

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL E BIOPROCESSOS



Inoculante agrícola de *Enterobacter* sp., *Ochrobactrum* sp. e *Bacillus thuringiensis* com ação biorremediadora do herbicida Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) e biocontrole de pragas.

**Barbara Alvarenga Peckle**

Rio de Janeiro  
2023

# Barbara Alvarenga Peckle

Aluna de doutorado do curso de Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos

Universidade Federal do Rio de Janeiro

INOCULANTE AGRÍCOLA DE *Enterobacter* sp., *Ochrobactrum* sp. E *Bacillus thuringiensis* COM AÇÃO BIORREMEIADORA DO HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) E BIOCONTROLE DE PRAGAS.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor em Ciências Biotecnológicas (Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos).

Orientador:

Dr. Andrew Macrae

Co-orientadora:

Dr.<sup>a</sup> Ida Carolina Neves Direito

Rio de Janeiro  
Fevereiro 2023

## FICHA CATALOGRÁFICA

### CIP - Catalogação na Publicação

229i      Alvarenga Peckle, Barbara  
          INOCULANTE AGRICOLA de Enterobacter sp.,  
Ochrobactrum sp. e Bacillus thuringiensis COM AÇÃO  
BIORREMIADORA DO HERBICIDA ÁCIDO 2,4  
DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) E BIOCONTROLE DE  
PRAGAS. / Barbara Alvarenga Peckle. -- Rio de  
Janeiro, 2022.  
          192 f.

Orientadora: Andrew Macrae.  
Coorientadora: Ida Carolina Neves Direito.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio  
de Janeiro, Decania do Centro de Ciências da Saude,  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal,  
2022.

1. Inoculante Agrícola. 2. Ochrobactrum sp.. 3.  
Enterobacter sp.. 4. Bacillus thuringiensis . 5.  
Biorremediação. I. Macrae, Andrew, orient. II. Neves  
Direito, Ida Carolina , coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

*“Por muitas vezes pensei em desistir, pensei em mudar, pensei que não valeria a pena, pensei que não era capaz e que não conseguiria. A vida é uma só, se eu desistisse estaria desistindo de mim, do meu passado e do meu futuro, então, resolvi seguir, e neste mar remei até chegar à terra e neste pequeno momento percebi que venci. Não foi e nunca será fácil, portanto, não deixe de ter fé”.*

**(Barbara Alvarenga Peckle)**

## AGRADECIMENTOS

Sobretudo a minha família que sempre me apoiou e me deu forças para meu sonho ser realizado. Obrigada pai por ter feito tudo necessário para que eu conseguisse finalizar minha tese, por ter dado apoio financeiro e emocional em toda minha trajetória acadêmica. Pai, eu consegui! À minha querida Rebecca Peckle, “segunda tese de doutorado” Rebecca Peckle, foi difícil, gratificante e maravilhoso você fazer parte da minha vida. À minha querida Clarice Peckle “terceira tese de doutorado”, que chegou como furacão e com muita doçura nos 45 minutos do segundo tempo trazendo mais amor e emoção para minha vida.

Ao meu orientador Andrew Macrae por ter me dado à oportunidade desde o mestrado. Além de ter me animado quando as coisas não iam bem, por ter aceitado minhas limitações quanto aluna e mãe de dois bebês. Também quero agradecer pelos maravilhosos churrascos descontraídos que sempre me ajudaram a encontrar os amigos cientistas e entender que nem tudo é trabalho.

À minha co-orientadora Ida Carolina, que muitas vezes foi meu pilar nos bons e maus momentos, que não desistiu de mim e que quase sempre teve paciência necessária. Obrigada pela ajuda na minha formação na graduação, obrigada por segurar minha mão no mestrado e muitíssimo obrigada por me abraçar no doutorado, momento no qual foi muito delicado na minha vida pessoal.

Aos amigos e companheiros de laboratório da antiga UEZO agora UERJ/ZO, o companheirismo e amizade me ajudaram muito em toda essa trajetória: Andressa Sbrano, João Victor Ferreira, Juliana Succar e Vinícius Flores. Vocês foram essenciais nesses anos de mestrado e doutorado. Em especial a Andressa, que foi minha parceira durante a graduação e no mestrado, que compartilhou de tudo comigo no doutorado e que deu os melhores conselhos durante toda minha trajetória científica. Aos meus colegas de laboratório na UFRJ, muito obrigada pela ajuda, pelos momentos de descontração, pelas festas, pelas risadas e por me aguentarem nas dificuldades acadêmicas: Dr. José Roberto, Dr<sup>a</sup> Selma Soares, João Ricardo, Alana Almeida, Rafaela, João Victor,

Verônica Andrade, às alunas que tive a oportunidade de ensinar e também colaboraram com meu trabalho. À minha amiga e companheira Sheila Silva que foi crucial nos dois últimos anos de doutorado, que colaborou e ensinou tanto, que estendeu a mão no momento mais delicado da tese. Ao melhor técnico do laboratório, Renato Ferreira, foi um amigo, que me ajudou muito nos momentos mais difíceis, preparando material comigo, me auxiliando nas questões de laboratório e também por fazer parte da minha vida pessoal. Agora, nos 45 do segundo tempo, tive uma ajuda mais que especial, gostaria de fazer um agradecimento ao meu querido amigo João Ricardo, que colaborou muito para que essa tese fosse concluída, muitíssimo obrigado.

Na pesquisa uma andorinha não faz verão, por isso tenho que agradecer esse grande corpo de professores/doutores que sempre foram solícitos nos momentos cruciais. Muitíssimo obrigada à Prof<sup>a</sup> Fernanda Reinert, que cedeu gentilmente o laboratório durante toda minha pesquisa; ao Dr. Kayo Bianco e Dr<sup>a</sup> Maysa Mandetta pela parceria juntamente com a FIOCRUZ, que abriu o laboratório para que eu pudesse usar durante o auge da pandemia; ao Dr. João Vianez Júnior por abrir parceria e auxiliar na parte genômica mesmo distante; Dr<sup>a</sup> Alane Vermelho por disponibilizar equipamentos, espaço e conhecimento técnico científico durante todo meu doutorado, a Dr<sup>a</sup> Bianca Ortiz por ser uma parceira ímpar em todos os momentos, estando disponível para tirar dúvidas e parceria a todo o momento. Ao professor Dr. Antônio Jorge Ribeiro por me auxiliar nas questões de HPLC e disponibilizar sua equipe desde meu período no mestrado e doutorado. Mais uma vez remeto ao Dr. José Roberto Assis que foi meu apoio em dúvidas e questões relacionadas ao meu trabalho, você foi essencial para que isso tenha ocorrido.

Aos meus amigos que sempre entenderam minha ausência e me deram muitas forças nos momentos necessários: Maria Clara, Joyce Lopes, Yasmim Christine, Caroline Teixeira, Carol Rodrigues e Thaianá Melo, Eric Moura, Alessandra Sbrana, que acreditaram no meu potencial e alguns ajudaram diretamente na tese.

Ao meu melhor amigo e companheiro Rafael Moreira de Lima por ter me incentivado em todos os momentos, por ter feito tudo que necessitei para que esse trabalho fosse bem feito, desde me levar ao laboratório, por ter me escutado e embarcado comigo nos momentos de reclusão, muitíssimo obrigada!

*Ao apoio financeiro do CNPq, FAPERJ, CAPES, UFRJ e UERJ/ZO sem o qual esse trabalho não seria possível.*

## RESUMO

PECKLE, B. A, Rio de Janeiro, 2023. Inoculante agrícola de *Enterobacter* sp. *Ochrobactrum* sp. e *Bacillus thuringiensis* com ação biorremediadora do herbicida Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) e biocontrole de pragas. Tese (Doutorado em Ciências – Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2023

O Brasil é um grande exportador de *commodities* agrícolas, é um dos principais fornecedores e produtores de alimentos do mundo, sendo a produção agrária uma das principais bases da economia deste país. Para produzir em grande escala e com boa qualidade, os agricultores recorrem a produtos químicos como agrotóxicos. Sabe-se que o país é o principal consumidor de agrotóxico do mundo e esse intenso consumo traz sérios danos ao meio ambiente e a saúde humana. Os herbicidas são produtos cuja classe está em segundo lugar no *ranking* de agrotóxicos mais consumidos e, desta classe destaca-se o herbicida Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) que é amplamente utilizado no país. Hoje se sabe que o 2,4-D é extremamente tóxico e possivelmente cancerígeno. Devido ao uso deste produto, faz-se necessário buscar mecanismos para minimizar os danos que o 2,4-D pode causar ao meio ambiente e ao homem. O principal objetivo deste trabalho foi elaborar/ otimizar um bioproduto (inoculante agrícola) com dupla funcionalidade, podendo ser biorremediador do herbicida 2,4-D e atuar no biocontrole de pragas. Fazendeiros já investem em produtos para biocontrole de pragas há anos, e assim, um produto que faz dois serviços pelo preço de um é mais atrativo, mais fácil de ser inserido no mercado e pode ser melhor benquistado que os biocontroles tradicionais. Para este trabalho, foram selecionadas duas estirpes bacterianas da coleção de cultura do Laboratório de Biotecnologia Sustentável e Bioinformática Microbiana (LBSBM) e três estirpes oriundas da coleção de culturas do Leibniz Institute - *German Collection of Microorganisms and Cell Culture GmbH* (DSMZ), para que fosse feito um inoculante usando um consórcio microbiano. Para produção do inoculante foram utilizadas estirpes da espécie *Bacillus thuringiensis*, que já é conhecida por ser bioinseticida, além da utilização de uma estirpe do gênero *Enterobacter* sp., que é relatada como degradadora do 2,4-D. Adicionalmente, outras estirpes foram testadas

neste projeto, *Bacillus thuringiensis* (ATCC 33679), *Enterobacter xiangfangensis* (DSM 101093), *Ochrobactrum ciceri* (DSMZ 22292) e *Bacillus thuringiensis* (DSMZ 2046), *Ochrobactrum intermedium* (DF13) e *Enterobacter hormaechei* subsp. *steigerwaltii* (MG02). Todas as estirpes foram testadas para verificar seu crescimento em meio de cultura contendo o 2,4-D como única fonte de carbono, observando então a capacidade das estirpes de resistir à sua toxidez e metabolizar o composto. Todas as estirpes bacterianas testadas foram capazes de degradar o 2,4-D dentro de 30 dias, com exceção das duas estirpes *Bacillus thuringiensis* que biotransformaram o herbicida. O sequenciamento genômico das duas estirpes da coleção do laboratório confirmou as identidades de cada estirpe: *Enterobacter hormaechei* MG02 e a estirpe *Ochrobactrum intermedium/Brucella intermedia* DF13.

Análise intra e inter genomas foi feita para identificar genes que codifiquem enzimas envolvidas nas rotas de degradação do herbicida. A mineração genômica foi realizada, a fim de encontrar genes já descritos na literatura como degradadores do composto 2,4-D ou associados. Foi possível observar outros genes e enzimas que podem estar relacionados à degradação do 2,4-D pelas estirpes bacterianas MG02 e DF13: *paaH/fadB* (3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase); *ACAT* (acetil-CoA C-acetiltransferase); *fadJ* (enoil-Co-A hidratase); *fadI* (acetil-CoA aciltransferase); (*paaF/echA*) (enoil-CoA hidratase); *paaH/fadB* (3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase); *pcaG* (protocatecuato 3,4-dioxigenase); *pcaH* (3,4-dioxigenase, beta subunit [EC:1.13.11.3]); *pcaB* (3-carboxi-cis,cis-muconato cicloisomerase); *pcaC* (4-carboximuconolactona descarboxilase); *pcaD* (3-oxoadipato enol-lactonase); *pobA* (p-hidroxibenzoato 3-monooxigenase) e *catE* (catecol 2,3-dioxigenase) - indicando a possibilidade de novas rotas de degradação. Este trabalho gerou o depósito de patente com a formulação do inoculante agrícola e também gerou a publicação de dois artigos na modalidade de *Genome Announcement*, os quais descreveram o sequenciamento, montagem e anotação dos genomas das estirpes MG02 e DF13.

**Palavras-chave:** Inoculante Agrícola, *Ochrobactrum* sp., *Enterobacter* sp., *Bacillus thuringiensis*, Biorremediação e Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)

## ABSTRACT

PECKLE, B. A. Agricultural inoculant of *Enterobacter* sp., *Ochrobactrum* sp. e *Bacillus thuringiensis* with action of bioremediation of the herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and pest biocontrol. Rio de Janeiro, 2023. Thesis (Doctorate in Sciences – Plant Biotechnology and Bioprocesses). Postgraduate Program in Plant Biotechnology and Bioprocesses. Federal University of Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2023.

Brazil is a major exporter of agricultural commodities, it is one of the main suppliers and producers of food in the world, and agricultural production is the basis of this country's economy. To produce on a large scale and with good quality, farmers resort to chemical products such as pesticides. It is known that the country is the main consumer of pesticides in the world and this intense consumption brings serious damage to the environment and to man. Herbicides are products whose class is in second place in the ranking of most consumed pesticides and, from this class, the herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) stands out, which is widely used in the country. Today it is known that 2,4-D is extremely toxic and possibly carcinogenic. Due to the use of this product, it is necessary to seek interruption to minimize the damage that 2,4-D can cause to the environment and man. The main objective of this work was to elaborate/optimize a bioproduct (agricultural inoculant) with dual functionality, being able to be a bioremediator of the 2,4-D herbicide and to act as a biocontrol of pests. Farmers have been investing in pest biocontrol products for years, so a product that does two jobs for the price of one is more attractive, easier to market, and may be more welcome than traditional biocontrols. Two bacterial strains were selected from the culture collection of the Laboratory of Sustainable Biotechnology and Microbial Bioinformatics (LBSBM) and three strains from the culture collection of the Leibniz Institute - German Collection of Microorganisms and Cell Culture GmbH (DSMZ), so were used to create a microbial consortium inoculant. For the production of the inoculant, strains of the species *Bacillus thuringiensis* were used, which is already known in the literature for being a bioinsecticide, as well as a strain of the genus *Enterobacter* sp., which is reported as a 2,4-D degrader. In addition, other strains were examined in this project, *Bacillus thuringiensis* (ATCC 33679), *Enterobacter xiangfangensis* (DSM 101093), *Ochrobactrum ciceri* (DSMZ 22292) and *Bacillus*

*thuringiensis* (DSMZ 2046), *Ochrobactrum intermedium* (DF13) and *Enterobacter hormaechei* subsp. *steigerwaltii* (MG02). All strains were tested to verify their growth in the culture medium containing 2,4-D as the only carbon source, then observing the ability of the strains to resist its toxicity and metabolize the compound. All bacterial strains tested were capable of degrading 2,4-D within 30 days, with the exception of the two *Bacillus thuringiensis* strains, which biotransformed the herbicide. Genomic sequencing of the two strains in the laboratory collection confirmed the identities of each strain: *Enterobacter hormaechei* MG02 and the strain *Ochrobactrum intermedium/Brucella intermedia* DF13.

Intra and inter genome analysis was performed to identify genes that encode enzymes involved in herbicide degradation routes. Genomic mining was performed in order to find genes already registered in the literature as degraders of the 2,4-D compound or associated. It was possible to observe other genes and enzymes that may be related to the degradation of 2,4-D by bacterial strains MG02 and DF13: *paaH/fadB* (3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase); *ACAT* (acetyl-CoA C-acetyltransferase); *fadJ* (enoyl-Co-A hydratase); *fadI* (acetyl-CoA acyltransferase); (*paaF/echA*) (enoyl-CoA hydratase); *paaH/fadB* (3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase); *pcaG* (protocatechuate 3,4-dioxygenase); *pcaH* (3,4-dioxygenase, beta subunit [EC:1.13.11.3]); *pcaB* (3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase); *pcaC* (4-carboxymuconolactone decarboxylase), *pcaD* (3-oxoadipate enol lactonase); *pobA* (p-hydroxybenzoate 3-monooxygenase); *catE* (catechol 2,3-dioxygenase) - indicating the possibility of new degradation routes. This work led to the filing of a patent with the formulation of an agricultural inoculant and also led to the publication of two articles in the form of Genome Announcements, which described the sequencing, assembly and annotation of the genomes of strains MG02 and DF13.

**Keywords:** Agricultural Inoculum, *Ochrobactrum sp.*, *Enterobacter sp.*, *Bacillus thuringiensis*, Bioremediation and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D).

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Fórmula estrutural plana do herbicida 2,4-D em forma de ácido (NJOKU & HAMMED, 2011).  
..... 28
- Figura 2. Visualização sistemática do sistema atual de nomenclatura elaborado pelo comitê de nomenclatura de toxinas de *Bacillus thuringiensis* (PALMA *et al.*, 2014) ..... 39
- Figura 3. Representação das regiões da toxina Cry onde as mutações aumentaram a atividade inseticida em diferentes toxinas de Cry. A estrutura tridimensional da toxina Cry1Aa (BRAVO *et al.*, 2013). ..... 40
- Figura 4. Esquema de vias metabólicas orto e meta e sistemas enzimáticos de degradação do catecol por bactérias. Papel das dioxigenases na degradação de compostos aromáticos (ARORA *et al.*, 2009; ABLIEIEVA *et al.*, 2021; - Adaptado 2022)..... 47
- Figura 5. Biossíntese do Catecol através de diversos compostos aromático Fonte: NC-IUBMB (2022)... 49
- Figura 6. Mecanismo de ação das dioxigenases aromáticas. A) dioxigenase hidroxilante do anel aromático; B) dioxigenase de clivagem do anel de extradiol e C) dioxigenase de clivagem do anel intradiol (ARORA *et al.*, 2009)..... 51
- Figura 7. Vias de degradação de 2,4-D com conjunto de genes (*cad* e *tfd*) envolvido em *Alcaligenes* sp. e *Achromobacter* sp. Os retângulos tracejados representam os metabólitos e/ou enzimas originalmente propostos por Don *et al.* (1985). Modificado de Don *et al.* (1985), Kitagawa *et al.* (2002), Vedler *et al.* (2004) e Huang *et al.* (2017) Apud SERBENT *et al.*, 2019)..... 53
- Figura 8. A semelhança organizacional entre os *operons* degradativos do catecol e do clorocatecol, como mostrado por seus produtos gênicos. A extensão de identidades de aminoácidos entre os produtos gênicos é mostradas por setas (a identidade de aminoácidos de TcbR para ClcR é apenas sobre uma porção de clcR, não a proteína inteira). Além disso, outras identidades entre os produtos gênicos são: CatR e TcbR, 31%; *c1cA* e *tfdC*, 59%; *catB* e *tcbD*, 44%; *catB* e *tfdD*, 42%; C1cB e TdfD, 63%; *clcD* e *tfdE*, 54% (DAUBARAS & CHAKRABARTY, 1992). ..... 56
- Figura 9. Esquema resumido da estrutura organizacional do documento de tese em capítulos. Capítulo 1 - introdução, capítulo 2 - material e métodos em duas etapas, capítulo 3- são os resultados dos dados relacionados ao inoculante, o capítulo 4 - são resultados ..... 67
- Figura 10. Fluxograma da 1ª etapa do material e métodos referente à otimização da produção do inoculante bacteriano..... 68
- Figura 11. Esquema do experimento de curva de crescimento das estirpes empregadas no experimento. O esquema mostra meio LB líquido inoculado, que passa por diluição seriada. Em seguida, as diluições são plaqueadas em meio LB sólido, utilizando a técnica drop plate com crescimento pelo período de 24h. A contagem da UFC foi feita manualmente. O meio LB inoculado também passou por leitura no espectrofotômetro para analisar o crescimento microbiano em D.O ..... 72
- Figura 12. Esquema da microplaca utilizada na diluição do herbicida 2,4-D em LB para testar o MIC das estirpes bacterianas *Enterobacter* sp. MG02 e *Ochrobactrum* sp. DF13. A coluna 1 (linha A) foi utilizada como controle positivo - meio LB e a bactéria escolhida. A coluna 2 (linha A) foi o controle negativo - somente meio LB estéril. Na coluna 3 (linha A - 1º grupo) a concentração inicial do 2,4-D foi de 2,0 g.L<sup>-1</sup>, já as colunas ao lado foram colocadas as seguintes concentrações de 2,4-D: 1,0g.L<sup>-1</sup>, 0,5g.L<sup>-1</sup> e 0,25g.L<sup>-1</sup>. Na coluna 3 (linha E - 2º grupo) foi colocado a concentração inicial de 3,0g. L<sup>-1</sup>, já nas colunas

ao lado foram colocados as seguintes concentrações: 1,5g.L<sup>-1</sup>, 0,75g.L<sup>-1</sup> e 0,375g.L<sup>-1</sup>. Em cada poço com contendo meio LB líquido acrescido das concentrações de 2,4-D, foi inoculados a estirpe bacteriana escolhida para verificar o MIC. (Criado no Biorender.com)..... 74

Figura 13. Esquema do experimento da análise de degradação do herbicida 2,4-D pelas estirpes bacterianas. Meio LB líquido acrescido com 300 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D inoculado com estirpe bacteriana escolhida. Após o crescimento microbiano, as células foram passadas por meio mínimo 2,4-D como única fonte de carbono. Alíquotas foram retiradas nos período de 15 e 30 dias depois de inoculadas. As alíquotas foram analisadas em HPLC, técnica que mostra a degradação do 2,4-D pelas estirpes bacterianas..... 76

Figura 14. Esquema do teste de antagonismo realizado com a estirpe bacteriana *B. thuringiensis* como indicadora e as estirpes bacterianas *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSM 101093), *O. cicere* (DSM 22292), *Enterobacter* sp. MG02, e *Ochrobactrum* sp. DF13 como produtoras de substâncias antimicrobianas. .... 78

Figura 15. Esquema da formulação do inoculante. Formulação 1- inoculante à base de *B. thuringiensis*; formulação 2- inoculante à base a estirpe *Enterobacter* sp. MG02, formulação 3- inoculante em consórcio *Enterobacter* sp. MG02 e *B. thuringiensis* e formulação número 4 - inoculante controle. .... 79

Figura 16. Esquema da diluição seriada do inoculante agrícola para determinar UFC. Diluição seriada na proporção 1:10 de solução salina estéril na concentração de 0,85%, diluições foram realizadas de 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-9</sup> e foi utilizado para o plaqueamento a técnica de *drop plate* (ilustração criada no Biorender). .... 80

Figura 17. Fluxograma da 2ª etapa do material e métodos - Análise genômica *in silico* das estirpes bacterianas. O primeiro fluxograma mostra as etapas da análise genômica das estirpes bacterianas *Enterobacter* sp. MG02 e *Ochrobactrum* sp. DF13, onde se fez a identificação e análise funcional, com o objetivo de buscar genes de interesse e rotas alternativas de compostos aromáticos. O segundo fluxograma, apresenta a análise funcional dos genomas das estirpes bacterianas da coleção DSMZ e *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134, cujo objetivo é o estudo dos genes de degradação de compostos aromáticos. .... 82

Figura 18. Curva de crescimento da estirpes bacterianas em meio LB sob agitação de 150 rpm . A- *Enterobacter* sp. MG02 durante período de 48 horas após inoculação. B- *Bacillus thuringiensis* (ATCC 33679) com duração de 38 horas após a inoculação. C. *Ochrobactrum* sp. DF13 durante período de 36 horas. Barras de erros indicam o erro padrão (n=3). .... 90

Figura 19. Gráfico do crescimento das estirpes bacterianas *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSMZ 101093), *Ochrobactrum cicere* (DSMZ 22292) e *Bacillus thuringiensis* (DSMZ 2046) em meio LB acrescido com 0,5 g.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e em meio LB sem 2,4-D (controle) durante o período de 9 horas. Barras de erro indicam erro padrão (n=3). .... 93

Figura 20. Gráfico do crescimento das estirpes bacterianas *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSMZ 101093), *Ochrobactrum cicere* (DSMZ 22292) e *Bacillus thuringiensis* (DSMZ 2046) em meio LB acrescido com 1 g.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e em meio LB sem 2,4-D (controle) durante o período de 9 horas. Barras de erro indicam erro padrão (n=3). .... 93

Figura 21. Gráfico da Concentração Mínimo Inibitória de 2,4-D para as estirpes bacterianas *Enterobacter* sp. MG02 e *Ochrobactrum* sp. DF13. Barras de erro indicam erro padrão (n=3). .... 95

Figura 22. Perfil cromatográfico do meio mínimo 2,4-D com estirpe bacteriana *Ochrobactrum* sp. DF13. Em A e C o perfil cromatográfico do controle com 15 e 30 dias de experimento sem bacteria; em B e D- o perfil cromatográfico do meio mínimo 2,4-D após inoculado com a estirpe bacteriana DF13 com 15 dias e 30 dias de experimento. .... 97

- Figura 23. Perfis cromatográficos do meio mínimo 2,4-D . A - perfil cromatográfico do controle (sem inoculação -  $t_R$  10,522 min); com 30 dias de experimento B- perfil cromatográfico do meio mínimo 2,4-D ( $t_R$  10,510 min) após inoculado com a estirpe bacteriana *Bacillus thuringiensis* com 30 dias de experimento. .... 99
- Figura 24. A- estirpe bacteriana *B. thuringiensis* DSMZ (2046) como indicadora de substância antimicrobiana; B- estirpe bacteriana *B. thuringiensis* (ATCC 33679) como indicadora de substância antimicrobiana. Poço 1- *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis*; poço 2- *Enterobacter* sp. MG02; poço 3- *O. ciceri*; poço 4- *Ochrobactrum* sp. DF13; poço 5- MG04 (estirpe teste). .... 100
- Figura 25. Árvore filogenética da estirpe *Enterobacter* sp. MG02 (destacada em vermelho). Gerada pelo método de máxima verossimilhança, com distância P e *Neighbor-Joining* baseada no alinhamento de 1417 pb. A escala da distância 0.0100 indica substituições por sítio, número situados nas ramificações da árvore indicam porcentagem de recuperação. .... 109
- Figura 26. Árvore filogenética da estirpe DF13 (destacada em vermelho). Gerada pelo método de máxima verossimilhança com distância P e *Neighbor-Joining* baseada no alinhamento de 1417 pb. A escala da distância 0.0100 indica substituições por sítio, número situados nas ramificações da árvore indicam porcentagem de recuperação. .... 112
- Figura 27. Sistemas do metabolismo e biodegradação de xenobióticos encontrados no genoma da estirpe MG02 anotado pela ferramenta KAAS. .... 115
- Figura 28. Sistemas do metabolismo e Biodegradação de xenobióticos encontrados no genoma da estirpe *Ochrobactrum* sp. DF13 gerado pela ferramenta KA..... 121

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Os 10 ingredientes ativos mais vendidos no Brasil em 2020 (IBAMA, 2021).....	27
Tabela 2. Dados das estirpes bacterianas empregados no estudo .....	70
Tabela 3. Organismos de referência usados na ferramenta Medusa .....	85
Tabela 7. Viabilidade do inoculante agrícola com as estirpes bacterianas <i>Bacillus thuringiensis</i> e MG02 no período de 30, 60, 90 e 365 dias após o preparo e liofilizado em prateleira. ....	101
Tabela 8. Resultado das reads brutas geradas pelo sequenciamento e reads filtradas pelo programa Trim-Galore das estirpes bacterianas <i>Enterobacter</i> sp. MG02 e <i>Ochrobactrum</i> sp. DF13. ....	104
Tabela 9. Resultados após o processamento no programa QUAST. ....	105
Tabela 10. Resultados gerados a partir da sequência de rRNA16S –BLAST-NCBI da estirpe bacteriana MG02 para a primeira cópia. ....	106
Tabela 11. Resultados gerados a partir da sequência de rRNA 16S - BLAST NCBI da estirpe bacteriana <i>Enterobacter</i> sp. MG02.....	107
Tabela 12. Resultados gerados a partir da sequência de rRNA16S - BLAST NCBI da estirpe bacteriana <i>Ochrobactrum</i> sp. DF13.....	111
Tabela 13. Características do genoma da estirpe bacteriana MG02 .....	113
Tabela 14. Dados de recursos proteicos do genoma da estirpe bacteriana MG02, anotado através da ferramenta de bioinformática PATRIC. ....	113
Tabela 15. KAAS genes e enzimas envolvidas rotas metabólicas de degradação de xenobióticos no genoma da <i>Enterobacter</i> sp. MG02.....	116
Tabela 16. Característica do genoma da estirpe bacteriana DF13 .....	119
Tabela 17. Dados de recursos proteicos do genoma da estirpe bacteriana DF13 através da ferramenta de bioinformática PATRIC. ....	119
Tabela 18. KAAS genes e enzimas envolvidas nas rotas metabólicas de degradação de xenobióticos do genoma da estirpe <i>Ochrobactrum</i> sp. DF13.....	122
Tabela 19. KAAS genes e enzimas envolvidas nas rotas metabólicas de degradação de xenobióticos do genoma da estirpe <i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i> strain LMG27195 (DSMZ 101093). ....	125
Tabela 20. KAAS genes e enzimas envolvidas nas rotas metabólicas de degradação de xenobióticos do genoma da estirpe <i>Ochrobactrum ciceri</i> DSMZ 22292.....	128
Tabela 21. KAAS que apresenta os genes e enzimas envolvidas nas rota metabólica de degradação de xenobióticosdo genoma da estirpe <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar berliner (ATCC-10972) .....	133

Tabela 22. Resultados gerados pela ferramenta KAAS que apresenta os genes e enzimas envolvidas nas rota metabólica do genoma da estirpe <i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i> HD73 .....	135
Tabela 23. KAAS sistemas de degradação de xenobióticos da estirpe bacteriana <i>Cupriavidus pinatubonensis</i> JMP134.....	139
Tabela 24. KAAS sistemas de degradação de xenobióticos do plasmídeo da estirpe bacteriana <i>Cupriavidus pinatubonensis</i> JMP134.	146

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ATCC - *American Type Culture Collection*

2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ABHO – Associação Brasileira de Higienistas Ocupacionais

APTA- Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

Bt – *Bacillus thuringiensis*

CG –Citocina - Guanina

CL – Concentração Letal

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CNPS - Centro Nacional de Pesquisa de Solos

DL<sub>50</sub> – Dose Letal Mediana ( 50%)

DMA - Produto comercial que possui como ingrediente ativo o sal de dimetilamina do ácido 2,4-diclorofenoxiacético

DSMZ – *German Collection of Microorganisms and Cell Culture GmbH*

EUA – Estados Unidos da América

FAO- Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

GMP – *PlantsGeneticsModification*

ha – Hectares

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

IA – Ingrediente Ativo

IARC - Agência Internacional de Pesquisa em Câncer

ISSAA- *International Service For the Acquisition of Agro-Biotec Applications*

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IPC – *Insecticidal Crystal Proteins*

KDa- Unidade de Massa Atômica ou Dalton

LBSBM - Laboratório de Biotecnologia Sustentável e Bioinformática Microbiana

LD – Dose Letal

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MMA - Ministério do Meio Ambiente

NCBI - National Center for Biotechnology Information

OCDE- Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OF – Organofosforados

ONU - Organização das Nações Unidas

Pka – Constante de acidez

PIB – Produto Interno Bruto

RELARE - Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola

RNA – Ácido Ribonucléico

SNA- Sociedade Nacional de Agricultura

SRI - Secretaria de Relações Institucionais

Vca- Voltage current Alternator

VIP - *Vegetative Insecticidal Proteins*

## SUMÁRIO

### Sumário

<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	22
<b>1 Introdução</b> .....	24
1.1 Agrotóxicos.....	25
1.1.1 Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D).....	27
1.2 Contaminação do Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.....	29
1.3 Importância dos microrganismos do solo na degradação de agrotóxicos.....	32
1.3.1 Biorremediação como uma alternativa biotecnológica para descontaminação do ambiente 34	
1.3.2 Gênero <i>Bacillus</i> .....	35
1.3.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	36
1.3.4 Gênero <i>Enterobacter</i> sp. ....	42
1.3.5 Gênero <i>Ochrobactrum</i> e a relação com gênero <i>Brucella</i> .....	44
1.4 Degradação do herbicida 2,4-D.....	46
1.4.1 Análise genômica das vias metabólicas de transformação de composto aromáticos.....	47
1.4.2 Enzimas envolvidas na biodegradação de 2,4-D.....	50
1.4.3 Os genes <i>tfd</i> s e as enzimas responsáveis pela degradação do herbicida 2,4-D ..	51
1.5 Inoculantes agrícolas.....	57
1.5.1 Classificação dos inoculantes.....	60
1.5.2 Tipos de inoculantes agrícolas no Brasil.....	61
1.7 Justificativa.....	63
1.8 Objetivo geral.....	64
1.8.1 Objetivos específicos.....	64
<b>CAPÍTULO 2: MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	66
<b>2 Metodologia empregada no trabalho</b> .....	68
1ª Etapa – Otimização da produção do inoculante bacteriano.....	68
2.1 Caracterização metabólica e análise da degradação do 2,4-D pelas estirpes bacterianas 69	
2.1.1 Estirpes bacterianas empregadas nos experimentos.....	69
2.1.2 Cultivo e armazenamento dos isolados.....	71
2.1.3 Curva de crescimento e determinação de UFC das células.....	71

2.1.4	Concentração Mínima Inibitória (MIC) de 2,4-D para as estirpes <i>Enterobacter</i> sp. MG02 e <i>Ochrobactrum</i> sp. DF13.....	72
2.1.5	Screening de resistência ao 2,4-D pelas as estirpes bacterianas <i>E. hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i> , <i>O. ciceri</i> e <i>B. thuringiensis</i> oriundas da coleção DSMZ.....	74
2.1.6	Análise da degradação do herbicida 2,4-D pelas estirpes bacterianas .....	75
2.2	1ª ETAPA - Desenvolvimento do inoculante à base de estirpes bacterianas .....	77
2.2.1	Teste de antagonismo entre estirpes do mesmo inoculante.....	77
2.3	Formulação do inoculante com as estirpes bacterianas <i>Enterobacter</i> sp. MG02 e <i>B. thuringiensis</i> (ATCC 33679).....	78
2.3.1	Análise da viabilidade das células no inoculante formulado pelo período de 365 dias	80
2.4	2ª Etapa: Análise genômica <i>in silico</i> das estirpes bacterianas.....	82
2.4.1	Extração de DNA genômico ( <i>Whole Genome Sequence</i> ) .....	83
2.4.2	Extração de DNA plasmidial.....	83
2.4.3	Sequenciamento do genoma completo .....	83
2.4.4	Controle de qualidade e pré-processamento dos dados .....	83
2.4.5	Montagem dos genomas.....	84
2.4.6	Identificação filogenética .....	85
2.4.7	Anotação funcional dos genomas.....	86
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO INOCULANTE AGRÍCOLA E PRODUÇÃO DE PATENTE .....</b>		<b>88</b>
<b>3</b>	<b>Curva de crescimento e determinação de UFC das células.....</b>	<b>88</b>
3.1	Crescimento das estirpes adquiridas da DSMZ na presença de 2,4-D .....	91
3.2	Concentração mínima Inibitória.....	94
3.3	Análise da Degradação do herbicida 2,4-D pelas estirpes bacterianas por HPLC .....	95
3.4	Teste de Antagonismo.....	100
3.4.1	Viabilidade das células no inoculante formulado pelo período de 365 dias .....	101
<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS DA ANÁLISE GENÔMICA <i>in silico</i> DAS ESTIRPES BACTERIANAS <i>Enterobacter</i> sp. MG02 E <i>Ochrobactrum</i> sp. DF13 .....</b>		<b>102</b>
<b>4</b>	<b>Sequenciamento, montagem e análise genômica das estirpes <i>Enterobacter</i> sp. MG02 e <i>Ochrobactrum</i> sp. DF13 .....</b>	<b>103</b>
4.1	Extração de DNA e sequenciamento.....	103
4.2	Qualidade do sequenciamento e processamento dos dados .....	103
4.2.1	Montagem do genoma e análise de qualidade da montagem .....	104
4.3	Identificação taxonômica por genoma .....	106
4.3.1	Identificação taxonômica da estirpe <i>Enterobacter</i> sp. MG02.....	106

4.3.2	Identificação taxonômica da estirpe <i>Ochrobactrum</i> sp. DF13 .....	110
4.4	Anotação Funcional do Genoma da estirpe <i>Enterobacter</i> sp. MG02.....	113
4.5	Anotação funcional do genoma da <i>Ochrobactrum</i> sp. DF13 .....	119
4.6	Análise genômica funcional das estirpes bacterianas da coleção DSMZ.....	124
4.6.1	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i> (DSMZ 101093) .....	124
4.6.2	<i>Ochrobactrum ciceri</i> (DSMZ- 22292) .....	127
4.6.3	<i>Bacillus thuringiensis</i> (ATCC-10972) .....	131
4.6.4	<i>Cupriavidus pinatubonesis</i> JMP134 estirpe padrão de degradação do 2,4-D ...	137
<b>CAPÍTULO 5 - DISCUSSÃO</b> .....		148
<b>5</b>	<b>Histórico da pesquisa</b> .....	148
5.1	Degradação do 2,4-D pelas estirpes bacterianas .....	148
5.2	Análises taxonômica e genômica funcional .....	154
5.2.1	Taxonomia.....	154
5.2.2	Análise genômica funcional buscando as origens genéticas da atividade de degradação de 2,4-D.....	157
<b>6</b>	<b>Referências</b> .....	165
<b>ANEXO I : DEPOSITO DE PATENTE</b> .....		188
<b>ANEXO II : ARTIGOS</b> .....		189
<b>ANEXO III: CROMATOGRAMAS</b> .....		191
<b>ANEXO IV: TABELAS</b> .....		198
<b>ANEXO V: MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES</b> .....		199

# CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

## Prefácio

Esta tese relata a continuação da linha de pesquisa da dissertação de Peckle (2015), na qual foram selecionadas estirpes para produção do inoculante agrícola que degradavam o herbicida 2,4-D. Em Peckle (2015) foram selecionadas 13 cepas da coleção de Direito (2009), pertencentes ao Laboratório de Biotecnologia Sustentável e Bioinformática Microbiana (LBSBM), para verificar a capacidade de degradar o Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Neste *screening*, foram selecionadas duas estirpes bacterianas, MG02 e DF13, que apresentaram a capacidade de degradação do herbicida 2,4-D. A estirpe *Bacillus thuringiensis* (ATCC 33679), cedida pela FIOCRUZ, é caracterizada como estirpe padrão de biocontrole de pragas, além disso, foi possível analisar sua capacidade de biotransformar o 2,4-D. O presente trabalho teve como um dos objetivos otimizar a produção do inoculante desenvolvido em 2015, para que pudesse ser patenteado. Para isso foi necessário padronizar as etapas da produção; verificar o tempo de prateleira do produto, avaliando a viabilidade; e verificar a possibilidade do consórcio microbiano. Após a elaboração do inoculante, de acordo com padrões técnicos e produção do documento de patente, viu-se a necessidade de entender os mecanismos de degradação realizados pelas estirpes bacterianas, e isso foi realizado por meio do sequenciamento dos genomas das estirpes de estudo.

Durante os primeiros anos deste projeto foi uma constante preocupação realizar a pesquisa e transformar os microrganismos em um produto biotecnológico, devido às leis ambientais brasileiras, que exigiam muitos requisitos para licenciar este tipo de estudo que gera um bioproduto. A lei de Acesso ao Patrimônio Genético (lei 13.123/2015) exigia o cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), autorização no Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGen) e após, ainda iria ser objeto de verificação. Na época, o projeto não tinha essa autorização, nem sequer o cadastro e os documentos necessários para conseguir uma licença de uso dos microrganismos em parte porque a lei chegou antes do sistema SISGEN para cadastrar organismos de interesse biotecnológico. Assim como nós, inúmeros pesquisadores ficaram no limbo, por causa

desta lei. Em razão desses problemas, foi necessário achar alternativas para continuar o projeto. Para isso, foram compradas três estirpes da coleção estrangeira (DSMZ), que não estão sujeitas pela Lei 13.123/2015, sendo assim, foi possível realizar a produção do inoculante e produzir a patente com esses microrganismos estrangeiros, o que facilitou o processo burocrático brasileiro. Após realizar uma prévia identificação utilizando o gene 16S rRNA das estirpes bacterianas da coleção interna, foi decidido quais espécies bacterianas estrangeiras adquirir. Desta forma, todas as análises *in situ* de degradação do 2,4-D também foram realizadas com as estirpes da coleção externa recém-adquiridas. Portanto, durante todo o processo de material e métodos foram realizadas análises com estirpes da coleção do laboratório (DIREITO, 2009) e também da coleção externa DSMZ. Hoje, as estirpes da coleção do laboratório (DIREITO, 2009) estão registradas no SisGen, havendo a possibilidade de usar essas estirpes para a produção de um bioproduto brasileiro. Segue na tese a descrição do desenvolvimento de uma nova biotecnologia microbiana para o setor da agricultura.

## 1 Introdução

Estima-se que a população mundial encontra-se em torno de 8 bilhões de pessoas; contudo, nos próximos trinta anos, em 2050, a população mundial ultrapassará o número de 9.7 bilhões (ONU, 2019). Com esse ritmo, a perspectiva é que o número de pessoas no planeta deve chegar a aproximadamente 10.9 bilhões em 2100 (ONU, 2019). No grupo da América Latina, o Brasil é o país mais populoso, e está entre os dez países mais populosos no mundo (WORLD BANK, 2020).

No futuro, esse aumento populacional será um grande problema, devido a falta de comida para a demanda mundial, pois há vários fatores que afetam diretamente o desenvolvimento agrícola (PIACENTIN, 2016). Dentre os problemas destacam-se a diminuição das áreas novas agricultáveis, desastres naturais, falta de água potável, problemas climáticos, pragas e doenças agrícolas; isso sem considerar os problemas gerados pelo homem, como guerras e desigualdade social (PIACENTIN, 2016 *apud* FAO/ IFAD/ PAM, 2015; MAPA, 2015; FAO, FIDA, UNICEF, PMA e OMS. 2018).

O Brasil é um dos países mais populosos do mundo e pode estar suscetível aos fatores que atingem a produção agrícola. Além disso, um relatório de perspectivas agrícolas de 2015-2024, realizado pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura (FAO) e pela Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OCDE), aponta que o Brasil será o principal exportador de alimentos do mundo (OCDE/FAO, 2015). O Brasil vem cada vez mais ganhando força no cenário do agronegócio mundial, sendo um grande exportador de *commodities* agrícola; portanto, o Brasil se prepara há anos para produzir mais produtos, com boa qualidade e a baixos custos, para suprir a demanda mundial de alimentos (CARNEIRO *et al.*, 2015). Segundo o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) (2022), neste ano, teve-se um recorde na quantidade exportada de diversos produtos como, complexo soja (grão, óleo e farelo), café e complexo sucroalcooleiro. Um dos principais setores de exportação é o complexo soja, que atingiu a marca de 12,3 milhões de toneladas, arrematando o valor de US\$ 6,48 bilhões, com pico histórico no preço. Outros setores também possuem representatividade nas exportações agrícolas, como milho, café, celulose. O setor do agronegócio é importante para o PIB brasileiro, pois movimenta a economia, gerando renda e emprego. Além disso, o Brasil tem a função de fornecer alimentos para o mercado interno, bem como exportar para outros países do

mundo, sendo esta atividade de extrema relevância para a segurança alimentar mundial, uma vez que grande parte da comida do planeta vem deste tipo de produção (SOUZA JÚNIOR *et al.*, 2020).

Devido a todos esses fatores, o Brasil precisa produzir grandes quantidades de produtos agrícolas e com boa qualidade, e para isso acontecer, há a necessidade de manter as lavouras livres de pragas, doenças e plantas daninhas. Por sua vez, os agricultores recorrem à forma mais fácil, a utilização de agrotóxicos (CARNEIRO *et al.*, 2015; MMA, 2016). Hoje, dentro do agronegócio, o modelo brasileiro é de monocultura extensiva químico-dependente com a justificativa da produção em larga escala (CARNEIRO *et al.*, 2015). Uma vez que o uso do agrotóxico é grande, o Brasil já é considerado o maior consumidor de agrotóxico no mundo desde 2008 (CARNEIRO *et al.*, 2015; MMA, 2016). Dados analisados dos relatórios do IBAMA (2015 e 2020) mostraram o aumento superior a 23% da importação dos agrotóxicos durante os últimos 5 anos, com um total de 211.615,61 toneladas de ingrediente ativo (i.a) do produto técnico e 278.214,69, respectivamente. Já o total de produto formulado em 2015, ficou em 125.892,75 e, no ano de 2020 representou o valor de 185,721.01 toneladas de IA (IBAMA 2018; IBAMA 2020). Os relatórios do IBAMA são bem claros quanto ao aumento da importação desses tipos de produtos nos últimos anos, desta forma, ressalta-se a dependência do uso de agrotóxicos pela agricultura brasileira. Isso justifica o uso de tais produtos em larga escala, devido a necessidade de evitar pragas, doenças e plantas daninhas, melhorando assim, a colheita e tendo uma segurança alimentar de consumo interno e externo.

Os agrotóxicos possuem relevância para o desenvolvimento da agricultura mundial, entretanto, somente uma pequena quantidade, cerca de 1 % chega ao seu alvo, o que nos faz pensar sobre o caminho dos pesticidas no meio ambiente e quais são os principais problemas que isso pode causar ao meio ambiente e ao ser humano (SARKER *et al.*, 2021).

## **1.1 Agrotóxicos**

Há anos o homem utiliza compostos químicos na tentativa de livrar-se das pragas e doenças agrícolas. Por meio de experimentos de tentativa e erro foram descobertos vários compostos com ação de impedir a destruição das lavouras. Entretanto, por falta

de conhecimento, o homem utilizou diversos compostos tóxicos como, o mercúrio, arsênio e enxofre até o início da década de 1950 (JARDIM *et al.*, 2009; BRAIBANTE & ZAPPE, 2012). Com a busca por novos meios de controle de pragas e doenças agrícolas, começaram a utilizar: ervas, óleos e cinzas para o tratamento de sementes e grãos armazenados (BRAIBANTE & ZAPPE, 2012). No século XIX, começaram os primeiros estudos sistemáticos sobre o uso dos compostos químicos, hoje mais conhecidos como agrotóxicos (BRAIBANTE & ZAPPE, 2012).

Segundo a lei Federal nº 7.802 de 11/07/89, regulamentada pelo Decreto 98.816, no seu Artigo 2º, Inciso I, define o termo *agrotóxicos* da seguinte forma:

*"Os produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores do crescimento."*

Com base nesta definição, os agrotóxicos possuem a finalidade de prevenir, destruir, repelir ou inibir pragas (carrapatos, insetos e outros), doenças (por fungos, bactérias, vírus) e plantas daninhas (ALMEIDA *et al.*, 1985; SILVA & COSTA, 2012; MAPA, 2015). É necessário saber o princípio ativo de cada agrotóxico para entender melhor o seu grupo químico e conseqüentemente a sua ação. Os produtos comerciais possuem normalmente um ingrediente ativo, que é o item principal para a formulação do produto final (TERRA & PELAEZ, 2009). Porém, é possível encontrar mais de um ingrediente ativo em um produto comercial (TERRA & PELAEZ, 2009). O produto comercial nada mais é que o/os ingredientes ativos, junto com outros compostos, químicos auxiliares, que ao final serão aplicados nas culturas (TERRA & PELAEZ, 2009).

Em relação à classificação dos agrotóxicos, quanto à finalidade deles, podem-se destacar os principais grupos: Bactericidas, que destinam-se ao controle de doenças causadas por bactérias; Nematicidas, que são destinados ao controle de nematoides; Fungicidas, que são usados no controle de doenças causadas por fungos; Inseticidas, que são destinados ao controle de insetos; Acaricidas, são os defensivos destinados ao

controle de ácaros e Herbicidas, que são os defensivos destinados ao controle de ervas daninhas. Segundo o IBAMA (2020), a classe de agrotóxico mais vendido no Brasil é a de herbicidas. Dentre os ingredientes ativos mais comercializados destaca-se o Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), sendo o segundo herbicida mais utilizado no país, atrás somente do glifosato (IBAMA, 2020). Na tabela 1 é possível verificar que os dois primeiros ingredientes ativos mais vendidos no Brasil são os da classe dos herbicidas.

**Tabela 1.** Os 10 ingredientes ativos mais vendidos no Brasil em 2020 (IBAMA, 2020)

Unidade de medida: toneladas de ingrediente ativo		
Glifosato e seus sais	246,017.51	1°
2,4-D	57,597.57	2°
Mancozebe	50,526.87	3°
Atrazina	33,321.11	4°
Acefato	29,982.50	5°
Clorotalonil	24,191.03	6°
Malationa	15,702.11	7°
Enxofre	11,390.90	8°
Imidacloprido	9,401.65	9°
Clorpirifós	8,864.88	10°

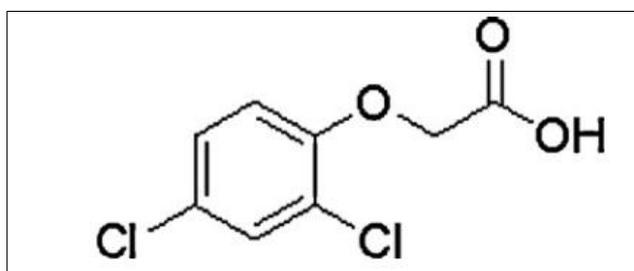
### 1.1.1 Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)

O 2,4-D é um herbicida seletivo, muito utilizado para aplicação na pré e pós-emergência de ervas daninhas de folhas largas (eudicotiledôneas) (ZUANAZZI *et al.*, 2020). Ele foi desenvolvido ainda na década de 1940 (SZÉKÁCS, 2021). O 2,4-D foi o componente principal (cerca de 50%) do agente laranja, produto utilizado extensivamente na guerra do Vietnã como desfoliante (STELLMAN *et al.*, 2003; MACEDO NETO, FROEHNER & MACHADO, 2012). Devido à ação do agente laranja sobre a saúde do povo do Vietnã, o 2,4-D passou a ser muito estudado. Após a guerra, o estudo de 2,4-D com o Dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) formaram uma base de uma nova área científica, hoje reconhecido como ecotoxicologia (OLSON & MORTON, 2019).

O 2,4-D é considerado uma auxina sintética, uma vez que seu efeito em plantas, em baixas concentrações, é análogo ao ácido indol-3-acético (AIA), sendo a primeira auxina sintética a ser utilizada na agricultura (RODRÍGUEZ-SERRANO, 2014). O

sucesso e aceitação do 2,4-D deve-se a diferentes ações sobre a planta, como um estimulador de crescimento da planta, ou como herbicida, já que em concentrações mais altas promove danos letais à planta (RODRÍGUEZ-SERRANO, 2014; dos SANTOS *et al.*, 2022). Nas eudicotiledôneas, o 2,4-D, se acumula nas regiões de crescimento, onde induz a proliferação desordenada do tecido vegetal conseqüentemente, os tecidos entram em colapso e morrem, podendo levar à morte da planta (PAZMIÑO *et al.*, 2014; RODRÍGUEZ-SERRANO, 2014). Este herbicida pode causar outros danos como epinastia (curvatura da folha para baixo), curvatura do caule, engrossamento das raízes, rachaduras nos caules e raízes, formação de gemas múltiplas, hipertrofia das raízes laterais, senescência, inibição do crescimento das raízes e da parte aérea (PAZMIÑO *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2015; dos SANTOS *et al.*, 2022).

O 2,4-D (figura 1) pertence ao grupo fenoxiacético, da família do organoclorados, e pode ser encontrado como ésteres, aminas, sais e ácidos; variando assim em solubilidade e volatilidade (JERVAI *et al.*, 2008; BALDISSARELLI, 2017; MAGNOLI *et al.*, 2020). Além disso, tais propriedades químicas influenciam no seu comportamento no meio ambiental (JERVAI *et al.*, 2008). O 2,4-D na forma de sal de dimetilamina, é o ingrediente ativo do produto DMA<sup>®</sup> (nome comercial da marca Agro Dow AgroSciences), e o 2-etil-hexil éster é encontrado em vários produtos comerciais, como por exemplo o produto PrimmaDin da marca Cheminova Agro. Ambos os produtos são os tipos mais vendidos como herbicida à base 2,4-D em todo o mundo (JERVAI *et al.*, 2008; MAGNOLI *et al.*, 2020). O 2,4-D em forma de ácido, apresenta baixa solubilidade, entretanto, na formulação para uso como herbicida tem a solubilidade aumentada, devido ao uso de um de seus derivados (JERVAI *et al.*, 2008; MAGNOLI *et al.*, 2020).



**Figura 1.** Fórmula estrutural plana do herbicida 2,4-D em forma de ácido (NJOKU & HAMMED, 2011).

## 1.2 Contaminação do Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

Sabe-se que o 2,4-D é moderadamente persistente e sua meia vida no ambiente, fica em torno de 20 a 312 dias dependendo das condições ambientais. O 2,4-D persiste por menos tempo em água (ISLAM *et al.*, 2018). Ou seja, possui uma meia vida rápida, porém a utilização da forma incorreta e indiscriminada faz com que pensemos em duas problemáticas: I. O excesso de 2,4-D naquela mesma área, devido ao pesticida que permanecem na área de aplicação tornando-se pesticidas residuais, sem que haja tempo para ação biótica e abiótica agirem sobre este composto. II. Cerca de 99,9% do composto é carregado para outras áreas que não seja seu alvo, causando danos à fauna e flora que estão externas à área que deveria ser tratada (SARKER *et al.*, 2021). Através de diversas formas, os agrotóxicos podem alcançar os solos, chegando até mesmo nos recursos hídricos, visto que a absorção dos compostos químicos pelas plantas, em geral, é bem pequena (OECD, 2016, SARKER *et al.*, 2021). Por meio da pulverização aérea, com o auxílio dos ventos, o agrotóxico pode entrar em contato com os rios e lagos (BARIZON, 2004; OECD, 2016). Existem outras formas dos agrotóxicos se dissiparem, como, pela volatilização, que ocorre quando a partícula em forma de vapor se perde para atmosfera (ARAÚJO *et al.*, 2019). Pelo processo de sorção, também conhecido como processo de retenção, refere-se à habilidade do solo reter um substrato, neste caso, o agrotóxico não se locomove pela matriz do solo (LIMA *et al.*, 2020). Por meio do escoamento superficial ocorre o transporte destas substâncias para as águas (ARAÚJO *et al.*, 2019). Também pode ocorrer pela lixiviação, onde o agrotóxico é transportado ao longo do solo, chegando aos lençóis freáticos, esse processo de transporte se intensifica com a ajuda da água da chuva (ARAÚJO *et al.*, 2019).

A toxicidade do 2,4-D pode afetar não somente o meio ambiente em que ele está sendo lançado, mas também pode causar danos aos indivíduos, população e comunidade de organismos que não são alvos diretos deste produto. Devido a sua persistência no meio ambiente e acúmulo ao longo da cadeia alimentar, é necessário estudar a toxicidade do 2,4-D nos organismos que não são alvos (de CASTRO MARCATO *et al.*, 2017).

Em relação aos seres humanos, à exposição ao 2,4-D pode ocorrer de diversas formas, por exemplo, pela ingestão (direta ou indireta), inalação ou absorção dérmica, sendo esta última a principal via de contaminação para trabalhadores que utilizam o 2,4-D (MORGAN *et al.*, 2008; IARC, 2018; ISLAM *et al.*, 2018). Além do mais, há relatos

de consumo do 2,4-D por crianças por meio do leite materno ou através da placenta (FRIEDRICH, 2014). A principal via para expelir o 2,4-D do corpo humano é através das vias urinárias (ISLAM *et al.*, 2018). Diversos estudos mostraram a exposição do 2,4-D em humanos por meio da análise realizada na urina, sendo uma forma de monitorar a presença do 2,4-D no corpo humano. O biomonitoramento por biomarcadores é visto em vários trabalhos encontrados na literatura (ZHANG *et al.*, 2011; IARC, 2018).

O 2,4-D foi classificado pela ANVISA como classe I, extremamente tóxico, já no relatório publicado pela IARC (2018)- *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, No. 113, classificou o 2,4-D como possivelmente carcinogênico para seres humanos e o colocou no grupo 2B (BRASIL, 2022). Já no Brasil, o relatório feito pelo Núcleo de Estudos Agrários e Desenvolvimento Rural – NEAD (2014) apontou que o 2,4-D representa um perigo para a saúde humana. O relatório aponta alguns problemas que o herbicida pode causar, por exemplo: desregulação endócrina, perturbações nas funções reprodutivas, alterações genéticas (efeito genotóxico), efeitos cancerígenos e o desenvolvimento da doença neurodegenerativa de Parkinson. Este relatório foi emitido a pedido do Ministério Público, devido a implementação das novas sementes de soja e de milho geneticamente modificadas para apresentarem tolerância ao 2,4-D. Houve uma grande necessidade de reavaliar a toxicidade dos agrotóxicos à base de 2,4-D, antes de fazer a deliberação comercial das sementes, visto que o uso destas plantas iria induzir o aumento no uso deste herbicida, sendo assim, o excesso deste produto poderia, conseqüentemente, causar maiores danos ao meio ambiente e ao homem.

Os sintomas da exposição oral aguda de 2,4-D, ou seja, quando o indivíduo entra em contato com quantidades elevadas, incluem: vômitos, diarreia, dor de cabeça, confusão mental, agressividade ou comportamento atípico (COSTA, 2012; FRIEDRICH, 2014; PAN, 2017). O sintoma mais comum após a exposição dérmica é a irritação da pele. A exposição por inalação, pode causar tosse e sensação de queimação no trato respiratório superior (COSTA, 2012). Os efeitos crônicos ocorrem devido a exposição contínua, geralmente de doses menores que podem vir a se manifestar após semanas, meses ou até mesmo anos (FRIEDRICH, 2014).

Em um estudo, relacionado à contaminação do 2,4-D com trabalhadores da área de produção que utilizam este composto, foram avaliadas 41 pessoas por meio de

biomarcadores urinários, no qual se pode observar que estas pessoas apresentaram concentrações entre 35-12963  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de 2,4-D (IARC, 2018). Em outro estudo, foi analisada a exposição de uma equipe de pulverizadores manuais que aplicavam 2,4-D em um projeto de reflorestamento. A cada 24 horas, durante 6 dias, foram coletadas amostras de urinas de cinco pessoas do grupo A (não usavam roupas de proteção), três pessoas do grupo B (usavam roupas de proteção), e um misturador / carregador e um supervisor. Os resultados mostraram que o grupo A excretou uma média de  $951 \pm 1,089 \mu\text{g}$  (i.a.), o grupo B excretou uma média de  $768 \pm 438 \mu\text{g}$  (i.a.), o misturador apresentou  $217 \mu\text{g.kg}^{-1}$  por dia  $\pm 103 \mu\text{g.kg}^{-1}$  e o supervisor  $257 \pm 117 \mu\text{g/dia}$  de 2,4-D. Este resultado mostra que as pessoas que tiveram menos contato com 2,4-D apresentaram níveis mais baixos de 2,4-D no biomonitoramento, como ocorreu com o supervisor e com o misturador (ZHANG *et al.*, 2011). Em outro estudo realizado por MORGAN e colaboradores (2008), analisaram adultos e crianças expostas ao 2,4-D por diversas vias, após usarem o herbicida em suas casas. Foram analisadas amostras de urina de 66 crianças da Carolina do Norte e 69 de Ohio, nos Estados Unidos da América, com idade pré-escolar (2-5 anos), e seus respectivos responsáveis. Os resultados mostraram que a concentração de 2,4-D na urina das crianças de Ohio apresentou um valor duas vezes maior que o valor das crianças da Carolina do Norte (1,2 vs 0,5  $\text{ng.mL}^{-1}$ ). Já os adultos apresentaram uma concentração média idêntica em ambos os lugares, valor de 0,7  $\text{ng.mL}^{-1}$ . O estudo conclui que os participantes foram expostos ao 2,4-D através de várias fontes, e as crianças de Ohio podem ter sido expostas por processos de contaminação dérmicos e não-alimentares (MORGAN *et al.*, 2008).

Estudos mostram evidências que o 2,4-D pode causar imunossupressão, e que está fortemente associado ao desenvolvimento de “Non-Hodgkin Lymphoma” (NHL), assim como é um potencial causador de câncer de bexiga (KOUTROS *et al.*, 2016; SMITH *et al.*, 2017). Em trabalhos de meta-análise com evidências epidemiológicas à exposição de 2,4-D, mostraram associação com: NHL, câncer gástrico e de próstata (GOODMAN *et al.*, 2015). Contudo, os autores dos estudos argumentaram que por mais que existam evidências epidemiológicas de 2,4-D com estes tipos de câncer, ainda não é possível afirmar que as doenças oncológicas são oriundas da contaminação pelo herbicida (GOODMAN *et al.*, 2015; KOUTROS *et al.*, 2016; SMITH *et al.*, 2017; ISLAM *et al.*, 2017).

Devido aos problemas que o 2,4-D e outros compostos químicos podem causar à fauna e à flora, é necessário estudar suas vias de dissipação no meio ambiente. Conforme já sabemos, grande parte deste herbicida, assim como os outros agrotóxicos, entram em contato com o solo. No solo há inúmeros fatores envolvidos na degradação destes compostos (GOODMAN *et al.*, 2015). Dentre estes fatores destacam-se os microrganismos do solo.

### **1.3 Importância dos microrganismos do solo na degradação de agrotóxicos**

Uma vez entendendo o caminho que o agrotóxico passa no ambiente, é possível estudar formas de minimizar/diminuir essa dispersão, visto que são produtos xenobióticos, ou seja, compostos químicos estranhos aos organismos ou a um sistema biológicos, que podem vir a apresentar danos ao meio ambiente (WANG *et al.*, 2020). Grande parte dos agrotóxicos são depositados nos solos e, nestes locais, essas substâncias passam por inúmeras transformações, com auxílio dos fatores abióticos e bióticos (WANG *et al.*, 2020). Os fatores abióticos como incidência de luz solar, pH do solo, temperatura, condutividade e matéria orgânica são alguns dos elementos que influenciam direta e indiretamente na degradação dos compostos no solo (WANG *et al.*, 2020). Já como exemplo de fatores bióticos, podemos citar as plantas e os microrganismos presentes no solo. Um dos principais responsáveis pelos processos biológicos são os microrganismos que habitam esta região, que por sua vez, ficam concentrados na parte superficial, onde a profundidade pode chegar a 120 cm e ocupam uma fração <0,5% do volume total do solo (SAHU *et al.*, 2017). Os diversos microrganismos do solo coexistem em equilíbrio ecológico, e desempenham função essencial para o ecossistema. São agentes reguladores de decomposição da matéria orgânica; ajudam na ciclagem e fluxo de nutrientes como: nitrogênio, fósforo e enxofre, que são extremamente preciosos para a fertilidade dos solos; E conseqüentemente, auxiliam no funcionamento do sistema solo-planta, propiciando o desenvolvimento dos vegetais. (SAHU *et al.*, 2017; LEAL *et al.*, 2021).

