

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE NOVAS PROTEÍNAS POR *Burkholderia* sp. SMF 07 NA  
PRESENÇA DO HERBICIDA ÁCIDO 2,4 DICLOFENOACÉTICO EM RELAÇÃO À  
CONDIÇÃO CONTROLE**

<sup>1</sup>Maria Amélia Araújo Soares ; <sup>2</sup>Maria Gleiciane de Queiroz Martins; <sup>3</sup>Nayanne Hardy Lima  
Pontes; <sup>4</sup>João Garcia Alves Filho; <sup>5</sup>Rodrigo Maranguape Silva da Cunha

**Resumo**

Bactérias do gênero *Burkholderia* apresentam capacidade de degradar diversos compostos tóxicos e recalcitrantes. Com base no exposto, neste estudo foi utilizada a eletroforese bidimensional (2DE) para investigar novas proteínas expressas na condição estresse (presença de 2,4 D) em relação à condição controle (ausência de 2,4D). A fim de fazer a extração das proteínas totais foi realizado o crescimento bacteriano em dois meios de cultivo TY (*Tryptone-Yeast Medium*), sendo um controle e o outro suplementado com 1000 mg/mL de 2,4-D, ambos foram incubados a 28 °C. A extração das proteínas totais foi realizada quando o crescimento bacteriano atingiu a fase *log*. Para análise quantitativa e qualitativa das proteínas foi utilizado o método de Bradford e SDS-PAGE, respectivamente. A partir das proteínas totais extraídas foi determinado o mapa bidimensional de referência para cada condição. O ajuste das imagens dos géis bidimensionais, a detecção de *spots* protéicos e a avaliação dos dados para determinação de variações quantitativas e qualitativas, massa molecular (MM) e ponto isoelétrico (pI) dos *spots* foi feito pelo programa *ImageMaster*<sup>®</sup>. As novas proteínas expressas na condição estresse (presença de 2,4 D) em relação à condição controle (ausência de 2,4D) foram identificadas utilizando os valores de pI e MM do *spot* contra um banco de dados de proteínas *Uniprot* disponível no servidor *Expasy*. A análise estatística foi realizada aplicando o teste *Mann-Whitney* considerando  $p < 0,05$ . O número médio de *spots* protéicos das replicas dos géis 2DE foi de 836 (controle) e 803 (tratamento). Foi possível verificar nos géis 2DE novas proteínas expressas na condição estresse (presença de 2,4 D) em relação à condição controle (ausência de 2,4D). A maioria dessas proteínas identificadas são enzimas (transferases, oxigenases e hidrolases) que estão envolvidas no processo de biodegradação de poluentes recalcitrantes. Em conclusão a eletroforese bidimensional (2-DE) permitiu identificar novas proteínas expressas por *Burkholderia* sp. na condição estresse em relação à condição controle sendo estas principalmente enzimas que estão envolvidas no processo de biodegradação de poluentes recalcitrantes.

**Palavras-chave:** *Burkholderia* sp.; ácido 2,4-diclorofenoxiacético; eletroforese bidimensional

## **Introdução**

Poluição pode ser definida como a introdução pelo homem, direta ou indiretamente, de substâncias ou energia no ambiente em quantidades que provoque um impacto ambiental negativo, ou seja, uma alteração indesejável, causando assim danos na saúde humana, nos seres vivos e no ecossistema ali presente. Aos fatores que causam poluição chamam-se poluentes (GÓIS e WEBER, 2011).

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um herbicida amplamente utilizado no controle de ervas daninhas de folhas largas e gramíneas (BOIVIN *et al.*, 2005) em cerca de 65 culturas, tais como, arroz, milho e cana-de-açúcar (RODRIGUES e ALMEIDA, 1998). Na atualidade o 2,4-D e outros componentes do grupo químico dos fenoxiacéticos estão sendo utilizados como ferramenta básica na agricultura moderna, principalmente pelo seu baixo custo e fácil aplicação. Porém, o uso intensivo deste herbicida pode provocar danos à saúde humana, afetando órgãos essenciais, tais como, fígado, coração, baço, rim, pulmão e ao sistema nervoso central, podendo ocasionar também câncer (VIEIRA *et al.*, 1999).

