

MARIANA VERDAN DE MATTOS NUNES

**ANÁLISE DA BIODEGRADAÇÃO DO HERBICIDA
ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO POR
Ochrobactrum sp.**



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO/2017**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor Andrew Macrae e coorientação de Barbara Alvarenga Peckle.

CIP - Catalogação na Publicação

N972a Nunes, Mariana Verdan de Mattos
Análise da biodegradação do herbicida ácido 2,4
diclorofenoxiacético por *Ochrobactrum* sp. / Mariana
Verdan de Mattos Nunes. -- Rio de Janeiro, 2017.
86 f.

Orientador: Andrew Macrae.
Coorientadora: Barbara Alvarenga Peckle.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2017.

1. herbicidas. 2. agrotóxicos. 3. *Ochrobactrum*.
4. bioprospecção. 5. 2,4-D. I. Macrae, Andrew,
orient. II. Peckle, Barbara Alvarenga, coorient.
III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Mariana Verdan de Mattos Nunes**

DRE: 114008671

BANCA EXAMINADORA: Profa. Ana Maria Mazotto de Almeida (Presidente)
 Dr. José Roberto de Assis Ribeiro
 Ms. Vinicius Ribeiro Flores
 Prof. Mateus Gomes de Godoy (Suplente)

Título da Monografia: **"Análise da biodegradação do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético por *Ochrobactrum* sp."**

Local: **Sala de Reuniões do Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes/CCS/ UFRJ**

Data e hora de início: **06 de dezembro de 2017 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 06 de dezembro de 2017.

NOTA

10,0

10,0

10,0

Banca Examinadora:

Ana Maria Mazotto de Almeida

Profa. Ana Maria Mazotto de Almeida

José Roberto de Assis Ribeiro

Dr. José Roberto de Assis Ribeiro

Vinicius Ribeiro Flores

Ms. Vinicius Ribeiro Flores

Prof. Mateus Gomes de Godoy

Aluno:

Mariana Verdan de Mattos Nunes

Mariana Verdan de Mattos Nunes

Orientador:

Andrew Macrae

Prof. Andrew Macrae

Coorientador:

Barbara Alvarenga Peckle

Barbara Alvarenga Peckle

Coordenador
de TCC

Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Dedico este trabalho aos meus pais, Célio e Marli.

Obrigada por tudo!

Agradecimentos

Ao professor Andrew que me recebeu no laboratório me proporcionando a experiência de trabalhar nessa área.

À minha coorientadora, Bárbara Peckle, que sempre esteve ao meu lado me ajudando, me ensinando e compartilhando essa jornada comigo. Obrigada por estar do meu lado ao longo de todo esse tempo.

Aos meus pais, Célio e Marli, que fizeram e fazem tudo por mim. Muito obrigada por todos os anos de dedicação e amor incondicionais que vocês me deram. Obrigada por sempre me incentivarem e me ajudarem a seguir meus sonhos. Sem vocês eu jamais teria chegado até aqui. Eu nunca serei capaz de agradecer devidamente por tudo. Eu amo vocês e sempre serei grata!

Ao meu irmão, Vinícius, que me ajudou muito durante todos esses anos. Principalmente com as caronas diárias que tornaram esse tempo de graduação muito mais fácil para mim.

À toda minha família: meus avós, tios e primos, que sempre me encorajaram, torceram e oraram por mim e pelos meus sonhos.

Ao meu namorado, Eduardo, por aturar meus estresses e estar sempre ao meu lado quando precisava.

À todos do LBSBM, que se fizeram presentes em todo esse tempo que estive com vocês, compartilhando experiências, risadas e conversas.

Ao técnico do LBSBM, Renato Ferreira, que estava sempre disposto a me ajudar com questões do laboratório mas também sempre esteve disposto como um amigo.

Ao professor Antônio Jorge do IPPN-UFRJ e ao técnico Ari Miranda do LABMASS, por sempre estarem dispostos a me ajudar e sanar minhas dúvidas.

À CAPES, CNPq e PIBIC pelo apoio financeiro.

À Deus, por todas as bênçãos em minha vida.

RESUMO

MARIANA VERDAN DE MATTOS NUNES

ANÁLISE DA BIODEGRADAÇÃO DO HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO POR *Ochrobactrum* sp.

Orientador: Andrew Macrae

O Brasil é o país que mais consome agrotóxicos em todo mundo. Apesar desses insumos químicos ajudarem no aumento de produção agrícola, eles estão associados a danos à saúde humana e ao meio ambiente. O herbicida 2,4-D é amplamente usado no Brasil e devido ao seu potencial tóxico é considerado nível II de toxicidade pela OMS. A biodegradação de agrotóxicos por bactérias tem se mostrado extremamente importante na redução desses compostos no meio ambiente. Microrganismos com esse potencial podem ser empregados em processos de biorremediação para tratar ou imobilizar compostos tóxicos em uma área contaminada. O objetivo deste trabalho foi encontrar uma bactéria capaz de degradar o herbicida 2,4-D a partir da coleção de bactérias do LBSBM. Para isso, as estirpes selecionadas foram incubadas durante 30 dias na presença do 2,4-D como única fonte de carbono. As análises da degradação foram realizadas através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) após os 30 dias de incubação. Através do CLAE foi possível selecionar a estirpe MF13 da coleção, que se destacou na degradação do herbicida. A estirpe MF13 apresentou resultados que sugerem a degradação total do herbicida. Essa estirpe foi identificada através do sequenciamento do 16S rDNA como uma estirpe do gênero *Ochrobactrum*. Um outro experimento foi conduzido para descobrir em qual momento a degradação do herbicida começava e como acontecia a formação dos subprodutos de degradação. Dessa vez, a estirpe MF13 foi inoculada durante 10 dias na presença do 2,4-D como única fonte de carbono. Entretanto, no período de 10 dias de experimento foi possível observar apenas o início da biotransformação do herbicida em subprodutos. Novos testes são necessários para realizar essa análise. Os resultados encontrados sugerem que estirpe *Ochrobactrum* MF13 possui a capacidade de mineralizar o herbicida e tem potencial em ser aplicada na biorremediação de sítios contaminados com a herbicida 2,4D.

Palavras chave: 2,4-D, bioprospecção, *Ochrobactrum*, agrotóxicos, herbicidas

ABSTRACT

MARIANA VERDAN DE MATTOS NUNES

ANALYSIS OF THE BIODEGRADATION OF THE HERBICIDE 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID BY *Ochrobactrum* sp.

Brazil is the leading consumer of pesticides in the world. Although these chemical help increase agricultural production, they are associated with damage to human health and the environment. The herbicide 2,4-D is widely used in Brazil, the WHO classify its toxicity as level II of toxicity. The biodegradation of pesticides by bacteria has been extremely important in reducing these compounds in the environment. Microorganisms with this potential may be used in bioremediation processes to treat or immobilize toxic compounds in a contaminated area. The objective of this study was to find a bacterium that was still capable of degrading the 2,4-D herbicide from LBSBM's collection of bacteria. Selected strains were incubated for 30 days in the presence of 2,4-D as the sole carbon source. Degradation analyzes were performed using High Efficiency Liquid Chromatography (HPLC) after 30 days of incubation. The HPLC results were used to select MF13 strain from the collection, which stood out in the herbicide degradation. MF13 strain presented results suggesting total degradation of the herbicide. The strain was identified by full sequencing of its 16S rDNA as belonging to the genus *Ochrobactrum*. Another experiment was conducted to find out at which point the degradation of the herbicide began and how the degradation products were formed. This time, inoculation was for 10 days in the presence of 2,4-D as the sole carbon source. However, during the 10-day experiment period it was possible to observe only the beginnings of the biotransformation of the herbicide into sub-products. Further experiments of longer duration are required to study the rates and products of transformation. These results suggests that *Ochrobactrum* MF13 strain have the ability to mineralize 2,4-D and the potential to be applied in the bioremediation of contaminated sites.

Key words: 2,4-D, bioprospection, *Ochrobactrum*, pesticides, herbicides

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Quantidade de agrotóxicos comercializada anualmente no Brasil até 2014.	15
Figura 2 – Distribuição da comercialização de agrotóxicos por estado.	15
Figura 3 - Distribuição percentual dos ingredientes ativos de agrotóxicos mais comercializados.	18
Figura 4 – Fórmula estrutural do ácido 2,4-diclorofenoxiacético	19
Figura 5 - Processos envolvidos na dispersão dos agrotóxicos no meio ambiente..	26
Figura 6 – Rota de degradação iniciada pela bactéria <i>Cupriavidus necator</i> JMP134.....	31
Figura 7 – Observação e caracterização morfológica de colônias isoladas com microscópio estereoscópio.	42
Figura 8 – Perfil cromatográfico do controle do herbicida 2,4-D.	44
Figura 9 – Análise da degradação do 2,4-D pela estirpe MF13 utilizando CLAE.....	44
Figura 10 – Sobreposição dos cromatogramas do controle e da degradação do 2,4-D pela estirpe MF13.....	44
Figura 11 – Árvore filogenética da estirpe MF13.	46
Figura 12 – Curva de crescimento da estirpe MF13 num período de 54 horas.	47
Figura 13 – Curva de crescimento da estirpe MF13 num período de 54 horas.	48
Figura 14 - Curva de crescimento da estirpe MF13 em meio 2,4-D..	49
Figura 15 - Perfil cromatográfico do controle de 2,4-D..	49
Figura 16 - Comparação entre os dias 0 e 10 do cromatograma gerado por <i>Ochrobactrum</i> MF13..	50
Figura 17 - Sobreposição dos cromatogramas gerados no dia 0 e 10 por <i>Ochrobactrum</i> MF13.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação de agrotóxicos pelo grau de toxicidade.	17
Tabela 2 – Classificação dos agrotóxicos de acordo com sua classe química	18
Tabela 3 - Sintomas dos efeitos da intoxicação aguda e crônica em seres humanos.	21
Tabela 4 – Gêneros de microrganismos do solo com espécies capazes de degradar agrotóxicos.....	29
Tabela 5 – Revisão das espécies do gênero <i>Ochrobactrum</i>	34
Tabela 6 – Programa de amplificação utilizado na reação de PCR.....	39
Tabela 7 – Avaliação do crescimento das estirpes em meio 2,4-D após 30 dias de incubação.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 2,4,5-T – ácido triclorofenoxiacético
- 2,4-D – ácido 2,4-diclorofenoxiacético
- 2,4-DCF – 2,4-diclorofenol
- 3CB – 3-clorobenzoato
- ABRASCO – Associação Brasileira de Saúde Coletiva
- AIA – Ácido indolacético
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- DL₅₀ – dose letal média
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- LB – Luria-Bertani
- LNH – Linfoma não-Hodgkin
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- PGPR – Rizobactérias promotoras do crescimento em plantas
- ROS – Espécies reativas de oxigênio
- SNC – Sistema nervoso central
- UEZO – Universidade Estadual da Zona Oeste
- UFC – Unidades formadoras de colônias
- UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro
- US-EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
- IARC – Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- LBSBM – Laboratório de Biotecnologia Sustentável e Bioninformática Microbiana
- DDT – Diclorodifeniltricloroetano

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Histórico.....	14
1.2. Agrotóxicos.....	16
1.2.1. O herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético	19
1.2.1.1. Efeitos do 2,4-D na saúde humana.....	20
1.3. Disseminação de agrotóxicos e contaminação do meio ambiente	23
1.4. Microrganismos do solo e seu potencial na biodegradação de agrotóxicos	27
1.4.1. Rotas de Degradação do 2,4-D	29
1.4.2. O gênero <i>Ochrobactrum</i>	32
2. JUSTIFICATIVA.....	35
2. OBJETIVOS	35
2.1. Objetivo Geral.....	35
2.2. Objetivos específicos	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. Manutenção dos microrganismos e caracterização morfo-tintorial.....	36
3.2. Seleção da estirpe promissora para a degradação de 2,4-D	37
3.2.1. Incubação em meio 2,4-D para seleção.....	37
3.2.2. Análise quantitativa da biodegradação do 2,4-D por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	38
3.3. Identificação da estirpe MF13 pelo sequenciamento da região 16S rDNA.....	38
3.3.1. Extração de DNA	38
3.3.2. Amplificação por PCR da região 16S rDNA.....	38
3.3.3. Eletroforese em gel de agarose.....	39
3.3.4. Sequenciamento da região 16S do rDNA.....	39
3.3.5. Análise filogenética do gene amplificado	40
3.4. Curva de crescimento da estirpe MF13	40
3.5. Análise da geração de subprodutos de degradação do 2,4-D por CLAE.....	40
4. RESULTADOS.....	41
4.1. Manutenção dos microrganismos e caracterização morfo-tintorial.....	41
4.2. Seleção das estirpes promissoras para a degradação do 2,4-D	42
4.2.1. Incubação em meio 2,4-D para seleção.....	42
4.2.2. Análise quantitativa da biodegradação do 2,4-D por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	43
4.3. Identificação da bactéria selecionada.....	45
4.3.1. Análise filogenética da estirpe MF13	45

4.4. Curva de crescimento de <i>Ochrobactrum</i> sp.....	47
4.5. Análise da geração de subprodutos de degradação do 2,4-D por CLAE.....	48
5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÃO	56
7. REFERÊNCIAS.....	57

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

A síntese química de agentes tóxicos foi amplamente desenvolvida nas primeiras décadas do século XX, especialmente no período entre as duas guerras mundiais, com o objetivo de produzir armas químicas (OPAS/OMS, 1996). Com o fim da Segunda Guerra Mundial, a maioria das indústrias bélicas buscou dar outra aplicação aos seus produtos. Seus novos alvos foram as pragas da agricultura, da pecuária e de vetores que transmitiam doenças endêmicas e desde então seu uso foi enormemente expandido (OPAS/OMS, 1996; Carneiro *et al.*, 2015). No Brasil, foram utilizados primeiramente no combate a vetores de doenças e parasitas como uma arma aliada à saúde pública (OPAS/OMS, 1996). A partir da década de 1960 esses compostos começaram a ser intensivamente utilizados na agricultura e em 1975 passaram a ter seu uso disseminado nas lavouras brasileiras devido ao estímulo que o Plano Nacional de Desenvolvimento dava aos agricultores para comprar agrotóxicos através do Crédito Rural, uma vez que para cada financiamento requerido era exigido uma cota de agrotóxicos a ser comprado (OPAS/OMS, 1996). Essa obrigatoriedade do uso de agrotóxicos associada às propagandas dos fabricantes, tornou o uso desses produtos extremamente difundido pelo país e mundialmente (OPAS/OMS, 1996).

O Brasil é um país de suma importância para a produção agrícola, principalmente na exportação de grãos e frutas. O uso de agrotóxicos foi um dos meios que os produtores encontraram de aumentarem a produção e qualidade de seus produtos (Benevides e Marinho, 2015). Entretanto, alguns autores sugerem que a exposição aos agrotóxicos está correlacionada com diversos perigos à saúde humana e diversos outros seres vivos (Benevides e Marinho, 2015; Kim, Kabir e Jahan, 2017). Essas substâncias são fabricadas para serem tóxicas e mesmo o alvo sendo um determinado grupo de organismos, muitas vezes a toxicidade desses produtos não é restrita às espécies-alvo, podendo atingir diversos outros organismos, incluindo os seres humanos (Benevides e Marinho, 2015; Kim, Kabir e Jahan, 2017). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), desde 2008 o Brasil mantém a liderança mundial como maior consumidor de agrotóxicos (Santos e Oliveira, 2015; MMA, 2017). Existem aproximadamente 15 mil formulações para 400 agrotóxicos diferentes, sendo que cerca de 8 mil estão licenciadas no país (Santos e Oliveira, 2015). De acordo com a ANVISA (2017), em 14 anos o uso de agrotóxicos aumentou mais que o dobro no país (Figura 1). Os agrotóxicos mais utilizados no Brasil são os herbicidas, com 62,6% do total de vendas, seguidos dos

inseticidas, com 12,6%, e dos fungicidas, com 7,8% (IBGE, 2015). O mapa demonstrando a comercialização de agrotóxicos nos estados brasileiros pode ser encontrado na Figura 2.

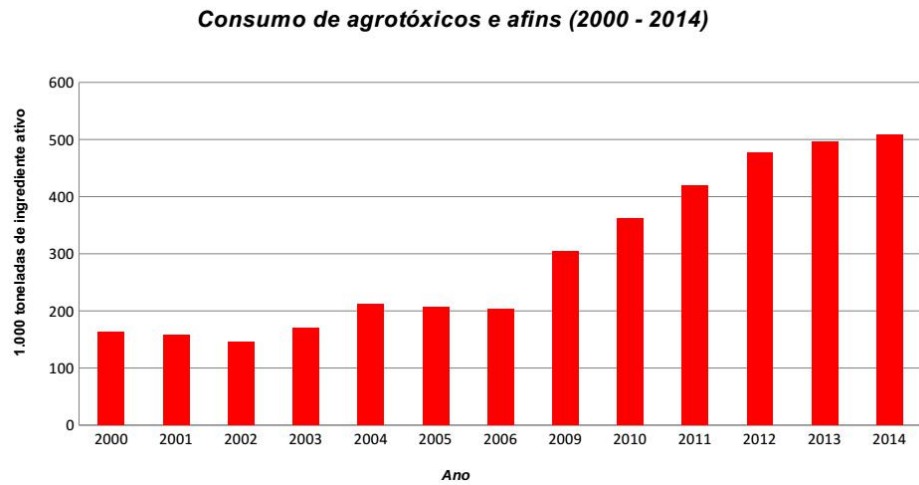


Figura 1 – Quantidade de agrotóxicos comercializada anualmente no Brasil até 2014 (ANVISA, 2017).

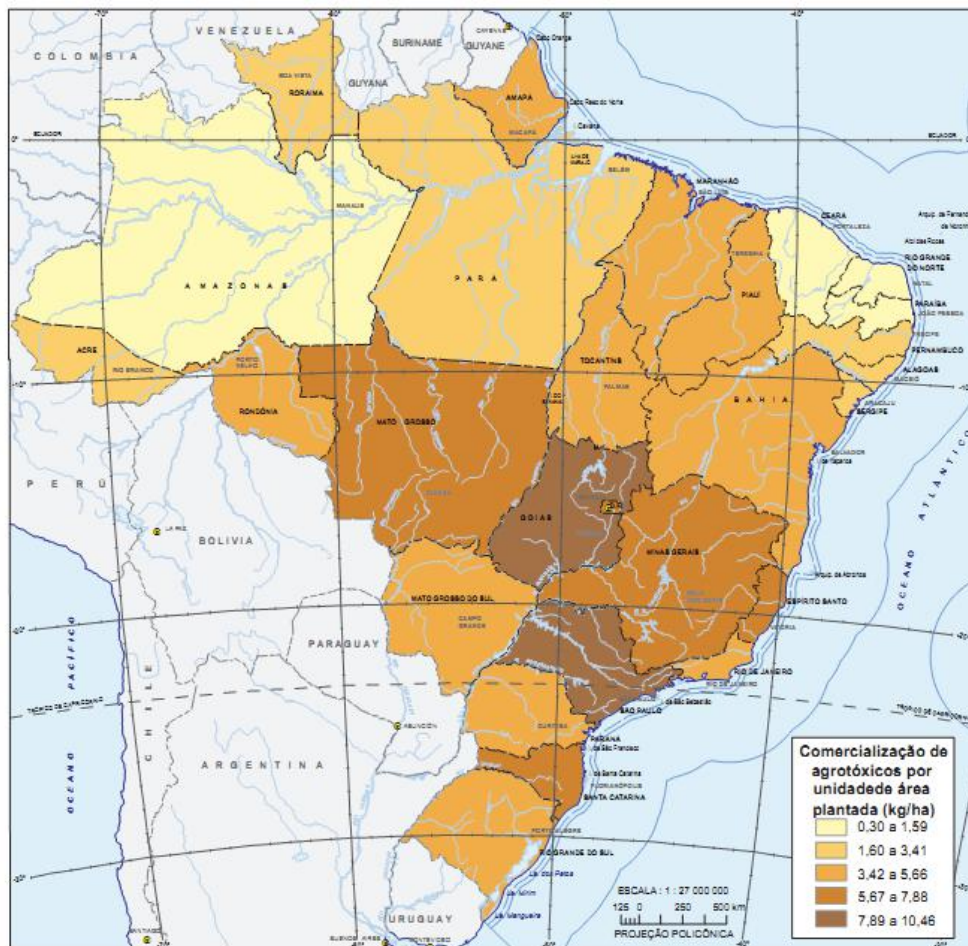


Figura 2 – Distribuição da comercialização de agrotóxicos por estado (IBGE, 2015).

Para atender à crescente demanda de alimento, por consequência do aumento populacional, há um maior uso de fertilizantes sintéticos e agrotóxicos (Santos e Oliveira, 2015). Esse uso maciço de agrotóxicos vem trazendo há várias décadas benefícios em termos de aumento de produção de alimentos e ao mesmo tempo incalculáveis prejuízos aos seres humanos e ao meio ambiente (Santos e Oliveira, 2015).

1.2. Agrotóxicos

Os agrotóxicos têm vários nomes e também são conhecidos como: pesticidas, defensivos agrícolas, praguicidas, remédio, veneno e biocidas (Peres e Moreira, 2003) e são definidos no artigo 2, inciso I da Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989 como:

“Agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos”

No Brasil, o termo agrotóxico passou a ser utilizado ao invés de defensivo agrícola para colocar em evidência a toxicidade desses produtos para a saúde humana e meio ambiente (OPAS/OMS, 1996; Peres e Moreira, 2003). Nesta monografia também será utilizado este termo para se referir a este grupo de substâncias. Existem diversos critérios para classificação de agrotóxicos, como por exemplo: classe química, modo de ação e toxicidade (Garcia *et al.*, 2012). A avaliação e classificação do potencial de periculosidade ambiental de um agrotóxico é feito pelo Ministério do Meio Ambiente e é baseada em estudos físico-químicos, toxicológicos e ecotoxicológicos (Ribas e Matsumura, 2009). Os agrotóxicos são classificados quanto a periculosidade ambiental em classes de I a IV: classe I, produtos altamente perigosos ao meio ambiente; classe II, produtos muito perigosos ao meio ambiente; classe III, produtos perigosos ao meio ambiente e classe IV, produtos pouco perigosos ao meio ambiente (Peres e Moreira, 2003; Ribas e Matsumura, 2009). Os agrotóxicos também podem ser classificados em classes de acordo com os perigos que eles representam à saúde dos seres humanos, essa classificação é feita de acordo com testes que estabelecem a DL₅₀, que é quantidade necessária de determinada substância para matar 50% dos animais testados (OMS, 2010; Garcia *et al.*, 2012). A classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de agrotóxicos em função dos efeitos à saúde humana está sumarizada na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação de agrotóxicos pelo grau de toxicidade (Retirado de: OMS, 2010).

Classe		DL ₅₀ ^a para ratos (mg/kg peso corpóreo)	
		Oral	Dermal
Ia	Extremamente perigoso	< 5	< 50
Ib	Altamente perigoso	5-50	50-200
II	Moderadamente perigoso	50-2000	200-2000
III	Levemente perigoso	> 2000	> 2000
U	Improvável de apresentar perigo agudo	> 5000	

^aDL₅₀ – Dose da substância necessária para matar 50% da população de animais testada.

