

ANÁLISE IN VITRO DE FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS ISOLADAS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA SOBRE A DEGRADAÇÃO DE NAFTALENO

RESUMO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são compostos tóxicos aos seres humanos que podem se acumular no ambiente. *Pseudomonas* é um gênero que compreende bactérias que utilizam preferencialmente, como fonte de carbono os HPA. Neste trabalho, a expressão de enzimas da via de degradação de naftaleno foi induzida em *P. aeruginosa*, que é comumente encontrada em solos brasileiros, e cujo potencial biorremediador ainda não foi explorado. As frações cromatográficas obtidas foram testadas quanto à degradação do HPA naftaleno, *in vitro*. Algumas das frações se mostraram capazes de realizar a catálise, indicando a presença das enzimas responsáveis pelo processo e apontando um potencial do uso das mesmas, fora do micro-ambiente bacteriano.

PALAVRAS-CHAVE - Biodegradação Ambiental; Cromatografia; Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos; *Pseudomonas aeruginosa*.

IN VITRO ANALYSIS OF CHROMATOGRAPHIC FRACTIONS ISOLATED FROM PSEUDOMONAS AERUGINOSA ON NAPHTHALENE DEGRADATION

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PHA) are toxic compounds to humans that can accumulate in the environment. *Pseudomonas* genus comprises bacteria that preferably use HPA as a carbon source. In this work, the expression of enzymes from the naphthalene degradation pathway was induced in *P. aeruginosa*, which is commonly found in Brazilian soils, and whose bioremediator potential has not yet been explored. The chromatographic fractions obtained were tested for degradation of PHA naphthalene, *in vitro*. Some of the fractions were able to perform catalysis, indicating the presence of the enzymes responsible for the process and pointing out a potential use of them outside the bacterial micro-environment.

KEYWORDS - Environmental Biodegradation; Chromatography; Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; *Pseudomonas aeruginosa*.

ANÁLISIS IN VITRO DE FRACCIONES CROMATOGRÁFICAS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA SOBRE DEGRADACIÓN DE NAFTALENO

RESUMEN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son compuestos tóxicos para los seres humanos que se pueden acumular en el medio ambiente. *Pseudomonas* es un género que comprende bacterias que preferiblemente utilizan HPA como fuente de carbono. En este trabajo, la expresión de enzimas de la vía de degradación del naftaleno fue inducida en *P. aeruginosa*, que se encuentra comúnmente en suelos brasileños, y cuyo potencial biorremediador aún no ha sido explorado. Las fracciones cromatográficas obtenidas se analizaron para determinar la degradación del naftalina DE HAP, *in vitro*. Algunas de las fracciones fueron capaces de realizar la catálisis, indicando la presencia de las enzimas responsables del proceso y señalando un uso potencial de ellas fuera del microambiente bacteriano.

PALABRAS CLAVE: Biodegradación ambiental; Cromatografía; Hidrocarburos aromáticos policíclicos; *Pseudomonas aeruginosa*.

1. INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) constituem uma classe de contaminantes de extrema importância para o ambiente; estão presentes no ar, água, solo e alimentos, são de difícil degradação e causam malefícios a saúde dos seres humanos, sendo ainda destacados em estudos como potentes carcinógenos.^{1,2}

Estes compostos e seus derivados são encontrados em óleo bruto e emitidos na atmosfera por várias fontes de combustão ou liberados no ambiente aquático via atividades humanas, como o esgoto industrial ou doméstico.³⁻⁵

Os HPA são um grupo de combinações orgânicas hidrofóbicas que consistem de dois ou mais anéis benzênicos combinados de modo linear, angular ou em arranjos. Existem mais de 100 tipos de compostos, e a maioria deles persiste no ecossistema por vários anos devido à sua baixa solubilidade em água e à sua adsorção a partículas sólidas.⁶⁻⁸

Em vista disso, a biorremediação pode ser considerada como uma tecnologia para tratar locais contaminados mediante o uso de agentes biológicos capazes de modificar ou decompor poluentes alvos. O benefício desse processo é a mineralização do poluente, isto é, a transformação em componentes inertes, carbono e água.⁹

Diversos gêneros microbianos, principalmente bactérias, fungos e leveduras, têm apresentado capacidade de degradação dos HPA e seus derivados.¹⁰ Algumas dessas bactérias podem utilizar os HPA de baixo peso molecular como o naftaleno, fenantreno, antraceno e acenafteno como fonte exclusiva de carbono.¹¹⁻¹⁵