Quando as substâncias entram em contato com os microrganismos, os mesmos podem assimilar os substratos, utilizando seus processos metabólicos/enzimáticos, ou seja, esses agentes estão diretamente associados à transformação e degradação de resíduos e compostos orgânicos sintéticos (JOUTEY *et al.*, 2013; SAHU *et al.*, 2017). Os processos metabólitos se dividem em metabolismo (biotransformação e

mineralização) e co-metabolismo (DELLA-FLORA *et al.*, 2020). No metabolismo microbiano as moléculas dos compostos xenobióticos podem ser transformadas em outras moléculas, tanto mais tóxicas quanto menos tóxicas, sendo tal processo chamado de biotransformação (RODRIGUES *et al.*, 2010; DELLA-FLORA *et al.*, 2020). Contudo, quando a molécula é quebrada em pequenas moléculas, ela pode ser degradada completamente em formas inorgânicas presentes na natureza, como H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, Cl<sup>-</sup> e outros, este processo é chamado de mineralização (JOUTEY *et al.*, 2013; AGUIAR & MACHADO, 2022; DELLA-FLORA *et al.*, 2020). Ambos os processos metabólicos geram energia para os microrganismos (DELLA-FLORA *et al.*, 2020). O outro processo, co-metabolismo, ocorre quando um composto é parcialmente degradado pela ação de uma ou mais enzimas de uma rota catabólica, e o mesmo não é aproveitado como fonte de energia pelo microrganismo; sendo necessário outro composto para ser utilizado como fonte de energia para que o microrganismo degrade o composto desejado (PRATA & LAVORENTI, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2010; AGUIAR & MACHADO, 2022; DELLA-FLORA *et al.*, 2020). Dentre os microrganismos, fungos e bactérias se destacam na degradação dos agrotóxicos (SAHU *et al.*, 2017). Os microrganismos possuem uma capacidade natural de degradar, transformar ou acumular uma enorme gama de compostos (JOUTEY *et al.*, 2013; DIREITO *et al.*, 2015). Hoje é possível encontrar na literatura inúmeros trabalhos com diferentes gêneros bacterianos capazes de degradar certos agrotóxicos: *Achromobacter* sp. que degrada o clorpirifós (AKBAR & SULTAN, 2016), o Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCP) (XIA *et al.*, 2017); *Arthrobacter* sp. que degrada o carbaril (HAYATSU *et al.*, 1999); *Bacillus* sp. degradando o 2,4-D (PECKLE, 2015), o 2,4-diclorofenol (FELSHIA *et al.*, 2018); o endosulfan (CASANOVA *et al.*, 2021); o fipronil, imidaclopride e o sulfossulfuron (GANGOLA *et al.*, 2022); a *Burkholderia* sp. que é capaz de degradar o metil paration (ORTIZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2021); *Pseudomonas* sp. degradando o clorpirifós (GONG *et al.*, 2018; ASWATHI *et al.*, 2019), paration, fenpropatrina, cipermetrina, carbofurano e o carbaril (GONG *et al.*, 2018); *Enterobacter* sp. capaz de degradar o carbofurano (EKRAM *et al.*, 2020), o endosulfan (CASANOVA *et al.*, 2021) e o DDT (SUMAN & TANUJA, 2021); *Ochrobactrum* sp. degradando o DDT (PAN *et al.*, 2017) e o lindano-hexaclorocicloexano (SAHOO & CHAUDHURI, 2019). Além desses, também inclui-se a bactéria, formalmente classificada como, *Cupriavidus pinatubonensis* (conhecida também como: *Cupriavidus necator* JMP134, *Ralstonia*

*eutropha* JMP134, *Alcaligenes eutrophus* ou *Waustersia eutropha*) que é capaz de degradar o 2,4-D (FÜCHSLIN *et al.*, 2003; VIANEZ JÚNIOR, 2007; NICOLAISEN *et al.*, 2008 DIREITO, 2009; PECKLE, 2012; WU *et al.*, 2017; NGUYEN *et al.*, 2019).

Dos microrganismos mencionados, a bactéria *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 é conhecida como estirpe padrão de degradação do 2,4-D. Após a descoberta da sua capacidade, foi possível identificar o gene plasmidial responsável pela degradação, chamado de *tfdA*, presente na estirpe *Alcaligenes eutrophus* pJP4, depois nomeada como *Cupriavidus necator*. A partir disso, foi possível formular a primeira rota de degradação do 2,4-D (DON AND PEMBERTON, 1981; YOU AND GHOSAL, 1995, LEVEAU *et al.*, 1999, LAEMMLI *et al.*, 2000; QUEIROZ & VIDAL, 2014; CARLES *et al.*, 2021).

Os estudos com bioprospecção de microrganismos do solo visando encontrar organismos capazes de degradar 2,4-D, em geral, tem como objetivo encontrar formas/ alternativas viáveis para diminuir e/ou acabar com compostos tóxicos presentes no meio ambiente. Principalmente com a finalidade de descontaminação dos solos, e como consequência, tentar minimizar a contaminação dos lençóis freáticos. A intenção de usar microrganismos oriundos dos solos, como agentes ativos na descontaminação deste mesmo ambiente, não é recente, tal processo se chama biorremediação (MATĚJŮ, 2000; YENN, 2015; SHARMA *et al.*, 2021). Na década de 1960, o processo de biorremediação foi reportado pela primeira vez por George M. Robinson, por meio do experimento em que utilizava frascos de vidro sujo com óleo e microrganismos dentro (YENN, 2015). No ano de 1972, foi utilizada a biorremediação na forma comercial para remediar vazamentos de óleo em poços de petróleo em Ambler, na Pensilvânia e, a partir deste ponto, a técnica se tornou uma forma de descontaminar áreas (YENN, 2015).

### **1.3.1 Biorremediação como uma alternativa biotecnológica para descontaminação do ambiente**

Conforme já se sabe, a degradação de compostos por microrganismos é um processo natural, enquanto que a aplicação de microrganismos para a biorremediação destes compostos é uma biotecnologia. A biorremediação tem como objetivo eliminar e/ou diminuir as substâncias poluentes e xenobióticas de certas áreas contaminadas,

podendo ser do ambiente aquático em rios ou mar, como também do solo. Para esse processo pode-se utilizar diversos microrganismos, plantas ou até seus derivados, como ator principal na remediação (KARIMI *et al.*, 2022; PATEL *et al.*, 2022).

As técnicas de biorremediação precisam ser bem estudadas, para isso, os microrganismos utilizados devem ser eficientes na degradação dos compostos. Então, é necessário certificar-se de que estes possuem a capacidade de biotransformar o composto tóxico em outro menos tóxico; ou em um resíduo aceitável; ou, sendo o ideal, metabolizar toda a substância em H<sub>2</sub>O e CO<sub>2</sub> (De ARAÚJO & ORLANDA, 2014; PATEL *et al.*, 2022). O sucesso da técnica depende de variáveis, tais como: estado fisiológico dos microrganismos, sobrevivência e proliferação dos microrganismos no sítio contaminado, disponibilidade dos compostos/metabólitos para o microrganismo e também continuidade populacional deste microrganismo (CARLES *et al.*, 2021). Além disso, é necessária a criação de micro-habitat para os microrganismos desejáveis, buscando controlar a temperatura em uma faixa adequada, ajustar o pH para o ideal dos microrganismos, bem como fornecer água em quantidade suficiente. É difícil manter estes fatores da forma desejável em campo, visto que são muitos fatores independentes que não podem ser totalmente controlados (SINGH, 2008; GARIMA & SINGH, 2014; CARLES *et al.*, 2021), diferente dos experimentos realizados no laboratório e no micro-habitat ideal que são mais fáceis de serem controlados. Dessa maneira, para este projeto, buscamos trabalhar com o gênero bacteriano *Bacillus*, que é conhecido por ser um microrganismo fácil de explorar, exerce diversas atividades biotecnológicas, incluindo a biodegradação de compostos xenobióticos (CHEN *et al.*, 2012; MARYAM *et al.*, 2014).

### 1.3.2 Gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* é representado por bactérias com forma de bastonetes, Gram-positivas, formadoras de esporos, podendo ser aeróbicas ou anaeróbicas facultativas (LORENTZ, 2005; SILVEIRA, 2008; DIREITO, 2009; AMIN *et al.*, 2015). São microrganismos cosmopolitas, podendo ser encontrados em águas, solos, rizosferas e sistemas agrícolas (LORENTZ, 2005; SILVEIRA, 2008). As bactérias deste gênero são conhecidas por terem a capacidade de secretar enzimas extracelulares, compostos antibióticos, polissacarídeos, aminoácidos e metabólitos secundários. Por possuir tais características, são alvo de estudos para diversas finalidades, por exemplo: são capazes

de produzir antibióticos, melhoram a produção de alimentos, conseguem degradar compostos tóxicos, fazem o biocontrole de pragas e etc. (LORENTZ, 2005; SILVEIRA, 2008; ARAÚJO & PEDROSO, 2013; AMIN *et al.*, 2015). Dentro do gênero *Bacillus* podemos destacar o *Bacillus thuringiensis* (Bt), que é uma espécie muito estudada e utilizada em processos biotecnológicos. São utilizadas no desenvolvimento agrícola, para construção de plantas geneticamente modificadas e pela sua ação de biocontrole de pragas agrícolas (SILVA, 2013b; PALMA *et al.*, 2014; THARAD *et al.*, 2016).

Por meio de trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa (DIREITO, 2009), obteve-se uma coleção de bactérias degradadoras de 2,4-D. Dentre elas, estão bactérias do gênero *Bacillus* sp. Desta forma, tanto na literatura, quanto dentro do nosso grupo de pesquisa, há trabalhos demonstrando o uso de bactérias do gênero *Bacillus* como ferramentas biotecnológicas. Podendo ser utilizadas para resolver problemas de poluição ambiental e promoção de crescimento vegetal, assim, beneficiando a agricultura.

### 1.3.3 *Bacillus thuringiensis*

A espécie bacteriana *B. thuringiensis* pode ser encontrada facilmente no solo, entretanto, é possível encontrá-la em água, superfície de planta, insetos mortos, grãos. (NAIR *et al.*, 2018). Foi descrita pela primeira vez em 1901, como “*Bacillus sotto*”, após ser isolada de uma larva de *Bombyx mori*, mais conhecida como bicho da seda, pelo cientista japonês Shigetane Ishiwata (IBRAHIM *et al.*, 2010; SANAHUJA *et al.*, 2011; KOCH *et al.*, 2015). Este *Bacillus* também foi descrito por Berliner, em 1915, na província de Thuringia na Alemanha e foi dado o nome de *B. thuringiensis* Berliner, devido ao local onde foi encontrado e a pessoa que o identificou (MILNER, 1994).

O *B. thuringiensis* (Bt) é conhecido mundialmente por sua ação de biocontrole de insetos, que são pragas agrícolas (ARAÚJO & PEDROSO, 2013; NAIR *et al.*, 2018). Segundo o MAPA- Agrofit, existe no mercado vinte e cinco produtos/formulações comerciais à base de Bt, que atuam no controle de pragas agrícolas, são eles: Able, Agree, Bac-Control Max EC, Bac-Control WP e Bac-Control Max WP, BTControl, BT-Turbo Max, Costar, Crystal, Dipel, Dipel ES-NT, Dipel WG, Dipel WP, Helymax EC, Helymax WP, Javelin WG, Ponto Final, Stregga EC, Super-Bt, Tarik EC, Tarik WP, Thuricide, Thuricide SC, Winner Max EC e Xentari (EMBRAPA, 2020). Além da sua

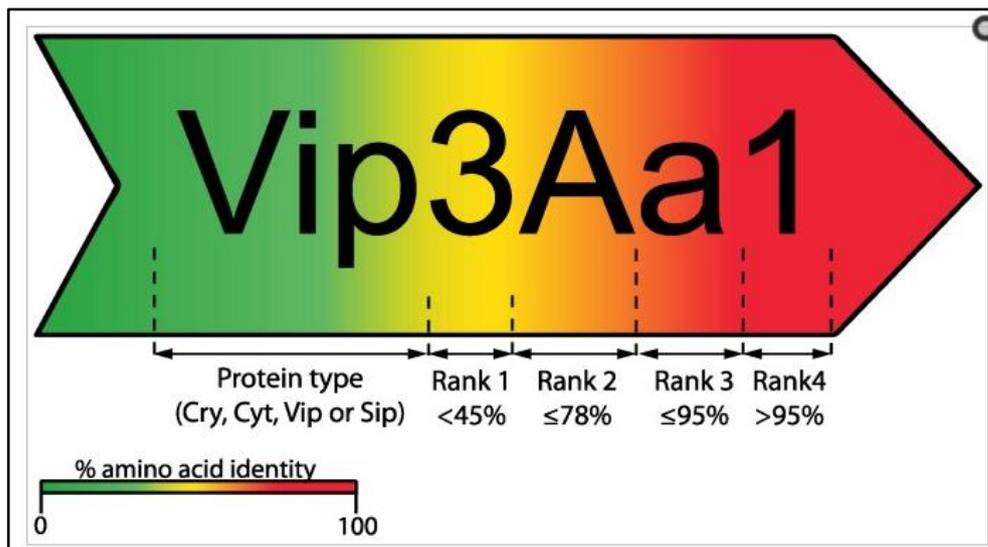
ação biopesticida, o Bt é uma bactéria que pode ser endofítica, ou seja, capazes de colonizar o interior dos tecidos vegetais, sem causar danos à planta hospedeira e sem formar estruturas externas visíveis (COSTA & QUEIROZ, 2014; JEONG *et al.*, 2016). Na literatura é possível encontrar diversas subespécies de Bt, isso porque este microrganismo passou por diversos critérios de classificação taxonômica. Como por exemplo: sorotipagem, susceptibilidade fágica e perfil de plasmídeo, resultando na classificação de, aproximadamente, 100 subespécies (SANAHUJA *et al.*, 2011).

Em relação à produção de substâncias tóxicas, que fazem o controle de insetos, há uma classificação à nível de subespécie de Bt. Podendo correlacionar a subespécie de Bt e o inseto alvo. Entretanto, essa correlação não se aplica à nível de gênero e espécie, porque a maioria das estirpes de Bt podem sintetizar mais do que uma toxina (SANAHUJA *et al.*, 2011). Um exemplo é a bactéria *B. thuringiensis* sorovar *kurstaki* (Btk), que é específica para o controle dos insetos lepidópteros (borboletas e mariposas), enquanto que as estirpes *Bt. israelensis* são específicas para o controle das dípteras (moscas) e as estirpes de *Bt. morrisoni* são específicas para o controle de coleópteros (besouros) (SANAHUJA *et al.*, 2011; EMBRAPA, 2020). Outras estirpes não são ativas contra insetos, mas são tóxicas para diferentes invertebrados (SANAHUJA *et al.*, 2011). Por exemplo, as estirpes Bt contendo apenas toxinas do tipo Cry5 e Cry6, que são ativas contra os nematóides (SANAHUJA *et al.*, 2011). Ao invés de classificar em nível de gênero e espécie, é mais útil classificar as estirpes Bt de acordo com a funcionalidade baseada nas proteínas/toxinas que produzem (SANAHUJA *et al.*, 2011).

O *B. thuringiensis* produz proteínas entomopatogênicas, como as: fosfolipases,  $\alpha$ -exotoxinas, exotoxinas, quitinases, proteases,  $\beta$ -exotoxinas, enterotoxinas, hemolisinas e, as mais conhecidas, proteínas VIPs, Cyt e Cry (HÖFTE & WHITELEY, 1989; AGUIAR, 2007; PINTO *et al.*, 2009; PALMA *et al.*, 2014). As estirpes de Bt sintetizam as proteínas inseticidas de duas famílias delta-endotoxinas, cristal (Cry) e a citinolítica (Cyt), durante a fase de esporulação (PALMA *et al.*, 2014; THARAD *et al.*, 2016; JIN *et al.*, 2020). O gene *cry*, um dos mais estudados no Bt, é o responsável por sintetizar a proteína Cry (CRICKMORE *et al.*, 2011; PALMA *et al.*, 2014; LACEY *et al.*, 2015). Nas últimas décadas, foram encontradas mais de 700 sequências de gene *cry* e, por causa disso, teve-se a necessidade de se organizar o sistema de nomenclatura, surgindo o comitê de nomenclatura de toxinas de *B. thuringiensis*, sendo aplicado para

endotoxinas  $\delta$  (Cry e Cyt) e às toxinas Bt segregáveis (Vip e Sip) (CRICKMORE *et al.*, 2011; PALMA *et al.*, 2014).

Para a nomenclatura, as novas toxinas recebem quatro algarismos dependendo do grau de identidade dos aminoácidos, comparados aos das toxinas designadas anteriormente (CRICKMORE *et al.*, 2011; PALMA *et al.*, 2014). Os números arábicos são utilizados na primeira e quarta fileira, enquanto que as letras minúsculas e maiúsculas são inseridas para as segundas e terceiras fileiras, como pode ser visto na Figura 2 (PALMA *et al.*, 2014). Assim, as proteínas que apresentarem menos de 5% de identidade em pares, são inseridas em classificações diferentes, inserindo somente um número árabe (Ex.: Vip1 e Vip2) (CRICKMORE *et al.*, 2011; PALMA *et al.*, 2014). Duas proteínas que compartilham entre de 6-78% de identidade são classificadas diferentemente, onde se insere uma letra maiúscula (Ex.: Vip1A e Vip1C) (CRICKMORE *et al.*, 2011; PALMA *et al.*, 2014). Já as proteínas que compartilham menos de 95% de identidade em pares, são atribuídas uma classificação terciária, inserindo-se uma letra minúscula (Ex.: Vip3Aa e Vip3Ab) (PALMA *et al.*, 2014). E por fim, as proteínas que compartilharem mais de 95% de identidade entre pares, é feita a classificação quaternária, onde se adiciona mais um número árabe (Ex.: Vip3Aa1 e Vip3Ab2) (CRICKMORE *et al.*, 2011; PALMA *et al.*, 2014).

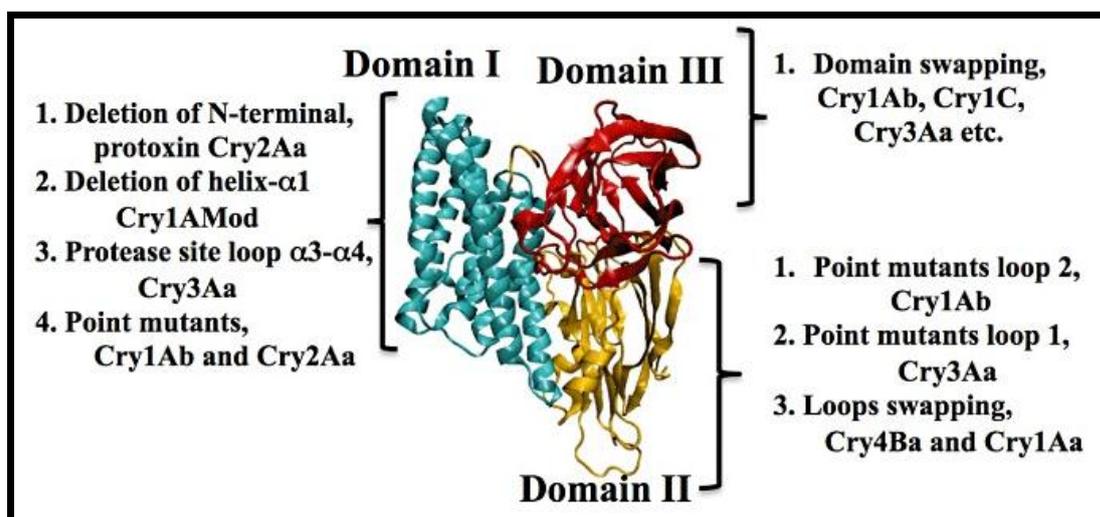


**Figura 2.** Visualização sistemática do sistema atual de nomenclatura elaborado pelo comitê de nomenclatura de toxinas de *Bacillus thuringiensis* (PALMA *et al.*, 2014)

Segundo Bravo e colaboradores (2005), ao analisar a árvore filogenética das sequências da proteína Cry, observaram que, todas essas proteínas Cry de toxina, pertencem a quatro famílias protéicas, que não são relacionadas filogeneticamente (Cry, Mtx, Bin e Cyt). Sendo a família Cry de domínio (3D), a família Cry mosquitocida (Mtx), família binário (Bin) e a família de toxinas Cyt (BRAVO *et al.*, 2005; BRAVO *et al.*, 2011; BRAVO *et al.*, 2013; PARDO-LÓPES *et al.*, 2013). O grupo 3D é o maior em toxinas Cry, obtendo mais de 50 grupos Cry diferentes, sendo as estruturas tridimensionais das toxinas Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry4Aa, Cry4Ba e Cry8Ea estudadas e caracterizadas (BRAVO *et al.*, 2013). Tais estruturas apresentaram dobras semelhantes, compostas por três domínios (Figura 3), apesar dessas proteínas compartilharem menos de 20% de identidade nas sequências de aminoácidos (BRAVO *et al.*, 2011; BRAVO *et al.*, 2013). Portanto, as proteínas Cry podem ser subdivididas em grupos de acordo com sua homologia e estrutura molecular (BRAVO *et al.*, 2013).

Em relação à análise filogenética da família Cry do domínio 3D, há uma variabilidade na atividade biocida, ainda que pertençam ao mesmo grupo. Esta informação nos mostra uma evolução independente dos três domínios estruturais da proteína, podendo ser observado na figura 3 (BRAVO *et al.*, 2013). Desta forma, qualquer mudança/troca no domínio III, faz gerar diferentes toxinas. O processo de

mudança do domínio III gera proteínas com modo de ação semelhante, entretanto, com especificidades diferentes (BRAVO *et al.*, 2013). De Maagd e seus colaboradores (2000) construíram uma proteína com domínios I e II a partir da toxina Cry1Ab e do domínio III de Cry1C, resultando uma proteína híbrida. Os resultados mostraram que a toxina formada apresentou seis vezes mais toxicidade contra a lagarta de beterraba *Spodoptera exigua*, quando comparada com a toxina natural Cry1C (de MAAGD *et al.*, 2000). Em outro estudo, Naimov e colaboradores (2001) mostraram uma melhoria da atividade da toxina, a partir de uma mudança no domínio III, mostrando que a atividade inseticida aumentou em sete vezes sua ação contra o besouro de batata do colorado. É notável que o domínio III das proteínas Cry é importante em relação ao grau de toxicidade dos cristais e conhecer bem sua estrutura é crucial para desenvolver bons produtos à base desta toxina.



**Figura 3.** Representação das regiões da toxina Cry onde as mutações aumentaram a atividade inseticida em diferentes toxinas de Cry. A estrutura tridimensional da toxina Cry1Aa (BRAVO *et al.*, 2013).

### 1.3.3.1 Modo de ação da proteína do Bt

Os cristais secretados por Bt possuem atividade entomopatogênica, sendo específicos para um alvo, como insetos das ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera. Entretanto, há subespécies de Bt capazes de produzir toxinas contra insetos das ordens Hymenoptera e Hemiptera, entre outras (VILLAS-BÔAS *et al.*, 2012; LACEY *et al.*, 2015; NAIR *et al.*, 2018).

Quando os insetos ingerem os cristais, os mesmos são solubilizados no intestino. Em seguida, proteases desdobram as protoxinas, as quais conseqüentemente são ativadas e formam pequenos fragmentos tóxicos (SILVA, 2013b). As toxinas ligam-se a receptores específicos na membrana das células epiteliais do intestino médio do inseto, provocando desequilíbrio iônico entre citoplasma e meio extracelular. Há, assim, destruição das microvilosidades intestinais, hipertrofia das células epiteliais, vacuolização do citoplasma e lise celular, levando o inseto à morte (FIUZA, 2009; SILVA, 2013b; VILLAS-BÔAS *et al.*, 2012). A inibição alimentar pode ocorrer logo após a ingestão do esporo e da toxina do *B. thuringiensis* (SILVA, 2013b; VILLAS-BÔAS *et al.*, 2012).

Produtos com esporos de Bt são vendidos em todo o mundo. Entretanto, com o avanço da biologia molecular, já é possível encontrar plantas geneticamente modificadas com o gene *cry* de Bt (SILVA, 2013b). Em relação à soja, o primeiro relato bem sucedido da expressão do gene *cry* de Bt foi em 1994 (SILVA, 2013b). Alguns genes de Bt, como *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Ab* e *cry9C* foram utilizados comercialmente no melhoramento genético de plantas, tornando-o uma alternativa para a redução da aplicação de pesticidas químicos a partir de 1996 (SCHÜNEMANN, 2014). Em 2018, o Brasil começou o plantio de cana-de-açúcar transgênica com gene de Bt pra resistência à broca (SNA- Sociedade Nacional de Agricultura, 2018). Além disso, o primeiro algodão transgênico no Brasil foi criado no ano de 2017, a planta apresenta resistência à lagarta com dois genes de Bt e também resistência ao herbicida glifosato (SNA, 2017). Apesar do Brasil e o mundo produzirem cada vez mais plantas transgênicas, já há relatos de insetos que começaram a desenvolver resistência a proteínas Bt expressas por plantas transgênicas (REYAZ *et al.*, 2021). Este fato já está ocorrendo em alguns países, e a resistência desenvolvida no campo pode se dar a uma única proteína ou mais de uma, causando assim uma diminuição na eficácia das plantas transgênicas com toxina de Bt (REYAZ *et al.*, 2021).

Em contrapartida ao Brasil ser o segundo maior produtor de plantas transgênicas (SNA, 2020) e às vantagens de plantas com resistência a pragas, há uma preocupação social com os efeitos desconhecidos dos transgênicos. A resistência de insetos-alvo a alguns tipos de proteína de Bt em plantas transgênicas e a preocupação sobre os efeitos dos transgênicos fazem com que sejam estudadas formas alternativas às plantas geneticamente modificadas, ou mesmo retornar ao uso de produtos químicos, uma vez

que há também o histórico de resistência dos insetos a plantas transgênicas. Desta forma, os bioprodutos tendem a ser uma alternativa para essa problemática, uma vez que podem ser inseridas novas proteínas de biocontrole nesse bioproduto sem precisar recorrer aos antigos produtos químicos para controlar as pragas.

Com o propósito de produzir uma alternativa aos produtos químicos, utilizou-se a estirpe bacteriana *Bacillus thuringiensis* para este trabalho, uma vez que é conhecida para controle biológico e eficiente no controle de diversos insetos-pragas, além de ser específica ao seu alvo e também não haver indícios de resistência de pragas para esse tipo de produto.

O desenvolvimento de um inoculante agrícola com ingrediente ativo de Bt é aceitável aos olhos do mercado uma vez que existem diversos produtos na mesma classe. Segundo o Biopesticide Market (2022), o mercado mundial de biopesticidas foi avaliado em mais de US\$ 10,4 bilhões em 2021 e deverá ultrapassar US\$34,5 bilhões até o final de 2031. Transparency Market Research (2016) explica que os fatores que fazem esse mercado crescer se devem à crescente demanda de alimentos orgânicos e à crescente regulamentação sobre o uso de produtos químicos. As empresas do mercado de biopesticidas estão focando em áreas de grande crescimento, como de cereais, grãos, frutas e legumes, e, com isso, espera-se que o aumento das culturas deste tipo também impulse o mercado global de biopesticidas. Além disso, as pessoas estão com uma visão mais crítica sobre o desenvolvimento agrícola, buscando produtos menos tóxicos para o consumo (Biopesticide Market, 2022). Em vista disso, a área de inoculantes agrícolas com ação biopesticida tende a crescer a cada ano, mostrando-se um ramo promissor para pesquisas e geração de produtos

#### **1.3.4 Gênero *Enterobacter* sp.**

O gênero *Enterobacter* pertence à família Enterobacteriaceae, composto por bactérias pequenas, com motilidade por meio de flagelos peritríquios, Gram-negativas, anaeróbias facultativas e distribuídas em quase toda natureza, sendo encontradas no solo, água, esgoto, corpo humano (DAVIN-REGLI *et al.*, 2019). O gênero é mais conhecido e estudado por abranger espécies de patógenos oportunistas e resistentes a agentes antimicrobianos (SANDERS JR & SANDERS, 1997; DAVIN-REGLI *et al.*, 2019). Entretanto, há espécies deste mesmo gênero que são caracterizadas como

microrganismos endofíticos, ou seja, residem nos tecidos das plantas sem prejudicá-las. Além disso, beneficiam a planta promovendo o crescimento e desenvolvimento do vegetal por meio de reguladores de crescimento, como etileno, auxinas e outros e, também, na supressão de patógenos (TAGHAVI *et al.*, 2010; YOUSAF *et al.*, 2011; LIN *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2022).

Na literatura, é possível encontrar diversos casos de espécies de *Enterobacter* que ajudam no crescimento de vegetais - *E. radicincitans*, *E. arachidis*, *E. oryzae* e *Enterobacter* sp. CBMB30 (KÄMPFERA *et al.*, 2005; YOUSAF *et al.*, 2011); na fixação de nitrogênio - *E. sacchari* (ZHU *et al.*, 2013), e biocontrole - *E. cloacae* EcET-501, *E. hormaechei* (HINTON AND BACON, 1995; BOUTARFI *et al.*, 2019). No trabalho realizado por Wang *et al.*, (2022) foram encontrados genes de promoção de crescimento de plantas no genoma da estirpe bacteriana *E. cloacae* Rs-2.

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) são amplamente estudadas. Um trabalho realizado por Pramanik *et al.* (2018) mostrou a capacidade de resistência a  $Cd^{2+}$  pela bactéria *Enterobacter* sp. e sua capacidade de promover crescimento de arroz sob estresse desse mesmo metal. Houve uma melhora dos efeitos do estresse induzido por tal composto por meio da biorremediação do componente e, assim, a planta foi beneficiada. Este é mais um exemplo do potencial benéfico de bactérias deste gênero. Além disso, Yousaf e colaboradores (2011) trazem mais um estudo da capacidade de um *Enterobacter* sp. de melhorar o crescimento vegetal e degradar compostos químicos. Em trabalhos realizados por Yousaf *et al.* (2010), mostraram-se cepas pertencentes à rizosfera e endosfera de plantas que cresceram em solo contaminado com diesel. Em outro estudo realizado por Yousaf *et al.* (2011), foi testada a atividade de degradação do hidrocarboneto por cepas identificadas como *E. ludwigii*. As cepas testadas mostraram degradação substancial de hidrocarbonetos. Entretanto, elas apresentaram diferentes capacidades de degradação, embora todas continham o mesmo tipo de gene de alcano-hidroxilase. Todos os anos são publicados trabalhos com *Enterobacter* sp. e sua capacidade de degradar pesticidas, dentre os quais destacam-se: *E. asburiae* com organofosforados acefato (RAMYA *et al.*, 2016); *E. ludwigii* com nematicida oxamil (RADWAN *et al.*, 2017); *E. aerogenes* com inseticida piretróides bifentrina, fenpropatrina e cipermetrina (HEGDE *et al.*, 2017). Em relação à degradação de compostos aromáticos, um estudo realizado por Tan *et al.*, (2013) mostrou a eficácia da degradação do herbicida ácido 2-metil 4-

clorofenoxiacético (MCPA) pela estirpe *Enterobacter* sp. (SE08), a qual usa o composto como fonte de carbono e de energia para seu crescimento.

A espécie bacteriana *E. hormaechei* apresenta eficácia na degradação de vários compostos. O trabalho realizado por El-Liethy *et al.* (2022) evidenciou a cepa de *E. hormaechei* ODB H32, oriunda de lama à base de petróleo de alguns locais de perfuração de petróleo no deserto ocidental, Egito. Neste trabalho, os autores mostraram que a cepa pode biodegradar óleo sob condições otimizadas de pH, temperatura e utilizando diferentes estimulantes de fontes de nitrogênio. Além disso, análises por meio da impressão digital metabólica usando Biolog Gen III revelaram que a cepa pode utilizar diversas fontes químicas.

Outro recente trabalho mostrou que a cepa *E. xiangfangensis* STP-3 foi capaz de degradar hidrocarbonetos de petróleo (PHCs) em 82% em 14 dias durante a biorremediação de borra de petróleo em tempo real com a produção concomitante de biosurfactante e enzimas metabólicas (MUNEESWARI *et al.*, 2021). Hoje já existe trabalho evidenciando a capacidade dessa espécie de degradar 2,4-D. No trabalho realizado por Neetha e colaboradores (2021), mostrou-se que *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* cepa 19\_357\_F (MK281611) conseguiu degradar 42,68% de 2,4-D na concentração de 250 mg.L<sup>-1</sup>; a cepa também conseguiu tolerar 2,4-D a uma concentração de 400 mg.L<sup>-1</sup>.

### 1.3.5 Gênero *Ochrobactrum* e a relação com gênero *Brucella*

O gênero *Ochrobactrum* foi proposto por Holmes *et al.*, (1988), caracterizado como um bastão incolor. As células se apresentam em forma de bastonetes, móveis por flagelos peritríquios, Gram-negativas e obrigatoriamente aeróbicas, crescem bem entre 20°C a 37°C. Em relação ao conteúdo G+C, pode variar entre 56 a 59%. A hibridização DNA-DNA indica que o gênero *Ochrobactrum* possui uma baixa distância genética com os genomas do gênero *Brucella*, estando filogeneticamente relacionados. (HOLMES *et al.*, 1988; CONTRERAS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2018). Esses microrganismos são filogeneticamente relacionados com os membros da subdivisão alfa-2 de Proteobacteria. A estirpe tipo de *Ochrobactrum* spp. produz ácido, a partir de carboidratos e reduz nitrato (RYAN & PEMBROKE, 2020).

A classe Alphaproteobacteria, inclui bactérias de diferentes habitats, estas possuem morfologias e fisiologias variadas e possuem representantes de importância

clínica e ecológica. Por serem variadas, as classificações e taxonomias dessas bactérias sempre foram difíceis de serem feitas, pois se baseavam em números limitados de características fenotípicas e na interpretação de árvores filogenéticas, mal resolvidas, utilizando os genes que codificam o 16S rRNA (Hördt *et al.*, 2020). Sendo assim, um novo estudo foi realizado pelos pesquisadores Hördt *et al.* (2020), no qual fizeram a classificação taxonômica da classe Alphaproteobacteria, utilizando estirpes tipo. Por meio deste trabalho, pode-se esclarecer a relação taxonômica entre o gênero *Ochrobactrum* e *Brucella*. Nas análises realizadas por Hördt *et al.* (2020), o gênero *Ochrobactrum* foi mostrado como parafilético, na árvore com o método filogenético *Genome BLAST distance Phylogeny* (GBDP), pois todo gênero *Brucella* foi alinhado dentro de *Ochrobactrum*. A estirpe tipo de *Ochrobactrum* apareceu mais relacionada com *Brucella*. Foi notado que a divergência genômica geral do clado *Brucella-Ochrobactrum* foi menor que muitos clados que fazem parte apenas de um dos gêneros. Apesar de certas diferenças, como o tamanho do genoma e análise de conteúdo genético, os autores propõem incluir as espécies do gênero *Ochrobactrum* dentro do gênero *Brucella*.

Sabemos que mudanças como essas de inclusões/exclusões de gêneros demoram muito para serem aplicadas. Desta forma, nos últimos anos, há um movimento para substituir algumas espécies de *Ochrobactrum* por *Brucella*, este é o caso da espécie *Ochrobactrum intermedium*, sendo agora chamada de *Brucella intermedia* e classificada como sinônimo homotípico (OREN & GARRITY, 2020). A espécie bacteriana *Ochrobactrum intermedia* foi descrita em 1989, a origem do seu nome é devido a posição intermediária entre *O. anthropi* e *Brucella spp.* nas análises feita no trabalho realizado por Velasco *et al.* (1998). Todavia, há resistência sobre o tema, havendo trabalhos sendo publicados indicando a não inclusão de *Ochrobactrum* dentro do gênero *Brucella* (MORENO *et al.*, 2022). Assim como Moreno *et al.* (2022), nós também optamos por manter o gênero *Ochrobactrum* separado do gênero *Brucella*, para este trabalho. Porém, é de extrema relevância demonstrarmos a relação de *Ochrobactrum* e *Brucella*, uma vez que nos resultados podem ser encontrados os dois nomes, dependendo de cada banco de dados analisados.

Há alguns trabalhos que mostram bactérias do gênero *Ochrobactrum* envolvidas na degradação de certos compostos, tais como: organofosforados – diclorvos (2,2 diclorovinil dimetil fosfato) (ZHANG *et al.*, 2006); o nitroaromático p-nitrofenol (PNP)

(QIU *et al.*, 2007); benzo[a]pireno (BAP) (YIRUI *et al.*, 2009); glifosato (HADI *et al.*, 2013); hidrocarboneto BTEX (ERAKKY *et al.*, 2015); 2,4-diclorofenol (DCP), 4-cloro-2-metilfenol (MCP) (MÜLLER *et al.*, 1999); 2,4-D (HAN *et al.*, 2014; BARBA *et al.*, 2019; GÓNGORA-ECHEVERRÍA *et al.*, 2020).

Por meio da capacidade destes microrganismos de degradar compostos xenobióticos, como o 2,4-D, é possível utilizá-los como ferramenta para a biorremediação. Por meio da biotecnologia, é possível elaborar produtos à base destes microrganismos, dentre eles destacam-se os inoculantes agrícolas. Além disso, o estudo do genoma destes microrganismos é crucial para entender o metabolismo e as diversas formas de degradação das substâncias xenobióticas, como o herbicida 2,4-D. Para isso é necessário analisar e caracterizar o genoma, buscando os possíveis genes/enzimas envolvidas na degradação. Podendo assim, avaliar todo mecanismo que é ativado pelos microrganismos aqui estudados.

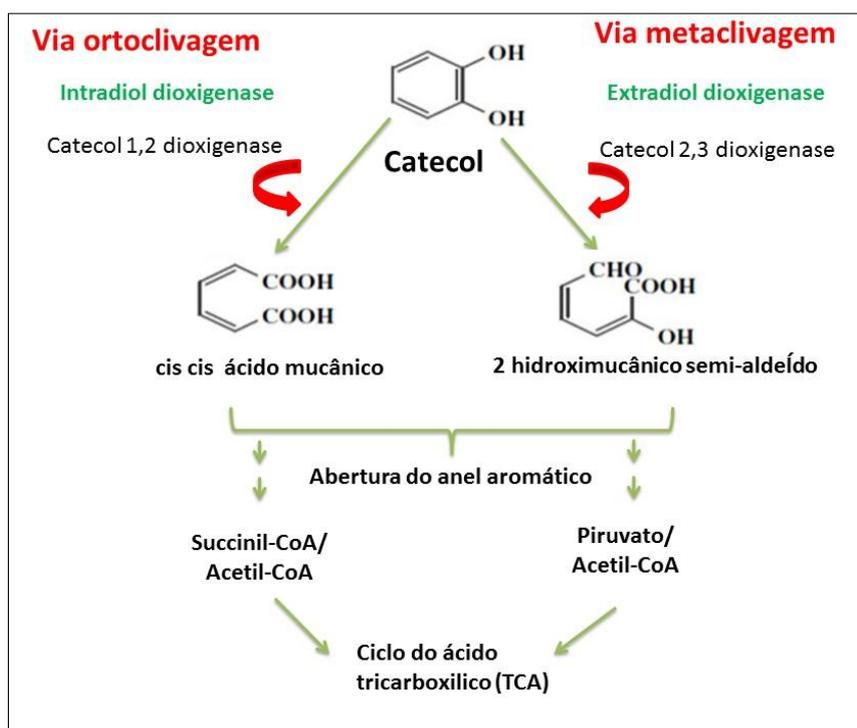
#### **1.4 Degradação do herbicida 2,4-D**

No solo, é possível encontrar diversos microrganismos com capacidade de degradar o herbicida 2,4-D. Na literatura, podem-se encontrar diversos gêneros de bactérias e fungos capazes de degradar o 2,4-D, dentre eles destacam-se *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Ralstonia* sp., *Delftia* sp., *Arthrobacter* sp., *Ochromobactrum* sp., *Serratia* sp., *Burkholderia* sp., *Phanerochaete* sp., *Aspergillus* sp., *Mortierella* sp., *chrysosporium* sp., *Mucor* sp., *Penicilium* sp., *Pleurotus* sp. (YADAV & REDDY, 1993, PEREIRA, 2016; SINGH *et al.*, 2014; PANDEY *et al.*, 2018; VASQUEZ-PIÑERO *et al.*, 2018). A degradação do 2,4-D, assim como de outros pesticidas, envolve várias enzimas que permitem acelerar a transformação da molécula, a quebra do anel aromático do 2,4-D e de diversos outros compostos. Em bactérias, as oxigenases podem incorporar um ou dois átomos de oxigênio molecular (O<sub>2</sub>), denominadas respectivamente de monooxigenases e dioxigenases. As monooxigenases, também denominadas de hidroxilases, atuam ativamente em rotas de degradação. São as enzimas iniciais na via catabólica do 2,4-D, sendo de suma importância para as etapas que antecedem a cisão do anel aromático, por serem responsáveis pela introdução de um ou mais grupos hidroxilas na estrutura do anel (PERKINS & LURQUIN, 1988; DIREITO, 2005; KUMAR *et al.*, 2016). As enzimas são produzidas por genes específicos de

degradação, os quais, em cepas microbianas, podem ser encontrados em plasmídeos, transposons e/ou cromossomos (VERMA *et al.*, 2014).

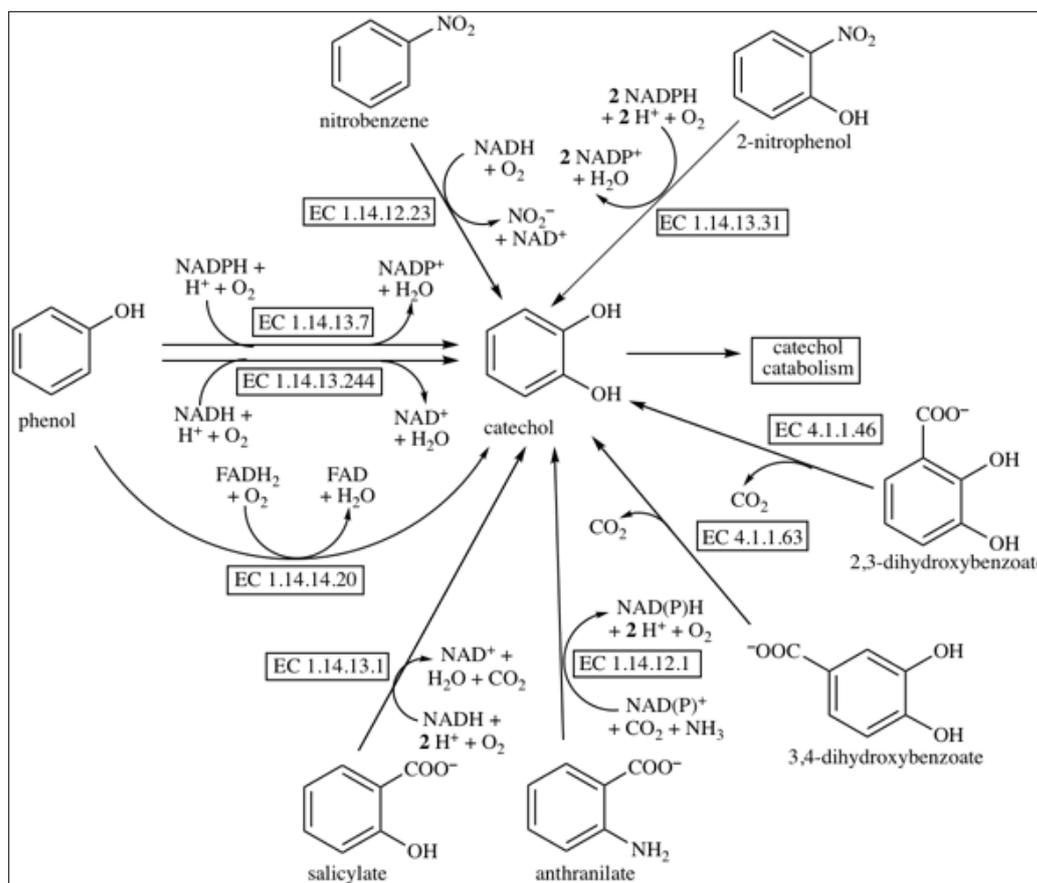
#### 1.4.1 Análise genômica das vias metabólicas de transformação de composto aromáticos

A transformação dos compostos aromáticos é iniciada por diferentes enzimas. A inserção do oxigênio pelas dioxigenases nos compostos aromáticos produz um composto cis-dihidrodiol que serve de substrato para outras enzimas desidrogenase, formando intermediários centrais (Catecol, Protocatecol e Gentisato) da rota de degradação de hidrocarbonetos aromáticos. Esses intermediários hidroxilados são canalizados para uma das duas possíveis vias metabólicas: metaclivagem (estradiol) ou ortoclivagem (intradiol), figura 4 (THOMAS, 2003).



**Figura 4.** Esquema de vias metabólicas orto e meta e sistemas enzimáticos de degradação do catecol por bactérias. Papel das dioxigenases na degradação de compostos aromáticos (ARORA *et al.*, 2009; ABLIEIEVA *et al.*, 2021; - Adaptado 2022)

A via de ortoclivagem é responsável pela degradação do catecol e protocatecol. O catecol pode ser formado a partir de vários compostos aromáticos, como fenol e benzeno (figura 5). O catecol é oxidado por meio da via de ortoclivagem pela enzima 1,2 dioxigenase ou então pode ser oxidado pela via de metaclivagem, pela da enzima 2,3 dioxigenase, conforme pode ser visto na figura 4. Seus compostos são transformados em intermediários, dos quais o protocatecol é convertido em  $\beta$ -carboximuconato pela protocatecuato 3,4-dioxigenase e depois convertido no intermediário central chamado  $\beta$ -ceto-adipato. Já o catecol é convertido em muconato pela enzima lactonizante cis-cis-muconato e após é convertido no mesmo intermediário central que o protocatecol ( $\beta$ -ceto-adipato). Após são metabolizados em intermediários finais: succinato e acetil-CoA e ambas as moléculas entram no ciclo do ácido tricarbóxico (SETLHARE *et al.*, 2019). Tanto a enzima 1,2 dioxigenase (ortoclivagem) quanto a 2,3 dioxigenase (metaclivagem) abrem o anel do catecol. O catecol tem um aroma forte e é um poluente tóxico persistente da água no meio ambiente (SETLHARE *et al.*, 2019).



**Figura 5.** Biossíntese do Catecol através de diversos compostos aromático Fonte: NC-IUBMB (2022).

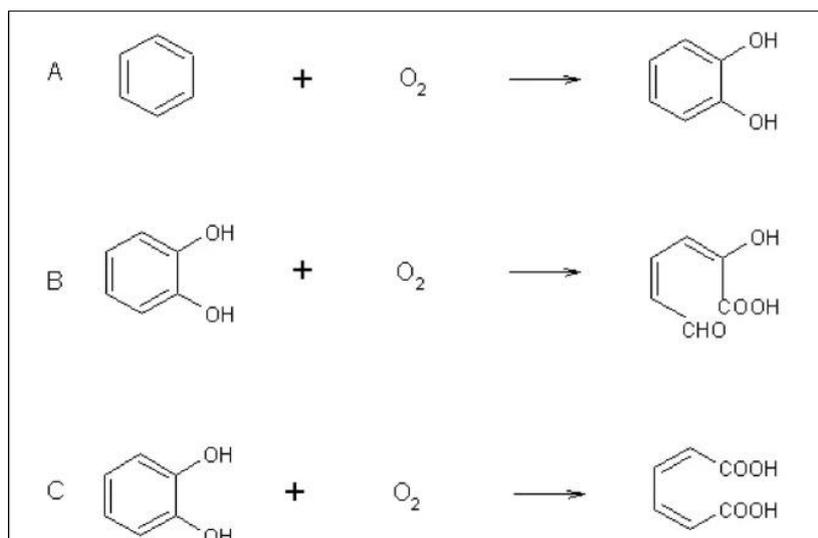
A degradação microbiana de vários cloroaromáticos foi elucidada via clorocatecol, apresentando intermediários centrais durante o processo de degradação, e posteriormente degradados via ortoclivagem. As enzimas Clorocatecol 1,2-dioxigenase, cloromuconato cicloisomerase, dienelactona hidrolase e maleilacetato redutase cumprem a convergência das vias de degradação do clorocatecol e do catecol. Em alguns microrganismos, a via degradação é iniciada pelas extradiol dioxigenases (metaclivagem), onde as enzimas catecol 2,3-dioxigenases da via meta são capazes de converter catecol, tanto metilcatecols isoméricos quanto 4-clorocatecol. A degradação do 4-clorocatecol ocorre de forma lenta, uma vez que os microrganismos na presença deste composto crescem lentamente (KARSCHABEK *et al.*, 1998). Já quando o composto 3-clorocatecol ocorre em cepa que realiza a metaclivagem, a enzima catecol 2,3-dioxigenase é inativada, isso porque este composto é uma substância quelante e também pode ocorrer pelo cloreto acil reativo (produto da clivagem da enzima), como

consequência, causa um efeito tóxico nas células. Desta forma, em regra geral, a degradação do 3-clorocatecol via metaclivagem é considerada impossível. Contudo, foi relatado que *Pseudomonas putida* GJ31 degrada o clorobenzeno com um tempo de geração de 3 h via 3-clorocatecol, usando a metavia sem quaisquer efeitos tóxicos aparentes, considerando-se um caso interessante para estudo em outras espécies (KARSCHABEK *et al.*, 1998; THOMAS, 2003).

#### 1.4.2 Enzimas envolvidas na biodegradação de 2,4-D

As enzimas de fissão podem ser divididas em dois grupos, que dependem do local de clivagem no intermediário central: vias de ortoclivagem e metaclivagem (figura 4). A enzima intradiol dioxigenase que catalisa substratos na via de ortoclivagem, tem ferro não heme (III) em seus sítios ativos e catalisa a abertura do anel aromático ligação carbono hidroxilado (posição 1,2 do anel aromático), originando o cis muconato e podendo gerar os produtos finais succinato e acetil-CoA. Já as enzimas extradiol dioxigenases participam da via de metaclivagem e possuem ferro não heme (II). Fazem a abertura do anel aromático adjacente ao átomo de carbono hidroxilado (posição 2,3 do anel aromático), originando 2-hidroxi-mucônico semialdeído e, como produto final, piruvato e aldeído. Na via de metaclivagem, a catecol 2,3 dioxigenase faz a clivagem do anel aromático se o intermediário central for catecol, e a proteocatecol 4,5 dioxigenase faz a clivagem se o composto formado for protocatecol (SILVA, 2008; ARORA *et al.*, 2009).

As monooxigenases (figura 6) catalisam a transferência do átomo de oxigênio molecular para um composto orgânico, sendo reduzido por elétrons e co-fatores para produzir água (ARORA *et al.*, 2009).



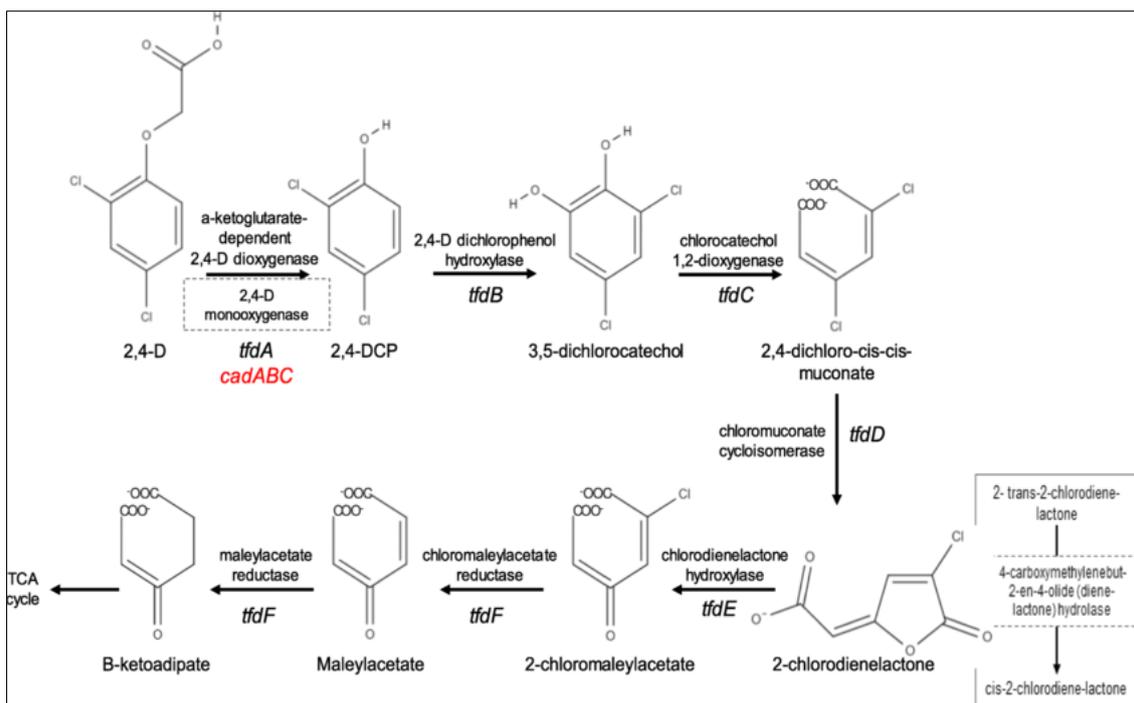
**Figura 6.** Mecanismo de ação das dioxigenases aromáticas. A) dioxigenase hidroxilante do anel aromático; B) dioxigenase de clivagem do anel de extradiol e C) dioxigenase de clivagem do anel intradiol (ARORA *et al.*, 2009)

### 1.4.3 Os genes *tfd*s e as enzimas responsáveis pela degradação do herbicida 2,4-D

Em 1978 surgiu o relato do primeiro gene plasmidial envolvido na degradação do 2,4-D, localizado no plasmídeo conjugativo pJPI, isolado de duas linhagens de *Pseudomonas* sp. Assim como no pJPI, há outros genes que codificam enzimas de degradação do 2,4-D, em geral, sendo frequentemente encontrados nos plasmídeo conjugativos, pEMT1 e pJP4 (SINGH *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2021). Há ainda outros plasmídeos que possuem alta taxa de transferência e podem promover atividade catabólica. No caso, há o grupo *inc* que inclui *incP1* ou *incP9* e podem ser importantes nas aquisições de genes. Esses podem sofrer modificações e permitem adaptação do hospedeiro (THOMAS, 2003; NGUYEN *et al.*, 2019).

O pJP4 foi primeiramente isolado na Austrália, a partir da estirpe *Ralstonia eutropha* JMP134, também formalmente chamada de *Cupriavidus pinatubonensis*, *Alcaligenes eutrophus*, *Cupriavidus necator* e *Waustersia eutropha* (VIANEZ JUNIOR, 2007; SINGH *et al.*, 2014; CARLES *et al.*, 2021). Em alguns relatos na literatura, encontram-se espécies bacterianas que possuem homologia, em suas regiões catabólicas, aos plasmídeos pJP4 e pEST4011, tais quais pRC10 da bactéria *Mercuryresistant flavobacterium* e *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* cepa EST4002 (KUMAR *et al.*, 2016). Tais plasmídeos possuem genes da via *tfd* de

degradação do 2,4-D. Isto quer dizer que são codificadores de enzimas responsáveis na participação ativa na degradação das moléculas do herbicida 2,4-D. Algumas são capazes de iniciar a via de degradação, já outras realizam as etapas seguintes, até a mineralização (VIANEZ JUNIOR, 2007; SINGH *et al.*, 2014; CARLES *et al.*, 2021). A via de degradação do 2,4-D pela *Ralstonia eutropha* é catalisada sequencialmente por seis enzimas codificadas pelos genes *tfdA*, *tfdB*, *tfdC*, *tfdD*, *tfdE*, *tfdF*, conforme demonstrado na figura 7. O gene *tfdA* ocorre em  $\beta$ - e  $\gamma$ -Protobactéria e *tfdA $\alpha$*  em  $\alpha$ -Protobactéria e codifica  $\alpha$ -cetoglutarato dioxigenase que converte 2,4-D em 2,4-diclorofenol (VIANEZ JÚNIOR, 2007; KUMAR *et al.*, 2014; NGUYEN *et al.*, 2019). Além do *tfdA* que transforma o 2,4-D em 2,4-diclorofenol, tem-se o transportador de 2,4-D, codificado pelo *tfdK*, e também outros reguladores *tfdR*, *tfdT* (NGUYEN *et al.*, 2019). Já o gene *tfdB* codifica uma fenol hidroxilase que converte 2,4-diclorofenol em 3,4-diclorocatecol, sendo dois átomos de oxigênio reduzidos a um grupamento hidroxila e água, oxidando o NADPH. O gene *tfdC* codifica a 1,2-diclorocatecol dioxigenase e realiza a reação catalisadora, que quebra o anel aromático de forma intradiol ou *orto*. As dioxigenases intradiol utilizam o Fe (III) para quebrar o anel aromático entre dois grupamentos de hidroxila (VIANEZ JÚNIOR, 2007; KUMAR *et al.*, 2016; HAYASHI *et al.*, 2016). O gene *tfdD* é responsável pela conversão do 2,4-dicloro-cis, cis-muconato à 2-clorodienolactona. Isso porque produz uma enzima cloromuconato cicloisomerase. Esta enzima que também é chamada de muconato lactonizante (MLE), em algumas espécies de bactérias são capazes de metabolizar compostos cloroaromáticos em *Ralstonia eutropha* (VIANEZ JÚNIOR, 2007; SERBENT *et al.*, 2019). As enzimas dienolactona hidrolases são codificadas pelo gene *tfdE* e são capazes de degradar o clorocatecol por meio da via orto de degradação, tendo especificidade para *cis* e *trans* dienolactona. No processo de catálise, a enzima faz a conversão da cis-2-clorodienolactona à 2-cloromaleilacetato (VIANEZ JÚNIOR, 2007). A enzima maleilacetato redutase, codificada pelo gene *tfdF* de *Ralstonia eutropha* JMP134, pertence à família álcool-desidrogenase (ADH) e catalisa a oxidação reversível do etanol a acetaldeído e a redução do NAD. Na reação catabólica do 2,4-D, esta enzima catalisa a conversão do 2-cloromaleilacetato em maleilacetato e em sequência canaliza o maleilacetato para a via 3-oxadipato (VIANEZ JÚNIOR, 2007; SERBENT *et al.*, 2019).



**Figura 7.** Vias de degradação de 2,4-D com conjunto de genes (*cad* e *tfd*) envolvido em *Alcaligenes* sp. e *Achromobacter* sp. Os retângulos tracejados representam os metabólitos e/ou enzimas originalmente propostos por Don *et al.* (1985). Modificado de Don *et al.* (1985), Kitagawa *et al.* (2002), Vedler *et al.* (2004) e Huang *et al.* (2017) Apud SERBENT *et al.*, 2019).

Os *clusters* dos genes *tfd*, encontrados no plasmídeo pJP4, nem sempre são conservados em bactérias catabólicas de 2,4-D oriundas de outras áreas geograficamente distantes. A maioria dos outros *clusters* de genes catabólicos de 2,4-D transporta apenas um *cluster* *tfd* para a conversão do 2,4-D e possuem diferença na composição intra e inter-modulares. Além disso, estão localizados em diferentes elementos geneticamente móveis (EGM) (NGUYEN *et al.*, 2019). Entretanto, os genes isofuncionais aparentam possuir um ancestral comum, e algumas bactérias capazes de degradar 2,4-D, já que mesmo as oriundas de locais diferentes, apresentam genes *tfd* homólogos (NGUYEN *et al.*, 2019).

Em *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4), foi descoberta a transcrição de um segundo grupo de genes degradadores de clorocatecol que fazem a transformação do 2,4-diclorofenol em  $\beta$ -cetoadipato quando em presença de 2,4-D. Tais genes funcionais estão presentes em plasmídeo, assim como os genes *tfdCDEF*, designado como *tfd*-I. Tal *cluster* foi denominado de *tfdDIICIIIEIIFII* (*tfd*II) (LAEMMLI *et al.*, 2002; KUMAR

*et al.*, 2016; NGUYEN *et al.*, 2019). Esta descoberta mostrou que há duas vias de degradação dos clorofenóis e clorocatecóis, visto que o *cluster* codifica enzimas funcionais para degradação da molécula clorocatecol. Entretanto, segundo estudos realizados por LAEMMLI *et al* (2002), mostrou-se que o cluster (*tfdII*) não é totalmente isofuncional, quando comparado ao *tfdI*. Isto porque a expressão do cluster *tfdII* não garantiu que células crescessem em 3-clorobenzoato, diferentemente do *tfdI*. Neste mesmo estudo, observou-se que a expressão do cluster *tfdI* foi mais eficiente em 3-clorobenzoato. LAEMMLI e seus colaboradores (2002) propuseram que as enzimas produzidas pelos genes *tfdDII* e *tfdEII* limitaram a velocidade da degradação do 3-clorobenzoato devido à baixa atividade das mesmas com 2-cloro-cis, cis-muconato e cis-dienelactona, respectivamente, ou seja, foram incapazes de catalisar a transformação dos compostos 2-cloro-cis, cis-muconato comprovando não serem isofuncionais.

