bohemicus</i> ANC 3994	(KF679797.1)
> <i>Acinetobacter bouvetii</i> 16S	(AF509827.1)
> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> NCCB 22016	(AJ888983.1)
> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain MTCC 127	(AB859067)
> <i>Acinetobacter colistiniresistens</i> strain NIPH 1859	(NR_157607.1)
> <i>Acinetobacter courvalinii</i> strain ANC 3623	(KT997472.1)
> <i>Acinetobacter dispersus</i> strain ANC 4105	(KT997473.1)
> <i>Acinetobacter gandensis</i> strain UG 60467	(KM206131.1)
> <i>Acinetobacter guillouiae</i> strain M4	(MF185217.1)
> <i>Acinetobacter gyllenbergii</i> RUH 422T	(AJ293694.1)
> <i>Acinetobacter gyllenbergii</i> strain MTCC 11365	(AB859736)
> <i>Acinetobacter haemolyticus</i> 16S rRNA gene (DSM6962)	(X81662.1)
> <i>Acinetobacter haemolyticus</i> strain MTCC 9819	(AB859671)
> <i>Acinetobacter halotolerans</i> strain R160	(NR_149800.1)
> <i>Acinetobacter indicus</i> strain A648	(HM047743.1)
> <i>Acinetobacter johnsonii</i> strain MTCC 9820	(AB859672)

> <i>Acinetobacter junii</i> 16S (DSM6964)	(X81664.1)
> <i>Acinetobacter junii</i> SB132	(KY418004.1)
> <i>Acinetobacter junii</i> strain ATCC_17908	(NR_117623.1)
> <i>Acinetobacter lactucae</i> strain NRRL B-41902	(KU921101.1)
> <i>Acinetobacter lwoffii</i> strain MTCC 496	(AB859068)
> <i>Acinetobacter modestus</i> strain NIPH 236	(KT997474.1)
> <i>Acinetobacter nectaris</i> strain SAP 763.2	(JQ771132.1)
> <i>Acinetobacter parvus</i> phenon 4 strain LUH4616 (<i>Aci602</i>)	(AJ293691.1)
> <i>Acinetobacter parvus</i> strain MTCC 9828	(AB859679)
> <i>Acinetobacter pittii</i> strain LMG 1035	(HQ180184.1)
> <i>Acinetobacter puyangensis</i> strain BQ4-1	(JN664255.1)
> <i>Acinetobacter radioresistens</i> (DSM6976)	(X81666.1)
> <i>Acinetobacter radioresistens</i> strain MTCC 9821	(AB859674)
> <i>Acinetobacter rudis</i> strain MTCC 11366	(AB859737)
> <i>Acinetobacter soli</i> strain B1	(EU290155.1)
> <i>Acinetobacter soli</i> strain MTCC 11370	(AB859739)
> <i>Acinetobacter townneri</i> strain AB1110	(AF509823.1)
> <i>Acinetobacter venetianus</i> strain ATCC 31012	(AJ295007.1)
> <i>Acinetobacter venetianus</i> strain MTCC 11369	(AB859738)
> <i>Acinetobacter vivianii</i> strain NIPH 2168	(KT997477.1)
> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain PA96	(CP007224)
> <i>Acinetobacter junii</i> strain 65	(CP019041.1)

APÊNDICE F - Proteínas preditas no genoma de *A. junii* SB132 que poderiam estar relacionadas com o metabolismo de hidrocarbonetos. A anotação foi realizada no servidor web RAST e os grupos foram filtrados diretamente do conjunto total de genes anotados

Group	Protein	Amount
Alcohol dehydrogenases	Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)	4
	Alcohol dehydrogenase, class IV	1
	Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)	1
Aldehyde dehydrogenases	Probable coniferyl aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.68)	1
	Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3)	4
	Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3); Probable coniferyl aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.68)	2
	Aldehyde dehydrogenase B (EC 1.2.1.22)	1
	aldehyde dehydrogenase family protein	1
	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.11)	1
	Betaine aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.8)	1
	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.27)	1
	Succinylglutamic semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.71)	1
	Dioxygenases	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (EC 1.13.11.27)
Alpha-ketoglutarate-dependent taurine dioxygenase (EC 1.14.11.17)		1
biphenyl-2,3-diol 1,2-dioxygenase III-related protein		1
Fe(2+)/alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase LpxO		2