O naftaleno é um hidrocarboneto que contém dois anéis aromáticos fundidos, e é um modelo para entendimento das propriedades da ampla classe de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos que é bastante abundante no ambiente.² Devido à simplicidade química e maior segurança relativa para o manuseio, o naftaleno, se tornou um modelo padronizado para estudos.¹⁶

Neste contexto, tendo em vista que os hidrocarbonetos são tóxicos aos seres humanos e que seu acúmulo é um importante contaminante do meio ambiente, o presente trabalho propôs-se analisar bactérias comumente encontradas no ambiente, que possuem a capacidade de degradar HPA, em específico o naftaleno, com o intuito de gerar dados que contribuam para a melhoria dos processos de biorremediação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*

O cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa de referência da ATCC - *American type culture collection*) foi realizado em meio de cultura YEPG (Extrato de levedura 0,2%, Peptona de caseína 0,2%, Glicose 0,1%, Nitrato de amônio 0,02%) durante 72h a 28°C sob agitação constante de aproximadamente 150 rpm. Foram preparados dois inóculos bacterianos de 100 mL cada, na proporção de 1:1.000 meio/bactéria. O preparo foi realizado em capela de fluxo laminar e todos os materiais de manuseio foram previamente esterilizados em autoclave (calor úmido). Em apenas um dos inóculos foi acrescentado naftaleno (HPA). Após 72h, as culturas foram centrifugadas por 10 min a 10.000 rpm para decantar as bactérias. O sobrenadante foi descartado e as bactérias foram congeladas a -20°C para dar prosseguimento ao próximo passo experimental. O crescimento bacteriano foi avaliado por espectrofotometria em 600 nm.

Lise bacteriana

O pellet de bactérias foi ressuspenso em PBS (*Phosphate buffered saline*) contendo inibidores de protease (PMSF e TPCK) e submetida a seis ciclos de choques térmicos (congelamento a -20°C e posterior aquecimento a 60°C) para rompimento das células. O extrato bruto obtido foi passado em seringa contendo agulha 21G para diminuição da viscosidade (quebra de ácidos nucléicos) e posteriormente centrifugado por 10 min a 5.000 rpm para decantação dos debrís.

Cromatografia de filtração molecular

Foi utilizado o método de filtração molecular em temperatura ambiente como método cromatográfico; para a fase estacionária foi escolhida a resina Sephadex G75 (Pharmacia/Amersham). A solução tampão (fase móvel) foi Tris (tris(hidroximetil)aminometano) 0,1 mol/L contendo NaCl 0,2 mol/L, sendo o pH = 7,5. A amostra aplicada não excedeu 5% do volume total da coluna cromatográfica; o fluxo foi de 0,5 mL/min, e foram coletadas frações de 1,5 mL.

Teste de atividade catalítica

A atividade catalítica foi analisada pela cinética da reação, realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 274 nm, absorção do naftaleno. A concentração de proteínas em cada fração cromatográfica foi estimada pela relação de absorvância em 260 e 280 nm. As reações de cinética foram montadas em tampão Tris 0,1 mol/L contendo NaCl 0,2 mol/L, pH = 7,5 contendo aproximadamente 50 µg de proteína total e 5 µg de naftaleno, em um volume final de 1 mL. A presença de atividade catalítica foi avaliada pela diminuição da absorvância a 274 nm em função do tempo. A taxa de decaimento k (constante cinética) foi calculada pela equação $k = \ln\{[\text{naftaleno}]_t/[\text{naftaleno}]_0\}/t$, na qual t = tempo.

Análise estatística

A avaliação da redução do decaimento da absorvância a 274 nm foi obtida pela concentração naftaleno no tempo $t=0s$ e $t=250s$ comparando com $t=2250s$ e $t=2500s$ nas frações cromatográficas 3 e 4. Os cálculos foram realizados pelo teste de t-student no software RStudio sendo o valor de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No processo de biodegradação de substâncias por bactérias, é necessário que haja uma indução da expressão de enzimas de degradação do composto alvo. Este processo envolve a ativação de regiões específicas do genoma bacteriano. Quando alguns substratos alvos, como xenobióticos, estão presentes, as bactérias apresentam plasmídeos que codificam enzimas necessárias para degradar o composto.¹⁷