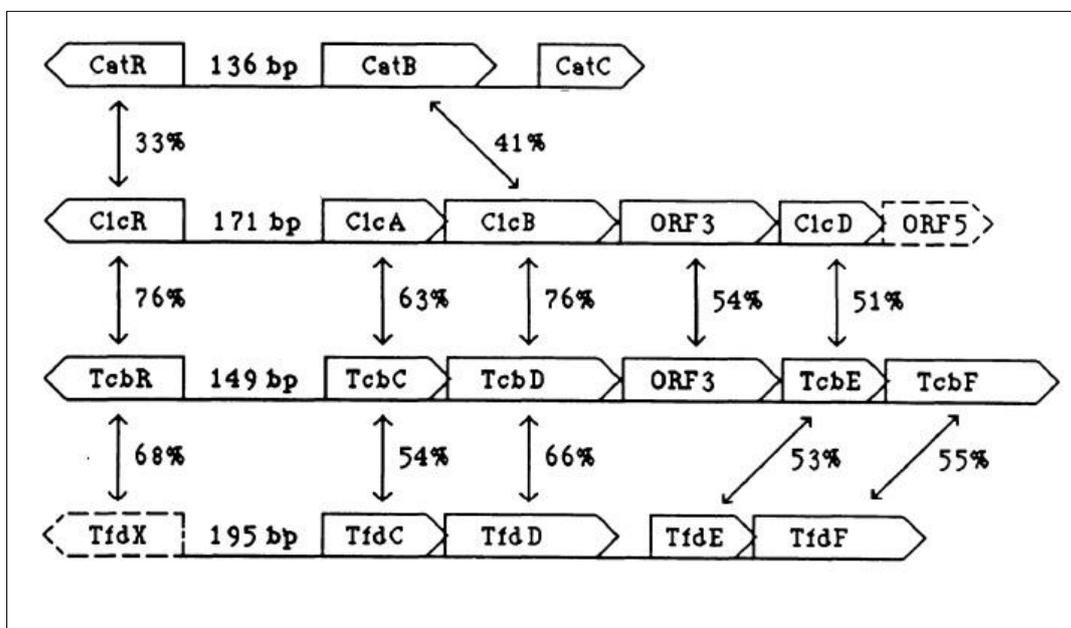
Os grupos de bactérias degradadoras de 2,4-D são caracterizadas com base nas suas propriedades fisiológicas e enzimáticas. O grupo I é caracterizado por possuir o gene *tfdA* - codificando a dioxigenase dependente de  $\alpha$ -cetoglutarato. O grupo II é formado por organismos copiotróficos e de rápido crescimento, como *Sphingomonas* spp, que pertencem ao grupo de  $\alpha$ -Proteobacteria, e possuem os genes *cadA* e *cadB*, os quais codificam monooxigenases e não são semelhantes ao *tfdA* da bactéria *Ralstonia eutropha*. Entretanto, *cadA* e *cadB* compartilham aproximadamente 50% de identidade com *tftA* e *tftB* de *Burkholderia cepacia* AC1100. Já o grupo III é composto por bactérias oligotróficas e de crescimento lento pertencentes ao gênero de bactérias *Bradyrhizobium* do grupo  $\alpha$ -Proteobacteria. Caracterizam-se por possuírem *cadAB* e *tfdA $\alpha$* , os genes *cadA* e *cadB* compartilham de 54% - 59% de identidade com *tfdA* e *tfdB*, respectivamente, de *B. cepacia* AC110, neste grupo. A similaridade do gene *tfdA $\alpha$*  de *B. cepacia* AC110 é de 43%-46% em relação ao gene *tfdA* da bactéria *Ralstonia eutropha* (HAYASHI *et al.*, 2016; ZHARIKOVA *et al*, 2018). Assim como o gene *cad*, há outros genes que estão envolvidos na degradação do 2,4-D e apresentam semelhanças entre si (WU *et al.*, 2017).

Os genes *catA*, *tcbC*, *clcA* e *tfdC* codificam as enzimas clorocatecol 1,2 dioxigenase tipo I e tipo II, que atuam sobre catecol ou clorocatecol. Tais genes podem ser agrupados de acordo com os produtos das seguintes etapas: uma cicloisomerase de cloromucanato atuam em cis, cis-muconato ou seus derivados clorados (*catD*, *tcbD*, *clcB*, *tfdD*), uma hidrolase de dienelactona (*tcbE*, *clcD*, *tfdE*) e redutase de acetato de

cloromaleia (*tcbF*, *tfdF*) (WU *et al.*, 2017). Os genes, encontrados em plasmídeos diferentes, apresentam semelhanças entre si com base na sequência de DNA, sequência de aminoácidos e organização gênica, sugerindo que eles tenham origem em um ancestral comum, porém, mesmo semelhantes, possuem especificidades de substratos alterados (DAUBARAS & CHAKRABARTY, 1992; THOMAS, 2003). Outro ponto interessante a se saber é que os genes de degradação do catecol (*cat*) são cromossômicos, enquanto que genes de degradação do clorocatecol (*clc*, *tfd* e *tcb*) são todos transmitidos por plasmídeos.

Já se sabe que para iniciar os processos de degradação do clorobenzoato, clorofenoxiacetato e clorobenzeno são necessárias as oxigenases para gerar clorocatecol, e que os genes que produzem estas enzimas são carreados por elementos transponíveis em um plasmídeo para outros microrganismos, gerando assim a capacidade de degradar certos compostos nestes organismos hospedeiros (DAUBARAS & CHAKRABARTY, 1992; ROSENBERG, 2012). Neste contexto, têm-se os grupos de genes que codificam as enzimas para degradação do clorocatecol. Os clusters de genes *tfdCDEF*, genes *tcbCDEF* e o *clcABD* possuem uma organização operônica semelhante e um alto grau de identidade em suas sequências de nucleotídeos. Outra característica entre os *operons* é a presença dos genes reguladores que estão inseridos no contexto da organização, como o *clcR* em relação ao *operon clcABC*; e o gene regulador *tcbR* para *operon tcbCDEF* (DAUBARAS & CHAKRABARTY, 1992; LEVEAU & van der MEER 1996; ROSENBERG, 2012). Nestes casos, há uma regulação positiva, ao contrário do que se vê em relação ao gene regulador negativo *tfdR* do *operon tfdCDEF*. O gene *catR* regula positivamente o *operon catABC* e está presente na degradação do catecol. O *catR* mostra homologia de sequência de aminoácidos com outras duas proteínas reguladoras *clcR* e *tfdR*, já o regulador TcbR mostra homologia significativa com partes de *catR*, *clcR* e *tfdX* (figura 8). Os genes estruturais dos *operons catBC*, *clcABD*, *tfdCDEF* e *tcbCDEF* apresentam homologia entre si. O gene *catA*, cromossomicamente codificado, mostra bastante homologia com *clcA*; o gene *clcA* apresenta-se, aproximadamente, 50 a 60% de identidade compartilhada entre as sequências dos genes *tcbC* e *tfdC*; o gene *catB* mostra 40% a 50% de identidade com *clcB*, *tfdD* e *tcbD*; já gene *clcD* apresenta identidade de 50% com *tfdE* e *tcbE*; e há uma identidade de 50% entre os genes *tfdF* e *tcbF* e entre *tfdF* e a

porção N-terminal de uma fase de leitura aberta putativo no final do *operon clcABD* (DAUBARAS & CHAKRABARTY, 1992 *apud* ROSENBERG, 2012).



**Figura 8.** A semelhança organizacional entre os *operons* degradativos do catecol e do clorocatecol, como mostrado por seus produtos gênicos. A extensão de idêntidades de aminoácidos entre os produtos gênicos é mostradas por setas (a idêntidade de aminoácidos de TcbR para ClcR é apenas sobre uma porção de clcR, não a proteína inteira). Além disso, outras idêntidades entre os produtos gênicos são: CatR e TcbR, 31%; *clcA* e *tfuC*, 59%; *catB* e *tcbD*, 44%; *catB* e *tfuD*, 42%; ClcB e TfdD, 63%; *clcD* e *tfuE*, 54% (DAUBARAS & CHAKRABARTY, 1992 *apud* ROSENBERG, 2012).

Já se sabe que a proteína TfdR é codificada pelos genes *tfuR* ou *tfuS*, e a mesma está envolvida na ativação da expressão dos genes *tfuA* e *tfuB* (LEVEAU & van der MEER 1996; LIU *et al.*, 2022). O *tfuR* de *R. eutropha* JMP134 controla a expressão do *cluster tfuDCEFB*, mas também regula a transcrição do gene *tfuA* para metabolizar o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (LIU *et al.*, 2022).

Existem diversas possibilidades de agrupamentos de genes para degradação de aromáticos. A evolução das vias de degradação e as transferências de vias degradativas fazem com que muitos grupos de genes sejam capazes de trabalhar em conjuntos para degradação dos compostos aromáticos. Já foram citados os *clusters tfuS*, *cat*, *clc*, *tcb* e *cad*. A atenção para genes que expressam enzimas que desempenham as mesmas

funções ou, ao menos, parecidas faz com que se tenha outro leque de genes capazes de auxiliar na degradação do 2,4-D e, assim, gerar novas rotas para degradação deste composto.

O uso destes mecanismos microbiológicos para gerar biotecnologia é algo já possível, produtos para biorremediação já existem. Dentre eles, destacam-se os inoculantes agrícolas, que são produtos à base de microrganismos com diversas afinidades para melhorar produção e desenvolvimento da planta. Entretanto, não é fácil preencher as exigências para produção de inoculante agrícola, principalmente pela lei brasileira, que até poucos anos impedia as pesquisas e interferia no pedido de patente para este tipo de produto.

### **1.5 Inoculantes agrícolas**

A lei da Biodiversidade nº 13.123 de acesso ao patrimônio genético e conhecimento tradicional associado, foi sancionada em 20 de maio de 2015, e entrou em vigor no dia 17 de novembro de 2015. Esta lei foi um marco para o Brasil, porque o país foi pioneiro ao implementar tal lei. O objetivo desta lei foi evitar a biopirataria e também repartir os benefícios oriundos da biodiversidade de forma justa e equitativa. Contudo, a lei trouxe alguns impedimentos práticos para a Pesquisa & Desenvolvimento, trazendo exigências burocráticas, que interferiu nas colaborações internacionais e foi obstáculo direto à inovação e patentes. Por causa dessas exigências, muitas pesquisas tiveram dificuldades em seu desenvolvimento. Houve uma insatisfação da comunidade científica e uma insegurança jurídica, um exemplo disso, são as pesquisas que envolvem microrganismos. Para este projeto, foram escolhidas estirpes oriundas de solos brasileiros e com a implementação da lei, estavam fora das exigências. Como forma de tentar progredir com a pesquisa e desenvolver o bioproduto (inoculante agrícola), foram compradas espécies bacterianas, dessa forma, o trabalho se manteve legalizado. Em 2018, foi aprovada uma série de medidas que simplificam o cumprimento da Lei 13.123/2015 e o preenchimento do cadastro no SisGen. A atual legislação trouxe avanços em relação à anterior, mas ainda precisa de ajustes (SILVA, 2022).

A lei nº 6.894 de 16 de dezembro de 1980, regulamentada pelo Decreto nº 4.954 de 14 de janeiro de 2004, que trata da atribuição do MAPA no que diz respeito à fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos e inoculantes, define inoculante como o material que contém microrganismos que atuem favoravelmente no desenvolvimento das plantas entendendo-se como:

- “a) suporte: material excipiente e esterilizado, livre de contaminantes segundo os limites estabelecidos, que acompanha os microrganismos e tem a função de suportar ou nutrir, ou ambas as funções, o crescimento e a sobrevivência destes microrganismos, facilitando a sua aplicação; e*
- b) pureza do inoculante: ausência de qualquer tipo de microrganismos que não sejam os especificados”*

No ano de 1985, surgiu a Rede de Laboratórios para recomendação, padronização e difusão da tecnologia de inoculantes microbianos de interesse agrícola – RELARE que, juntamente com o MAPA promoveram normas técnicas específicas para o uso de inoculantes. A instrução normativa nº 5, de 10 de agosto de 2004, anexo I, define as normas sobre as especificações e garantias mínimas do inoculante. Nesta norma, destaca-se a exigência de que o inoculante tenha o número mínimo de  $1,0 \times 10^9$  de células viáveis por grama ou por mililitro do produto, até a data do seu vencimento, assim certificando a sua viabilidade até a data do vencimento do produto. Já a relação entre os inoculantes à base de sementes e concentração de células viáveis do microrganismo, o MAPA colocou como parâmetro a proporção de 50 kg de semente misturadas ao inoculante de modo que, ao final, cada semente deve ter, no mínimo, 6.000 células viáveis por unidade de semente. Além disso, na legislação, o suporte dos inoculantes devem atender às seguintes exigências: serem estéreis e não podem estar contaminados por microrganismos não especificados até o fator da diluição  $1 \times 10^5$ ; possuir prazo de validade de até 6 meses; terem o seu suporte/ veículo com capacidade para fornecer todas as condições de sobrevivência ao microrganismo (BITTENCOURT & SANTOS, 2010; DAMASCENO, 2011). Atualmente, a legislação não regulamenta inoculantes para gramíneas, sendo assim, a indústria se baseia na proposta feita pela RELARE (Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola), que estabelece a

recomendação de  $1 \times 10^8$  células viáveis do microrganismo por grama ou mililitro de produto.

Segundo Damasceno (2011), as especificações das normas para inoculantes agrícolas devem ser seguidas com um criterioso padrão, para que não haja a perda da qualidade do produto. Esses cuidados não devem ser observados apenas na fabricação do produto, mas também, deve-se ter critérios para as etapas de armazenamento e distribuição. Em relação ao controle de qualidade dos inoculantes, cabe ao RELARE estabelecer protocolos para verificar a eficiência agrônômica dos inoculantes agrícolas (CAMPO & HUNGRIA, 2007). Em geral, o método de análise para verificação da eficiência agrônômica dos inoculantes agrícolas é por meio da contagem de células, por meio de métodos amplamente utilizados na área da microbiologia e, conseqüentemente, de fácil análise. O método de contagem em placa envolve quantificar o número de unidades formadoras de colônias (UFC), resultantes após o período de 24 horas ou 48 horas de incubação das células, podendo determinar o número de células viáveis no inoculante (DAMASCENO, 2011). O procedimento para determinação de UFC consiste na diluição seriada do inoculante em solução salina, sendo a diluição mais utilizada a de base 10, cujo método chama-se diluição seriada decimal (DAMASCENO, 2011). Após a diluição seriada, alíquotas de cada diluição são plaqueadas pelo método de Espalhamento em Superfície (*Spread Plate*) para, após a incubação, ser realizada a contagem das colônias (DAMASCENO, 2011). O plaqueamento também pode ser feito pelo método da Gota (*Drop Plate*). Uma das diferenças entre as duas técnicas é que, no método de Espalhamento em Superfície, há o plaqueamento de um volume maior, que é espalhado uniformemente em toda a dimensão das placas; enquanto que no método da Gota, o plaqueamento é realizado com volumes menores que são gotejados em quadrantes da placa de Petri, sem que haja espalhamento do líquido na placa (NAGHILI *et al.*, 2013; BARBOSA, 2014). Além disso, devido às proporções, no método de Espalhamento em Superfície, a contagem de colônias é realizada nas placas que apresentem de 30 a 300 UFC, já no método da Gota, a contagem de colônias é realizada nos quadrantes que apresentem de 3 a 30 UFC (NAGHILI *et al.*, 2013). O método da Gota, permitir o plaqueamento de mais de uma diluição em uma mesma placa de Petri, e com isso, gera menos gastos com meio de cultura e necessita de menos espaço para incubação, este método pode otimizar as análises nos laboratórios brasileiros (NAGHILI *et al.*, 2013; BARBOSA, 2014). No trabalho realizado por NAGHILI e

colaboradores (2013), a técnica da Gota é validada e equiparada à técnica do Espalhamento em Superfície, não havendo diferença significativa nos valores finais das determinações de UFC. Devido às vantagens mencionadas do método da Gota, esta técnica foi selecionada para fazer parte deste trabalho.

### **1.5.1 Classificação dos inoculantes**

Como dito anteriormente, a base do inoculante são os microrganismos e sabe-se que as plantas podem desenvolver com alguns microrganismos do solo relações simbióticas. As bactérias e os fungos podem ter uma relação simbiótica endofítica ou associativa com as plantas (De SOUZA *et al.*, 2015). Por causa desse tipo de associação, os microrganismos são desejados para produção de inoculantes, pois colonizam raízes e criam um ambiente favorável para o desenvolvimento das plantas (De SOUZA *et al.*, 2015).

Segundo Gaskin e colaboradores (2010), os inoculantes agrícolas são divididos em três grandes classes: biofertilizantes, estimuladores de resistência da planta e biopesticidas. Segundo a legislação brasileira, biofertilizante é o "produto que contém princípio ativo ou agente orgânico, isento de substâncias agrotóxicas, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, elevando a sua produtividade, sem ter em conta o seu valor hormonal ou estimulante". Diferentemente da definição da legislação brasileira, temos como biofertilizantes microrganismos que habitam a rizosfera ou vivem nas raízes, e que atuam como promotores de crescimento das plantas, podendo estes serem aplicados nas sementes, nas plantas ou nos solos (GASKIN *et al.*, 2010; OWEN *et al.*, 2014). O objetivo dos biofertilizantes é promover o crescimento das plantas, seja aumentando nutrientes, estimulando o crescimento radicular ou ajudando nas relações simbióticas benéficas (GASKIN *et al.*, 2010). Os inoculantes com a função de estimular a resistência da planta, utilizam microrganismos que atuam diretamente como inibidores de patógenos (GASKIN *et al.*, 2010; De SOUZA *et al.*, 2015). Tal processo, chama-se resistência sistêmica induzida e baseia-se no fato dos microrganismos, ao entrarem em contato com a planta, fazerem com que a planta tenha resposta a sinais químicos. Desta forma, estimulam uma resposta fisiológica do vegetal, para que haja um controle do patógeno, como por exemplo, produção de terpenos e aumento da parede celular (GASKIN *et al.*, 2010). O último da

classificação são os biopesticidas, que são formulados com microrganismos supressivos, ou seja, microrganismos que inibem a atividade patogênica de outros microrganismos e organismos praga (GASKIN *et al.*, 2010). A maioria dos microrganismos biopesticidas funcionam produzindo substâncias que inibem ou matam a praga, devido à competição por disponibilidade de alimento e espaço. (GASKIN *et al.*, 2010).

Independentemente da classificação do inoculante quanto ao seu modo de ação/finalidade, a eficiência do inoculante está associada a vários fatores, dentre eles: a capacidade de colonizar as raízes das plantas, sobreviver à competição microbiana, viver no ambiente, dentre outros (GASKIN *et al.*, 2010). As plantas reagem de diversas formas a diferentes condições ambientais, como por meio da secreção de diversos compostos que podem interferir na interação planta-microrganismo (De SOUZA *et al.*, 2015). Da mesma forma, as características do solo, desde umidade, concentração de nutrientes, concentrações de metais tóxicos ou até mesmo o manejo, são importantes para a sobrevivência do microrganismo e, conseqüentemente, para a eficiência do inoculante (De SOUZA *et al.*, 2015).

### **1.5.2 Tipos de inoculantes agrícolas no Brasil**

Com o advento dos inoculantes, é possível encontrar no mercado nacional diferentes tipos deste produto que, em geral, são insumos baratos e fáceis de serem encontrados (HUNGRIA & CAMPOS, 2016). No Brasil, os inoculantes turfosos são os mais predominantes, visto que a turfa constitui um dos melhores suportes para a preparação de inoculantes em pó. A principal característica é possibilitar a manutenção de elevado número de bactérias viáveis e oferecer proteção física contra as adversidades do solo. Em geral, as turfas são de origem de solos aluviais orgânicos e ácidos (BRANDÃO JÚNIOR & HUNGRIA, 2000; BIZZARO, 2004; ZILLI *et al.*, 2010). Os inoculantes líquidos, podem ser aplicados via semente ou via sulco de semeadura enquanto que o inoculante em pó molhável, consiste em produtos contendo bactérias liofilizadas em um substrato sólido (BIZZARO, 2004; HUNGRIA & CAMPOS, 2016).

A busca por diferentes tipos de inoculantes se dá pela necessidade de reduzir os custos de produção e obter produtos que sejam de fácil aplicação. Porém, é necessário que os novos veículos atendam aos requisitos necessários para darem proteção para as estirpes, proporcionando o habitat ideal para as células se manterem viáveis, ou seja, ter

alta retenção de umidade, ausência de toxidez para os microrganismos, boa adesão às sementes e facilidade de processamento (BRANDÃO JÚNIOR & HUNGRIA, 2000; SCHUH, 2005). Para que o inoculante tenha êxito em sua ação, é preciso que os microrganismos escolhidos tenham uma boa capacidade de competição, assim como, precisam ter uma boa viabilidade, mesmo em ambientes adversos, mostrando sua qualidade no momento de uso (BRANDÃO JÚNIOR & HUNGRIA, 2000). Segundo O'Callaghan (2016), ter diferentes estirpes que possuem diferentes modos de ação em um único inoculante pode melhorar o rendimento da planta em comparação ao inoculante que possua somente um tipo de agente ativo. Um exemplo citado por O'Callaghan (2016), é o inoculantes que faz o uso de diferentes agentes de biocontroles com diferentes alvos e modo de ação, podendo assim, melhorar as questões das variáveis ambientais em campo. Mesmo que o inoculante e as estirpes escolhidas preencham todos os requisitos para um bom inoculante, é necessário fazer diversos testes visto que fatores ambientais podem influenciar negativamente a ação do produto (ZILLI *et al.*, 2010).

O MAPA não restringe a utilização de nenhum material como veículo de inoculante no Brasil, desde que o mesmo seja capaz de atender às determinações técnicas (ZILLI *et al.*, 2010). Graças a esta inexistência de restrição, diversos trabalhos estão sendo desenvolvidos, a fim de serem obtidos novos tipos de veículos para os inoculantes (ZILLI *et al.*, 2010). Neste projeto buscamos usar um substrato barato, que seja de fácil aderência, ou seja, que consiga dar suporte para as estirpes. Além do mais, que tenha a capacidade de ser esterilizado, liofilizado, que seja uma fonte de carbono para as estirpes, e que tenha a capacidade de reter água, após o processo de liofilização. A escolha adequada do substrato para o inoculante é extremamente necessária, pois com a ajuda dele é possível manter a viabilidade das células por mais tempo.

## 1.7 Justificativa

Conforme mencionado, o 2,4-D é um herbicida tóxico e amplamente utilizado nas lavouras brasileiras. Devido a isso, é necessário minimizar a contaminação das áreas em contato com esse agrotóxico, visto que a aplicação deste herbicida não fica segregada em um só ambiente (solo). O agrotóxico se move, podendo contaminar também as águas superficiais e subterrâneas. A formulação de um produto com ação biorremediadora poderia nos ajudar a diminuir esse problema de contaminação dos solos. Porém, um produto com tal ação, não seria visto como algo necessário para os agricultores, visto que seria mais um aditivo que encareceria o processo produtivo. Muitos agricultores não possuem uma visão de conservação ambiental, nem mesmo para assegurar seu próprio processo produtivo. Sob este ponto de vista, um produto com a finalidade exclusiva de biorremediação não seria um produto de uso dos agricultores em suas lavouras, pois traria benefícios que não podem ser facilmente contabilizados e que aumentam indiretamente a produtividade e, conseqüentemente, o lucro. Devido aos motivos mencionados, foi elaborada uma formulação com dupla ação, uma de biocontrole de pragas agrícolas e outra de biorremediação. Os produtos para biocontrole são necessários e utilizados em plantações para matar as pragas agrícolas que causam danos às lavouras. Uma vez que tenhamos um produto com uma ação que o mercado necessita (biocontrole), é mais fácil introduzirmos uma outra ação (biorremediadora) a esse produto e, assim, fazermos com que o produto seja produzido e comercializado. Utilizamos para esse inoculante agrícola uma estirpe padrão para biocontrole (*B. thuringiensis*) e para a biorremediação foi utilizada a estirpe do gênero *Enterobacter* sp. que possui ação de degradar o herbicida 2,4-D. Após a elaboração do bioproduto, teve-se como necessidade analisar os genomas das estirpes bacterianas para que pudessem ser melhor entendidas as possíveis rotas de degradação destes microrganismos.

Desenvolver formulações à base de microrganismos é uma biotecnologia que requer anos de pesquisa e dedicação. O potencial desta formulação para se transformar em um produto comercial de inoculante é grande. Portanto, este trabalho buscou otimizar a formulação de um bioproduto de biorremediação e biopesticida com função *eco-friendly* para que fosse um agente de recuperação de ambientes contaminados por agrotóxicos, principalmente o 2,4-D.

## 1.8 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo otimizar a produção de inoculante agrícola em consórcio entre as estirpes *B. thuringiensis* e *Enterobacter* sp. com ação de biocontrole de pragas agrícolas e biorremediação do Ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D); e de buscar e compreender as origens genéticas da atividade de biorremediação *B. thuringiensis*, *Enterobacter* sp. e *Ochrobactrum* sp.

### 1.8.1 Objetivos específicos

#### 1ª Etapa: Otimização do inoculante bacteriano

- Identificar as estirpes bacterianas que possuem a capacidade de degradar o herbicida 2,4-D;
- Caracterizar o crescimento das estirpes bacterianas;
- Determinar a concentração mínima inibitória do 2,4-D para das estirpes bacterianas;
- Analisar a degradação do 2,4-D pelas estirpes bacterianas crescidas em meio mineral contendo 2,4-D como única fonte de carbono por HPLC;
- Aperfeiçoar a produção do inoculante em consórcio com estirpes do gênero *B. thuringiensis* sp. e *Enterobacter* sp.;
- Padronizar o processo de congelamento do inoculante;
- Determinar a viabilidade do inoculante mensalmente até 12 meses após a sua produção para verificar se atende às exigências da legislação brasileira;
- Produção da patente.

#### 2ª Etapa: Análise genômica *in silico* das estirpes bacterianas

- Sequenciamento dos genomas das estirpes bacterianas *Enterobacter* sp. (MG02) e *Ochrobactrum* sp.(DF13)
- Identificação genômica das estirpes bacterianas *Enterobacter* sp.

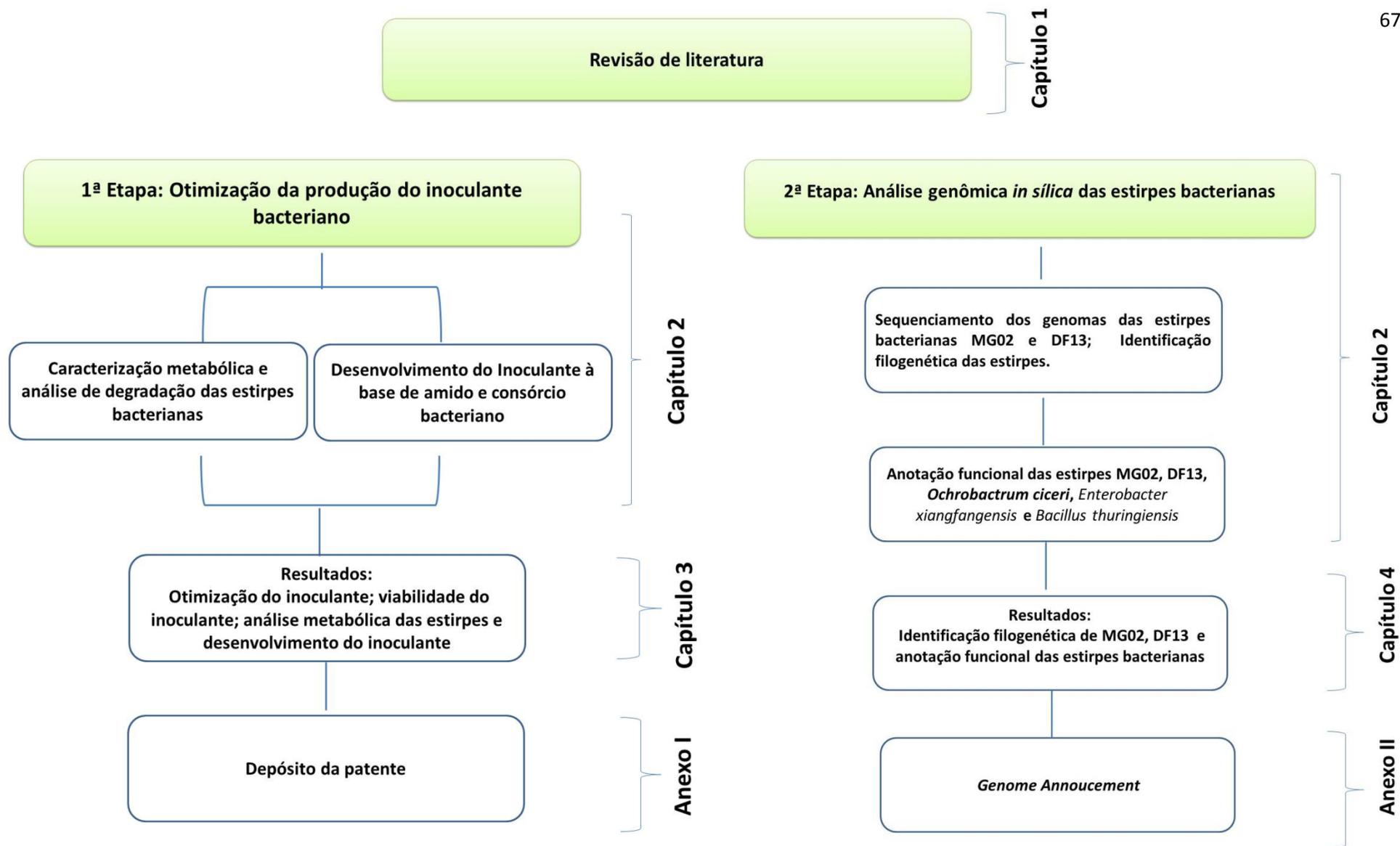
(MG02) e *Ochrobactrum sp.*(DF13)

- Encontrar *in silico*, as possíveis vias metabólicas de degradação dos compostos aromáticos das estirpes bacterianas *B. thuringiensis*, *Enterobacter sp.* (MG02) e *Ochrobactrum sp.*(DF13)
- Encontrar genes específicos responsáveis pela degradação do 2,4-D no genoma das estirpes bacterianas estudadas.
- Estudar enzimas envolvidas no processo de degradação das estirpes bacterianas estudadas;
- Analisar *in silico* os possíveis genes de degradação dos compostos aromáticos das estirpes bacterianas da coleção DSMZ (*E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis*, *O. ciceri* e *B. thuringiensis*).

## CAPÍTULO 2: MATERIAL E MÉTODOS

---

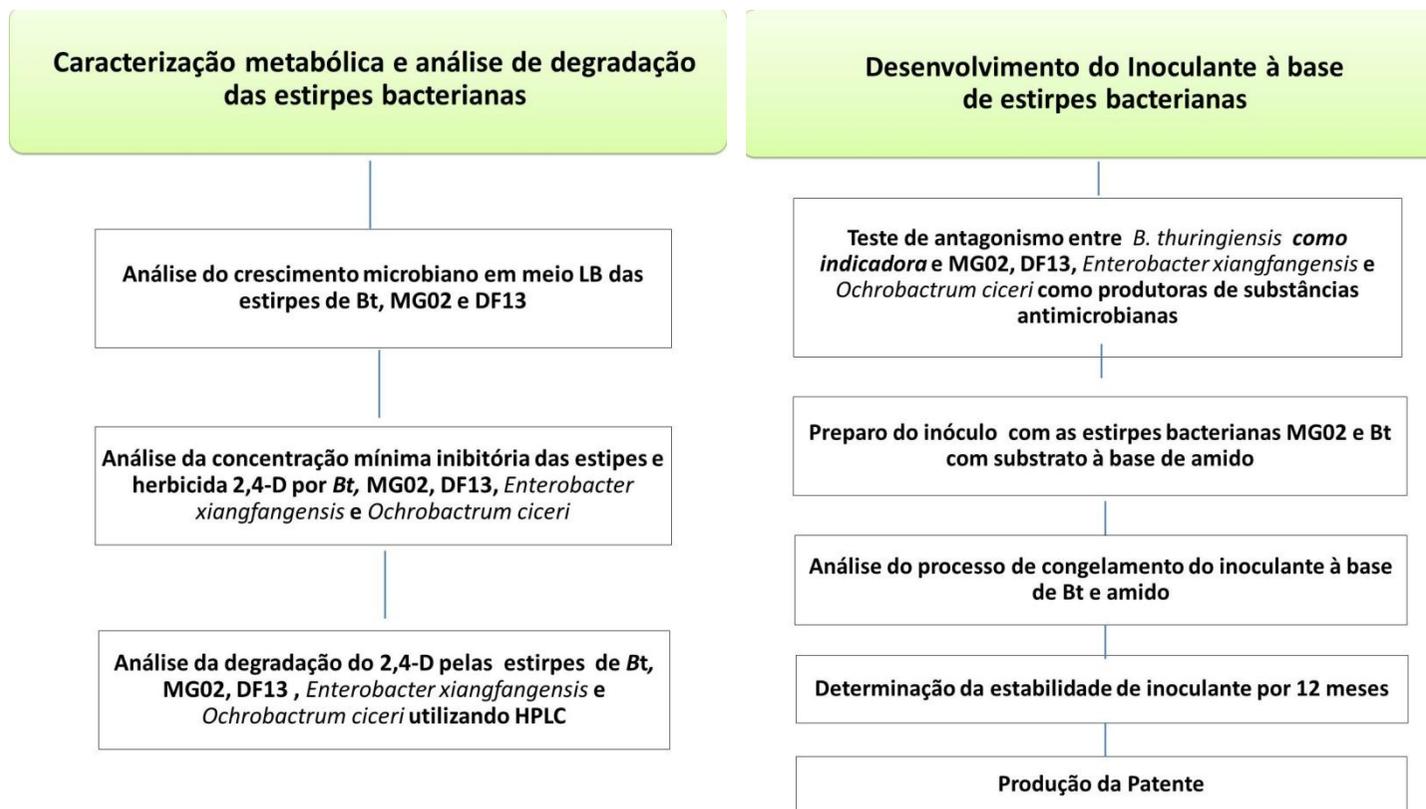
Neste trabalho, o capítulo de material e métodos foi dividido em duas etapas: otimização da produção do inoculante agrícola; e análise *in silico* dos genomas das estirpes bacterianas *Enterobacter* sp. MG02 e *Ochrobactrum* sp. DF13, conforme pode ser visto no esquema da figura 9. Esta tese foi dividida em capítulos: o capítulo 1 engloba a introdução geral e a revisão bibliográfica; no capítulo 2, está a metodologia empregada; no capítulo 3, estão os resultados da 1ª etapa do material e métodos (otimização da produção do inoculante agrícola); no capítulo 4, estão os resultados da 2ª etapa do material e métodos (análise *in silico* dos genomas das estirpes bacterianas *Enterobacter* sp. MG02 e *Ochrobactrum* sp. DF13); e, no capítulo 5, está a discussão dos resultados dos capítulos 3 e 4. Nos anexos, estão presentes dados complementares, além do número do depósito da patente e o artigo publicado.



**Figura 9.** Esquema resumido da estrutura organizacional do documento de tese em capítulos. Capítulo1 - introdução, capítulo 2 - material e métodos em duas etapas, capítulo 3- são os resultados dos dados relacionados ao inoculante, o capítulo 4 - são os resultados

## 2 Metodologia empregada no trabalho

### 1ª Etapa – Otimização da produção do inoculante bacteriano



**Figura 10.** Fluxograma da 1ª etapa do material e métodos referente à otimização da produção do inoculante bacteriano

## **2.1 Caracterização metabólica e análise da degradação do 2,4-D pelas estirpes bacterianas**

A caracterização metabólica é necessária para conhecer o metabolismo das estirpes bacterianas, entender suas fases de crescimento em meio rico (LB) e ter dados reais sobre a tolerância das células na presença do 2,4-D, uma vez que dependendo da concentração pode haver danos às células bacterianas.

### **2.1.1 Estirpes bacterianas empregadas nos experimentos**

As estirpes bacterianas *Enterobacter* sp. MG02 e *Ochrobactrum* sp. DF13 foram selecionadas anteriormente por Peckle (2015), pois apresentaram capacidade de degradar 2,4-D. O *B. thuringiensis* (ATCC 33679) foi cedido pela Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ e foi utilizada neste trabalho por ser uma estirpe padrão para o biocontrole de pragas. Devido a lei da Biodiversidade nº 13.123, houve a necessidade de comprar estirpes que pudessem ser utilizadas sem infringir a legislação, sendo assim, as bactérias MG02 e DF13, oriundas da coleção de cultura do laboratório LBSBM, foram previamente identificadas pelo gene 16S rDNA e as estirpes: *Enterobacter hormaechei* subsp *xiangfangensis* (DSM 101093), *Ochrobactrum ciceri* (DSMZ 22292) e *B. thuringiensis* (DSMZ 2046) foram comparadas (tabela 2). As mesmas fizeram parte dos testes como uma alternativa viável para o desenvolvimento do trabalho, uma vez que não estavam sujeitas a Lei de Acesso ao Patrimônio Genético 13.123/2015, conforme já mencionado. Contudo, elas não participaram da formulação do inoculante pois não foi necessário utilizá-las como segundo plano para o andamento do projeto.

**Tabela 2.** Dados das estirpes bacterianas empregados no estudo.

<b>Estirpe</b>	<b>Número de Acesso</b>	<b>Origem</b>	<b>Informações Adicionais</b>
<i>Enterobacter</i> sp. MG02	GCA_020526705.1	LBSBM	Inoculante/Ação biorremediadora
<i>Ochrobactrum</i> sp. DF13	GCA_020526685.1	LBSBM	Ação biorremediadora
<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i> (DSMZ 101093)	GCA_001729785.1 (LMG27195)	DSMZ / LMG27195	Ação biorremediadora
<i>Ochrobactrum ciceri</i> (DSMZ 22292)	GCA_012103155.1 (DSM 22292)	DSMZ / NCBI	Ação biorremediadora
<i>Bacillus thuringiensis</i> (ATCC 33679)	<a href="https://genomes.atcc.org/genomes/083ae500aa96494c?_ga=2.256058507.1661358906.1669768373-361590115.1669768373">https://genomes.atcc.org/genomes/083ae500aa96494c?_ga=2.256058507.1661358906.1669768373-361590115.1669768373</a>	ATCC / Site ATCC	Inoculante/Ação pesticida
<i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner 1915 – (DSMZ 2046)	GCA_000161615.1 (ATCC 10792)	DSMZ / ATCC 10792/ NCBI 9134	Ação pesticida
<i>Cupriavidus pinatubonensis</i> JMP134	GenBank: gb AY365053.1	NCBI	Organismo Modelo

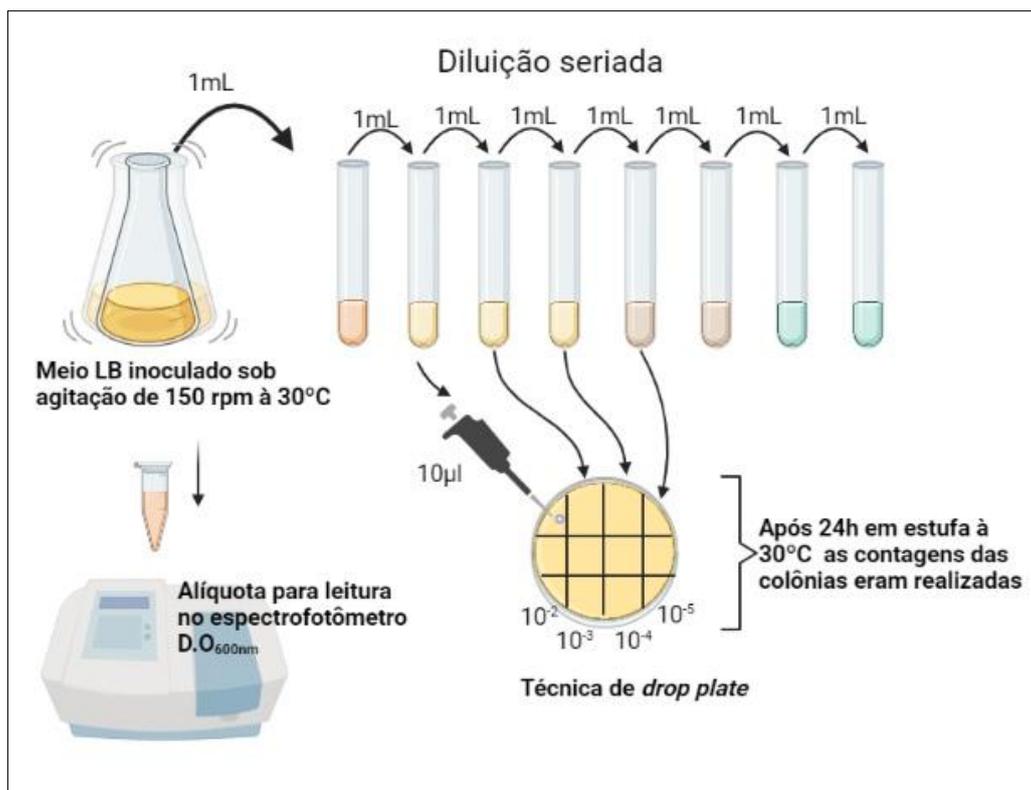
### 2.1.2 Cultivo e armazenamento dos isolados

As bactérias oriundas da coleção do laboratório (DIREITO, 2009) foram previamente estocadas em glicerol 30% e meio LB enriquecido com 2,4-D. O 2,4-D utilizado em todos os experimentos foi produto da marca Sigma-Aldrich® (>98% de pureza), massa molar de 221.04 e fórmula  $2,4-(Cl)_2C_6H_3OCH_2COOH$ .

Para fazer o estoque destas bactérias, foi realizado o cultivo em meio LB líquido enriquecido com  $0,3g.L^{-1}$  de 2,4-D a 30° C. Após 48 horas de incubação, cada tubo de ensaio foi homogeneizado e, em seguida, concentrado em microtubo de 2 mL, após centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e operação de lavagem foi repetida. Após uma segunda centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 0,5 mL de meio LB líquido enriquecido com  $0,3g.L^{-1}$  de 2,4-D e 0,5 mL de glicerol 30% (PECKLE, 2012). Após este processo, os isolados foram armazenados em tubos estocados em freezer a -20° C. As bactérias foram ativadas utilizando meio de cultura líquido Luria-Bertani (LB) (SAMBROOK *et al.*, 1989). Em seguida, a pureza das culturas foi verificada por meio do plaqueamento empregando a técnica de estriamento por esgotamento em meio LB sólido e também por coloração de Gram. As estirpes foram repicadas para meio LB enriquecido com 2,4-D na concentração de  $0,3g.L^{-1}$  até a realização do experimento. A incubação das bactérias foi sempre realizada em estufa à 30°C.

### 2.1.3 Curva de crescimento e determinação de UFC das células

As estirpes bacterianas foram crescidas em meio LB líquido sob agitação por 12h. Após, as estirpes foram transferidas para frascos *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 300 mL de meio LB líquido estéril, a 30°C sob agitação de 150 rpm. A cada duas horas foram retiradas as alíquotas que foram analisadas no espectrofotômetro, e lidas as densidades óptica-  $D.O_{600nm}$ - das células bacterianas. Essas mesmas alíquotas passaram por diluições seriadas (proporção 1:10), utilizando tubos de ensaio com solução salina estéril a 0,85% cada e, plaqueamento com 10µl, utilizando a técnica *drop plate*, em meio LB sólido para que pudesse ter os dados de UFC das colônias. Todo experimento foi realizado em triplicata  $n=3$  e as diluições foram plaqueadas de  $10^{-2}$  a  $10^{-9}$ , podendo ser visto o esquema na figura 11.



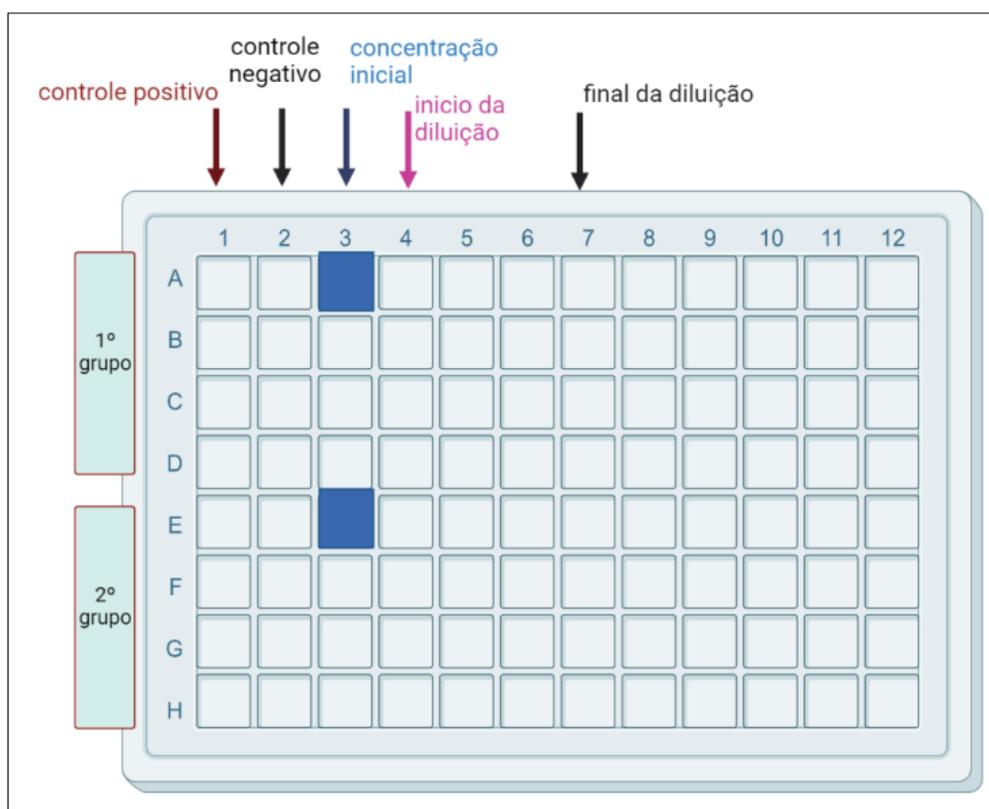
**Figura 11.** Esquema do experimento de curva de crescimento das estirpes empregadas no experimento. O esquema mostra meio LB líquido inoculado, que passa por diluição seriada. Em seguida, as diluições são plaqueadas em meio LB sólido, utilizando a técnica drop plate com crescimento pelo período de 24h. A contagem da UFC foi feita manualmente. O meio LB inoculado também passou por leitura no espectrofotômetro para analisar o crescimento microbiano em D.O

#### 2.1.4 Concentração Mínima Inibitória (MIC) de 2,4-D para as estirpes *Enterobacter* sp. MG02 e *Ochrobactrum* sp. DF13

As estirpes bacterianas da coleção LBSBM (MG02 e DF13) passaram pelo teste de Concentração Mínima Inibitória para saber qual concentração de 2,4-D as inibem, visando verificar se as estirpes seriam inibidas pelas concentrações do 2,4-D encontrado em solos agrícolas.

Para MIC foi utilizado o protocolo modificado da Oliveira *et al.* (2009), no qual utilizou-se uma microplaca de 96 poços. Para o teste foi adicionado 100 µL de meio LB nas colunas de controle positivo, negativo e nas colunas subsequentes as das concentrações iniciais. A placa foi dividida em dois grupos com duas concentrações iniciais do herbicida 2,4-D: 2,0g.L<sup>-1</sup> e 3,0g.L<sup>-1</sup>. No primeiro grupo utilizou as

concentrações de  $2,0\text{g.L}^{-1}$ ;  $1,0\text{g.L}^{-1}$ ;  $0,5\text{g.L}^{-1}$  e  $0,25\text{g.L}^{-1}$ . Já no segundo grupo as concentrações foram  $3,0\text{g.L}^{-1}$ ;  $1,5\text{g.L}^{-1}$ ;  $0,75\text{g.L}^{-1}$  e  $0,375\text{g.L}^{-1}$ . Nos poços das concentrações iniciais foram adicionados  $300\ \mu\text{L}$  de meio LB contendo 2,4-D nas concentrações previamente determinadas ( $2,0\ \text{g.L}^{-1}$  ou  $3,0\ \text{g.L}^{-1}$ ). Para inocular os tubos a estirpe bacteriana foi previamente crescida a  $30^\circ\text{C}$  por 4 horas com valor aproximadamente  $10^8$  UFC/mL, o que é necessário para a realização do teste de MIC. Tanto na coluna de controle positivo quanto nas colunas das concentrações foram inoculadas  $1\ \mu\text{L}$  da estirpe bacteriana nos poços. Todo esquema da metodologia pode ser visto na figura 12. O experimento durou 24 horas.



**Figura 12.** Esquema da microplaca utilizada na diluição do herbicida 2,4-D em LB para testar o MIC das estirpes bacterianas *Enterobacter* sp. MG02 e *Ochrobactrum* sp. DF13. A coluna 1 (linha A) foi utilizada como controle positivo - meio LB e a bactéria escolhida. A coluna 2 (linha A) foi o controle negativo - somente meio LB estéril. Na coluna 3 (linha A - 1º grupo) a concentração inicial do 2,4-D foi de  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ , já as colunas ao lado foram colocadas as seguintes concentrações de 2,4-D:  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ . Na coluna 3 (linha E - 2º grupo) foi colocado a concentração inicial de  $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ , já nas colunas ao lado foram colocados as seguintes concentrações:  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $0,75 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,375 \text{ g.L}^{-1}$ . Em cada poço com conteúdo meio LB líquido acrescido das concentrações de 2,4-D, foi inoculada a estirpe bacteriana escolhida para verificar o MIC. (Criado no Biorender.com).

### 2.1.5 *Screening* de resistência ao 2,4-D pelas estirpes bacterianas *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis*, *O. ciceri* e *B. thuringiensis* oriundas da coleção DSMZ

Conforme mencionado anteriormente, as estirpes bacterianas da coleção DSMZ foram compradas com o propósito de serem uma alternativa para continuação desta pesquisa. Contudo, antes de testá-las em um longo experimento de degradação, as

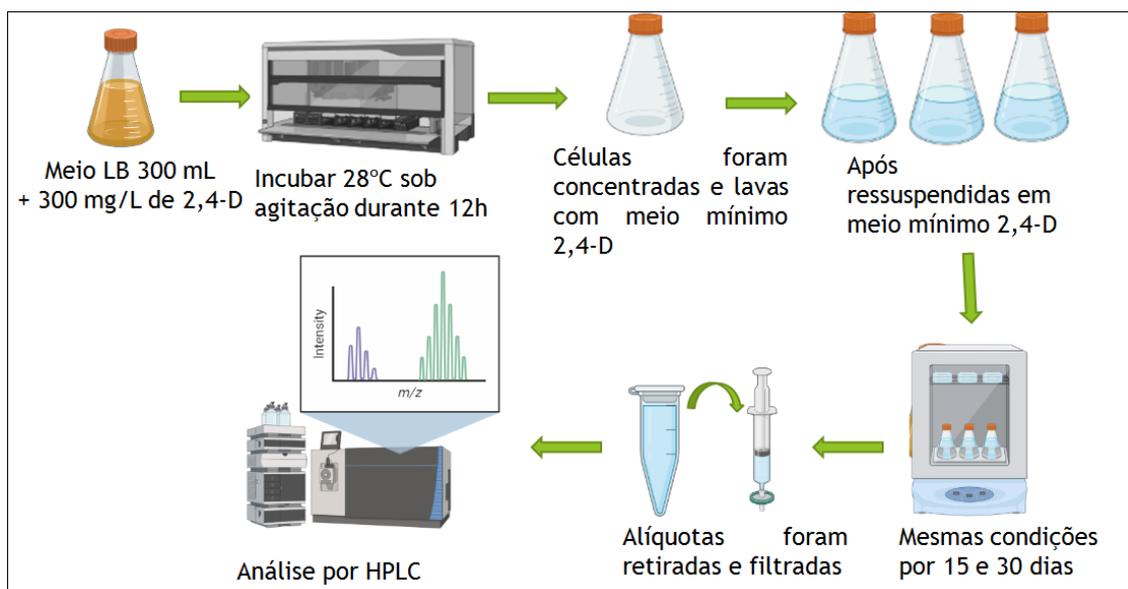
estirpes bacterianas *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSM 101093), *O. ciceri* (DSMZ 22292) e *B. thuringiensis* (DSMZ 2046) participaram de um teste piloto (*screening*) para verificar se cresciam em altas concentrações de 2,4-D. O 2,4-D utilizado foi Sigma-Aldrich® (>98% de pureza). As estirpes bacterianas foram crescidas em meio LB sob agitação a 150 rpm a 30°C por 24h. Em seguida, as células foram concentradas e transferidas para *erlenmeyer* de 250 mL contendo 100 mL de meio LB até chegar no mínimo de 0.1 de densidade óptica (D.O) de leitura (600<sub>nm</sub>). Os *erlenmeyers* contendo 100 mL de meio LB eram acrescentados com as seguintes concentrações do produto de 2,4-D: 0,5 g.L<sup>-1</sup> e 1 g.L<sup>-1</sup>. Todo o experimento foi realizado em triplicata. Durante o período de 0, 2, 4, 6 e 8 ou 9 horas foram retiradas alíquotas para leitura em espectrofotômetro e verificar o crescimento das células por D.O

#### **2.1.6 Análise da degradação do herbicida 2,4-D pelas estirpes bacterianas**

Para este experimento foram testadas as estirpes bacterianas *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSMZ 101093), *O. ciceri* (DSMZ 22292) e *B. thuringiensis* (DSMZ 2046), *Enterobacter* sp. MG02, *Ochrobactrum* sp. DF13 e *B. thuringiensis* (ATCC 33679). As estirpes *Enterobacter* sp. MG02, *Ochrobactrum* sp. DF13 e *B. thuringiensis* (ATCC 33679) foram mantidas em glicerol com 2,4-D para que não perdessem capacidade de degradar o herbicida. As bactérias foram inoculadas em 300 mL de meio Luria-Bertani (LB) com a adição de 0,3 g.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e incubada a 28°C sob agitação de 150 rpm durante 12 horas (n = 3). Em seguida, as bactérias foram lavadas com meio mínimo 2,4-D descrito por Füsclin *et al.* (2003). As células bacterianas foram então ressuspensas em meio mínimo contendo 0,5 g.L<sup>-1</sup> de 2,4-D. Após, as células foram transferidas para meio mínimo 2,4-D (0,5 g.L<sup>-1</sup>), sendo o 2,4-D a única fonte de carbono deste meio. Para o controle negativo, tubos com meio mínimo 2,4-D sem inóculo foram submetidos às mesmas condições do experimento. Todo o experimento, incluindo controle, foram feitos em triplicata.

As bactérias foram mantidas sob agitação (150 rpm) a 28°C por 30 dias. Durante o tempo de 15 e 30 dias foram retiradas alíquota, as amostras foram filtradas em filtro de porosidade 0,22 µm para a retirada das células bacterianas. A amostra filtrada foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC) para analisar a

degradação. O esquema gráfico do experimento pode ser visto na figura 13. A coluna empregada foi da marca Agilent® modelo Zorbax Eclipse XDB- C8, com 150 mm x 4,6 mm de diâmetro na fase estacionária (fase reversa) foi utilizado com grânulos irregulares de 5 µm de diâmetro. Para a fase móvel, foi utilizado água ultrapura acidificada com ácido fórmico a 0,1% (v/v) (85% de pureza) e acetonitrila (99,9% de pureza grau HPLC, Merck®) acidificada com ácido fórmico a 0,1% (v/v). A metodologia empregada para a análise de HPLC foi a mesma descrita por Costa *et al.* (2020). A modificação feita em relação à metodologia foi a adição de 2 minutos para o tempo de execução cromatográfica para cada amostra, sendo 17 minutos. Injetou-se 80 µL de sobrenadante filtrado na coluna cromatográfica e a corrida cromatográfica e a leitura foi realizada a 282 nm; já o meio inoculado com a estirpe de *B. thuringiensis* foi injetado 20 µL e a leitura realizada em 254 nm.



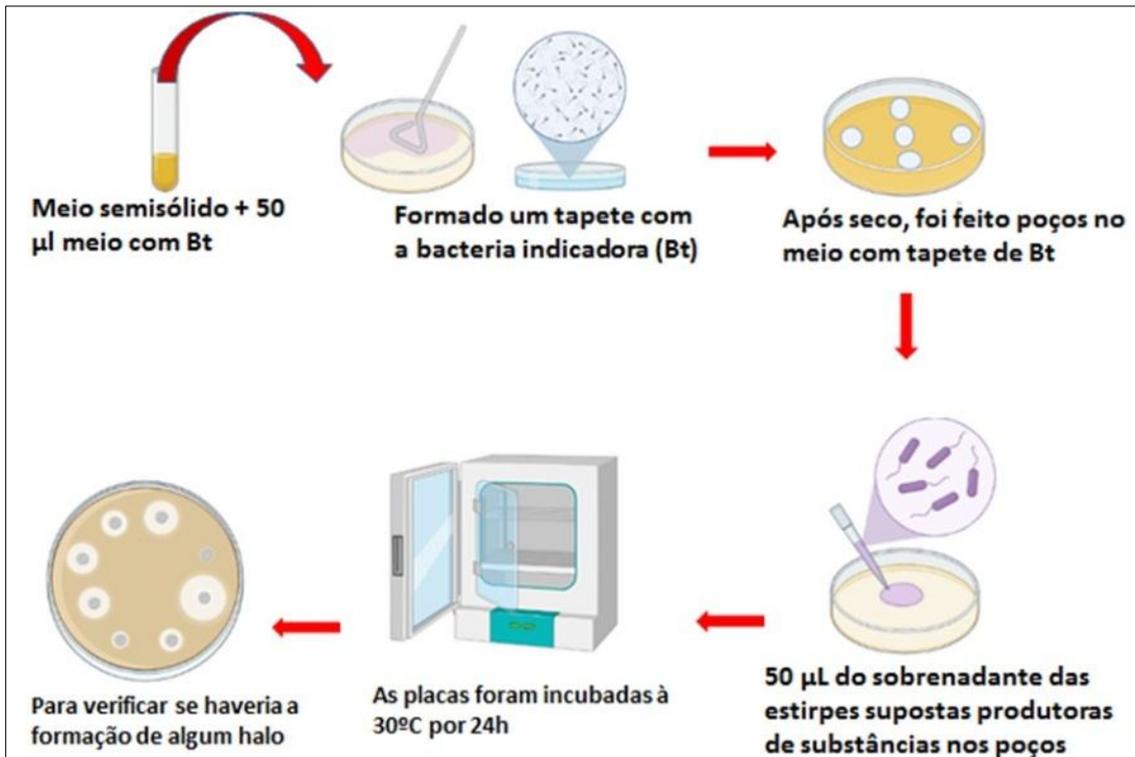
**Figura 13.** Esquema do experimento da análise de degradação do herbicida 2,4-D pelas estirpes bacterianas. Meio LB líquido acrescido com 300 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D inoculado com estirpe bacteriana escolhida. Após o crescimento microbiano, as células foram passadas para meio mínimo 2,4-D como única fonte de carbono. Aliquotas foram retiradas nos período de 15 e 30 dias depois de inoculadas. As alíquotas foram analisadas em HPLC, técnica que mostra a degradação do 2,4-D pelas estirpes bacterianas.

## 2.2 1ª ETAPA - Desenvolvimento do inoculante à base de estirpes bacterianas

Após realizar todos os experimentos para caracterização metabólica e análise da degradação do 2,4-D, as estirpes bacterianas foram testadas no experimento de antagonismo para a verificação da produção de substância antimicrobiana. Por último, as estirpes bacterianas selecionadas - *Enterobacter* sp. MG02 e *B. thuringiensis* (ATCC 33679) - participaram da formulação do inoculante agrícola, e à vista disso foi avaliada a viabilidade das células bacterianas no inoculante.

### 2.2.1 Teste de antagonismo entre estirpes do mesmo inoculante

O teste de antagonismo foi realizado por meio da técnica descrita por Vanden Berghe & Vlietinck (1991), cujo esquema pode ser visto na figura 14. Neste experimento, as bactérias usadas como indicadores foram as duas cepas de *B. thuringiensis* (Bt) (ATCC 33679) e (DSMZ 2046). Já as estirpes de *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSM 101093), *O. ciceri* (DSM 22292), *Enterobacter* sp. MG02 e *Ochrobactrum* sp. DF13 (chamadas de produtoras) foram inseridas no experimento para saber se inibem o crescimento das estirpes de Bt. Neste teste de antagonismo, busca-se avaliar se as estirpes de Bt são inibidas por substâncias produzidas pelas estirpes de *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSM 101093), *O. ciceri* (DSM 22292), *Enterobacter* sp. MG02 e *Ochrobactrum* sp. DF13. Primeiramente, foi formado um tapete com a estirpe indicadora na placa de Petri contendo meio Luria-Bertani (LB). Para isso, foi necessário coletar uma alíquota de 50 µL de cultura de Bt crescida em meio LB por 24 horas, a qual foi passada para tubo de rosca com quatro mL de meio LB semissólido (1% de ágar) em estado líquido. Após agitar, este tubo foi vertido sobre o meio sólido em placa de Petri, formando-se um tapete com a bactéria indicadora. Após a confecção do tapete com a estirpe indicadora, foram feitos pequenos poços nesta placa, nos quais se aplicaram 50µL do sobrenadante das estirpes nomeadas como produtoras. A placa ficou aberta no fluxo laminar para secar. As placas foram, então, incubadas em estufa de 30°C por 24 horas para verificar a presença de algum halo de inibição ou impedimento de crescimento da estirpe indicadora, mostrando um possível antagonismo entre Bt e as demais estirpes bacterianas. Foram realizados dois experimentos distintos para cada estirpe bacteriana de *B. thuringiensis* (ATCC 33679 e DSMZ 2046) como indicadora.