De acordo com sua estrutura química, os agrotóxicos são classificados em diferentes famílias, que vão de compostos organoclorados e organofosforados a compostos inorgânicos (Garcia *et al.*, 2012), essa classificação pode ser vista em detalhes na Tabela 2. Os agrotóxicos também podem ser classificados pelo tipo de espécie alvo, assim temos diversas nomeações para agrotóxicos de acordo com sua finalidade de uso: inseticidas, agem em insetos; fungicidas, em fungos; herbicidas, em plantas invasoras (plantas daninhas); desfolhantes, em folhas indesejadas; rodenticidas e raticidas, em roedores e ratos; nematicidas, em nematoides e acaricidas, em ácaros (Braibante e Zappe, 2012). Como já citado anteriormente, os herbicidas são a classe de agrotóxicos mais utilizadas atualmente no Brasil, dentre eles, pode-se destacar o uso do Glifosato, o mais utilizado (IBGE, 2015). O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é o segundo herbicida mais utilizado no Brasil com uma porcentagem de uso de 11,4% (Figura 3) (IBGE, 2015) e o sétimo herbicida mais utilizado no mundo (Abigail *et al.*, 2017). Devido suas propriedades tóxicas, o 2,4-D é o alvo de estudo desta monografia.

Tabela 2 – Classificação dos agrotóxicos de acordo com sua classe química (Informações retiradas de: Castro, 1999; Santos, Areas e Reyes, 2007; Braibante e Zappe, 2012; Garcia *et al.*, 2012 e Peckle, 2015).

Classe	Estrutura Química	Características	Principais Usos
Organoclorados	Compostos que possuem um ou mais anéis aromáticos ou cíclicos saturados ligados a, no mínimo, um átomo de Cloro	É insolúvel em água, porém possui solubilidade em líquidos apolares, o que favorece seu acúmulo em tecido adiposo; é persistente no ambiente devido ao seu baixo nível de degradação	Na erradicação de vetores de doenças como malária e dengue
Organofosforados	Ésteres derivados do ácido fosfórico	São mais tóxicos que os organoclorados, entretanto persistem menos no ambiente; inibem a enzima acetilcolinesterase (AChE) levando ao acúmulo de acetilcolina nas terminações nervosas	Utilizados como acaricidas e inseticidas
Carbamatos	Ésteres derivados do ácido carbâmico	São compostos sintéticos pouco persistentes no meio ambiente; tem ação semelhante com a dos organofosforados, pois também inibem a AchE	Utilizados como inseticidas, herbicidas, fungicidas e nematicidas
Piretróides	Derivados das piretrinas, ésteres provenientes das flores de <i>Chrysanthemum cinerariifolium</i> e espécies relacionadas	São pouco polares; não acumulam em tecido animal e tem fácil degradação; possuem baixo impacto ambiental	Utilizados como inseticidas

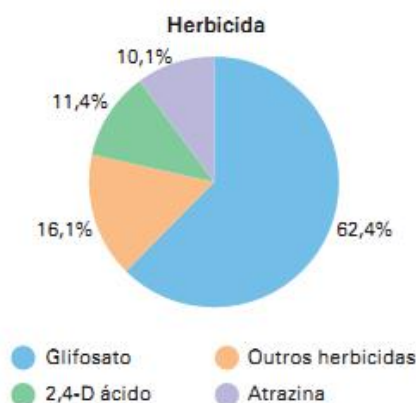


Figura 3 - Distribuição percentual dos ingredientes ativos de agrotóxicos mais comercializados (IBGE, 2015).

1.2.1. O herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético é um herbicida seletivo, está registrado para o uso desde a década de 1940 e foi o primeiro herbicida seletivo bem-sucedido, rapidamente se transformando no herbicida mais extensamente utilizado no mundo (Amarante Júnior *et al.*, 2002; Burns e Swaen, 2012). Este composto foi utilizado durante a Guerra do Vietnã, na forma de agente laranja junto ao herbicida 2,4,5-T (ácido triclorofenoxiacético) e o pentaclorofenol, que era utilizado pelas tropas americanas como desfolhante das florestas vietnamitas devido à sua propriedade fitotóxica (Amarante Júnior *et al.*, 2002).

O 2,4-D é usado para o controle de plantas daninhas, agindo em dicotiledônias em culturas como a de milho, trigo, arroz e outros tipos de cultivo de cereais (Burns e Swaen, 2012; Song, 2014; Abigail *et al.*, 2017). O custo relativamente baixo desse herbicida para os fazendeiros levou ao seu uso contínuo em plantações e o 2,4-D se tornou um dos herbicidas mais utilizados no mundo (Song, 2014). O ácido 2,4-diclorofenoxiacético pertence ao grupo químico dos compostos organoclorados, que são potencialmente tóxicos aos seres humanos (Boivin *et al.*, 2005). Em relação às suas características, o 2,4-D tem fórmula molecular $C_8H_6Cl_2O_3$ (Massa Molar = 221 g/mol) (Figura 4) e é um ácido orgânico com pKa 2,6 (Vieira *et al.*, 1999; Peckle, 2015). Comercialmente, o 2,4-D pode ser encontrado na forma de sais, amina e éster e é usado na pré e pós-emergência de plantas daninhas (Rodrigues e Serra, 1996; Amarante Júnior *et al.*, 2003a; Ferreira, 2012). Nessas formas o composto é solúvel em água e pode ser pulverizado de forma mais fácil para sua aplicação nas plantações (Ferreira, 2012).

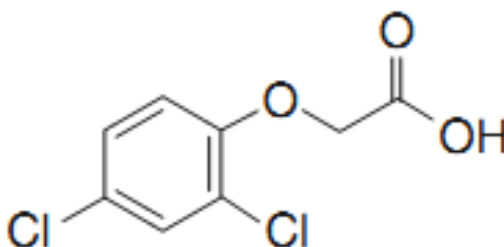


Figura 4 – Fórmula estrutural do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (Redéi, 2008)

O 2,4-D é um herbicida auxinico, isto é, ele mimetiza a ação dos hormônios naturais das plantas (Grossman, 2010; Abigail *et al.*, 2017). Auxinas naturais são fitohormônios importantes, o principal deles o ácido indolacético (AIA) (Grossman, 2010). A auxina foi um dos primeiros hormônios de plantas a serem descobertos, a mais de 70 anos atrás (Song, 2014). Esses hormônios tem papéis importantíssimos no crescimento da planta e o desenvolvimento

da embriogênese, incluindo a formação das estruturas de reprodução, crescimento dos gametófitos até a regulação da senescência da planta (Song, 2014). Os sintomas gerados pelos herbicidas auxínicos e as auxinas são semelhantes: em doses baixas promovem o crescimento da planta e em doses altas levam ao crescimento descontrolado, entretanto, auxinas naturais são rapidamente inativadas por degradação e conjugação, enquanto o 2,4-D é retido por um período longo e por consequência, tem ação de herbicida (Ljung *et al.*, 2002; Song, 2014). O 2,4-D mimetiza a auxina a níveis moleculares, por isso, em doses baixas esse herbicida é capaz de substituir o AIA como um hormônio de crescimento de células em culturas de tecido vegetal (Song, 2014).

Quando aplicado em doses efetivas em dicotiledôneas, o herbicida 2,4-D é absorvido pelas raízes, caule e folhas e é transportado para o meristema da planta (Munro *et al.*, 1992; Song, 2014). De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (Munro *et al.*, 1992, Song, 2014), o 2,4-D mata as plantas de três maneiras, principalmente: alterando a plasticidade das paredes celulares, influenciando a quantidade de produção de proteína e aumentando a produção de etileno. Até plantas resistentes ao 2,4-D podem sofrer alguns danos se o herbicida for aplicado durante alguma fase de rápida divisão celular ou durante fases de crescimento (Song, 2014). A aplicação de herbicidas auxínicos interferem com os processos fisiológicos da planta em três estágios: primeiro, acontece a estimulação do crescimento anormal e iniciação da expressão gênica com características como enrolamento do caule, inchaço do tecido e regulação positiva de genes que vão levar ao aumento da produção de etileno; em segundo, há a inibição do crescimento normal e das respostas fisiológicas como fechamento dos estômatos e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o processo termina com a senescência e morte celular, incluindo a ruptura dos cloroplastos e necrose dos tecidos (Grossman, 2010; Song, 2014). O 2,4-D também pode levar a formação de ROS no organismo humano, uma vez que ele é capaz de formar radicais livres (Abigail *et al.*, 2017). A formação de ROS leva ao estresse oxidativo, o que pode causar danos celulares e levar à injúria de diversos órgãos (Abigail *et al.*, 2017). Segundo a OMS (2010), o 2,4-D possui classificação toxicológica classe II, ou seja, é considerado moderadamente perigoso à saúde humana devido aos danos que ele pode causar em nosso organismo.

1.2.1.1. Efeitos do 2,4-D na saúde humana

É esperado que aconteça a exposição aos agrotóxicos em pessoas que trabalham em sua produção e que realizam sua aplicação, mas em geral, a população também pode ser exposta através da deriva, contaminação de água e alimentos e através da concentração biológica de

agrotóxicos através da cadeia alimentar (biomagnificação) (Blair *et al.*, 2014). Por isso, agrotóxicos persistentes e seus produtos de degradação podem ser encontrados em tecidos biológicos de grande parte da população mundial devido a essas diversas vias de exposição (Blair *et al.*, 2014). Os agrotóxicos podem entrar no organismo humano por quatro vias: dérmica, oral, ocular e respiratória, e a toxicidade do composto pode variar dependendo do tipo de exposição, a concentração e a via de entrada no organismo (Kim, Kabir e Jahan, 2017). Os sintomas de exposição aos agrotóxicos podem ser classificados em efeitos agudos, subagudos e crônicos (OPAS/OMS, 1996). Os efeitos agudos são aqueles que acontecem logo após a exposição excessiva à substância tóxica; os efeitos subagudos ocorrem por exposição moderada ou pequena aos produtos e os efeitos crônicos são aqueles que se desenvolvem ao longo de um período de exposição aos agrotóxicos (OPAS/OMS, 1996; Peres e Moreira, 2003). Na Tabela 3 estão resumidos os sintomas da intoxicação aguda e crônica em seres humanos de acordo com o tipo de agrotóxico.

Entre as dificuldades que se encontram para estabelecer a relação entre uma doença e o efeito de exposição aos agrotóxicos é que a maioria dos modelos de avaliação de risco servem apenas para analisar a exposição a um único princípio ativo ou uma única formulação (Olgun *et al.*, 2004; Das, Shaik e Jamil, 2007; Carneiro *et al.*, 2015). Entretanto, o que realmente acontece é a exposição da população a diversos princípios ativos ao mesmo tempo, os efeitos sinérgicos que podem existir entre eles são desconhecidos (Olgun *et al.*, 2004; Das, Shaik e Jamil, 2007; Graillot *et al.*, 2012; Carneiro *et al.*, 2015). Além dessa exposição múltipla, também não são levados em consideração que as diferentes vias de penetração do agrotóxico no organismo podem alterar sua toxicocinética, tornando-o mais nocivo (Graillot *et al.*, 2012; Carneiro *et al.*, 2015). Outro ponto importante a se realçar é que os seres humanos não se comportam de forma igual aos mesmos estímulos e situações (Carneiro *et al.*, 2015). Estes fatores deveriam ser, mas não são, levados em consideração quando se fala sobre a toxicidade de um agrotóxico (Carneiro *et al.*, 2015). Por esses motivos, há a dificuldade da associação do efeito dos agrotóxicos a muitas doenças, sendo difícil saber a real extensão de danos à saúde que eles podem causar e seu custo ao sociedade e meio ambiente.

Tabela 3 - Sintomas dos efeitos da intoxicação aguda e crônica em seres humanos. (Retirado de: OPAS/OMS, 1996 *apud* Carneiro *et al.*, 2015).

Classe	Grupo Químico	Sintomas de Intoxicação Aguda	Sintomas de Intoxicação Crônica
--------	---------------	-------------------------------	---------------------------------

Inseticidas	Organofosforados e carbamatos	Fraqueza, cólicas abdominais, vômitos, espasmos musculares e convulsões	Efeitos neurotóxicos retardados, alterações cromossomiais e dermatites de contato
	Organoclorados	Náuseas, vômitos, contrações musculares involuntárias	Lesões hepáticas, arritmias cardíacas, lesões renais e neuropatias periféricas
	Piretróides sintéticos	Irritações conjuntivas, espirros, excitação, convulsões	Alergia, asma brônquica, irritações na mucosas, hipersensibilidade
Fungicidas	Ditiocarbamatos	Tonteiras, vômitos, tremores musculares, dor de cabeça	Alergias respiratórias, dermatites, doença de Parkinson, cânceres
	Fentalamidas	-	Teratogênese
Herbicidas	Dinitroferóis e pentaclorofenol	Dificuldade respiratória, hipertermia, convulsões	Cânceres (PCP- formação de dioxinas), cloracnes
	Fenóxiacéticos	Perda de apetite, enjoo, vômitos, fasciculação muscular	Indução da produção de enzimas hepáticas, cânceres, teratogênese
	Dipiridilos	Sangramento nasal, fraqueza, desmaios, conjuntivites	Lesões hepáticas, dermatites de contato, fibrose pulmonar

Em relação ao herbicida 2,4-D, a toxicidade depende da sua forma química. As formas de ácido e sais de 2,4-D são muito tóxicas pela via ocular, podendo causar irritação grave nos olhos (Jervais *et al.*, 2008a). Este herbicida é reconhecido por provocar danos ao fígado e rins, podendo levar à falência renal, provocar danos ao coração e ataca o sistema nervoso central, podendo levar a quadros convulsivos (Amarante Júnior *et al.*, 2002). A contaminação via oral pode levar a pessoa a apresentar diarreia, vômito, dor de cabeça, confusão mental e até agressividade (Robert e Reigart, 2013). Pessoas que inalam vapores de 2,4-D podem apresentar tosse, tontura e sensação de queimação nas vias aéreas (Robert e Reigart, 2013). Altas doses de 2,4-D podem provocar fraqueza, mal-estar, miose, vômitos, dificuldades respiratórias, bradicardia, hipotensão arterial, hipertermia, sudoreses, oligúria, enfraquecimento muscular, paralisia intercostal, dores musculares e condições diabéticas (hiperglicemia e glicosúria transitória) (ANVISA, 2001 *apud* Amarante Júnior *et al.*, 2002). Efeitos neurotóxicos também são passíveis de acontecer após a contaminação, podendo ocorrer mudança no estado mental

com progressão para o coma em vários casos (Robert e Reigart, 2013). O 2,4-D também pode causar danos aos músculos esqueléticos (Jervais *et al.*, 2008a), fraqueza muscular e neuropatia periférica foram descritas após exposição ocupacional ao herbicida (Robert e Reigart, 2013). Miotonia e fraqueza muscular podem permanecer por meses após a contaminação (Robert e Reigart, 2013), há registros de persistência de efeitos neuromusculares em alguns casos (Bradberry, Proudfoot e Vale, 2004).

Existe uma discussão em torno da possibilidade do 2,4-D ser carcinogênico ou não, alguns trabalhos já descreveram associações entre a exposição ao 2,4-D e o desenvolvimento de linfoma não-Hodgkin (LNH) (Garabant e Philbert, 2002), enquanto outros afirmam que não há nenhuma evidência indicando a relação entre esse agrotóxico e esse tipo de câncer (Goodman, Loftus e Zu, 2017). Também há indícios que a exposição ao 2,4-D juntamente com o 2,4,5-T possa estar relacionado a alguns casos de câncer, entretanto essa relação ainda não foi comprovada (Jervais *et al.*, 2008b). Devido à falta de informações sólidas em relação ao potencial carcinogênico desse composto, a Agência Internacional de Pesquisa com Câncer (IARC) liberou um relatório em 2015 e classificou o 2,4-D como Grupo 2B, possivelmente carcinogênico à seres humanos. Essa classificação é devido à falta de evidências consistentes associando a exposição ao 2,4-D e o desenvolvimento de LNH e outras formas de câncer (IARC, 2015). Devido a esse potencial de causar danos à saúde humana, é importante estudar formas de reduzir os níveis de agrotóxicos, como o 2,4-D, no meio ambiente a fim de evitar danos aos seres humanos e à natureza, para isso é necessário saber como esses compostos interagem e como se dá sua dispersão no meio ambiente.

1.3. Disseminação de agrotóxicos e contaminação do meio ambiente

A contaminação do meio ambiente causada pelo uso crescente e indiscriminado de agrotóxicos tem gerado uma série de preocupações em relação a forma como esses compostos se comportam no ambiente (Campos e Vieira, 2002; Zasso *et al.*, 2014). A contaminação ambiental é definida por Campos-Takaki, Okada e Nascimento (2008) como “a condição onde determinadas substâncias estão presentes em concentrações que afetam a qualidade e composição do meio ambiente, prejudicando diferentes ecossistemas”. Os agrotóxicos se disseminam no meio ambiente chegando aos ecossistemas terrestres e aquáticos, afetando-os e levando a diversas implicações, que dependem das suas características de degradação, capacidade de permanência e toxicidade (Theophilo *et al.*, 2014). Segundo Dellamatrice e

Monteiro (2014) a contaminação do ambiente também pode estar relacionada com a forma de aplicação. Diversos produtos que são muito tóxicos e tem o seu registro para um tipo específico de uso, são aplicados em culturas onde seu uso não é recomendado e muitas vezes são aplicados em quantidades maiores do que as recomendadas pelos órgãos de vigilância, como MMA e ANVISA (Dellamatrice e Monteiro, 2014). Estudos ecotoxicológicos desses compostos no meio ambiente revelam que sua aplicação em doses acima do recomendado podem trazer efeitos mais sérios que não estavam previstos quando o produto foi liberado para o uso (Dellamatrice e Monteiro, 2014).

Existem diversos fatores que levam estas substâncias a se espalhar pelo meio ambiente tais como a ação dos ventos, a lixiviação e a erosão, que juntas contribuem para a dispersão de agrotóxicos pelo ar, pelos solos e lençóis freáticos (Santos e Oliveira, 2015). Uma vez que os agrotóxicos chegam ao solo, os resíduos desses agentes também podem ser liberados para atmosfera através da volatilização, ajudando a propagar essas substâncias para áreas não-alvo e atingir diversos organismos vivos, incluindo os seres humanos (Figura 5) (Vieira *et al.*, 1999). A remoção das matas ciliares e o gerenciamento incorreto do solo e culturas, contribuem para o transporte de agrotóxicos do solo para corpos de água como consequência do escoamento superficial gerado pela ação da chuva ou irrigação da cultura nesses locais (Lourençato, 2010; Dellamatrice e Monteiro, 2014). A forma que os agrotóxicos se comportam no solo pode ser influenciada por vários fatores como: adsorção, movimento e decomposição (Vieira *et al.*, 1999). A adsorção é a interação dos agrotóxicos da fase líquida com a superfície das partículas da fase sólida do solo (Vieira *et al.*, 1999). O movimento dos agrotóxicos no solo pode ocorrer através da lixiviação, escoamento superficial e volatilização (Vieira *et al.*, 1999). Já os processos de decomposição são muito importantes na redução dos níveis de muitos agrotóxicos no solo, a diminuição desses compostos pode se dar pela biodegradação e por vários processos e reações químicas, incluindo o processo de fotodecomposição (Vieira *et al.*, 1999).

Em relação a dispersão do 2,4-D no meio ambiente, assim como a maioria dos agrotóxicos, a interação desse herbicida com o solo varia de acordo com o tipo de solo envolvido, sua microbiota, a forma química que se encontra o herbicida e a adsorção do 2,4-D. O ácido 2,4-diclorofenoxiacético apresenta boa solubilidade em água e solventes orgânicos, favorecendo sua dissolução e contaminação de ambientes aquáticos através da lixiviação (Amarante Júnior *et al.*, 2002).

A presença de agrotóxicos no solo, assim como diversas outras substâncias tóxicas, podem levar a diversas alterações biogeoquímicas (Campos-Takaki, Okada e Nascimento, 2008). Devido a essa contaminação podem ser observadas alterações do metabolismo dos

microrganismos assim como das plantas, reduzindo as produções agrícolas (Campos-Takaki, Okada e Nascimento, 2008). Porém, muitos microrganismos de lugares impactados podem se adaptar à presença desses contaminantes, conseguindo fazer a biodegradação dos mesmos, como os microrganismos do solo.

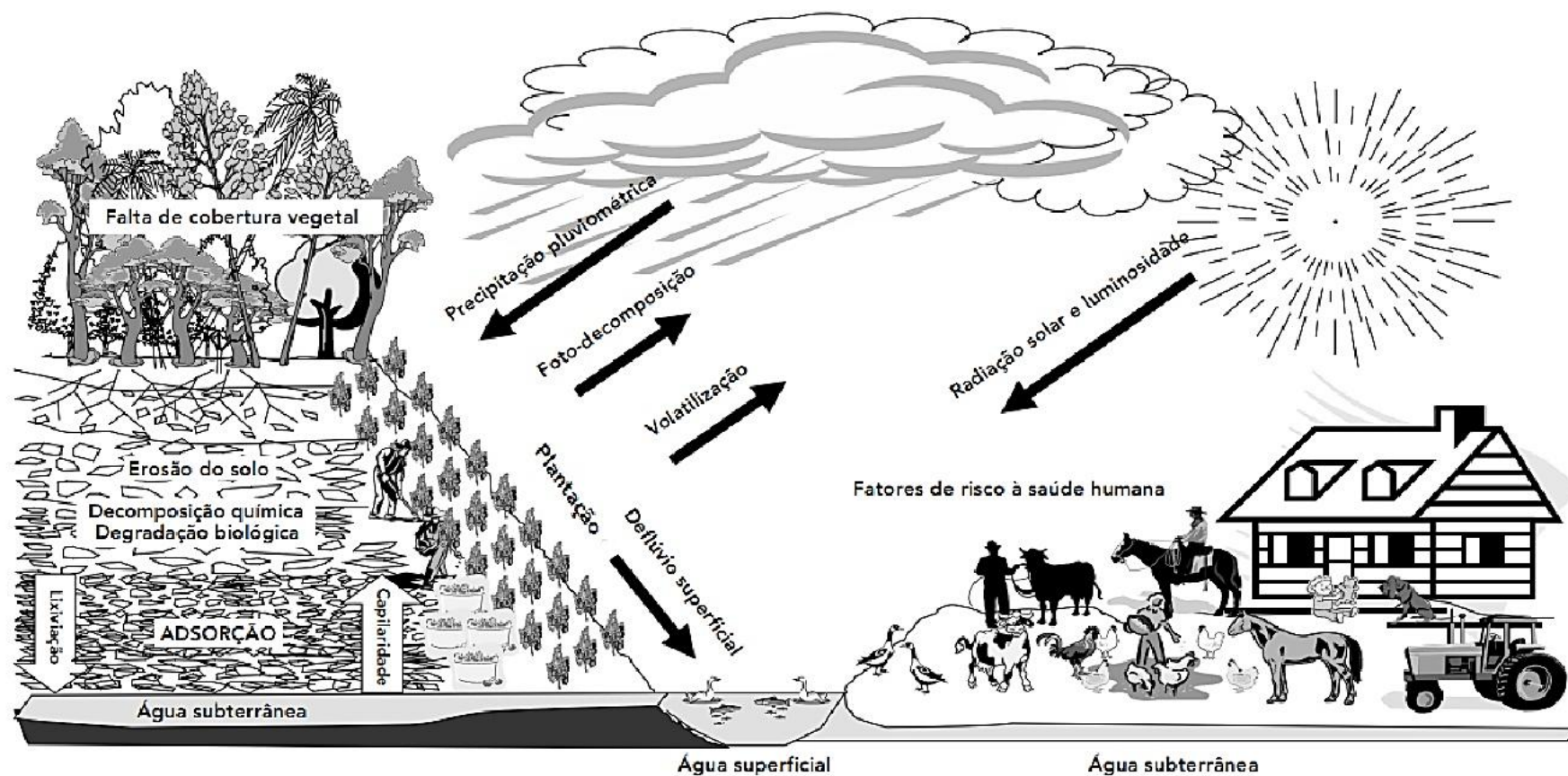


Figura 5 - Processos envolvidos na dispersão dos agrotóxicos no meio ambiente. (Retirado e adaptado de Veiga *et al.*, 2006).