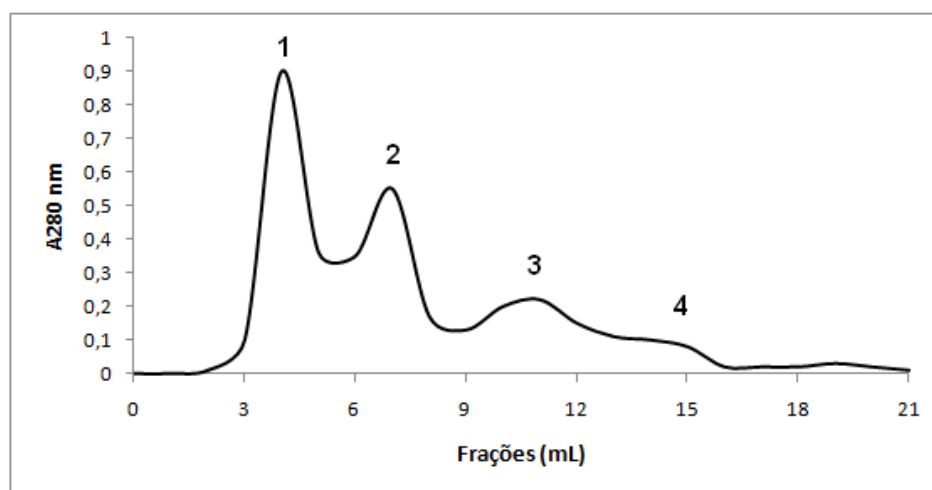
No trabalho em questão, o composto alvo de degradação é o naftaleno, que foi utilizado como indutor da síntese das enzimas de sua via de degradação em *Pseudomonas aeruginosa*. A *P. aeruginosa* é uma bactéria gram negativa, aeróbia obrigatória que possui diversos fatores de virulência (adesinas, enzimas, toxinas secretadas e resistência a antimicrobianos). É comumente distribuída nos solos, em fontes de água e em ambientes úmidos. Trata-se de uma bactéria oportunista que pode causar doenças em pacientes imunossuprimidos. Em humanos as doenças incluem infecções do trato respiratório, trato urinário, pele, tecidos moles, ouvido, olhos, bacteremia e endocardite.¹⁸

O crescimento de *P. aeruginosa* foi monitorado em comprimento de onda de 600 nm, e de acordo com os resultados o crescimento bacteriano na ausência de naftaleno foi praticamente nulo ($OD_{600}=0,12$) em relação ao inóculo cultivado na presença do mesmo ($OD_{600}=1,76$). Esse resultado sugere que o naftaleno foi utilizado como fonte de carbono para o crescimento das bactérias. O extrato bruto, obtido a partir da lise bacteriana, foi submetido a um fracionamento por cromatografia líquida clássica de filtração molecular e 21 frações de 1,5 mL foram obtidas. Todas as frações foram monitoradas a 280 nm para análise do conteúdo proteico e construção do perfil cromatográfico.

A análise do gráfico mostrou que a resina utilizada na cromatografia foi capaz de fracionar o extrato bacteriano em quatro picos principais: pico 1 (frações 3 e 4), pico 2 (frações 6 e 7), pico 3 (frações 9-12), pico 4 (frações 13-16) (FIG. 1). Os dois primeiros picos estão mais definidos, apesar de ainda existir uma pequena sobreposição entre os mesmos. Os picos 3 e 4 não estão bem definidos e concentram uma menor parcela de proteínas.

De acordo com o perfil da cromatografia (FIG. 1), as frações 1 e 2 concentram a maior quantidade das proteínas bacterianas, indicando que grande parte das proteínas de *P. aeruginosa* possuem alta massa molecular, próximas de 80 kDa, de acordo com o range da coluna.

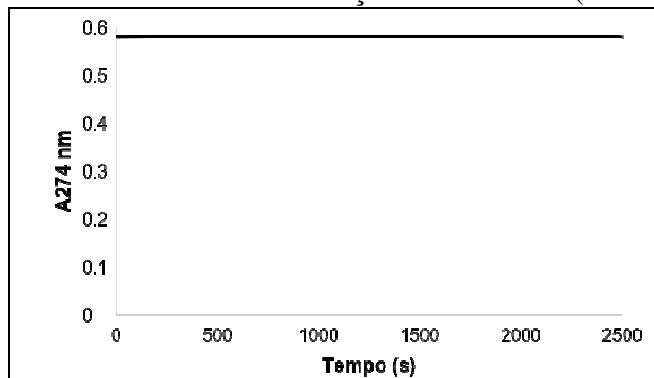
FIGURA 1. Perfil da cromatografia de filtração (cromatograma). Os picos cromatográficos estão indicados pelos números de 1 a 4.