	Flavoheprotein (Hemoglobin-like protein) (Flavoheprotein) (Nitric oxide dioxygenase) (EC 1.14.12.17)	1
	Protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha chain (EC 1.13.11.3)	1
	Protocatechuate 3,4-dioxygenase beta chain (EC 1.13.11.3)	1
Ferredoxin e Ferredoxin reductases	4Fe-4S ferredoxin, iron-sulfur binding	2
	Bacterioferritin-associated ferredoxin	1
	Ferredoxin	2
	Ferredoxin reductase	2
	Ferredoxin, 2Fe-2S	2
	Ferredoxin-dependent glutamate synthase (EC 1.4.7.1)	1
	Ferredoxin--NADP(+) reductase (EC 1.18.1.2)	2
	Flavodoxin reductases (ferredoxin-NADPH reductases) family 1	3
	Indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase, alpha and beta subunits	1
Monooxygenases	Alkane-1 monooxygenase (EC 1.14.15.3)	2
	Alkanesulfonate monooxygenase (EC 1.14.14.5)	1
	Antibiotic biosynthesis monooxygenase	1
	Coenzyme F420-dependent N5,N10-methylene tetrahydromethanopterin reductase and related flavin-dependent oxidoreductases; sulfonate monooxygenase	1
	Cyclohexanone monooxygenase (EC 1.14.13.22)	3
	monooxygenase, flavin-binding family	1
	monooxygenase, putative	1

	Nitrilotriacetate monooxygenase component B (EC 1.14.13.-)	1
	Probable Lysine n(6)-hydroxylase associated with siderophore S biosynthesis (EC 1.14.13.59) @ Siderophore biosynthesis protein, monooxygenase	1
	Ubiquinone biosynthesis monooxygenase UbiB	3
Transcriptional regulators, AraC family	FIG229276: Transcriptional regulator, AraC family	1
	Helix-turn-helix, AraC type	1
	Transcriptional regulator, AraC family	22
Rubredoxin and Rubredoxin reductases	Rubredoxin	2
	Rubredoxin-NAD(+) reductase (EC 1.18.1.1)	1
Total		85

APÊNDICE G - Comparação dos subsistemas relacionados com o metabolismo de compostos aromáticos de diferentes genomas bacterianos. Os diferentes genomas são de bactérias descritas com grande potencial para biorremediação e seus genomas foram obtidos do banco de dados GenBank. As anotações de todos os genomas foram realizadas nas mesmas condições. Foi considerado apenas a presença, simbolizada pelo número 1, e ausência da proteína, não representando os valores absolutos

Subsystem	Protein	SB132	65	SK2	PYR-1	78-ME	DR1
Acetophenone carboxylase 1	Acetophenone carboxylase subunit Apc1				1		
	Acetophenone carboxylase subunit Apc2				1		
	Acetophenone carboxylase subunit Apc3				1		
	Acetophenone carboxylase subunit Apc4				1		
Aromatic Amin Catabolism	4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase (EC 1.14.13.3)				1	1	
	Monoamine oxidase (1.4.3.4)				1		1
	Nitrilotriacetate monooxygenase component B (EC 1.14.13.-)				1	1	1
	Phenylacetaldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.39)						1
Benzoate degradation	1,2-dihydroxycyclohexa-3,5-diene-1-carboxylate dehydrogenase (EC 1.3.1.25)		1			1	1
	benABC <i>operon</i> transcriptional activator BenR				1		1
	Benzoate 1,2-dioxygenase alpha subunit (EC 1.14.12.10)		1			1	1
	Benzoate 1,2-dioxygenase beta subunit (EC 1.14.12.10)		1			1	1
	Benzoate 1,2-dioxygenase, ferredoxin reductase component						1
	benzoate MFS transporter BenK	1	1				1
	Benzoate transport protein	1	1				1

	benzoate-specific porin	█	█				█
	Ortho-halobenzoate 1,2-dioxygenase alpha-ISP protein OhbB				█	█	
	Ortho-halobenzoate 1,2-dioxygenase beta-ISP protein OhbA				█	█	
Biphenyl Degradation	2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.39)				█	█	
	2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate hydrolase (EC 3.7.1.-)				█	█	
	2-keto-4-pentenoate hydratase (EC 4.2.1.80)				█	█	
	4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase (EC 4.1.3.39)				█	█	
	Acetaldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.10)				█		
	Acetaldehyde dehydrogenase, acetylating, (EC 1.2.1.10) in gene cluster for degradation of phenols, cresols, catechol				█	█	
	Biphenyl dioxygenase alpha subunit (EC 1.14.12.18)				█	█	
	Biphenyl dioxygenase beta subunit (EC 1.14.12.18)				█	█	
	biphenyl-2,3-diol 1,2-dioxygenase III-related protein	█	█				█
	Large subunit naph/bph dioxygenase				█	█	
	Small subunit naph/bph dioxygenase				█	█	
Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	3-oxoadipate CoA-transferase subunit A (EC 2.8.3.6)	█	█		█		█
	3-oxoadipate CoA-transferase subunit B (EC 2.8.3.6)	█	█		█		█
	Beta-ketoadipate enol-lactone hydrolase (EC 3.1.1.24)	█	█		█	█	█
	Catechol 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.1)		█				█
	Catechol 1,2-dioxygenase 1 (EC 1.13.11.1)				█		
	Muconate cycloisomerase (EC 5.5.1.1)		█				█