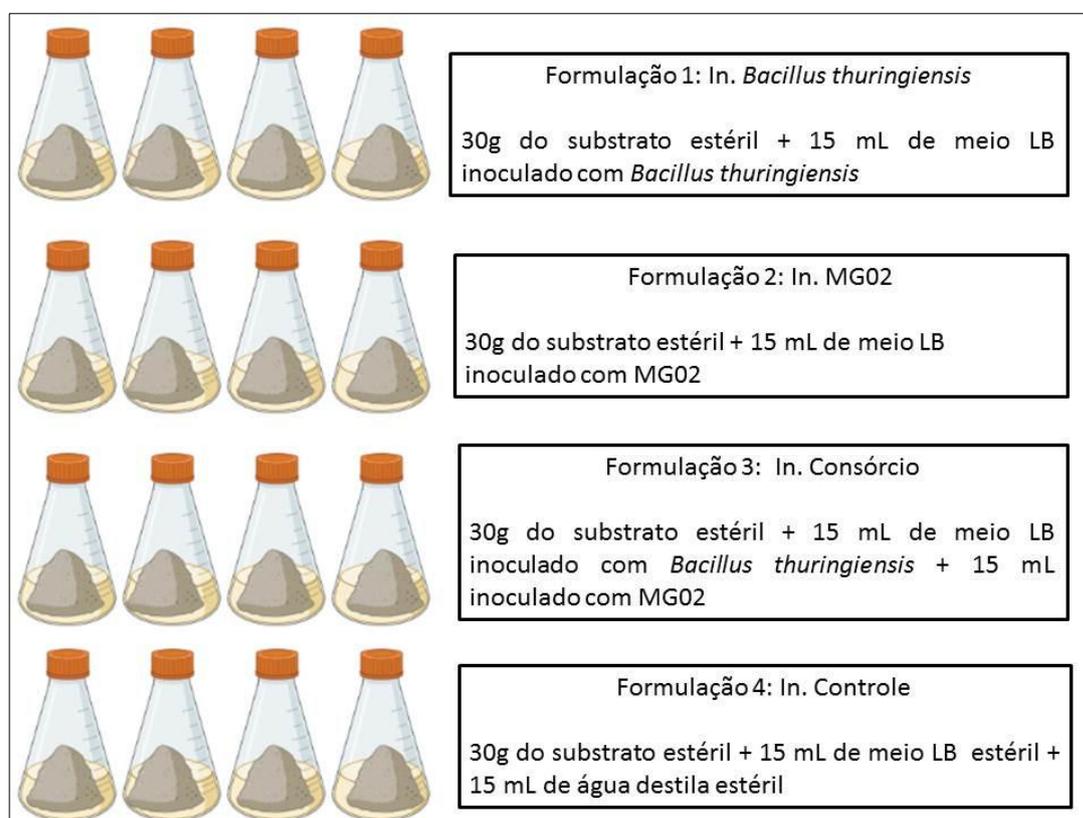


**Figura 14.** Esquema do teste de antagonismo realizado com a estirpe bacteriana *B. thuringiensis* como indicadora e as estirpes bacterianas *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSM 101093), *O. ciceri* (DSM 22292), *Enterobacter* sp. MG02, e *Ochrobactrum* sp. DF13 como produtoras de substâncias antimicrobianas.

### 2.3 Formulação do inoculante com as estirpes bacterianas *Enterobacter* sp. MG02 e *B. thuringiensis* (ATCC 33679)

Quatro formulações foram elaboradas conforme visto figura 15. A primeira formulação foi feita com substrato, meio LB, água e *B. thuringiensis*; a segunda formulação foi realizada com substrato, meio LB, água e a estirpe *Enterobacter* sp. MG02; na terceira formulação foi usado a estirpe bacteriana *B. thuringiensis*, *Enterobacter* sp. MG02, substrato, meio LB e água; já na quarta formulação, foi preparada com o substrato, meio de cultura e água (controle sem estirpe bacteriana). Na formulação 1, foi adicionado 15 mL da suspensão bacteriana de *B. thuringiensis* no substrato; na formulação 2, adicionou 15 mL da suspensão bacteriana da estirpe *Enterobacter* sp. MG02 no substrato; na formulação 3, adicionou 15 mL da suspensão bacteriana de *B. thuringiensis* e 15 mL da suspensão bacteriana da estirpe *Enterobacter* sp. MG02 no substrato; enquanto que na formulação 4, foi adicionado 15 mL de meio LB e 15 mL de água destilada no substrato. Após a inoculação, as formulações foram incubadas em estufa a 30° C durante 7 dias para que as bactérias crescessem no

substrato. Antes do processo de liofilização, a concentração das células bacterianas foi de  $10^{10}$  UFC.g<sup>-1</sup>. Todas as formulações foram realizadas em quadruplicada (n=4). Após o período de 7 dias, o inoculante sofreu processo de congelamento na temperatura de -20°C, pelo período de 1h e 30 minutos. Em seguida, as formulações já congeladas, passaram pelo processo de liofilização utilizando o modelo K120 da marca LIOTOP, nas condições de -91°C e 212 Vca, pelo período de 72 horas, seguindo o protocolo descrito por SILVA *et al.* (2018). Esse processo é necessário para que o produto tenha uma vida útil de prateleira muito maior, e também potencializa a sobrevivência das células.

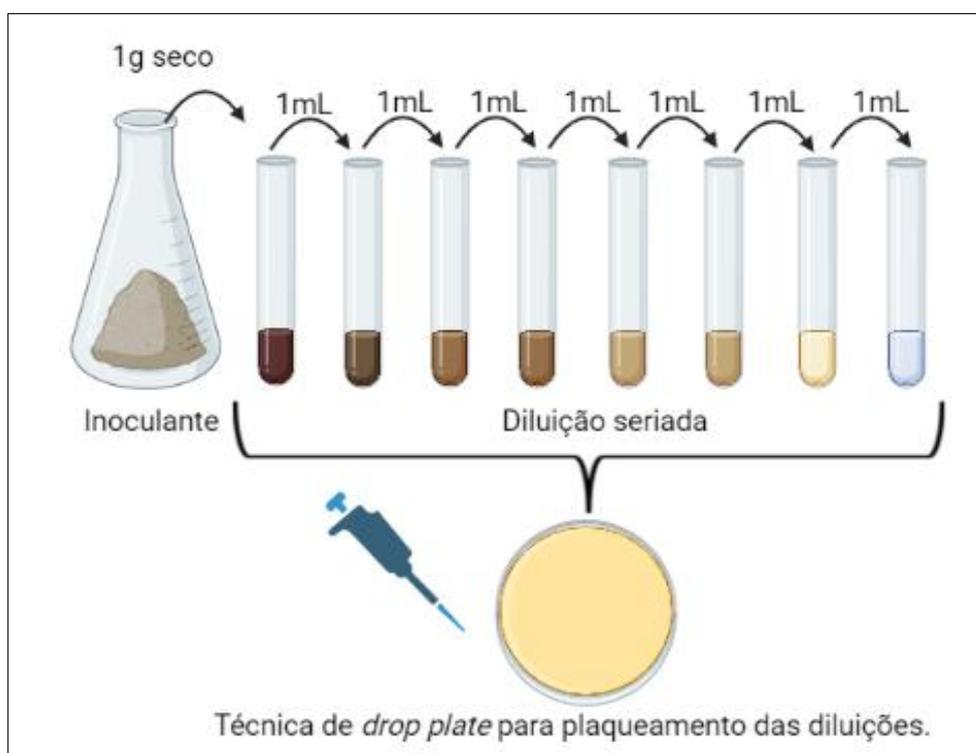


**Figura 15.** Esquema da formulação do inoculante. Formulação 1- inoculante à base de *B. thuringiensis*; formulação 2- inoculante à base a estirpe *Enterobacter* sp. MG02, formulação 3- inoculante em consórcio *Enterobacter* sp. MG02 e *B. thuringiensis* e formulação número 4 - inoculante controle.

\*In Bt - Inoculante à base de *B. thuringiensis* ; In. E.x - Inoculante à base de da estirpe bacteriana *Enterobacter* sp. MG02; In. consórcio - Inoculante à base de *B. thuringiensis* e *Enterobacter* sp. MG02

### 2.3.1 Análise da viabilidade das células no inoculante formulado pelo período de 365 dias

A viabilidade do inoculante foi avaliada no período de 30, 60, 90 e 365 dias após o processo de liofilização, o esquema pode ser visto na figura 16. O inoculante foi estocado em prateleira comum do laboratório em temperatura ambiente, variando entre 15 e 35°C (22° C durante o dia com ar condicionado ligado) e em contato com a luz elétrica (fotoperíodo entre 8 a 12 horas por dia) disponível no laboratório durante os dias. A cada 30 dias foram realizadas as diluições seriadas (descrita no tópico 2.1.4), 1g do inoculante foi adicionado em um tubo contendo 9 mL de solução salina estéril a 0,85% (NaCl). As diluições foram realizadas, em seguida, foram plaqueadas em meio LB (figura 16). Após, as placas foram incubadas a 30° C por 24h. As contagens da UFC foram realizadas manualmente. Todo procedimento de diluição seriada e contagem UFC também foi realizado com grupo controle.



**Figura 16.** Esquema da diluição seriada do inoculante agrícola para determinar UFC. Diluição seriada na proporção 1:10 de solução salina estéril na concentração de 0,85%, diluições foram realizadas de 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-9</sup> e foi utilizado para o plaqueamento a técnica de *drop plate* (ilustração criada no Biorender).

Para realizar os cálculos de UFC do inoculante antes e após o processo de liofilização foram realizados cálculos para compensar a diferença, uma vez que a quantidade de ingrediente ativo em 1g da massa fresca\* é diferente de 1g da massa seca do inoculante. Portanto, 0,46g da massa seca\* é igual a 1g da massa fresca Foi aplicada a seguinte fórmula para determinar a UFC do inoculante.

\*massa fresca - inoculante antes do processo de liofilização (substrato úmido contendo meio LB líquido e água líquida)

\*massa seca – inoculante após o processo de liofilização

Onde:

$$N = UFC \times FD \times 100$$

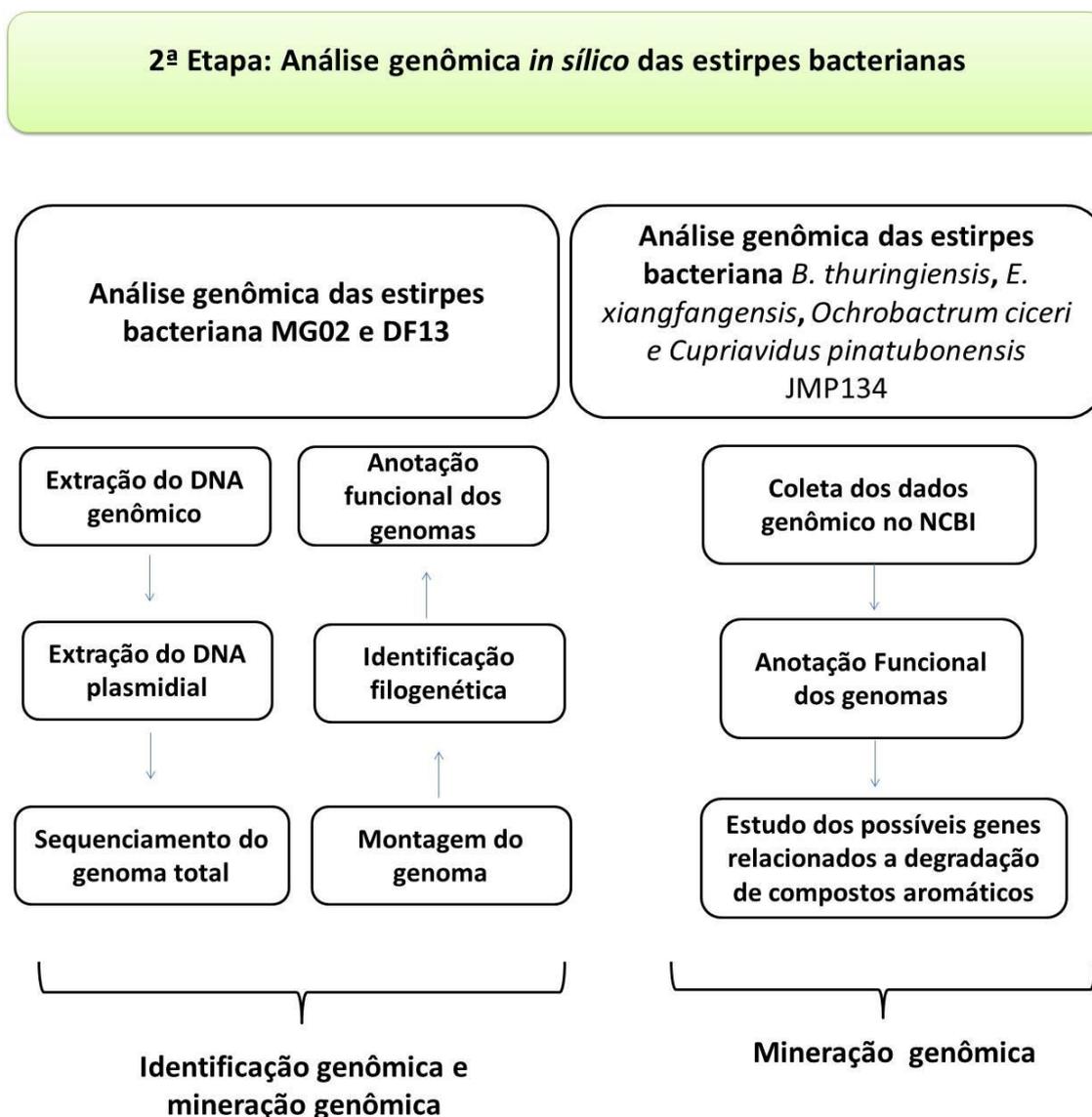
N- Número de UFC por mL ou g. do inoculante;

UFC- Unidade Formadora de Colônia;

FD- Fator de diluição;

100- Fator a ser multiplicado por 100, refere-se à unidade a ser multiplicada para extrapolação do número de células viáveis por mililitro.

## 2.4 2ª Etapa: Análise genômica *in silico* das estirpes bacterianas



**Figura 17.** Fluxograma da 2ª etapa do material e métodos - Análise genômica *in silico* das estirpes bacterianas. O primeiro fluxograma mostra as etapas da análise genômica das estirpes bacterianas *Enterobacter* sp. MG02 e *Ochrobactrum* sp. DF13, onde se fez a identificação e análise funcional, com o objetivo de buscar genes de interesse e rotas alternativas de compostos aromáticos. O segundo fluxograma, apresenta a análise funcional dos genomas das estirpes bacterianas da coleção DSMZ e *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134, cujo objetivo é o estudo dos genes de degradação de compostos aromáticos.

#### **2.4.1 Extração de DNA genômico (*Whole Genome Sequence*)**

As estirpes bacterianas *Enterobacter* sp. MG02 e *Ochrobactrum* sp. DF13 foram cultivadas em meio LB sólido, foi realizado a técnica de estriamento por esgotamento para obter colônias isoladas, em seguida, foram incubadas a 28°C por 48 horas sob agitação de 150 rpm. O DNA total dos isolados foram extraídos com o kit Purelink genomic DNA mini kit<sup>®</sup> (Invitrogen), eluímos em 200 µL de água ultrapura.

#### **2.4.2 Extração de DNA plasmidial**

As amostras de DNA Plasmidial foram extraídas com o kit Purelink HiPure Plasmidial Miniprep Kit<sup>®</sup> (Invitrogen) e foram eluidas em 50 µL de água ultrapura.

#### **2.4.3 Sequenciamento do genoma completo**

Todas as amostras de DNA foram quantificadas por fluorescência no Qubit<sup>®</sup>. Após a extração do DNA, as amostras foram enviadas para colaboradores onde foram realizados os sequenciamentos. A estirpe bacteriana *Enterobacter* sp. MG02 foi sequenciada no centro de genômica na Universidade de São Paulo (USP), e a estirpe *Ochrobactrum* sp. DF13 foi sequenciada no Laboratório de Microrganismos de Referência - Departamento de Microbiologia no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS- Fundação Oswaldo Cruz. A plataforma utilizada foi a Illumina MiSeq, o preparo da biblioteca foi realizado com kit Nextera XT<sup>®</sup>, tipo de sequenciamento foi *paired-end* e o tamanho de fragmento utilizado foi 2 x 300 pb.

#### **2.4.4 Controle de qualidade e pré-processamento dos dados**

Os dois genomas foram montados com mesmo *pipeline*. Foi utilizado o programa FastQC v0.11.9 (ANDREWS, 2010) para fazer o controle de qualidade das leituras brutas, o qual gera estatísticas básicas dos dados do sequenciamento, como: qualidade das bases, conteúdo GC, quantidades de bases n, níveis de duplicação. Para o pré-processamento dos dados foi utilizado o programa Trim Galore v.0.6.6 (KRUEGER, 2015) a fim de remover leituras com qualidade abaixo de de um escore de 30 e leituras com tamanho menor que 20pb, além de remover a sequência dos adaptadores (CTGTCTCTTATA).

#### 2.4.5 Montagem dos genomas

A montagem do genoma ocorreu com a combinação do método *De novo* com o método por mapeamento com montador MeDuSa v 1.6 (BOSI *et al.*, 2015). A ferramenta *SPAdes* 3.15.0 foi utilizada para fazer a montagem *De novo* do genoma com uso do argumento - - *careful*, que visa reduzir o número de *mismatches* e pequenas *indels* (BANKEVICH *et al.*, 2012). A ferramenta MeDuSa foi utilizada para fazer a organização dos *contigs* da montagem do *SPAdes*. Para isso foram utilizados 27 genomas de referência de *Brucella intermedia/Ochrobactrum intermedia* oriundos do NCBI na tabela 3 estão os números de acesso.

A ferramenta Quast foi utilizada para gerar as estatísticas básicas do genoma como número de *contigs*, tamanho do genoma, N50, L50 e conteúdo GC (MIKHEENKO *et al.*, 2018) A ferramenta *CheckM* foi utilizada para verificar a completude dos genomas montados em relação a genes ortólogos universais de cópia única para linhagens de bactéria (PARKS *et al.*, 2015)

**Tabela 3.** Organismos de referência usados na ferramenta Medusa

Organism Name	Strain	BioSample	Assembly	Size(Mb)	GC%	Scaffolds	CDS
<i>Brucella intermedia</i>	NCTC12171	SAMEA3146534	GCA_900454225.1	4.73	57.70	3	4322
<i>Brucella intermedia</i>	ZJ499	SAMN15946017	GCA_014495725.1	4.75	57.67	2	4424
<i>Brucella intermedia</i>	TD30	SAMN12821291	GCA_008932495.1	4.53	57.80	36	4211
<i>Brucella intermedia</i>	RH4WT92	SAMN12025762	GCA_014138165.1	4.93	57.70	27	4558
<i>Brucella intermedia</i>	TM73	SAMN12821292	GCA_008932475.1	4.44	57.90	67	4128
<i>Brucella intermedia</i>	KCJK1738	SAMN04943269	GCA_001641495.1	4.70	57.70	47	4366
<i>Brucella intermedia</i>	Tara1	SAMN10148457	GCA_009361155.1	4.98	57.40	33	4560
<i>Brucella intermedia</i>	RH1CCR112	SAMN14515434	GCA_013409355.1	4.64	57.70	18	4292
<i>Brucella intermedia</i>	CCUG 39736	SAMN12821288	GCA_008932555.1	4.48	58.20	26	4097
<i>Brucella intermedia</i>	OiC8-6	SAMN12821290	GCA_008932485.1	4.85	57.80	60	4487
<i>Brucella intermedia</i>	CCM 7036	SAMN12821287	GCA_008932575.1	4.85	57.60	83	4429
<i>Brucella intermedia</i>	45999	SAMN15345212	GCA_013375275.1	4.86	57.70	82	4541
<i>Brucella intermedia</i>	isolate	SAMEA6623799	GCA_902825335.1	4.61	57.70	53	4294
<i>Brucella intermedia</i>	LMG 379	SAMN12821289	GCA_008932505.1	4.64	57.70	99	4304
<i>Brucella intermedia</i>	SA148	SAMN04520138	GCA_001917355.1	4.91	57.60	38	4473
<i>Brucella intermedia</i>	T	SAMN04584778	GCA_001637305.1	3.94	57.80	48	3636
<i>Brucella intermedia</i>	isolate	SAMEA6623803	GCA_902825345.1	4.90	57.60	52	4521
<i>Brucella intermedia</i>	isolate	SAMEA6623802	GCA_902825315.1	4.81	57.70	71	4436
<i>Brucella intermedia</i>	CIP 105838	SAMN12500697	GCA_012103055.1	4.88	57.70	5	2241
<i>Brucella intermedia</i>	UBA2471	SAMN06452796	GCA_002342125.1	4.08	58.00	10	
<i>Brucella intermedia</i>	AS04akNAM_66	SAMN13893596	GCA_012839885.1	4.76	57.70	736	4953
<i>Brucella intermedia</i>	BP8.5	SAMN10169096	GCA_003852825.1	2.92	58.40	1,146	3162
<i>Ochrobactrum intermedium</i> 229E	229E	SAMN02470619	GCA_000472165.1	4.81	57.90	378	4249
<i>Ochrobactrum intermedium</i> 2745-2	2745-2	SAMN02592615	GCA_000612245.1	4.80	57.60	95	4438
<i>Ochrobactrum intermedium</i> LMG 3301	LMG 3301	SAMN02472089	GCA_000182645.1	4.73	57.70	4	4219
<i>Ochrobactrum intermedium</i> M86	M86	SAMN04279001	GCA_001996385.1	4.68	57.70	121	4277
<i>Ochrobactrum intermedium</i> M86	M86	SAMN02470612	GCA_000332835.1	5.19	57.90	148	4821

#### 2.4.6 Identificação filogenética

Uma análise preliminar foi realizada no JSpeciesWS com objetivo de realizar uma identificação taxonômica mais rápida (RICHTER *et al.*, 2015). Dessa forma, foi utilizada a análise *Tetra Correlation Search* (TCS), que se baseia na frequência tetra de nucleotídeo e coeficiência de correlação e permite a comparação do genoma de interesse com o conjunto de genomas do banco de dados do servidor (GenomeDB Content)

TETRA (padrões de uso de tetranucleotídeos) e ANI (Identidade Nucleotídica Média) com a plataforma JSpecies (RICHTER *et al.*, 2015).

Para a análise filogenética com 16S rDNA, primeiramente, foram pegas as sequências (arquivo fasta) das espécies válidas dos gêneros *Enterobacter spp.* (<https://lpsn.dsmz.de/genus/enterobacter>) e *Brucella spp.* (<https://lpsn.dsmz.de/genus/brucella>). Após, foram adicionadas as sequências de 16S rDNA das cepas *Enterobacter sp.* MG02 e *Ochrobactrum sp.* DF13, obtidas por meio da ferramenta de identificação de RNAs, Barnap 0.9 (SEEMANN, 2013), para gerar arquivos a serem usados na inferência filogenética com o programa MEGA 11.

Na análise do gênero *Enterobacter spp.* e MG02 foi utilizada a sequência 16S rDNA da bactéria *Escherichia coli* NBRC 102203 AB681728 (<https://lpsn.dsmz.de/species/escherichia-coli>) como gênero externo para enraizar a árvore filogenética. A inferência filogenética foi realizada no programa Mega 11 (TAMURA *et al.*, 2021). Neste programa, alinharam-se as sequências por meio do algoritmo *ClustalW*. Esse alinhamento foi usado para a predição do melhor modelo de substituição de nucleotídeos (*bacterial plastid genetic code*). A inferência filogenética foi realizada com Tamura 3 parâmetros, com uma distribuição gama com alguns sítios invariáveis. A validação dos ramos deu-se por estatística de 1000 *bootstraps*. Na análise do gênero *Brucella spp.* e DF13 foi utilizada a sequência 16S rDNA da bactéria *Mycoplana dimorpha* DSM 7138 EU022307 (<https://lpsn.dsmz.de/species/mycoplana-dimorpha>) para enraizar a árvore filogenética. O alinhamento múltiplo foi realizado com o algoritmo *ClustalW*. Esse alinhamento é usado para a predição do melhor modelo de substituição de nucleotídeos (*bacterial plastid genetic code*). A inferência filogenética foi utilizada com o modelo Kimura 2 parâmetro, com uma distribuição gama com alguns sítios invariáveis. A validação dos ramos deu-se por estatística de + 1000 *bootstraps*.

#### **2.4.7 Anotação funcional dos genomas**

O genoma foi anotado em duas etapas, sendo uma etapa automática e uma etapa de curadoria manual. Para a etapa de anotação automática foi utilizada a ferramenta PATRIC Versão 3.6.12 <<https://www.patricbrc.org/>>.

Para análise das vias metabólicas de compostos aromáticos foi utilizada a ferramenta KAAS - KEGG Automatic Annotation Server <<https://www.genome.jp/kegg/>> na qual é feita a anotação funcional dos genes por BLAST ou GHOST, comparando com o banco de dados manualmente curado do KEGG (MORIYA *et al.*, 2007). Foi analisado sequência de aminoácidos por meio do método BBH (*bidirectional best hit*). A ferramenta Interpro 91.0 <<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>> foi empregada para fazer a classificação de famílias de proteínas e identificação de domínios. Já a ferramenta UniProt foi usada para obter informações a respeito das proteínas identificadas nas anotações e também buscar sequências similares a elas.

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO INOCULANTE AGRÍCOLA E PRODUÇÃO DE PATENTE

---

Neste capítulo são apresentados os resultados da etapa do desenvolvimento do inoculante à base de estirpes bacterianas dividida em duas partes:

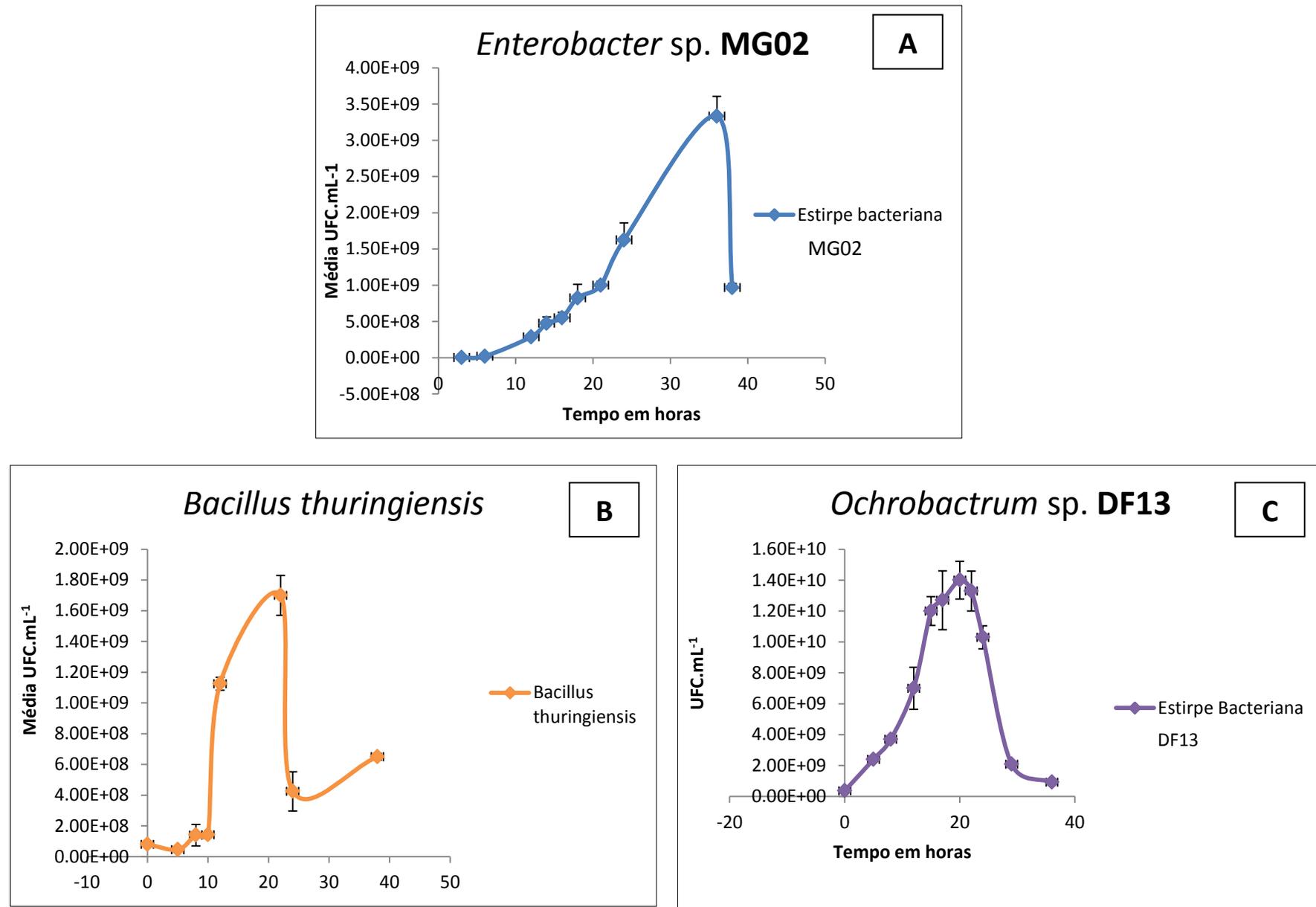
- 1 Caracterização das estirpes e análise de degradação do 2,4-D pelas estirpes bacterianas *Enterobacter* sp. MG02 e *Ochrobactrum* sp. DF13 (DIREITO, 2009), *Bacillus thuringiensis* (ATCC 33679), *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSMZ 101093), *Ochrobactrum ciceri* (DSMZ 22292) e análise da degradação do 2,4-D;
- 2 Desenvolvimento do inoculante agrícola à base de estirpes bacterianas.

Na caracterização metabólica foi realizada a curva de crescimento em meio LB, análise de concentração mínima inibitória com 2,4-D, análise de degradação do 2,4-D pelas estirpes bacterianas. Já no desenvolvimento do inoculante o objetivo era otimizar a produção do inoculante para que se tornasse um produto padronizado. Foram realizados testes de antagonismo entre as estirpes; preparo da formulação do inoculante com *B. thuringiensis*, MG02 e em consórcio, padronização do processo de congelamento do inoculante, determinação viabilidade do inoculante. Ao final desta foi elaborado um pedido de patente, que foi depositado em junho de 2021 (anexo I).

### 3 Curva de crescimento e determinação de UFC das células

A partir dos resultados dos ensaios de curvas de crescimento, padronizou-se o número de células do inoculante. Como não há determinação legal para as estirpes usadas neste trabalho, usou-se o número mínimo de células para rizóbios - Instrução Normativa SDA/MAPA 13/2011- (MAPA, 2011). Na figura 18 A pode ser visto a estirpe bacteriana *Enterobacter* sp. MG02, que apresentou crescimento exponencial entre 24 e 36 horas, com valores respectivamente de  $1.6 \times 10^9$  e  $3.3 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>, após o início da inoculação da bactéria no meio LB. A mesma estirpe apresentou sinais de declínio com 38 horas, momento no qual foi realizada a última contagem de UFC. mL<sup>-1</sup>.

Na figura 18B pode-se observar o crescimento da estirpe de *B. thuringiensis* (ATCC 33679) com fase exponencial inicial em 12 horas e auge com 22 horas após o início da inoculação. Indicando uma fase log com número de células de  $1.7 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>, sendo possível observar o declínio em 24 horas e estendendo por até período de 36 horas. Já a estirpe bacteriana *Ochrobactrum* sp. DF13, que pode ser vista na figura 18 C apresentou uma fase exponencial de crescimento com 20 horas após inoculação, cuja média ficou em  $1.4 \times 10^{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup> e apresentou fase de declínio a partir de 29 horas após o início do inóculo.



**Figura 18.** Curva de crescimento da estirpes bacterianas em meio LB sob agitação de 150 rpm . A- *Enterobacter sp.* MG02 durante período de 48 horas após inoculação. B- *Bacillus thuringiensis* (ATCC 33679) com duração de 38 horas após a inoculação. C. *Ochrobactrum sp.* DF13 durante período de 36 horas. Barras de erros indicam o erro padrão (n=3).

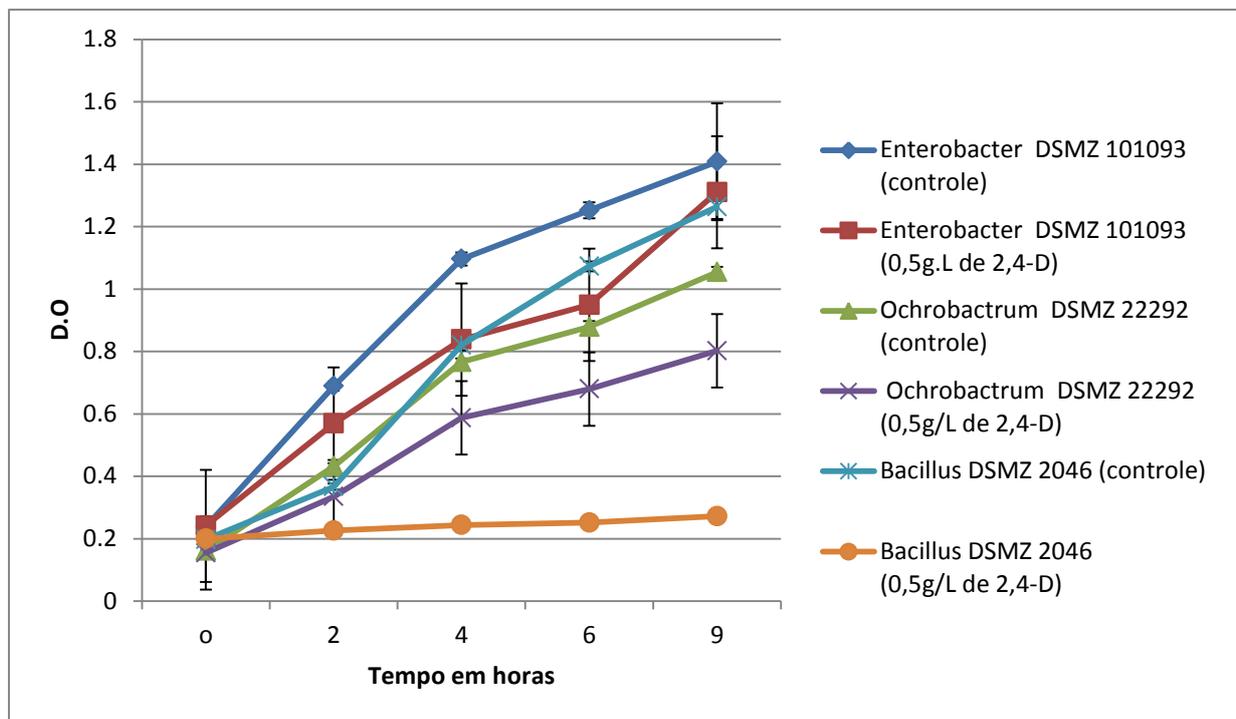
### 3.1 Crescimento das estirpes adquiridas da DSMZ na presença de 2,4-D

As estirpes bacterianas *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSMZ Z 101093), *O. cicere* (DSMZ 22292) e *B. thuringiensis* (DSMZ 2046), oriundas da coleção DSMZ, passaram por *screening* em meio de cultura LB acrescido com 2,4-D, nas concentrações de 0,5g.L<sup>-1</sup> e 1g.L<sup>-1</sup> (figura 19 e 20). Este teste foi necessário para ter uma rápida análise referente a capacidade das estirpes de resistir e crescer na presença do 2,4-D para que posteriormente fosse feito o teste de degradação do 2,4-D utilizando estas mesmas estirpes. Para as análises estatísticas, foram realizados teste de *Lilliefords* para verificar a normalidade dos dados e, para verificar a diferença significativa entre o tratamento com 2,4-D e o controle, foi utilizado o teste ANOVA, empregando o teste de *Friedman*.

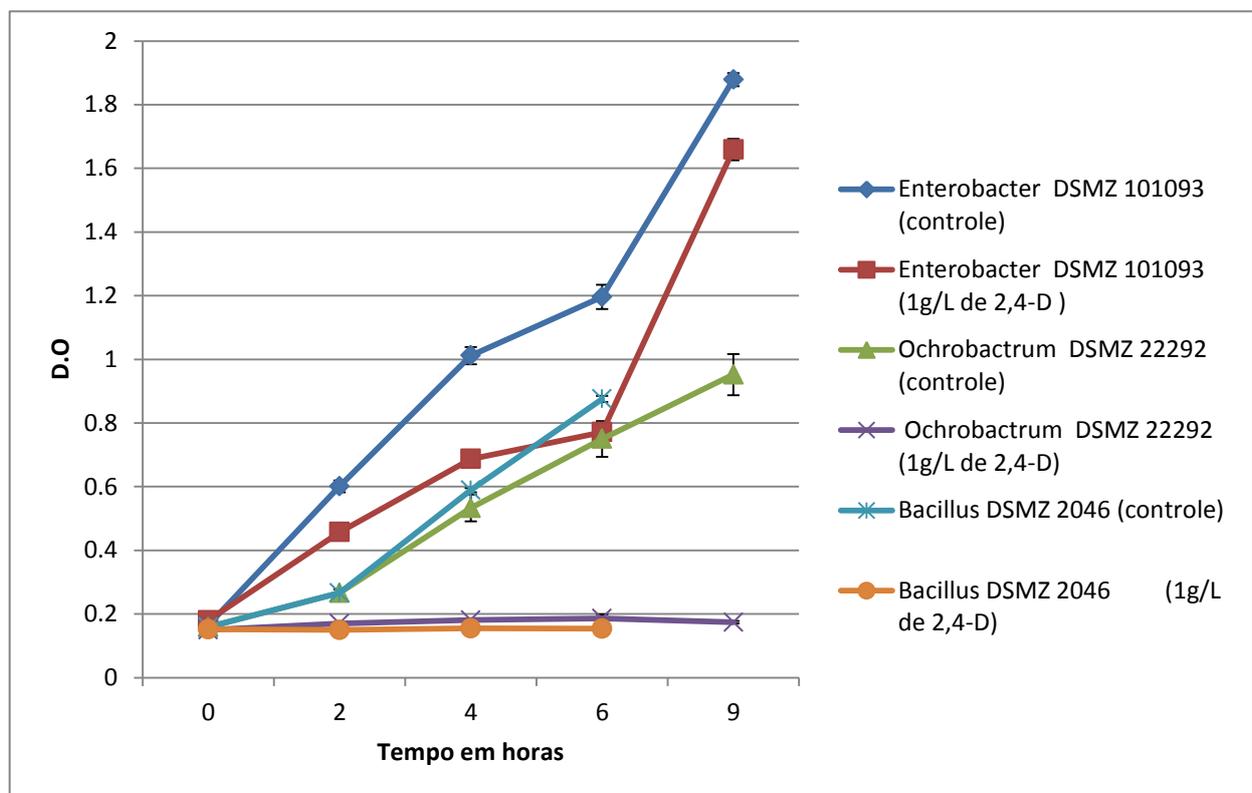
Na concentração de 0,5g.L<sup>-1</sup> (figura 19), os dados de crescimento de *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSMZ 101093) mostraram que não houve uma diferença significativa  $p > 0.05$  (0.1797) entre o grupo controle e o tratamento com herbicida 2,4-D durante o período de 9 horas. Na figura 20, pode-se observar o crescimento da mesma estirpe bacteriana na concentração de 2,4-D duplicada (1g.L<sup>-1</sup>) no período de 9 horas de crescimento. O teste estatístico para *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSMZ 101093) na concentração de 1g.L<sup>-1</sup> mostrou que também não houve diferença significativa entre tratamento e controle ( $p = 0.1797$ ), ou seja, no crescimento microbiano com e sem 2,4-D no meio de cultura.

Em relação à estirpe bacteriana *Ochrobactrum cicere* (DSMZ 22292), a estatística mostrou que somente houve diferença significativa no crescimento microbiano no período de 9 horas ( $p = 0.04$ ), comparando controle e tratamento na concentração de 0,5g.L<sup>-1</sup> de 2,4-D. Nos demais tempos, o teste estatístico não apresentou diferença significativa. No experimento com a estirpe bacteriana *O. cicere* em meio LB contendo 2,4-D na concentração de 1g.L<sup>-1</sup>, observou-se diferença significativa no crescimento em relação ao controle. Segundo teste estatístico (ANOVA) empregando o teste de *Friedman*, teve um  $p < 0.05$  (0.0253), indicando que houve diferença significativa entre tratamento e controle, ou seja, no crescimento com e sem 2,4-D. Essa diferença pode ser claramente vista na figura 20, na qual se observa que *O. cicere* em meio contendo 1g.L<sup>-1</sup> de 2,4-D sofreu uma inibição em seu crescimento durante as 9 horas de testagem.

O crescimento de *B. thuringiensis* (DSMZ 2046) na concentração  $0,5\text{g.L}^{-1}$  de 2,4-D, estatisticamente apresentou diferença significativa ( $p= 0,01747$ ) em relação ao meio com 2,4-D e ao meio do controle. As leituras realizadas no período de 9 horas mostraram uma D.O de 1.263 e 0,272 para controle e tratamento, respectivamente. Contudo, por meio da percepção da análise do gráfico e os dados de  $\text{D.O}_{600\text{nm}}$ , sugere-se que a estirpe bacteriana não teve um crescimento microbiano expressivo em presença de  $0,5\text{g.L}^{-1}$  de 2,4-D, indicando uma possibilidade de inibição e retardo no crescimento de *B. thuringiensis* (DSMZ 2046) (figura 19). No gráfico 20, pode-se observar os dados da estirpe *B. thuringiensis* (DSMZ 2046), em que a estirpe não apresenta bom crescimento em presença de 2,4-D, visto que a estatística mostrou que houve diferença significativa no crescimento microbiano na ausência de 2,4-D (controle) e na concentração de  $1\text{g.L}^{-1}$  de 2,4-D ( $p= 0.0455$ ), comparando o período de tempo de 6 horas no meio com 2,4-D ( $\text{D.O}_{600\text{nm}} = 0,154$ ) e tempo de 6 horas do controle ( $\text{D.O}_{600\text{nm}} = 0,876$ )



**Figura 19.** Gráfico do crescimento das estirpes bacterianas *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSMZ 101093), *O. cicere* (DSMZ 22292) e *Bacillus thuringiensis* (DSMZ 2046) em meio LB acrescido com  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de 2,4-D e em meio LB sem 2,4-D (controle) durante o período de 9 horas. Barras de erro indicam erro padrão (n=3).

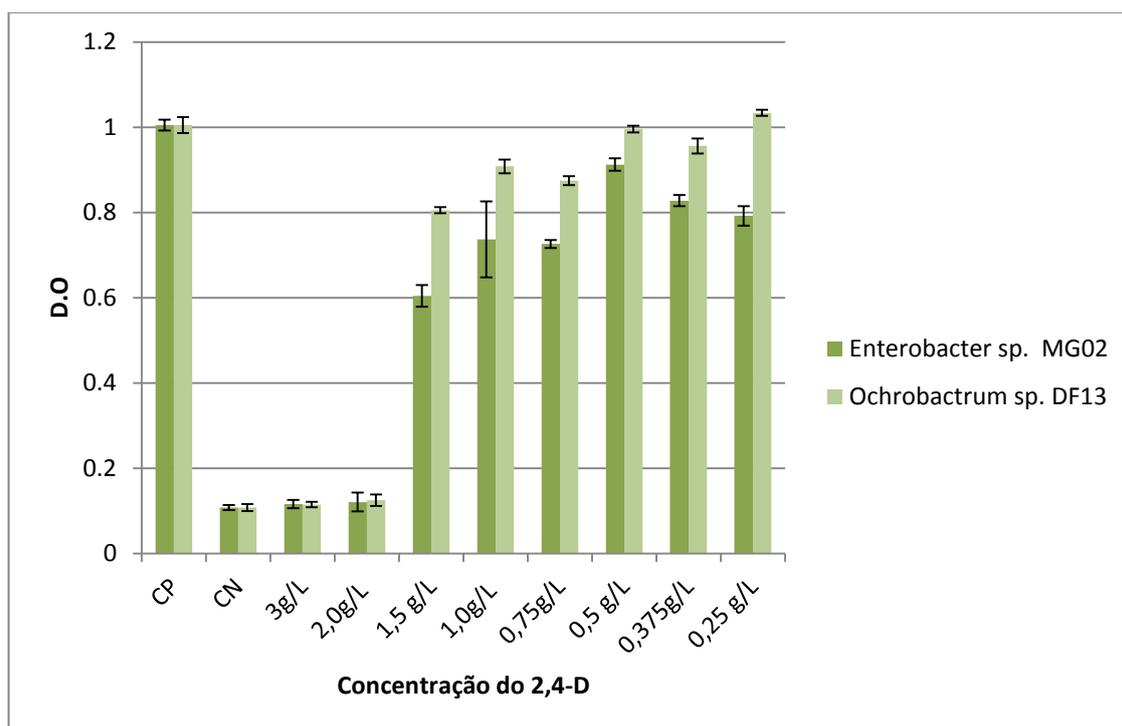


**Figura 20.** Gráfico do crescimento das estirpes bacterianas *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSMZ 101093), *O. cicere* (DSMZ 22292) e *Bacillus thuringiensis* (DSMZ 2046) em meio LB acrescido com  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de 2,4-D e em meio LB sem 2,4-D (controle) durante o período de 9 horas. Barras de erro indicam erro padrão (n=3).

### 3.2 Concentração mínima Inibitória

O teste de MIC foi realizado somente com as estirpes *Enterobacter* sp. MG02 e *Ochrobactrum* sp. DF13 para verificar a concentração máxima de 2,4-D em que as bactérias crescessem, os resultados em gráfico podem ser vistos na figura 21. Os resultados da análise estatística realizado com os dados de MIC da estirpe *Enterobacter* sp. MG02 mostraram uma diferença significativa entre o controle positivo (meio LB sem 2,4-D com a estirpe bacteriana) e as concentrações de  $3\text{g.L}^{-1}$ ,  $2\text{g.L}^{-1}$ ,  $1,5\text{g.L}^{-1}$  e  $0,75\text{g.L}^{-1}$  de 2,4-D. Nas concentrações  $1\text{g.L}^{-1}$  ( $p= 0,0498$ ),  $0,5\text{g.L}^{-1}$ ,  $0,375\text{g.L}^{-1}$ ,  $0,25\text{g.L}^{-1}$ , mostra-se um crescimento parecido ao controle positivo. Já em relação ao controle negativo (meio LB sem inoculação), todas as concentrações apresentaram diferença significativa, exceto nas concentrações  $3,0\text{g.L}^{-1}$ ,  $2,0\text{g.L}^{-1}$ ,  $1,5\text{g.L}^{-1}$ . Comparando as concentrações  $3,0\text{g.L}^{-1}$  e  $2,0\text{g.L}^{-1}$  de 2,4-D, não há diferença significativas entre elas, também é possível verificar que não teve crescimento microbiano no meio, indicando que o 2,4-D inibiu o crescimento das células nas duas concentrações.

Os resultados das análises estatísticas dos dados do teste de MIC da estirpe *Ochrobactrum* sp. DF13 mostraram que, em relação ao controle positivo, houve uma diferença significativa com todas as concentrações, exceto em  $0,25\text{g.L}^{-1}$  de 2,4-D, que, por sua vez, apresentou um crescimento parecido ao do controle, não havendo diferença significativa. Já em comparação ao controle negativo, houve diferença significativa com todas as concentrações de 2,4-D, exceto nas concentrações mais altas:  $3,0\text{g.L}^{-1}$  e  $2,0\text{g.L}^{-1}$  de 2,4-D. Este dado sugere que não houve crescimento microbiano nas concentrações  $3,0\text{g.L}^{-1}$  e  $2,0\text{g.L}^{-1}$  de 2,4-D e que ocorreu uma inibição do crescimento da *Ochrobactrum* sp. DF13. O crescimento bacteriano nas concentrações de  $1,0\text{g.L}^{-1}$  e  $0,75\text{g.L}^{-1}$  de 2,4-D não apresentou diferença significativa, no entanto, nas concentrações  $3,0\text{g.L}^{-1}$  e  $2,0\text{g.L}^{-1}$ , os demais apresentaram diferença significativa entre os tratamentos.



\*CP –Controle Positivo CN- Controle Negativo

**Figura 21.** Gráfico da Concentração Mínima Inibitória de 2,4-D para as estirpes bacterianas *Enterobacter* sp. MG02 e *Ochrobactrum* sp. DF13. Barras de erro indicam erro padrão (n=3).

### 3.3 Análise da Degradação do herbicida 2,4-D pelas estirpes bacterianas por HPLC

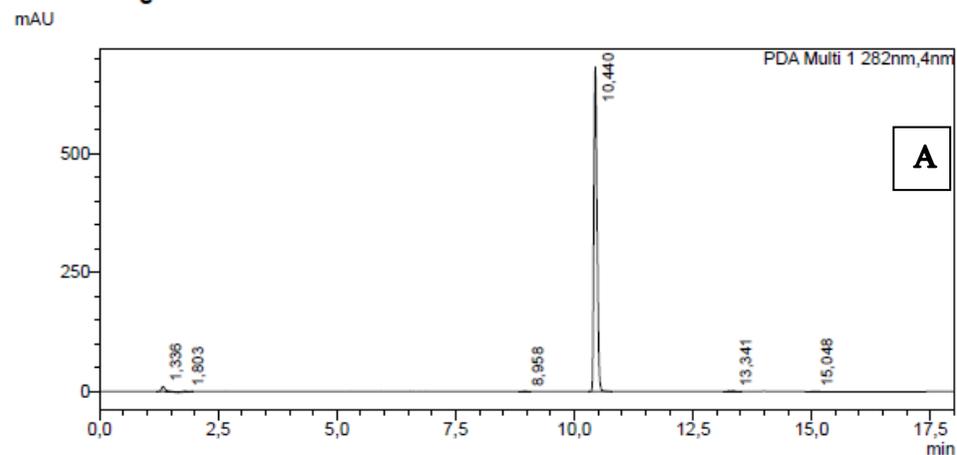
Foram avaliados os cromatogramas com 15 e 30 dias de crescimento das estirpes bacterianas em meio contendo 2,4-D como única fonte carbono. Nos cromatogramas com 15 dias, todas as estirpes apresentaram pico, indicando a presença de 2,4-D com seu anel aromático ainda intacto no meio de cultura, já no período de 30 dias, após a inoculação, os cromatogramas não apresentaram picos em todos os resultados das estirpes bacterianas, exceto na estirpe de *B. thuringiensis*. Os perfis cromatográficos da estirpe DF13 (figura 22 B e 22 D), nos períodos de 15 e 30 dias se assemelham aos perfis cromatográficos das estirpes bacterianas *Enterobacter* sp. MG02, *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSM 101093) e *O. ciceri* (DSMZ 22292), no mesmo período de tempo, que podem ser vistos nas figuras do anexo III, . Na figura 22 A, é mostrado o perfil cromatográfico do meio mínimo 2,4-D no período de 15 dias sem inoculação -

controle, no qual se apresentou um tempo de retenção em 10,440 minutos. Já na figura 22 B, é mostrado o perfil cromatográfico do meio mínimo 2,4-D inoculado com a estirpe bacteriana DF13 pelo período de 15 dias. O mesmo apresentou tempo de retenção de 9,859 minutos e a formação de outro pico no tempo de retenção de 5,07 minutos, havendo uma pequena mudança em relação ao controle, contudo, fica claro que o 2,4-D está presente no meio no período de 15 dias.

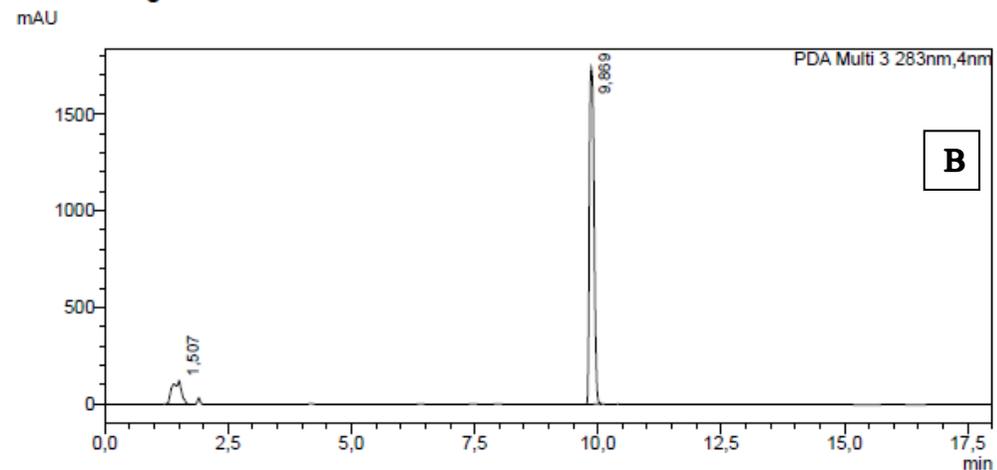
Na figura 22 C, é apresentado o perfil cromatográfico do controle no período de 30 dias após o início o experimento. O controle mostra que há a saída do pico de 2,4-D no tempo de 10,034 minutos, e o mesmo possui a área de 11395609. A figura 22 D mostra o perfil cromatográfico do meio mínimo 2,4-D inoculado com a estirpe bacteriana DF13 durante o tempo de 30 dias. O cromatograma não apresentou picos nas escalas 1500 mUA ou 300 mUA. Ao colocar as escalas em tamanho reduzido (0-30 mUA), apresentaram-se pequenos picos, sem muita forma e com tempos de retenção distintos ao do 2,4-D. Além disso, apresentaram-se áreas pequenas, indicando a presença de resquícios dos solventes ou pequenos metabólitos da degradação. Desta forma, os dados indicam que, no período de 30 dias, a estirpe bacteriana DF13 degradou o 2,4-D.

Os perfis cromatográficos do meio mínimo 2,4-D inoculado com as estirpes bacterianas MG02, *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSM 101093) e *O. ciceri* (DSMZ 22292) se apresentaram muito parecidos após 30 dias de inoculação (anexo III). Os dados indicam que não há a presença do 2,4-D nos cromatogramas, e isto sugere que as estirpes bacterianas, isoladamente, degradam a molécula em 30 dias. Os cromatogramas podem ser vistos no anexo cromatogramas.

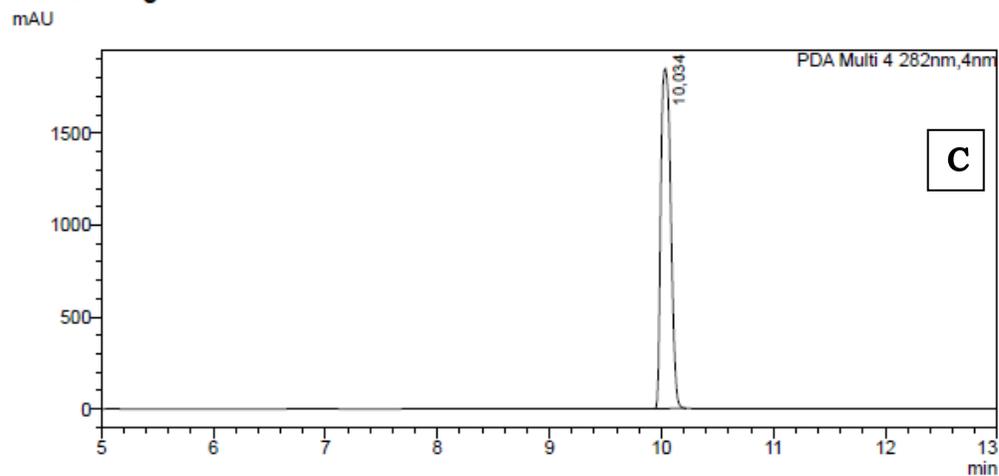
## &lt;Chromatogram&gt;



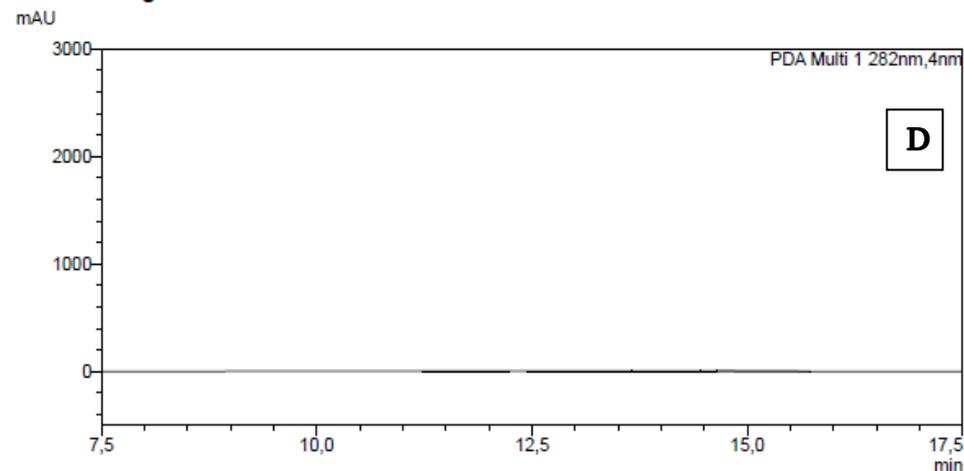
## &lt;Chromatogram&gt;



## &lt;Chromatogram&gt;

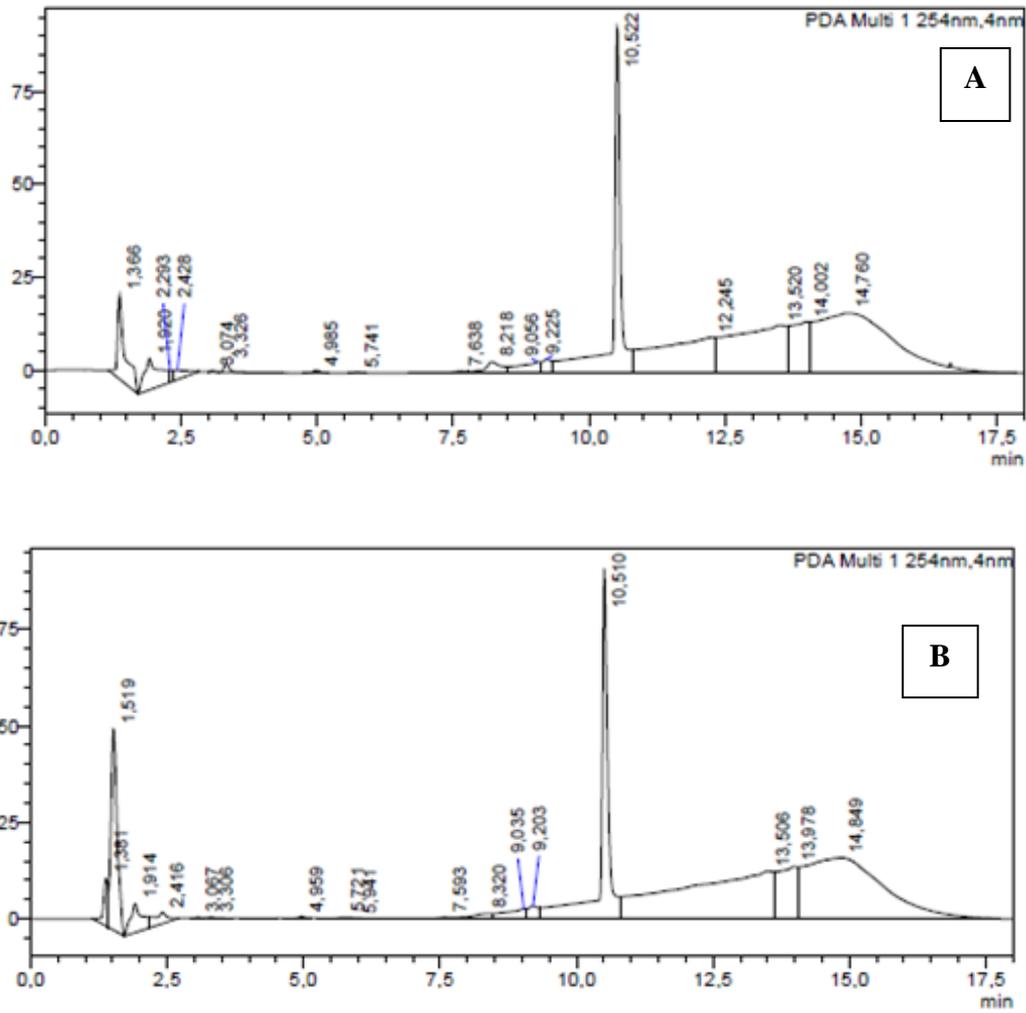


## &lt;Chromatogram&gt;



**Figura 22.** Perfil cromatográfico do meio mínimo 2,4-D com estirpe bacteriana *Ochrobactrum* sp. DF13. Em A e C o perfil cromatográfico do controle com 15 e 30 dias de experimento sem bacteria; em B e D- o perfil cromatográfico do meio mínimo 2,4-D após inoculado com a estirpe bacteriana DF13 com 15 dias e 30 dias de experimento.

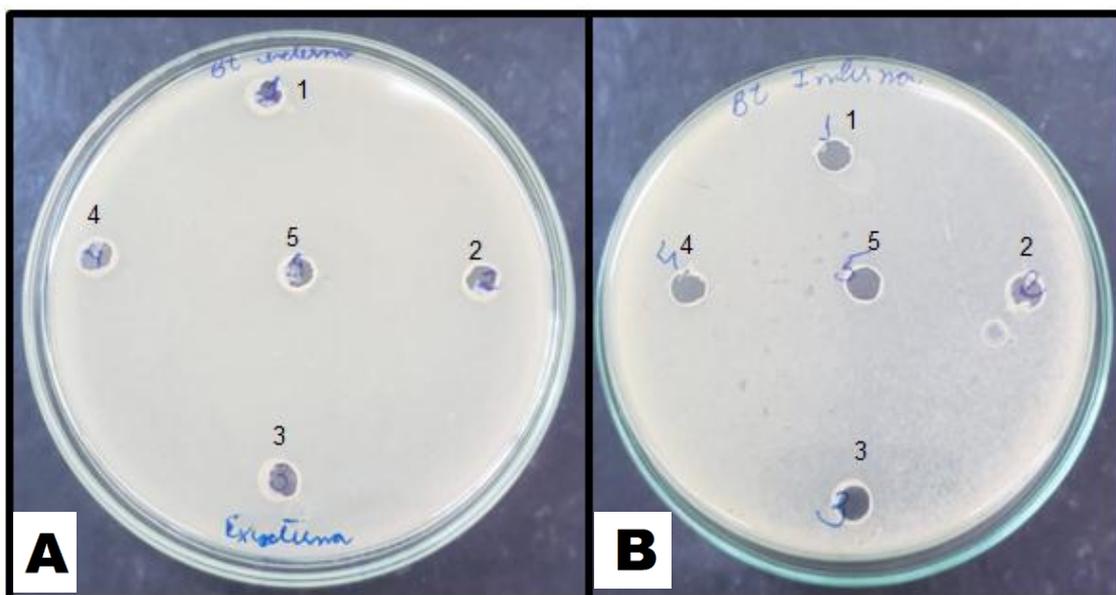
O meio mínimo 2,4-D inoculado com estirpe bacteriana *B. thuringiensis* (ATCC 33679) apresentou um perfil cromatográfico (figura 23 B) com poucas mudanças em relação ao controle (figura 23 A), indicando uma biotransformação do 2,4-D. No perfil cromatográfico do controle, ou seja meio mínimo sem inoculação pelo período de 30 dias (figura 23 A) o pico referente à molécula do ácido 2,4-D saiu no tempo de retenção de 10,522 e apresentou a área de 886429. Já no perfil cromatográfico o tratamento (figura 23 B), ou seja, meio mínimo 2,4-D inoculado com *B. thuringiensis* por 30 dias, é notável a presença de dois picos: um no início do cromatograma com tempo de retenção de 1,519 minutos e com área de 401518 e o segundo pico com tempo de retenção de 10,510, com área de 866761. O segundo pico, pelas características indica ser a molécula do 2,4-D, já o primeiro pico indica ser um metabólito da degradação do 2,4-D. Ao comparar os cromatogramas do controle com o tratamento concluí-se que não houve a área referente ao pico do 2,4-D no tratamento apresentou uma pequena redução comparado ao controle, e houve um aumento do metabólito, sugerindo o *B. thuringiensis* pode ter feito a biotransformação da molécula do 2,4-D em 30 dias.