Fonte: Autores, 2020.

Para os experimentos de cinética enzimática foi realizado um teste controle negativo, no qual o naftaleno foi incubado apenas com tampão utilizado na reação para verificar analisar uma possível oxidação do composto por outro fator distinto do enzimático. O naftaleno não teve a concentração alterada após 40 min de incubação no experimento controle negativo. Logo, o tampão utilizado na reação não interferiu na oxidação deste HPA (FIG. 2).

FIGURA 2. Teste de oxidação do naftaleno (controle negativo).



Fonte: Autores, 2020.

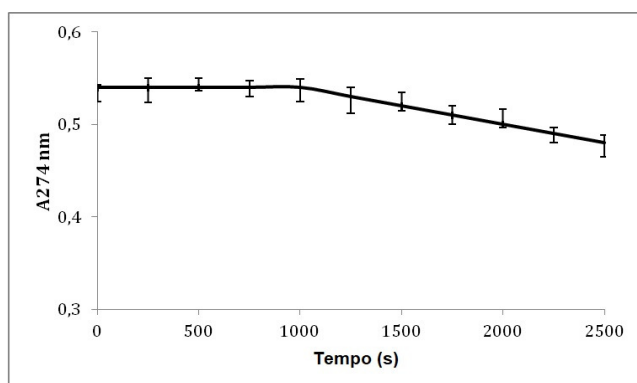
Os testes de cinética foram iniciados a partir da fração cromatográfica 3, pois as proteínas de *P. aeruginosa* começaram a ser fracionadas nesse ponto, e concluídos na fração 15. As demais frações não foram analisadas, uma vez que, de acordo com a absorção espectrofotométrica o conteúdo proteico se mostrou quase nulo. Observou-se queda da absorção do naftaleno quando incubado na presença de proteínas das frações 3 e 4 (FIG. 3 e 4). Na incubação com as demais frações a absorção do naftaleno permaneceu constante, semelhante ao observado no controle negativo das reações.

Sugere-se que as enzimas pertencentes à via de degradação do naftaleno, se concentram nas frações 3 e 4, que formam o primeiro pico cromatográfico, com esses achados é factível afirmar que a maior atividade catalítica ocorreu neste período. A via conhecida de degradação de naftaleno é composta por sete enzimas, todas de alta massa molecular.¹⁹ Esse fato explica a maior atividade catalítica nas frações cromatográficas que compreendem moléculas de menor tempo de retenção na coluna cromatográfica utilizada.

Os estudos realizados por Habe e Omori (2003), descrevem o metabolismo do naftaleno em *Pseudomonas putida* G7, com achados semelhantes aos evidenciados por este estudo, e afirma que esse processo se dá devido o fato dessa bactéria possuir um plasmídeo NAH7 de 83 kb capaz de codificar enzimas com potencial degradador desse HPA.²⁰

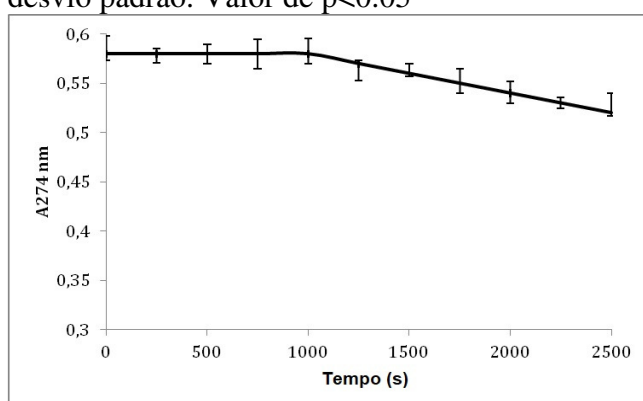
As análises realizadas por Sun et al. (2019) confirmam o potencial biodegradador de *Pseudomonas aeruginosa* S5 e discute que seu potencial biodegradante possa advir da capacidade desta bactéria em produzir biossurfactante.²¹ No experimento de cinética *in vitro* foi observada diminuição na absorção estatisticamente significativa ($p < 0.05$) após aproximadamente 20 minutos de incubação das frações cromatográficas com o naftaleno (FIG. 3 e 4). A taxa de decaimento (valor da constante cinética - k) foi calculada a partir da equação $\ln\{[\text{naftaleno}]_t/[\text{naftaleno}]_0\}/t$. (TAB. 1).