1.4. Microrganismos do solo e seu potencial na biodegradação de agrotóxicos

A diversidade do microbioma do solo é muito grande, principalmente pela heterogeneidade que existe nesse ambiente (Cardoso e Andreote, 2016). Dentre os microrganismos que estão presentes no solo podemos encontrar bactérias, fungos, protozoários, nematoides, ácaros e vírus (Campos-Takaki, Okada e Nascimento, 2008). A maioria destes organismos vive na primeira camada do solo, até uma profundidade de cerca de 40 cm, no solo também vamos encontrar a rizosfera (Siqueira *et al.*, 1994; Romagnoli e Andreote, 2016). A rizosfera, o solo sob a influencia de raízes, é uma região rica em nutrientes que são liberados pelas raízes das plantas, consequentemente é uma região rica em microrganismos (Romagnoli e Andreote, 2016). É nessa região da rizosfera que podem ser encontrados os microrganismos que auxiliam no crescimento e desenvolvimento das plantas (Barret, Morrissey e O’Gara, 2011; Romagnoli e Andreote, 2016). Para isso, os microrganismos que habitam o solo exercem funções de extrema importância nesse ambiente como decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, o controle biológico de pragas através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, a transformação de minerais, fixação de nitrogênio e também a biodegradação de xenobióticos, que compõe um importante fator para a redução desses compostos no meio ambiente (Cardoso, Tsai e Neves, 1992; Juárez *et al.*, 2013; Cotta, 2016).

A biodegradação envolve reações bioquímicas mediadas por diversos microrganismos que levam a vários tipos de transformações nas moléculas, incluindo a mineralização ou biotransformação de um composto (Messias e Silva, 2008; Pereira e Freitas, 2012). A mineralização é o processo onde compostos orgânicos sofrem a degradação completa, resultando em compostos inorgânicos, como a água, gás carbônico e amônia (Santos e Oliveira, 2015). Essa transformação pode ocorrer por reações químicas e físico-químicas, como a hidrólise e fotólise, entretanto o metabolismo microbiano também é capaz de realizar a mineralização (Santos e Oliveira, 2015). Já a biotransformação é quando a degradação não chega a mineralização, os subprodutos gerados no processo de biotransformação tem relevância ambiental pela possibilidade de apresentarem toxicidade menor, igual ou superior às moléculas originais (Santos e Oliveira, 2015). Nesse processo de biotransformação, alguns microrganismos necessitam de uma fonte de carbono adicional para conseguirem degradar o composto desejado, esse processo é chamado de co-metabolismo: quando um microrganismo realiza a transformação de uma molécula sem que essa forneça energia ou fonte de carbono principal para o degradador, sendo necessário um outro substrato para ser utilizado como fonte de carbono e energia (Campos-Takaki, Okada e Nascimento, 2008).

Fatores ambientais bióticos e abióticos, tais como as interações dos microrganismos com vários constituintes do solo; o tipo de molécula envolvida; a sorção/dessorção da molécula e a solubilidade influenciam na biodisponibilidade do composto (Smith *et al.*, 1992; Scow e Johnson, 1996; Guerin e Boyd, 1997; Boivin *et al.*, 2005; Campos-Takaki, Okada e Nascimento, 2008). Por consequência, esses fatores também podem influenciar na capacidade de um microrganismo em biodegradar uma molécula. A decomposição das moléculas de agrotóxicos no meio ambiente acontece, principalmente, pela degradação microbiológica, uma vez que a ação dos microrganismos sobre essas substâncias constitui o mecanismo de maior importância para a redução desses produtos tóxicos (Araújo, 2002; Araújo e Orlanda, 2014). Devido a essa capacidade que os microrganismos têm em degradar moléculas tóxicas eles podem ser utilizados para processos de descontaminação de ambientes, como no processo de biorremediação. A biorremediação é definida pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 2012) como: “o processo de tratamento que usa microrganismos para quebrar ou degradar substâncias perigosas em moléculas menos tóxicas ou não tóxicas”. Essa biotecnologia vem sendo muito estudada pois uma boa parte das técnicas que visam o tratamento de resíduos tóxicos muitas vezes apenas transferem esses resíduos de um local para outro, não degradando o poluente tóxico em questão (Campos e Vieira, 2002). Existem três estratégias para a realização da biorremediação: a biorremediação intrínseca ou natural, onde os microrganismos provenientes do próprio local contaminado realizam o tratamento (Pereira e Freitas, 2012); a bioestimulação, que é a adição de agentes que irão estimular os microrganismos, como a adição de nutrientes e oxigênio (Seklemova, Pavlova e Kovacheva, 2001; Bento *et al.*, 2003) e o bioaumento, onde é feita a inoculação de consórcios enriquecidos de microrganismos (Bento *et al.*, 2003, Chang *et al.*, 2015).

A biodiversidade microbiana do solo representa um grande potencial biotecnológico para a biodegradação e recuperação de sítios contaminados através de processos como a biorremediação (Campos-Takaki, Okada e Nascimento, 2008). Diversos autores já demonstraram essa capacidade de microrganismos em degradar agrotóxicos, a Tabela 4 mostra um resumo de alguns gêneros de microrganismos que já foram descritos degradando essas substâncias.

Tabela 4 – Gêneros de microrganismos do solo com espécies capazes de degradar agrotóxicos. (Informações retiradas de: Soccol, Pinheiro e Krefta, 1995; Mattos, 2015; González *et al.*, 2017)

Microrganismos	Gêneros com espécies capazes de degradar agrotóxicos
Bactérias	<i>Achromobacter, Aerobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Bacillus, Bacteroides, Clostridium, Corynebacterium, Escherichia, Flavobacterium, Klebsiella, Pseudomonas, Xanthomonas.</i>
Fungos	<i>Alternaria, Aspergillus, Cladosporium, Fusarium, Glomerella, Mucor, Penicillium, Rhizoctonia, Trichoderma, Rhodotorula</i>
Actinomicetos	<i>Micromonospora, Nocardia, Streptomyces</i>

No caso do herbicida 2,4-D, uma variedade de microrganismos o degradam, dentre eles estão: *Pseudomonas* sp., *Cupriavidus necator*, *Achromobacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Nocardia* sp., *Streptomyces* spp. e *Aspergillus niger*; sendo 2,4-diclorofenol, 4-clorocatecol e clorohidroquinona seus principais compostos produzidos durante sua biodegradação (Marcondes, 2001; Amarante Junior *et al.*, 2002; Mattos, 2015). É importante ressaltar que os subprodutos gerados ao longo da degradação de um agrotóxico devem ser estudados, pois durante esse processo pode ser formado um composto mais tóxico do que a molécula original, o que é indesejado num processo de biorremediação (Fasanella e Cardoso, 2016). Dessa forma, conhecer a rota da biodegradação de um agrotóxico por uma bactéria é de extrema importância caso haja a intenção de utilizar aquele microrganismo em processos biotecnológicos no futuro.

1.4.1. Rotas de Degradação do 2,4-D

Apesar do ácido 2,4-diclorofenoxiacético ter uma estrutura fenólica e ser tóxico, ele pode ser utilizado como fonte de carbono por diversos microrganismos do meio ambiente e portanto, ser degradado (Evans *et al.*, 1971; Don e Pemberton, 1981, 1985; Lee *et al.*, 2005, Silva *et al.*, 2007). Ambientes contaminados por esse agrotóxico tem potencial para serem tratados através de técnicas de biorremediação. Tanto na sua forma ácida, de amina ou de éster, os formulados de 2,4-D podem ser metabolizados a outros compostos que posteriormente podem entrar no ciclo do carbono (Amarante Júnior *et al.*, 2002). De acordo com Voos e Groffman (1997), em condições favoráveis a biodegradação, o 2,4-D pode ser completamente dissipado em cerca de 20 dias. É importante ressaltar que a degradação desse herbicida vai depender de uma interação complexa que ele terá com os microrganismos, substratos e constituintes do solo, o que vai determinar a magnitude de sua degradação (Souza *et al.*, 1999 *apud* Silva, 2012). Por isso,

mesmo após um longo período, quantidades consideráveis do 2,4-D e do 2,4-diclorofenol (2,4-DCF), considerado o principal produto de degradação desse ácido, podem ser encontrados no meio ambiente (Amarante Júnior *et al.*, 2003a; Amarante Júnior *et al.*, 2003b; Silva *et al.*, 2007).

Pemberton e Fisher (1977) viram através de seus experimentos que plasmídeos estavam envolvidos no processo de degradação do 2,4-D (Chang *et al.*, 2015). Pouco tempo depois, sete plasmídeos que conferiam a capacidade de degradar esse herbicida foram isolados de duas espécies de *Alcaligenes* spp. (Don e Pemberton, 1981; Chang *et al.*, 2015), dentre esses plasmídeos, o pJP4 é um dos mais estudados, ele é autotransmissível e codifica genes para a degradação do 2,4-D, ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético e 3-clorobenzoato (3CB) (Don e Pemberton, 1985; Kumar *et al.*, 2014). A bactéria *Cupriavidus necator* JMP134, anteriormente denominada *Alcaligenes eutrophus* JMP134, é o organismo modelo para estudos da degradação do 2,4-D tendo sua rota de degradação muito bem estudada (Dennis, 2005; Direito, 2009; Silva, 2012; Chang *et al.*, 2015). Ela possui o plasmídeo pJP4 que contém os genes *tfdA*, *tfdB*, *tfdC*, *tfdD*, *tfdE* e *tfdF* que codificam para seis enzimas que fazem parte do processo de degradação dessa molécula (Dennis, 2005; Direito, 2009; Silva, 2012; Kumar *et al.*, 2014). A rota clássica realizada pela *Cupriavidus necator* JMP134 está ilustrada na Figura 6.

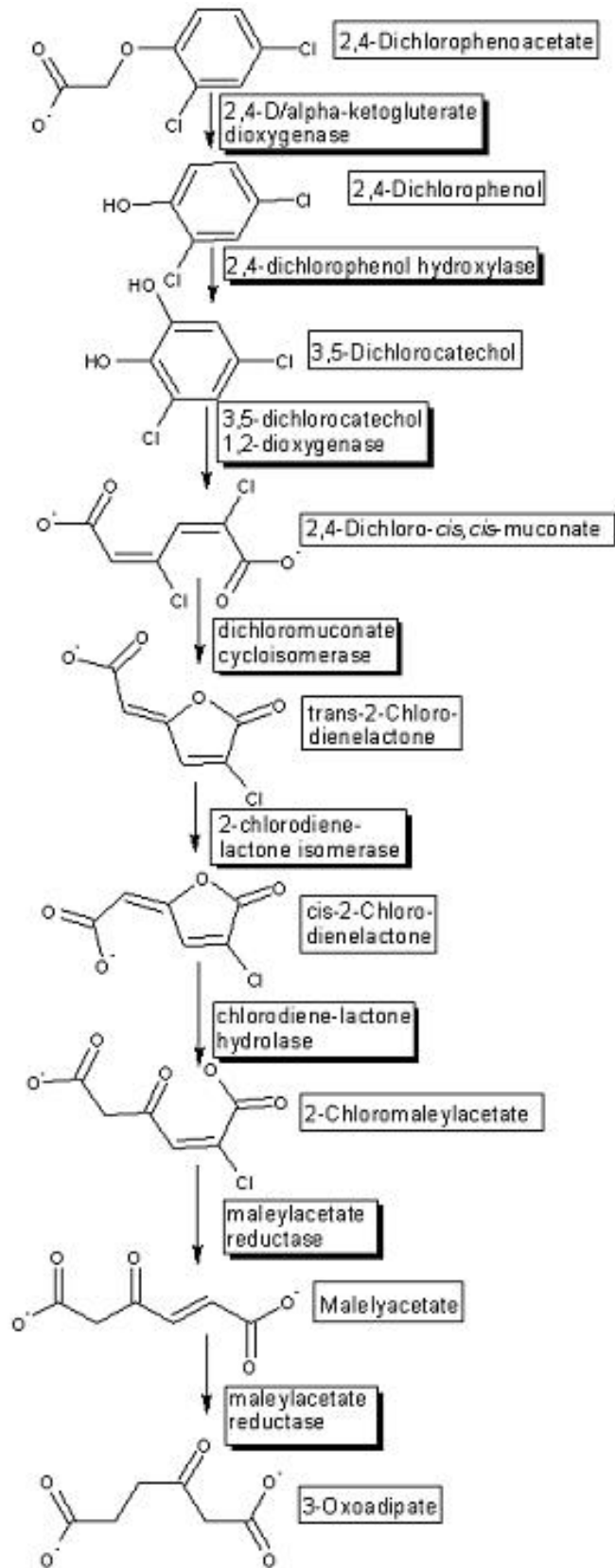


Figura 6 – Rota de degradação iniciada pela bactéria *Cupriavidus necator* JMP134 (Retirado de: Young, 2012).

Além da *Cupriavidus necator* JMP134, várias outras bactérias capazes de degradar o 2,4-D já foram descobertas, como, por exemplo, no trabalho de Chaudry e Huang (1988), onde eles caracterizaram o plasmídeo pRC10 encontrado em uma bactéria da espécie *Flavobacterium* spp., apesar de ser menor, esse plasmídeo apresentava regiões homólogas com o plasmídeo pJP4 e também conferia a capacidade de degradar o 2,4-D. Isso mostra que nem toda bactéria capaz de degradar o 2,4-D possui somente os genes *tfd*. Estudos feitos com bactérias de solos brasileiros demonstraram que muitas delas não possuem os genes *tfd* mesmo sendo capazes de degradar o 2,4-D, mostrando que ainda há muito a se saber sobre a degradação desse herbicida por bactérias (Direito, 2009; Pereira, 2012). Além da diversidade de microrganismos que possuem genes para a degradação do 2,4-D, muitas rotas podem ser iniciadas por um microrganismo e continuadas por outros, gerando uma rede complexa de degradação (Young, 2012). Mostrando assim que existe uma grande diversidade em microrganismos que são capazes de degradar o 2,4-D e por consequência, diversas rotas para a degradação desse ácido podem existir na natureza.

Como citado no item 1.4, diversos gêneros de microrganismos já foram descritos degradando o 2,4-D e outros agrotóxicos. Um gênero que vem se mostrando promissor na degradação de diversos compostos tóxicos é o gênero *Ochrobactrum*, sendo ele estudado nesse trabalho.

1.4.2. O gênero *Ochrobactrum*

O gênero *Ochrobactrum* pertence à família *Brucellaceae* na classe das α -Proteobacteria e foi primeiramente descrito em 1988 (Holmes *et al.*, 1988). Antes as bactérias desse gênero eram classificadas como pertencentes ao grupo Vd de *Achromobacter* spp. (Teyssier *et al.*, 2005; Holmes, 2015; Xu *et al.*, 2015; Saini *et al.*, 2017). As cepas do grupo Vd eram relacionadas com os gêneros *Agrobacterium*, *Brucella*, *Mycoplana*, *Phyllobacterium* e *Rhizobium*, porém distintas o suficiente para a formação de um novo gênero (Holmes *et al.*, 1988; Holmes, 2015). As bactérias desse gênero são caracterizadas por bastonetes Gram-negativos com extremidades arredondadas, normalmente com cerca de 1,0x1,5-2,0 μ m de tamanho, podendo ocorrer formas ovais menores de cerca de 1,0-1,5 μ m de comprimento (Holmes, 2015). São organismos aeróbios obrigatórios, não formadores de esporos, possuem um bom crescimento numa faixa de temperatura de 20 a 37°C e podem possuir motilidade pela presença de flagelos peritríquios (Holmes, 2015). A primeira espécie caracterizada de *Ochrobactrum* spp. foi a bactéria *Ochrobactrum anthropi*, sendo também a estirpe tipo do

gênero (Holmes *et al.*, 1988; Velasco, *et al.*, 1998; Holmes, 2015). Acreditava-se que o gênero *Ochrobactrum* era somente encontrado em espécimes clínicas humanas pois foi de onde *O. anthropi* e *O. intermedium*, as primeiras espécies caracterizadas, foram isoladas (Holmes *et al.*, 1988; Velasco *et al.*, 1998). Entretanto, posteriormente espécies do gênero foram isoladas de diferentes ambientes como solo (Lebuhn *et al.*, 2000; Kämpfer *et al.*, 2008); ambientes industriais (Kämpfer *et al.*, 2008; Huber *et al.*, 2010), rizosfera e em associações com plantas (Lebuhn *et al.*, 2000; Ngom *et al.*, 2004; Trujillo *et al.*, 2005; Tripathi *et al.*, 2006; Zurdo-Piñeiro *et al.*, 2007; Kämpfer *et al.*, 2008; Imran *et al.*, 2010; Abraham e Silambarasan, 2016) e animais (Kämpfer *et al.*, 2003).

Até o momento da redação deste trabalho, o gênero *Ochrobactrum* consiste em 18 espécies com nomes publicados válidos: *O. anthropi*; *O. ciceri*; *O. cytisi*; *O. daejeonense*; *O. endophyticum*; *O. gallinifaecis*; *O. grignonense*; *O. haemophilum*; *O. intermedium*; *O. lupini*; *O. oryzae*; *O. pecoris*; *O. pituitosum*; *O. pseudointermedium*; *O. pseudogrignonense*; *O. rhizosphaerae*; *O. thiophenivorans* e *O. tritici* (LPSN, 2017). Um resumo de todas as espécies está na Tabela 5.

Devido ao fato de algumas espécies desse gênero serem isoladas de espécimes clínicos, principalmente do sangue, e da emergência de patógenos dentro da família *Brucellaceae*, há uma preocupação de que *Ochrobactrum* seja possivelmente um gênero com patógenos emergentes (Aujolat *et al.*, 2014). Entretanto, até agora, espécies isoladas do gênero foram encontradas apenas em pessoas em estado suscetível a infecções oportunistas como pessoas imunocomprometidas, pessoas transplantadas e em diálise, pacientes de pós-operatório e pacientes fazendo uso de cateter venoso (Teyssier *et al.*, 2005; Aujolat *et al.*, 2014). Por isso, algumas espécies do gênero podem ser classificadas como patógenos oportunistas (Teyssier *et al.*, 2005; Thoma *et al.*, 2009; Jackel *et al.*, 2017). Contudo, esse gênero é amplamente estudado por possuir outras características extremamente importantes, como degradação de compostos tóxicos (Imran *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2014; Sipahutar e Vangnai, 2017; Yun *et al.*, 2017); atuação como bactérias promotoras de crescimento de plantas (Faisal e Hasnain, 2006; Imran *et al.*, 2014; Meng *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2016; Saini *et al.*, 2017); produção de substâncias antibióticas e biosurfactantes (Thomas *et al.*, 2014; Bezza *et al.*, 2015; Ferhat *et al.*, 2017) e já foi relatado até mesmo uma espécie capaz de atribuir a resistência a fitopatógenos em plantas (Sumayo, Hahm e Ghim, 2013).

Tabela 5 – Revisão das espécies do gênero *Ochrobactrum*. (Informações retiradas de: Ozdemir *et al.*, 2003; Bathe *et al.*, 2005; Batoool e Hasnain, 2009; Wang *et al.*, 2012; Yang, Yu e Zhang, 2013; Castro *et al.*, 2014; Meng *et al.*, 2014; Chai *et al.*, 2015; Chaturvedi e Verma, 2015; Niu e Kolter, 2017; Reyad *et al.*, 2017).

Espécie	Locais onde já foi encontrada	Autor que a descreveu
<i>O. anthropi</i>	Espécimes clínicas humanas; solo; raiz de <i>Helianthus tuberosus</i> (alcachofra-girassol) lodo ativado	Holmes <i>et al.</i> , 1988
<i>O. intermedium</i>	Espécimes clínicas humanas, água, solo	Velasco <i>et al.</i> , 1998
<i>O. grignonense</i>	Solo e raiz de trigo	Lebuhn <i>et al.</i> , 2000
<i>O. tritici</i>	Solo e raiz de trigo	Lebuhn <i>et al.</i> , 2000
<i>O. gallinifaecis</i>	Fezes de galinha	Kämpfer <i>et al.</i> , 2003
<i>O. lupini</i>	Nódulos de <i>Lupinus albus</i> (tremoço-branco)	Trujillo <i>et al.</i> , 2005
<i>O. oryzae</i>	Água de plantação de arroz, sementes de <i>Oryza sativa</i> (arroz), águas residuais	Tripathi <i>et al.</i> , 2006
<i>O. haemophilum</i>	Espécimes clínicas humanas, lagos de água salgada	Kämpfer <i>et al.</i> , 2007
<i>O. pseudogrignonense</i>	Espécimes clínicas humanas; solo; água residual de mina de cobre; sedimento de mangue	Kämpfer <i>et al.</i> , 2007
<i>O. pseudointermedium</i>	Espécimes clínicas humanas	Teyssier <i>et al.</i> , 2007
<i>O. cytisi</i>	Nódulos de <i>Cytisus scoparius</i> (Vassoura escocesa)	Zurdo-Piñero <i>et al.</i> , 2007
<i>O. rhizosphaerae</i>	Rizosfera de batata	Kämpfer <i>et al.</i> , 2008
<i>O. thiophenivorans</i>	Ambiente industrial	Kämpfer <i>et al.</i> , 2008
<i>O. pituitosum</i>	Ambiente industrial; raiz de milho	Huber <i>et al.</i> , 2010
<i>O. ciceri</i>	Nódulos de <i>Cyzer arietinum</i> (grão-de-bico); lodo ativado	Imran <i>et al.</i> , 2010
<i>O. pecoris</i>	Animais de fazenda	Kämpfer <i>et al.</i> , 2011
<i>O. daejeonense</i>	Lodo de estação de tratamento de lixiviação	Woo <i>et al.</i> , 2011
<i>O. endophyticum</i>	Raiz de <i>Glycyrrhiza uralensis</i> (alcaçuz chinês)	Li <i>et al.</i> , 2015

Diversas espécies do gênero *Ochrobactrum* possuem a capacidade de degradar compostos aromáticos (Inram *et al.*, 2014), isso permite que esses microrganismos utilizem diferentes moléculas como fontes de energia, inclusive, já tendo sido descritas degradando diversos agrotóxicos, como o thifensulfuran metil (Zhao *et al.*, 2015); Quilnaphos (Talwar, Mulla e Ninnekar, 2014); atrazina (Reyad *et al.*, 2017); carbendazim (Santos *et al.*, 2017); DDT (Pan *et al.*, 2017); glifosato (Hadi *et al.*, 2013) e clorpirifós e seu produto de degradação 3,5,6-tricloro-2-piridinol (Abraham e Silambarasan, 2016). Essa capacidade de degradar compostos aromáticos e possibilidade de degradar agrotóxicos, tornam esse gênero promissor na degradação do herbicida 2,4-D. Além disso, a variedade de funções que as espécies de *Ochrobactrum* spp. podem exercer permitem que esse gênero seja estudado e possivelmente utilizado em aplicações biotecnológicas como biorremediação, preparo de bioinoculantes com ação de promoção de crescimento de plantas, produção de substâncias com ação antimicrobiana e produção de biosurfactantes, mostrando que o gênero é promissor nessa área de estudo.