Há vários relatos e estudos que o solo é o reservatório final dos herbicidas, e é também, fonte da qual os herbicidas podem ser liberados para atmosfera, lençóis freáticos e organismos vivos. A degradação do 2,4-D pode ser feita de várias formas, uma delas é através de microrganismos (AMARANTE JÚNIOR *et al.*, 2003), e esta, pode ser preferida devido aos baixos custos e a possibilidade da completa mineralização (GENG *et al.*, 2006). O processo no qual os organismos vivos são utilizados tecnologicamente para remover ou reduzir poluente no ambiente é denominado de biorremediação.

Diversas bactérias, principalmente as dos gêneros *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Arthrobacter* e *Burkholderia*, têm sido isoladas e suas habilidades de catabolizar esses químicos poluentes caracterizadas (COENYE e VANDAMME, 2003; QINGYAN *et al.*, 2008). Dentre esses microrganismos, destacam-se algumas espécies do táxon genérico *Burkholderia*, capazes de usar novos genes para produção de enzimas catabólicas específicas para metabolizar substratos aromáticos clorados, utilizando esses componentes como fonte de carbono e energia (DAUBARAS *et al.*, 1996; MACUR *et al.*, 2007).

O objetivo do trabalho foi utilizar a técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) para identificar novas proteínas expressas por *Burkholderia* sp. SMF07 na presença do herbicida 2,4-D em comparação ao tratamento controle.

## **Materiais e Métodos**

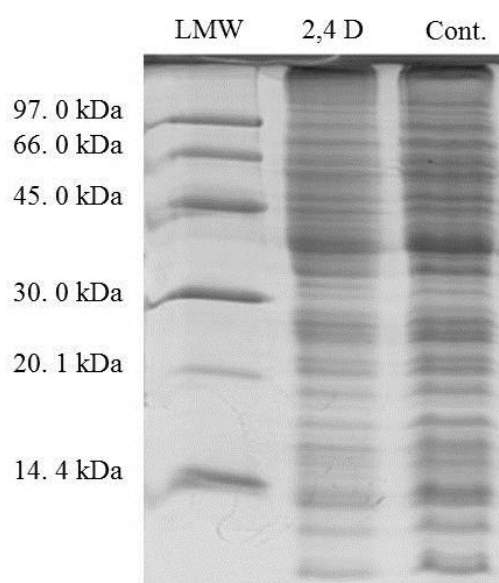
Para a extração das proteínas intracelulares a cepa de *Burkholderia* sp. SMF07 foi crescida *overnight* em 5 mL de meio TY à temperatura de 28 °C e sob agitação orbital de 250 rpm. Em seguida, o pré-inóculo foi utilizado em 1 L de meio TY (*Tryptone-Yeast Medium*). A indução da expressão das proteínas foi realizada através da adição de 1000 mg/mL de 2,4-D. Usando sempre um controle para cada meio com o poluente (tratamento) que constava apenas de meio TY e o isolado característico para que pudessem ser comparadas as expressões do proteoma de cada condição envolvida no estudo. A extração das proteínas intracelulares foi feita de acordo com Riedel e colaboradores (2006) a partir do *pellet* de crescimento bacteriano obtido por centrifugação a 10000 rpm a 4 °C por 30 minutos. Dessa forma o *pellet* foi lavado duas vezes com 10 mL de Tris/HCl 50 mM, pH 7,5. Após as lavagens foi adicionado 10 mL de Tris/HCl 50 mM, pH 7,5 acrescido de 40 µL do Inibidor de Protease (*Protease Inibidor Mix* (GE Healthcare™)). As células foram lisadas por sonicação (10 pulsos de 20 segundos com intervalo de 1 minuto entre cada pulso – com 50% de potência). Após sonicadas as células foram centrifugadas a 12000 rpm por 1 hora e 30 minutos a 4 °C para remoção dos *debris*. O sobrenadante foi colhido e a ele foi adicionado 1 mL de fenol e a mistura foi incubada a 70 °C por 10 minutos. As amostras foram resfriadas em gelo por 5 minutos e as fases foram separadas por centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado duas vezes com acetona gelada 100%. Após as lavagens o *pellet* final foi seco a temperatura ambiente e ressuspenso em uréia 7 M/tioureia 2 M. A concentração de proteínas nas amostras foi mensurada utilizando o Método de Bradford (1976). Em seguida, uma alíquota foi submetida à SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) de modo a verificar a pureza das amostras proteicas.