**Figura 23.** Perfis cromatográficos do meio mínimo 2,4-D . A - perfil cromatográfico do controle (sem inoculação -  $t_R$  10,522 min); com 30 dias de experimento B- perfil cromatográfico do meio mínimo 2,4-D ( $t_R$  10,510 min) após inoculado com a estirpe bacteriana *Bacillus thuringiensis* com 30 dias de experimento.

### 3.4 Teste de Antagonismo

No teste de antagonismo não foi possível visualizar formação de halo de inibição em nenhum dos dois testes realizados. A figura 24 A demonstra que não houve formação de halos ao redor dos poços, este resultados sugere que não houve antagonismo da estirpe bacteriana *B. thuringiensis* (DSMZ 2046) entre e as demais estirpes do teste (poço 1- *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSMZ 101093); poço 2- *Enterobacter* sp. MG02; poço 3- *O. ciceri* (DSMZ 22292); poço 4- *Ochrobactrum* sp. DF13). Nos resultados mostrados na figura 24B é revelado que não houve formação de halos de inibição, nesta placa foi utilizado a estirpe bacteriana *B. thuringiensis* (ATCC 33679) como indicadora de substância antimicrobiana. Desta forma, o teste de difusão em ágar mostrou que as estirpes bacterianas podem trabalhar em consórcio sem inibir a estirpe *B. thuringiensis* tanto da coleção ATCC quanto da DSMZ. Este teste é importante porque para produção do inoculante em consórcio não se pode ter bactérias que produzam substâncias que inibam o crescimento de *B. thuringiensis* e vice versa.



**Figura 24.** A- estirpe bacteriana *B. thuringiensis* DSMZ (2046) como indicadora de substância antimicrobiana; B- estirpe bacteriana *B. thuringiensis* (ATCC 33679) como indicadora de substância antimicrobiana. Poço 1- *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis*; poço 2- *Enterobacter* sp. MG02; poço 3- *O. ciceri*; poço 4- *Ochrobactrum* sp. DF13; poço 5- MG04 (estirpe teste).

### 3.4.1 Viabilidade das células no inoculante formulado pelo período de 365 dias

A determinação da viabilidade do inoculante mostrou que as estirpes bacterianas apresentaram células viáveis pelo período de 12 meses (tabela 7). Mesmo após os processos de preparação do inoculante e as adversidades que o produto passou (luz, variações de temperatura, variações de umidade) os dados mostraram que os inoculantes apresentaram uma média de  $10^8$  UFC.g<sup>-1</sup> seca no período de três meses, mantendo-se constante a viabilidade das células no início do produto formulado. Já com 365 dias as células apresentaram uma média de  $9,83 \times 10^6$  e  $3,02 \times 10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> para *B. thuringiensis* e MG02, respectivamente. A queda do número de células já era esperada, principalmente após um período de um ano. Este teste foi importante para entender melhor como as células bacterianas ficariam na prateleira por um longo período e também para produção do documento de patente.

**Tabela 4.** Viabilidade do inoculante agrícola com as estirpes bacterianas *B. thuringiensis* e *Enterobacter* sp. MG02 no período de 30, 60, 90 e 365 dias após o preparo e liofilizado em prateleira.

Microrganismo	30 Dias UFC. g <sup>-1</sup> seca	60 dias UFC. g <sup>-1</sup> seca	90 dias UFC. g <sup>-1</sup> seca	365 dias UFC. g <sup>-1</sup> seca
<i>Bacillus thuringiensis</i> 1*	$4,45 \times 10^8$	$6,9 \times 10^8$	$5,2 \times 10^8$	$7,6 \times 10^6$
<i>Bacillus thuringiensis</i> 2	$1,17 \times 10^9$	$4 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$	$8,3 \times 10^6$
<i>Bacillus thuringiensis</i> 3	$1,49 \times 10^9$	$8,55 \times 10^8$	$6,56 \times 10^8$	$9,4 \times 10^6$
<i>Bacillus thuringiensis</i> 4	$4,48 \times 10^8$	$7,45 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$	$1,4 \times 10^7$
<i>Enterobacter</i> sp 1	$5,25 \times 10^9$	$3,9 \times 10^8$	$1,33 \times 10^8$	$6,5 \times 10^6$
<i>Enterobacter</i> sp. 2	$7,7 \times 10^9$	$5 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	$6,7 \times 10^6$
<i>Enterobacter</i> sp. 3	$1,16 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$8,9 \times 10^8$	$7,7 \times 10^5$
<i>Enterobacter</i> sp 4	$6,9 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$7,8 \times 10^7$	$1,6 \times 10^6$

\*O número refere-se ao frasco que estavam os microrganismos. No total foram 4 frascos.

## **CAPÍTULO 4: RESULTADOS DA ANÁLISE GENÔMICA *in silico* DAS ESTIRPES BACTERIANAS *Enterobacter* sp. MG02 E *Ochrobactrum* sp. DF13**

---

Neste capítulo, são apresentados os resultados das análises genômicas, *in silico*, das estirpes bacterianas *Enterobacter* sp. MG02 e *Ochrobactrum* sp. DF13. O trabalho de bioprospecção desta coleção foi realizado por Direito (2009), no qual se selecionaram bactérias do solo com potencial capacidade de degradar 2,4-D. Ao longo dos anos, esses microrganismos foram estudados e atualmente sabe-se que podem ser utilizados como ferramentas biotecnológicas para a biorremediação. Tanto a estirpe *Enterobacter* sp. MG02, que faz parte da formulação do inoculante agrícola preparado por Peckle (2015), como a estirpe *Ochrobactrum* sp. DF13 são ótimas degradadoras do herbicida 2,4-D. A caracterização do genoma foi realizada a fim de compreender os mecanismos de degradação de 2,4-D e outros xenobióticos nestas estirpes bacterianas. Foi realizada a identificação genômica das mesmas e o depósito das genomas no Genbank. Uma análise do genoma de *Bacillus thuringiensis* (ATCC 33679) também foi realizada. Esta estirpe de *B. thuringiensis* apresentou capacidade de biotransformar o 2,4-D na concentração 0,5g.L<sup>-1</sup> de 2,4-D. Contudo, é uma estirpe com potencial biotecnológico para ação de biopesticida e amplamente utilizada para este propósito. A bactéria *B. thuringiensis* (ATCC 33679) juntamente com *Enterobacter* sp. MG02 fizeram parte da formulação de inoculante agrícola realizada neste trabalho.

As estirpes bacterianas *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSMZ 101093) e *O. ciceri* (DSMZ 22292) também apresentaram a capacidade de degradar o herbicida 2,4-D na concentração 0,5g.L<sup>-1</sup>, durante o período de 30 dias. Assim como a estirpe *B. thuringiensis* (ATCC 33679), a estirpe de *B. thuringiensis* (DSMZ 2046) também realizou a biotransformação do composto em 30 dias, na mesma concentração que as demais bactérias presentes neste estudo. O estudo do genoma *in silico* destas estirpes do gênero *Bacillus* foi realizado para entender quais genes e enzimas podem estar relacionados à biotransformação do 2,4-D. Da mesma forma, foi analisado o genoma *in silico* da estirpe padrão de degradação do 2,4-D, *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134, que é amplamente conhecida e estudada por participar também da degradação de vários

compostos aromáticos. A tabela 8 mostra os microrganismos utilizados nesta etapa do estudo.

#### **4 Sequenciamento, montagem e análise genômica das estirpes *Enterobacter* sp. MG02 e *Ochrobactrum* sp. DF13**

##### **4.1 Extração de DNA e sequenciamento**

Foi extraído DNA genômico da bactéria *Enterobacter* sp. MG02 na concentração de  $600 \text{ ng.mL}^{-1}$  e DNA plasmidial de  $0,7 \text{ ng.mL}^{-1}$ . A quantidade de DNA plasmidial extraído foi insuficiente para o sequenciamento. No sequenciamento do DNA genômico de MG02, obteve-se um tamanho de fragmento de  $2 \times 250 \text{ pb}$  e também gerou aproximadamente 5 milhões de leituras/*reads* por amostra.

O DNA genômico extraído da bactéria *Ochrobactrum* sp. DF13 resultou na concentração de  $> 600 \text{ ng. mL}^{-1}$ , o qual foi utilizado para o preparo de bibliotecas de sequenciamento do tipo *paired-end* ( $2 \times 330 \text{ pb}$ ), Illumina. O sequenciamento total gerou o total de 2.073.810 leituras. O DNA plasmidial de DF13 foi insuficiente para sequenciamento.

##### **4.2 Qualidade do sequenciamento e processamento dos dados**

O sequenciamento dos dados das estirpes *Enterobacter* sp. MG02 e *Ochrobactrum* sp. DF13 foi realizado com a biblioteca *paired-end*, sendo assim, resultou em um arquivo representando as sequências da fita *forward* (R1) e um arquivo para as sequências da fita *reverse* (R2).

Por meio das análises realizadas pela ferramenta fastQC foi possível verificar um total de 2.744.980 *reads* brutas, para cada sentido, na estirpe bacteriana MG02. Após a remoção de bases de baixa qualidade ( $Q < 30$ ) e de adaptadores com a ferramenta Trim Galore foi possível observar um total de 2,774,980 (100%) *reads* limpas e 598.718.792 bp (96,5%) para a R1 e 502.180.505 bp (80,6%) para a R2 para a estirpe MG02.

Os resultados da análise da ferramenta fastQC com dados da estirpe DF13 apresentou um total de 1.036.905 *reads* brutas, para cada sentido. Na ferramenta Trim galore obteve-se um total de 1.036.905 (100%) e 274.654.999 pb (91,4%) para a R1 e

162.834.862 pb (54,0%) para a R2. Os resultados das *reads* brutas e *reads* filtradas podem ser vistos na tabela 8.

**Tabela 5.** Resultado das *reads* brutas geradas pelo sequenciamento e *reads* filtradas pelo programa Trim-Galore das estirpes bacterianas *Enterobacter* sp. MG02 e *Ochrobactrum* sp. DF13.

Resumo da Análise	MG02-R1	MG02-R2	DF13-R1	DF13-R2
Total de <i>reads</i> processadas	2.774.980	2.774.980	1.036.905	1.036.905
<i>Reads</i> filtradas	2.744.980 (100%)	2.774.980 (100%)	1.036.905 (100%)	1.036.905 (100%)
Total de pares de bases processadas	620.545.075	622.759.649	300.483.528	301.605.582
Total de pares de bases filtradas	598.718.792 pb (96,5%)	502.180.505 pb (80,6%)	274.654.999 pb (91,4%)	162.834.862 pb (54,0%)

#### 4.2.1 Montagem do genoma e análise de qualidade da montagem

A montagem com a metodologia *De novo* da ferramenta SPAdes resultou nos seguintes dados para estirpe bacteriana *Enterobacter* sp. MG02, o número total de *contig* foi de 66 com um total de 4,923,901 pb, sendo o maior *contig* com comprimento 2.502.611 pb e comprimento mínimo de 128 pb. Já para a estirpe *Ochrobactrum* sp. DF13 observou-se um total de 53 *contigs* e o comprimento total de 4.570.037 pb, sendo o maior *contig* 1.130.910 pb e o menor *contig* 128 pb.

Para a montagem por mapeamento de referência o resultado foi de 5 *scaffolds* com o comprimento total de 4.923.875 pb e a cobertura do genoma foi de 117,7x. Já para o genoma da estirpe *Ochrobactrum* sp. DF13 gerou-se um total de 6 *scaffolds* com o comprimento total de 4.570.268 e a cobertura foi de 95,7x. Os dados da montagem com o método *De Novo* e de mapeamento de referência para união de *contigs* estão na tabela 9.

O programa CheckM verificou a completude e o nível de contaminação dos genomas, para a estirpe *Enterobacter* sp. MG02 resultou em 99,37% de completude e

0,71% de contaminação. Já para a estirpe *Ochrobactrum* sp. DF13 a completude foi de 100% e 0% de contaminação.

O depósito dos dados foi realizado na plataforma GenBank. O número de acesso do Bioproject é PRJNA757421. Para a *Enterobacter* sp. MG02, o número de acesso do BioSample é SAMN 209610190; O genoma foi depositado sob o número de acesso JAIQVY000000000 (Link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JAIQVY000000000.1/>); As reads brutas foram depositadas no SRA sob o número SRR15858125 (Link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=srr15858125>).

Para a *Ochrobactrum* sp. DF13, o número de acesso do BioSample é SAMN 20961033 e o genoma foi depositado no GenBank sob o número de acesso JAIQVX000000000 (Link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JAIQVX000000000>) e as reads brutas foram depositadas no SRA sob o número de acesso SRR15853869 (Link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=SRR15853869>).

**Tabela 6.** Resultados após o processamento no programa QUAST.

<b>Métricas geradas pela ferramenta QUAST</b>			
		<b>MG02</b>	<b>DF13</b>
<b>SPAdes</b>	# <i>Scaffolds</i>	66	53
	Maior <i>contig</i>	2.502.611	1.130.910
	Comprimento total	4.913.364	4.561.461
	GC%	55,7%	57,83%
	N <sub>50</sub>	332.036	480.705
	L <sub>50</sub>	1	3
<b>MeDuSa</b>	# <i>Scaffolds</i>	5	6
	Maior <i>Scaffolds</i>	4.581.889	4.552.750
	Comprimento total	4.923.875	4.570.268
	GC%	55,47	57,83
	N <sub>50</sub>	4.581.889	4.552.750
	L <sub>50</sub>	1	1

### 4.3 Identificação taxonômica por genoma

#### 4.3.1 Identificação taxonômica da estirpe *Enterobacter* sp. MG02

Por meio da ferramenta Barnap 0.9 foi realizada a identificação dos genes RNA ribossômicos nos genomas. No genoma da estirpe bacteriana MG02 foram encontradas 16 sequências de rRNA, sendo: 13 sequências de 5S rRNA, 1 sequência de 23S rRNA, 2 sequências de 16S rRNA. A classificação taxonômica preliminar foi realizada por BLAST do gene rRNA 16S, para a estirpe MG02 ambas as cópias do rRNA 16S deram maior identidade com estirpes da espécie *E. hormaechei*. Sendo 100% de identidade, 100% de cobertura 0.0 de *E-value* com a *E. hormaechei* estirpe BW e *E. hormaechei* estirpe AKB48, como representado na tabela 10 e 11.

**Tabela 7.** Resultados gerados a partir da sequência de rRNA16S –BLAST-NCBI da estirpe bacteriana *Enterobacter* sp. MG02 para a primeira cópia.

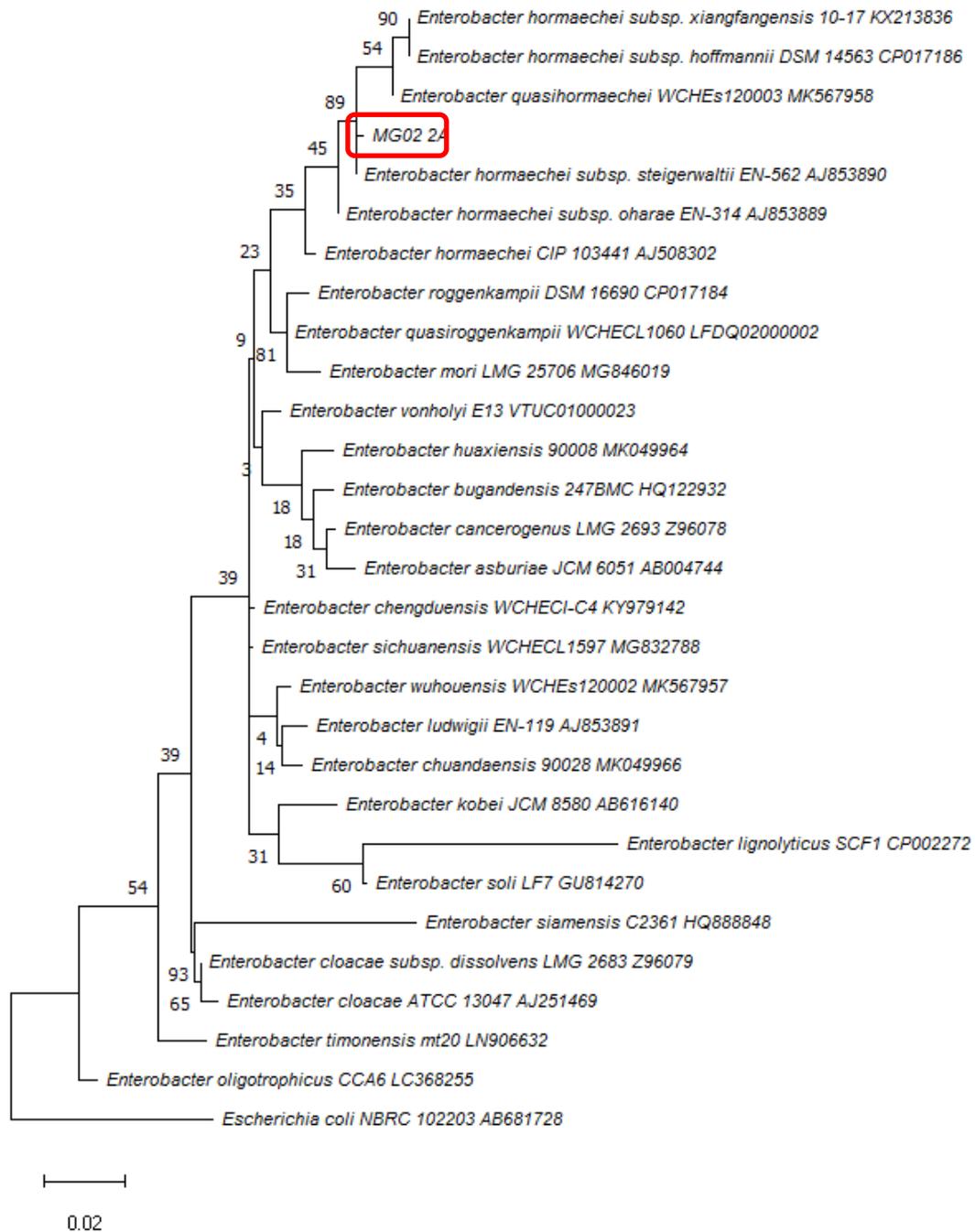
Resultado do BLAST do gene 16S rRNA da estirpe <i>Enterobacter</i> sp. MG02 para a primeira cópia								
Descrição	Nome científico	Max Score	Total Score	Cobertura	E-value	Per. Identidade	Acc. Len	Acesso
<i>Enterobacter hormaechei</i> strain BW chromosome, complete genome	<i>Enterobacter hormaechei</i>	1849	14691	100%	0.0	100.00%	4833651	CP023569.1
<i>Enterobacter hormaechei</i> strain E70 chromosome, complete genome	<i>Enterobacter hormaechei</i>	1849	14758	100%	0.0	100.00%	4572253	CP046271.1
<i>Enterobacter hormaechei</i> strain AUH-ENM30 chromosome	<i>Enterobacter hormaechei</i>	1849	14724	100%	0.0	100.00%	4869611	CP045611.1
<i>Enterobacter hormaechei</i> strain C45 chromosome, complete genome	<i>Enterobacter hormaechei</i>	1849	14758	100%	0.0	100.00%	5068785	CP042551.1
<i>Enterobacter hormaechei</i> strain C15 chromosome, complete genome	<i>Enterobacter hormaechei</i>	1849	14769	100%	0.0	100.00%	4780403	CP042488.1

**Tabela 8.** Resultados gerados a partir da sequência de rRNA 16S - BLAST NCBI da estirpe bacteriana *Enterobacter* sp. MG02

Resultado do BLAST do gene 16S rRNA da estirpe <i>Enterobacter</i> sp. MG02 para a segunda cópia								
Descrição	Nome científico	Max Score	Total Score	Cobertura	E-value	Per. Identidade	Acc. Len	Acesso
<i>Enterobacter hormaechei</i> strain AKB48 chromosome, complete genome	<i>Enterobacter hormaechei</i>	955	7569	100%	0.0	100.00%	4655363	CP044335.1
<i>Enterobacter cloacae</i> strain 3849 chromosome, complete genome	<i>Enterobacter cloacae</i>	955	7563	100%	0.0	100.00%	4599410	CP052870.1
<i>Enterobacter hormaechei</i> strain AMS-38 chromosome, complete genome	<i>Enterobacter hormaechei</i>	955	7580	100%	0.0	100.00%	4914558	CP051132.1
<i>Enterobacter hormaechei</i> strain Y233 chromosome, complete genome	<i>Enterobacter hormaechei</i>	955	7532	100%	0.0	100.00%	4719755	CP049046.1
<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i> OIPH-N069 DNA, complete genome	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i>	955	7580	100%	0.0	100.00%	4689117	AP019817.1
<i>Enterobacter hormaechei</i> strain BW chromosome, complete genome	<i>Enterobacter hormaechei</i>	955	7613	100%	0.0	100.00%	4959214	CP027111.1
<i>Enterobacter hormaechei</i> strain BW chromosome, complete genome	<i>Enterobacter hormaechei</i>	955	7613	100%	0.0	100.00%	4833651	CP023569.1
<i>Enterobacter hormaechei</i> strain F2 chromosome, complete genome	<i>Enterobacter hormaechei</i>	955	7521	100%	0.0	100.00%	4619717	CP047570.1
<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i> strain Eh1 chromosome, complete genome	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i>	955	7635	100%	0.0	100.00%	4845040	CP034754.1

Para completar as análises taxonômicas preliminares, foram realizadas as análises TCS (Tetra Correlation Search), TETRA (padrões de uso de tetranucleotídeos) e ANI (Identidade Nucleotídica Média) com a plataforma JSpecies. Para a análise TCS, a estirpe bacteriana MG02 apresentou um perfil aproximado com estirpe *E. hormaechei* INSali10, resultando uma estatística de 0.99992 *Z-score*. Nesta mesma análise pode ser visto que na segunda posição de aproximação é com a estirpe *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* CIDEIMsCOL3, com *Z-score* de 0.99983. A análise TETRA resultou em um score de 0.9994 para o genoma da bactéria *E. hormaechei* FDAARGOS 69, mostrando que o genoma da bactéria MG02 apresenta uma maior frequência de assinatura de tetranucleotídeos em comparação com genoma *E. hormaechei* FDAARGOS 69. Para a análise ANI da estirpe MG02, a estirpe bacteriana com maior identidade nucleotídeo média foi *E. hormaechei* FDAARGOS 69, sendo o valor de 98,35% (88,67%,- de alinhamento), e sendo o valor de corte 95% para essa análise,

Além, a análise do BLAST-NCBI do gene 16S rRNA e as análises TCS, TETRA e ANI pela plataforma JSpecies WS mostraram uma alta identidade entre o genoma da bactéria MG02 e as bactérias da espécie *E. hormaechei*. Para confirmar a classificação taxonômica, foi inferida a árvore filogenética para o gene 16S rRNA, utilizando o 16SrDNA do genoma da estirpe *Enterobacter* sp. MG02 e de outros genomas das estirpes tipo do gênero *Enterobacter*. Como resultado, a estirpe MG02 foi agrupada com a bactéria *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* EN-562 AJ 853890 com *bootstrap* de 82. Sendo possível confirmar a classificação taxonômica (figura 25).



**Figura 25.** Árvore filogenética da estirpe *Enterobacter* sp. MG02 (destacada em vermelho). Gerada pelo método de máxima verossimilhança, com distância P e *Neighbor-Joining* baseada no alinhamento de 1417 pb. A escala da distância 0.0100 indica substituições por sítio, número situados nas ramificações da árvore indicam porcentagem de recuperação.

### 4.3.2 Identificação taxonômica da estirpe *Ochrobactrum* sp. DF13

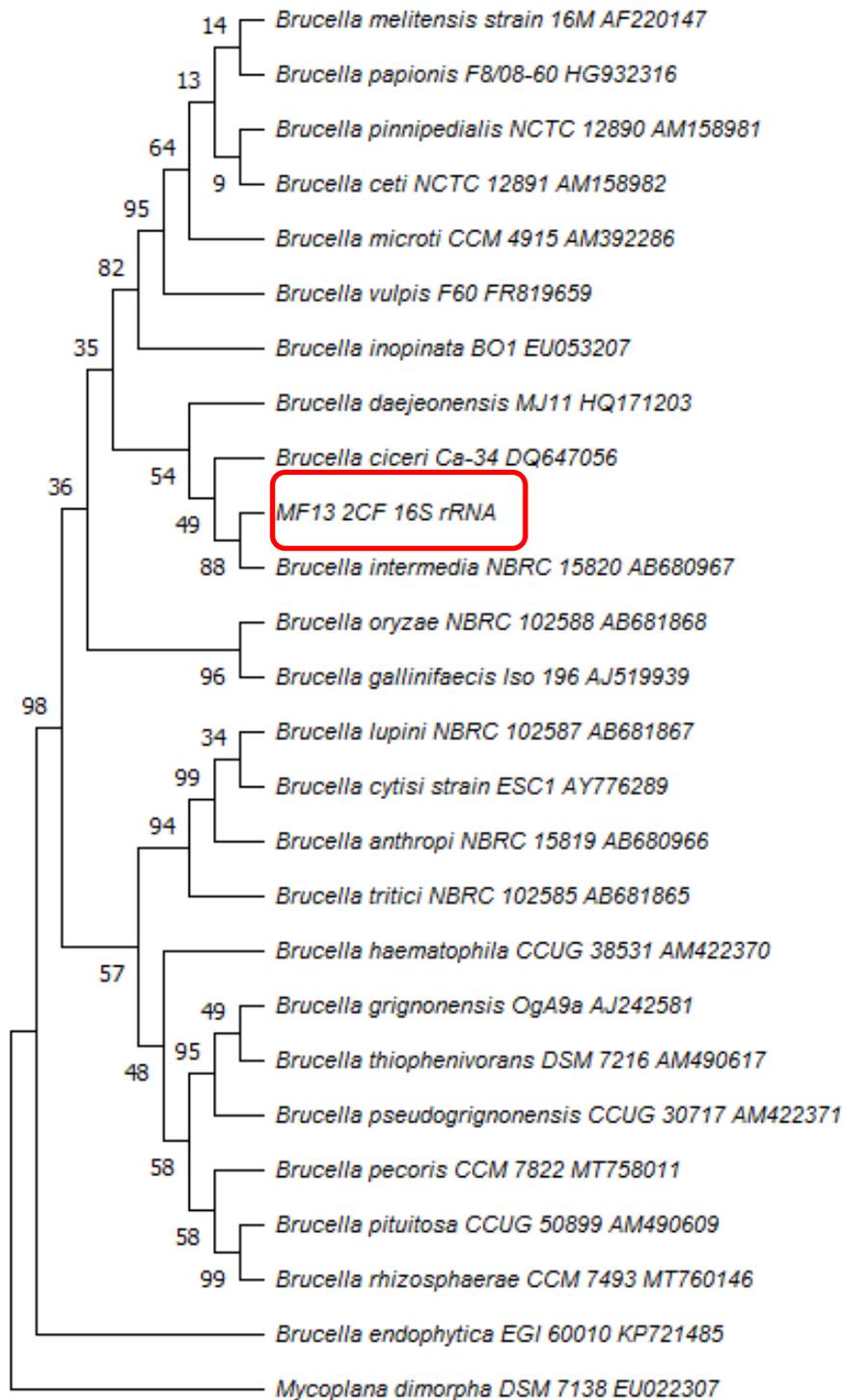
Por meio da ferramenta Barnap 0.9 foram encontrados 5 rRNAs, sendo 3 sequências de 5S rRNA, 1 sequência do 23S rRNA e 1 sequência do 16S rRNA (tabela 12). A análise do BLAST do 16S rRNA resultou em 100% de identidade, 99% cobertura e 0.00 de *E-value* com a estirpe *Ochrobactrum* sp. DZQ2a (Número de acesso: KC146415.1). Além desse resultado, também pode-se observar uma alta identidade com *Ochrobactrum anthropi* (99,93% identidade) e *Brucella intermedia* (99,66% Identidade), indicando uma proximidade com essas duas espécies.

As análises TCS e TETRA realizadas na plataforma JSpecie-WS, resultaram em: *Ochrobactrum intermedium* LMG 3301 com score de 0.9995 para a análise TCS e escore de 0.9995 para a análise TETRA. A análise ANI resultou em um escore de 98.62% (88,24%- alinhamento) para o genoma da bactéria *Ochrobactrum intermedium* LMG 3301 e 98.62% (88,71% - alinhamento) para o genoma da bactéria *Brucella intermedia* NCTC 12171.

**Tabela 9.** Resultados gerados a partir da sequência de rRNA16S - BLAST NCBI da estirpe bacteriana *Ochrobactrum* sp. DF13

Resultado do BLAST do gene 16S rRNA da estirpe <i>Ochrobactrum</i> sp. DF13							
Descrição	Max Score	Total Score	Cobertura	E value	Per. Ident	Acc. Len	Acesso
<i>Ochrobactrum</i> sp. DZQ2a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2726	2726	99%	0.0	100.00%	1477	KC146415.1
<i>Ochrobactrum anthropi</i> gene for 16S rRNA	2726	2726	99%	0.0	99.93%	1480	AB120120.1
<i>Ochrobactrum intermedium</i> 16S rRNA gene (partial), 23S rRNA gene (partial), tRNA-Ile gene, tRNA-Ala gene and ITS1, strain OiC8-6	2721	2721	99%	0.0	99.93%	2275	AJ242582.2
<i>Brucella intermedia</i> strain ZJ499 chromosome 2, complete sequence	2710	5399	100%	0.0	99.66%	2064809	CP061040.1
<i>Ochrobactrum</i> sp. WatG-BA isolate O gene for 16S rRNA, partial sequence	2695	2695	99%	0.0	99.59%	1476	AB272074.1
Uncultured <i>Ochrobactrum</i> sp. clone p4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2680	2680	97%	0.0	100.00%	1451	AY851688.1
<i>Ochrobactrum intermedium</i> strain VL5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2675	2675	97%	0.0	100.00%	1451	MN611377.1
<i>Brucella</i> sp. strain 2716 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2665	2665	100%	0.0	99.12%	1493	MG515280.1
<i>Brucella</i> sp. strain 1315 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2665	2665	100%	0.0	99.12%	1493	MG515279.1
<i>Brucella</i> sp. 09RB8910 chromosome 2, complete sequence	2665	2665	100%	0.0	99.12%	1312151	CP019391.1
<i>Brucella</i> sp. 09RB8910 chromosome 1, complete sequence	2665	5331	100%	0.0	99.12%	2280827	CP019390.1

Para corroborar os resultados da classificação taxonômica preliminar, foi inferida a árvore filogenética do gene 16S rRNA da bactéria DF13 e das estirpes tipos do gênero *Brucella*. Como resultado, a bactéria *Ochrobactrum* sp. DF13 agrupou no clado com a espécie *Brucella intermedia* NBRC 15820 AB680967 com *bootstrap* de 88 (Figura 26).



**Figura 26.** Árvore filogenética da estirpe DF13 (destacada em vermelho). Gerada pelo método de máxima verossimilhança com distância P e *Neighbor-Joining* baseada no alinhamento de 1417 pb. A escala da distância 0.0100 indica substituições por sítio, número situados nas ramificações da árvore indicam porcentagem de recuperação.

#### 4.4 Anotação Funcional do Genoma da estirpe *Enterobacter* sp. MG02

O genoma da estirpe bacteriana MG02 apresenta um total de 4.738 genes, dos quais 4.554 representam genes codificantes, 97 representam genes de RNA e 87 representam pseudogenes (tabela 13).

**Tabela 10.** Características do genoma da estirpe bacteriana MG02

Característica do genoma de MG02	
Genes total	4.738
CDS (total)	4.715
Genes (codante)	4.554
CDSs (com proteína)	4.554
Genes (RNA)	97
rRNAs	11,1,1 (5S, 16S e 23S)
rRNAs completo	11,1,1 (5S, 16S e 23S)
tRNAs	79
ncRNAs	5
CDSs (sem proteína)	87
Pseudo Genes (total)	87

Ao utilizar a ferramenta PATRIC foi possível obter dados das proteínas do genoma, dos quais 583 são proteínas hipotéticas, 4.131 são proteínas com designação funcional e 1.048 são proteínas com ortologia gênica funcional (tabela 14).

**Tabela 11.** Dados de recursos proteicos do genoma da estirpe bacteriana MG02, anotado através da ferramenta de bioinformática PATRIC.

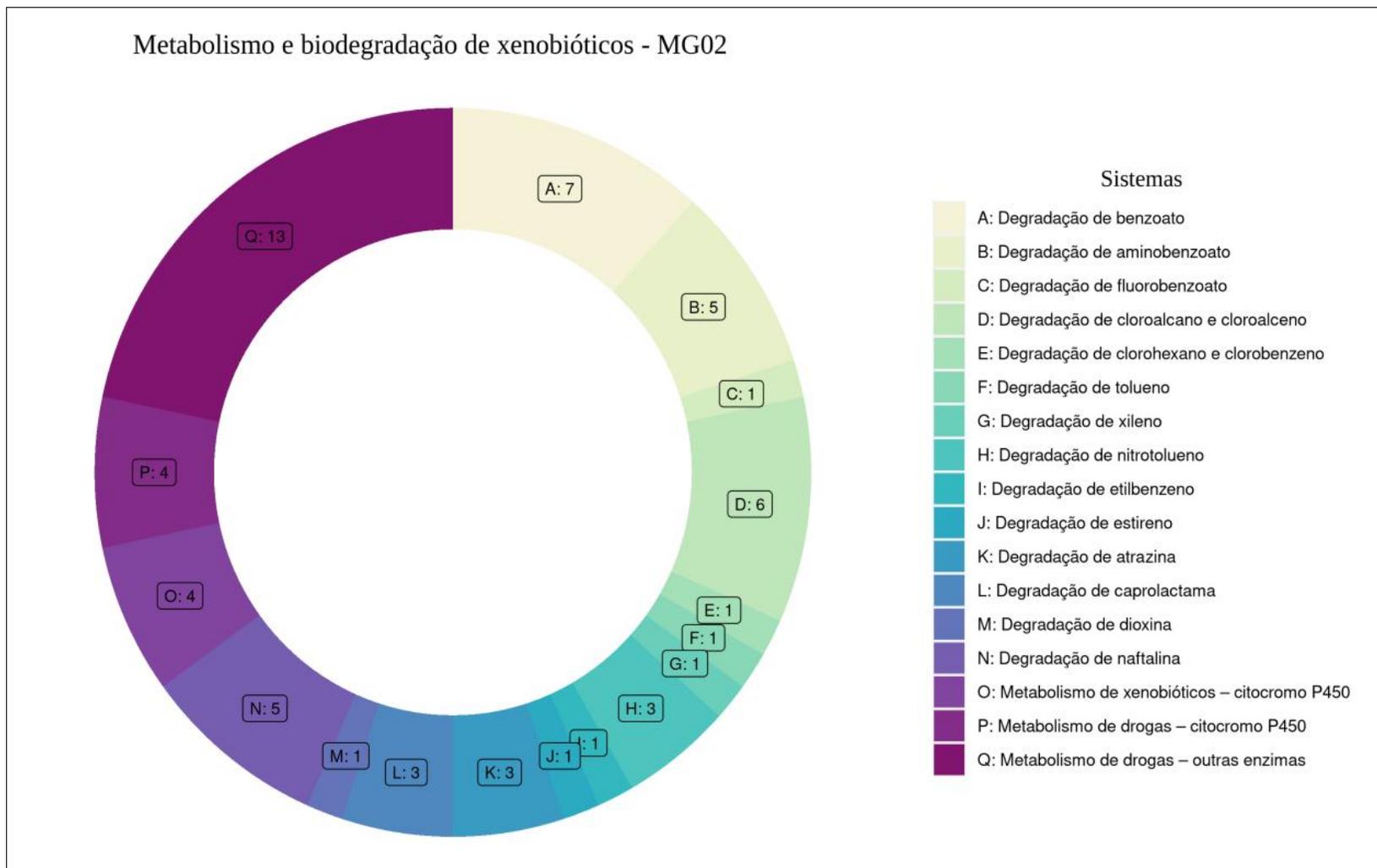
Recursos Proteicos MG02- PATRIC	
Proteínas hipotéticas	583
Proteína com designação funcional	4.131
Proteínas com GO* funcional	1.048
Proteínas com PATRIC gene-específico (PLfam) funcional	4.580
Proteínas com PATRIC famílias de genes cruzados (PGfam) funcional	4.613

\*ontologia gênica

Na ferramenta KAAS foram analisados os sistemas de metabolismo e biodegradação de xenobióticos presentes no genoma de MG02. Na figura 27, pode-se

observar quantas enzimas estão presentes em cada sistema encontrado neste genoma. Desta forma destacam-se, para este trabalho, os seguintes sistemas de degradação: benzenoato (7), clorociclohexanos e clorobenzeno(1), tolueno (1), xileno (1), etilbenzeno(1), estireno (1), atrazina (3) calopactama(3), dioxina(1) e metabolismo de xenobióticos por citocromo P450 (4).

Além das enzimas presentes em cada sistema, a ferramenta KAAS disponibilizou o resultado de genes vinculados ao metabolismo de *Enterobacter* sp. MG02 em seu genoma. Os resultados foram filtrados e colocados na tabela 15 para que fossem analisados, uma vez que há muitos resultados vinculados ao metabolismo de xenobióticos. Na tabela 15 é possível ver os genes *fadA*, *fadB* e *fadI*, que transferem o grupo Co-A do substrato para gerar acetil Co-A, que entra no ciclo do TCA. Os genes do *cluster paa* catalisam a segunda etapa na quebra do ácido graxo. Também estão presentes os genes *praC*, *xylH*, que produzem a enzima 4-oxalocrotonato tautomerase, que está envolvida na via de metaclivagem da rota de degradação de fenol e Catecol. Outra informação importante é a presença do gene *gst*, envolvido no metabolismo de xenobióticos por citocromo P450, e a enzima glutathione S-transferase, que apresenta uma ação de cloração em herbicidas clorados como 2,4-D.



**Figura 27.** Sistemas do metabolismo e biodegradação de xenobióticos encontrados no genoma da estirpe MG02 anotado pela ferramenta KAAS.

**Tabela 12.** KAAS genes e enzimas envolvidas rotas metabólicas de degradação de xenobióticos no genoma da *Enterobacter* sp. MG02

Rotas metabólicas	Produto	Gene	KO	Posição
Degradação Benzoato	acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16]	<i>fadA, fadI</i>	00632	ig 66666666.939968.peg.370
	4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]	<i>praC, xylH</i>	01821	fig 66666666.939968.peg.1148
	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase [EC:1.1.1.35 4.2.1.17 5.1.2.3]	<i>fadJ</i>	01782	fig 66666666.939968.peg.37
	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase / enoyl-CoA isomerase [EC:1.1.1.35 4.2.1.17 5.1.2.3 5.3.3.8]	<i>fadB</i>	01825	fig 66666666.939968.peg.63;
	enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17]	<i>paaF, echA</i>	01692	fig 66666666.939968.peg.1340
	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.157]	<i>paaH, hbd, fadB, mmgB</i>	0007	fig 66666666.939968.peg.1338
Degradação de Clorociclohexanos e Clorobenzeno [PATH:ko00361]	acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2.3.1.9]	<i>ACAT, atoB</i>	00626	fig 66666666.939968.peg.2868
	carboxymethylenebutenolidase [EC:3.1.1.45]	-	01061	fig 66666666.939968.peg.3717
	Degradação do Tolueno [PATH:ko00623]	carboxymethylenebutenolidase [EC:3.1.1.45]	-	01061
Degradação do xileno [PATH:ko00622]	4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]	<i>praC, xylH</i>	01821	fig 66666666.939968.peg.1148

**Resultados KAAS rotas de degradação da *Enterobacter* sp. MG02 (Continuação)**

<b>Rotas metabólicas</b>	<b>Produto</b>	<b>Gene</b>	<b>KO</b>	<b>Posição</b>
Degradação da calopractama [PATH:ko00930]	enoyl-CoA hidratase [EC:4.2.1.17]	<i>paaF</i> , <i>echA</i>	01692	fig 66666666.939968.peg.1340
	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / enoyl-CoA hidratase / 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase / enoyl-CoA isomerase [EC:1.1.1.35 4.2.1.17 5.1.2.3 5.3.3.8]	<i>fadB</i>	01825	fig 66666666.939968.peg.63
	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / enoyl-CoA hidratase / 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase [EC:1.1.1.35 4.2.1.17 5.1.2.3]	<i>fadJ</i>	01782	fig 66666666.939968.peg.371
	alcohol dehydrogenase, propanol-preferring [EC:1.1.1.1]	<i>adhP</i>	13953	fig 66666666.939968.peg.1173
	alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.1]	<i>viaY</i>	13954	fig 66666666.939968.peg.139
Degradação Naftaleno [PATH:ko00626]	alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.1]	<i>adh</i>		fig 66666666.939968.peg.4470
	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.284 1.1.1]	<i>frmA</i> , <i>ADH5</i> , <i>adhC</i>	00121	fig 66666666.939968.peg.1290
	acetaldehyde dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.2.1.10 1.1.1.1]	<i>adhE</i>	04072	fig 66666666.939968.peg.2701
Degradação de Dioxina [PATH:ko00621]	4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]	<i>praC</i> , <i>xylH</i>	01821	fig 66666666.939968.peg.1148
Degradação de Etilbenzeno [PATH:ko00642]	acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16]	<i>fadA</i> , <i>fadI</i>	00632	fig 66666666.939968.peg.370

Resultados KASS rotas de degradação da <i>Enterobacter</i> sp MG02 (conclusão)				
Rotas metabólicas	Produto	Gene	KO	Posição
	glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]	<i>GST, gst</i>	00799	fig 66666666.939968.peg.403
Metabolismo de xenobióticos por citocromo P450 [PATH:ko00980]	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.284 1.1.1.1]	<i>frmA, ADH5, adhC</i>	00121	fig 66666666.939968.peg.2701 fig 66666666.939968.peg.1290
	alcohol dehydrogenase, propanol-preferring [EC:1.1.1.1]	<i>adhP</i>	13953	fig 66666666.939968.peg.1173
	alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.1]	<i>adh</i>	00001	fig 66666666.939968.peg.4470

#### 4.5 Anotação funcional do genoma da *Ochrobactrum sp.* DF13

O genoma da estirpe *Ochrobactrum sp.* DF13 apresenta um total de 4.342 genes, dos quais, 4.571 representam genes codificantes, 97 representam genes de RNA e 52 representam pseudo genes (tabela 16).

**Tabela 13.** Característica do genoma da estirpe bacteriana *Ochrobactrum sp.* DF13

Característica do genoma de <i>Ochrobactrum sp.</i> DF13	
Genes total	4.342
CDS ( total)	4.571
Genes(codante)	4.229
CDSs (com proteína)	4.229
Genes (RNA)	97
rRNAs	3,1,1 (5S, 16S e 23S)
rRNAs completo	3,1,1 (5S, 16S e 23S)
tRNAs	52
ncRNAs	4
CDSs (sem proteína)	52
Pseudo Genes (total)	52

Nos dados gerados utilizando PATRIC, obteve-se os recursos proteicos do genoma de DF13, dos quais 1.130 são proteínas hipotéticas, 3.441 são proteínas com designação funcional e 881 são proteínas com ortologia gênica funcional (tabela 17).

**Tabela 14.** Dados de recursos proteicos do genoma da estirpe bacteriana DF13 através da ferramenta de bioinformática PATRIC.

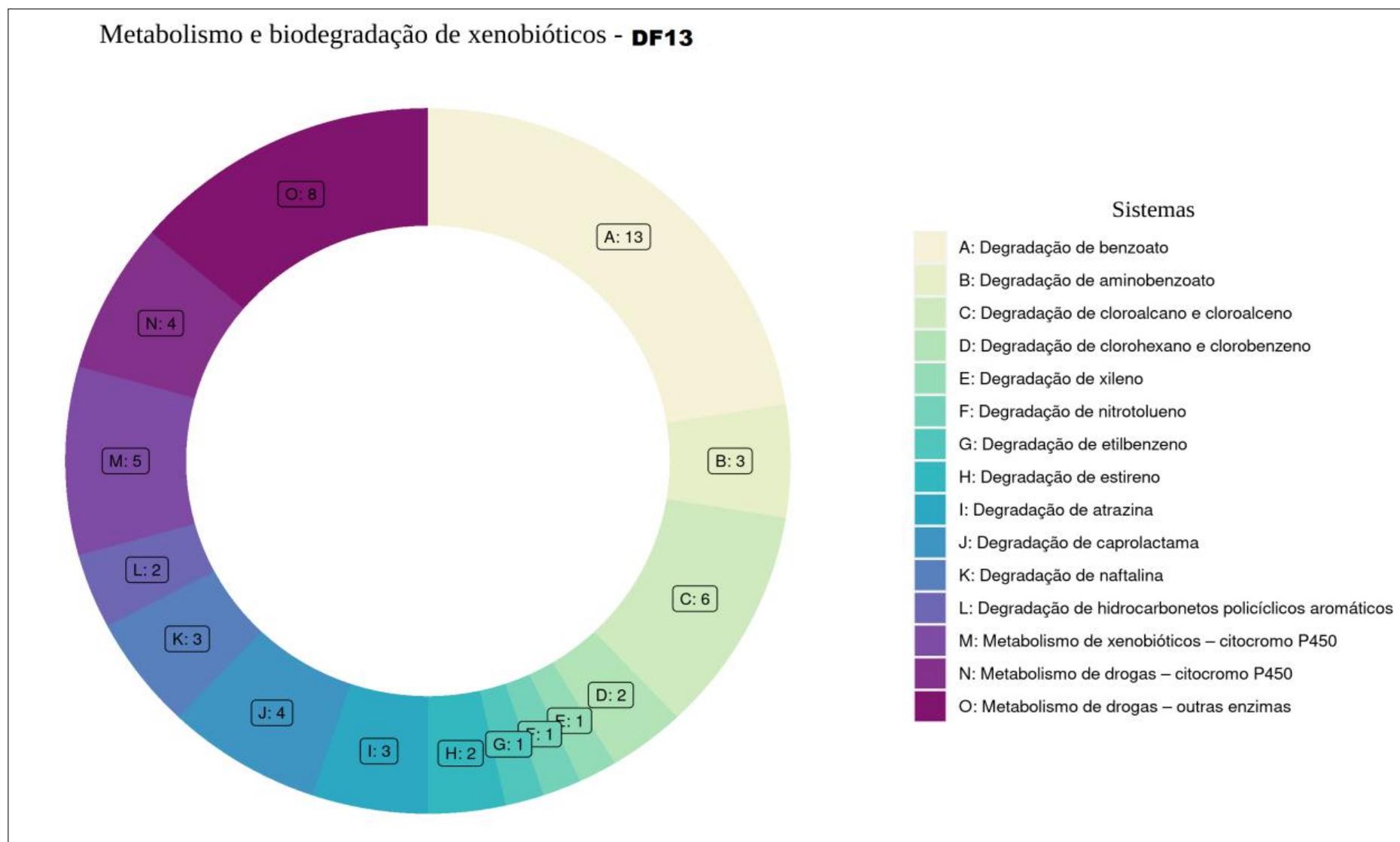
Recursos Protéicos <i>Ochrobactrum sp.</i> DF13- PATRIC	
Proteínas hipotéticas	1.130
Proteína com designação funcional	3.441
Proteína com GO* funcional	881
Proteínas com PATRIC gene-específico (PLfam) funcional	4.310
Proteínas com PATRIC famílias de genes cruzados (PGfam) funcional	4.332

\*ontologia gênica

O resultado gerado pela ferramenta KASS para análise de sistema metabólico do genoma de *Ochrobactrum sp.* DF13 é mostrado na figura 28. Os dados do sistema metabólico de degradação são relevantes para este trabalho porque através destes são descobertos quais genes e enzimas no genoma da estirpe estudada (*Ochrobactrum sp.*

DF13) estão envolvidos na degradação do 2,4-D. Em uma prévia análise dos sistemas encontrados, os mais interessantes para este estudo são: degradação benzoato (13), clorociclohexanos e clorobenzeno com (2), xileno (1), etilbenzeno (1), atrazina (3), caprolactama(4), nafataleno (3) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (4), cujos números de enzimas encontram-se entre parênteses.

Ao analisar mais detalhadamente os resultados gerados no KAAS sobre rotas metabólicas do genoma de *Ochrobactrum* sp. DF13 destacaram-se os que podem ser visto na tabela 18. Nos resultados há a presença do *cluster* de genes catabólicos protecatuato *pcaBCDGH*, envolvido nas rotas catabólica essenciais para degradação de vários ácidos aromáticos, incluindo rota do  $\beta$ -ceto-adipato. Além disso, esses genes produzem enzimas dioxigenases, importantes para a degradação do 2,4-D. Destaca-se também o gene *catE*, que está relacionado à degradação do catecol, produz a enzima catecol 2,3-dioxigenase (degradação via meta), importante papel para abertura do anel aromático. Outra enzima em destaque é a p-hidroxibenzoato 3-monooxigenase, produto do gene *pobA*, cuja a ação oxigenasse é importante no processo de catálise do herbicida 2,4-D. Há a presença do gene *gst* (glutathiona S-transferase), assim como na estirpe *Ochrobactrum* sp.DF13, indicando uma possível resistência a herbicida.



**Figura 28.** Sistemas do metabolismo e Biodegradação de xenobióticos encontrados no genoma da estirpe *Ochrobactrum* sp. DF13 gerado pela ferramenta KA

**Tabela 15.** KAAS genes e enzimas envolvidas nas rotas metabólicas de degradação de xenobióticos do genoma da estirpe *Ochrobactrum* sp. DF13.

Resultados KAAS rotas de degradação <i>Ochrobactrum</i> sp. DF13				
Rotas metabólicas	Produto	Gene	KO	Posição
Degradação do Benzoato	3-oxoadipate enol-lactonase [EC:3.1.1.24]	<i>pcaD</i>	00362	fig 66666666.939966.peg.1888
	acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16]	<i>fadA, fadI</i>		fig 66666666.939966.peg.1895
	catechol 2,3-dioxygenase [EC:1.13.11.2]	<i>catE</i>	07104	fig 66666666.939966.peg.3469
	protocatechuate 3,4-dioxygenase, alpha subunit [EC:1.13.11.3]	<i>pcaG</i>	00448	fig 66666666.939966.peg.1885
	protocatechuate 3,4-dioxygenase, beta subunit [EC:1.13.11.3]	<i>pcaH</i>	00449	fig 66666666.939966.peg.1886
	3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.2]	<i>pcaB</i>	01857	fig 66666666.939966.peg.1884
	4-carboxymuconolactone decarboxylase [EC:4.1.1.44]	<i>pcaC</i>		fig 66666666.939966.peg.1887;
	p-hydroxybenzoate 3-monooxygenase [EC:1.14.13.2]	<i>pobA</i>	00481	fig 66666666.939966.peg.1890
	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase [EC:1.1.1.35 4.2.1.17 5.1.2.3]	<i>fadJ</i>	01782	fig 66666666.939966.peg.1640
	glutaryl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.8.6]	<i>GCDH, gcdH</i>	00252	fig 66666666.939966.peg.3833
	enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17]	<i>paaF, echA</i>		fig 66666666.939966.peg.1175
	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.157]	<i>paaH, hbd, fadB, mmgB</i>	00074	fig 66666666.939966.peg.1475;
acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2.3.1.9]	<i>ACAT, atoB</i>	00626	fig 66666666.939966.peg.1639	

---

**Resultados KASS rotas de degradação da *Ochrobactrum* sp.DF13 (continuação)**


---

<b>Rotas metabólicas</b>	<b>Produto</b>	<b>Gene</b>	<b>KO</b>	<b>Posição</b>
Degradação de Clorociclohexanos e Clorobenzeno [PATH:ko00361]	catechol 2,3-dioxygenase [EC:1.13.11.2]	<i>catE</i>	07104	fig 6666666.939966.peg.3469
	2-haloacid dehalogenase [EC:3.8.1.2]	-	01560	fig 6666666.939966.peg.535
Degradação de Etilbenzeno [PATH:ko00642]	acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16]	<i>fadA, fadI</i>	00632	fig 6666666.939966.peg.1895
Degradação de estireno [PATH:ko00643]	amidase [EC:3.5.1.4]	<i>amiE</i>	01426	fig 6666666.939966.peg.4247
	catechol 2,3-dioxygenase [EC:1.13.11.2]	<i>catE</i>	07104	fig 6666666.939966.peg.3469
Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclico [PATH:ko00624]	protocatechuate 3,4-dioxygenase, alpha subunit [EC:1.13.11.3]	<i>pcaG</i>		fig 6666666.939966.peg.1885
	protocatechuate 3,4-dioxygenase, beta subunit [EC:1.13.11.3]	<i>pcaH</i>	00449	fig 6666666.939966.peg.1886
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 [PATH:ko00980]	glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]	<i>GST, gst</i>	00799	fig 6666666.939966.peg.391
	dihydrodiol dehydrogenase / D-xylose 1-dehydrogenase (NADP) [EC:1.3.1.20 1.1.1.179]	<i>DHDH</i>	00078	fig 6666666.939966.peg.4235

---

## 4.6 Análise genômica funcional das estirpes bacterianas da coleção DSMZ

### 4.6.1 *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSMZ 101093)

A estirpe bacteriana DSMZ 101093 é encontrada no NCBI como *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* strain LMG27195. Desta forma, se encontra nomeada de tal forma na tabela 19. Ao analisar os dados de degradação de xenobióticos e metabolismo foi verificada a presença de alguns genes e enzimas que também aparecem na estirpe bacteriana *Enterobacter* sp. MG02. Entretanto, assim como em *Enterobacter* sp. MG02, não foram encontrados genes padrões ligados à degradação do 2,4-D como “*tfd*”, “*cats*”, “*cads*”, “*clc*” e outros. Dentro da degradação de benzenoato, fluorbenzenoato, cloroalcano, tolueno, estireno, capolactram e metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450 há genes e enzimas que podem ser exploradas para entender melhor como este microrganismo age na degradação dos compostos aromáticos, principalmente o 2,4-D.

**Tabela 16.** KAAS genes e enzimas envolvidas nas rotas metabólicas de degradação de xenobióticos do genoma da estirpe *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* strain LMG27195 (DSMZ 101093).

Rotas metabólicas	Produto	Gene	KO	Posição
Benzoate degradation [PATH:ko00362]	acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16]	<i>fadA</i> <i>fadI</i>	K00632	AOP92219.1 AOP93278.1
	4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]	<i>praC</i> <i>xylH</i>	K01821	AOP91502.1
	4-carboxymuconolactone decarboxylase [EC:4.1.1.44]	<i>pcaC</i>	K01607	AOP91430.1
	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase [EC:1.1.1.35 4.2.1.17 5.1.2.3]	<i>fadJ</i>	K01782	AOP92218.1
	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase / enoyl-CoA isomerase [EC:1.1.1.35 4.2.1.17 5.1.2.3 5.3.3.8]	<i>fadB</i>	K01825	AOP93277.1
	enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17]	<i>paaF</i> , <i>echA</i>	K01692	AOP91302.1
	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.157]	<i>paaH</i> , <i>hbd</i> , <i>fadB</i> , <i>mmgB</i>	K00074	AOP91303.1
	acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2.3.1.9]	<i>ACAT</i> , <i>atoB</i>	K00626	AOP92677.1
	acylphosphatase [EC:3.6.1.7]	<i>acyP</i>	K01512	AOP90796.1
	vanillate/4-hydroxybenzoate decarboxylase subunit C [EC:4.1.1.- 4.1.1.61]	<i>bsdC</i>	K01612	AOP92581.1
Aminobenzoate degradation [PATH:ko00627]	vanillate/4-hydroxybenzoate decarboxylase subunit D [EC:4.1.1.- 4.1.1.61]	<i>bsdD</i>	K21759	AOP92580.1
	flavin prenyltransferase [EC:2.5.1.129]	<i>ubiX</i> , <i>bsdB</i> , <i>PAD1</i>	K03186	AOP92197.1 AOP92582.1
Fluorobenzoate degradation [PATH:ko00364]	enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17]	<i>paaF</i> , <i>echA</i> ;	K01692	AOP91302.1
	carboxymethylenebutenolidase [EC:3.1.1.45]	<i>E3.1.1.45</i>	K01061	AOP89550.1
Chloroalkane and chloroalkene degradation [PATH:ko00625]	alcohol dehydrogenase, propanol-preferring [EC:1.1.1.1]	<i>adhP</i>	K13953	AOP91476.1
	alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.1]	<i>E1.1.1.1</i> , <i>adh</i>	K00001	AOP93395.1
	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.284 1.1.1.1]	<i>frmA</i> , <i>ADH5</i> , <i>adhC</i>	K00121	AOP91348.1
	acetaldehyde dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.2.1.10 1.1.1.1]	<i>adhE</i>	K04072	AOP91658.1
	aldehyde dehydrogenase (NAD <sup>+</sup> ) [EC:1.2.1.3]	<i>ALDH</i>	K00128	AOP89893.1

**Resultados KASS rotas de degradação *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* strain LMG27195 (DSMZ 101093). Continuação**

<b>Rotas metabólicas</b>	<b>Produto</b>	<b>Gene</b>	<b>KO</b>	<b>Posição</b>
Toluene degradation [PATH:ko00623]	carboxymethylenebutenolidase [EC:3.1.1.45]	<i>E3.1.1.45</i>	K01061	AOP89550.1
Xylene degradation [PATH:ko00622]	4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]	<i>praC, xylH</i>	K01821	AOP91502.1
Nitrotoluene degradation [PATH:ko00633]	nitroreductase [EC:1.-.-.]	<i>nfsA</i>	K10678	AOP90681.1
	nitroreductase / dihydropteridine reductase [EC:1.-.-.- 1.5.1.34]	<i>nfnB, nfsB</i>	K10679	AOP90393.1
	N-ethylmaleimide reductase [EC:1.-.-.]	<i>nemA</i>	K10680	AOP91150.1
Ethylbenzene degradation [PATH:ko00642]	acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16]	<i>fadA, fadI</i>	K00632	AOP92219.1 AOP93278.1
Styrene degradation [PATH:ko00643]	phenylacetaldehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.39]	<i>feaB, tynC</i>	K00146	AOP91292.1
Atrazine degradation [PATH:ko00791]	urease subunit alpha [EC:3.5.1.5]	<i>ureC</i>	K01428	AOP92864.1
	urease subunit beta [EC:3.5.1.5]	<i>ureB</i>	K01429	AOP92863.1
	urease subunit gamma [EC:3.5.1.5]	<i>ureA</i>	K01430	AOP92862.1
	enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17]	<i>paaF, echA</i>	K01692	AOP91302.1
Caprolactam degradation [PATH:ko00930]	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase / enoyl-CoA isomerase [EC:1.1.1.35 4.2.1.17 5.1.2.3 5.3.3.8]	<i>fadB</i>	K01825	AOP93277.1
	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase [EC:1.1.1.35 4.2.1.17 5.1.2.3]	<i>fadJ</i>	K01782	AOP92218.1
Dioxin degradation [PATH:ko00621]	4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]	<i>praC, xylH</i>	K01821	AOP91502.1
	alcohol dehydrogenase, propanol-preferring [EC:1.1.1.1]	<i>adhP</i>	K13953	AOP91476.1
	alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.1]	<i>E1.1.1.1, adh</i>	K00001	AOP93395.1
Naphthalene degradation [PATH:ko00626]	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.284 1.1.1.1]	<i>frmA, ADH5, adhC</i>	K00121	AOP91348.1
	acetaldehyde dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.2.1.10 1.1.1.1]	<i>adhE</i>	K04072	AOP91658.1
	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.284 1.1.1.1]	<i>frmA, ADH5, adhC</i>	K00121	AOP91348.1
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 [PATH:ko00980]	alcohol dehydrogenase, propanol-preferring [EC:1.1.1.1]	<i>adhP</i>	K13953	AOP91476.1
	alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.1]	<i>E1.1.1.1, adh</i>	K00001	AOP93395.1
				AOP89660.1
	glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]	<i>gst</i>	K00799	AOP90667.1 AOP91165.1 AOP92187.1

#### 4.6.2 *Ochrobactrum ciceri* (DSMZ- 22292)

Na análise do genoma da estirpe bacteriana *O. ciceri* DSMZ-22292 há algumas diferenças no metabolismo de degradação em relação à estirpe DF13, cujos resultados podem ser vistos na tabela 20. Nos resultados da tabela podemos destacar alguns genes e seus produtos nas degradações de benzenoato, clorociclohexanos e clorobenzeno, xileno, hidrocarbonetos policíclicos e metabolismo de xenobióticos por citocromo P450. Pode-se observar a presença do gene *catE* que está envolvido na degradação de compostos aromáticos e também em 2,4-D; genes *fadA* e *fadI* (acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16]); há presença do operon *pcaBDGH*, produz enzimas dioxigenases importante para abertura do anel aromático; gene *pobA* (p-hydroxybenzoate 3-monooxygenase) que produz mooxigenase; os genes *praC* e *xylH* (4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]), envolvido na degradação de fenol e catecol; gene *gnl* (gluconolactonase [EC:3.1.1.17]), que faz parte do grupo das hidrolases; já o gene *gst* (glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]) está relacionado a destoxificação de xenobióticos.

**Tabela 17.** KAAS genes e enzimas envolvidas nas rotas metabólicas de degradação de xenobióticos do genoma da estirpe *Ochrobactrum ciceri* DSMZ 22292.