	Muconolactone isomerase (EC 5.3.3.4)		█				█
	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit A (EC 2.8.3.5)	█	█		█	█	
	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit B (EC 2.8.3.5)				█	█	
Central meta-cleavage pathway of aromatic compound degradation	2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate hydrolase (EC 3.7.1.-)					█	
	2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase (EC 3.7.1.9)					█	
	2-oxo-hepta-3-ene-1,7-dioic acid hydratase (EC 4.2.-.-)					█	
	2-polyprenylphenol hydroxylase and related flavodoxin oxidoreductases					█	
	4-oxalocrotonate tautomerase (EC 5.3.2.-)					█	
	Acetaldehyde dehydrogenase, acetylating, (EC 1.2.1.10) in gene cluster for degradation of phenols, cresols, catechol					█	
	Catechol 2,3-dioxygenase (EC 1.13.11.2)					█	
Chloroaromatic degradation pathway	3-oxoadipate CoA-transferase subunit A (EC 2.8.3.6)	█	█				█
	3-oxoadipate CoA-transferase subunit B (EC 2.8.3.6)	█	█				█
	Beta-ketoadipate enol-lactone hydrolase (EC 3.1.1.24)	█	█				█
	Beta-ketoadipyl CoA thiolase (EC 2.3.1.-)	█	█				█
Gentisate degradation	4-hydroxybenzoate transporter	█				█	█
	Fumarylacetoacetate hydrolase family protein	█	█	█	█	█	█
	Gentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.4)						█
	Maleylacetoacetate isomerase (EC 5.2.1.2)	█	█				█
	putative 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase	█	█	█	█		█
	Putative n-hydroxybenzoate hydroxylase						█

Homogentisate pathway of aromatic compound degradation	Aromatic-amino-acid aminotransferase (EC 2.6.1.57)					█		
	Homogentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.5)					█		
	Transcriptional regulator, lclR family					█		
Phenol hydroxylase	Phenol hydroxylase, assembly protein DmpK						█	█
	Phenol hydroxylase, FAD- and [2Fe-2S]-containing reductase component DmpP						█	█
	Phenol hydroxylase, P1 oxygenase component DmpL (EC 1.14.13.7)						█	█
	Phenol hydroxylase, P2 regulatory component DmpM (EC 1.14.13.7)						█	█
	Phenol hydroxylase, P3 oxygenase component DmpN (EC 1.14.13.7)						█	█
	Phenol hydroxylase, P4 oxygenase component DmpO (EC 1.14.13.7)						█	█
Phenylacetyl-CoA catabolic pathway (core)	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase PaaC (EC 1.1.1.-)							█
	Phenylacetaldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.39)							█
	Phenylacetate degradation enoyl-CoA hydratase PaaA (EC 4.2.1.17)							█
	Phenylacetate degradation enoyl-CoA hydratase PaaB (EC 4.2.1.17)							█
	Phenylacetate-CoA oxygenase, PaaG subunit							█
	Phenylacetate-CoA oxygenase, PaaH subunit							█
	Phenylacetate-CoA oxygenase, PaaI subunit							█
	Phenylacetate-CoA oxygenase, PaaJ subunit							█
	Phenylacetate-CoA oxygenase/reductase, PaaK subunit							█

	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit A (EC 2.8.3.5)	█			█		
	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit B (EC 2.8.3.5)				█		
Quinate degradation	3-dehydroquinatase I (EC 4.2.1.10)	█					█
	3-dehydroquinatase II (EC 4.2.1.10)	█	█	█	█	█	█
	3-dehydroshikimate dehydratase	█					█
	Quinate/shikimate dehydrogenase [Pyrroloquinoline-quinone] (EC 1.1.99.25)	█					█
Salicylate and gentisate catabolism	4-hydroxybenzoate transporter	█				█	█
	Fumarylacetoacetase (EC 3.7.1.2)	█	█				█
	Fumarylacetoacetate hydrolase family protein	█	█	█	█	█	█
	Gentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.4)						█
	Maleylacetoacetate isomerase (EC 5.2.1.2)	█	█				█
	putative facilitator of salicylate uptake	█	█				
	Putative n-hydroxybenzoate hydroxylase						█
	regulator protein, SalR						█
	salicylate esterase				█		
	Salicylate hydroxylase (EC 1.14.13.1)	█	█		█		█
Salicylate ester degradation	putative facilitator of salicylate uptake	█					
	regulator protein, SalR						█
	salicylate esterase				█		
	Salicylate hydroxylase (EC 1.14.13.1)	█	█		█		█
Toluene 4-monooxygenase (T4MO)	Toluene-4-monooxygenase, subunit TmoA					█	
	Toluene-4-monooxygenase, subunit TmoB					█	

	Toluene-4-monooxygenase, subunit TmoC					1	
	Toluene-4-monooxygenase, subunit TmoD					1	
	Toluene-4-monooxygenase, subunit TmoE					1	
	Toluene-4-monooxygenase, subunit TmoF					1	
Toluene degradation	Toluene-4-monooxygenase, subunit TmoD					1	
	Total	41	28	4	46	45	76