1.5. JUSTIFICATIVA

O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos no mundo. Isso leva a uma preocupação com o destino que essas substâncias tomam na natureza, podendo contaminar o solo e a água. O Laboratório de Biotecnologia Sustentável e Bioinformática Microbiana (LBSBM) tem um histórico em pesquisas de mecanismos para a diminuição do herbicida 2,4-D no meio ambiente, a fim de minimizar os danos que ele pode causar aos seres humanos e à natureza. Uma das tecnologias mais sustentáveis que existe hoje em dia para a recuperação de ambientes contaminados é a biorremediação, dessa forma, o LBSBM procura microrganismos para estudar a sua capacidade de degradar esse herbicida com possível aplicação biotecnológica no futuro. Nesse contexto, este presente trabalho irá contribuir para o estudo da degradação desse herbicida por bactérias nativas do solo brasileiro com a intenção de selecionar e identificar a que apresentar o melhor perfil.

2. OBJETIVOS

1.6. Objetivo Geral

O objetivo geral desta monografia é estudar a capacidade de degradação do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético por estirpes bacterianas da coleção de culturas do LBSBM e selecionar e identificar a estirpe que apresentar o melhor perfil de degradação.

1.7. Objetivos específicos

- Confirmar o crescimento das bactérias da coleção em meio contendo 2,4-D como única fonte de carbono;
- Verificar a biotransformação/biodegradação do 2,4-D pelas bactérias através da técnica de CLAE;
- Selecionar e identificar a bactéria com o melhor perfil de degradação para possível aplicação biotecnológica;
- Verificar a formação de subprodutos de degradação do herbicida 2,4-D pela bactéria selecionada através da técnica de CLAE.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Manutenção dos microrganismos e caracterização morfo-tintorial

As bactérias utilizadas no presente trabalho são da coleção de culturas do LBSBM elaborada por Direito (2009), que através de uma bioprospecção em solos com e sem histórico de 2,4-D isolou bactérias com potencial de degradar este herbicida. Os microrganismos dessa coleção foram isolados através da utilização de dois meios, um deles é o meio seletivo MEMB (Chong, 2005) que distingue as bactérias degradadoras (colônias avermelhadas) das bactérias não degradadoras (colônias azuladas) do 2,4-D. O outro meio utilizado foi o meio mínimo contendo 2,4-D (na concentração de 500 mg/L) como única fonte de carbono, denominado neste trabalho de meio 2,4-D (Füschlin *et al.*, 2003). A nomenclatura das estirpes foi dada quanto ao meio de isolamento (D – meio 2,4-D; M – meio MEMB) e quanto ao tipo de solo de onde o microrganismo foi isolado (F – solo sob cultivo orgânico; C – solo sob cultivo convencional sem histórico de uso de 2,4-D; G – solo sob cultivo convencional com histórico de uso de 2,4-D) (Direito, 2009). Peckle (2015) observou em seu trabalho que algumas estirpes da coleção de culturas de bactérias do LBSBM se destacavam na biotransformação/degradação do 2,4-D. As estirpes selecionadas para este estudo foram escolhidas a partir desse trabalho, sendo elas: DG01, DG02, MC02, MF13, MF19, MF20, MF23 e MG04.

As bactérias foram reativadas em meio Luria-Bertani (LB) sólido pela técnica de esgotamento e incubadas em estufa a 28°C por 48 horas, com a finalidade de verificar a viabilidade e pureza das colônias. Após a reativação, foi realizada a classificação morfo-tintorial através da coloração de Gram, para determinar sua morfologia e se são Gram-positivas

ou Gram-negativas. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico no aumento de 1000x com óleo de imersão.

Para a caracterização morfológica de colônias foram utilizados os critérios de Neder (1992), que abrangem as seguintes características: tamanho (grande, média e pequena), forma (circular, irregular, rizoide, filamentosa e puntiforme), elevação (côncava, elevada, ondulada, protuberante, achatada e convexa), bordos (lisos, lacerados, lobados, filamentosos e ondulados), estrutura (lisa, granulosa, filamentosa e rugosa), brilho (transparente, translúcida e opaca), cor (incolor e pigmentada) e aspecto (viscosa, úmida, membranosa, gelatinosa e leitosa). A visualização das colônias para o processo de caracterização foi feita com microscópio estereoscópio (MOTIC).

A manutenção das bactérias durante todo o período de realização desse trabalho foi feito em meio LB sólido enriquecido com 300mg/L de 2,4-D (Padrão Sigma-Aldrich >98% de pureza), sempre utilizando a técnica de esgotamento para comprovar a pureza dos isolados.

2.2. Seleção da estirpe promissora para a degradação de 2,4-D

2.2.1. Incubação em meio 2,4-D para seleção

Foram realizados testes com todas as estirpes com o objetivo de verificar se ainda possuíam a capacidade de degradar o herbicida 2,4-D e selecionar a que apresenta o melhor perfil de degradação para os experimentos seguintes. Cada estirpe foi inoculada em meio LB sólido enriquecido com 300mg/L 2,4-D e incubadas por 24 horas em estufa a 28°C para a ativação do inóculo. Depois, uma colônia de cada bactéria foi transferida para um tubo de ensaio contendo 4mL de meio LB líquido enriquecido com 300mg/L de 2,4-D e incubados em estufa a 28°C por 24 horas, para cada bactéria foram feitos quatro tubos de ensaio. Após o tempo de incubação, todas as bactérias foram centrifugadas (modelo Avanti J-E Centrifuge da marca Beckman Coulter) por 10 minutos, a 15316.6g e a 10°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas com solução salina 0,85%, esse processo foi repetido três vezes. Após esse processo as células foram ressuspendidas e transferidas para 4 tubos contendo 4mL de meio 2,4-D até atingir a $A_{600\text{ nm}} = 0,3$ (espectrofotômetro modelo SP-2000 UV da marca Spectrum), a incubação foi feita em estufa à 28°C. O experimento foi realizado durante 30 dias e durante o período de incubação em meio mínimo foram realizadas leituras diárias a 600nm no espectrofotômetro para análise da turbidimetria em todos os tubos. Para o controle negativo, 4 tubos contendo 4mL de meio 2,4-D sem inóculo foram submetidos às mesmas condições que os tubos inoculados.

2.2.2. Análise quantitativa da biodegradação do 2,4-D por Cromatografia

Líquida de Alta Eficiência

Após os 30 dias de incubação em meio 2,4-D, uma alíquota de 1mL de cada estirpe foi filtrada em filtro de porosidade 0,22µm para retirada das células e armazenado a -20°C. As amostras foram analisadas na UEZO (Centro Universitário Estadual da Zona Oeste), onde a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi utilizada para quantificar a degradação do herbicida pelas estirpes e selecionar a que apresentou o melhor perfil de degradação.

As análises cromatográficas foram todas realizadas pelo aparelho Shimadzu SPD-M10A equipado com bomba LC-10AD e detector *Diode array* CBM-10. A coluna empregada foi a Lichrosorb-RP-18 (fase inversa) com 200mm de comprimento por 4 mm de diâmetro e fase estacionária com grânulos irregulares de 5µm de diâmetro. Foi utilizado o método Direito Modificado, conforme descrito por Sbrano *et al.* (2013). Injetou-se 20µL de sobrenadante filtrado no equipamento cromatográfico e a corrida cromatográfica ocorreu por 20 minutos usando como fase móvel água acidificada com ácido fosfórico e acetonitrila em sistema com gradiente: nos primeiros 3 minutos a concentração da acetonitrila foi de 30%; de 3 minutos aos 20 minutos finais da corrida cromatográfica a concentração de acetonitrila variou de 30% a 100%. A leitura foi realizada a 225nm.

2.3. Identificação da estirpe MF13 pelo sequenciamento da região 16S rDNA

2.3.1. Extração de DNA

A estirpe selecionada foi cultivada em meio LB pela técnica de esgotamento e incubada em estufa a 28°C por 24 horas. A extração de DNA foi feita pela técnica do Choque Térmico, onde uma colônia isolada da bactéria foi transferida para um microtubo contendo 100 µL de água ultrapura estéril e homogeneizado manualmente. O microtubo com a bactéria foi submetido 40 minutos em banho de gelo e depois aquecido a 94°C por 4 minutos. Em seguida, foi feita uma centrifugação por 2 minutos a 11.414,3g, o sobrenadante contendo o DNA extraído foi recuperado e transferido para outro microtubo para ser utilizado nas etapas seguintes.

2.3.2. Amplificação por PCR da região 16S rDNA

Foi realizada a amplificação do 16S rDNA da bactéria para posterior identificação por sequenciamento. Utilizou-se os primers 27F (5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGG(CT)TACCTTGTTACGACTT-3').

O PCR foi realizado utilizando o KIT GoTaq Green Master Mix (Promega Corporation). O volume total de reação foi 25 μ L, onde foi adicionado 12,5 μ L de Master Mix, 1 μ L de cada primer na concentração de 20 pmol, 8,5 μ L de água ultrapura estéril e 2 μ L da amostra de DNA. Para o controle negativo foi adicionado em um microtubo todos os reagentes mas não foi adicionado DNA. A reação de PCR foi realizada por 2 horas utilizando as configurações descritas na Tabela 5, nas etapas 2,3 e 4 foram realizados 35 ciclos.

Tabela 6 – Programa de amplificação utilizado na reação de PCR.

Etapa	Temperatura	Duração
1. Desnaturação Inicial	94°C	4 minutos
2. Desnaturação	94°C	45 segundos
3. Alinhamento	55°C	30 segundos
4. Extensão	72°C	90 segundos
5. Extensão final	72°C	7 minutos

} 35 ciclos

2.3.3. Eletroforese em gel de agarose

A visualização do produto de PCR foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1% em TBE (0,045M Tris-borato; 0,001M EDTA) 1x e a corrida foi a 100v por 30 minutos. Para isso, 5 μ L de tampão de amostra foram adicionados a 5 μ L da amostra de DNA e aplicado no gel. Também foi aplicado 1 μ L marcador de 1kb com 5 μ L de tampão de amostra. Para o controle negativo foi misturado 5 μ L de tampão de amostra com a amostra de controle negativo. Os géis foram preparados com o corante SYBR Safe (Invitrogen) e após a corrida, foram revelados utilizando o aparelho ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences).

2.3.4. Sequenciamento da região 16S do rDNA

A purificação do produto de PCR e o sequenciamento da região 16S rDNA foi realizado pela empresa Helixxa. Foram utilizados os primers 27F (5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3'); 530F (5'-GTGCCAGC(C/A)GCCGCGG-3'); 945F (5'-TGGGGCGCAATCTGGAT-3'); 519R (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3'); 1087R (5'-CTCGTTGCGGGACTTACCCC-3') e 1492R (5'-TACGG(CT)TACCTTGTTACGACTT-3').

2.3.5. Análise filogenética do gene amplificado

As sequências obtidas no sequenciamento foram alinhadas no programa BioEdit para obtenção de uma sequência consenso. A sequência consenso foi analisada no banco de dados BLAST NCBI (Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para comparação com sequências similares. A sequência consenso também foi analisada no software RDP (Disponível em: <https://rdp.cme.msu.edu/>) para obtenção das estirpes tipo da sequência enviada. As sequências do 16S rDNA das estirpes tipo foram obtidos no LPSN (Disponível em: <http://www.bacterio.net/>). Todas as sequências das estirpes tipo, incluindo a sequência consenso, foram alinhadas no programa BioEdit.

Após o alinhamento das sequências, a árvore filogenética foi construída no programa MEGA7.0. A distância filogenética foi inferida com o modelo de distância-*p* e a topologia foi construída usando *neighbor-joining* baseada no alinhamento de 1400pb, com análise de *bootstrap* baseado em 1000 amostragens.

2.4. Curva de crescimento da estirpe MF13

Foi realizada uma curva de crescimento das bactéria selecionada com o objetivo de entender melhor seu ciclo de crescimento. Primeiro, três colônias isoladas em meio LB foram transferidas para 10mL de meio LB líquido e incubada por 24 horas em estufa a 28°C, sob agitação (180 rpm). Após a incubação, realizou-se a leitura de absorvância no espectrofotômetro (A_{600nm}) do inóculo, sendo ele diluído até a $A_{600nm}=1,0$. 1,5mL do inóculo foi transferido para 300 mL de meio LB líquido e a cada 4 horas uma alíquota foi retirada para fazer a leitura da densidade ótica no espectrofotômetro e para fazer a diluição seriada e plaqueamento em meio LB sólido pela técnica da Gota (*drop plate*) para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). A contagem de UFC foi realizada 48 horas após a incubação das placas de Petri em estufa a 28°C, foram consideradas válidas as diluições que apresentarem entre 3 e 30 colônias.

2.5. Análise da geração de subprodutos de degradação do 2,4-D por CLAE.

A bactéria selecionada foi inoculada em 300mL meio LB enriquecido com 2,4-D e incubada a 28°C sob agitação de 180rpm durante 24 horas, em 6 repetições. Em seguida, a bactéria foi centrifugada e lavada com solução salina 0,85%, conforme descrito no item 2.2.1. As células bacterianas foram então ressuspensas em 150mL de meio 2,4-D até atingir a A_{600nm}

=0,4. Para o controle negativo, 150mL de meio 2,4-D sem inóculo foram submetidos às mesmas condições do experimento. Todo o experimento, incluindo controle, foi feito em triplicata. Os erlenmeyers utilizados nessa etapa foram adaptados com uma torneira para retirada das alíquotas durante o experimento.

A bactéria foi mantida sob agitação (180 rpm) a 28°C por 10 dias. Durante o tempo de incubação foi retirado uma alíquota de cada erlenmeyer a cada 24 horas. Após a coleta da alíquota, foi feita diluição seriada e plaqueamento para determinação da UFC/mL. Cada amostra também foi filtrada em filtro de porosidade 0,22 µm para a retirada das células bacterianas. A amostra filtrada foi analisada por CLAE. As análises cromatográficas foram todas realizadas pelo aparelho Agilent 1260 Infinity Series equipado com bomba 1260 Quat Pump VL (modelo G1311C) e detector *diode array* 1260 DAD (modelo G4212B). A coluna empregada foi a ZORBAX Eclipse XDB-C8 (fase inversa) com 150mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro e fase estacionária com grânulos irregulares de 5µm de diâmetro. Injetou-se 80µL de sobrenadante filtrado na coluna cromatográfica e a corrida cromatográfica ocorreu por 20 minutos usando como fase móvel água acidificada com ácido fosfórico 0,1% e acetonitrila acidificada com ácido fosfórico 0,1% em sistema com gradiente: nos primeiros 3 minutos a concentração da acetonitrila acidificada foi de 30% e de água acidificada foi de 70%; de 3 minutos aos 10 minutos a concentração de acetonitrila variou de 30% a 100% e de água acidificada de 70% para 0%; dos 10 minutos até o fim da corrida a acetonitrila acidificada foi 100% para 30% novamente e de água acidificada foi de 0% para 70%. A leitura foi realizada a 225nm. Esse método foi elaborado pelo professor Antônio Jorge do Instituto de Pesquisa em Produtos Naturais-UFRJ (Comunicação pessoal), que é colaborador do LBSBM.

3. RESULTADOS.

3.1. Manutenção dos microrganismos e caracterização morfo-tintorial

As bactérias DG01, DG02, MC02, MF13, MF19, MF20, MF23 e MG04 foram reativadas em meio LB sólido e testadas quanto a sua viabilidade e pureza. Todas as estirpes se apresentaram viáveis. Em seguida foram caracterizadas através da coloração de Gram.

Através da coloração de Gram foram encontradas bactérias com forma de cocos e bastonetes, Gram-positivas e Gram-negativas. A estirpe DG01 é Gram-positivas e apresenta forma de cocos. As estirpes DG02, MC02, MF23 e MG04 são Gram-negativas e também apresentaram forma de cocos. As estirpes MF13, MF19 e MF20 também são Gram-negativas, porém apresentaram forma de bastonetes. Foi possível observar as características coloniais das estirpes através da análise macroscópica das colônias. A caracterização morfológica de colônias foi realizada também em meio LB sólido e foi possível observar uma grande variedade nas colônias das estirpes selecionadas (Figura 7).

3.2. Seleção das estirpes promissoras para a degradação do 2,4-D

3.2.1. Incubação em meio 2,4-D para seleção

Como todas as estirpes se apresentaram viáveis, todas foram testadas quanto a sua capacidade em crescer no meio 2,4-D, cuja única fonte de carbono é este herbicida. Através das análises da turbidimetria do meio feita ao longo dos 30 dias de incubação, foi possível analisar quais estirpes apresentaram um crescimento bom (+), crescimento razoável (\pm) ou não

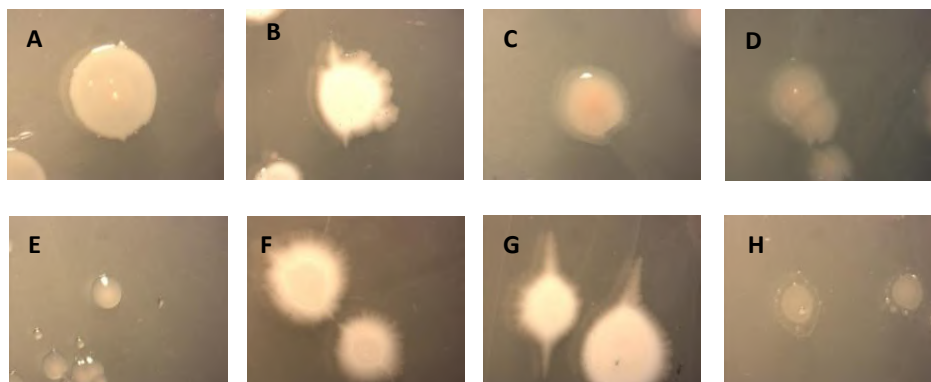


Figura 7 – Observação e caracterização morfológica de colônias isoladas com microscópio estereoscópico. A caracterização das bactérias foi feita em meio LB sólido. (A) DG01 - Colônias grandes, circulares, elevadas, com borda lisa, opacas com pigmentação laranja e aspecto mucoso. (B) DG02 - Colônias grandes, circulares, convexas, com borda lobada, opacas com pigmentação laranja claro e aspecto mucoso. (C) MC02 - Colônias médias, circulares, com borda lobada, translúcidas com uma pigmentação levemente esbranquiçada e aspecto mucoso. (D) MG04 - Colônias médias, circulares, achatadas, com borda lisa, translúcida com pigmentação esbranquiçada e aspecto mucoso. (E) MF13 - Colônias pequenas, circulares, com borda lisa, levemente translúcida com aspecto mucoso. (F) MF19 - Colônias médias, irregulares, achatadas, com borda ondulada, opaca com coloração branca e aspecto mucoso. (G) MF20 - Colônias médias, irregulares, convexas, com borda ondulada, opaca com coloração branca e aspecto mucoso. (H) MF23 - Colônias pequenas, circulares, achatadas, com borda lobada, translúcida com aspecto mucoso.

apresentou crescimento (-) (Tabela 7). As estirpes foram inoculadas com $A_{600nm}=0,3$ e a avaliação de crescimento foi feita de acordo com a densidade ótica apresentada ao longo do

período de incubação. As estirpes que apresentam crescimento bom e moderado provavelmente possuem capacidade de degradar/biotransformar o herbicida 2,4-D, uma vez que foram capazes de crescer na presença desse composto como a única fonte de carbono presente no meio. O controle negativo do experimento não apresentou nenhum crescimento microbiano.

Tabela 7 – Avaliação do crescimento das estirpes em meio 2,4-D após 30 dias de incubação. +, indica crescimento bom (A_{600nm} acima de 0,4); ±, indica crescimento razoável (A_{600nm} de 0,35 a 0,4); –, indica que não houve crescimento (A_{600nm} abaixo de 0,35).

Estirpe	Crescimento em meio 2,4-D
DG01	±
DG02	+
MC02	+
MG04	+
MF13	+
MF19	±
MF20	±
MF23	±

3.2.2. Análise quantitativa da biodegradação do 2,4-D por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As análises da degradação do herbicida com CLAE demonstraram que as bactérias DG01, DG02, MC02, MF19, MF20, MF23 e MG04 foram capazes de reduzir a concentração inicial de 2,4-D e de biotransformar o herbicida (Ver Anexos). No controle de 2,4-D é possível observar um único pico com tempo de retenção de 11,887 minutos (Figura 8), esse resultado é condizente com o padrão que o 2,4-D exibe no CLAE utilizando o método Direto Modificado (Sbano *et al.*, 2013). Uma das estirpes testadas se destacou por ter um perfil de degradação completo segundo as análises do CLAE. Essa bactéria foi a estirpe MF13. Analisando o perfil cromatográfico gerado após 30 dias de inoculação no meio 2,4-D (Figura 9) é possível verificar que é distinto ao perfil cromatográfico gerado pelo controle do 2,4-D. Ao comparar com o cromatograma da bactéria MF13 nenhum pico com esse tempo de retenção é observado na escala maior (Figura 9). É possível observar que nenhum dos picos apresenta o mesmo padrão que o gerado pelo herbicida, uma vez que apresentam tempos de retenção de 1,920, 2,240 e 6,127 minutos (Figura 9).

Uma outra análise foi realizada, desta vez sobrepondo o cromatograma do 2,4-D com o gerado pela degradação do herbicida pela estirpe MF13, pode-se observar que não houve sobreposição do espectro do 2,4-D com o espectro gerado pela degradação do herbicida pela estirpe MF13 (Figura 10), mostrando que o 2,4-D não se encontra ali. Esses resultados sugerem que a bactéria foi capaz de utilizar o 2,4-D como fonte de carbono e que foi capaz de degradar o anel aromático desse herbicida, possivelmente mineralizando o composto devido à ausência de picos no cromatograma que sugerem a formação de subprodutos.

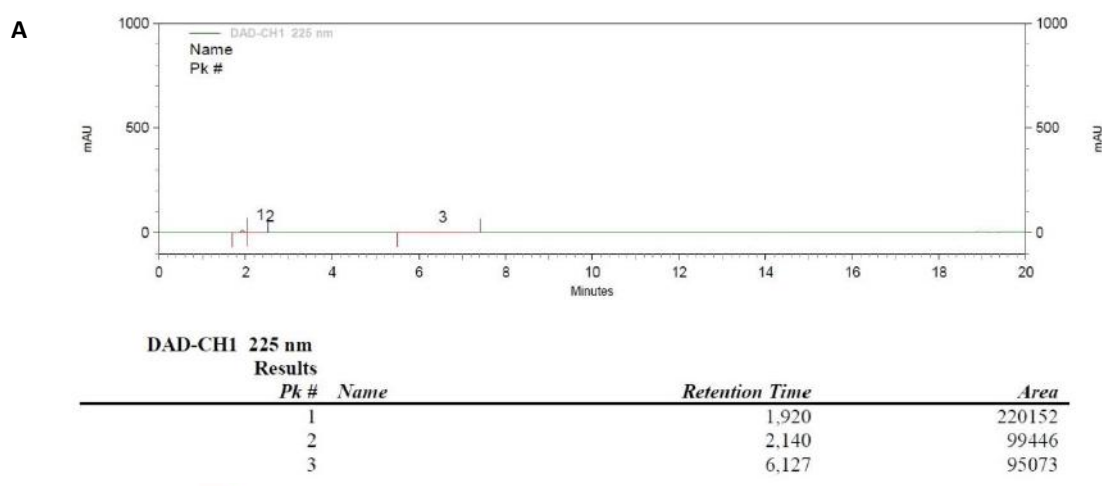


Figura 10 – Análise da degradação do 2,4-D pela estirpe MF13 utilizando CLAE. Cromatograma da degradação do 2,4-D pela bactéria MF13. Não é observado nenhum pico semelhante ao padrão do 2,4-D.