Rotas metabólicas	Produto	Gene	KO	Posição
Degradação Benzonoato	acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16]	<i>fadA, fadI</i>	00632	WP_006468971.1 WP_006470026.1
	4-carboxymuconolactone decarboxylase [EC:4.1.1.44]	<i>praC</i>	01607	WP_006468979.1
	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase [EC:1.1.1.35 4.2.1.17 5.1.2.3]	<i>fadJ</i>	01782	WP_075041840.1
	protocatechuate 3,4-dioxygenase, alpha subunit [EC:1.13.11.3] enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17]	<i>pcaG;</i>	00448	WP_241083948.1
		<i>paaF, echA</i>	01692	WP_006473179.1 WP_006473077.1
	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.157]	<i>paaH, hbd, fadB, mmgB</i>	00074	WP_025092165.1
	p-hydroxybenzoate 3-monooxygenase [EC:1.14.13.2]	<i>pobA</i>	00481	WP_006468976.1
	protocatechuate 3,4-dioxygenase, beta subunit [EC:1.13.11.3] 3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.2] catechol 2,3-dioxygenase [EC:1.13.11.2]	<i>pcaH;</i>	00449	WP_241083949.1
		<i>pcaB</i>	01857	WP_006468982.1
	Degradação de Clorociclohexanos e Clorobenzeno [PATH:ko00361]	glutaryl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.8.6] 3-oxoadipate enol-lactonase [EC:3.1.1.24]	<i>GCDH, gcdH</i> <i>pcaD</i>	01055
acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2.3.1.9]		<i>ACAT, atoB</i>	00626	WP_006471271.1 WP_006472095.1
catechol 2,3-dioxygenase [EC:1.13.11.2]		<i>catE</i>	07104	WP_052018811.1
2-haloacid dehalogenase [EC:3.8.1.2]		-	01560	WP_025091251.1
Degradação do Tolueno [PATH:ko00623]	carboxymethylenebutenolidase [EC:3.1.1.45]	-	01061	fig 66666666.939968.p eg.3717;

Rotas metabólicas	Produto	Gene	KO	Posição
Degradação do xileno [PATH:ko00622]	4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]	<i>praC</i> , <i>xylH</i>	01821	fig 66666666.939968.peg.11 48
Degradação de estireno [PATH:ko00643]	amidase [EC:3.5.1.4]	<i>amiE</i>	01426	WP_021586793 WP_112701812.1 WP_176056577.1
	catechol 2,3-dioxygenase [EC:1.13.11.2]	<i>catE</i>	07104	WP_052018811.1
Degradação da calopractama [PATH:ko00930]	gluconolactonase [EC:3.1.1.17]	<i>gnl</i> , <i>RGN</i>	01692	WP_063621175.1 WP_075041527.1
	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase [EC:1.1.1.35 4.2.1.17 5.1.2.3]	<i>fadJ</i>	01782	WP_075041840.1
	enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17]	<i>paaF</i> , <i>echA</i>	01692	WP_006473077.1 WP_006473179.1 WP_006473179.1
Degradação do Naftaleno [PATH:ko00626]	alcohol dehydrogenase, propanol-preferring [EC:1.1.1.1] alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.1]	<i>adhP</i> <i>adh</i>	13953 00001	WP_113387993.1 WP_241084366.1
	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.284 1.1.1]	<i>frmA</i> , <i>ADH5</i> , <i>adhC</i>	00121	WP_021586396.1
Degradação de Dioxina [PATH:ko00621]	4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]	<i>praC</i> , <i>xylH</i>	01821	fig 66666666. 939968.peg.1148
Degradação de Etilbenzeno [PATH:ko00642]	acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16]	<i>fadA</i> , <i>fadI</i>	00632	WP_006468971.1 WP_006470026.1
Degradação de hidrocarbonetos aromático policíclico [PATH:ko00624]	protocatechuate 3,4-dioxygenase, alpha subunit [EC:1.13.11.3]	<i>pcaG</i> ;	00448	WP_241083948.1
	protocatechuate 3,4-dioxygenase, beta subunit [EC:1.13.11.3]	<i>pcaH</i>	00449	WP_241083949.1

---

**Resultados KASS rotas de degradação *O.ciceri* DSMZ 22292 (conclusão)**


---

<b>Rotas metabólicas</b>	<b>Produto</b>	<b>Gene</b>	<b>KO</b>	<b>Posição</b>
				WP_006466432.1 WP_006467595.1 WP_006472201.1 WP_021586931.1 WP_025089489.1 WP_025091995.1 WP_075041842.1
	glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]	<i>GST, gst</i>	00799	
Metabolismo de xenobióticos por citocromo P450 [PATH:ko00980]	dihydrodiol dehydrogenase / D-xylose 1-dehydrogenase (NADP) [EC:1.3.1.20 1.1.1.179]	<i>DHDH</i>	00078	WP_112700801.1
	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.284 1.1.1.1]	<i>frmA, ADH5, adhC</i>	00121	WP_021586396.1
	alcohol dehydrogenase, propanol-preferring [EC:1.1.1.1]	<i>adhP</i>	13953	WP_113387993.1
	alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.1]	<i>adh</i>	00001	WP_241084366.1

---

#### 4.6.3 *Bacillus thuringiensis* (ATCC-10972)

Ao fazer a busca do genoma da estirpe bacteriana ATCC 33679 foi notado que ela foi classificada como *B. thuringiensis* sorovar Berliner. Desta forma, a tabela 21 apresenta os dados gerados da ferramenta KAAS do sistema de degradação de xenobióticos e seus metabólitos do genoma da estirpe bacteriana que até então denominava-se de *B. thuringiensis* sorovar kurstaki. Contudo, o genoma de ATCC 33679 não se encontra no NCBI, então foi decidido analisar o genoma de *B.thuringiensis* sorovar Berliner (ATCC-10972).

Na análise do genoma da estirpe pode-se observar alguns genes e enzimas que podem ser responsáveis pela biotransformação do 2,4-D pela estirpe ATCC-10972 . Na tabela (21) se destaca a degradação de benzenoato, fluorobenzenoato, ciclohexano e ciclobenzeno, tolueno, xileno, etilbenzeno, estireno, dioxina, metabolismo de xenobióticos do citocromo p450, nestes sistemas há a repetição de alguns genes e seus produtos que estão envolvidos em mais de um sistema. Dentre esses sistemas de degradação destacam-se os seguintes genes e seus produtos: *catB* (muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.1]), *catE* (catechol 2,3-dioxygenase [EC:1.13.11.2]); *fadA* e *fadI* (acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16]); *pcaC* e *xyIH* (4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]; *fadB* (enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17]); *paaH*, *hbd*, *fadB* e *mmgB* (3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.157]); ACAT, *atoB* (acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2.3.1.9] ); UGT (glucuronosyltransferase [EC:2.4.1.17]). Foram encontrados diversos genes de interesse, porém não foi possível encontrar os genes padrões de degradação de 2,4-D,entretanto, há presença da catechol 2,3-dioxygenase [EC:1.13.11.2], o que indica que este microrganismo pode trabalhar pela rota metaclivagem

A estirpe bacteriana da coleção DSMZ não tinha seu genoma no NCBI até a data de 09 de novembro de 2022, por causa disso, foi analisado o genoma de *B. thuringiensis* sorovar kurstaki HD73. Analisando os dados da tabela 22 pode-se observar a presença de alguns genes e enzimas mais relevantes para considerar um estudo mais profundo da possível rota de degradação do 2,4-D por esta estirpe. Destaca-se o gene *CatB* (muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.1]); *catE* (catechol 2,3-dioxygenase [EC:1.13.11.2]); *praC* e *xyIH* (-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]); *pcaC* (4-carboxymuconolactone decarboxylase [EC:4.1.1.44]); *fadN* (3-hydroxyacyl-

CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.35]); *vanA* (vanillate monooxygenase [EC:1.14.13.82]). É notável a ausência do gene *gst* (glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]), que esteve presente em todas bactérias estudadas. Não foram encontrados genes padrão de degradação do 2,4-D nesta estirpe bacteriana.

**Tabela 18.** KAAS que apresenta os genes e enzimas envolvidas nas rota metabólica de degradação de xenobióticosdo genoma da estirpe *B. thuringiensis* Berliner (ATCC-10972)

Rotas metabólicas	Produto	Gene	KO	Posição
	muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.1]	<i>catB</i>	k01856	EEM68089.1
	acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16]	<i>fadA fadI</i>	k00632	EEM63595.1
	catechol 2,3-dioxygenase [EC:1.13.11.2]	<i>catE</i>	k07104	EEM64252.1
	4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]	<i>praC, xylH</i>	k01821	EEM65176.1
Degradação de Benzoato [PATH:ko00362]	4-carboxymuconolactone decarboxylase [EC:4.1.1.44]	<i>pcaC</i>	k01607	EEM63207.1
	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.35]	<i>fadN</i>	k07516	EEM66605.1
	enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17]	<i>fadB</i>	k01376	EEM63596.1
	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.157]	<i>paaH, hdh, fabB, mmgB</i>	K00074	EEM63991.1
	acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2.3.1.9]	<i>ACAT, atoB</i>	K00626	EEM63262.1
Degradação de Fluorobenzoato [PATH:ko00364]	muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.1]	<i>catB</i>	K01856	EEM68089.1

**Resultados KASS rotas de degradação *Bacillus thuringiensis* Berliner ATCC 10972 (continuação)**

<b>Rotas metabólicas</b>	<b>Produto</b>	<b>Gene</b>	<b>KO</b>	<b>Posição</b>
Degradação de Cloroalcano e Cloroalqueno [PATH:ko00625]	alcohol dehydrogenase, propanol-preferring [EC:1.1.1.1]	<i>adhP</i>	K13953	EEM66329.1
	acetaldehyde dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.2.1.10 1.1.1.1]	<i>adhE</i>	K04072	EEM64263.1
	aldehyde dehydrogenase (NAD+) [EC:1.2.1.3]	<i>ALDH</i>	K00128	EEM65076.1 EEM65749.1 EEM67252.1
	2-haloacid dehalogenase [EC:3.8.1.2]	<i>E3.8.1.2</i>	K01560	EEM63237.1
Degradação de Clorociclohexano e Clorobenzeno [PATH:ko00361]	muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.1]	<i>catB</i>	K01856	EEM68089.1
	catechol 2,3-dioxygenase [EC:1.13.11.2]	<i>catE</i>	K07104	EEM64252.1 EEM65176.1
	2-haloacid dehalogenase [EC:3.8.1.2]	<i>E3.8.1.2</i>	K01560	EEM63237.1
Degradação de Tolueno [PATH:ko00623]	muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.1]	<i>catB</i>	K01856	EEM68089.1
Degradação do xileno [PATH:ko00622]	catechol 2,3-dioxygenase [EC:1.13.11.2]	<i>catE</i>	K07104	EEM64252.1 EEM65176.1
	4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]	<i>praC, xylH</i>	K01821	EEM63207.1
Degradação de Etilbenzeno [PATH:ko00642]	acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16]	<i>fadA, fadI</i>	K00632	EEM63595.1
	homogentisate 1,2-dioxygenase [EC:1.13.11.5]	<i>HGD, hmgA</i>	K00451	EEM68120.1
Degradação do Estireno [PATH:ko00643]	amidase [EC:3.5.1.4]	<i>E3.5.1.4, amiE</i>	K01426	EEM66451.1
	catechol 2,3-dioxygenase [EC:1.13.11.2]	<i>catE</i>	K07104	EEM64252.1 EEM65176.1
Degradação de Dioxina [PATH:ko00621]	4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]	<i>praC, xylH</i>	K01821	EEM63207.1
Degradação de Naftaleno [PATH:ko00626]	alcohol dehydrogenase, propanol-preferring [EC:1.1.1.1]	<i>adhP</i>	K13953	EEM66329.1
	acetaldehyde dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.2.1.10 1.1.1.1]	<i>adhE</i>	K04072	EEM64263.1
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 [PATH:ko00980]	glucuronosyltransferase [EC:2.4.1.17]	<i>UGT</i>	K00699	EEM65894.1 EEM66288.1
	alcohol dehydrogenase, propanol-preferring [EC:1.1.1.1]	<i>adhP</i>	K13953	EEM66329.1

**Tabela 19.** Resultados gerados pela ferramenta KAAS que apresenta os genes e enzimas envolvidas nas rota metabólica do genoma da estirpe *B. thuringiensis* sorovar kurstaki HD73

Rotas metabólicas	Produto	Gene	KO	Posição
Degradação de clorociclohexano e clorobenzeno [PATH:ko00361]	catechol 2,3-dioxygenase [EC:1.13.11.2]	<i>catE</i>	K07104	WP_00000984 5.1
	2-haloacid dehalogenase [EC:3.8.1.2]	<i>E3.8.1.2</i>	K01560	WP_00000984 5.1
	2-haloacid dehalogenase [EC:3.8.1.2]	<i>E3.8.1.2</i>	K01560	WP_00076019 2.1
	muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.1]	<i>catB</i>	K01856	WP_00076019 2.1
Degradação do Tolueno [PATH:ko00623]	muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.1]	<i>catB</i>	K01856	WP_00070449 0.1
	muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.1]	<i>catB</i>	K01856	WP_00070449 0.1
Degradação de Xileno [PATH:ko00622]	catechol 2,3-dioxygenase [EC:1.13.11.2]	<i>catE</i>	K07104	WP_00000984 5.1
	4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]	<i>praC, xylH</i>	K01821	WP_00024987 7.1
Degradação de Etilbenzeno [PATH:ko00642]	acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16]	<i>fadA, fadI</i>	K00632	WP_00114717 1.1
	homogentisate 1,2-dioxygenase [EC:1.13.11.5]	<i>HGD, hmgA</i>	K00451	WP_00120632 4.1
	amidase [EC:3.5.1.4]	<i>E3.5.1.4, amiE</i>	K01426	WP_01314171 0.1
Degradação de Estireno [PATH:ko00643]	amidase [EC:3.5.1.4]	<i>E3.5.1.4, amiE</i>	K01426	WP_00040539 4.1
	catechol 2,3-dioxygenase [EC:1.13.11.2]	<i>catE</i>	K07104	WP_00000984 5.1
				WP_00024987 7.1

---

**Resultados KASS rotas de degradação *B. thuringiensis* sorovar kurstaki HD73 (conclusão)**


---

<b>Rotas metabólicas</b>	<b>Produto</b>	<b>Gene</b>	<b>KO</b>	<b>Posição</b>
Degradação de Dioxina [PATH:ko00621]	4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]	<i>praC, xylH</i>	K01821	WP_00114717 1.1
	alcohol dehydrogenase, propanol-preferring [EC:1.1.1.1]	<i>adhP</i>	K13953	WP_00064910 9.1
Degradação de Naftaleno [PATH:ko00626]	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.284 1.1.1.1]	<i>frmA, ADH5, adhC</i>	K00121	WP_00064909 1.1
	acetaldehyde dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.2.1.10 1.1.1.1]	<i>adhE</i>	K04072	WP_00026050 2.1
Metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450 [PATH:ko00980]	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.284 1.1.1.1]	<i>frmA, ADH5, adhC</i>	K00121	WP_00064909 1.1
	alcohol dehydrogenase, propanol-preferring [EC:1.1.1.1]	<i>adhP</i>	K13953	WP_00064910 9.1

---

#### 4.6.4 *Cupriavidus pinatubonesis* JMP134 estirpe padrão de degradação do 2,4-D

Por meio dos dados gerados pela ferramenta KAAS, foi analisado o sistema de degradação de xenobióticos e metabolismo estirpe bacteriana *Cupriavidus pinatubonesis* JMP134. No NCBI foram encontrados dois cromossomos e dois plasmídeos em seu genoma. Os dados podem ser vistos na tabela 23 e 24. Na tabela 23 estão presentes os principais genes de interesse, destacando-se: *benA-xylX* (benzoate/toluato 1,2-dioxygenase subunit alpha [EC:1.14.12.10 1.14.12.-]) e benzoate/toluato 1,2-dioxygenase subunit beta [EC:1.14.12.10 1.14.12.-]); *benC-xylZ* (benzoate/toluato 1,2-dioxygenase reductase component [EC:1.18.1.-]); *benD-xylL* (dihydroxycyclohexadiene carboxylate dehydrogenase [EC:1.3.1.25 1.3.1.-]); *catA* (catechol 1,2-dioxygenase [EC:1.13.11.1]); *catB* (muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.1]); *catC* (muconolactone D-isomerase [EC:5.3.3.4]); *pcaD* (3-oxoadipate enol-lactonase [EC:3.1.1.24]); *fadA* e *fadI* (acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16]); *mhpD* (2-keto-4-pentenoate hydratase [EC:4.2.1.80]); *praC* e *xylH* (4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]); *pcaG* (protocatechuate 3,4-dioxygenase, alpha subunit [EC:1.13.11.3]); *pcaH* (protocatechuate 3,4-dioxygenase, beta subunit [EC:1.13.11.3]); *pcaB* (3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.2]); *pcaC* (4-carboxymuconolactone decarboxylase [EC:4.1.1.44]); *pobA* (p-hydroxybenzoate 3-monooxygenase [EC:1.14.13.2]); *nagX* (3-hydroxybenzoate 6-monooxygenase [EC:1.14.13.24]); *fadN* (3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.35]); *paaF* (echA; enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17]); *HGD*, *hmgA*; homogentisate 1,2-dioxygenase [EC:1.13.11.5]; *vanA* (vanillate monooxygenase [EC:1.14.13.82]) *feaB* *etynC* (phenylacetaldehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.39]); *mhpD* (2-keto-4-pentenoate hydratase [EC:4.2.1.80]); *kshA* (3-ketosteroid 9alpha-monooxygenase subunit A [EC:1.14.15.30]); *ethA* (monooxygenase [EC:1.14.13.-]); *kshB* (3-ketosteroid 9alpha-monooxygenase subunit B [EC:1.14.15.30]); *hsaA* (3-hydroxy-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-triene-9,17-dione monooxygenase [EC:1.14.14.12]); *hsaB* (3-hydroxy-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-triene-9,17-dione monooxygenase reductase component [EC:1.5.1.-]); *GST* (glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]).

No primeiro plasmídeo analisado não havia genes de degradação de xenobióticos. Já no segundo plasmídeo (tabela 24) não foram encontrados os genes

padrões de degradação do 2,4-D como o “*tfd*”, “*clc*” “*cad*” entretanto, foram encontrados genes que produzem enzimas monooxigenases e dioxigenases, importantes para degradação do 2,4-D. Destacam-se os seguintes genes e seus produtos monooxigenases: *nagX* (3-hydroxybenzoate 6-monooxygenase [EC:1.14.13.24]); *vanA* (vanillate monooxygenase [EC:1.14.13.82]); *vanB* (vanillate monooxygenase ferredoxin subunit; *maiA*, *GSTZI* (maleylacetoacetate isomerase [EC:5.2.1.2]); *hsaB* (3-hydroxy-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-triene-9,17-dione monooxygenase reductase component [EC:1.5.1.-]). Além desses, há outras genes e produtos que já foram citados e que são de extrema importância para entender como que esta estirpe bacteriana degrada 2,4-D.

**Tabela 20.** KAAS sistemas de degradação de xenobióticos da estirpe bacteriana *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134

Rotas metabólicas	Produto	Gene	KO	Posição
Degradação de Benzoato [PATH:ko00362]	benzoate/toluato 1,2-dioxygenase subunit alpha [EC:1.14.12.10 1.14.12.-]	<i>benA-xylX</i> <i>benB-xylY</i>	K05549 K05550	fig 6666666.965524.peg.5287 peg.5288
	benzoate/toluato 1,2-dioxygenase reductase component [EC:1.18.1.-]	<i>benC-xylZ</i>	K05784	fig 6666666.965524.peg.5289;
	dihydroxycyclohexadiene carboxylate dehydrogenase [EC:1.3.1.25 1.3.1.-]	<i>benD-xylL</i>	K05783	fig 6666666.965524.peg.5290
	catechol 1,2-dioxygenase [EC:1.13.11.1]	<i>catA</i>	K03381	fig 6666666.965524.peg.2455
	muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.1]	<i>catB</i>	K01856	fig 6666666.965524.peg.2439
	muconolactone D-isomerase [EC:5.3.3.4]	<i>catC</i>	K03464	fig 6666666.965524.peg.2440
	3-oxoadipate enol-lactonase [EC:3.1.1.24]	<i>pcaD</i>	K01055	fig 6666666.965524.peg.2442 peg.5939
				fig 6666666.965524.peg.1151
	acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16]	<i>fadA</i> <i>fadI</i>	K00632	peg.2142 peg.2317 peg.6541 peg.194
	2-keto-4-pentenoate hydratase [EC:4.2.1.80]	<i>mhpD</i>	K02554	fig 6666666.965524.peg.966 peg.6151 peg.6647
	4-hydroxy 2-oxovalerate aldolase [EC:4.1.3.39]	<i>mhpE</i>	K01666	peg.6792
	acetaldehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.10]	<i>mhpF</i>	K04073	fig 6666666.965524.peg.6793
	4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]	<i>praC, xylH</i>	K01821	fig 6666666.965524.peg.1569 peg.3687 peg.6649
	protocatechuate 3,4-dioxygenase, alpha subunit [EC:1.13.11.3]	<i>pcaG</i>	K00448	fig 6666666.965524.peg.5941
protocatechuate 3,4-dioxygenase, beta subunit [EC:1.13.11.3]	<i>pcaH</i>	K00449	fig 6666666.965524.peg.5942	
3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.2]	<i>pcaB</i>	K01857	fig 6666666.965524.peg.5940	
4-carboxymuconolactone decarboxylase [EC:4.1.1.44]	<i>pcaC</i>	K01607	fig 6666666.965524.peg.1224 peg.6652	

---

**Resultados KAAS nas rotas de degradação de *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 (continuação)**


---

<b>Rotas metabólicas</b>	<b>Produto</b>	<b>Gene</b>	<b>KO</b>	<b>Posição</b>
Degradação de Benzoato [PATH:ko00362]	p-hydroxybenzoate 3-monooxygenase [EC:1.14.13.2]	<i>pobA</i>	K00481	fig 6666666.965524.peg.5937
	3-hydroxybenzoate 6-monooxygenase [EC:1.14.13.24]	<i>nagX</i>	K22270	fig 6666666.965524.peg.6772 peg.6830
	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.35]	<i>fadN</i>	K07516	fig 6666666.965524.peg.1150 peg.2140; peg.4724
	glutaryl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.8.6] enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17]	<i>GCD, gcdH</i> <i>paaF, echA;</i>	K00252 K01692	fig 6666666.965524.peg.1518 fig 6666666.965524.peg.801 peg.2305 peg.2307 peg.2417 peg.3821 peg.4102 peg.5442 peg.5487 peg.635 peg.401
	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.157]	<i>paaH, hbd, fadB, mmgB</i>	K00074	fig 6666666.965524.peg.948 peg.1728 peg.426 peg.519 fig 6666666.965524.peg.829 peg.2080 peg.2310 peg.2419
	acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2.3.1.9]	<i>ACAT, atoB</i>	K00626	peg.5450 peg.5640 peg.59 peg.441 peg.548

---

**Resultados KAAS nas rotas de degradação de *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 (continuação)**

<b>Rotas metabólicas</b>	<b>Produto</b>	<b>Gene</b>	<b>KO</b>	<b>Posição</b>
Degradação de Aminobenzoato [PATH:ko00627]	monooxygenase [EC:1.14.13.-]	<i>ethA</i>	K10215	fig 6666666.965524.peg.6081 fig 6666666.965524.peg.4615
	amidase [EC:3.5.1.4]	<i>E3.5.1.4, amiE</i>	K01426	peg.4938 peg.5010 peg.6069
	acylphosphatase [EC:3.6.1.7]	<i>acyP</i>	K01512	fig 6666666.965524.peg.3840 peg.329
	flavin prenyltransferase [EC:2.5.1.129]	<i>ubiX, bsdB, PADI</i>	K03186	fig 6666666.965524.peg.3860 peg.3891
	2-aminobenzoate-CoA ligase [EC:6.2.1.32]	<i>abmG</i>	K08295	fig 6666666.965524.peg.2953
	anthraniloyl-CoA monooxygenase [EC:1.14.13.40]	<i>E1.14.13.40</i>	K09461	fig 6666666.965524.peg.2957
	5-carboxyvanillate decarboxylase	<i>ligW</i>	K15063	fig 6666666.965524.peg.4632
	vanillate monooxygenase [EC:1.14.13.82]	<i>vanA</i>	K03862	fig 6666666.965524.peg.5220
	acetate CoA/acetoacetate CoA-transferase alpha subunit [EC:2.8.3.8 2.8.3.9]	<i>atoD</i>	K01034	fig 6666666.965524.peg.6539
	acetate CoA-transferase [EC:2.8.3.8]	<i>ydiF</i>	K19709	fig 6666666.965524.peg.2234 fig 6666666.965524.peg.801 peg.2305 peg.2307 peg.2417 peg.3821 peg.4102 peg.5442 peg.5487 peg.635 peg.401
Degradação de Fluorobenzoato [PATH:ko00364]	enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17]	<i>paaF, echA</i>	K01692	fig 6666666.965524.peg.5287
	benzoate/toluato 1,2-dioxygenase subunit alpha [EC:1.14.12.10 1.14.12.-]	<i>benA-xylX</i>	K05549	fig 6666666.965524.peg.5288
	benzoate/toluato 1,2-dioxygenase subunit beta [EC:1.14.12.10 1.14.12.-]	<i>benB-xylY</i>	K05550	fig 6666666.965524.peg.5289
	benzoate/toluato 1,2-dioxygenase reductase component [EC:1.18.1.-]	<i>benC-xylZ</i>	K05784	fig 6666666.965524.peg.5290
	dihydroxycyclohexadiene carboxylate dehydrogenase [EC:1.3.1.25 1.3.1.- catechol 1,2-dioxygenase [EC:1.13.11.1]	<i>benD-xylL catA</i>	K05783 K03381	fig 6666666.965524.peg.2455

**Resultados KAAS nas rotas de degradação de *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 (continuação)**

Rotas metabólicas	Produto	Gene	KO	Posição
Degradação de Fluorobenzoato [PATH:ko00364]	carboxymethylenebutenolidase [EC:3.1.1.45]	<i>E3.1.1.45</i>	K01061	fig 6666666.965524.peg.1589 peg.3996 peg.6735 peg.461 peg.538
	muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.1]	<i>catB</i>	K01856	fig 6666666.965524.peg.2439 peg.5284
	alcohol dehydrogenase, propanol-preferring [EC:1.1.1.1]	<i>adhP</i>	K13953	fig 6666666.965524.peg.4519 peg.5609 peg.213
	alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.1]	<i>yiaY</i>	K13954	fig 6666666.965524.peg.2153
	alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.1]	<i>E1.1.1.1, adh</i>	K00001	fig 6666666.965524.peg.466
Degradação de Cloroalcano e Cloroalqueno [PATH:ko00625]	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.284 1.1.1.1]	<i>frmA, ADH5, adhC</i>	K00121	fig 6666666.965524.peg.4859 peg. 5741
	acetaldehyde dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.2.1.10 1.1.1.1]	<i>adhE</i>	K04072	fig 6666666.965524.peg.1581
	aldehyde dehydrogenase (NAD+) [EC:1.2.1.3]	<i>ALDH</i>	K00128	fig 6666666.965524.peg.2598 peg.4708 peg.5653
	glutathione-independent formaldehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.46]	<i>fdhA</i>	K00148	fig 6666666.965524.peg.5732
	alcohol dehydrogenase (cytochrome c) [EC:1.1.2.8]	<i>exaA</i>	K00114	fig 6666666.965524.peg.2540
	haloacetate dehalogenase [EC:3.8.1.3]	<i>dehH</i>	K01561	fig 6666666.965524.peg.856
	2-haloacid dehalogenase [EC:3.8.1.2]	<i>E3.8.1.2</i>	K01560	fig 6666666.965524.peg.2711 peg.6614 peg.6617

**Resultados KAAS nas rotas de degradação de *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 (continuação)**

<b>Rotas metabólicas</b>	<b>Produto</b>	<b>Gene</b>	<b>KO</b>	<b>Posição</b>
Degradação de Etilbenzeno [PATH:ko00642]	acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16]	<i>fadA, fadI</i>	K00632	fig 6666666.965524.peg.1151 peg.2142 peg.2317 peg.6541 peg.194
	phenylacetaldehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.39]	<i>feaB, tynC</i>	K00146	fig 6666666.965524.peg.4939
	homogentisate 1,2-dioxygenase [EC:1.13.11.5]	<i>HGD, hmgA</i>	K00451	fig 6666666.965524.peg.4776
Degradação do Estireno [PATH:ko00643]	fumarylacetoacetase [EC:3.7.1.2]	<i>FAH, fahA</i>	K01555	fig 6666666.965524.peg.2550 peg.4777
	fumarylacetoacetate (FAA) hydrolase [EC:3.7.1.2]	<i>fahH</i>	K16171	fig 6666666.965524.peg.802 ig 6666666.965524.peg.4615
	amidase [EC:3.5.1.4]	<i>E3.5.1.4, amiE</i>	K01426	peg.4938 peg.5010 peg.6069
	allophanate hydrolase [EC:3.5.1.54]	<i>atzF</i>	K01457	fig 6666666.965524.peg.5791
Degradação da Atrazina [PATH:ko00791]	urea carboxylase / allophanate hydrolase [EC:6.3.4.6 3.5.1.54]	<i>DURI</i>	K14541	fig 6666666.965524.peg.5792
	urease subunit alpha [EC:3.5.1.5]	<i>ureC</i>	K01428	fig 6666666.965524.peg.1713
	urease subunit beta [EC:3.5.1.5]	<i>ureB</i>	K01429	fig 6666666.965524.peg.1712
	urease subunit gamma [EC:3.5.1.5]	<i>ureA</i>	K01430	fig 6666666.965524.peg.1710
	epsilon-lactone hydrolase [EC:3.1.1.83]	<i>mlhB, chnC</i>	K14731	fig 6666666.965524.peg.173
	acyl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.99.-]	<i>DCAA</i>	K06446	fig 6666666.965524.peg.6253 fig 6666666.965524.peg.801 peg.2305
Degradação da caprolactama [PATH:ko00930]	enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17]	<i>paaF, echA;</i>	K01692	peg.2307 peg.2417 peg.3821
	2,4'-dihydroxyacetophenone dioxygenase [EC:1.13.11.41]	<i>dad</i>	K05913	fig 6666666.965524.peg.1082
Degradação do Bisfenol [PATH:ko00363]	4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]	<i>praC, xylH</i>	K01821	fig 6666666.965524.peg.1569 peg.3687 peg.6649
	2-keto-4-pentenoate hydratase [EC:4.2.1.80]	<i>mhpD</i>	K02554	fig 6666666.965524.peg.966 peg.6151 peg.6647
Degradação de Dioxinas [PATH:ko00621]	4-hydroxy 2-oxovalerate aldolase [EC:4.1.3.39]	<i>mhpE</i>	K01666	fig 6666666.965524.peg.6792
	acetaldehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.10]	<i>mhpF</i>	K04073	fig 6666666.965524.peg.6793

**Resultados KAAS nas rotas de degradação de *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 (continuação)**

<b>Rotas metabólicas</b>	<b>Produto</b>	<b>Gene</b>	<b>KO</b>	<b>Posição</b>
Degradação de Clorociclohexano e Clorobenzeno [PATH:ko00361]	catechol 1,2-dioxygenase [EC:1.13.11.1]	<i>catA</i>	K03381	fig 6666666.965524.peg.2455 fig 6666666.965524.peg.1589
	carboxymethylenebutenolidase [EC:3.1.1.45]	<i>E3.1.1.45</i>	K01061	peg.3996 peg.6735 peg.461 peg.538
	tetrachlorobenzoquinone reductase [EC:1.1.1.404]	<i>pcpD</i>	K21607	fig 6666666.965524.peg.4412
	muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.1]	<i>catB</i>	K01856	fig 6666666.965524.peg.2439 peg.5284
	2-haloacid dehalogenase [EC:3.8.1.2]	<i>E3.8.1.2</i>	K01560	fig 6666666.965524.peg.2711 peg.6614 peg.6617
	haloacetate dehalogenase [EC:3.8.1.3]	<i>dehH</i>	K01561	fig 6666666.965524.peg.856
	catechol 1,2-dioxygenase [EC:1.13.11.1]	<i>catA</i>	K03381	fig 6666666.965524.peg.2455
Degradação do Tolueno [PATH:ko00623]	muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.1]	<i>catB</i>	K01856	fig 6666666.965524.peg.2439 peg.5284 fig 6666666.965524.peg.1589
	carboxymethylenebutenolidase [EC:3.1.1.45]	<i>E3.1.1.45</i>	K01061	peg.3996 peg.6735 peg.461 peg.538
	benzoate/toluato 1,2-dioxygenase subunit alpha [EC:1.14.12.10 1.14.12.-]	<i>benA-xylX</i>	K05549	fig 6666666.965524.peg.5287
	benzoate/toluato 1,2-dioxygenase subunit beta [EC:1.14.12.10 1.14.12.-]	<i>benB-xylY</i>	K05550	fig 6666666.965524.peg.5288
	benzoate/toluato 1,2-dioxygenase reductase component [EC:1.18.1.-]	<i>benC-xylZ</i>	K05784	fig 6666666.965524.peg.5289
	dihydroxycyclohexadiene carboxylate dehydrogenase [EC:1.3.1.25 1.3.1.-]	<i>benD-xylL</i>	K05783	fig 6666666.965524.peg.5290 fig 6666666.965524.peg.1569
	4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]	<i>praC, xylH</i>	K01821	peg.3687 peg.6649
Degradação do Xileno [PATH:ko00622]	2-keto-4-pentenoate hydratase [EC:4.2.1.80]	<i>mhpD</i>	K02554	fig 6666666.965524.peg.966 peg.6151 peg.6647
	4-hydroxy 2-oxovalerate aldolase [EC:4.1.3.39]	<i>mhpE</i>	K01666	fig 6666666.965524.peg.6792
	acetaldehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.10]	<i>mhpF</i>	K04073	fig 6666666.965524.peg.6793

**Resultados KAAS nas rotas de degradação de *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 (conclusão)**

Rotas metabólicas	Produto	Gene	KO	Posição
Degradação de naftaleno [PATH:ko00626]	alcohol dehydrogenase, propanol-preferring [EC:1.1.1.1]	<i>adhP</i>	K13953	fig 6666666.965524.peg.4519 peg.5609 peg.213
	alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.1]	<i>yiaY</i>	K13954	fig 6666666.965524.peg.2153
	alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.1]	<i>E1.1.1.1, adh</i>	K00001	fig 6666666.965524.peg.466
	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.284 1.1.1.1]	<i>frmA, ADH5, adhC</i>	K00121	fig 6666666.965524.peg.4859 peg.5741
Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos [PATH:ko00624]	acetaldehyde dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.2.1.10 1.1.1.1]	<i>adhE</i>	K04072	fig 6666666.965524.peg.1581
	protocatechuate 3,4-dioxygenase, alpha subunit [EC:1.13.11.3]	<i>pcaG</i>	K00448	fig 6666666.965524.peg.5941
	protocatechuate 3,4-dioxygenase, beta subunit [EC:1.13.11.3]	<i>pcaH</i>	K00449	fig 6666666.965524.peg.5942
	3-oxosteroid 1-dehydrogenase [EC:1.3.99.4]	<i>kstD</i>	K05898	fig 6666666.965524.peg.2286
	3-ketosteroid 9alpha-monooxygenase subunit A [EC:1.14.15.30]	<i>kshA</i>	K15982	fig 6666666.965524.peg.2321
	3-ketosteroid 9alpha-monooxygenase subunit B [EC:1.14.15.30]	<i>kshB</i>	K15983	fig 6666666.965524.peg.2289
Degradação de esteróides [PATH:ko00984]	3-hydroxy-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-triene-9,17-dione monooxygenase [EC:1.14.14.12]	<i>hsaA</i>	K16047	fig 6666666.965524.peg.2285
	3-hydroxy-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-triene-9,17-dione monooxygenase reductase component [EC:1.5.1.-]	<i>hsaB</i>	K16048	fig 6666666.965524.peg.4297 peg.455
	3,4-dihydroxy-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-triene-9,17-dione 4,5- dioxygenase [EC:1.13.11.25]	<i>hsaC</i>	K16049	fig 6666666.965524.peg.2302
	HIP---CoA ligase [EC:6.2.1.41]	<i>fadD3</i>	K18687	fig 6666666.965524.peg.2290 fig 6666666.965524.peg.835 peg.912 peg.1473 peg.2228 peg.3126 peg.3137 peg.4320 peg.5629
Metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450 [PATH:ko00980]	glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]	<i>gst</i>	K00799	fig 6666666.965524.peg.4859 peg.5741
	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.284 1.1.1.1]	<i>frmA, ADH5, adhC</i>	K00121	fig 6666666.965524.peg.4859 peg.5741
	alcohol dehydrogenase, propanol-preferring [EC:1.1.1.1]	<i>adhP</i>	K13953	fig 6666666.965524.peg.4519 peg.5609 peg.213
	alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.1]	<i>E1.1.1.1, adh</i>	K00001	fig 6666666.965524.peg.466

**Tabela 21.** KAAS sistemas de degradação de xenobióticos do plasmídeo da estirpe bacteriana *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134.

Resultados KAAS na rota de degradação de <i>Cupriavidus pinatubonensis</i> JMP134- Plasmídeo				
Rotas metabólicas	Produto	Gene	KO	Posição
Degradação de Benzoato [PATH:ko00362]	benzoate/toluato 1,2-dioxygenase subunit alpha [EC:1.14.12.10 1.14.12.-]	<i>benA-xylX</i>	K05549	DMNFCNLP_02363
	benzoate/toluato 1,2-dioxygenase subunit beta [EC:1.14.12.10 1.14.12.-]	<i>benB-xylY</i>	K05550	DMNFCNLP_02362
	benzoate/toluato 1,2-dioxygenase reductase component [EC:1.18.1.-]	<i>benC-xylZ</i>	K05784	DMNFCNLP_02361
	dihydroxycyclohexadiene carboxylate dehydrogenase [EC:1.3.1.25 1.3.1.-]	<i>benD-xylL</i>	K05783	DMNFCNLP_02360
	catechol 1,2-dioxygenase [EC:1.13.11.1]	<i>catA</i>	K03381	DMNFCNLP_02364
	muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.1]	<i>catB</i>	K01856	DMNFCNLP_02366
	3-oxoadipate enol-lactonase [EC:3.1.1.24]	<i>pcaD</i>	K01055	DMNFCNLP_01726
	acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16]	<i>fadA, fadI</i>	K00632	DMNFCNLP_01129
	2-keto-4-pentenoate hydratase [EC:4.2.1.80]	<i>mhpD</i>	K02554	DMNFCNLP_01024
	4-hydroxy 2-oxovalerate aldolase [EC:4.1.3.39]	<i>mhpE</i>	K01666	DMNFCNLP_00889
	acetaldehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.10]	<i>mhpF</i>	K04073	DMNFCNLP_00888
	4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]	<i>praC, xylH</i>	K01821	DMNFCNLP_01022
	protocatechuate 3,4-dioxygenase, alpha subunit [EC:1.13.11.3]	<i>pcaG</i>	K00448	DMNFCNLP_01724
	protocatechuate 3,4-dioxygenase, beta subunit [EC:1.13.11.3]	<i>pcaH</i>	K00449	DMNFCNLP_01723
	3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.2]	<i>pcaB</i>	K01857	DMNFCNLP_01725
	4-carboxymuconolactone decarboxylase [EC:4.1.1.44]	<i>pcaC</i>	K01607	DMNFCNLP_01019
	p-hydroxybenzoate 3-monooxygenase [EC:1.14.13.2]	<i>pobA</i>	K00481	DMNFCNLP_01728
	3-hydroxybenzoate 6-monooxygenase [EC:1.14.13.24]	<i>nagX</i>	K22270	DMNFCNLP_00851
	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.35]	<i>fadN</i>	K07516	DMNFCNLP_00398
	enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17]	<i>paaF, echA</i>	K01692	DMNFCNLP_02157
				DMNFCNLP_02205
				DMNFCNLP_02212
				DMNFCNLP_00442
			DMNFCNLP_00670	
	acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2.3.1.9]	<i>ACAT, atoB</i>	K00626	DMNFCNLP_01964
			DMNFCNLP_02014	
			DMNFCNLP_02204	

**Resultados KAAS nas rotas de degradação de *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134- Plasmídeo (continuação)**

Rotas metabólicas	Produto	Gene	KO	Posição	
Degradação de Aminobenzoato [PATH:ko00627]	monooxygenase [EC:1.14.13.-]	<i>ethA</i>	K10215	DMNFCNLP_01588 DMNFCNLP_00119	
	amidase [EC:3.5.1.4]	<i>E3.5.1.4, amiE</i>	K01426	DMNFCNLP_00191 DMNFCNLP_00504	
	nitrilase [EC:3.5.5.1]	<i>E3.5.5.1</i>	K01501	DMNFCNLP_01298	
	anthraniloyl-CoA monooxygenase [EC:1.14.13.40]	<i>E1.14.13.40</i>	K09461	DMNFCNLP_01301	
	5-carboxyvanillate decarboxylase	<i>ligW</i>	K15063	DMNFCNLP_00487	
	vanillate monooxygenase [EC:1.14.13.82]	<i>vanA</i>	K03862	DMNFCNLP_02426 DMNFCNLP_02157	
	enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17]	<i>paaF, echA</i>	K01692	DMNFCNLP_02205 DMNFCNLP_02212	
	benzoate/toluato 1,2-dioxygenase subunit alpha [EC:1.14.12.10 1.14.12.-]	<i>benA-xylX</i>	K05549	DMNFCNLP_02363	
	benzoate/toluato 1,2-dioxygenase subunit beta [EC:1.14.12.10 1.14.12.-]	<i>benB-xylY</i>	K05550	DMNFCNLP_02362	
	Degradação de Fluorobenzoato [PATH:ko00364]	benzoate/toluato 1,2-dioxygenase reductase component [EC:1.18.1.-]	<i>benC-xylZ;</i>	K05784	DMNFCNLP_02361
dihydroxycyclohexadiene carboxylate dehydrogenase [EC:1.3.1.25 1.3.1.-]		<i>benD-xylL</i>	K05783	DMNFCNLP_02360	
catechol 1,2-dioxygenase [EC:1.13.11.1]		<i>catA</i>	K03381	DMNFCNLP_02364 DMNFCNLP_00943	
carboxymethylenebutenolidase [EC:3.1.1.45]		<i>E3.1.1.45</i>	K01061	DMNFCNLP_01139	
muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.1]		<i>catB</i>	K01856	DMNFCNLP_02366	
alcohol dehydrogenase, propanol-preferring [EC:1.1.1.1]		<i>adhP</i>	K13953	DMNFCNLP_00594 DMNFCNLP_02042	
alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.1]		<i>yiaY</i>	K13954	DMNFCNLP_02057	
alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.1]		<i>E1.1.1.1, adh</i>	K00001	DMNFCNLP_00931	
Degradação de Cloroalcano e Cloroalqueno [PATH:ko00625]		S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.284 1.1.1.1]	<i>frmA, ADH5, adhC;</i>	K00121	DMNFCNLP_00268 DMNFCNLP_01917 DMNFCNLP_02179
		aldehyde dehydrogenase (NAD+) [EC:1.2.1.3]	<i>ALDH</i>	K00128	K00128

## CAPÍTULO 5 - DISCUSSÃO

---

### 5 Histórico da pesquisa

Nosso grupo de estudo trabalha com degradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético por mais de 10 anos. Nossa pesquisa englobou desde a bioprospecção de microrganismos até o estudo genômico para entender melhor os mecanismos envolvidos na degradação do 2,4-D (VIANEZ JÚNIOR, 2007; DIREITO, 2009; SBANO, 2015; PECKLE, 2012; PECKLE, 2015; PEREIRA, 2016). Em 2015, foi elaborado um protótipo de inoculante agrícola com bactérias da coleção interna do laboratório LBSBM (DIREITO, 2009), entretanto, foi necessário o desenvolvimento da pesquisa para otimizar a produção deste bioproduto. Neste estudo focou em experimentos de desenvolvimento do inoculante. Além disso, elaborou-se um pedido de patente que foi depositado no INPI, simbolizando assim a finalização do trabalho iniciado em 2015 e, também, de todos os trabalhos que foram base para esta pesquisa.

#### 5.1 Degradação do 2,4-D pelas estirpes bacterianas

A busca por microrganismos capazes de degradar compostos xenobióticos vem sendo realizada por muitos anos (SIGH, 2011). Hoje, a degradação microbiana é vista como tecnologia econômica e ecologicamente correta. Entretanto, a ação naturalmente exercida por esses microrganismos em seu habitat pode ser lenta. Existem mecanismos para acelerar esse processo, como o aumento da concentração de culturas e condições favoráveis para que possam agir de forma mais rápida. Os microrganismos deste trabalho passaram por uma seleção, cujo objetivo era degradar o herbicida 2,4-D. As estirpes bacterianas *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* (MG02) e *O. intermedium/Brucella intermedia* (DF13) passaram por *screening* e testes de degradação e ambas apresentaram a capacidade de degradar 2,4-D após o decurso de 30 dias em meio mínimo com 2,4-D como única fonte de carbono. Além das estirpes da coleção de cultura do laboratório LBSBM, as estirpes bacterianas da coleção DSMZ também foram capazes de degradar o herbicida 2,4-D, mostrando que os gêneros *Enterobacter* e *Ochrobactrum* são promissores na degradação do herbicida. Como descrito por El-Liethy *et al.* (2022) e Muneeswari *et al.* (2021), as bactérias *E. hormaechei* e *E.*

*xiangfangensis* STP-3 foram capazes de degradar diversos compostos, entre eles misturas de hidrocarbonetos em petróleo. De mesmo modo, o trabalho de Neetha *et al.* (2021) apresentou a bactéria *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* estirpe 19\_357\_F (MK281611) com a capacidade de degradar o composto 2,4-D. Já em relação às estirpes presentes no gênero *Ochrobactrum*, há alguns trabalhos que indicam a capacidade de degradação de diversas substâncias e produtos. Há trabalhos, por exemplo, onde se indica a ação de degradação de nicotina (YUAN *et al.*, 2006), queratina (SHARMA *et al.*, 2021), borra de petróleo (BEZZA *et al.*, 2015), bifenilopoliclorados (LIZ *et al.*, 2009), glifosato (ZHAN *et al.*, 2018), clorpirifós (NAYAK *et al.*, 2020) e 2,4-D (DIREITO *et al.*, 2015). Em relação à degradação do 2,4-D existem relatos para a espécie *O. anthropi* (HAN, *et al.*, 2014), e também para a espécie *O. intermedium* (DIREITO *et al.*, 2015).

Para averiguar a viabilidade das estirpes em relação às diferentes concentrações do 2,4-D, foi realizado o teste de concentração inibitória mínima (MIC) para as estirpes *Enterobacter* sp. MG02 e *Ochrobactrum* sp. DF13. Por meio deste, pode-se verificar que houve um declínio significativo no crescimento das estirpes na concentração de 1,5 g.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e acima. A partir da concentração de 2 g.L<sup>-1</sup>, não houve crescimento. Já no trabalho de Neetha *et al.* (2021), a estirpe *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* estirpe 19\_357\_F (MK281611) foi capaz de tolerar a concentração máxima de 0,4 g.L<sup>-1</sup> de 2,4-D, porém houve uma redução na biomassa e crescimento bacteriano já na concentração de 0,3 g.L<sup>-1</sup> suas estirpes mais sensível do que *Enterobacter* sp. MG02. Neste estudo eles mostraram, assim, que as estirpes *Enterobacter* sp. MG02 e *Ochrobactrum* sp. DF13 possuem alta capacidade de tolerar o herbicida 2,4-D, apresentando grande potencial biotecnológico.

Nos ensaios de degradação de Neetha e colaboradores (2021), a estirpe *E.hormaechei* subsp. *xiangfangensis* estirpe 19\_357\_F apresentou o melhor desempenho na concentração de 0,25 g.L<sup>-1</sup> (42,68 %) em 72h. Tais dados corroboram com os dados desta pesquisa, em relação à degradação do herbicida. Já neste presente trabalho, as estirpes bacterianas *Enterobacter* sp. MG02 e *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSMZ 101093) foram capazes de degradar o herbicida no dobro da concentração, sendo 0,5g.L<sup>-1</sup>. Vale ressaltar que, no trabalho de Neetha *et al.* (2021), os dados de degradação foram avaliados no período de 72 horas e este trabalho avaliou a

degradação em 30 dias. No trabalho de Neetha *et al.* (2021), a estirpe bacteriana foi capaz de degradar o 2,4-D na concentração máxima de  $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ , porém nesta concentração o número de células é reduzido.

Alguns produtos comerciais (p.c) utilizados na agricultura, possuem a concentração de aproximadamente  $0,5 - 0,8 \text{ g.L}^{-1}$  de 2,4-D, sendo que a aplicação depende da cultura, alguns casos podem variar entre  $0,4 \text{ L} - 3,5 \text{ L}$  por hectare do p.c (2,4-D NORTOX<sup>®</sup>) que resultara em concentrações no solo bem menores do que testados neste estudo. Tais dados mostram que o inoculante produzido neste trabalho pode ter a capacidade de fazer a biorremediação e degradação do 2,4-D nas concentrações encontradas em campo. Já a espécie *O. intermedium* é pouco estudada sobre questões de degradação de compostos aromáticos, contudo neste estudo foi comprovado que *O. ciceri* (DSMZ 22292) degradou  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de 2,4-D no período de 30 dias. Desta forma, o presente trabalho mostra um potencial a ser explorado e divulgado, uma vez que o 2,4-D é amplamente estudado e existem poucos trabalhos com esta espécie bacteriana. Relativo à degradação, diferente das outras estirpes do gênero *Enterobacter* e *Ochrobactrum* estudadas nesse trabalho, as estirpes *B. thuringiensis* (ATCC 33679 e DSMZ 2046), biotransformaram o 2,4-D em 30 dias. As bactérias desta espécie são bastante conhecidas e exploradas pela capacidade de biocontrole de pragas agrícolas, entretanto, poucos estudos sobre seu potencial de biodegradação de compostos xenobióticos são realizados. Um desses trabalhos foi realizado por Chen e colaboradores (2015), no qual mostrou que a estirpe *B. thuringiensis* ZS-19, que foi isolada de solos contaminados com piretróides, foi capaz de degradar  $0,08 \text{ g.L}^{-1}$  (82,1%) de cialotrina em 72h. Neste mesmo trabalho, os autores testaram a estirpe ZS-19 com o composto ácido 3-fenoxibenzóico (3-PBA), que é um subproduto da degradação da cialotrina. A estirpe ZS-19 mostrou uma taxa de degradação proporcional às concentrações  $0,01 \text{ g.L}^{-1}$  (75,4%),  $0,02 \text{ g.L}^{-1}$  (63,85%),  $0,03 \text{ g.L}^{-1}$  (52,5%) e  $0,04 \text{ g.L}^{-1}$  (48%) em 72h, nota-se que ao aumentar a concentração a porcentagem do composto diminui, efeito marcante na degradação. As concentrações no experimento com 3-PBA são quase 10 vezes menores que as concentrações aplicadas no experimento com 2,4-D, isso sugere que a espécie consegue resistir a altas concentrações de certos compostos aromáticos. Outro ponto relevante, é a possibilidade *B. thuringiensis*, assim como sugerido pelos autores com a estirpe ZS-19 e o composto

3-PBA, uma vez que na concentração de  $0,04 \text{ g.L}^{-1}$  houve uma queda na porcentagem de degradação. Contudo, não foi caracterizado biomassa celular e crescimento microbiano, conseqüentemente, não foi afirmado que o composto 3-PBA possa ser tóxico para a estirpe ZS-19. A característica de bio- transformar compostos xenobióticos pode auxiliar em um melhor efeito de biorremediação presente no bioproduto formulado com *B. thuringiensis*, trazendo benefício para o inoculante agrícola.

O ensaio de citotoxicidade realizado por Neetha *et al.* (2021) mostrou que o metabólito de 2,4-D, neste caso o 2,4-diclorofenol, degradado por *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* estirpe 19\_357\_F (MK281611) foi mais tóxico e perigoso que o composto original (2,4-D). O que talvez seja a explicação para a redução da biomassa e do crescimento desta estirpe no período de 72h e na concentração de  $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ . No presente estudo, também foi observado que as estirpes *Enterobacter* sp. MG02 e *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSMZ 101093) apresentaram crescimento reduzido e mais lento durante os primeiros dias de experimento da degradação, correlativo ao que pode ter acontecido com a estirpe bacteriana utilizada por Neetha *et al.* (2021). Essa correlação sugere que os metabólitos derivados do 2,4-D podem ser citotóxicos para as células bacterianas. No *screening* de resistência ao 2,4-D, não se observou diferença no crescimento das células na concentração de  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ , quando comparada ao seu controle. Entretanto, é notável que há um retardo no crescimento e uma D.O mais baixa; já no mesmo teste, utilizando-se a concentração de  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de 2,4-D, o crescimento da estirpe bacteriana foi claramente inibido. Esses dados sugerem que na concentração de  $1 \text{ g.L}^{-1}$ , o 2,4-D é tóxico para *B. thuringiensis* (DSMZ 2046). A estirpe bacteriana *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSMZ 101093) não sofreu inibição no crescimento quando inoculada em LB acrescido de 2,4-D na concentração de  $1 \text{ g.L}^{-1}$ . Entretanto, a estirpe bacteriana *O. cicere* (DSMZ 22292) apresentou inibição em seu crescimento na concentração  $1 \text{ g.L}^{-1}$ , indicando a toxicidade desta substância para as células bacterianas desta estirpe. Em relação à *Enterobacter* sp. MG02 e *Ochrobactrum* sp. DF13, a concentração mínima inibitória se apresentou no valor de  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de 2,4-D. A estirpe *Enterobacter* sp. MG02 apresentou melhor crescimento na concentração  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  comparada ao controle positivo (somente estirpe com meio LB). As concentrações  $3 \text{ g.L}^{-1}$  e  $2 \text{ g.L}^{-1}$  apresentaram diferença significativas em relação às demais concentrações de 2,4-D e, os dados estatísticos mostram que o início da diminuição do crescimento das células foi a partir da concentração  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$  de 2,4-D. Já a estirpe *Ochrobactrum* sp.

DF13, apresentou crescimento ótimo, comparado ao controle positivo, na concentração  $0,25\text{g.L}^{-1}$  de 2,4-D, não havendo diferença significativa entre estes dados. A análise estatística indicou que houve diferença significativa no crescimento microbiano nas concentrações de  $0,25\text{ g.L}^{-1}$  e  $0,5\text{g. L}^{-1}$ , este resultado pode ser um indício que a estirpe bacteriana *Ochrobactrum* sp. DF13 pode degradar de forma mais rápida o 2,4-D em uma concentração menor do que foi aplicado nos testes de degradação

Os *screenings* com 2,4-D e MIC foram experimentos diferentes que trouxeram informações relevantes para entender um pouco mais sobre a capacidade de resistência das estirpes em relação ao 2,4-D. As estirpes *Enterobacter* sp. MG02 e *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSMZ 101093) apresentaram capacidade de crescer nas concentrações de  $0,5\text{g.L}^{-1}$  e  $1\text{g.L}^{-1}$  de 2,4-D. A estirpe *B. thuringiensis* (ATCC 33679) não cresceu na concentração de  $1\text{g.L}^{-1}$  de 2,4-D. Os testes indicaram que *Ochrobactrum* sp. DF13 e *O. ciceri* (DSMZ 22292) tiveram crescimento na concentração de  $0,5\text{g.L}^{-1}$  de 2,4-D, sendo um bom resultado pois os testes de degradação deste estudo são feitos nesta concentração. No que tange sobre *Ochrobactrum* sp. DF13, a estirpe apresentou capacidade de crescer na concentração de  $1\text{g.L}^{-1}$  de 2,4-D, em contrapartida, a estirpe *O. ciceri* (DSMZ 22292) foi inibida nesta mesma concentração. Desta forma pode-se entender melhor sobre a capacidade microbiana de crescer em meio com 2,4-D.

Após a seleção das estirpes bacterianas, foram realizados diversos testes para entender se a produção do inoculante em consórcio era possível. Foram realizados teste de antagonismo com as estirpes bacterianas que poderiam ser utilizadas na produção do inoculante. Os resultados indicaram que o crescimento das estirpes de *B.thuringiensis* (indicadora) não era inibido pelas demais estirpes bacterianas (produtoras). Este resultado indica a viabilidade da utilização do consórcio bacteriano na produção do inoculante.

A padronização do processo de congelamento foi necessária para estudar o melhor tempo de congelamento do inoculante, antes de liofilizar. Tais testes foram publicados na monografia de alunas do laboratório (SILVA *et al.*, 2018) desta forma, foi possível fazer um protocolo operacional padrão (POP) com a viabilidade do inoculante com a estirpe de *B. thuringiensis*. O experimento testou a viabilidade das células antes e após o processo de liofilização e, também em processo de congelamento em congelador e

ultrafreezer. Os liofilizadores utilizados eram de 3 modelos: L1(modelo SL404 Sorlab) com 675 mmHg a  $-30^{\circ}\text{C}$ ; L2 (modelo K120 LIOTOP) com 212Vca a  $-91^{\circ}\text{C}$ ; L3 (modelo L101 LIOTOP) com 218 Vca e a  $-47^{\circ}\text{C}$ . O experimento também testou dois tipos de congelamento, no qual, os inoculantes já prontos eram congelados antes do processo de liofilização. Um grupo de inoculante (n=3) foi padronizado a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 90 minutos e outro grupo de tratamento (n=3) passou por congelamento em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. No trabalho realizado por Silva *et al.* (2018), foi concluído que o número de células (UFC.g<sup>-1</sup>) não teve diferença significativa antes e após o processo de liofilização nos diferentes liofilizadores. Entretanto, quando comparados os processos de congelamento (congelador e ultrafreezer), houve diferença significativa ( $p<0.05$ ) no grupo que passou pelo processo do congelador ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) e também pelo liofilizador L1. Isso indica que as células não foram resistentes a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 90 minutos e ainda ao processo de liofilização de L1. Em relação ao experimento realizado por Silva *et al.* (2018), do ponto de vista técnico, o substrato do inoculante apresentou uma secagem não tão satisfatória com os liofilizadores L1 e L3 durante no período de 72h, comparando ao liofilizador L2 (mais potente dos três liofilizadores). Segundo Bashan (1998), o processo de secagem é uma etapa crítica do processo de formulação do inoculante, principalmente para bactérias que não esporulam, deve-se, assim, considerar o tipo de secagem, taxa de desidratação e a tecnologia usada. Contudo, por meio do experimento realizado por nosso grupo de pesquisa (SILVA *et al.*, 2018), foi possível preparar um POP para esse tipo de trabalho.

Após a produção do inoculante, foi analisada a viabilidade das células bacterianas no inoculante com *B. thuringiensis* e *Enterobacter* sp. MG02 e do inoculante em consórcio durante o período de 30, 60, 90 e 365 dias. A viabilidade das estirpes bacterianas foi contada separadamente, pois as colônias de *B. thuringiensis* cresciam sobrepostas às colônias de MG02 e, conseqüentemente, ficava inviável contabilizar de forma correta a UFC das duas estirpes bacterianas juntas. Entretanto, era notável que ambas cresciam bem juntas e não havia diminuição do número de colônias com a presença das outras colônias maiores de *Bacillus thuringiensis*.

## 5.2 Análises taxonômica e genômica funcional

### 5.2.1 Taxonomia

A identificação genômica da estirpe bacteriana *Enterobacter* MG02 foi realizada utilizando várias metodologias, começando com o gene que codifica o rRNA 16S, por meio do BLAST na plataforma do NCBI, o qual resultou em uma identificação, a nível de espécie, para *E. hormaechei*, enquanto que, na análise com árvore filogenética, chegou-se a nível da subespécie *steigerwaltii*. No entanto, o trabalho realizado por Wu *et al.* (2020), trouxe uma atualização da taxonomia de *Enterobacter* baseada em análises genômicas que indicam uma mudança para esta espécie. Foram estudadas 19 espécies incluindo 6 subespécies de *Enterobacter*, dentre elas, em especial, *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*, *E. hormaechei* subsp. *oharae* e *E. hormaechei* subsp. *hoffmannii* e *E. xiangfangensis*. Foram realizados sequenciamentos dos genomas completos das estirpes tipo, para uma comparação genômica e uma análise filogenética para esclarecer as posições taxonômicas exatas das subespécies de *E. hormaechei*. Foi relatado que *E. hormaechei* e *E. xiangfangensis* são de fato espécies diferentes, enquanto que *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*, *E. hormaechei* subsp. *hoffmannii* e *E. hormaechei* subsp. *oharae* são sinônimos de *E. xiangfangensis*.

As análises indicaram que todas as atribuições de subespécie de *Enterobacter* estavam incorretas. *E. xiangfangensis* foi validado como espécie, entretanto, um estudo propôs colocá-lo como *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (SUTTON *et al.*, 2018), causando certa confusão. Segundo WU *et al.* (2020), as análises ANI e isDDH indicam que três outras subespécies (*E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*, *E. hormaechei* subsp. *oharae* e *E. hormaechei* subsp. *hoffmannii*) e *E. xiangfangensis* na verdade não pertencem a *E. hormaechei* e não devem ser consideradas subespécies de *E. hormaechei* e pertencem à espécie *E. xiangfangensis*. Wu *et al.* (2020) sugere que *E. xiangfangensis* e as subespécies de *E. hormaechei* estão relacionadas. Desta forma, se seguirmos as sugestões de Wu *et al.* (2020), a estirpe bacteriana *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* pode ser também identificada como *E. xiangfangensis*, assim como a prévia identificação realizada pelo nosso grupo de trabalho (NUNES, 2017).

Assim como a taxonomia do gênero *Enterobacter*, que é complicada e confusa, ocorre o mesmo problema taxonômico com o gênero *Ochrobactrum/Brucella*.

A estirpe bacteriana *Ochrobactrum* sp. DF13, identificada como *Ochrobactrum intermedium*, é classificada também como *Brucella intermedia*. A base para esta mudança foi o trabalho publicado por Hördt *et al.* (2020), no qual se descreveu uma análise com mais de 1000 genomas e sugeriram-se mudanças na classificação taxonômica em alfaprotobactérias. Dentre os gêneros deste estudo, estavam os *Ochrobactrum* e *Brucella*. O resultado da árvore GBDP mostrou que o gênero *Brucella* estava alinhado dentro do gênero *Ochrobactrum*. Nos estudos taxonômicos em que se basearam, também mostraram uma análise filogenética com um número suficiente de espécies de *Brucella* e *Ochrobactrum* para montar a árvore, evidenciando um parafiletismo de *Ochrobactrum*, mais especificamente nas recentes propostas de novas espécies. Segundo os autores, a divergência do clado *Brucella-Ochrobactrum* foi menor do que em muitos cladogramas que abrigam apenas um único gênero.