Para a segunda dimensão (2-D), 250µg de proteína de cada amostra foi misturada com tampão de reidratação (uréia7M/tioureia2M, 1% CHAPS, 1% DTT; 0,5%(v/v), anfólitos (pH de 4-7) e azul de bromofenol) em um volume final de 250µl por amostra. A mistura de proteína foi então reidratada em *strip* de gradiente de pH imobilizado (IPG) de 13cm de comprimento e pH de 4-7 em temperatura ambiente por 16 horas. Posteriormente, foi realizada a Primeira Dimensão ou Focalização Isoelétrica - IEF usando o sistema de focalização *EttanIPGphor* III. A *strip* de IPG foi equilibrada com a solução de equilíbrio I (Uréia 6M, Tris 50mM, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol, e DDT ) por 15min e em seguida, com a solução de equilíbrio II (Uréia 6M, Tris 50mM, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol e iodoacetamida ) por 15min. Subseqüentemente a *strip* foi colocada em um gel de poliacrilamida a 12%, e a separação na

segunda dimensão foi realizada na unidade de eletroforese vertical Hoefer SE 600 Ruby por aproximadamente 4:30h. Após a corrida, o gel foi corado com *Comassie Blue G-250* (*Blue Silver*) (CANDIANO *et al.*, 2004) por 24 horas sob agitação. O gel foi digitalizado utilizando um *scanner* do modelo *LabScan* da *GE Healthcare*<sup>TM</sup>, através do *ImageScanner III* e estocado em solução de ácido acético a 5%. O ajuste da imagem, a detecção dos *spots* e a avaliação dos dados para determinar variações quantitativas (% do volume) e qualitativas, massa e ponto isoelétrico dos *spots* foi feito pelo programa *ImageMaster*<sup>TM</sup> também desenvolvida pela *GE Healthcare*. Algumas proteínas foram identificadas utilizando os valores de PI e massa molecular do *spot* contra um banco de dados de proteínas no *ExpASY* (<http://www.expasy.ch/tools/#proteome>). A análise estatística foi realizada aplicando o teste *Mann-Whitney* considerando  $p < 0,05$ .

## Resultados e Discussão

A análise da concentração de proteínas totais pelo método de Bradford (1976) mostrou que o valor médio da concentração de proteínas foi de 3,738  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  na condição controle (ausência de 2,4-D) e 3,834  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  na condição de estresse (presença de 2,4-D). A pureza e a integridade das proteínas intracelulares extraídas puderam ser verificadas pelo padrão de bandas em SDS-PAGE (Figura 1), sendo possível observar que as proteínas extraídas apresentaram boa qualidade com bandas bem definidas e livres de possíveis contaminantes.



**Figura 1** – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12,5% de proteínas obtidas de *Burkholderia* SMF 07 corado com *Comassie blue* G-250. A raia 1 corresponde ao marcador de peso molecular – LWM, em quilodaltons - kDa; Raia 2 e 3 corresponde proteína intracelular total extraída de *Burkholderia* SMF 07 na presença e ausência de 2,4-D, respectivamente.

A eletroforese bidimensional foi realizada a fim de determinar o padrão de expressão do genoma funcional quando a bactéria em estudo foi crescida na presença e ausência de 2,4-D. Para cada amostra foram feitos géis em triplicata a fim de verificar a reprodutibilidade do método. A comparação entre as replicatas fornece fortes indícios sobre a qualidade dos dados obtidos. As análises dos géis C1, C2 e C3 referentes à condição controle (ausência de 2,4D) possibilitaram a identificação de 826, 821 e 860 *spots*, respectivamente. Enquanto que os géis T1, T2 e T3 referentes a condição estresse (presença de 2,4D) apresentaram uma quantidade de 791, 804 e 814 *spots*, respectivamente. Os géis C3 (Figura 2A) e T3 (Figura 2B) foram escolhidos como referência para a condição controle e estresse, respectivamente por estes serem os géis com maior número de *spots* e que apresentaram a melhor focalização.