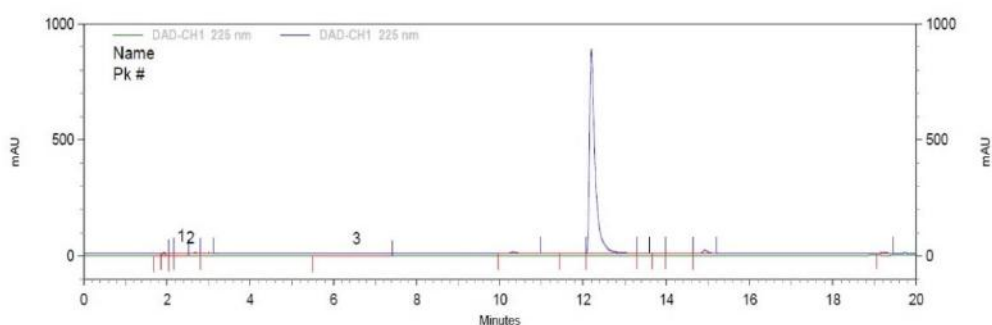


Figura 10 – Sobreposição dos cromatogramas do controle e da degradação do 2,4-D pela estirpe MF13. Espectro do herbicida 2,4-D (linha azul) sobreposto com o espectro gerado pela degradação do 2,4-D pela estirpe MF13 (linha verde). Não há sobreposição entre os dois espectros.

Seta vermelha – tempo de retenção do 2,4-D

3.3. Identificação da bactéria selecionada

3.3.1. Análise filogenética da estirpe MF13

1449 bases da sequência do gene 16S rDNA da estirpe MF13 foram alinhados e mostrou-se mais similar com a estirpe *Ochrobactrum* sp. DZQ2a (Número de acesso: KC146415.1) apresentando 99% de identidade e *E-value* de 0.0 de acordo com o programa BLAST. Demonstrando que a estirpe MF13 pertence ao gênero *Ochrobactrum*. Uma árvore filogenética do gene que codifica o 16S rDNA da estirpe MF13 foi gerada (Figura 11). Os códigos que aparecem antes do nome de cada espécie indicam o número de acesso da sequência usada nas análises do Genbank. A análise filogenética mostrou que a estirpe possui maior proximidade à espécie *Ochrobactrum ciceri*.

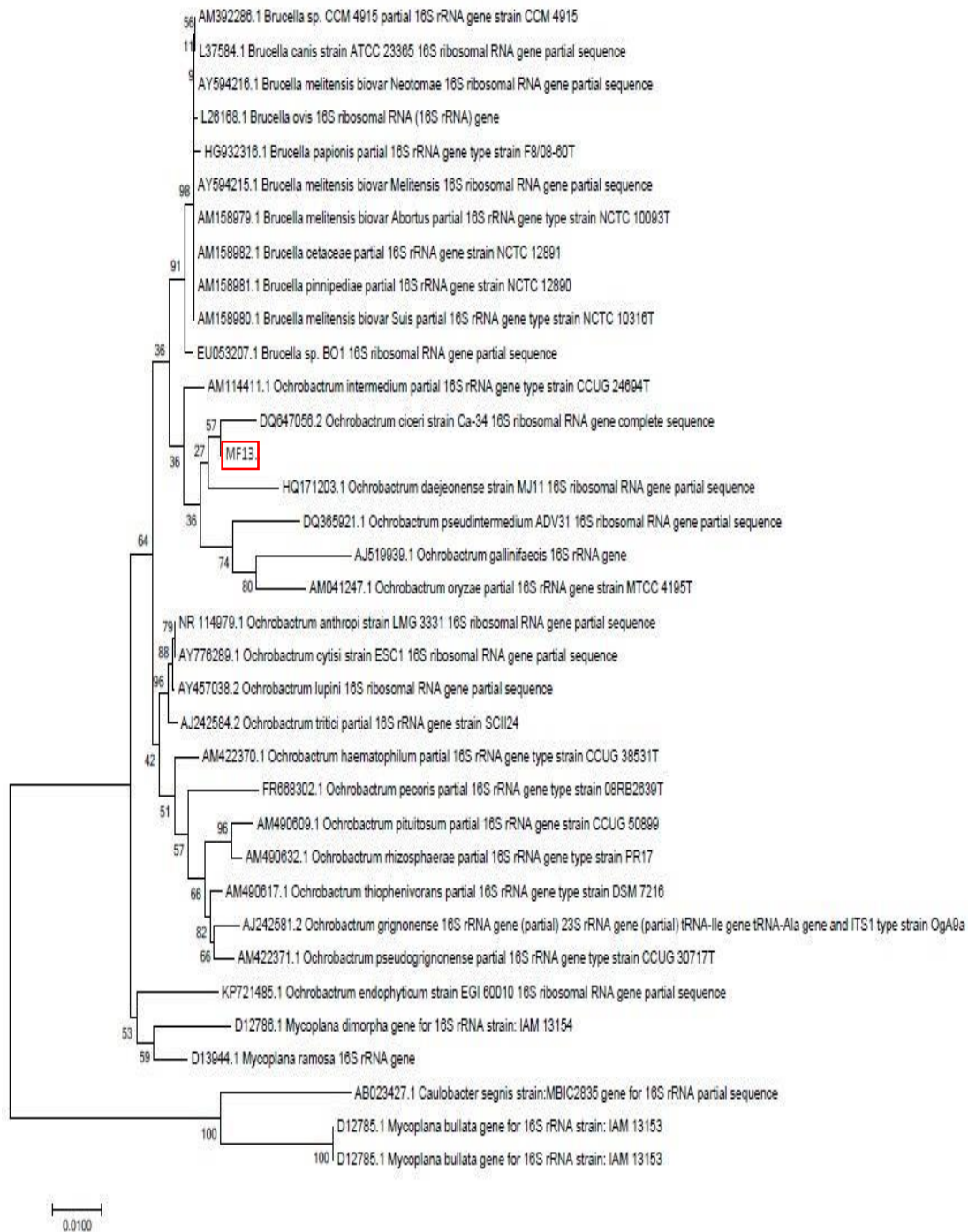


Figura 11 – Árvore filogenética da estirpe MF13. Gerada com distância P e *Neighbor-Joining* baseada no alinhamento de 1400 pb. A escala da distância 0.0100 indica substituições por sítio, número situados nas ramificações da árvore indicam porcentagem de recuperação do *bootstrap* baseado em 1000 amostragens. A estirpe MF13 está circulada em vermelho.

3.4. Curva de crescimento de *Ochrobactrum* sp.

É importante conhecer as fases de crescimento de células bacterianas quando se pretende utilizá-las em processos biotecnológicos (Bruno, 2017). Sendo um dos objetivos o desenvolvimento de inoculantes microbianos, é necessário ter muitas células, assim a fase exponencial é a melhor para se trabalhar com microrganismos uma vez que é a fase que apresenta maior taxa de divisão celular e por consequência, maior viabilidade das células (Bruno, 2017). Devido a isso, realizou-se uma curva de crescimento da estirpe para determinar a sua fase exponencial de crescimento. Para isso, foi realizada uma quantificação direta das células através de diluições seriadas seguidas de plaqueamento em meio LB sólido e contagem de UFC. Após a quantificação direta, foi observado que a bactéria apresentou $2,83 \times 10^7$ UFC/mL no tempo de 4 horas, onde começa sua fase exponencial, que dura aproximadamente até às 24 horas, atingindo $8,25 \times 10^9$ UFC/mL (Figura 12). É possível que no período de 24 horas até aproximadamente 35 horas ocorra a fase estacionária da bactéria. Às 48 horas começa um declínio gradual de células, a bactéria apresenta $1,28 \times 10^{10}$ UFC/mL e termina com $1,15 \times 10^{10}$ UFC/mL às 54 horas de crescimento (Figura 12). Em relação à densidade ótica, a estirpe apresentou um crescimento gradual, apresentando uma D.O de 0,019 às 4 horas e de 4,175 às 54 horas (Figura 13).

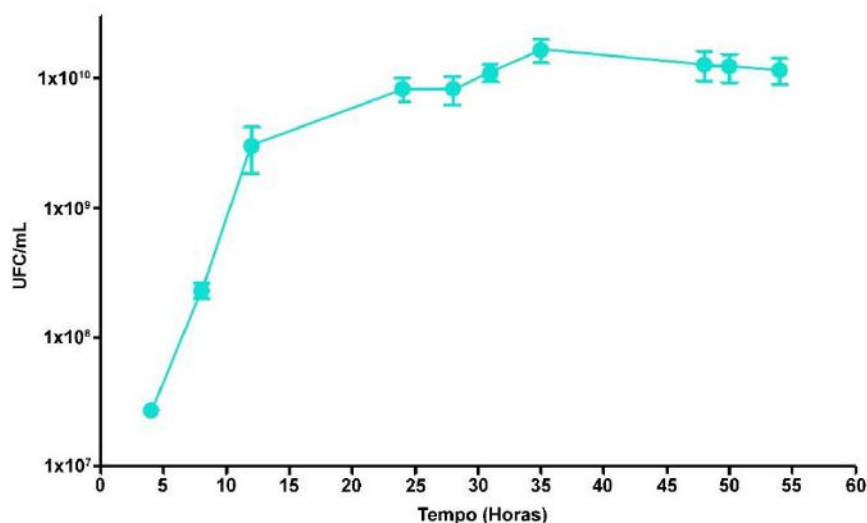


Figura 12 – Curva de crescimento da estirpe MF13 num período de 54 horas. A curva foi realizada através da contagem de UFC/mL. A bactéria foi inoculada em meio LB líquido e mantida sob agitação, a 28°C. As barras indicam o desvio padrão de 4 repetições.

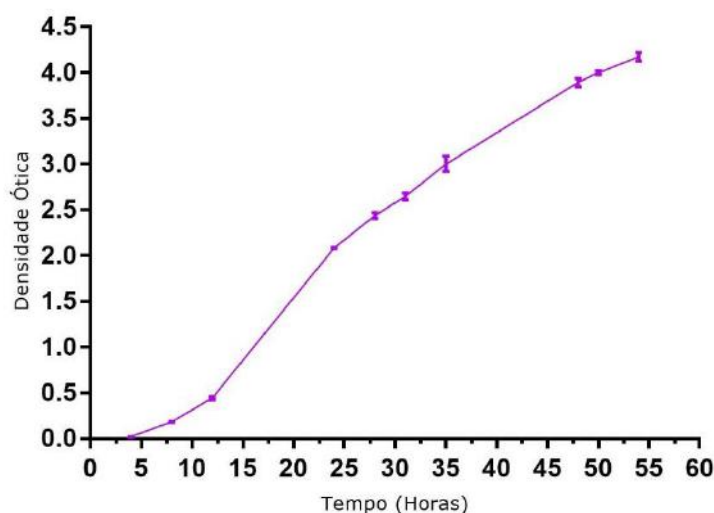


Figura 13 – Curva de crescimento da estirpe MF13 num período de 54 horas. A curva foi realizada através da determinação da densidade ótica (absorbância) no comprimento de de 600nm. As barras indicam o desvio padrão de 4 repetições.

3.5. Análise da geração de subprodutos de degradação do 2,4-D por CLAE.

Para a análise dos subprodutos gerados ao longo do processo de biodegradação do 2,4-D pela bactéria *Ochrobactrum* sp., ela foi mantida em meio 2,4-D durante 10 dias e a cada 24 horas uma alíquota era retirada do meio para realizar o estudo da degradação e determinar o número de UFC/mL. A média do inóculo inicial foi de $8,25 \times 10^8$ UFC/mL (Figura 14). No quarto dia, a bactéria entrou em sua fase exponencial com $2,79 \times 10^9$ UFC/mL, durando até o sexto dia. Entre o sexto e oitavo dias, a bactéria se encontrava em sua fase estacionária. A partir do oitavo dia, a bactéria entrou em declínio, terminando ao décimo dia de inoculação com $1,61 \times 10^9$ UFC/mL. O controle não apresentou nenhum crescimento microbiano durante o experimento.

As análises de CLAE mostraram que a bactéria não foi capaz de degradar completamente o 2,4-D em 10 dias. O controle do 2,4-D mostrou que o tempo de retenção do herbicida foi de 7,981 minutos (Figura 15), uma vez que o método utilizado foi diferente do utilizado anteriormente. Com 10 dias é possível ver apenas o início da formação de subprodutos. É provável que a biotransformação do 2,4-D em seus subprodutos comece no segundo dia da inoculação em meio mínimo, uma vez que nesse momento começa o aumento da área de picos que podem ser subprodutos e uma leve diminuição no pico do 2,4-D (Ver Anexos).

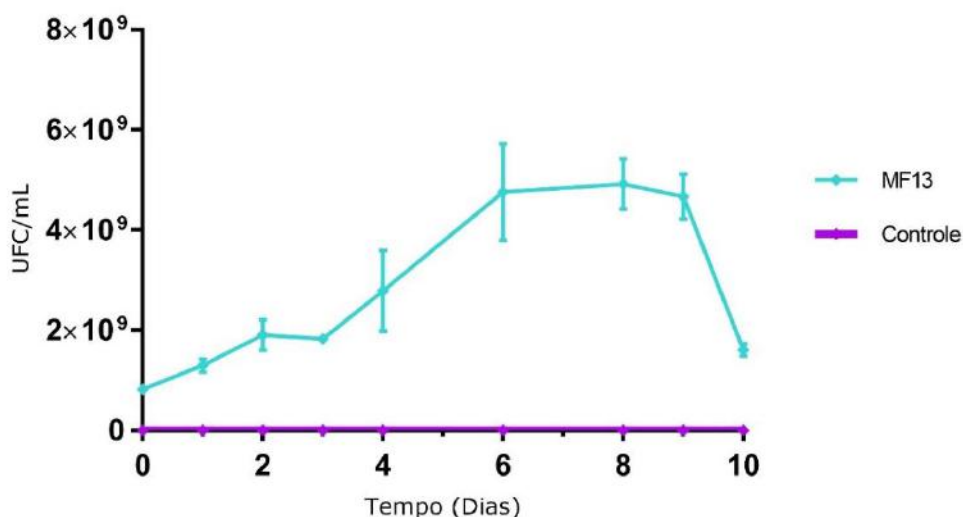


Figura 14 - Curva de crescimento da estirpe MF13 em meio 2,4-D. A curva foi realizada através dos valores de UFC/mL apresentados pela bactéria durante os 10 dias de inoculação. As barras indicam o desvio padrão de 4 repetições.

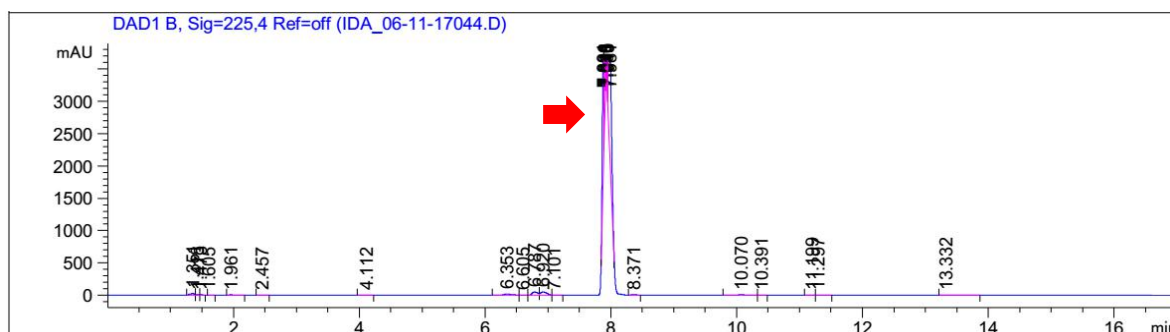


Figura 15 - Perfil cromatográfico do controle de 2,4-D. É possível ver um pico com tempo de retenção de 7,981 minutos, esse é o padrão do 2,4-D nesse método empregado. Seta vermelha – indica o pico gerado pelo 2,4-D

A comparação entre os dias 0 e dia 10 de incubação de *Ochrobactrum* sp. em meio mínimo com 2,4-D como única fonte de carbono mostra que houve apenas a formação de novos picos assim como o aumento de alguns já existentes (Figura 16). A diminuição do pico relativo ao 2,4-D não foi muito expressiva. Esses resultados podem ser melhor observados com a sobreposição de ambos os cromatogramas em uma escala menor (Figura 17), onde as setas verdes indicam a formação de picos que já existiam ao dia 0 de incubação e as setas vermelhas indicam a formação de picos que não foram observados no dia 0.

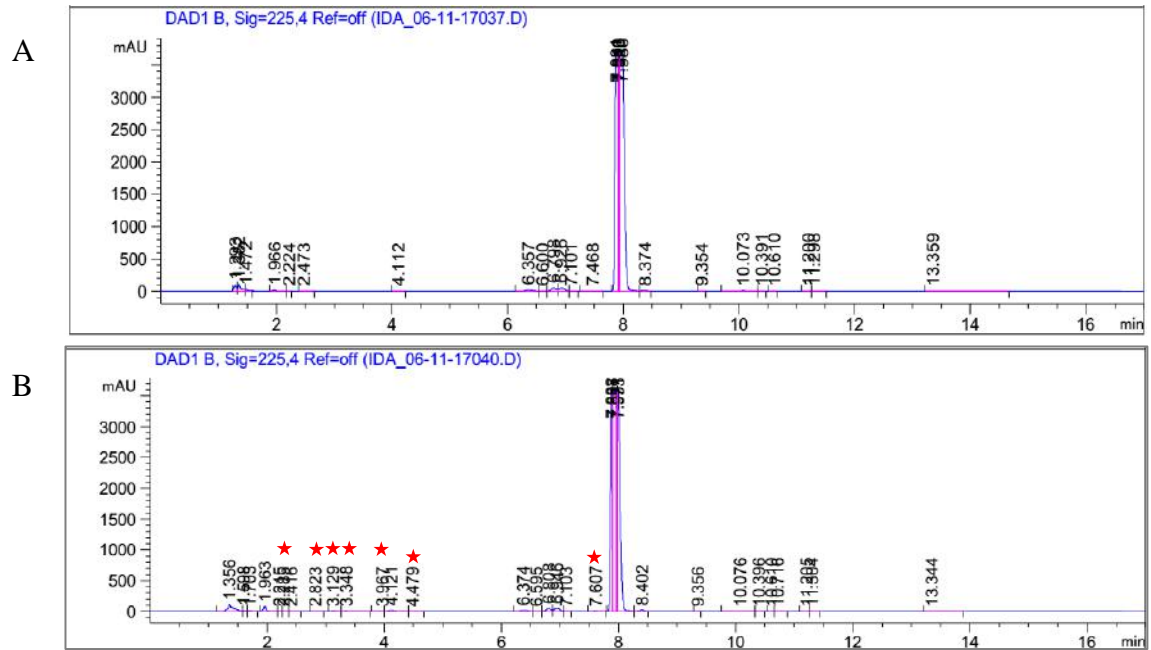


Figura 16 - Comparação entre os dias 0 e 10 do cromatograma gerado por *Ochrobactrum* MF13. (A) Cromatograma relativo ao dia 0 (B) Cromatograma relativo ao dia 10. É possível observar a formação de novos produtos.

Estrelas vermelhas – indicam a formação de novos produtos

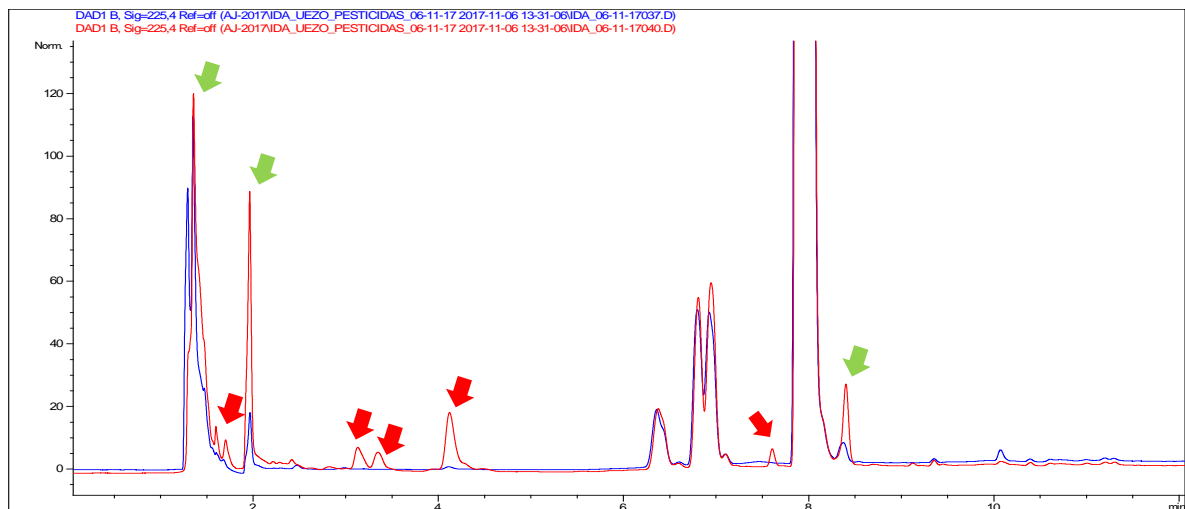


Figura 17 - Sobreposição dos cromatogramas gerados no dia 0 e 10 por *Ochrobactrum* MF13. A linha azul representa o dia 0, enquanto a linha vermelha representa o dia 10. É possível observar a formação de novos produtos e o aumento dos sinais dos produtos já existentes.

Setas vermelhas – indicam a formação de novos produtos

Setas verdes – indicam o aumento dos sinais já existente

4. DISCUSSÃO

Existe uma grande preocupação em torno dos problemas que o uso extensivo de agrotóxicos nas lavouras podem desencadear no meio ambiente. Resíduos desses compostos se acumulam no solo e na água, tornando-se um problema grave ao redor do mundo devido a toxicidade e persistência desses compostos na natureza. Entre os tipos de agrotóxicos existentes, destaca-se o uso dos herbicidas, a classe de agrotóxicos mais utilizada no Brasil. Dentre eles, o uso do herbicida 2,4-D, o segundo mais utilizado no Brasil, também pode ser ressaltado devido a sua toxicidade e danos que pode trazer à saúde humana. Logo, estudos que tem como objetivo minimizar a concentração desse herbicida no meio ambiente estão se fazendo cada vez mais necessários. Diversas técnicas podem ser utilizadas para esse fim, entretanto, a biodegradação de agrotóxicos por microrganismos é considerada um dos meios mais sustentáveis e de baixo impacto ambiental para promover a remediação de um ambiente contaminado.