De acordo com Hördt *et al.* (2020), o gênero *Brucella* possui potencial patogênico, o que pode refletir no tamanho pequeno do seu genoma, já o gênero *Ochrobactrum* apresenta espécimes clínicos, incluindo a estirpe-tipo, indicando uma redução do genoma em espécies patogênicas. Contudo, as diferenças fenotípicas de *Brucella* podem ser indicadas pela adaptação evolutiva à patogenicidade. Hördt *et al.* (2020) sugerem a inclusão de *Ochrobactrum* dentro do gênero *Brucella*, uma vez que este último gênero apresenta prioridade. Desde então, as sequências de genomas depositados no NCBI estão sendo indicadas a mudarem o nome de *Ochrobactrum* para *Brucella*. Contudo, Moreno *et al.* (2022) discorda da sugestão de Hördt *et al.* (2020). Em seu trabalho, Moreno *et al.* (2022) ressalta que *Ochrobactrum* pode infectar casualmente e causar doenças em humanos que estejam clinicamente comprometidos por meio de cateteres e dispositivos médicos; indicando que há diferença na dinâmica das infecções. No entanto, a patogênese de *Brucella* não pode ser comparada a de *Ochrobactrum*. Sabe-se que o gênero *Brucella* é composto por patógenos intracelulares perigosos para animais e o homem. Segundo Moreno *et al.* (2022), a “virulência” de *Ochrobactrum* foi atribuída a bombas de efluxo de antibiótico, aos sistemas de secreção do tipo IV e à presença de genes de síntese de lipopolissacarídeo (LPS); entretanto, bombas de efluxo de antibióticos não são, especificamente, fatores de virulência. Já a presença do gene de síntese de LPS é característica de bactérias Gram-negativas, tirando a particularidade de ser indicativo de microrganismos patogênicos. Desta forma, os autores resumem que o argumento de *Brucella* e *Ochrobactrum* serem semelhantes

porque as espécies de *Ochrobactrum* também são estirpes clínicas é incompleto. Em relação a comparação dos dois gêneros, sob o ponto de vista da cladística, os autores descrevem que os membros do gênero *Ochrobactrum*, mais especificamente *O. anthropi* e *O. intermedium*, são os parentes conhecidos mais próximos dos organismos *Brucella*. Moreno *et al.* (2022) destaca que na análise realizada por Hördt *et al.* (2020) não se levaram em conta muitos aspectos importantes, destacando uma característica significativa para organismos de *Brucella*, que é o pequeno tamanho do seu genoma (3,1–3,4 Mb) em comparação aos parentes mais próximos *Ochrobactrum* (4,7–8,3 Mb), correspondendo a diferenças de aproximadamente 950–3000 genes entre *O. anthropi* ou *O. intermedium*. A diferença de tamanho ocorre pela presença de número de plasmídeos ou cromídeos nas espécies de *Ochrobactrum*, enquanto que em *Brucella* a ausência de plasmídeos é comum. Essas duas diferenças citadas são de extrema importância para distinção desses dois gêneros.

Outro ponto importante de diferença destacado pelos autores Moreno *et al.* (2022) é a quantidade de proteínas encontradas no gênero *Brucella* (~170), cujos genes não são encontrados em *Ochrobactrum*. E também a quantidade de genes (~249) em 13 regiões genômicas que são exclusivos de *Brucella*. Por fim, destaca-se a história evolutiva diferente, incluindo o sistema de secreção tipo IV e os genes envolvidos na síntese de LPS que são relacionados à virulência e ao estilo de vida intracelular de *Brucella*, enquanto que os dois sistemas Tipo IV encontrados em *Ochrobactrum* indicam serem adquiridos por conjugação de plasmídeos. Os autores Moreno *et al.* (2022) deixam claro que há diversas diferenças (patogenicidade, fisiologia, estilo de vida, estrutura populacional, genômica) entre os dois gêneros, que são necessários mais estudos e outros aspectos, além dos cladogramas para juntar os dois gêneros. Os autores Moreno *et al.* (2022) descrevem que “os organismos vivos não devem ser categorizados segundo as únicas regras da taxonomia bidimensional, pois são sistemas dinâmicos multidimensionais que evoluem em tempo real de acordo com contingências espaço-temporais complexas e com um número praticamente infinito de combinações genéticas”. Assim como Moreno *et al.* (2022), nosso grupo de pesquisa também concorda que *Ochrobactrum* não é *Brucella*, são gêneros distintos. Por causa disso, mantivemos o nome de *Ochrobactrum intermedium* para a estirpe DF13.

A estirpe bacteriana *B. thuringiensis* sorovar *kurstaki* (ATCC 33679) hoje é classificada como *B. thuringiensis* Berliner (estirpe NRRL B-3792). A estirpe bacteriana *B. thuringiensis* sorovar *kurstaki* (DSMZ 2046) também foi renomeada como *B. thuringiensis* Berliner 1915 (DSMZ 2046), a mesma estirpe é encontrada no banco de dados no NCBI como *B. thuringiensis* Berliner (ATCC 10972). Para as demais análises realizadas neste trabalho, foi utilizado o genoma disponível no NCBI de *B. thuringiensis* Berliner (ATCC-10972) e também foi analisado o genoma da estirpe *B. thuringiensis* sorovar *kurstaki* HD73.

### **5.2.2 Análise genômica funcional buscando as origens genéticas da atividade de degradação de 2,4-D**

Os resultados gerados pela ferramenta KAAS mostraram elementos genéticos que pode explicar a degradação de 2,4-D e de outros xenobióticos. Na estirpe *Enterobacter* sp. MG02, não se observou genes padrões da degradação do 2,4-D como os genes “*tfd*”, “*cad*”, “*clc*”. Entretanto, presença dos genes *praC* e *xylh*, que produzem a enzima 4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6] envolvida na via metaclivagem da degradação de fenóis e na modificação do fenol em catecol, é um indício que esta estirpe bacteriana possa degradar o 2,4-D por essa via. Esta enzima participa da via de degradação de xileno, tolueno e 1,2,4 trimetilbenzeno. A enzima tautomerase 4-oxalocrotonato (4-OT) é a enzima titular da família de enzimas 4-OT (COPLEY, 2009). Dentro da família de 4-OT, estão as enzimas desalogenase do ácido trans-3-cloroacrílico e ácido cis-3-cloroacrílico (cis-CAAD), que participam de uma via em *Pseudomonas cichorii* 170 para degradação do nematocida 1,3-dicloropropeno, o que indicaria que esta estirpe consiga degradar o cloro presente no 2,4-D (SUVOROVA *et al.*, 2019). A enzima enoyl-CoA (*fadB* e *fadI*) isomerase faz parte da superfamília de crotonase, que inclui a enzima 4-Clorobenzoil-CoA desalogenase, catalisando, em *Pseudomonas*, a conversão de 4-clorobenzoato-CoA em 4-hidroxibenzoato-CoA (InterPro, 2022); e acetil-CoA aciltransferase (*fadI/fadA*) transferem o grupo Co-A do substrato para gerar acetil Co-A, que entra no ciclo do TCA (NANJANI *et al.*, 2022). Sabe-se que o Benzoato, o qual possui anel benzeno, assim como o herbicida 2,4-D, pode ser catabolizado via 3-hidroxipimeloil-CoA em acetil CoA por diversas enzimas identificadas nos resultados de *Enterobacter* sp. MG02, incluindo enoil-Co-A hidratase (*fadJ*), acetil-CoA

aciltransferase (*fadI*), enoil-CoA hidratase (*paaF/echA*), 3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase (*paaH/fadB*) e acetil-CoA C-acetiltransferase (ACAT) (NANJANI *et al.*, 2022).

Vários compostos aromáticos podem ser metabolizados por bactérias, que os degradam por diversas rotas. Porém, essas rotas costumam convergir a um intermediário comum, como o  $\beta$ -ceto-adipato no caso do 2,4-D, em que os intermediários centrais são catecol ou protocatecoato. Os dados no KAAS mostraram que, no genoma da estirpe *Ochrobactrum sp.* DF13, há genes diretamente ligados ao ramo da rota de protocatecoato, codificados pelo *operon pcaBCDHG*. As enzimas de clivagem de anel aromático são fundamentais para degradação de compostos aromáticos como 2,4-D e são comuns em bactérias do solo, como é o caso da estirpe *Ochrobactrum sp.* DF13 (BRODERICK, 1999). Uma enzima importante que está presente nos resultados de *Ochrobactrum sp.* DF13 é a protocatecoato 3,4-dioxigenase, subunidade alfa (*pcaG*) e protocatecoato 3,4-dioxigenase, subunidade beta [EC:1.13.11.3] (*pcaH*). Essas são enzimas chave na via do  $\beta$ -ceto-adipato. Genes adicionais envolvidos no ramo protocatecoato da via  $\beta$ -ceto-adipato (*operon pcaBCDGH* e *pobA*) foram encontrados em *Ochrobactrum sp.* DF13. A maioria dos compostos aromáticos são, primeiramente, convertidos em um dos vários substratos di ou trihidroxilados, como catecol e protocatecoato. Na via do  $\beta$ -ceto-adipato, há uma rota catabólica, na qual o catecol ou protocatecol são clivados entre seus grupos hidroxila pela 1,2-dioxigenase (1,2-CTD) ou protocatecoato 3,4-dioxigenase (3,4-PCD). Essa via ramificada converge, e os produtos de clivagem do anel de catecol ou protocatecol são convertidos em  $\beta$ -ceto-adipato, o metabólito que deu nome à via. Duas etapas adicionais completam a conversão de  $\beta$ -ceto-adipato em intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. Ambos 3,4-PCD e 1,2-CTD pertencem a uma grande classe de dioxigenases contendo ferro não heme (BURCHAN *et al.*, 2000). Um exemplo de uma via com os genes *pcaBCDGH* é a do 3,4 diidroxibenzoato, que pode ser convertido em 3-oxoadipato pela ação catalítica sequencial da protocatecoato 3,4-dioxigenase (*pcaG/pcaH*), 3-carboxi-cis,cis-muconato cicloisomerase (*pcaB*), 4-carboximuconolactona descarboxilase (*pcaC*) e 3-oxoadipato enol-lactonase (*pcaD*). Outra alternativa é o benzoato ser degradado em 4-hidroxi-benzoato pela benzoato 4-monooxigenase, que é ainda influenciada pela p-hidroxi-benzoato 3-monooxigenase (*pobA*) para formar 3,4-dihidroxi-benzoato (NANJANI *et al.*, 2022). Além do *operon pcaBCDGH* e o gene *pobA*, que se mostram

importantes para entender a rota de degradação, há também o gene *catE*, que segundo HARTNETT *et al.* (1990), apresenta homologia ao gene *pcaE* (que não foi encontrado no genoma), possibilitando que o produto do gene *catE* (catecol 2,3-dioxigenase) possa auxiliar na degradação juntamente com o *operon*. A enzima catecol 2,3-dioxigenase [EC:1.13.11.2] (*catE*) é conhecida por participar da via metaclivagem e é a enzima responsável por quebrar o anel aromático do catecol e transformá-lo em 2-hidroxiacetonato semialdeído. Outro ponto importante para destacar é ação das monoxigenases e dioxigenases, uma vez que elas são responsáveis pela hidroxilação do anel aromático e, conseqüentemente, formam os produtos intermediários (catecol e protocatecoato), que por sua vez abrem o anel benzênico (HAN *et al.*, 2020).

Entender as vias de degradação de compostos aromáticos é importante para conjecturar novos meios de degradação, inclusive explicar possíveis novas rotas. Um microrganismo importante é a estirpe padrão de degradação do 2,4-D, *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134, que apresenta quase todas as principais vias de clivagem de anéis aromáticos: a via  $\beta$ -ceto-adipato, com seus ramos de catecol, clorocatecol, metilcatecol e protocatecoato de orto clivagem de anéis; a via de meta-clivagem do anel (metil)catecol; a via gentisada; a via do homogeneizado; a via do 2,3-diidroxifenilpropionato; a via do (cloro) hidroxiquinol; a via da (amino)hidroquinona; a via fenilacetil-CoA; a via 2-aminobenzoil-CoA; a via do benzoil-CoA e a via do 3-hidroxiantranilato (PEREZ-PANJOLA *et al.*, 2008). Por mais que os genes de degradação do protocatecoato sejam cromossomiais e os genes conhecidos da degradação de 2,4-D, plasmidiais (BHATT *et al.*, 2021), a busca por respostas no genoma de *Ochrobactrum* sp. DF13 para degradação realizada pode estar presente nesses genes e enzimas citados acima.

Na análise do genoma da estirpe bacteriana *O. ciceri* (DSMZ-22292), há algumas diferenças no metabolismo de degradação em relação à estirpe *Ochrobactrum* sp. DF13, cujos resultados podem ser vistos na tabela 21. Na degradação do benzenoato, há a presença do *operon* *pcaBDGH*, genes *pobA*, *catE* e *gcdH*; porém ausência dos genes *fadB* e *xyIH*. A enzima mostrada na tabela 21, codificada pelo gene *pcaC* é a 4-carboxymuconolactona descarboxilase [EC:4.1.1.44], enquanto que o gene *pcaC* em DF13, a enzima codificada é 4-oxalocrotonato tautomerase [EC:5.3.2.6], que modifica fenol e catecol, envolvida na via metaclivagem de degradação de fenol (BRENDA,

2022). Na rota de degradação do xileno, os genes *praC* e *xylH* (4-oxalocrotonato tautomerase [EC:5.3.2.6]) estavam presentes em DF13. Por outro lado, em *O. ciceri*, a ação ocorre pela enzima catecol 2,3-dioxigenase, produto do gene *catE*. Na rota do colopractama, há presença do gene *gnl* (gluconolactonase [EC:3.1.1.17]) e ausência do gene *fabB* (3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase / enoyl-CoA isomerase [EC:1.1.1.35 4.2.1.17 5.1.2.3 5.3.3.8]). Outra diferença é na degradação do estireno, em *O. ciceri*, há a presença dos genes *amiE* (amidase) e *catE* em seu genoma; já em DF13, o genoma apresenta genes *feaB* e *tynC* (fenilacetaldéido desidrogenase [EC:1.2.1.39]), indicando uma mudança na rota da degradação deste composto. No sistema de degradação do naftaleno, há a ausência do gene *adhE* (acetaldehyde dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.2.1.10 1.1.1.1]) em *O. ciceri* (DSMZ-22292) em relação à *Ochrobactrum* sp. DF13. Na degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, no genoma de *O. ciceri* há os genes *pcaG* (protocatecoato 3,4-dioxigenase, subunidade alfa [EC:1.13.11.3]) e *pcaH* (protocatecoato 3,4-dioxigenase, subunidade beta [EC:1.13.11.3]); já na estirpe DF13, não se observou nenhum resultado. Na parte de metabolismo de xenobióticos por citocromo P450, no genoma da estirpe *O. ciceri*, há a presença do gene *DHDH* (S-(hidroximetil) glutationa desidrogenase / álcool desidrogenase [EC:1.1.1.284 1.1.1.1]). Entretanto, em DF13, não se há a presença deste gene.

O gene *gst* (glutationa S-transferase [EC:2.5.1.18]) está presente em *O. ciceri* (DSMZ-22292), *Ochrobactrum* sp. DF13, *Enterobacter* sp. MG02 e *Enterobacter hormaechei* subsp. *xianfangensis*. A enzima glutaciona S-transferase está relacionada à capacidade de aguentar a toxicidade de certos compostos. Segundo Cataneo *et al.* (2003), este gene é estudado em plantas, nas quais a enzima glutaciona S-transferase desempenha um papel de resposta ao estresse causado por herbicidas, sendo capaz de metabolizar compostos xenobióticos e formar uma substância de baixa toxicidade. A enzima está envolvida nas vias de desintoxicação da fase II, que protege macromoléculas celulares e impede que sejam atacadas por reativos letrófilos. Ela catalisa o ataque nucleofílico do átomo de enxofre da glutaciona (-SH) sobre os grupos eletrofílicos de compostos hidrofóbicos tóxicos, aumentando, assim, a sua solubilidade em água. O processo promove sua excreção (SIMARANI *et al.*, 2016).

Devido a sua ação de proteção contra xenobióticos, o grupo de enzimas GSTs é utilizado também como biomarcador em contaminações aquáticas (DECONTO, 2022). O estudo dos GSTs em bactérias é limitado, porém são encontrados em *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Rhizobium* (SIMARANI *et al.*, 2016). Nos dados da tabela 21 e 22 de *Bacillus thuringiensis*, as duas estirpes bacterianas não apresentaram as enzimas GSTs. Relacionando esta informação ao *screening* de resistência ao 2,4-D, a bactéria *Bacillus thuringiensis* não apresentou crescimento celular acima de  $1\text{g.L}^{-1}$  de 2,4-D, enquanto que as outras estirpes estudadas aguentaram concentrações mais altas que  $1\text{g.L}^{-1}$ . Além disso, ao contrário das demais estirpes estudadas - que degradam o 2,4-D (remoção do anel) -, as estirpes de *Bacillus thuringiensis* fizeram a biotransformação do 2,4-D, mesmo possuindo possíveis enzimas capazes de degradar compostos intermediários, como catecol e genes previamente descritos nesta sessão. Observando os dados da estirpe padrão de degradação do 2,4-D, a *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 (tabela 24), há também a presença do gene *gst* e enzima GST. Desta forma, fica uma indagação para um futuro estudo: será que as bactérias capazes de tolerar o 2,4-D e crescer no meio contendo este composto possuem enzimas glutationa S-transferase em seu genoma e/ou outras enzimas envolvidos nas vias de desintoxicação de compostos xenobióticos?

Os resultados dos genes do metabolismo de degradação de *Bacillus thuringiensis* (ATCC 33679) mostraram que a estirpe contém, em seu genoma, importantes genes que podem estar envolvidos na degradação do 2,4-D, como o *catE* (catechol 2,3-dioxygenase [EC:1.13.11.2]), *catB* (muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.1]) e outros que estão também presentes nas demais bactérias deste estudo. Estes dados indicam que as vias de degradação do 2,4-D possam estar presentes em diferentes espécies, porém, se o microrganismo não possui capacidade de resistir a este composto, talvez o mesmo não consiga realizar a degradação, assim como ocorreu neste caso. Os genes de degradação, em muitos casos, estão presentes em plasmídeos, que possuem uma série de genes essenciais para o catabolismo dos compostos xenobióticos. Tais plasmídeos possuem tamanho entre (50-500 kbp), pouco número de cópias e podem ser transferidos de uma linhagem para outra, processo chamado de transferência horizontal de genes (THG) (BHATT *et al.*, 2021). Porém, nos casos de *O. ciceri* (DSMZ-22292), *Ochrobactrum* sp. DF13, *Enterobacter* sp. MG02 e *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* e *B.thuringiensis* (ATCC 33679), não foram estudados os plasmídeos que

possivelmente estas estirpes possuem. Os resultados mostraram que os genes estão presentes em seus cromossomos, indicando que os fatores de tolerância ao 2,4-D estão presentes *O. ciceri* DSMZ-22292, *Ochrobactrum* sp. DF13, *Enterobacter* sp. MG02 e *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* DSMZ 101093) e ausentes (*B. thuringiensis* ATCC 33679) em seus genomas, que, por sua vez, podem ter sido adquiridos por transposons ou por outros elementos genéticos móveis (MGEs). Segundo Bhatt *et al.* (2021), as sequências de inserção e os transposons vão para o plasmídeo ou são integrados no cromossomo. No caso das estirpes estudadas, indicam que os genes catabólicos foram integrados e que os genes que são padrões de degradação do 2,4-D, como “*tfd*”, “*cad*” e “*clc*”, não foram adquiridos cromossomicamente. Porém, nos casos de *Enterobacter* sp. MG02 e *Ochrobactrum* sp. DF13, não se pode afirmar que há plasmídeos com esses genes. Os MGEs produzem rearranjos genéticos devido a mutações. Tais rearranjos genéticos podem ser úteis para a sobrevivência de células bacterianas sob estresse xenobiótico e acelerar sua biorremediação. Desta forma, a transmissão de genes catabólicos de uma comunidade para outra ajuda as cepas microbianas a sobreviverem sob o estresse de determinados xenobióticos e desempenha um papel crucial na evolução das vias catabólicas (BHATT *et al.*, 2021). Porém, no casos de *O. ciceri* (DSMZ-22292), *Ochrobactrum* sp. DF13, *Enterobacter* sp. MG02 e *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* e *B. thuringiensis* (ATCC 33679) não foram estudados os plasmídeos que possivelmente estas estirpes possuem, os dados mostraram os genes presentes em seus cromossomos, indicando que os fatores de tolerância ao 2,4-D, ou não tolerância, estão presentes em seus genomas.

À vista do que foi mencionado, sabe-se que os genes de catabolismo do 2,4-D são organizados em *operons*, e podem ser localizados no DNA cromossômico ou plasmidial, o que indica uma variação na localização destes genes, isto faz com que determine a estrutura geral genômica e molde a transferência lateral de genes. As ilhas genômicas (ICE) são adequadas para preservar e manter os genes dentro das células hospedeiras e também são facilmente transferíveis. Um exemplo é o gene *clc* em *Pseudomonas* sp. a cepa B13 também é um exemplo do ICE mencionado anteriormente, que inicialmente se pensou ser um plasmídeo, mas posteriormente foi localizado no cromossomo, do qual pode ser excisado (BHATT *et al.*, 2021). Um estudo mais aprofundado sobre esse assunto é de extrema relevância para entender mecanismos de degradação e as origens dos genes das estirpes estudadas.

.Os ensaios de degradação com as estirpes bacterianas descrito nesta tese corroboram com outros estudos já citados. O caso das estirpes *O. ciceri* (DSMZ-22292), *Ochrobactrum sp.* DF13 e o teste de degradação resultaram em novas informações relevantes, visto que há poucos dados deste gênero em relação à degradação de compostos aromáticos. As análises genômicas mostraram que tanto para a espécie *Enterobacter hormaechei* quanto para *Ochrobactrum intermedium/Brucella intermedia* há questões taxonômicas que ainda estão em discussão para firmar os táxons e classificação de cada uma. A estirpe bacteriana *B. thuringiensis* subsp. Beliner também passou por mudanças em sua nomenclatura. Também foi visto que por meio da análise genômica funcional possíveis genes responsáveis por auxiliar na degradação do 2,4-D devido às ações de seus produtos (enzimas). Na discussão houve a observação que as duas estirpes de *Bacillus thuringiensis* não possuem função de degradação completa do 2,4-D, assim como as outras estirpes fizeram; ficou explícito que em seu genoma não há genes que auxiliam na resistência ao 2,4-D e que esse seja o principal ponto pra não conseguir degradar da mesma forma que as outras estirpes, uma vez que ela possui genes que produzem enzimas importantes para degradação do 2,4-D, assim como as demais estirpes estudadas.

Desta forma, fica claro que o estudo genômico *in silico* destas estirpes foi essencial para entender os possíveis genes e enzimas responsáveis pela degradação do 2,4-D, além de indicar possíveis fatores de tolerância ao 2,4-D, uma vez que se teve resultados promissores, acerca da biodegradação de um composto aromático usado em grandes quantidades no mundo todo. Além do mais, os dados de degradação, juntamente com a mineração genômica, fazem com que se tenha informações sobre estirpes estudadas, já que são microrganismos promissores para biotecnologia. Não há porque fazendeiros não escolher inoculante bacterianas que além de promover crescimento também despoluir solos e águas, fica o desafio de divulgação e produção de inoculantes em uma maior escala.

## Conclusão

- As estirpes bacteriana MG02 e DF13 continuam apresentando capacidade de degradar o 2,4-D na concentração de 0,5 g.L<sup>-1</sup> no período de 30 dias.
- As estirpes bacterianas *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSM 101093), *Ochrobactrum ciceri* (DSMZ 22292) apresentaram capacidade de degradar o 2,4-D, na concentração de 0,5 g.L<sup>-1</sup>, durante o período de 30 dias.
- As estirpes bacterianas *Bacillus thuringiensis* sorovar Berliner (DSMZ 2046) e *Bacillus thuringiensis* sorovar Berliner (ATCC 33679) realizaram a biotransformação do 2,4-D, entretanto, não foram realizados testes para identificar os subprodutos.
- A estirpe bacteriana MG02 apresentou 100% de identidade com a *Enterobacter hormaechei* estirpe BW e *Enterobacter hormaechei* estirpe AKB48, e classificação taxonômica com *Enterobacter hormaechei* subsp. *steigerwaltii* EN-562 AJ 853890.
- A estirpe bacteriana DF13 apresentou uma identidade de 98.62% para o genoma da bactéria *Ochrobactrum intermedium* LMG 3301 e 98.62% para o genoma da bactéria *Brucella intermedia* NCTC 12171, na classificação taxonômica a estirpe se agrupou com a espécie *Brucella intermedia* NBRC 15820 AB680967.
- A otimização do inoculante foi realizada e a viabilidade do inoculante com 365 dias de prateleira apresentou concentração mínima de 9,4 x10<sup>6</sup> UFC<sup>-1</sup> para estirpe de *Bacillus thuringiensis* e 6,7 x10<sup>6</sup> UFC<sup>-1</sup> para estirpe *Enterobacter* sp.MG02
- Em relação a mineração genômica das estirpes bacterianas, não foram encontrados os genes conhecidos de degradação do 2,4-D (“*tfd*” “*cad*” e “*clc*”), o que era de se esperar, uma vez que não foi possível analisar o genoma dos possíveis plasmídeos presentes nas estirpes bacterianas.
- No genoma das estirpes bacterianas da coleção LBSBM e DSMZ, foram encontrados genes promissores que atuam na degradação do anel benzeno e enzimas monooxigenases e dioxigenases, atuantes na degradação do 2,4-D.

## 6 Referências

ABLIEIEVA, I.; PLYATSUK, L.; BEREZHNA, I.; MALOVANYY, M.. Biotechnological reclamation of oil-polluted soils. **Ecological Engineering and Environmental Technology**, v. 22, n. 2, p. 27–38, 2021. DOI: 10.12912/27197050/133328.

ABOU-SHANAB, R. A. I.; ERAKY, M.; SALEM, A. M.; ABDELGAFFER, A. R. B. Petroleum Hydrocarbon Degradation Potential of *Ochrobactrum lupini* Isolated from BTEX Enrichment Soil. **International Journal of Environment**. 4 (3): 204 , v. 209, n. 03, p. 204–209, 2015.

AGUIAR, A. P., & MACHADO, K. M. G. BIODEGRADAÇÃO DO DICLOFENACO. **LEOPOLDIANUM**, v. 48, nº134

AGUIAR, R. W. de S. **Estudo de toxicidade de proteína CRY recombinantes de *Bacillus thuringiensis*, utilizando o sistema de expressão baseado em baculovirus e células de inseto**. 2007. 122p. Tese de doutorado pela Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2007.

AKBAR, S. & SULTAN, S.. Soil bacteria showing a potential of chlorpyrifos degradation and plant growth enhancement. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 563–570, 2016. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.04.009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.009>.

AMIN, M., RAKHISI, Z., & AHMADY, A. Z. Isolation and identification of *Bacillus* species from soil and evaluation of their antibacterial properties. **Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection**, 2(1) ,2015.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A.; CONTRERAS, D.; RODRIGUEZ, J. 2007. Mecanismo e aplicações da reação de denton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Revista Nova Química**, v.30, n.3.

ARAÚJO, F. D., & PEDROSO, R. A. B. (2013). Interaction of rhizobacteria *Bacillus* sp. with pastures rhizosphere. **Bioscience Journal** 29(1):152-158

ARAÚJO, V. C. R.; FERREIRA, T. C., SANTOS, M. L. M.; RAMOS, G. S. GOMES, G. R. **Impactos Ambientais de Pesticidas sobre o Solo. In: Zabotto, A. R. Estudos Sobre Impactos Ambientais: Uma Abordagem**. 1. ed., Botucatu; FEPAF, 2019. cap. 8, p. 128;

ARORA, P. K.; KUMAR, M. CHAUHAN, A.; RAGHAVA, G. P.; JAIN, R. K. OxDBase: A database of oxygenases involved in biodegradation. **BMC Research Notes**, v. 2, p. 1–8, 2009. DOI: 10.1186/1756-0500-2-67.

ASWATHI, A.; PANDEY, A.; SUKUMARAN, R. K. Corrigendum to ‘Rapid degradation of the organophosphate pesticide – Chlorpyrifos by a novel strain of *pseudomonas nitroreducens* AR-3’. **Bioresource Technology** 292 (2019) 122025] (*Bioresource Technology* (2019) 292, (S0960852419312556), (10.1016/j.biortech. **Bioresource Technology**, v. 318, n. September, p. 124093, 2020. DOI:

10.1016/j.biortech.2020.124093. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124093>.

AT, K.; KARTHIKEYAN, S.. Occurrence and microbial degradation of fipronil residues in tropical highland rhizosphere soils of Kerala, India. **Soil and Sediment Contamination: An International Journal**, v. 28, n. 4, p. 360-379, 2019.

BANKEVICH, A., NURK, S., ANTIPOV, D., GUREVICH, A. A., DVORKIN, M., KULIKOV, A. S.; PEVZNER, P. A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of computational biology**, 19(5), 455-477, 2012.

BARBA, S.; CARVELA, M.; VILLASEÑOR, J.; RODRIGO, M. A.; CAÑIZARES, P.. Fixed-bed biological barrier coupled with electrokinetics for the in situ electrobioremediation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid polluted soil. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [S. l.], v. 94, n. 8, p. 2684–2692, 2019. DOI: 10.1002/jctb.6079.

BALDISSARELLI, D. P. (2017). **Estudo de contaminação de solo por agrotóxico ácido 2, 4-diclorofenoxiacético**. Trabalho de conclusão de curso (graduação). Universidade Federal da Fronteira do Sul, curso de Engenharia Ambiental e sanitária, erichim, RS, 2017.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A química dos agrotóxicos. **Química nova na escola**, vol. 34, nº 1, p. 10-15, 2012.

BRASIL. Agrotóxico. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxico>. Publicado: 20/05/2022. Acesso em 17 nov 2022

BARIZON, R. R. M. **Sorção e transporte de pesticidas sob- condições de não equilíbrio**. 2004. 96f. Tese de doutorado para obtenção do título doutor em agronomia. Escola Superior de agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo, 2004

BASHAN, Y. INOCULANTS OF PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA FOR USE IN AGRICULTURE, 1998. Disponível em <<http://www.bashanfoundation.org/gmaweb/pdfs/inoculants.pdf>>. Acesso em: 19 de dezembro de 2018.

BHATT, P., BHANDARI, G., BHATT, K., MAITHANI, D., MISHRA, S., GANGOLA, S., ... & CHEN, S. (2021). Plasmid-mediated catabolism for the removal of xenobiotics from the environment. **Journal of Hazardous Materials**, 420, 126618.

BEZZA, F. A., BEUKES, M., & CHIRWA, E. M. N. (2015). Application of biosurfactant produced by *Ochrobactrum intermedium* CN3 for enhancing petroleum sludge bioremediation. **Process Biochemistry**, 50(11), 1911-1922

BENNDORF, D., DAVIDSON, I., & BABEL, W. Regulation of catabolic enzymes during long-term exposure of *Delftia acidovorans* MC1 to chlorophenoxy herbicides. **Microbiology**, 150(4), 1005-1014. 2004.

Biopesticides Market (Source: Microbial Pesticides, Biochemical Pesticides, and Plant-incorporated Protectants; and Product: Bioinsecticides, Biofungicides, Bioherbicides, Bionematicides, and Others) - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, and Forecast, 2022-2031, pag. 342, 2022. Disponível em <https://www.transparencymarketresearch.com/biopesticides-market.html>> Acesso em junho 2022.

BOSI, E., DONATI, B., GALARDINI, M., BRUNETTI, S., SAGOT, M. F., LIÓ, P., ... & FONDI. MeDuSa: a multi-draft based scaffolder. **Bioinformatics**, 31(15), 2443-2451, 2015.

BRENDA- The comprehensive Enzyme Information System. Disponível em: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=5.3.2.6>. Acessado em: 25/11/22

BRAVO A., GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. **ResearchGate**. 2005.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 41, n. 7, p.423-431, 2011.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; PORTA, H.; GÓMEZ, B. I. G.; ALMAZAN, C. R.; LILIANA PARDO, L.; SOBERÓN, M.; Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. **Microbial biotechnology**. vol. 6, n° 1, p. 7-26, 2013.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol*. vol. 41, n°4, p. 23–431, 2011.

BRODERICK, J. B. Catechol dioxygenases. **Essays in biochemistry**, v.34, p. 11-11., 1999.

BITTENCOURT, J. V. M. ; SANTOS, M. H. R. . Inoculantes Agrícolas. In: Thomas Newton Martin; Alessandro Jaquiel Waclawovsky; Fernando Kuss; Angélica Signor Mendes; Eleandro José Brun. (Org.). **Sistemas de Produção Agropecuária - Ciências Agrárias, Animais e Florestais**. Dois Vizinhos: Editora UTFPR. p. 323-337, 2010.

CARLES, L.; MARTIN-LAURENT, F.; DEVERS, M.; SPOR, A.; ROUARD, N.; BEGUET, J.; BESSE-HOGGAN, P.; BATAISSON, I. Potential of preventive bioremediation to reduce environmental contamination by pesticides in an agricultural context: A case study with the herbicide 2,4-D. **Journal of Hazardous Materials**, v. 416, n. November 2020, p. 1–10, 2021. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.125740.

CASANOVA, A.; CABRERA, S.; DÍAZ-RUIZ, G.; HERNÁNDEZ, S.; WACHER, C.; ZUBILLAGA, M.; ORTÍZ, I. Evaluation of endosulfan degradation capacity by six

pure strains isolated from a horticulture soil. **Folia Microbiologica**, v. 66, n. 6, p. 973–981, 2021. DOI: 10.1007/s12223-021-00899-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00899-5>.

CATANEO, A. C., DÉSTRO, G. F. G., FERREIRA, L. C., CHAMMA, K. L., & SOUSA, D. C. F. Glutathione S-transferase activity on the degradation of the herbicide glyphosate in maize (*Zea mays*) plants. **Planta Daninha**, 21, 307-312, 2003.

CHEN, S., DENG, Y., CHANG, C., LEE, J., CHENG, Y., CUI, Z., ... & ZHANG, L. H. (2015). Pathway and kinetics of cyhalothrin biodegradation by *Bacillus thuringiensis* strain ZS-19. **Scientific reports**, 5(1), 1-10, 2015.

CHEN, S., HU, W., XIAO, Y., DENG, Y., JIA, J., & HU, M. (2012). Degradation of 3-phenoxybenzoic acid by a *Bacillus* sp. **PLoS One**, 7, 2012.

CONTRERAS-RODRÍGUEZ, A.; MAJALCA-MARTÍNEZ, C.; AGUILERA-ARREOLA, M. G.. *Ochrobactrum anthropi*. **Revista Chilena de Infectologia**, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 431–432, 2018. DOI: 10.4067/s0716-10182018000400431.

COPLEY, S. D. Evolution of efficient pathways for degradation of anthropogenic chemicals. **Nature chemical biology**, 5(8), 559-566, 2009.

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Anais da XIII reunião da rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbianos de interesse agrícola (RELARE). 2007. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/82266/1/Anais-da-XIII-Reuniao-da-Rede-de-Laboratorios-para-Recomendacao-Padronizacao-e-Difusao-de-Tecnologia-de-Inoculantes-Microbianos-de-Interesse-Agricola-RELARE.pdf>>. Acesso em 02 Feve. 2016.

CARNEIRO, F. F; RIGOTTO, R. M; AUGUSTO, L.G. da SILVA; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A. C. Dossiê Abrasco: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de saúde Joaquim Venâncio; São Paulo: **Expressão Popular**, 2015.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. 2011. Disponível em <[http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/)>. Acesso em 12 Dez. 2016.  
COSTA, L. E.; QUEIROZ, É. S. M., Plantas geneticamente modificadas com toxinas de *Bacillus thuringiensis*: uma ferramenta para conferir resistência contra insetos praga, *Revista Universitas: Ciências da Saúde*, Brasília, v. 12, n. 2, p. 99-106, jul./dez. 2014

COSTA, L.G. Fundamentos em toxicologia de CASARET e DOULL (Lange). Cap. 22 **Efeito toxicológico dos praguicidas** p. 312-323. 2ª Ed. Artmed, 2012.

CAPALBO, D.M.F.; VILAS-BÔAS, G.T.; ARANTES, O.M.N.; SUZUKI, M.T. *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.34, p.69-85, 2005.

De ARAÚJO, L. C. A. ; ORLANDA, J. F. F. Biodegradação do herbicida 2,4-d utilizando bactérias selecionadas do solo do cerrado maranhense. **Pesticidas: Ecotoxicologia e Meio ambiente**, v. 21, p. 21-32, 2014

De CASTRO MARCATO, A. C., DE SOUZA, C. P., & FONTANETTI, C. S. (2017). Herbicide 2, 4-D: a review of toxicity on non-target organisms. **Water, Air, & Soil Pollution**, 228, 1-12.2017

De MAAGD, R. A., WEEMEN-HENDRIKS, M., STIEKEMA, W., & BOSCH, D. (2000). Bacillus thuringiensis delta-endotoxin Cry1C domain III can function as a specificity determinant for Spodoptera exigua in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. **Applied and Environmental Microbiology**, 66(4), 1559-1563.

DAMASCENO, R. G.; **Comparação e desenvolvimento de metodologias para o controle de qualidade de inoculantes**. 2011. 78f. Dissertação de mestrado da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

DELLA-FLORA, I. K.; DUPONT, G.K; CLERICI, N.J.; SERAFINI, C. G. ; HOFFMANN, J.I; WELTER, N.; PORTA, P.G.D.; WEBER, P.F. Uma Revisão Das Tecnologias De Bioestimulação Orgânica De Solos Contaminados Com Hidrocarbonetos De Petróleo / a Review of Organic Biostimulation Technologies for Soils Contaminated With Oil Hydrocarbons. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 72256–72269, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n9-610.

DAUBARAS, D.; CHAKRABARTY, A.M. The environment, microbes and bioremediation: microbial activities modulated by the environment. **Biodegradation**, v. 3, 125–135,1992. <https://doi.org/10.1007/BF00129078>

DAVIN-REGLI, A., LAVIGNE, J. P., & PAGÈS, J. M. (2019). Enterobacter spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. **Clinical microbiology reviews**, 32(4), 10-1128.

DECONTO,V. **Caracterização da enzima Glutathione S-Transferase Alfa 1.2 recombinante de Ostra**. de ostra *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Dissertação ( Mestrado)- Uiversidade federal de Santa catarina, Centro Ciências Biológicas, Programa de Pós –Graduação em Bioquímica,Florianópolis, 2022.

DIREITO, I. C. N., PECKLE, B. A., MENDONÇA-HAGLER, L. C. S., & MACRAE, A. Influência da matéria orgânica na biodegradação do ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-d). **Acta Scientiae et Technicae**, 3, 2015.

DIREITO, I. C. N. **Bioprospeção e interações de populações bacterianas degradadoras do herbicida 2,4-D em solos grícolas**. 2009. 190f. Tese de doutorado em Ciências Biológicas - Biotecnologia vegetal. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de janeiro, 2009.

DON, R.H; PEMBERTON, J.M. Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. **Journal Bacteriological**, 145, pp. 681-686,1981

DON RH,WEIGHTMAN AJ, KNACKMUSS HJ, TIMMISKN (1985) Transposon mutagenesis and cloning analysis of the pathways for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 3-chlorobenzoate in *Alcaligenes eutrophus* JMP134(pJP4). **J Bacteriol** 161(1):85–90

DOS SANTOS, T. A., MORAIS, A. F. G., DA SILVA PINHO, P., DIAS, V. O., DOS SANTOS, L. S., DA CRUZ, L. R., & LEITE, H. M. F. (2022). Influência do herbicida 2, 4-D aplicado em pós emergência no desempenho agrônômico de milho crioulo comparado a cultivares comerciais na Amazônia ocidental. **Research, Society and Development**, 11(6), 2022.

EKRAM, M.D; AKHTAR , E.; SARKER, I.; RAHI, M. S.; RAHMAN, M. A.; SAHA, A. K.; REZA, M. A. Efficacy of soil-borne *Enterobacter* sp. for carbofuran degradation: HPLC quantitation of degradation rate. **Journal of Basic Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 390–399, 2020. DOI: 10.1002/jobm.201900570.

ERAKKY, M.; ABOU-SHANAB, R. A. I.; SALEN, A. M.; ABDELGAFFER, A.R.B (2015). Petroleum Hydrocarbon Degradation Potential of *Ochrobactrum lupini* Isolated from BTEX Enrichment Soil. **International Journal of Environment** ISSN: 2077-4508. 4. : 204-209, 2015.

EL-LIETHY, M. A.; EL-NOUBI, M. M.; ABIA, A. L. K.; EL-MALKY, M. G.; HASHEM, A. I.; EL-TAWEEL, G. E. Eco-friendly bioremediation approach for crude oil-polluted soils using a novel and biostimulated *Enterobacter hormaechei* ODB H32 strain. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 19, n. 11, p. 10577–10588, 2022. DOI: 10.1007/s13762-021-03885-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03885-z>.

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Documento 369: Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Brasília, DF, 2020.

FRIEDRICH, K. **Avaliação dos efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutivo, hormonal e câncer para seres humanos após o uso do herbicida 2,4-D**. Departamento de Farmacologia e Toxicologia Núcleo Técnico de Saúde e Ambiente INCQS/FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 2014.

FAO; FIDA; UNICEF; PMA; OMS. **El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo: fomentando la resiliencia climática en aras de la seguridad alimentaria y la nutrición**. 2018. Disponível em: <https://hdl.handle.net/11537/27978>.

FIUZA, L. M. Mecanismos de ação de *Bacillus thuringiensis*. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 38, p. 32-35, 2009.

FÜCHSLIN, H.P.; RÜEGG, I.; VAN DER MEER, J. R.; EGLI, T.. Effect of integration of a GFP reporter gene on fitness of *Ralstonia eutropha* during growth with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 5, n. 10, p. 878–887, 2003. DOI: 10.1046/j.1462-2920.2003.00479.x.

FRIEDRICH, K. **Avaliação dos efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutivo, hormonal e câncer para seres humanos após o uso , 2014do herbicida 2,4-d.** Disponível em:

<[http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:8gUJwcJQG\\_cJ:www.contraosagrotoxicos.org/index.php/materiais/relatorios/parecer-sobre-o-herbicida-2-4-d-incqs-fiocruz/download+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:8gUJwcJQG_cJ:www.contraosagrotoxicos.org/index.php/materiais/relatorios/parecer-sobre-o-herbicida-2-4-d-incqs-fiocruz/download+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br)>. Acesso em 10 out. 2016.

GASKIN, J. W.; HARTEL, P.; LITTLE, E.; HARRIS, G. **Soil Inoculants**. College of Agricultural and Environmental Sciences Cooperative Extension. University of Georgia, circular 990, 2010. Disponível em: <[http://extension.uga.edu/publications/files/pdf/C%20990\\_2.PDF](http://extension.uga.edu/publications/files/pdf/C%20990_2.PDF)>. Acesso em 08 Abr. 2016.

GARIMA, T., & SINGH, S. P. (2014). Application of bioremediation on solid waste management: a review. *J Bioremed Biodegr* 5 (6): 248–256, 2014

GOODMAN, J. E.; LOFTUS, C. T.; ZU, K. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and non-Hodgkin's lymphoma, gastric cancer, and prostate cancer: meta-analyses of the published literature. **Annals of epidemiology**, vol. 25, n° 8, p. 626-636, 2015.

GONG, T., Xu, X., Dang, Y., Kong, A., Wu, Y., Liang, P., ... & Yang, C. An engineered *Pseudomonas putida* can simultaneously degrade organophosphates, pyrethroids and carbamates. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 628–629, p. 1258–1265, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.02.143. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.143>.

HADI, F.; MOUSAVI, A.; NOGHABI, K.A.; TABAR, H. G.; SALMANIAN, A. H.(2013). New bacterial strain of the genus *Ochrobactrum* with glyphosate-degrading activity, **Journal of Environmental Science and Health**, Part B, 48:3, 208-213, DOI: [10.1080/03601234.2013.730319](https://doi.org/10.1080/03601234.2013.730319)

HAN, L., CHEN, S., & ZHOU, J. Expression and cloning of catA encoding a catechol 1, 2-dioxygenase from the 2, 4-D-degrading strain *Cupriavidus campinensis* BJ71. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 50(5), 486-493, 2020.

HAN, L., LIU, Y., HE, A., & ZHAO, D. 16S rRNA gene phylogeny and tfdA gene analysis of 2, 4-D-degrading bacteria isolated in China. **World journal of microbiology and biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 2567–2576, 2014. DOI: 10.1007/s11274-014-1680-6.

GÓNGORA-ECHEVERRÍA, V. irgilio R.; GARCÍA-ESCALANTE, R. odrigo; ROJAS-HERRERA, R. afael; GIÁCOMAN-VALLEJOS, G. ermán; PONCE-CABALLERO, C. armen. Pesticide bioremediation in liquid media using a microbial consortium and bacteria-pure strains isolated from a biomixture used in agricultural areas. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 200, n. April, p. 110734, 2020. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.110734.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J. Inoculação e Inoculante. **Embrapa**. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONTAG01\\_70\\_271020069133.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONTAG01_70_271020069133.html)>. Acesso em: 13 Nov. 2016.

Huang X, He J, Yan X, Hong Q, Chen K, He Q, Zhang L, Liu X, Chuang S, Li S, Jiang J (2017) Microbial catabolism of chemical herbicides: microbial resources, metabolic pathways and catabolic genes. **Pestic Biochem Physiol** 143:

HÖRDT A, LÓPEZ MG, MEIER- KOLTHOFF JP, SCHLEUNING M, WEIN-HOLD L-M et al. Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of Alphaproteobacteria. **Frontiers Microbiology**. 2020; DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00468>

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Reviews**. vol. 53, n° 2, p. 242-255, 1989.

HÖRDT A. LÓPEZ M.G, MEIER-KOLTHOFF J.P, SCHLEUNING M., WEINHOLD L.M, TINDALL B.J, GRONOW S., KYRPIDES NC, WOYKE T, GÖKER M. Analysis of 1,000+ Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of Alphaproteobacteria. **Front Microbiol**. 2020 Apr 7;11:468. doi: 10.3389/fmicb.2020.00468.

HINTON, D. M.; BACON, C. W. Enterobacter cloacae is an endophytic symbiont of corn. **Mycopathologia** 129: pag. 117-125, 1995.

HEGDE, D. INESH R. AJARAM; MANOHARAN, T.; SRIDAR, R. Identification and Characterization of Bacterial Isolates and their Role in the Degradation of Neonicotinoid Insecticide Thiamethoxam **JOURNAL OF PURE AND APPLIED MICROBIOLOGY**, Vol. 11(1), p. 393-400, March 2017.

HAN, Lizhen; LIU, Yanbo; HE, Aigong; ZHAO, Degang. 16S rRNA gene phylogeny and tfdA gene analysis of 2,4-D-degrading bacteria isolated in China. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 30, n. 10, p. 2567–2576, 2014. DOI: 10.1007/s11274-014-1680-6.

HARTNETT, C.; NEIDLE, E. L.; NGAI, K. L.; ORNSTON, L. N. DNA sequences of genes encoding Acinetobacter calcoaceticus protocatechuate 3,4-dioxygenase: Evidence indicating shuffling of genes and of DNA sequences within genes during their evolutionary divergence. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 172, n. 2, p. 956–966, 1990. DOI: 10.1128/jb.172.2.956-966.1990.

HAYATSU, M. asahito; HIRANO, M. otoko; NAGATA, Tadahiro. Involvement of two plasmids in the degradation of carbaryl by Arthrobacter sp. strain RC100. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1015–1019, 1999. DOI: 10.1128/aem.65.3.1015-1019.1999.

HOLMES, B.; POPOFF, M.; KIREDJIAN, M.; KERSTERS, K. Ochrobactrum anthropi gen. nov., sp. nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [S. l.], v. 38, n. 4, p. 406–416, 1988. DOI: 10.1099/00207713-38-4-406.

HÖRDT, Anton et al. Analysis of 1,000+ Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of Alphaproteobacteria. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 11, n. April, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00468.

IARC Monographs. DDT, Lindane, and 2,4-D / IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2015: Lyon, France), v. 113, 2018

InterPro - Classification of protein families. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR018376/>. Acessado em: 24/11/22

IBAMA 2020- **Relatório de comercialização de agrotóxico**- Boletim 2020. Disponível em: < <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>> Acessado em: 23/03/2022

IBAMA 2018- Relatório de comercialização de agrotóxico- Boletim 2015. Disponível em< <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#>>. Acessado em: 23/03/2022

ICAR-National Bureau of Agricultural Insect Resources, Bangalore – 560

IBRAHIM, M.; GRIKO, N.; JUNKER, M.; BULLA, L. A. Bacillus thuringiensis: A genomics and proteomics perspective. **Bioengineered bug Journal**, v.1, ed.1, p.31-50, 2010.

IARC MONOGRAPHS- DDT, Lindane, and 2,4-D / IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans ; volume 113). 2018: Lyon, France

ISLAM, R., KUMAR, S., KARMOKER, J., KAMRUZZAMAN, M., RAHMAN, M. A., BISWAS, N., ... & RAHMAN, M. M. Bioaccumulation and adverse effects of persistent organic pollutants (POPs) on ecosystems and human exposure: a review study on Bangladesh perspectives. **Environmental Technology & Innovation**, 12, 115-131, 2018.

JARDIM, I. C. S. F ; ANDRADE, J. de A.; DE QUEIROZ, S. C. N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - um enfoque às maçãs. **Química Nova**. vol.32, nº. 4, 2009.

JEONG, H., JO, S. H., HONG, C. E., & PARK, J. M. Genome sequence of the endophytic bacterium Bacillus thuringiensis strain KB1, a potential biocontrol agent against phytopathogens. **Genome Announcements**, 4(2), 10-1128, 2016

JERVAI, G.; LUUKINEN, B.; BUHL, K.; STONE, D. **2,4-D General Fact Sheet. National Pesticide Information Center**, Oregon State University Extension Services.2008 Disponível em: <<http://npic.orst.edu/factsheets/24Dgen.html>> Acesso em: 27/12/16.

JIN, Y., WANG, J., LIU, Q., QIU, H., WANG, Y., ZHOU, J., ... & ZHANG, W. Genome of *Bacillus* sp. strain QHF158 provides insights into its parasporal inclusions

encoded by the S-layer gene. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 1145–1150, 2020. DOI: 10.1007/s42770-019-00205-z.

JOUTEY, N. T., BAHAFID, W., SAYEL, H., & EL GHACHTOULI, N. Biodegradation: involved microorganisms and genetically engineered microorganisms. **Biodegradation-life of science**. p. 289–320, 2013.

KASCHABEK, S. R., KASBERG, T., MÜLLER, D., MARS, A. E., JANSSEN, D. B., & REINEKE, W. Degradation of chloroaromatics: purification and characterization of a novel type of chlorocatechol 2, 3-dioxygenase of *Pseudomonas putida* GJ31. **Journal of Bacteriology**, 180(2), 296-302, 1998..

KAMPFERA, P.; RUPPELB, S.; REMUSC, R. *Enterobacter radicincitans* sp. nov., a plant growth promoting species of the family Enterobacteriaceae. *Systematic and Applied Microbiology* 28 (2005) 213–221. <https://scihub.bban.top/10.1016/j.syapm.2004.12.007>

KARIMI, Hoda; MAHDAVI, Shahriar; ASGARI LAJAYER, Behnam; MOGHISEH, Ebrahim; RAJPUT, Vishnu D.; MINKINA, Tatiana; ASTATKIE, Tess. Insights on the bioremediation technologies for pesticide-contaminated soils. **Environmental Geochemistry and Health**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 1329–1354, 2022. DOI: 10.1007/s10653-021-01081-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10653-021-01081-z>.

KOCH, M. S.; WARD, J.M.; LEVINE, S. L.; BAUM, J. A.; VICINI, J. L.; HAMMOND, B. G. The food and environmental safety of Bt crops. **Frontiers in Plant Science**, v.6, p. 283 2015.

KITAGAWA W, TAKAMI S, MIYAUCHI K, MASAI E, KAMAGATA Y, TIEDJE JM, FUKUDA M (2002) Novel 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation genes from oligotrophic *Bradyrhizobium* sp. strain HW13 isolated from a pristine environment. **J Bacteriol** 184(2):509–518. <https://doi.org/10.1128/jb.184.2.509-518.2002>

KOUTROS, S., SILVERMAN, D. T., ALAVANJA, M. C., ANDREOTTI, G., LERRO, C. C., HELTSHE, S., ... & BEANE FREEMAN, L. E. Occupational exposure to pesticides and bladder cancer risk. **International journal of epidemiology**, 45(3), 792–805, 2016.

KUMAR, A., TREFAULT, N., & OLANIRAN, A. O. (2016). Microbial degradation of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid: insight into the enzymes and catabolic genes involved, their regulation and biotechnological implications. **Critical Reviews in Microbiology**, 42(2), 194-208.

LACEY, L. A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; FRUTOS, R.; BROWNBRIDGE, M.; GOETTEL, M. S. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, [S. l.], v. 132, p. 1–41, 2015. DOI: 10.1016/j.jip.2015.07.009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>.

LEAL, Maria Lorryne de Araújo; CHAVES, Josimar da Silva; SILVA, Jandiê Araújo Da; SILVA, Lucas Souza Da; SOARES, Ronielly Barbosa; NASCIMENTO, João Pedro Santos Do; MATOS, Sandoval Menezes De; TEIXEIRA JÚNIOR, Davair Lopes; BRITO NETO, Alfredo Fernandes De. Efeito dos sistemas de manejo e do uso do solo na população de microrganismos do solo. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. e21910917966, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i9.17966.

LEE, T. H.; KURATA, S.; NAKATSU, C. H.; KAMAGATA, Y. Molecular analysis of bacterial community based on 16S rDNA and functional genes in activated sludge enriched with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) under different cultural conditions. **Microbial Ecology**, [S. l.], v. 49, n. 1, p. 151–162, 2005. DOI: 10.1007/s00248-003-1035-6.

LEVEAU, J. H. J.; VAN DER MEER, J. R. Erratum: The tfdR gene product can successfully take over the role of the insertion element-inactivated TfdT protein as a transcriptional activator of the tfdCDEF gene cluster, which encodes chlorocatechol degradation in *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4) (**J. Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 179, n. 6, p. 2096, 1997).

LIMA, J. M. D.; AQUINO, R. F.; MAGALHÃES, C. A. D. S.; GONÇALVES, R. H.; NÓBREGA, J. C. A.; MELLO, C. R. Lime and phosphate effects on atrazine sorption, leaching and runoff in soil. **Ciencia e Agrotecnologia**, , v. 44, 2020. DOI: 10.1590/1413-7054202044022919.

LIU, X. X.; LIU, L.; SONG, X.; WANG, G. Q.; XIONG, Z. Q.; XIA, Y. J.; AI, L. Z.. Determination of the regulatory network and function of the lysR-type transcriptional regulator of *Lactiplantibacillus plantarum*, LpLttR. **Microbial Cell Factories**, v. 21, n. 1, p. 1–13, 2022. DOI: 10.1186/s12934-022-01774-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01774-9>.

LIZ, J. A. Z. E., JAN-ROBLERO, J., DE LA SERNA, J. Z. D., DE LEÓN, A. V. P., & HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. Degradation of polychlorinated biphenyl (PCB) by a consortium obtained from a contaminated soil composed of *Brevibacterium*, *Pandoraea* and *Ochrobactrum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 25(1), 165-170, 2009.

LEVEAU, J.H; F. KÖNIG, H. FÜCHSLIN; C. WERLEN, VAN DER MEER; J. Roelof. Dynamics of multigene expression during catabolic adaptation of *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) to the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetate **Mol. Microbiol.**, 33 (1999), pp. 396-406

LAEMMLI, C.M.; LEVEAU, J.H.; ZEHNDER, A.J.; VAN DER MEER, J.R. Characterization of a second tfd gene cluster for chlorophenol and chlorocatechol

metabolism on plasmid pJP4 in *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4). **Journal Bacteriology**, 182 (2000), pp. 4165-4172

LIN, L.; LI, Z.; HU, CHUNJIN; ZHANG, X.; CHANG, S.; YANG, L.; LI, Y.; AN, Q. Plant Growth-Promoting Nitrogen-Fixing Enterobacteria Are in Association with Sugarcane Plants Growing in Guangxi, China. **Microbes Environmental**, 4, pag. 391-398, 2012 doi: [10.1264/jsme2.ME11275](https://doi.org/10.1264/jsme2.ME11275).

MACEDO NETO, D.; FROEHNER, S.; MACHADO, K. S. (2012). Avaliação do transporte do ácido 2, 4-diclorofenoxiacético através de um lisímetro. **Química Nova**, 35, 1809-1813.

MAPA- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO Agrotóxico, 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/agrotoxicos>> Acesso em 10/05/2015.

MAPA- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Potencial agrícola coloca Brasil à frente da segurança alimentar no mundo**. 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2015/12/potencial-agricola-coloca-brasil-a-frente-da-seguranca-alimentar-no-mundo>> Acesso em : 04 Ago. 2016.

MAPA- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA - INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13, DE 24 DE MARÇO DE 2011. Disponível em <<https://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=recuperarTextoAtoTematicaPortal&codigoTematica=1229256>>

MAGNOLI, K., CARRANZA, C. S., ALUFFI, M. E., MAGNOLI, C. E., & BARBERIS, C. L. (2020). Herbicides based on 2, 4-D: its behavior in agricultural environments and microbial biodegradation aspects. A review. **Environmental Science and Pollution Research**, 27, 38501-38512.

MATĚJŮ, V. Current State of Biorremediation in the Czech Republic. The utilization of bioremediation to reduce soil contamination: problems and solution. **IV Earth and Environmental Sciences**. vol. 19, p. 405-412, 2000

MMA- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acesso em: 13 Ago. 2016.

MILNER, R. J. . History of *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture, ecosystems & environment*, 49(1), 9-13, 1994.

MORENO E, BLASCO JM, LETESSON JJ, GORVEL JP, MORIYÓN I. Pathogenicity and Its Implications in Taxonomy: The *Brucella* and *Ochrobactrum* Case. **Pathogens**. 2022 Mar 21;11(3):377. doi: 10.3390/pathogens11030377.

MIKHEENKO, A., PRJIBELSKI, A., SVELIEV, V., ANTIPOV, D., & GUREVICH, A. Versatile genome assembly evaluation with QUASt-LG. **Bioinformatics**, 34(13), 2018.

MILNER, R. J. (1994). History of *Bacillus thuringiensis*. **Agriculture, ecosystems & environment**, 49(1), 9-13.

MORIYA, Y., ITOH, M., OKUDA, S., YOSHIZAWA, A., AND KANEHISA, M.; KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. **Nucleic acids research**. 35, p. 182-185, 2007.

MORGAN, M. K.; SHELDON, L. S.; THOMAS, K. W., EGEHY, P. P.; CROGHAN, C. W., JONES; P. A., WILSON, N. K. Adult and children's exposure to 2, 4-D from multiple sources and pathways. **Journal of exposure science & environmental epidemiology**, 18(5), 486-494. (2008).

MÜLLER, R. H.; JORKS, S.; KLEINSTEUBER, S.; BABEL, W.. Degradation of various chlorophenols under alkaline conditions by Gram-negative bacteria closely related to *Ochrobactrum anthropi*. **Journal of Basic Microbiology**, [S. l.], v. 38, n. 4, p. 269–281, 1998. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4028(199809)38:4<269::AID-JOBM269>3.0.CO;2-P.

NAIR, K., AL-THANI, R., AL-THANI, D., AL-YAFEI, F., AHMED, T., & JAOUA, S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Qatar as shown by crystal morphology,  $\delta$ -endotoxins and cry gene content. **Frontiers in microbiology**, 9, 708, 2018.

NANJANI, S., PATEL, Z., SHARMA, S., PANDITA, P. R., PANDIT, R., JOSHI, M. N., ... & JOSHI, C. Transcriptome profiling reveals upregulation of benzoate degradation and related genes in *Pseudomonas aeruginosa* D6 during textile dye degradation. **Environmental Research**, 212, 113288, 2022.

NUNES, M. V. de M.. **Análise da degradação do herbicida Ácido 2,4 diclorofenoxiacético por *Ochrobactrum* sp.** Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, 2017

NC-IUBMB- INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 2022. Disponível em: <<https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/reaction/misc/catech.html>>. Acessado em: 09/11/22

NAYAK, T., PANDA, A. N., KUMARI, K., ADHYA, T. K., & RAINA, V. (2020). Comparative genomics of a paddy field bacterial isolate *Ochrobactrum* sp. CPD-03: analysis of chlorpyrifos degradation potential. *Indian Journal of Microbiology*, 60(3), 325-333.

NEETHA, J.P; UJWAL, P.; GIRISH KUMAR,K.; CHIDANANDA, B. GOVEAS,L.; SANDESH, K. Aerobic biodegradation and optimization of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid by *E. hormaechei* subsp. *Xiangfangensis* and assessment of biodegraded metabolite toxicity, **Environmental Technology & Innovation**. Volume 24, 2021, 102055, ISSN 2352-1864 <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102055>.

NAIR, K.; AL-THANI, R.; AL-THANI, D.; AL-YAFEI, F.; AHMED, T.; JAOUA, S.. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Qatar as shown by crystal morphology,  $\delta$ -Endotoxins and Cry gene content. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. APR, p. 1–10, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00708.

NAIMOV, S., WEEMEN-HENDRIKS, M., DUKIANDJIEV, S., & DE MAAGD, R. A. (2001). Bacillus thuringiensis delta-endotoxin CryI hybrid proteins with increased activity against the Colorado potato beetle. **Applied and Environmental Microbiology**, 67(11), 5328-5330.

NGUYEN, T. P. O.; HANSEN, M. A.; HANSEN, L. H.; HOREMANS, B.; SØRENSEN, S. J.; DE MOT, R.; SPRINGAEL, D.. Intra- and inter-field diversity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmids and their tfd catabolic genes in rice fields of the Mekong delta in Vietnam. **FEMS Microbiology Ecology**, , v. 95, n. 1, p. 1–11, 2019. DOI: 10.1093/femsec/fiy214.