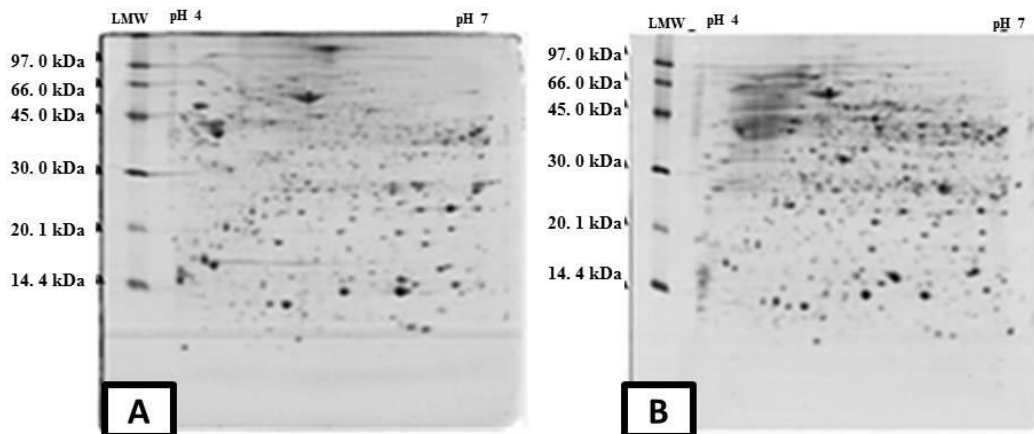






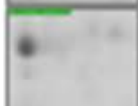



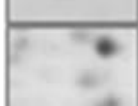



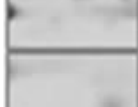
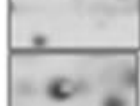


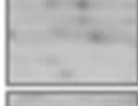



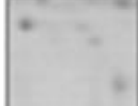



Figura 2 - Géis de referência de eletroforese bidimensional de proteínas obtidas de *Burkholderia* SMF 07 cultivadas em meio TY ausência (A) e presença (B) de 2,4-D. LMW corresponde ao marcador molecular utilizado com unidade em Quilodalton (kDa).

Utilizando os valores de PI e massa molecular do *spot* contra um banco de dados de proteínas no *ExPASy*, foi possível identificar novas proteínas expressas na condição estresse (presença de 2,4 D) em relação a condição controle (ausência de 2,4 D) (Tabela 1). As proteínas identificadas apresentam diferentes funções no processo de biodegradação de poluentes convertendo-os em produtos mais simples e menos tóxicos, como gás carbônico, fosfatos, nitratos, etc. Segundo Nair, Jayachandran e Shashidhar (2008), esta atividade biodegradativa se dar pela ação de uma variedade de enzimas que incluem as oxigenases, hidroxilases, peroxidases e tirosinases.

| NOME DA PROTEÍNA   | FUNÇÃO BIOLÓGICA                     | TRATAMENTOS   |   |
|--|--------------------------------------|---|---|
|  |                                      | Controle  | 2,4 D   |
| Enolase  | Liase                                |    |    |
| Acetilglutamato quinase                                    | Quinase/ Transferase                 |    |    |
| Imidazolonepropionase                                      | Hidrolase                            |    |    |
| 3-metil-2-oxobutanoato hidroximetiltransferase 2           | Metiltransferase/ Transferase        |    |    |
| Proteína de transporte secB                                | Chaperona                            |    |    |
| Protease Clp proteolítica dependente de ATP – subunidade 1 | Hidrolase/ Protease/ Serina Protease |   |   |
| Fosforibosil-AMP ciclohidrolase                            | Hidrolase                            |  |  |
| ATP Fosforibosiltransferase                                | Glicosiltransferase/ Transferase     |  |  |
| Transaldolase  | Transferase                          |  |  |
| 3-oxoacil sintase 3  | Acetiltransferase/ Transferase       |  |  |
| Provável polifosfato inorgânico /ATP-NAD quinase           | Quinase/ Transferase                 |  |  |
| Fosforibosil-AMP ciclohidrolase                            | Hidrolase                            |  |  |

**Tabela 1** – Lista das novas proteínas expressas pela bactéria *Burkholderia* sp. SMF 07 na condição estresse (presença de 2,4 D) em relação à condição controle (ausência de 2,4 D) e suas respectivas funções

## Conclusão

A técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) permitiu identificar novas proteínas expressas na condição estresse (presença de 2,4-D) em relação à condição controle (ausência de 2,4 D). Entre estas proteínas estão enzimas que desempenham papel fundamental no processo de biodegradação de compostos recalcitrantes como o herbicida 2,4 D.