Apesar de ser um composto tóxico, diversos trabalhos já relataram a biodegradação do 2,4-D e seus subprodutos por bactérias de diferentes gêneros como *Burkholderia* spp., *Pseudomonas* spp., *Sphingomonas* spp. (Cycoń, Zmijowska e Piotrowska-Seget, 2011), *Novosphingobium* spp. (Dai *et al.*, 2015), *Delftia* spp. (González *et al.*, 2012), *Dyella* spp., *Mycobacterium* spp., *Microbacterium* spp. (González-Cuna *et al.*, 2016) e *Cupriavidus* spp. (Zabaloy e Gómez, 2013; Han, Zhao e Li, 2017). Entretanto, poucos estudos se propuseram a isolar bactérias encontradas em solo brasileiro com tal capacidade de degradação, o que pode ser considerado um problema quando o objetivo é aplicação de um microrganismo em processos biotecnológicos, como a biorremediação. Em termos de aplicação biotecnológica, o uso de microrganismos nativos normalmente é a melhor opção, uma vez que a espécie introduzida pode se tornar invasora e levar ao desequilíbrio do ecossistema e perda da biodiversidade e por que microrganismos nativos já estão adaptados ao ambiente (Faleiro, Andrade e Reis Junior, 2011). Devido a isso, Direito (2009) isolou cerca de 70 estirpes de bactérias nativas do solo brasileiro que demonstravam potencial em degradar o herbicida 2,4-D. Nosso grupo de trabalho vem estudando as estirpes dessa coleção procurando aquelas que se destacam na biodegradação desse herbicida. Este trabalho se propôs a estudar a biodegradação do herbicida 2,4-D por algumas estirpes dessa coleção com o objetivo de procurar uma bactéria capaz de, futuramente, ser aplicada em processos de biorremediação de solos contaminados. Para esse propósito, foram estudadas as estirpes DG01, DG02, MC02, MF13, MF19, MF20, MF23 e MG04 desta coleção de bactérias.

A técnica de CLAE foi a escolhida para analisar a degradação do herbicida pelas estirpes. Segundo Amarante Júnior *et al.* (2003a; 2003b), as técnicas de cromatografia gasosa e líquida são as mais utilizadas para análise do 2,4-D e de seus subprodutos, entretanto, apesar das técnicas de cromatografia gasosa serem mais sensíveis, as técnicas de cromatografia líquida, como o CLAE, são mais rápidas e simples de se executar (Chávez-Moreno *et al.*, 2012). As estirpes foram submetidas ao mesmo teste feito por nosso grupo anteriormente, onde foram inoculadas por 30 dias em meio mínimo contendo o 2,4-D como única fonte de carbono (Direito, 2009; Peckle, 2015). Todas foram capazes de crescer em meio mínimo contendo 2,4-D como única fonte de carbono, o que mostra que a maioria das estirpes manteve a capacidade de crescer nesse meio, como visto anteriormente por Direito (2009) e tem grande potencial na degradação desse herbicida. Esse resultado é um indício de que os genes que codificam para a degradação desse composto podem estar integrados em seus cromossomos e não em plasmídeos, como é mais comum de ser descrito na literatura, uma vez que as bactérias estavam a muito tempo sem entrar em contato com o 2,4-D (Suwa *et al.*, 1996; Kumar *et al.*, 2014). Um dos trabalhos que mostrou que os genes de degradação do 2,4-D podem ser encontrados no cromossomo é o de Suwa *et al.* (1996), onde eles observaram que o plasmídeo pRASC que a bactéria *Burkholderia* sp. RASC possuía não apresentava homologia aparente ao plasmídeo pJP4 de *Cupriavidus necator* JMP134, conhecido por carregar os genes de degradação do 2,4-D. Para demonstrar que os genes para degradação do 2,4-D estavam codificados no cromossomo, eles obtiveram isolados de *Burkholderia* sp. RASC sem plasmídeos e conferiram que mesmo sem a presença deles na célula a bactéria ainda apresentava a capacidade de degradação do herbicida (Suwa *et al.*, 1996).

Os resultados obtidos com CLAE mostraram que as estirpes DG01, DG02, MC02, MF19, MF20, MF23 e MG04 foram capazes de biotransformar o herbicida, pois seus cromatogramas apresentam picos que demonstravam a formação de subprodutos. A estirpe MF13 apresentou um cromatograma que sugere a completa degradação do composto, uma vez que nenhum pico foi detectado no CLAE. Entretanto, não é possível afirmar isso apenas por essa análise. Para essa análise, pode ser feito futuramente a técnica de CLAE acoplada com Espectrometria de Massas para análise de quais subprodutos são gerados, assim é possível analisar se essa estirpe faz a degradação completa do 2,4-D. Por ter apresentado um padrão de degradação muito bom nas análises por CLAE, essa estirpe foi selecionada para continuar o estudo.

O passo seguinte deste estudo foi identificar a estirpe que foi selecionada através das análises com CLAE. A estirpe MF13 foi identificada pelo sequenciamento da região 16S rDNA e foi visto que pertencia a *Ochrobactrum* spp., se mostrando intimamente relacionada com a

espécie *Ochrobactrum ciceri* quando feita a árvore filogenética. O gênero *Ochrobactrum* é cosmopolita, sendo encontrado em diversos locais ao redor do mundo, normalmente associados ao meio ambiente, principalmente no solo, na rizosfera e associados às plantas (Imran et al., 2015). Muitas espécies do gênero são descritas como auxiliadoras no crescimento das plantas, o que as torna de extrema importância para a microbiologia agrícola, inclusive *O. ciceri* (Trujillo et al., 2005; Zurdo-Pineiro et al., 2007; Imran et al., 2010). A espécie *O. ciceri* foi isolada em 1996 de nódulos de grão-de-bico (*Cicer arietinum*), no Paquistão (Imran et al., 2010). Já foi verificada a sua capacidade de produzir o fitohormônio AIA e de estimular o crescimento de duas variedades de grão-de-bico, auxiliando no aumento da formação de nódulos e da biomassa, no tamanho da planta, na proliferação de raízes, na ramificação primária e secundária e também no rendimento de grãos (Imran et al., 2015). *O. ciceri* também já foi descrita produzindo biofloculantes a partir de hidrolisados de palha de milho e sem a necessidade de adição de sais de fosfato extra, o que reduz o custo da produção do biofloculante, além de utilizar resíduos da agricultura para produção de produtos biológicos (Wang et al., 2012).

Além disso, estirpes do gênero *Ochrobactrum* possuem características que podem ser consideradas importantes quando se trata da aplicação de microrganismos em processos biotecnológicos, como a ampla faixa de temperatura que ele é capaz de crescer e a resistência a liofilização (Holmes, 2015), permitindo a produção de bioinoculantes, como o descrito por Peckle (2015), que produziu com uma estirpe da coleção de Direito (2009) um bioinoculante agrícola liofilizado com ação de biorremediação do 2,4-D e biocontrole. O gênero *Ochrobactrum* é extensamente descrito como capaz de degradar diversos tipos de moléculas tóxicas e persistentes, sendo descrita degradando agrotóxicos de vários tipos. Apesar de extenso o número de estudos descrevendo a biodegradação de agrotóxicos por *Ochrobactrum* spp., nenhum estudo além do de Direito (2009) falou sobre a degradação do 2,4-D por esse gênero em específico.

Após a identificação da estirpe, o passo seguinte foi estudar como ocorria a degradação do herbicida pela *Ochrobactrum* sp. Peckle (2012) observou que alguns isolados da coleção de Direito (2009) conseguiam realizar a degradação do 2,4-D em 14 dias, havendo indícios de que a degradação ocorria antes. Dessa forma, nosso grupo de trabalho diminuiu o tempo de incubação de 30 para 10 dias, aumentando o inóculo inicial de células, com a expectativa de que com 10 dias a estirpe MF13 fosse capaz de degradar o 2,4-D. Entretanto, após 10 dias de inoculação, não foi possível observar a degradação completa do herbicida como visto anteriormente. Diversos fatores podem explicar tais resultados, o primeiro é o fato de que a

degradação do herbicida por *Ochrobactrum* sp. foi descrita primeiramente com 30 dias de inoculação em meio 2,4-D. Não havia qualquer indício anterior que essa bactéria em questão seria capaz de degradar em apenas 10 dias, apesar do aumento do número de células no início do experimento. Outro é que as condições do experimento, como temperatura, concentração de 2,4-D, tempo de inoculação e pH poderiam ter sido alteradas para tentar otimizar o tempo de degradação do herbicida pela bactéria.

Sendo o objetivo estudar em qual momento começa a degradação do 2,4-D pela *Ochrobactrum* MF13 e quais subprodutos estão sendo gerados, uma concentração de 2,4-D menor que 500 mg/L, a utilizada nesta monografia, pode ser utilizada para tal fim. Como por exemplo, Araújo e Orlanda (2014), que também utilizaram meio mineral mínimo suplementado com 2,4-D como única fonte de carbono na concentração de 100 mg/L, menor do que a concentração utilizada por nosso grupo de trabalho. Foi observado que as linhagens de bactérias F5, F7, M5 e M6, isoladas de amostras de solo de cultivo de feijão e mandioca conseguiram degradar mais de 80% do 2,4-D em 7 dias (Araújo e Orlanda, 2014). Outros trabalhos também descrevem a degradação do herbicida 2,4-D em meio mineral mínimo na concentração de 100 mg/L como Cycoń, Zmijowska e Piotrowska-Seget (2011), que viram a degradação do 2,4-D em 10 dias por *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* sp. e *Sphingomonas paucimobilis*. Ambos os estudos citados acima conseguiram observar a degradação em até 10 dias, o que era pretendido observar neste trabalho, porém a degradação só foi observada pela estirpe *Ochrobactrum* MF13 em 30 dias. Além da concentração, outros fatores podem ser levados em consideração para estudar uma forma de observar a degradação do 2,4-D por *Ochrobactrum* MF13 em um tempo menor que 30 dias. Como Xia *et al.* (2016), que estudou diversos parâmetros que poderiam influenciar na taxa de degradação do 2,4-D pela bactéria *Achromobacter* sp. LZ35, isolada de solo contaminado com 2,4-D. Para descobrir as condições ótimas da degradação do herbicida por essa bactéria diversos fatores foram estudados, como a concentração inicial de 2,4-D, a temperatura e o pH do meio. Foi determinado que as condições de degradação ótima do 2,4-D por *Achromobacter* sp. LZ35 foi a 30°C e pH 8 quando concentração inicial de 2,4-D era de 200 mg/L. Nessas condições, cerca de 70% do 2,4-D era degradado em 24 horas por essa bactéria. As condições são diferentes das utilizadas em nosso grupo, onde a temperatura de incubação é de 28°C, pH 7,5 e concentração de 2,4-D de 500 mg/L. Xia *et al.* (2016) também observou que nas concentrações acima de 500 mg/L a taxa de degradação do 2,4-D diminuía seriamente, assim como o crescimento da bactéria, justamente a concentração utilizada neste estudo. Esses fatores podem ser levados em consideração futuramente para o estudo da biodegradação do 2,4-D por *Ochrobactrum* MF13 e dos

subprodutos que são gerados ao longo desse processo. Experimentos futuros podem tanto manter os 30 dias de inoculação, como estudado anteriormente, como também modificar alguns parâmetros para otimizar o estudo da degradação. Por exemplo, para otimizar a degradação do herbicida pode-se utilizar concentrações menores de 2,4-D e estudar o efeito do pH e temperatura de incubação na degradação do herbicida por *Ochrobactrum* MF13. De qualquer forma, estudos posteriores devem ser realizados para analisar em detalhes a biodegradação do 2,4-D por essa bactéria e a formação dos subprodutos durante esse processo.

5. CONCLUSÃO

- As estirpes DG01, DG02, MC02, MF13, MF19, MF20, MF23 e MG04 da coleção de culturas bacterianas do LBSBM se mostraram capazes de crescer em meio mínimo contendo 2,4-D como única fonte de carbono, demonstrando que ainda possuem o potencial em degradar o 2,4-D conforme visto por Direito (2009);
- Utilizando a técnica de CLAE foi possível verificar a degradação/biotransformação do herbicida pelas estirpes. As estirpes DG01, DG02, MC02, MF13, MF19, MF20, MF23 e MG04 foram capazes de biotransformar o 2,4-D, enquanto a estirpe MF13 apresentou um cromatograma que sugere a degradação desse composto. Por isso, a estirpe MF13 foi escolhida para continuar os experimentos;
- Através do sequenciamento da região 16S rDNA da estirpe MF13 foi possível montar uma árvore filogenética onde ela foi identificada como pertencente ao gênero *Ochrobactrum*.
- Não foi possível estudar a geração de subprodutos de degradação do 2,4-D por *Ochrobactrum* MF13 com apenas 10 dias de experimento. Sendo necessário repetir esse teste utilizando outras condições de experimento.

6. REFERÊNCIAS.

- Abigail, E. A., Samuel, M., Needhidasam, S. e Ramalingam, C. (2017). Stratagems employed for 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid removal from polluted water sources. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 19(6), 1607-1620.
- Abraham, J. e Silambarasan, S. (2016). Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol using a novel bacterium *Ochrobactrum* sp. *JAS2: A proposal of its metabolic pathway. Pesticide biochemistry and physiology*, 126, 13-21.
- Amarante Júnior, O. P., Santos, T. C. R., Brito, N. M. e Ribeiro, M. L. (2002). Revisão das propriedades, usos e legislação do Ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D). *Cad. Pesq.*, 13(1), 60-70.
- Amarante Júnior, O. P., Santos, T. D. e Nunes, G. S. (2003a). Breve revisão de métodos de determinação de resíduos do herbicida ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D). *Química Nova*, 26(2), 223-229.
- Amarante Júnior, O. P.; Brito, N. M.; Santos, T. C. R.; Nunes, G. S. e Ribeiro, M. L. (2003b). Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its major transformation product in soil samples by liquid chromatographic analysis. *Talanta*, 60, 115-121.
- ANVISA (2017). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. Disponível em: <<http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao>> . Acesso em: 11 nov. 2017.
- Araújo, A. S. F. (2002). Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 83f.
- Araújo, L. C. A. e Orlanda, J. F. F. (2014). Biodegradação Do Herbicida 2,4-D Utilizando Bactérias Seleccionadas Do Solo Do Cerrado Maranhense. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 24, 21-32.
- Aujoulat, F., Romano-Bertrand, S., Masnou, A., Marchandin, H. e Jumas-Bilak, E. (2014). Niches, population structure and genome reduction in *Ochrobactrum intermedium*: clues to technology-driven emergence of pathogens. *PLoS One*, 9(1), e83376.
- Barret, M., Morrissey, J. P. e O’Gara, F. (2011). Functional genomics analysis of plant growth-promoting rhizobacterial traits involved in rhizosphere competence. *Biology and Fertility of Soils*, 47(7), 729.
- Bathe, S., Achouak, W., Hartmann, A., Heulin, T., Schlöter, M. e Leubhn, M. (2005). Genetic and phenotypic microdiversity of *Ochrobactrum* spp. *FEMS microbiology ecology*, 56(2), 272-280.
- Batool, R. e Hasnain, S. (2009). Phytostimulatory effects of chromium reducing ochrobactrum intermedium and *Pseudomonas aeruginosa* on *Triticum aestivum* Growth. *New Biotechnology*, 25, S310.
- Benevides, J. A. J. e Marinho, G. (2015). Degradação de Pesticidas por Fungos – Uma Revisão. *Holos*, 2, 110-129.
- Bento, F. M.; Camargo, F. A. O.; Okeke, B. e Frankenberger-Júnior, W. T. (2003). Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34(1), 65-68.
- Bezza, F. A., Beukes, M. e Chirwa, E. M. N. (2015). Application of biosurfactant produced by *Ochrobactrum intermedium* CN3 for enhancing petroleum sludge bioremediation. *Process Biochemistry*, 50(11), 1911-1922.
- Blair, A., Ritz, B., Wesseling, C. e Freeman, L. B. (2014). Pesticides and human health. *Occup Environ Med* Month, 0, 1-2.
- Boivin, A., Amellal, S., Schiavon, M. e Van Genuchten, M. T. (2005). 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) sorption and degradation dynamics in three agricultural soils. *Environmental Pollution*, 138(1), 92-99.
- Bradberry, S. M.; Proudfoot, A. T. e Vale, J. A. (2004). Poisoning due to chlorophenoxy herbicides. *Toxicol rev*, 23(2), 65-73.
- Braibante, M. E. F. e Zappe, J. A. (2012). A química dos agrotóxicos. *Química Nova na Escola*, 34(1), 10-15.
- BRASIL (1989). Lei nº 7.802, de 11 de Julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7802.htm>. Acesso em: 20 de jan. 2017.

- Bruno, A. N. (2017). Analisando Culturas Celulares. In: Biotecnologia II: aplicações e tecnologias. Bruno, A. N. (eds). (Porto Alegre: Artmed), pp 43-46.
- Burns, C. J. e Swaen, G. M. (2012). Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) biomonitoring and epidemiology. *Critical reviews in toxicology*, 42(9), 768-786.
- Campos, S. X. e Vieira, E. M. (2002). Estudo da degradação do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2, 4-D) por meio da radiação gama do cobalto-60 em solução aquosa contendo ácido húmico. *Quim. Nova*, 25(4), 529-532.
- Campos-Takaki, G. M.; Okada, K. e Nascimento, A. E. (2008). Contaminação do solo e decomposição de xenobióticos. In: *Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura*. Figueiredo, M. V. B.; Burity, H. A.; Stamford, N. P. e Santos, C. E. R. S., eds. (Guaíba: Agrolivros), pp. 441-461.
- Cardoso, E. J. B. N. e Andreote, F. D. (2016). Introdução à biologia do solo. In: *Microbiologia do Solo*. Cardoso, E. J. B. N. e Andreote, F. D., eds. (Piracicaba, ESALQ), pp. 09-22.
- Cardoso, E. J. B. N., Tsai, S. M. e Neves, M. C. P. (1992). *Microbiologia do solo*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.
- Carneiro, F. F, Rigotto, R. M, Augusto, L.G. Da Silva, Friedrich, K. e Búrigo, A. C. (2015). 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.
- Castro, J. (1999). Práticas de uso de agrotóxicos no município de Cachoeiras de Macacu, RJ: um estudo de saúde ambiental. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Geociências, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 159f.
- Castro, R. A., Quecine, M. C., Lacava, P. T., Batista, B. D., Luvizotto, D. M., Marcon, J., Ferreira, A., Melo, I. S., e Azevedo, J. L. (2014). Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. *SpringerPlus*, 3(1), 382.
- Chai, L. J., Jiang, X. W., Zhang, F., Zheng, B. W., Shu, F. C., Wang, Z. L., Cui, Q. F., Dong, H. P., Zhang, Z. Z., Hou, D. J. e She, Y. H. (2015). Isolation and characterization of a crude oil degrading bacteria from formation water: comparative genomic analysis of environmental *Ochrobactrum intermedium* isolate versus clinical strains. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 16(10), 865-874.
- Chang, Y. C., Reddy, M. V., Umemoto, H., Sato, Y., Kang, M. H., Yajima, Y. e Kikuchi, S. (2015). Bio-augmentation of *Cupriavidus* sp. CY-1 into 2, 4-D contaminated soil: microbial community analysis by culture dependent and independent techniques. *PloS one*, 10(12), e0145057.
- Chaturvedi, V. e Verma, P. (2015). Biodegradation of malachite green by a novel copper-tolerant *Ochrobactrum pseudogrignonense* strain GGUPV1 isolated from copper mine waste water. *Bioresources and Bioprocessing*, 2(1), 42.
- Chaudhry, G. R. e Huang, G. H. (1988). Isolation and characterization of a new plasmid from a *Flavobacterium* sp. which carries the genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Journal of bacteriology*, 170(9), 3897-3902.
- Chong, N. M. (2005). Development of a tool for measuring the degradation capacity of microorganisms for a xenobiotic. *Enzyme and microbial technology*, 37(5), 467-471.
- Cotta, S. R. (2016). O solo como ambiente para a vida microbiana. In: *Microbiologia do Solo*. Cardoso, E. J. B. N. e Andreote, F. D., eds. (Piracicaba, ESALQ), pp. 23-35.
- Cycoń, M., Żmijowska, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2011). Biodegradation kinetics of 2, 4-D by bacterial strains isolated from soil. *Open Life Sciences*, 6(2), 188-198.
- Dai, Y., Li, N., Zhao, Q. e Xie, S. (2015). Bioremediation using *Novosphingobium* strain DY4 for 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid-contaminated soil and impact on microbial community structure. *Biodegradation*, 26(2), 161-170.
- Das, P. P., Shaik, A. P. e Jamil, K. (2007). Genotoxicity induced by pesticide mixtures: in-vitro studies on human peripheral blood lymphocytes. *Toxicology and industrial health*, 23(8), 449-458.
- Dellamatrice, P. M. e Monteiro, R. T. (2014). Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 18(12), 1296-1301.
- Dennis, J. J. (2005). The evolution of IncP catabolic plasmids. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 291-298.

- Direito, I. C. N (2009). Bioprospecção e interações de populações bacterianas degradadoras do herbicida 2,4-D em solos agrícolas. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biotecnologia vegetal) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 190f.
- Don, R. H. e Pemberton, J. M. (1981). Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of bacteriology*, 145(2), 681-686.
- Don, R. H. e Pemberton, J. M. (1985). Genetic and physical map of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid pJP4. *Journal of bacteriology*, 161(1), 466-468.
- Evans, W. C., Smith, B. S. W., Fernley, H. N. e Davies, J. I. (1971). Bacterial metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Biochemical Journal*, 122(4), 543-551.
- Faisal, M. e Hasnain, S. (2006). Growth stimulatory effect of *Ochrobactrum intermedium* and *Bacillus cereus* on *Vigna radiata* plants. *Letters in applied microbiology*, 43(4), 461-466.
- Faleiro, F. G., Andrade, S. R. M. e Reis Junior, F. B. (2011). Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária. Embrapa Cerrados-Livros técnicos (INFOTECA-E).
- Fasanella, C. C. e Cardoso, E.J.B.N. (2016). Biorremediação. In: Microbiologia do solo. Cardoso, E.J.B.N. e Andreote, F. D., eds. (Piracicaba, ESALQ), pp. 197-210.
- Ferhat, S., Alouaoui, R., Badis, A. e Moulai-Mostefa, N. (2017). Production and characterization of biosurfactant by free and immobilized cells from *Ochrobactrum intermedium* isolated from the soil of southern Algeria with a view to environmental application. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 1-10.
- Ferreira, J. V. R. (2012). Bioprospecção e identificação de microrganismos com potencial biotecnológico para biorremediação na interface solo-planta-microrganismos. Monografia (Graduação em Tecnologia em Biotecnologia) – Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, 42f.
- Füchslin, H. P., Rüegg, I., Der Meer, V., Roelof, J. e Egli, T. (2003). Effect of integration of a GFP reporter gene on fitness of *Ralstonia eutropha* during growth with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Environmental microbiology*, 5(10), 878-887.
- Garabrant, D. H. e Philbert, M. A. (2002). Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) epidemiology and toxicology. *Critical reviews in toxicology*, 32(4), 233-257.
- García, F. P., Ascencio, S. Y. C., Oyarzun, J. C. G., Hernandez, A. C. e Alavarado, P. V. (2012). Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks. *Journal of Research in Environmental Science and Toxicology* (ISSN: 2315-5698) Vol, 1(11), 279-293.
- González, A. J., Fortunato, M. S., Gallego, A. e Korol, S. E. (2017). Simultaneous Biodegradation and Detoxification of the Herbicides 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and 4-Chloro-2-Methylphenoxyacetic Acid in a Continuous Biofilm Reactor. *Water, Air, & Soil Pollution*, 228(8), 300.
- González, A. J., Gallego, A., Gemini, V. L., Papalia, M., Radice, M., Gutkind, G., Planes, E. e Korol, S. E. (2012). Degradation and detoxification of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) by an indigenous *Delftia* sp. strain in batch and continuous systems. *International biodeterioration & biodegradation*, 66(1), 8-13.
- González-Cuna, S., Galíndez-Mayer, J., Ruiz-Ordaz, N., Murugesan, S., Piña-Escobedo, A., García-Mena, J., Lima-Martínez, E. e Santoyo-Tepole, F. (2016). Aerobic biofilm reactor for treating a commercial formulation of the herbicides 2,4-D and dicamba: Biodegradation kinetics and biofilm bacterial diversity. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 107, 123-131.
- Goodman, J. E., Loftus, C. T. e Zu, K. (2017). 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid and non-Hodgkin's lymphoma: results from the Agricultural Health Study and an updated meta-analysis. *Annals of Epidemiology*, 27(4), 290-292.
- Graillet, V., Takakura, N., Hegarat, L. L., Fessard, V., Audebert, M. e Cravedi, J. P. (2012). Genotoxicity of pesticide mixtures present in the diet of the French population. *Environmental and molecular mutagenesis*, 53(3), 173-184.
- Grossmann, K. (2010). Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest management science*, 66(2), 113-120.
- Guerin, W. F. e Boyd, S. A. (1997). Bioavailability of naphthalene associated with natural and synthetic sorbents. *Water Research*, 31(6), 1504-1512.