FIGURA 3. Cinética de reação da fração cromatográfica 3. As barras no gráfico indicam o desvio padrão. Valor de $p < 0.05$



Fonte: Autores, 2020.

FIGURA 4. Cinética de reação da fração cromatográfica 4. As barras no gráfico indicam o desvio padrão. Valor de $p < 0.05$



Fonte: Autores, 2020.

TABELA 1. Valores das constantes cinéticas (k) calculadas a 274 nm

Amostra	Constante cinética
Fração 3	$1,53 \times 10^{-3} \cdot h^{-1}$
Fração 4	$1,50 \times 10^{-3} \cdot h^{-1}$

Fonte: Autores, 2020.

Os valores das constantes cinéticas foram semelhantes para as frações 3 e 4 (Tabela 1), indicando semelhante eficiência catalítica. Esse resultado é semelhante ao encontrado no estudo realizado em 2020 por Lofthus e colaboradores, onde a constante de degradação de naftaleno foi 0,041 por dia ou $1,70 \times 10^{-3} \cdot h^{-1}$.²²

Algumas das frações se mostraram capazes de realizar a catálise, indicando a presença das enzimas responsáveis pelo processo e apontando um potencial do uso das mesmas, fora do micro-ambiente bacteriano.

Embora as concentrações e as emissões de HAP permitidas sejam regulamentadas, estudos evidenciam o seu potencial carcinogênico e mutagênico. Logo, alternativas que potencializam o processo de degradação de HAP, como proposto neste estudo e em estudos como o realizado em 2017 por Yan e Wu, que buscou evidenciar os genes das enzimas presentes em *Pseudomonas aeruginosa* responsáveis pela degradação dos HAP, são de grande

relevância para a humanidade em curto e longo prazo, já que a eliminação dos hidrocarbonetos no meio ambiente é difícil, e eles se acumulam com facilidade.^{23,24}

Ademais, a biorremediação é uma estratégia biotecnológica potencialmente segura, menos agressiva e com melhor custo benefício quando defrontado aos métodos físico-químicos tradicionalmente utilizados, tais como lavagem do solo e incineração.²⁵

4. CONCLUSÃO

A utilização de bactérias do gênero *Pseudomonas*, como *P. aeruginosa*, em processos de biorremediação de solo e água contaminados com óleo já foi apontada na literatura, como um processo promissor. Por se tratar de uma espécie oportunista, a *P. aeruginosa* deve ser coletada após a conclusão do processo de biorremediação, logo seria importante o estudo da estabilidade de suas enzimas no meio ambiente para realização desse processo. Isso eliminaria a necessidade do microrganismo, que possui os fatores de virulência. Este estudo mostra que a atividade catalítica das enzimas da via de degradação de HPA se mantém após seu isolamento, sugerindo a possibilidade de uso em ambientes contaminados.

REFERÊNCIAS

1. Bernardo; Douglas L. et al. Carcinogenicidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Quím. Nova, São Paulo. agosto de 2016. (acessado em 20 de julho de 2020); 39(7):789-794. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422016000700789&lng=en&nrm=iso. doi: <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20160093>.
2. GERESSASSIE, Tekleweini et al. Occurrence and Ecological and Human Health Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils from Wuhan, Central China. International Journal Of Environmental Research And Public Health, v. 15, n. 12, p.1-19, 5 dez. 2018.
3. Khatoon K, Malik A. Screening of polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial isolates from oil refinery wastewater and detection of conjugative plasmids in polycyclic aromatic hydrocarbon tolerant and multi-metal resistant bacteria. Heliyon. 2019 Oct; 5(10):e02742. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6838955/> doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02742
4. Sicre MA, Marty JC, Saliot A, Aparicio X, Grimalt J, Albaiges J. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in different sized aerosols over the Mediterranean Sea: occurrence and origin. Atmospheric Environment. 1987; 21(10): 2247–2259. doi: 10.1080/03067318708078412
5. Neff JM. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: sources, fates and biological effects. Applied Science Publishers Ltd., Essex: England; 1979. p. 262
6. Volkering F, Breure AM, Van Andel JG. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1992; 36: 548–552. doi:<https://doi.org/10.1007/BF00170201>
7. Volkering F, Breure AM, Van Andel JG. Effect of microorganisms on the bioavailability and biodegradation of crystalline naphthalene. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1993; 40: 535–540 doi: 10.1007/BF00175745
8. Bosma TNP, Middeldorp PJM, Schra AG, Zender AJB. Mass transfer limitation of biotransformation: quantifying bioavailability. Environ Sci Technol. 1997; 31: 248–252. doi:<https://doi.org/10.1021/es960383u>
9. Francisco WC, Queiroz TM de. Biorremediação.[Internet].(2018).[Acesso em: 08 jun. 2020.];