## Referências Bibliográficas

AMARANTE JÚNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; NUNES, G. S.; RIBEIRO, M. L. Breve revisão de métodos de determinação de resíduos do herbicida ácido 2,4-Diclorofenoxyacético (2,4-D). **Química Nova**, v.26, 2003.

BOIVIN, A.; AMELLAL, S.; SCHIAVON, M.; VAN GENUCHTEN, M. T. 2,4 Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) sorption and degradation dynamics in three agricultural soils. **Environmental Pollution**. v. 138, p. 92 – 99, 2005.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**. v. 25, n. 9, p. 1327-33, 2004.

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

DAUBARAS, D.L.; DANGANAN, C.E.; HUBNER, A.; YE, R.W.; HENDRICKSON, W.; CHAKRABARTY, A.M. Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by *Burkholderia cepacia* strain AC1100: evolutionary insight. **Gene**. v.179, p.1-8. 1996.

GENG, A; SOH, A. E. W.; LIM, C.J.; LOKE, L.C.T. Isolation and characterization of a phenol-degrading bacterium from an industrial activated sludge. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v. 71, p. 728–735, 2006.

GÓIS & WEBER. Uma abordagem de relacionamento no Ensino de Biologia com as Questões Ambientais. **Revista Eletrônica do CEspEdAmb-CCR/UFSM**, Santa Catarina, nº 2, 2011. Disponível em <<http://cascavel.ufsm.br/revistas/ojs.2.2.2/index.php/remoa/article/view/2771/1612>>. Acesso em: 08 de agosto de 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. p. 680-685, 1970.

MACUR, R. E.; WHEELER, J. T.; BURR, M. D.; INSKEEP, W. P. Impacts of 2,4-D application on soil microbial community structure and on populations associated with 2,4-D degradation. **Microbiological Research**, v.162, p.37-45, 2007.

NAIR, C. I.; JAYACHANDRAN, K.; SHASHIDHAR, S. Biodegradation of phenol. **African Journal of Biotechnology**. v. 7, p. 4951-4958, 2008.

QINGYAN, L.I.; YING, L.I.; XIKUN, Z.H.U.; BAOLI, C.A.I. Isolation and characterization of atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. AD26 and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. **Journal of Environmental Sciences**, v.20, p.1226-1230, 2008.

RIEDEL, K.; CARRANZA, P.; GEHRIG, P.; POTTHAST, F.; EBERL, L. Towards the proteome of *Burkholderia cenocepacia* H111: Setting up a 2-DE reference map. **Proteomics**. v. 6, p. 207-218, 2006.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. de. **Guia de herbicidas**. Londrina: Edição dos Autores, 1998. 648 p.

VIEIRA, E. M.; PRADO, A. G. S.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. Estudo da adsorção/dessorção do ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4D) em solo na ausência e presença de matéria orgânica. **Química Nova**, São Paulo, v.22, n.3, p.305-308, 1999.

<sup>1</sup>Discente do Curso de Doutorado em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO – Universidade Federal do Ceará – UFC – *campus* Sobral. amellyaaraujo@hotmail.com;

<sup>2</sup>Discente do Curso de Doutorado em Engenharia de Pesca – Universidade Federal do Ceará - UFC; gleicianebio@hotmail.com;

<sup>3</sup>Discente do Curso de Especialização em Biologia Celular e Molecular – Universidade Estadual Vale do Acaraú –UVA. nayannelima@hotmail.com;

<sup>4</sup>Doutor em Bioquímica – Universidade Federal do Ceará – UFC. garciabio@gmail.com;

<sup>5</sup>Orientador Prof. Dr. do Curso de Biologia – Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA. rmaranguape@gmail.com.