- Hadi, F., Mousavi, A., Noghabi, K. A., Tabar, H. G. e 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.
- Han, L., Zhao, D. e Li, C. (2015). Isolation and 2, 4-D-degrading characteristics of *Cupriavidus campinensis* BJ71. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 433-441.
- Holmes, B. (2015). *Ochrobactrum*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 1–7.
- Holmes, B., Popoff, M., Kiredjian, M. e Kersters, K. (1988). *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(4), 406-416.
- Huber, B., Scholz, H. C., Kämpfer, P., Falsen, E., Langer, S. e Busse, H. J. (2010). *Ochrobactrum pituitosum* sp. nov., isolated from an industrial environment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(2), 321-326.
- IARC (2015). The International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs evaluate DDT, lindane, and 2,4-D. Disponível em: <https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr236_E.pdf>. Acesso em: 18 abr. 2017.
- IBGE (2015). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores do Desenvolvimento Sustentável. Estudos e Pesquisa, Informação Geográfica número 10. Brasil, 348p.
- Imran, A., Hafeez, F. Y., Frühling, A., Schumann, P., Malik, K. A. e Stackebrandt, E. (2010). *Ochrobactrum ciceri* sp. nov., isolated from nodules of *Cicer arietinum*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(7), 1548-1553.
- Imran, A., Mirza, M. S., Shah, T. M., Malik, K. A. e Hafeez, F. Y. (2015). Differential response of kabuli and desi chickpea genotypes toward inoculation with PGPR in different soils. *Frontiers in microbiology*, 6.
- Imran, A., Saadalla, M. J. A., Khan, S. U., Mirza, M. S., Malik, K. A. e Hafeez, F. Y. (2014). *Ochrobactrum* sp. PvZ22 exhibits multiple traits of plant growth promotion, biodegradation and N-acyl-homoserine-lactone quorum sensing. *Annals of microbiology*, 64(4), 1797-1806.
- Jäckel, C., Hertwig, S., Scholz, H. C., Nöckler, K., Reetz, J. e Hammerl, J. A. (2017). Prevalence, host range, and comparative genomic analysis of temperate *Ochrobactrum* phages. *Frontiers in microbiology*, 8, 1207.
- Jervais, G., Luukinen, B., Buhl, K. e Stone, D. (2008a). 2,4-D General Fact Sheet; National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services. Disponível em: <<http://npic.orst.edu/factsheets/24Dgen.html>> Acesso em: 15 fev. 2017.
- Jervais, G., Luukinen, B., Buhl, K. e Stone, D. (2008b). 2,4-D Technical Fact Sheet; National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services. Disponível em: <<http://npic.orst.edu/factsheets/archive/2,4-DTech.html>>. Acesso em: 15 fev. 2017.
- Juárez, M. F. D.; Waldhuber, S.; Knapp, A.; Partl, C.; Gómez-Brandón, M. e Insam, H. (2013). Wood ash effects on chemical and microbiological properties of digestate-and manure-amended soils. *Biology and fertility of soils*, 49(5), 575-585.
- Kämpfer, P., Buczolits, S., Albrecht, A., Busse, H. J. e Stackebrandt, E. (2003). Towards a standardized format for the description of a novel species (of an established genus): *Ochrobactrum gallinifaecis* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(3), 893-896.
- Kämpfer, P., Huber, B., Busse, H. J., Scholz, H. C., Tomaso, H., Hotzel, H. e Melzer, F. (2011). *Ochrobactrum pecoris* sp. nov., isolated from farm animals. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(9), 2278-2283.
- Kämpfer, P., Scholz, H. C., Huber, B., Falsen, E. e Busse, H. J. (2007). *Ochrobactrum haematophilum* sp. nov. and *Ochrobactrum pseudogrignonense* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(11), 2513-2518.
- Kämpfer, P., Sessitsch, A., Schloter, M., Huber, B., Busse, H. J. e Scholz, H. C. (2008). *Ochrobactrum rhizosphaerae* sp. nov. and *Ochrobactrum thiophenivorans* sp. nov., isolated from the environment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(6), 1426-1431.
- Kim, K. H., Kabir, E. e Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment*, 575, 525-535.

- Kumar, A., Trefault, N. e Olaniran, A. O. (2014). 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.
- Lebuhn, M., Achouak, W., Schloter, M., Berge, O., Meier, H., Barakat, M., Hartmann, A. e Heulin, T. (2000). Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6), 2207-2223.
- Lee, T. H., Kurata, S., Nakatsu, C. H. e Kamagata, Y. (2005). 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*, 49(1), 151-162.
- Li, L., Li, Y. Q., Jiang, Z., Gao, R., Nimaichand, S., Duan, Y. Q., Egamberdieva, D., Chen, W. e Li, W. J. (2016). *Ochrobactrum endophyticum* sp. nov., isolated from roots of *Glycyrrhiza uralensis*. *Archives of microbiology*, 198(2), 171-179.
- Ljung, K., Hull, A. K., Kowalczyk, M., Marchant, A., Celenza, J., Cohen, J. D. e Sandberg, G. (2002). Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 50(2), 309-332.
- Lourençato, F. L. (2010). Potencial de contaminação de águas superficiais por agrotóxicos na microbacia hidrográfica do Campestre, Colombo, PR. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 51f.
- LPNS (2017). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/>>. Acesso em 18 jun. 2017.
- Marcondes, M. A. (2001). Influência de Aplicações de Pesticidas na Degradação do Herbicida ¹⁴C-2, 4-D em Diferentes Solos. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 78 f.
- Mattos, M. L. T. (2015). Microbiologia do Solo. In: Nunes, R.R.; Rezende, M.O.O. Recurso Solo: Propriedades e Usos. (São Carlos: Editora Cubo), p. 250-272.
- Meng, X., Yan, D., Long, X., Wang, C., Liu, Z. e Rengel, Z. (2014). Colonization by endophytic *Ochrobactrum anthropi* Mn1 promotes growth of Jerusalem artichoke. *Microbial biotechnology*, 7(6), 601-610.
- Messias, A. S. e Silva, C. A. A. (2008). Microrganismos degradadores de resíduos sólidos. In: Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. Figueiredo, M. V. B.; Burity, H. A.; Stamford, N. P. e Santos, C. E. R. S., eds. (Guaíba: Agrolivros), pp. 424-437.
- MMA (2017). Ministério do Meio Ambiente. Agrotóxicos. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acesso em: 11 nov. 2017.
- Munro, I. C., Carlo, G. L., Orr, J. C., Sund, K. G., Wilson, R. M., Kennepohl, E., Lynch, B. S. e Jablinske, M. (1992). A comprehensive, integrated review and evaluation of the scientific evidence relating to the safety of the herbicide 2, 4-D. *Journal of the American College of Toxicology*, 11(5), 559-664.
- Neder, R. N. (1992). Microbiologia – Manual de Laboratório. (São Paulo: Nobel), 137f.
- Ngom, A., Nakagawa, Y., Sawada, H., Tsukahara, J., Wakabayashi, S., Uchiumi, T., Nuntajig, A., Kotepong, S., Suzuki, A., Higashi, S. e Abe, M. (2004). A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobactrum* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. *The Journal of general and applied microbiology*, 50(1), 17-27.
- Niu, B. e Kolter, R. (2017). Complete Genome Sequences of Seven Strains Composing a Model Bacterial Community of Maize Roots. *Genome announcements*, 5(36).
- Olgun, S., Gogal, R. M., Adeshina, F., Choudhury, H. e Misra, H. P. (2004). Pesticide mixtures potentiate the toxicity in murine thymocytes. *Toxicology*, 196(3), 181-195.
- OMS – Organização Mundial De Saúde. (2010). The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009.
- OPAS/OMS (1996). Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial de Saúde. Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde.
- Ozdemir, G., Ozturk, T., Ceyhan, N., Isler, R. e Cosar, T. (2003). Heavy metal biosorption by biomass of *Ochrobactrum anthropi* producing exopolysaccharide in activated sludge. *Bioresource technology*, 90(1), 71-74.

- Pan, X., Xu, T., Xu, H., Fang, H. e Yu, Y. (2017). Characterization and genome functional analysis of the DDT-degrading bacterium *Ochrobactrum* sp. DDT-2. *Science of The Total Environment*, 592, 593-599.
- Peckle, B. A. (2012). Capacidade de degradação do herbicida ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) pelos isolados DF07 e MG07. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas). Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, 59 f.
- Peckle, B. A. (2015). Desenvolvimento de um inoculante com ação biorremediadora e de biocontrole. 2015. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 99f.
- Pemberton, J. M. e Fisher, P. R. (1977). 2,4-D plasmids and persistence. *Nature*, 268, 732-733.
- Pereira, A. R. B. e Freitas, D. A. F. (2012). Uso de micro-organismos para a biorremediação de ambientes impactados. *Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)*, 6, e2236-1170.
- Pereira, P. H. F. (2012). Avaliação do potencial biotecnológico da degradação de ácido 2,4-diclorofenoxiacético por estirpes bacterianas em solos brasileiros. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal). Programa de Pós-Graduação de Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 93 f.
- Peres, F. e Moreira, J. C. (2003). *É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ.
- Redéi, G. P. (2008). *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*. Disponível em: <<https://link.springer.com/referencework/10.1007/978-1-4020-6754-9>>. Acesso em: 15 fev. 2017.
- Reyad, A. M., Radwan, T. E. E., Ibrahim, W. M., e Essa, A. M. M. (2017). Occurrence of Atrazine Biodegrading Bacterium "*Ochrobactrum oryzae*" In Agricultural Wastewater. *Egypt.J.Bot.* **57**(2), 303- 316.
- Ribas, P. P. e Matsumura, A. T. S. (2009). A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. *Rev. Liberato, Novo Hamburgo*, 10(14), 149-158
- Roberts, J. R. e Reigart, J. R. (2013). Chlorophenoxy Herbicides. In: *Recognition and management of pesticides poisonings*. Roberts, J. R. e Reigart, J. R. 6 ed. Washington: U.S. Environmental Protection Agency, pp. 98-102.
- Rodrigues, M. V. N. e Serra, G. E. (1996). Determinação de Resíduos de 2,4D em amostras vegetais. *Pesticidas R. Téc. Cient.* 1996, 6, 99-104.
- Romagnoli, E. M. e Andreote, F. D. (2016). Rizosfera. In: *Microbiologia do solo*. Cardoso, E.J.B.N. e Andreote, F. D., eds. (Piracicaba, ESALQ), pp. 47-60.
- Saini, A., Nain, L., Garg, V. e Saxena, J. (2017). Improvement of Growth, Yield, and Pigmentation of Mung Bean Plants Using *Ochrobactrum intermedium* CP-2 as Bioinoculant. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 45(6).
- Santos, J. C., Batista, I. H., Barroso, H. S., Lima, J. M. S., Neto, P. D. Q. C., Ghelfi, A. e Pereira, J. O. (2017). Biodegradation of the fungicide carbendazim by bacteria from *Coriandrum sativum* L. rhizosphere. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 39(1), 71.
- Santos, M. D., Areas, M. A. e Reyes, F. G. R. (2007). Piretróides—uma visão geral. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 18(3), 339-349.
- Santos, T. R. e Oliveira, H. S. (2015). Agroecologia como temática de educação ambiental na preservação dos ecossistemas através da redução de agrotóxicos no contexto rural. *REMEA-Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental*, 135-147.
- Sbano, A., Ferreira, J. V. R., Peckle, B. A., Macrae, A. e Direito, I. C. N. (2013). Otimização de método cromatográfico para quantificação do herbicida ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D). *Acta Scientiae et Technicae*, 1(2), 37-46.
- Scow, K. M. e Johnson, C. R. (1996). Effect of sorption on biodegradation of soil pollutants. *Advances in agronomy*, 58, 1-56.
- Seklemova, E., Pavlova, A. e Kovacheva, K. (2001). Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. *Biodegradation*, 12, 311-316.
- Silva, A. S. (2012). Desenvolvimento e validação de método cromatográfico para quantificação do herbicida 2,4-D. Monografia (Ciências Biológicas) – Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, 37 f.

- Silva, T. M., Stets, M. I., Mazzetto, A. M., Andrade, F. D., Pileggi, S. A. V., Fávero, P. R., Cantú, M. D., Carrilho, E., Carneiro, P. I. B. e Pileggi, M. (2007). Degradation of 2, 4-D herbicide by microorganisms isolated from Brazilian contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(3), 522-525.
- Sipahutar, M. K. e Vangnai, A. S. (2017). Role of plant growth-promoting *Ochrobactrum* sp. MC22 on triclocarban degradation and toxicity mitigation to legume plants. *Journal of hazardous materials*, 329, 38-48.
- Siqueira, J. O., Moreira, F. D. S., Grisi, B. M., Hungria, M. e Araujo, R. S. (1994). Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. Embrapa Arroz e Feijão-Documentos (INFOTECA-E).
- Smith, S. C., Ainsworth, C. C., Traina, S. J. e Hicks, R. J. (1992). Effect of sorption on the biodegradation of quinoline. *Soil Science Society of America Journal*, 56(3), 737-746.
- Socol, C. R., Pinheiro, L. I. e Krefta, A. A. W. (1995). Degradação microbiológica de pesticidas no solo: revisão bibliográfica. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 5.
- Song, Y. (2014). Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. *Journal of integrative plant biology*, 56(2), 106-113.
- Sumayo, M., Hahm, M. S. e Ghim, S. Y. (2013). Determinants of plant growth-promoting *Ochrobactrum lupini* KUDC1013 involved in induction of systemic resistance against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in tobacco leaves. *The plant pathology journal*, 29(2), 174.
- Suwa, Y., Wright, A. D., Fukimori, F., Nummy, K. A., Hausinger, R. P., Holben, W. E. e Forney, L. J. (1996). Characterization of a chromosomally encoded 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid/alpha-ketoglutarate dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain RASC. *Applied and environmental microbiology*, 62(7), 2464-2469.
- Talwar, M. P., Mulla, S. I., e Ninnekar, H. Z. (2014). Biodegradation of organophosphate pesticide quinalphos by *Ochrobactrum* sp. strain HZM. *Journal of applied microbiology*, 117(5), 1283-1292.
- Teyssier, C., Marchandin, H., Jean-Pierre, H., Diego, I., Darbas, H., Jeannot, J. L., Gouby, A. e Jumas-Bilak, E. (2005). Molecular and phenotypic features for identification of the opportunistic pathogens *Ochrobactrum* spp. *Journal of medical microbiology*, 54(10), 945-953.
- Teyssier, C., Marchandin, H., Jean-Pierre, H., Masnou, A., Dusart, G., e Jumas-Bilak, E. (2007). *Ochrobactrum pseudintermedium* sp. nov., a novel member of the family Brucellaceae, isolated from human clinical samples. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(5), 1007-1013.
- Theophilo, C. F., Poli, M. F. P., Cuervo, M. R. M., Milanez, J. F., Melgarejo, L. e Pizzato, A. C. (2014). Agrotóxicos permitidos no cultivo das frutas e verduras mais consumidas pela população brasileira e algumas de suas implicações na saúde. *Revista da Graduação*, 7(1).
- Thoma, B., Straube, E., Scholz, H. C., Al Dahouk, S., Zöllner, L., Pfeffer, M., Neubauer, H. e Tomaso, H. (2009). Identification and antimicrobial susceptibilities of *Ochrobactrum* spp. *International Journal of Medical Microbiology*, 299(3), 209-220.
- Thomas, R., Janardhanan, A., Varghese, R. T., Soniya, E. V., Mathew, J. e Radhakrishnan, E. K. (2014). Antibacterial properties of silver nanoparticles synthesized by marine *Ochrobactrum* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4), 1221-1227.
- Tripathi, A. K., Verma, S. C., Chowdhury, S. P., Lebuhn, M., Gatteringer, A. e Schloter, M. (2006). *Ochrobactrum oryzae* sp. nov., an endophytic bacterial species isolated from deep-water rice in India. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(7), 1677-1680.
- Trujillo, M. E., Willems, A., Abril, A., Planchuelo, A. M., Rivas, R., Ludena, D., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. e Velázquez, E. (2005). Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1318-1327.
- USEPA (2012). United States Environmental Protection Agency. A citizen's guide to bioremediation. Disponível em: < https://clu-in.org/download/Citizens/a_citizens_guide_to_bioremediation.pdf >. Acesso em: 14 mar. 2017.
- Veiga, M. M., Silva, D. M., Veiga, L. B. E. e de Castro Faria, M. V. (2006). Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. *Cad. Saúde Pública*, 22(11), 2391-2399.
- Velasco, J., Romero, C., López-Goñi, I., Leiva, J., Díaz, R. e Moriyón, I. (1998). Evaluation of the relatedness 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 and Evolutionary Microbiology, 48(3), 759-768.
- Vieira, E. M., Prado, A. D., Landgraf, M. D. e Rezende, M. D. O. (1999). Estudo da adsorção/dessorção do ácido 2, 4 diclorofenoxiacético (2, 4-D) em solo na ausência e presença de matéria orgânica. Química Nova, 22(3), 305-308.
- Voos, G. e Groffman, P. M. (1997). Dissipation of 2,4-D and dicamba in a heterogeneous landscape. Applied Soil Ecology, 5(2), 181-187.
- Wang, L., Ma, F., Lee, D. J., Wang, A. e Ren, N. (2013). Biofloculants from hydrolysates of corn stover using isolated strain *Ochrobactum ciceri* W2. Bioresource technology, 145, 259-263.
- Woo, S. G., Ten, L. N., Park, J. e Lee, M. (2011). *Ochrobactrum daejeonense* sp. nov., a nitrate-reducing bacterium isolated from sludge of a leachate treatment plant. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 61(11), 2690-2696.
- Xia, Z. Y., Zhang, L., Zhao, Y., Yan, X., Li, S. P., Gu, T. e Jiang, J. D. (2016). Biodegradation of the Herbicide 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid by a New Isolated Strain of *Achromobacter* sp. LZ35. Current microbiology, 74(2), 193-202.
- Xu, S., Liu, Y., Wang, J., Yin, T., Han, Y., Wang, X. e Huang, Z. (2015). Isolation and potential of *Ochrobactrum* sp. NW-3 to increase the growth of cucumber. International Journal of Agricultural Policy and Research, 3(9), 341-350.
- Yang, Y., Yu, X. e Zhang, R. (2013). Draft genome sequence of *Ochrobactrum pseudogrignonense* strain CDB2, a highly efficient arsenate-resistant soil bacterium from arsenic-contaminated cattle dip sites. Genome announcements, 1(2), e00173-13.
- Young, E. (2012). 2,4-D Graphical pathway map. Disponível em: <http://eawag-bbd.ethz.ch/2,4-d/2,4-d_image_map1.html>. Acesso em: 6 abr. 2017.
- Yu, H., Li, Y., Tang, H. e Xu, P. (2014). Genome Sequence of a Newly Isolated Nicotine-Degrading Bacterium, *Ochrobactrum* sp. SJY1. Genome announcements, 2(4), e00720-14.
- Yu, X., Li, Y., Cui, Y., Liu, R., Chen, Q., Gu, Y., Zhao, K., Xiang, Q., Xu, K. e Zhang, X. (2017). An indoleacetic acid-producing *Ochrobactrum* sp. MGJ11 counteracts cadmium effect on soybean by promoting plant growth. Journal of applied microbiology, 122(4), 987-996.
- Yun, H., Liang, B., Kong, D., Li, Z., Qi, G. e Wang, A. (2016). Enhanced Biotransformation of Triclocarban by *Ochrobactrum* sp. TCC-1 Under Anoxic Nitrate Respiration Conditions. Current microbiology, 74(4), 491-498.
- Zabaloy, M. C. e Gómez, M. A. (2014). Isolation and characterization of indigenous 2, 4-D herbicide degrading bacteria from an agricultural soil in proximity of Sauce Grande River, Argentina. Annals of microbiology, 64(3), 969-974.
- Zasso, M. A. D. C., Attuati, M. A., Fernandes, S. B. V. e Uhde, L. T. (2014). A dimensão humana dos problemas ambientais. In: Meio ambiente e sustentabilidade. Zasso, M. A. D. C., Ferreira, F., Lucchese, O., Attuati, M. A., Fernandes, S. B. V., e Uhde, L. T, eds. (Ijuí: Ed. Inujuí), pp.73-75.
- Zhao, W., Xu, L., Li, D., Li, X., Wang, C., Zheng, M., Pan, C. e Qiu, L. (2015). Biodegradation of thifensulfuron-methyl by *Ochrobactrum* sp. in liquid medium and soil. Biotechnology letters, 37(7), 1385-1392.
- Zurdo-Piñero, J. L., Rivas, R., Trujillo, M. E., Vizcaino, N., Carrasco, J. A., Chamber, M., Palomares, A., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. e Velazquez, E. (2007). *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57(4), 784-788.

ANEXOS

I. MEIO LURIA-BERTANI (LB):

Componente	Quantidade
Peptona	10 g
Extrato de Levedura	5 g
NaCl	10 g
Para o meio sólido	
Ágar	20 g
Para meio enriquecido com 2,4-D	
2,4-D	300 mg

Modo de preparo:

Misturar todos os reagentes até que fique homogêneo. Avolumar para 1000mL com água destilada e ajustar o pH para 7,0. Para o meio sólido, adicionar o ágar ao fim. Autoclavar por 15 minutos.