NICOLAISEN, Mette Haubjerg; BÆLUM, Jacob; JACOBSEN, Carsten Suhr; SØRENSEN, Jan. Transcription dynamics of the functional tfdA gene during MCPA herbicide degradation by Cupriavidus necator AEO106 (pRO101) in agricultural soil. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 571–579, 2008. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2007.01476.x.

NJOKU, V. O., ASIF, M., & HAMEED, B. H. (2015). 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid adsorption onto coconut shell-activated carbon: isotherm and kinetic modeling. **Desalination and water treatment**, 55(1), 132-141.

NGUYEN, T. P. O., HANSEN, M. A., HANSEN, L. H., HOREMANS, B., SØRENSEN, S. J., DE MOT, R., & SPRINGAEL, D. (2019). Intra-and inter-field diversity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmids and their tfd catabolic genes in rice fields of the Mekong delta in Vietnam. **FEMS microbiology ecology**, 95(1), fiy214. 2019.

ONU - United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2019). World Population Prospects 2019: Highlights (ST/ESA/SER.A/423). Disponível em: <https://www.un.org/development/desa/en/news/population/world-population-prospects-2019.html>. Acesso em: 10/01/2021

OLIVEIRA, T. D. F., Ferreira, J. S., Boa Sorte, P. M. F., Reis, V. M., Baldani, J. I., & Schwab, S. Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. **Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**.v. 49, n. Cmi, p. 16, 2009

OCDE-FAO Perspectivas agrícolas 2015-2024. Divisão de Comércio e Mercados Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. 2015. Disponível em: < <https://www.fao.org/3/i4761o/i4761o.pdf>> Acessado em 20/11/2022

OCDE/FAO. Perspectivas agrícolas no Brasil: desafios da agricultura brasileira 2015-2024. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2015**, , p. 61–108, 2015. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/pt/>.

OECD- Organization for Economic Co-operation and Development.Guidance document for conducting pesticide terrestrial field dissipation studies.**UN Conference on Environment and Development to strengthen co-operation and increase international co-ordination in the field of chemical safety**.n.86, 2016.

OLSON, K. R; MORTON, L. W.. Long-Term Fate of Agent Orange and Dioxin TCDD Contaminated Soils and Sediments in Vietnam Hotspots. **Open Journal of Soil Science**, v. 09, n. 01, p. 1–34, 2019. DOI: 10.4236/ojss.2019.91001.

OREN, A.; GARRITY, G.. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 4043–4049, 2020. DOI: 10.1099/ijsem.0.004244.

ORTIZ-HERNÁNDEZ, M. L.; GAMA-MARTÍNEZ, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; CASTREJÓN-GODÍNEZ, M. L.; ENCARNACIÓN, S.; TOVAR-SÁNCHEZ, E.; SALAZAR, E.; RODRÍGUEZ, A.; MUSSALI-GALANTE, P.. Transcriptomic analysis of *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 during methyl parathion degradation. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 28, n. 31, p. 42414–42431, 2021. DOI: 10.1007/s11356-021-13647-6.

PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. Bacillus thuringiensis Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. **Toxins**.vol. 6, n° 12, p. 3296–3325, 2014.

PAN. The Pesticide Action Network (PAN), 2017. Disponível em: <[http://www.pesticideinfo.org/Detail\\_Chemical.jsp](http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp) 06/01/2017>. Acesso em 15 Dez. 2016.

PARKS, D. H., IMELFORT, M., SKENNERTON, C. T., HUGENHOLTZ, P., & TYSON, G. W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome research**, 25(7), 1043-1055, 2015.

PAZMIÑO, D. M.; SERRANO, M. R.; SANZ, M.; PUERTAS, M. C. R.; SANDALIO, L.M. Regulation of epinasty induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in pea and *Arachidopsis* plants. **Plant Biology**, v.16, n° 4, 2014.

PECKLE, B. A., SILVA, S. D., RIBEIRO, J. R. D. A., OLIVEIRA, S. S. D., VIANEZ-JÚNIOR, J. L. S. G., DIREITO, I. C. N., & MACRAE, A. The Genome of *Enterobacter hormaechei* Strain MG02, a 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid-Degrading Bacterium Isolated from Brazilian Soil. **Microbiology Resource Announcements**, 11(3), e01104-21, 2022.

PECKLE, B. A. Capacidade de degradação do **Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) pelo isolados DF07 e MG07**. 2012. 59f. Monografia em Ciências Biológicas. Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), 2012.

PECKLE, B. A.. 2015. 99f. **Desenvolvimento de um Inoculante com ação biorremediadora e biocontrole**. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas - Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

PEREIRA, P.H.F. **Desenvolvimento de Formulações Fúngicas para a Biorremediação de Solos**. 2016. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas - Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

PERKINS, E. J., & LURQUIN, P. F. (1988). Duplication of a 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid monooxygenase gene in *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4). **Journal of bacteriology**, 170(12), 5669-5672.

PERES, F., MOREIRA, J.C. DUBOIS, G.S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F., MOREIRA, J.C. DUBOIS, G.S.,orgs. **É veneno ou remédio?: agrotóxico, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro. Editora FIOCRUZ, 2003. p.21-42 ISSN 85-7541-0318

PIACENTIN, P. **A fome no mundo**. Disponível em: < <http://pre.univesp.br/a-fome-no-mundo#.V6PQSPkrLIU>>. Acesso em 04 Ago. 2016.

PINTO, L. M. N.; BERLITZ, D. L.; FORTES, R. C.; FIUZA, L. M. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 38, p. 24-31, 2009.

PRATA, F.; LAVORENTI, A. Comportamento de Herbicida no Solo: Influência da Matéria Orgânica. **Revista Biociência**, v.6, n. 2, p. 17-22, 2000.

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; ALBARICO, F. P. J. B.; PANDEY, A.; CHEN, C. W.; DONG, C. D. Organic wastes bioremediation and its changing prospects. **Science of the Total Environment**, v. 824, p. 153889, 2022. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.153889. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153889>.

PRAMANIK, K.; MITRA, S.; SARKAR, A.; SOREN, T.; MAITI, T. K. Characterization of a Cd<sup>2+</sup>-resistant plant growth promoting rhizobacterium (*Enterobacter* sp.) and its effects on rice seedling growth promotion under Cd<sup>2+</sup>-stress in vitro. **Agriculture and Natural Resources**, v. 52, n. 3, p. 215–221, 2018. DOI: 10.1016/j.anres.2018.09.007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.09.007>.

QUEIROZ, A. R. S.; VIDAL, R. A. The development of dichlorophenoxyacetate herbicide tolerant crops: **literature review**. **Planta Daninha**, 32, 649-654, 2014.

QIU, X.; ZHONG, Q.; LI, M.; BAI, W.; LI, B. Biodegradation of p-nitrophenol by methyl parathion-degrading *Ochrobactrum* sp. B2. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 59, n. 4, p. 297–301, 2007. DOI: 10.1016/j.ibiod.2006.09.005

RAMYA, S. L.; VENKATESAN, T.; MURTHY, K.S.; JALALI, S. K; VARGHESE, A. Degradation of acephate by and isolated from diamondback moth moth *Plutella xylostella* (L), a pest of cruciferous crops *Enterobacter asburiae*, *Bacillus cereus* *Pantoea agglomerans* *Plutella xylostella*. **Journal of environmental biology**, 37(4), 611, 2016.

RADWAN, T. E., REYAD, A. M.;REYARD ASHRAF, M. . Bioremediation of the nematicide oxamyl by *Enterobacter ludwigii* isolated from agricultural wastewater. *Egypt. J. Exp. Biol.(Bot.)*, 13(3), 19-30, 2017.

REYAZ, A. L., BALAKRISHNAN, N., & UDAYASURIYAN, V. (2021). A novel *Bacillus thuringiensis* isolate toxic to cotton pink bollworm (*Pectinophora gossypiella* Saunders). *Microbial Pathogenesis*, 150, 104671.

RODRIGUES, N. R.; ANDRIETTA, M. G. S; ANDRIETTA, S. R; SANTOS, P. E. R. Biodegradação do Diclosulam por bactérias isoladas de solos cultivados com soja. *Revista Planta Daninha*, v. 28, n. 2, 2010.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E., CASTRO-GUTIÉRREZ, V., CHIN-PAMPILLO, J. S., & RUIZ-HIDALGO, K. (2013). On-farm biopurification systems: role of white rot fungi in depuration of pesticide-containing wastewaters. *FEMS microbiology letters*, 345(1), 1-12.

MUNEESWARI, R. ; S, IYAPPAN; KV, SWATHI; KP, SUDHEESH; T, RAJESH; G, SEKARAN; K, RAMANI. Genomic characterization of *Enterobacter xiangfangensis* STP-3: Application to real time petroleum oil sludge bioremediation. *Microbiological Research*, v. 253, n. September, p. 126882, 2021. DOI: 10.1016/j.micres.2021.126882.

RYAN, M. P.; PEMBROKE, T.J. The genus *Ochrobactrum* as major opportunistic pathogens. *Microorganisms*, v. 8, n. 11, p. 1–30, 2020. DOI: 10.3390/microorganisms8111797.

RICHTER M, ROSSELLÓ-MÓRA R, GLÖCKNER FO, AND PEPLIES J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*. 2015 Nov 16. pii: [btv681](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681). Disponível em: <https://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>

RODRÍGUEZ-SERRANO, M., PAZMIÑO, D. M., SPARKES, I., ROCHETTI, A., HAWES, C., ROMERO-PUERTAS, M. C., & SANDALIO, L. M. 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid promotes S-nitrosylation and oxidation of actin affecting cytoskeleton and peroxisomal dynamics. *Journal of experimental botany*, 65(17), 4783-4793, 2014.

ROSENBERG, E. (Ed.). *Microorganisms to combat pollution*. Springer Science & Business Media. 2012. DOI: 10.1007/978-94-011-1672-5.

SANDERS JR AND SANDERS, 1997 – SANDERS JR, W. E.; SANDERS, C.C. American Society for Microbiology *Enterobacter* spp.: Pathogens Poised To Flourish at the Turn of the Century. *Clinical Microbiology Reviews*, vol 10,n.2, 1997. Doi 10.1128/CMR.10.2.220.

SANAHUJA, G., BANAKAR, R., TWYMAN, R. M., CAPELL, T., & CHRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant biotechnology journal*, 9(3), 283-300, 2011.

SARKER, A., ISLAM, T., RAHMAN, S. *et al.* Uncertainty of pesticides in foodstuffs, associated environmental and health risks to humans—a critical case of Bangladesh with respect to global food policy. **Environmental Science and Pollution Research**, **28**, 54448–54465, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16042-3>

SAHOO, B., NINGTHOUJAM, R., & CHAUDHURI, S. Isolation and characterization of a lindane degrading bacteria *Paracoccus* sp. NITDBR1 and evaluation of its plant growth promoting traits. **International Microbiology**, **22**(1), 155-167. 2019.

SAHU, N., VASU, D., SAHU, A., LAL, N., & SINGH, S. K. Strength of Microbes in Nutrient Cycling: A Key to Soil Health. Agriculturally Important Microbes for Sustainable. **Agriculture**, **69**–86, 2017. doi:10.1007/978-981-10-5589-8\_4

SBANO, A., FERREIRA, J. V. R., PECKLE, B. A., MACRAE, A., & DIREITO, I. C. N. (Otimização de método cromatográfico para quantificação do herbicida ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D). *Acta Scientiae et Technicae*, **1**(2), 2013.

SCHÜNEMANN, R., KNAAK, N., & FIUZA, L. M. (2014). Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. **International Scholarly Research Notices**, **2014**.

SZÉKÁCS, A. Herbicide mode of action. In *Herbicides* (pp. 41-86). **Elsevier**, (2021).

SHARMA, I., & KANGO, N. Production and characterization of keratinase by *Ochrobactrum intermedium* for feather keratin utilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, **166**, 1046-1056, 2021.

SILVA, S. D., PECKLE, B. A., RIBEIRO, J. R. D. A., OLIVEIRA, S. S. D., BIANCO, K., CLEMENTINO, M. M., ... & MACRAE, A. The Genome Sequence of *Brucella intermedia* DF13, a 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid-Degrading Soil Bacterium Isolated in Brazil. **Microbiology Resource Announcements**, **11**(4), e01105-21, 2022

SUTTON GG, BRINKAC LM, CLARKE TH, FOUTS DE. *Enterobacter hormaechei* subsp. *hoffmannii* subsp. nov., *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* comb. nov., *Enterobacter roggenkampii* sp. nov., and *Enterobacter muelleri* is a later heterotypic synonym of *Enterobacter asburiae* based on computational analysis of sequenced *Enterobacter* genomes. **F1000Research**. 2018. doi: 10.12688/f1000research.14566.2.

SUVOROVA, I. A., & GELFAND, M. S. Comparative genomic analysis of the regulation of aromatic metabolism in betaproteobacteria. *Frontiers in microbiology*, **10**, 642, 2019.

SINGH, S. N. Microbial degradation of xenobiotics. **Springer Science & Business Media**, 2011.

SILVA, C.P.; MORAIS, G. L.; LIMA, V.W. Padronização da técnica de liofilização para inoculantes agrícolas à base de *Bacillus thuringiensis* (2018). Monografia (Barachel Ciências Biológicas)- Universidade Celso Lisboa, Rio de Janeiro, 2018.

SILVA, M.. Lei da Biodiversidade: Referências sobre a lei da Biodiversidade. FIOCRUZ. Disponível em: < <https://portal.fiocruz.br/lei-da-biodiversidade>> Acessado em: 01/12/2022

SILVA, A. de C. Guia para reconhecimento de inimigos naturais de pragas agrícolas. **EMBRAPA**, Brasília, p. 9-12, 2013.

SILVA, A. S. **Caracterização de enzimas bacterianas de degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos**. Dissertação, obtenção grau na Faculdade de Agronomia, programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo 2008. Universidade Federal do Rio Grand do Sul, Porto Alegre.

SILVA, L. M. da. **Caracterização molecular e atividade de isolados de *Bacillus thuringiensis* ( Berliner) para brocas da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* ( FABR.) e *Diatraea flavipennella* ( BOX) ( Lepidoptera: Crambidae)**. Dissertação de mestrado em Entomologia agrícola, 2013b.

SANAHUJA, G.; BANAKAR, R.; TWYMAN, R. M.; CAPELL'AND, T.; CHRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant biotechnology Journal**, v. 9, ed. 3, p. 283-300, 2011.

SNA- Sociedade Nacional de Agricultura. EUA e Brasil continuam a liderar a produção de transgênicos no mundo Disponível em:<<https://www.sna.agr.br/eua-e-brasil-continuam-a-liderar-a-producao-de-transgenicos-no-mundo/> Publica em: 03/12/2020 acessado em: 09/11/22

SNA. Brasil cria primeiro algodão transgênico de fibra longa. Disponível em: <https://www.sna.agr.br/brasil-cria-primeiro-algodao-transgenico-de-fibra-longa/>. Publicado em: 23/05/2017. Acesso em 17 nov. 2022;

SNA-Sociedade Nacional de Agricultura - Brasil começa a plantar cana transgênica. Disponível em: <<https://www.sna.agr.br/brasil-comeca-a-plantar-cana-transgenica/>>. Publicado em: 07/03/2018. Acesso em 12 nov 2020

SÁNCHEZ REYES, Ayixon. Reclassification of *Brucella ciceri* as later heterotypic synonyms of *Brucella intermedia*. **bioRxiv**, [*S. l.*], p. 1–7, 2020.

SANTOS, T. A.; MORAIS, A. F. G.; PINHO, P. da S.; DIAS, V. O.; SANTOS, L. S.; CRUZ, L. R.; LEITE, H. M. F.. Influência do herbicida 2,4-D aplicado em pós emergência no desempenho agrônômico de milho crioulo comparado a cultivares comerciais na Amazônia ocidental. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 6, p. e1511628599, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i6.28599.

SAMBROOK, J.; TRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SETLHARE, Boitumelo; KUMAR, Ajit; MOKOENA, Mduduzi P.; OLANIRAN, Ademola O. Catechol 1,2-dioxygenase is an analogue of homogentisate 1,2-dioxygenase in *Pseudomonas chlororaphis* strain UFB2. **International Journal of Molecular Sciences**, [*S. l.*], v. 20, n. 1, p. 1–13, 2019. DOI: 10.3390/ijms20010061.

SERBENT, M. P., REBELO, A. M., PINHEIRO, A., GIONGO, A., & TAVARES, L. B. B. (2019). Biological agents for 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide degradation. **Applied microbiology and biotechnology**, *103*, 5065-5078.

SMITH, A. M., SMITH, M. T., LA MERRILL, M. A., LIAW, J., & STEINMAUS, C. 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) and risk of non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis accounting for exposure levels. **Annals of epidemiology**, *27*(4), 281-289. 2017.

SOUZA JUNIOR, M. L. De; CASTRO, N. R.; GILIO, L.; MORAIS, A. C. P.; BARROS, G. S. de C.. Mercado De Trabalho Do Agronegócio No Centro-Oeste: a Importância Do Setor Para O Dinamismo Regional. **Revista de Economia e Agronegócio**, , v. 18, n. 1, p. 1–20, 2020. DOI: 10.25070/rea.v18i1.8426.

SUMAN, S.; TANUJA. Isolation and Characterization of a Bacterial Strain *Enterobacter cloacae* (Accession No. KX438060.1) Capable of Degrading DDTs Under Aerobic Conditions and Its Use in Bioremediation of Contaminated Soil . **Microbiology Insights**,2021, v. 14, p. 117863612110242, 2021. DOI: 10.1177/11786361211024289.

STELLMAN, J. M.; STELLMAN, S. D.; WEBER, T.; TOMASALLO, C.; STELLMAN, A. B.; CHRISTIAN JUNIOR, R. A. Geographic Information System for Characterizing Exposure to Agent Orange and Other Herbicides in Vietnam .**Environmental Health Perspectives**, v. 111, n° 3, 2003.

TAN, L.; HU, Q.; Xiong, X.; Su, X.; Huang, Y.; Jiang, Q.; Zhao, S.; ZENG, W. Isolation and characterization of a novel 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid-degrading *Enterobacter* sp. strain SE08. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 96, pag. 198-204,2013.

TAGHAVI, S. VAN DER LELIE, D.; HOFFMAN, A.; ZHANG, Y; WALLA, M.D.; VANGRONSVELD, J.; NEWMAN, L.; MONCHY, S. Genome Sequence of the Plant Growth Promoting Endophytic Bacterium *Enterobacter* sp. **638. PLOS GENET**, **2010**. [10.1371/journal.pgen.1000943](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000943) *PLoS Genet.* 2010.

THARAD, S.; TOCA-HERRERA, J.; POMDONKOY, B; KRITANNAI, C. *Bacillus thuringiensis* Cyt2Aa2 toxin disrupts cell membranes by forming large protein aggregates. **Bioscience Report**, v. 36, 2016.

TERRA, F.H.B.; PELAEZ, V. A história da indústria de agrotóxico no Brasil: as primeiras fábricas na década de 1940 aos anos 2000. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, 47. Anais. Porto Alegre: RS: 2009.

TAMURA, K., STECHER, G., & KUMAR, S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular biology and evolution**, *38*(7), 3022-3027 (2021).

VANDEN BERGHE DA & VLIETINCK AJ. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: Dey PM. & Harbone JD. Methods in Plant Biochemistry. **Academic Press** 47–69, 1991.

VELASCO, J.; ROMERO, C.; LEIVA, J.; DIAZ, R. MORYION, I.. Evaluation of the relatedness of of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. 1 998, p. 759–768, 1998.

VEDLER E, VAHTER M, HEINARU A (2004) The completely sequenced plasmid pEST4011 contains a novel IncP1 backbone and a catabolic transposon harboring tfd genes for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation. **J Bacteriol** 186(21):7161–7174. <https://doi.org/10.1128/JB.186.21.7161-7174.2004>

VIANEZ JUNIOR, J.L. da S. **Bioinformática Aplicada no Desenho de Iniciadores para Genes Funcionais- Degradação do Herbicida 2,4-D: Um estudo de caso.** 2007. 132F. Dissertação de Mestrado do curso de Biotecnologia Vegetal e Bioprodutos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

VILAS-BÔAS, G. T., ALVAREZ, R. C., DOS SANTOS, C. A., & VILAS-BOAS, L. A. (2012). Fatores de virulência de *Bacillus thuringiensis*: o que existe além das proteínas Cry. **EntomoBrasilis**, 5(1), 1-10.

YENN, R. A. Study on problems associated with crude oil contamination in assam and its control using biological methods. **Ed. Laxmi.** cap. 2, p. 12-41, 2015.

YUAN, Y. J., LU, Z. X., HUANG, L. J., BIE, X. M., LÜ, F. X., & LI, Y. Optimization of a medium for enhancing nicotine biodegradation by *Ochrobactrum intermedium* DN2. **Journal of Applied Microbiology**, 101(3), 691-697,2006

YOU, I.S.; GHOSAL, D. Genetic and molecular analysis of a regulatory region of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetate catabolic plasmid pJP4. **Molecular Microbiology**, 16 (1995), pp. 321-331

YOU, I. S.;GHOSAL, D. Genetic and molecular analysis of a regulatory region of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetate catabolic plasmid pJP4. **Molecular microbiology**, 16(2), 321-331, 1995.

YOUSAF., S. , AFZAL, M.; , REICHENAUER, T.G.; , CARRIE L. C.L. , SESSITSCH, A. Hydrocarbon degradation, plant colonization and gene expression of alkane degradation genes by endophytic *Enterobacter ludwigii* strains. **Environmental Pollution.** Volume 159, Issue 10, October 2011, Pages 2675-2683. doi.org/10.1016/j.envpol.2011.05.031

YOUSAF, S.; RIPKA, K. ; REICHENAUER, T. G.; ANDRIA, V.; AFZAL, M.; SESSITSCH, A Hydrocarbon degradation and plant colonization by selected bacterial strains isolated from Italian ryegrass and birdsfoot trefoil. *Journal Applied of Microbiology.* Volume109, Issue4.October 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04768.x>

WANG, J., WANG, C., LI, Q., S., M., BAI, P., LI, J., ... & ZHAO, J. Microcystin-LR degradation and gene regulation of microcystin-degrading *Novosphingobium* sp. THN1 at different carbon concentrations. **Frontiers in microbiology**, 10, 1750, 2019.

WANG, Xin Qiang; LIU, Jintong; ZHANG, Nan; YANG, Hong. Adsorption, mobility, biotic and abiotic metabolism and degradation of pesticide exianliumi in three types of farmland. **Chemosphere**, [S. l.], v. 254, p. 126741, 2020. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126741. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126741>.

WANG, Xiaobo; WU, Zhansheng; XIANG, Huichun; HE, Yanhui; ZHU, Shuangxi; ZHANG, Ziyang; LI, Xueping; WANG, Jianwen. Whole genome analysis of *Enterobacter cloacae* Rs-2 and screening of genes related to plant-growth promotion. **Environmental Science and Pollution Research**, 2022. DOI: 10.1007/s11356-022-23564-x.

WORLD BANK. Population 2020. **Finance & Development**, [S. l.], v. 57, n. 1, p. 68, 2020. Disponível em: <https://databank.worldbank.org/data/download/POP.pdf%0Ahttps://datacatalog.worldbank.org/dataset/population-ranking>.

WHO. **The International Agency for Research on Cancer (IARC)/ World Health Organization. IARC Monographs evaluate DDT, lindane, and 2,4-D**, 2015. Disponível em: <[https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr236\\_E.pdf](https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr236_E.pdf)>. Acesso em 15 Set. 2016.

WU, X., WANG, W., LIU, J., PAN, D., TU, X., LV, P., ... & HUA, Rapid biodegradation of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid by *Cupriavidus gilardii* T-1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 65(18), 3711-3720, 2017. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b00544.

WU, W., FENG, Y.; ZONG, Z. Precise species identification for *Enterobacter*: a genome sequence-based study with reporting of two novel species, *Enterobacter quasirogenkampii* sp. nov. and *Enterobacter quasimori* sp. nov. **MSystems**, 5(4), 10-1128 (2020).

ZHANG, X. H., ZHANG, G. S., ZHANG, Z. H., JIAN-HONG, X. U., & SHUN-PENG, L. I. Isolation and Characterization of a Dichlorvos-Degrading Strain DDV-1 of *Ochrobactrum* sp. **Pedosphere**, Volume 16, Issue 1, Pages 64-71, 2006, ISSN 1002-0160, [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(06\)60027-1](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(06)60027-1).

XIA, Zhen Yuan; ZHANG, Long; ZHAO, Yan; YAN, Xin; LI, Shun Peng; GU, Tao; JIANG, Jian Dong. Biodegradation of the Herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid by a New Isolated Strain of *Achromobacter* sp. LZ35. **Current Microbiology**, [S. l.], v. 74, n. 2, p. 193-202, 2017. DOI: 10.1007/s00284-016-1173-y.

XU, T.; WANG, Y.; LIU, X.; GAO, S.; QI, M.; LI, T. Solanum lycopersicum IAA15 functions in the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide mechanism of action by

mediating abscisic acid signaling. **Journal of experimental Botany**, vol. 66, n°13 p. 3977-3990, 2015.

YIRUI, W. U., TENGTENG, H. E., ZHONG, M., ZHANG, Y., ENMIN, L., HUANG, T., & ZHONG, H. U. (2009). Isolation of marine benzo [a] pyrene-degrading *Ochrobactrum* sp. BAP5 and proteins characterization. **Journal of Environmental Sciences**, 21(10), 1446-1451.

ZHAN, H., FENG, Y., FAN, X., & CHEN, S. Recent advances in glyphosate biodegradation. **Applied microbiology and biotechnology**, 102(12), 5033-5043, 2018.

ZHANG, XIAO HUA; ZHANG, GUO SHUN; ZHANG, ZHONG HUI; XU, JIAN HONG; LI, shun peng. Isolation and characterization of a dichlorvos-degrading strain DDV-1 of *Ochrobactrum* sp. **Pedosphere**, v. 16, n. 1, p. 64–71, 2006. DOI: 10.1016/S1002-0160(06)60027-1.

ZHANG, X., ACEVEDO, S.; CHAO, Y., CHEN, Z.; DINOFF, T., DRIVER, J.; KRIEGER, R. (2011). Concurrent 2, 4-D and triclopyr biomonitoring of backpack applicators, mixer/loader and field supervisor in forestry. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, 46(4), 281-293, 2011

ZHARIKOVA, N. V.; IASAKOV, T. R.; ZHURENKO, E. Yu.; KOROBOV, V. V.; MARKUSHEVA, T. V. Bacterial Genes of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Degradation Encoding  $\alpha$ -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenase Activity. **Biology Bulletin Reviews**, v. 8, n. 2, p. 155–167, 2018. DOI: 10.1134/s2079086418020081.

ZILLI, J. E.; SMIDERLE, J. O.; FERNANDES JÚNIOR, I. P.; Eficiência agronômica de diferentes formulações de inoculantes contendo *Bradyrhizobium* na cultura da soja em Roraima. **Agro@ambiente On-line**. vol. 4, n° 2, p. 56-61, 2010.

ZUANAZZI, N. R.; GHISI, N. de C.; OLIVEIRA, E. C.. Analysis of global trends and gaps for studies about 2,4-D herbicide toxicity: A scientometric review. **Chemosphere**, v. 241, 2020. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.125016.

2,4-D NORTOX - [Bula]. Paraná. NORTOX S/A. Disponível em: <[https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos\\_restritos/files/documento/2020-10/24-d\\_nortox\\_130120.pdf](https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2020-10/24-d_nortox_130120.pdf)> . Acesso em: 12/2022

## **ANEXO I : DEPOSITO DE PATENTE**

Pedido de Patente nº BR 10 2020 014884 2

Solicitação: 22/07/2020

Autores: Andrew Macrae, Barbara Alvarenga Peckle e Ida Carolina Neves Direito

Título: COMPOSIÇÃO INOCULANTE AGRÍCOLA, SEUS USOS, MÉTODO DE  
CONTROLE DE PRAGAS E MÉTODO PARA BIORREMEDIAÇÃO

### **RESUMO** **COMPOSIÇÃO INOCULANTE AGRÍCOLA, SEUS USOS, MÉTODO DE** **CONTROLE DE PRAGAS E MÉTODO PARA BIORREMEDIAÇÃO**

A presente invenção se relaciona com as ciências agrícolas e com o campo biológico. A presente invenção revela uma composição inoculante agrícola compreendendo um consórcio microbiano composto pela bactéria *Bacillus thuringiensis* e pelo menos uma das estirpes bacterianas *Enterobacter sp.* e *Ochrobactrum sp.*, seus mutantes ou combinação entre eles; um excipiente de uso agrícola e/ou uso farmacêutico aceitável à base de amido e um aditivo. Também se refere ao método de produção da referida composição inoculante agrícola e aos seus usos no biocontrole de pragas agrícolas, na biorremediação ou redução da contaminação ambiental por resíduos tóxicos ou pesticidas; para a promoção do o crescimento de plantas e para condicionar solos para todas as culturas e qualquer área agricultável ou não.

## ANEXO II : ARTIGOS



GENOME SEQUENCES



## The Genome of *Enterobacter hormaechei* Strain MG02, a 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid-Degrading Bacterium Isolated from Brazilian Soil

Barbara Alvarenga Peckle,<sup>a</sup> Sheila da Silva,<sup>a</sup> José Roberto de Assis Ribeiro,<sup>a</sup> Selma Soares de Oliveira,<sup>ab</sup> João Lídio Silva Gonçalves Vianez-Júnior,<sup>c</sup> Ida Carolina Neves Direito,<sup>d</sup> Andrew Macrae<sup>ab</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup>Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>c</sup>Center for Technological Innovation, Evandro Chagas Institute/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brazil

<sup>d</sup>Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LBA) do Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Barbara Alvarenga Peckle and Sheila da Silva contributed equally to this article. Author order was determined both alphabetically and in order of increasing seniority.

**ABSTRACT** *Enterobacter hormaechei* strain MG02 was isolated from a mixed culture collected from soil with a history of pesticide application. This strain degrades 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Here, we report on its genome, which has 4,923,875 bp and 55.4% G+C content.

Strains of the genus *Enterobacter* are Gram-negative bacilli, non-spore forming, and belong to the family *Enterobacteriaceae*; they are widely distributed in nature (1). *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* was described as degrading 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (2). *Enterobacter hormaechei* strain MG02 was isolated from soil that receives herbicides from the Cruzeiro Farm, Castelândia, Goiás, Brazil (18°04'49"S, 50°10'59"WGr). For isolation, a dilution ( $10^{-7}$ ) of 10 g of the soil was performed with 0.1% NaCl (wt/vol), 0.1% sodium pyrophosphate (wt/vol), and 0.1% (vol/vol) Tween 20 after incubation at 30°C and centrifuged at 180 rpm for 20 min. Then, serial dilution ( $10^{-2}$  to  $10^{-7}$ ) in 0.85% saline was performed. We plated 100  $\mu$ L of each dilution on 2,4-D MEMB medium (3). The strain was maintained in a minimal mineral medium with 2,4-D as the sole carbon source. A single colony was grown on LB medium at 28°C and was used for DNA extraction using the Purelink genomic DNA minikit (Invitrogen) and was DNA quantified by Qubit fluorometer.

The genome was sequenced using the Illumina MSeq platform (Functional Genomics Center, ESALQ/USP) using 600 ng/mL genomic DNA (gDNA) for construction of a paired-end sequencing library (2  $\times$  250 bp) with Nextera XT DNA sample preparation kit (Illumina, San Diego, CA, USA). The FastQC v0.11.9 (4) and Trim Galore v0.6.6 (5) tools were used to remove adapters and check and control read quality with a Phred quality score cutoff of >30. Genome assembly was performed combining *de novo* and scaffold mapping assembly techniques. SPAdes v3.15.0 (6) was used for the *de novo* assembly, and its output was used for assembly with MeDuSa v1.6 (7) along with 30 *Enterobacter hormaechei* complete reference genomes from NCBI. QUAST v5.0.2 (8) and CheckM v1.4.0 (9) were used to confirm quality of the assembly. The Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) v5.3 from NCBI (10–12) was used to annotate the genome. 16S rRNA taxonomic classification was done using NCBI BLASTn v2.12.0 using the nr/nt database (13). Genome taxonomy was done using Average Nucleotide Identity (ANI) v3.8.3, Pairwise Tetra-correlation (TETRA) v3.8.3, and the Tetra Correlation Search (TCS) v3.8.3 from JSpeciesWS v3.8.3 (14).

The sequencing resulted in 2,744,980 raw reads. The genome assembly resulted in 5 scaffolds and a genome length of 4,923,875 bp with 117.7 $\times$  coverage and 55.4% G+C content,

Editor Catherine Puzoni, Loyola University Chicago

Copyright © 2022 Peckle et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Andrew Macrae, amacrae@micro.uff.br.

The authors declare no conflict of interest.

Received 12 November 2021

Accepted 14 February 2022



GENOME SEQUENCES



## The Genome Sequence of *Brucella intermedia* DF13, a 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid-Degrading Soil Bacterium Isolated in Brazil

Sheila da Silva,<sup>a</sup> Barbara Alvarenga Peckle,<sup>a,d</sup> José Roberto de Assis Ribeiro,<sup>a</sup> Selma Soares de Oliveira,<sup>a,b</sup> Kayo Bianco,<sup>c</sup> Maysa Mandetta Clementino,<sup>c</sup> Ida Carolina Neves Direito,<sup>d</sup> Andrew Macrae<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Programa pós-graduação de Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>b</sup>Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>c</sup>Laboratório de Micro-organismos de Referência, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>d</sup>Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LBA) do Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Sheila da Silva and Barbara Alvarenga Peckle contributed equally to this work. The order of authors was determined as shown because more than one coauthored paper was submitted, so the order was divided among the submissions.

**ABSTRACT** *Brucella intermedia*/*Ochrobactrum intermedium* strain DF13 was isolated from Brazilian soil and is able to degrade 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Here, we report on its genome sequence, with 4,570,268 bp and a 57.8% G+C content.

**KEYWORDS** *Ochrobactrum intermedium*, *Brucella intermedia*, bioremediation, biodegradation, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), soil

Members of the genus *Brucella* are Gram-negative aerobic bacilli (1), belonging to the *Brucellaceae* family (2, 3), and are known as human and animal pathogens (2). Based on recent and thorough genome comparisons, the genus *Ochrobactrum* has been reclassified and its species included within the genus *Brucella* (4, 5). Consequently, strain DF13, originally classified as *Ochrobactrum intermedium*, is synonymous with *Brucella intermedia*. *Ochrobactrum intermedium* is known to biodegrade organic pollutants (6) as well as organophosphorus pesticides (7, 8). The genus *Ochrobactrum* was described as capable of degrading the pesticide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (9). Based on our interests in biodegradation, we report on this strain's genome. The strain was isolated from topsoil, at a depth of 0 to 20 cm, from Fazenda Agroecológica-SIPA, located at 43°40'00"W and 22°44'30"S. For isolation, a dilution ( $10^{-1}$ ) of 10 g of the soil was performed with 0.1% NaCl (wt/vol), 0.1% (wt/vol) sodium pyrophosphate, and 0.1% (vol/vol) Tween 20 after incubation at 30°C and centrifuged at 180 rpm for 20 min. Then, serial dilution ( $10^{-2}$  to  $10^{-7}$ ) in 0.85% saline was performed. A total of 100  $\mu$ L of each dilution was plated on a 2,4-D, MEMB selective medium (10). The strain was maintained and grew in a minimal mineral medium with 2,4-D as the sole carbon source. A single colony grown on LB medium at 28°C was used for DNA extraction using the PureLink genomic DNA minikit (Invitrogen) and was quantified with a Qubit fluorometer.

The genomic paired-end library ( $2 \times 300$  bp) with 550-bp medium-sized inserts was built using the Nextera XT DNA library preparation kit (Illumina, San Diego, CA) and sequenced on Illumina MiSeq (INCCQ; Fiocruz, Manguinhos, RJ, Brazil) using the MiSeq reagent kit V3 (600 cycle). FastQC v0.11.9 (11) and Trim Galore v0.6.6 (12) tools were used to check and trim at a cutoff of  $>30$  for quality Phred score. Genome assembly was performed combining *de novo* and mapping assembly techniques. SPAdes v3.15.0 (13) was used for the *de novo* assembly and the output was used for assembly with MeDuSa v1.6 (14) using 27 *Brucella intermedia* reference genomes available from the NCBI. CheckM v1.40 (15) and QUAST v5.0.2 (16) were used to check assembly quality and contamination. Genomic annotation was made with NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) v5.3 (17–19). Taxonomic identification was

Editor Catherine Putz, Loyola University Chicago

Copyright © 2022 Silva et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Address correspondence to Barbara Alvarenga Peckle, barbara.peckle8@gmail.com, or Andrew Macrae, ama.crae@micro.uff.br.

The authors declare no conflict of interest.

Received 12 November 2021

Accepted 12 March 2022

## ANEXO III: CROMATOGRAMAS

21/01/2020 12:06:46 Page 1 / 2

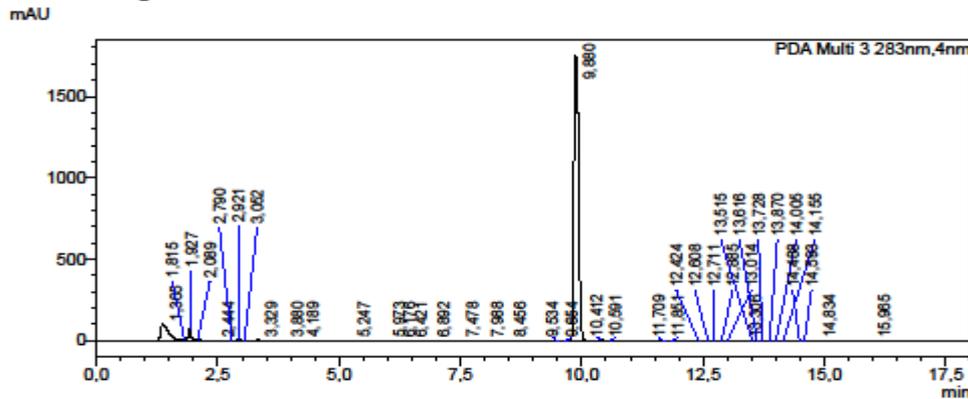

**Analysis Report**

## &lt;Sample Information&gt;

Sample Name : EX2 15 DIAS  
 Sample ID : EX2 15 DIAS  
 Data Filename : EX2 15 DIAS.lcd  
 Method Filename : barbaraex COM TEMP.lcm  
 Batch Filename : BATCH 10.06.19.lcb  
 Vial # : 1-8  
 Injection Volume : 80 uL  
 Date Acquired : 17/01/2020 13:55:17  
 Date Processed : 17/01/2020 14:40:41

Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## &lt;Chromatogram&gt;



## &lt;Peak Table&gt;

PDA Ch3 283nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	1,365	1165910	100682	8,601		S	
2	1,815	24851	6103	0,183		T	
3	1,927	284048	74918	2,095		V	
4	2,089	56913	8322	0,420		V	
5	2,444	3444	809	0,025			
6	2,790	6485	898	0,048			
7	2,921	42005	9594	0,310		V	
8	3,052	4138	787	0,031		V	
9	3,329	23688	4011	0,175		V	
10	3,880	23489	2597	0,173			
11	4,189	17398	1811	0,128		V	
12	5,247	1426	173	0,011		V	
13	5,973	2647	208	0,020		V	
14	6,178	2088	215	0,015		V	
15	6,421	14281	1303	0,105		V	
16	6,892	4619	328	0,034		V	
17	7,478	10981	1009	0,081			
18	7,988	13663	1222	0,101			
19	8,456	1350	206	0,010			
20	9,534	1717	532	0,013			
21	9,654	2004	572	0,015			
22	9,880	11659925	1750035	86,016			

\\HPLCS-MULTI\Users\Public\DAOS\AJ\BARBARA MICRO\17.01.20\EX2 15 DIAS.lcd

Figura 29 A - Perfil cromatográfico do meio mínimo 2,4-D no período de 15 dias inoculado com a estirpe bacteriana *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSMZ 101093. Escala 0-1500 mAU



# Analysis Report

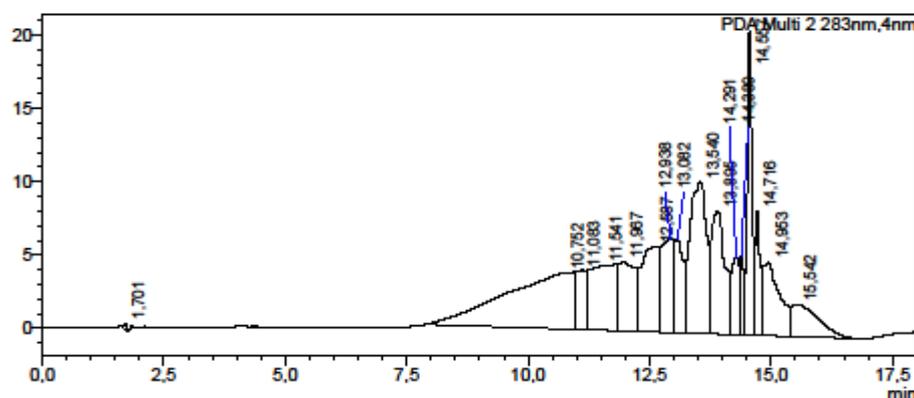
**<Sample Information>**

Sample Name : 1.1 30 DIAS  
 Sample ID : 1.1 30 DIAS  
 Data Filename : 1.1 30 DIAS.lcd  
 Method Filename : barbaraex COM TEMP.lcm  
 Batch Filename : 03.02.20.lcb  
 Vial # : 1-1  
 Injection Volume : 80 uL  
 Date Acquired : 03/02/2020 11:53:33  
 Date Processed : 03/02/2020 12:11:38

Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

**<Chromatogram>**

mAU

**<Peak Table>**

PDA Ch2 283nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	1,701	1117	400	0,058			
2	10,752	371820	3806	19,191			
3	11,083	58817	4015	3,036		V	
4	11,541	166180	4401	8,577		V	
5	11,967	107129	4700	5,529		V	
6	12,587	152506	5775	7,871		V	
7	12,938	110279	6384	5,692		V	
8	13,082	79260	6358	4,091		V	
9	13,540	242655	10309	12,524		V	
10	13,895	163074	8393	8,417		V	
11	14,291	52709	5259	2,720		V	
12	14,389	33379	5361	1,723		V	
13	14,557	137204	20668	7,081		V	
14	14,716	53198	8482	2,746		V	
15	14,953	121591	5017	6,276		V	
16	15,542	86580	2185	4,489		V	
Total		1937499	101512				

\\HPLCS-MULTI\Users\Public\Dados\AJ\BARBARA MICRO\03.02.20\1.1 30 DIAS.lcd

Figura 29 B- Perfil cromatográfico do meio mínimo 2,4-D no período de 30 dias inoculado com a estirpe bacteriana *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSMZ 101093. Escala 0-20 mAU.



# Analysis Report

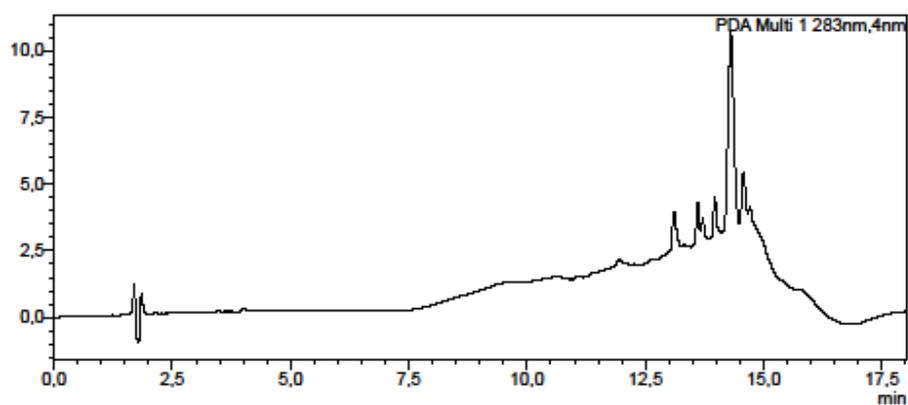
## <Sample Information>

Sample Name : 2.1 30 DIAS  
 Sample ID : 2.1 30 DIAS  
 Data Filename : 2.1 30 DIAS.lcd  
 Method Filename : barbaraex COM TEMP.lcm  
 Batch Filename : 03.02.20.lcb  
 Vial # : 1-3  
 Injection Volume : 80 uL  
 Date Acquired : 03/02/2020 12:30:42  
 Date Processed : 03/02/2020 12:48:44

Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## <Chromatogram>

mAU



## <Peak Table>

PDA Ch1 283nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
Total							

\\HPLCS-MULTI\Users\Public\DADOS\AJ\BARBARA MICRO\03.02.20\2.1 30 DIAS.lcd

Figura 30- Perfil cromatográfico do meio mínimo 2,4-D no período de 30 dias inoculado com a estirpe bacteriana *Ochrobactrum ciceri* (22292). Escala 0-10 mAU.



# Analysis Report

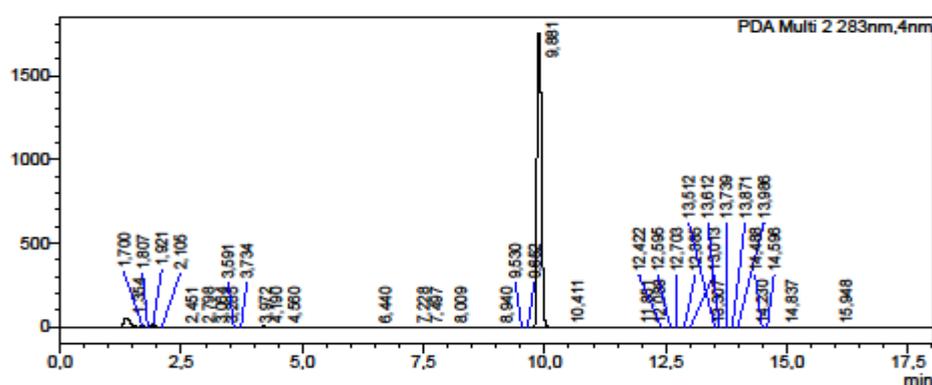
**<Sample Information>**

Sample Name : MGO2 2A 1 15 DIAS  
 Sample ID : MGO2 2A 1 15 DIAS  
 Data Filename : MGO2 2A 1 15 DIAS.lcd  
 Method Filename : barbaraex COM TEMP.lcm  
 Batch Filename : BATCH 10.06.19.lcb  
 Vial # : 1-5  
 Injection Volume : 80 uL  
 Date Acquired : 17/01/2020 13:36:45  
 Date Processed : 17/01/2020 13:54:48

Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

**<Chromatogram>**

mAU

**<Peak Table>**

PDA Ch2 283nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	1,354	480152	55082	3,893			
2	1,700	57149	12930	0,463		V	
3	1,807	7053	2328	0,057			
4	1,921	102720	25011	0,833		V	
5	2,105	15287	2769	0,124		V	
6	2,451	10471	2790	0,085			
7	2,798	4296	756	0,035			
8	3,064	1531	289	0,012			
9	3,285	1685	239	0,014			
10	3,591	1756	235	0,014		V	
11	3,734	1367	236	0,011		V	
12	3,972	7575	797	0,061		V	
13	4,190	27368	4595	0,222		V	
14	4,560	1644	165	0,013		V	
15	6,440	12247	1196	0,099		V	
16	7,228	2796	307	0,023			
17	7,497	15059	1098	0,122		V	
18	8,009	15695	1317	0,127		V	
19	8,940	1221	278	0,010			
20	9,530	1139	334	0,009			
21	9,652	1697	498	0,014			
22	9,881	11391966	1749017	92,359			

\\HPLCS-MULTI\Users\Public\DADOS\AJ\BARBARA MICRO\17.01.20\MGO2 2A 1 15 DIAS.lcd

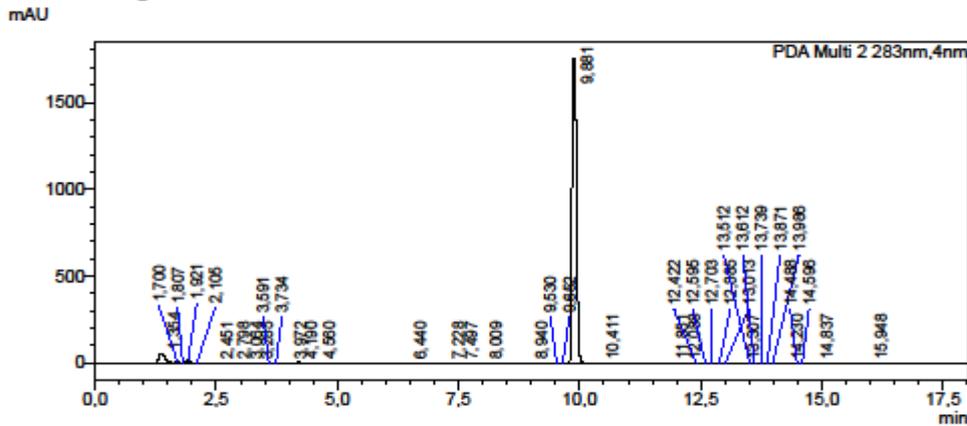
Figura 31 A. Perfil cromatográfico do meio mínimo 2,4-D no período de 15 dias inoculado com a estirpe bacteriana *Enterobacter hormaechei* subsp. *steigerwaltii* MG02 Escala 0-1500 mAU.

**LabSolutions Analysis Report**

**<Sample Information>**

Sample Name : MGO2 2A 1 15 DIAS  
 Sample ID : MGO2 2A 1 15 DIAS  
 Data Filename : MGO2 2A 1 15 DIAS.lcd  
 Method Filename : barbaraex COM TEMP.lcm  
 Batch Filename : BATCH 10.06.19.lcb  
 Vial # : 1-5  
 Injection Volume : 80 uL  
 Date Acquired : 17/01/2020 13:36:45  
 Date Processed : 17/01/2020 13:54:48  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

**<Chromatogram>**



**<Peak Table>**

PDA Ch2 283nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	1.354	480152	55082	3.893			
2	1.700	57149	12930	0.463		V	
3	1.807	7053	2328	0.057			
4	1.921	102720	25011	0.833		V	
5	2.105	15287	2789	0.124		V	
6	2.451	10471	2790	0.085			
7	2.798	4296	756	0.035			
8	3.064	1531	289	0.012			
9	3.285	1685	239	0.014			
10	3.591	1756	235	0.014		V	
11	3.734	1367	236	0.011		V	
12	3.972	7575	797	0.081		V	
13	4.190	27368	4595	0.222		V	
14	4.560	1644	165	0.013		V	
15	6.440	12247	1196	0.099		V	
16	7.228	2796	307	0.023			
17	7.497	15059	1098	0.122		V	
18	8.009	15695	1317	0.127		V	
19	8.940	1221	278	0.010			
20	9.530	1139	334	0.009			
21	9.652	1697	498	0.014			
22	9.881	11391966	1749017	92.359			

\\HPLCS-MULT\Users\Public\DAOS\AJ\BARBARA MICRO\17.01.20\MGO2 2A 1 15 DIAS.lcd

Figura 31 B- Perfil cromatográfico do meio mínimo 2,4-D no período de 30 dias inoculado com a estirpe bacteriana *Enterobacter hormaechei* subsp. *steigerwaltii* MG02 Escala 0-5 mAU.



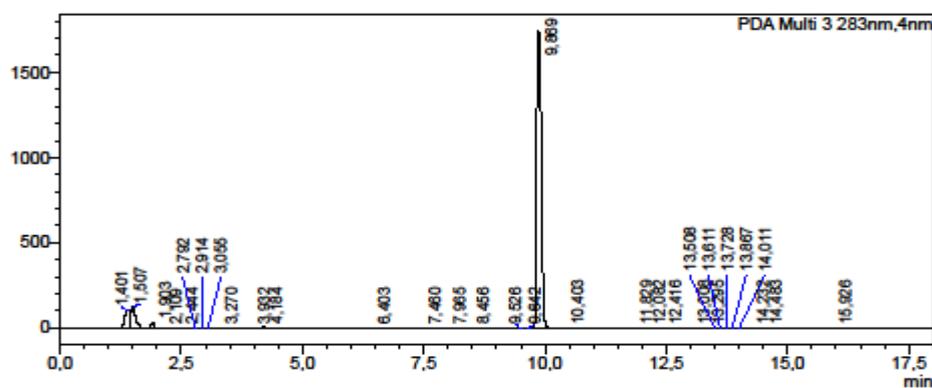
# Analysis Report

**<Sample Information>**

Sample Name : MF13 2C 2 15 DIAS  
 Sample ID : MF13 2C 2 15 DIAS  
 Data Filename : MF13 2C 2 15 DIAS.lcd  
 Method Filename : barbaraex COM TEMP.lcm  
 Batch Filename : BATCH 10.06.19.lcb  
 Vial # : 1-4  
 Injection Volume : 80 uL  
 Date Acquired : 17/01/2020 13:18:12  
 Date Processed : 21/01/2020 11:48:37  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

**<Chromatogram>**

mAU

**<Peak Table>**

PDA Ch3 283nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	1,401	826439	105385	6,062			
2	1,507	803877	123893	5,895		V	
3	1,903	135885	33447	0,997			
4	2,109	8615	1013	0,063		V	
5	2,444	8050	2187	0,059			
6	2,792	2059	462	0,015			
7	2,914	1240	258	0,009		V	
8	3,055	2972	475	0,022		V	
9	3,270	4522	750	0,033		V	
10	3,932	3453	285	0,025		V	
11	4,184	28223	4862	0,207		V	
12	6,403	11271	1191	0,083			
13	7,460	13783	1064	0,101			
14	7,965	15943	1304	0,117		V	
15	8,456	1054	162	0,008			
16	9,526	1370	396	0,010			
17	9,842	1524	459	0,011			
18	9,869	11676119	1742082	85,648		S	
19	10,403	8929	2151	0,065		T	
20	11,829	1386	164	0,010		V	
21	12,082	5120	1303	0,038			
22	12,418	1028	179	0,008			

\\HPLCS-MULTI\Users\Public\DADOS\JA\BARBARA MICRO\17.01.20\MF13 2C 2 15 DIAS.lcd

Figura D- Perfil cromatográfico do meio mínimo 2,4-D no período de 15 dias inoculado com a estirpe bacteriana *Ochrobactrum intermedium* DF13. Escala 0-1500 mAU.



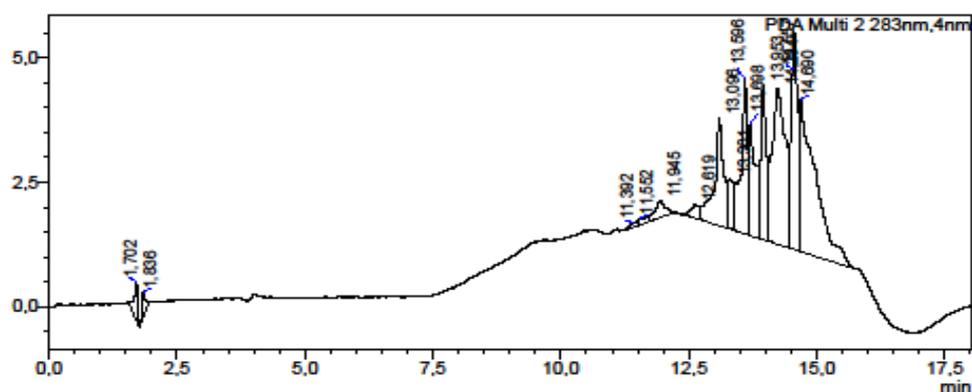
# Analysis Report

## <Sample Information>

Sample Name : 5.2 30 DIAS  
 Sample ID : 5.2 30 DIAS  
 Data Filename : 5.2 30 DIAS.lcd  
 Method Filename : barbaraex COM TEMP.lcm  
 Batch Filename : 03.02.20.lcb  
 Vial # : 1-10  
 Injection Volume : 80 uL  
 Date Acquired : 03/02/2020 14:40:34  
 Date Processed : 03/02/2020 14:58:37  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## <Chromatogram>

mAU



## <Peak Table>

PDA Ch2 283nm							
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	1.702	3313	762	1.172			
2	1.836	2714	535	0.960			
3	11.392	1106	89	0.391			
4	11.552	1473	124	0.521		V	
5	11.945	5030	338	1.779		V	
6	12.619	3210	265	1.135			
7	13.098	27374	2170	9.679		V	
8	13.301	7419	1003	2.623		V	
9	13.596	25640	3123	9.066		V	
10	13.698	21361	2233	7.553		V	
11	13.953	24013	3120	8.491		V	
12	14.234	54102	3130	19.130		V	
13	14.557	38580	4363	13.642		V	
14	14.690	67478	3056	23.859		V	
Total		282814	24312				

\\HPLCS-MULTI\Users\Public\DADOS\AJ\BARBARA MICRO\03.02.20\5.2 30 DIAS.lcd

Figura 32 B- Perfil cromatográfico do meio mínimo 2,4-D no período de 30 dias inoculado com a estirpe bacteriana *Ochrobactrum intermedium* DF13. Escala 0-5 mAU.

## ANEXO IV: TABELAS

Tabela A- Dados do *screening* de resistência ao 2,4-D pela estirpe *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (DSMZ 101093) em meio LB sem (controle) e com 2,4-D (tratamento) na concentração de 0,5g.L<sup>-1</sup>

<b>Tempo/horas</b> <i>E. hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i>	<b>Média de crescimento (D.O)</b> <b>Grupo Controle</b>	<b>Média de crescimento (D.O)</b> <b>Grupo Tratamento</b>
0	0.236	0.2406
2	0.689	0.5686
4	1.096	0.8383
6	1.2523	0.9486
8	1.408	1.1103

\*D.O- Densidade Óptica em 600nm

Tabela B- Dados do *screening* de resistência ao 2,4-D pela *Ochrobactrum ciceri* (DSMZ 22292) em meio LB sem (controle) e com 2,4-D (tratamento) na concentração de 0,5g.L<sup>-1</sup>

<b>Tempo/horas</b> <i>Ochrobactrum ciceri</i>	<b>Média de crescimento (D.O)</b> <b>Grupo Controle</b>	<b>Média de crescimento (D.O)</b> <b>Grupo Tratamento</b>
0	0.160	0.154
2	0.432	0.334
4	0.766	0.587
8	1.054	0.801

\*D.O- Densidade Óptica em 600nm

Tabela C- Dados do *screening* de resistência ao 2,4-D pelo *Bacillus thuringiensis* em meio LB sem (controle) e com 2,4-D (tratamento) na concentração de 0,5g.L<sup>-1</sup>

<b>Tempo/horas</b> <i>Bacillus thuringiensis</i>	<b>Média de crescimento (D.O)</b> <b>Grupo Controle</b>	<b>Média de crescimento (D.O)</b> <b>Grupo Tratamento</b>
0	0.237	0.240
2	0.689	0.568
4	1.096	0.838
6	1.252	0.948
9	1.408	1.087

\*D.O- Densidade Óptica em 600nm

**ANEXO V: MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES**

- **Meio de cultura LB** (SAMBROOK *et al.*, 1989, *apud* DIREITO, 2009)

10 g Triptona

5 g Extrato de Levedura

10 g NaCl

15 g Agar (para meio sólido)

Misturar todos os reagentes até que fique homogêneo. Completar o volume com água destilada para 1000 mL. Ajustar para pH 7,0 com NaOH. Autoclavar por 15 min.

- **Meio mínimo 2,4-D** (FÜSCHSLIN *et al.*, 2003, *apud* DIREITO, 2009)

275 mg NH<sub>4</sub>Cl

75 mg MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

5 mg CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O

35 mg KCl

1,5 mg FeCl<sub>2</sub>

60 µg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

100 µg MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O Fração autoclavável

120 µg CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O

70 µg ZnCl<sub>2</sub>

25 µg NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O

15 µg CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O

25 µg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O

5,2 mg EDTA.Na<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>

500 mg 2,4-D

100 mL Tampão fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,56 M pH 7,5)

0,05 mL Solução estoque de vitaminas

15 g Agar (para meio sólido)

**Modo de preparo do meio de cultura 2,4-D:** Misturar todos os reagentes da fração autoclavável até que fique homogêneo. Completar o volume com água destilada para 900 mL. Para o meio sólido adicionar o agar. Autoclavar por 15 min. Quando a fração autoclavável estiver com aproximadamente 60 °C adicione por filtração (porosidade de 0,22 µm) o tampão fosfato, a solução estoque de vitaminas e o 2,4-D. A solução de vitaminas pode ser diluída no tampão fosfato para a filtração e adição à base mineral do meio. O 2,4-D deve ser diluído em 2 mL de etanol e filtrado em um novo filtro para evitar a precipitação do mesmo. Deve ser realizada a homogenização do meio e sua distribuição.

- **Reagentes do tampão fosfato** ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} / \text{KH}_2\text{PO}_4$  0,56 M pH 7,5)(DIREITO, 2009):

850 mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1 M

150 mL  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 M

*Modo de preparo do tampão fosfato:* Misturar os reagentes até que fique homogêneo. Ajustar o volume para 1000 mL com água destilada.

- **Reagentes da solução estoque de vitaminas** (DIREITO, 2009)

100 mg Piridoxina-HCl

50 mg Tiamina-HCl

50 mg Riboflavina

50 mg Ácido nicotínico

50 mg Ácido D-Ca-pantotênico

50 mg Ácido p-amino benzóico

50 mg Ácido lipóico

50 mg Nicotinamida

50 mg Vitamina B12

20 mg Biotina

20 mg Ácido fólico

Água destilada suficiente para completar o volume para 1000 mL de solução.

*Modo de preparo da solução estoque de vitaminas:* Misturar todos os reagentes até que fique homogêneo. Ajustar o volume para 1000 mL com água destilada. Armazenar sob refrigeração (4 °C).

- **Tampão fosfato de sódio 0,12 M pH 8,0** (modificado de SAMBROOK *et al.*, 1989, *apud* DIREITO, 2009)

22,4 mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 M

1,6 mL  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 M

Misturar os dois reagentes e completar o volume com água destilada para 200 mL. Autoclavar por 15 min.

- **Tampão TBE concentrado 10x** (SAMBROOK *et al.*, 1989, *apud* DIREITO, 2009)

108 g Tris base

55 g Ácido bórico

40 mL EDTA 0,5 M pH 8,0

Dissolver os reagentes em água destilada e completar o volume para 1000 mL.