- 15(1):249-255. Disponível em: <http://nucleus.feituverava.com.br/index.php/nucleus/article/view/1700>. doi: <https://doi.org/10.3738/1982.2278.1700>
10. Rosato YB. Biodegradação do Petróleo. 1997. In: Melo, I.S e Azevedo, J.L. Microbiologia Ambiental. Jaguariúna. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 14: 307-334.
11. Annweiler E, Richnow H, Antranikian G, Hebenbrock S, Garms C, Franke S, et al. Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*. *Appl Environ Microbiol*. 2000 Feb; 66(2):518–523. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91857/>. doi: 10.1128/aem.66.2.518-523.2000
12. Resnick SM, Lee K, Gibson DT. Diverse reactions catalyzed by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 1996; 17: 438–457.
13. Menn FM, Applegate BM, Saylor GS. NAH Plasmid mediated catabolism of anthracene and phenanthrene to naphthoic acids. *Appl. Environ. Microbiol*. 1993; 59(6): 1938–1942. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC182186/>
14. Kiyohara H, Torigoe S, Kaida N, Asaki T, Iida T, Hayashi H, et al. Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, *pah*, that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilization by *Pseudomonas putida* OUS82. *J. Bacteriol*. 1994 Apr; 176(8): 2439–2443. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC205370/>. doi: 10.1128/jb.176.8.2439-2443.1994
15. Pinyakong O, Habe H, Kouzuma A, Nojiri H, Yamane H, Omori T. Isolation and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from acenaphthene and acenaphthylene degrading *Sphingomonas* sp. *FEMS Microbiol. Lett.*; 2004. p.297–305, Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article/238/2/297/490344> doi: 10.1016/j.femsle.2004.07.048
16. Frescura LM, Pereira HE, Silva Jr FV, Menezes BB, Hilgemman M, Lazzaretti Jr AP, et al. A Comparative Study Between High Density Polyethylene, Polyurethane Foam and Amberlite XAD-2 in the Removal of Different PAHs. *Journal Polycyclic Aromatic Compounds*. 25 Aug 2018; 0(0):1-15. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/329922973_A_Comparative_Study_Between_High_Density_Polyethylene_Polyurethane_Foam_and_Amberlite_XAD-2_in_the_Removal_of_Different_PAHs. doi: <https://doi.org/10.1080/10406638.2018.1545680>
17. Top EM, Spingael D. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Curr. Opin. Biotechnol*. 2003; 14(3):262–269. doi: [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00066-1](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00066-1)
18. Tortora GJ, Case CL, Funke BR. *Microbiologia*. 12 ed. Porto Alegre: Artmed Editora; 2016.
19. Eaton RW, Chapman PJ. Bacterial metabolism of naphthalene: construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions. *J Bacteriol*. 1992; 174(23), 7542-7554. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC207464/>. doi: 10.1128/jb.174.23.7542-7554.1992.
20. Habe H, Omori T. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 22 May 2014; 67(2): 225-243. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/67/2/67_2_225/pdf-char/en.

doi: <https://doi.org/10.1271/bbb.67.225>

21. Sun S, Wang Y, Zang T, et al. A biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* S5 isolated from coking wastewater and its application for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bioresour Technol.* 2019; 281:421-428. doi:10.1016/j.biortech.2019.02.087

22. Lofthus S, Bakke I, Tremblay J, Greer CW, Brakstad OG. Biodegradation of weathered crude oil in seawater with frazil ice. *Marine Pollution Bulletin.* May 2020; 154:111090.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X20302083>. doi: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111090>

23. Kim KH, Jahan SA, Kabir E, Brown, RJ. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ Int.* 2013 Oct; 60: 71-80. doi:10.1016/j.envint.2013.07.019

24. Yan S, Wu G. Reorganization of gene network for degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under several conditions. *J Appl Genet.* 2017; 58(4):545-563.

Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13353-017-0402-9>
doi:10.1007/s13353-017-0402-9

25. Alcalde M, Ferrer M, Plou FJ, Ballesteros A. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. *Trends Biotechnol.* 2006; 24(6):281-287.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167779906000990>. doi:10.1016/j.tibtech.2006.04.002.