II. MEIO 2,4-D (Füschlin *et al.*, 2003):

➤ Fração Autoclavável:

Componente	Quantidade
NH ₄ Cl	275 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	75 mg
CaCl ₂ .H ₂ O	5 mg
KCl	35 mg
FeCl ₂	1,5 mg
H ₃ BO ₃	60 µg
MnCl ₂ .4H ₂ O	100 µg
CoCl ₂ .6H ₂ O	120 µg
ZnCl ₂	70 µg
NiCl ₂ .6H ₂ O	25 µg
CuCl ₂ .2H ₂ O	15 µg
NaMoO ₄ .2H ₂ O	25 µg
EDTA.Na ₄ (H ₂ O) ₄	14 µL

➤ **Fração filtrável:**

Componente	Quantidade
2,4-D	500 mg
Tampão fosfato (Na₂HPO₄.2H₂O/KH₂PO₄ 0,56 M pH 7,5)	100 mL
Solução de vitaminas	50 µL

Modo de Preparo do meio 2,4-D:

Misturar todos os reagentes da solução autoclavável e avolumar para 900 mL com água destilada. Autoclavar por 15 minutos. Quando a solução autoclavável atingir 60°C aproximadamente, adicionar por filtração com filtro de porosidade 0,22 µm o 2,4-D, tampão fosfato e solução de vitaminas. A solução de vitaminas deve ser diluída no tampão fosfato para filtragem. O 2,4-D deve ser diluído em 2 mL de etanol e então filtrado e adicionado ao meio. Homogeneizar o meio.

Modo de preparo da solução de vitaminas:

Componente	Quantidade
Piridoxina-HCl	100 mg
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	50 mg
Biotina	20 mg
Ácido fólico	20 mg

Misturar todos os reagentes, homogeneizar e avolumar para 1000mL com água destilada. Estocar em frasco âmbar sob refrigeração (4°C).

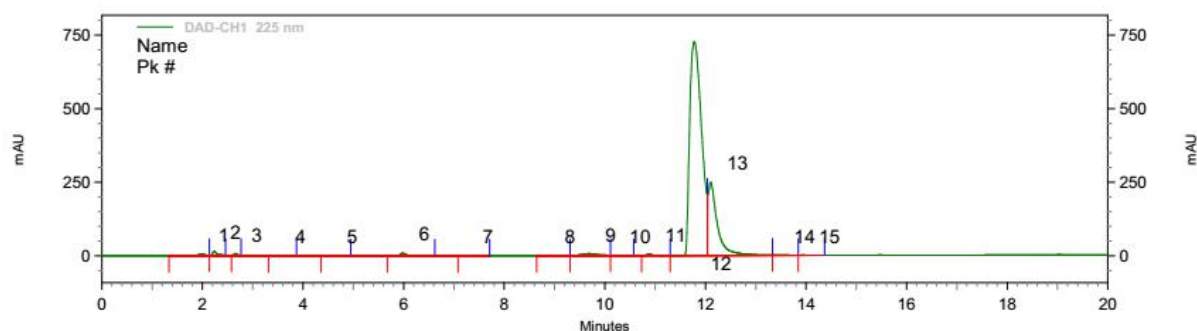
III. Sequência de 16S rDNA da estirpe MF13

TGAGTTTGATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGT
CGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTACC
ATTTGCTACGGAATAACTCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGTATGAGCCCGAAAG
GGGAAAGATTTATCGGCAAATGATCGGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGG
TAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
GGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTA
GGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAAGAAGC
CCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTT
GGATTTACTGGGCGTAAAGCGCACGCTAGGCGGGCTAATAAGTCAGGGGTGAAAT
CCCGGGGCTCAACCCCGGAACTGCCTTTGATACTGTTAGTCTTGAGTATGGTAGA
GGTGAGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACAC
CAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGACCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGTT
AGCCGTTGGGGAGTTTACTCTTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCC
TGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA
AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTT
GACATCCCGATCGCGGTTAGTGGAGACACTATCCTTCAGTTCGGCTGGATCGGAG
ACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGG
GGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGG
CCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGA
GCACGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGC
AACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT
GAATACGTTCCCGGSCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTTA
CCCGAAGGCGCTGTGCTAACCGCAAGGAGGCAGGCGACCACGGTAGGGTCAGCG
ACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTA

Componente	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Max ident	Acesso
<i>Ochrobactrum</i> sp. DZQ2a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2660	2660	99%	0.0	99%	KC146415.1
Uncultured <i>Ochrobactrum</i> sp. clone p4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2660	2660	99%	0.0	99%	AY851688.1
<i>Ochrobactrum intermedium</i> strain C_13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2658	2658	99%	0.0	99%	KT808883.1
<i>Ochrobactrum ciceri</i> strain Ca-34 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2350	2587	99%	0.0	99%	DQ647056.2

IV. Resultados obtidos com CLAE – Seleção da estirpe (30 dias)

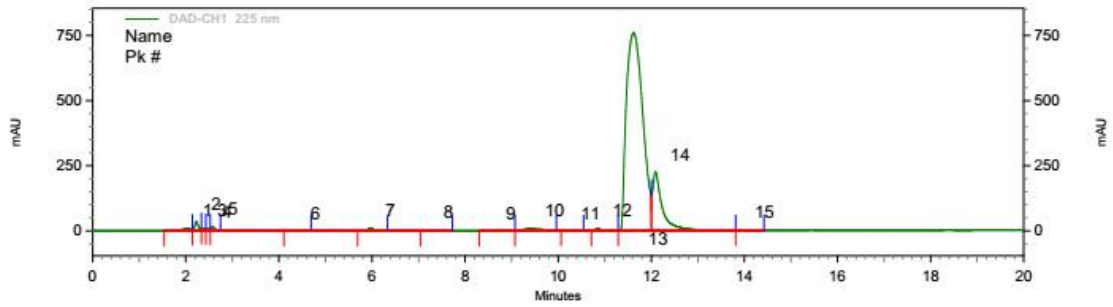
➤ DG01



DAD-CH1 225 nm
Results

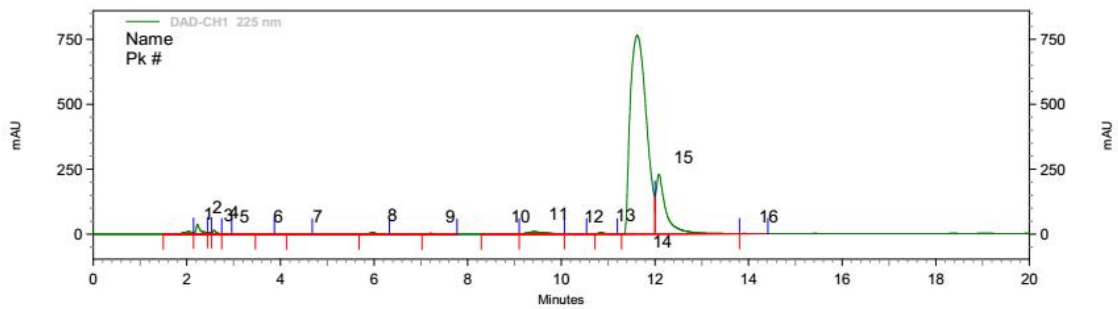
Pk #	Name	Retention Time	Area
1		2,000	270299
2		2,240	437074
3		2,660	178181
4		3,533	80142
5		4,547	91030
6		5,987	303007
7		7,247	85606
8		8,887	124008
9		9,687	584419
10		10,173	72559
11		10,880	169853
12		11,780	47399526
13		12,107	12944602
14		13,447	130481
15		13,940	71743

➤ DG02


**DAD-CH1 225 nm
Results**

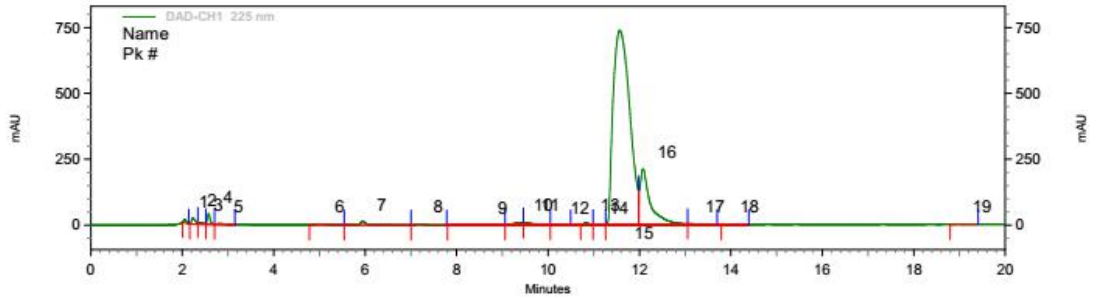
<i>Pk #</i>	<i>Name</i>	<i>Retention Time</i>	<i>Area</i>
1		2,047	460957
2		2,227	802556
3		2,360	205336
4		2,467	138927
5		2,587	353018
6		4,360	104445
7		5,973	370568
8		7,220	137165
9		8,567	177959
10		9,393	897926
11		10,167	85483
12		10,853	288035
13		11,620	73584158
14		12,093	13367611
15		13,907	88819

➤ MC02


**DAD-CH1 225 nm
Results**

<i>Pk #</i>	<i>Name</i>	<i>Retention Time</i>	<i>Area</i>
1		2,040	491962
2		2,227	1036140
3		2,467	116591
4		2,587	345580
5		2,807	79098
6		3,533	81879
7		4,367	93817
8		5,967	271978
9		7,207	116325
10		8,607	184048
11		9,413	929295
12		10,167	86867
13		10,847	211045
14		11,627	72609343
15		12,087	13698339
16		13,900	84274

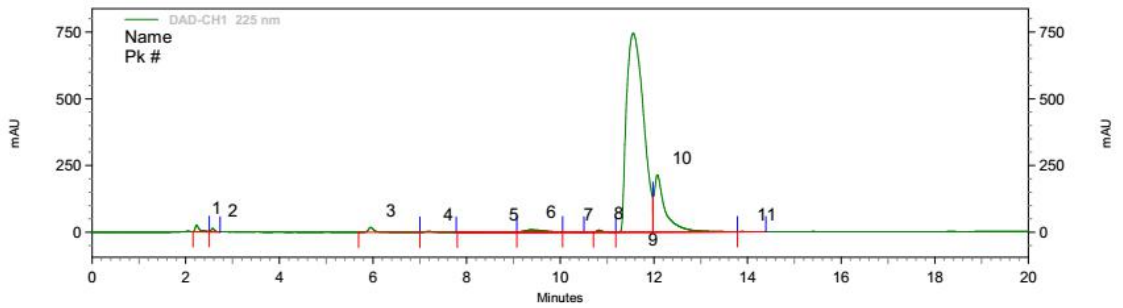
➤ MF19



DAD-CH1 225 nm
Results

Pk #	Name	Retention Time	Area
1		2,053	214170
2		2,233	539812
3		2,367	196041
4		2,580	691948
5		2,807	149781
6		5,020	250751
7		5,947	505259
8		7,180	140546
9		8,580	220371
10		9,367	491235
11		9,527	538056
12		10,173	99449
13		10,833	271282
14		11,027	71268
15		11,573	73736218
16		12,080	13650054
17		13,127	324772
18		13,887	99588
19		18,967	71841

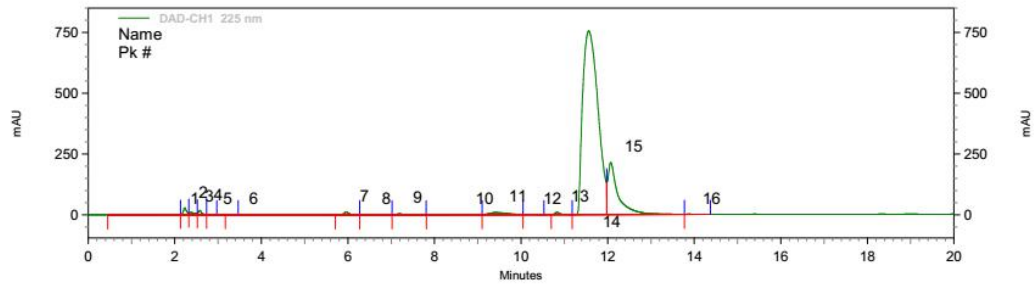
➤ MF20



DAD-CH1 225 nm
Results

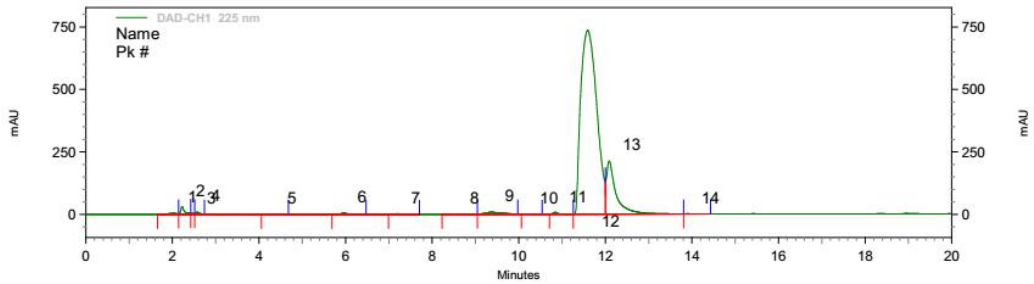
Pk #	Name	Retention Time	Area
1		2,233	632629
2		2,580	249380
3		5,953	601218
4		7,187	130464
5		8,587	216130
6		9,380	971124
7		10,180	100645
8		10,827	244932
9		11,560	74332317
10		12,073	14198247
11		13,887	92129

➤ MF23


**DAD-CH1 225 nm
Results**

Pk #	Name	Retention Time	Area
1		2,040	192957
2		2,233	612763
3		2,380	330723
4		2,580	379179
5		2,800	95461
6		3,400	77484
7		5,953	387492
8		6,467	82341
9		7,187	161063
10		8,633	223094
11		9,400	977931
12		10,193	111096
13		10,833	310703
14		11,567	73796621
15		12,073	14235013
16		13,873	104160

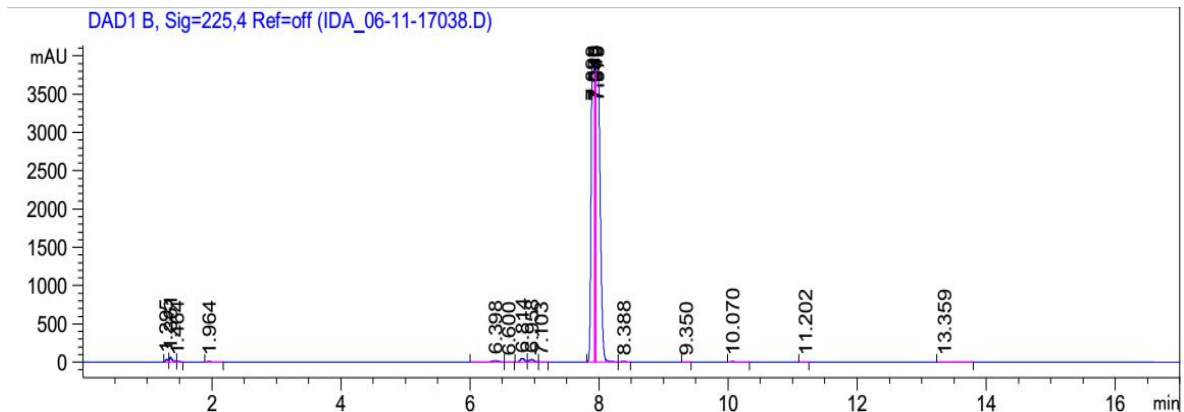
➤ MG04


**DAD-CH1 225 nm
Results**

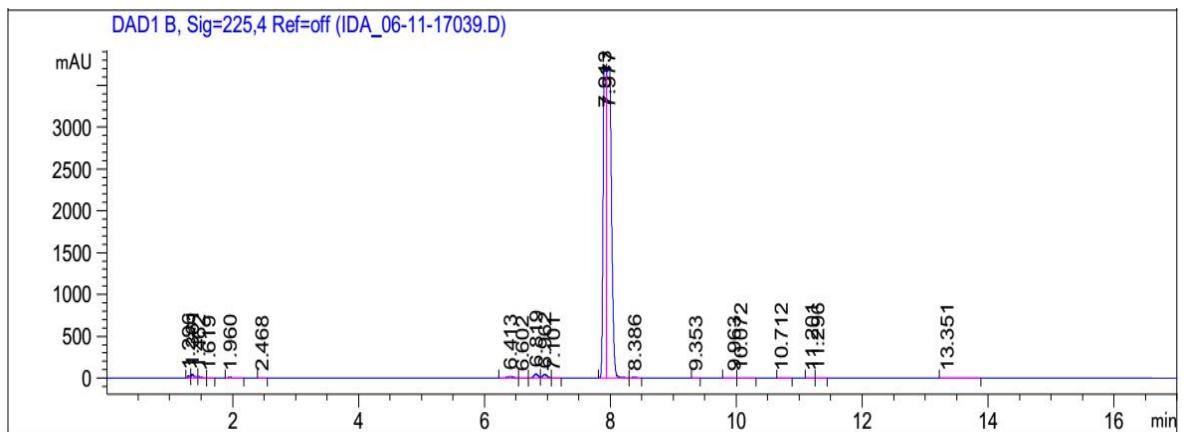
Pk #	Name	Retention Time	Area
1		2,040	244084
2		2,227	756292
3		2,473	72627
4		2,580	239066
5		4,333	112038
6		5,960	251652
7		7,200	96071
8		8,560	180018
9		9,360	936140
10		10,173	89456
11		10,840	247206
12		11,593	75039365
13		12,087	13299202
14		13,900	86445

V. Análise dos subprodutos de degradação por CLAE (10 dias)

➤ MF13 – Dia 0

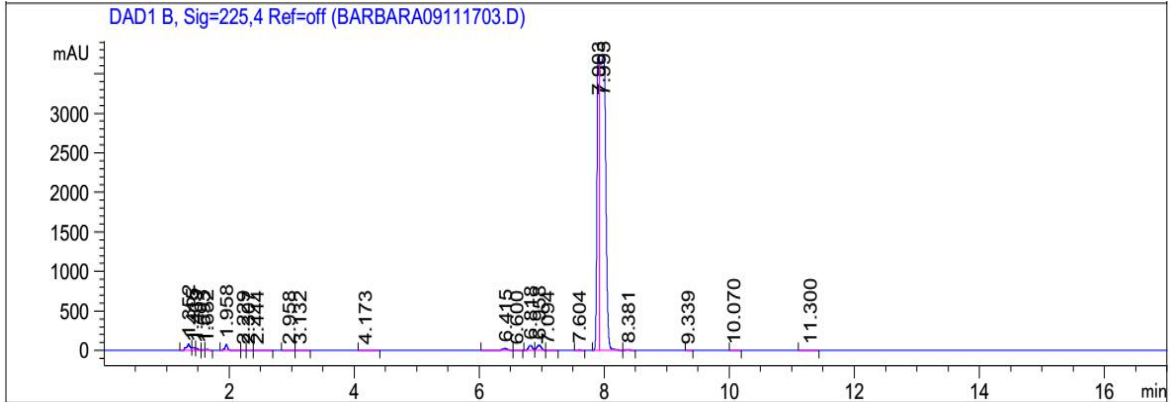


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %	Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.295	BV	0.0364	97.68812	38.70209	0.2650	10	7.899	BV	0.0456	1.29091e4	3903.54419	35.0187
2	1.361	VV	0.0392	205.29810	67.09066	0.5569	11	7.935	VV	0.0102	2853.04395	3824.81274	7.7395
3	1.464	VB	0.0398	27.83701	9.89564	0.0755	12	7.949	VV	0.0115	2655.96704	3842.08374	7.2048
4	1.964	BB	0.0527	56.60847	14.78753	0.1536	13	7.979	VB	0.0613	1.74731e4	3938.38159	47.3992
5	6.398	BV	0.1193	116.36499	15.72765	0.3157	14	8.388	BB	0.0784	22.58109	4.55311	0.0613
6	6.600	VB	0.0672	4.91376	9.29863e-1	0.0133	15	9.350	BB	0.0559	3.70400	1.04330	0.0100
7	6.814	BV	0.0769	226.80850	46.47966	0.6153	16	10.070	VV	0.0713	18.58931	3.78497	0.0504
8	6.958	VV	0.0855	167.70668	30.80005	0.4549	17	11.202	BV	0.0588	3.63151	8.10292e-1	9.851e-3
9	7.103	VB	0.0647	7.56621	1.75976	0.0205	18	13.359	BB	0.1620	13.09439	9.63728e-1	0.0355

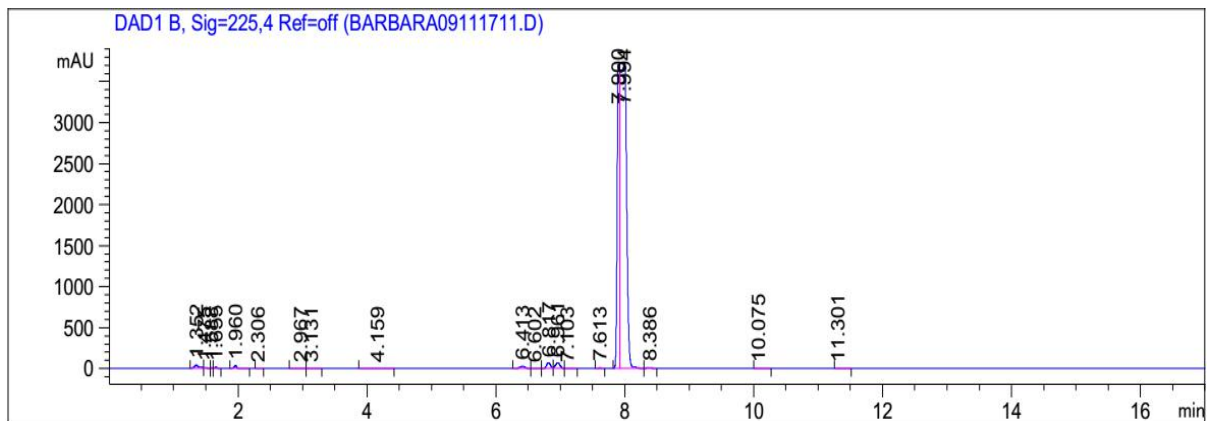


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %	Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.296	BV	0.0362	67.75429	25.78774	0.2015	12	7.913	BV	0.0457	1.34286e4	3708.57349	39.9464
2	1.361	VV	0.0437	159.67944	46.98206	0.4750	13	7.977	VV	0.0616	1.92377e4	3731.66016	57.2266
3	1.462	VB	0.0421	39.37330	13.10328	0.1171	14	8.386	VB	0.0871	26.46971	4.74187	0.0787
4	1.619	BB	0.0577	7.00074	1.49197	0.0208	15	9.353	BB	0.0573	3.76372	1.05105	0.0112
5	1.960	BV	0.0563	54.51189	13.16996	0.1622	16	9.963	VV	0.1195	5.45197	5.41195e-1	0.0162
6	2.468	BB	0.0608	3.30894	7.98502e-1	9.843e-3	17	10.072	VV	0.0838	13.78115	2.30392	0.0410
7	6.413	BV	0.1110	109.91141	15.74276	0.3270	18	10.712	VB	0.1144	4.92354	5.25179e-1	0.0146
8	6.602	VB	0.0691	4.73758	9.12063e-1	0.0141	19	11.201	BV	0.0668	3.55100	7.84528e-1	0.0106
9	6.819	BV	0.0727	215.04332	46.28696	0.6397	20	11.296	VB	0.0679	3.21217	6.70620e-1	9.555e-3
10	6.962	VV	0.0811	203.48230	39.52735	0.6053	21	13.351	BB	0.1737	15.03191	1.06467	0.0447
11	7.101	VB	0.0649	9.34373	2.16399	0.0278							

➤ MF13 – Dia 1

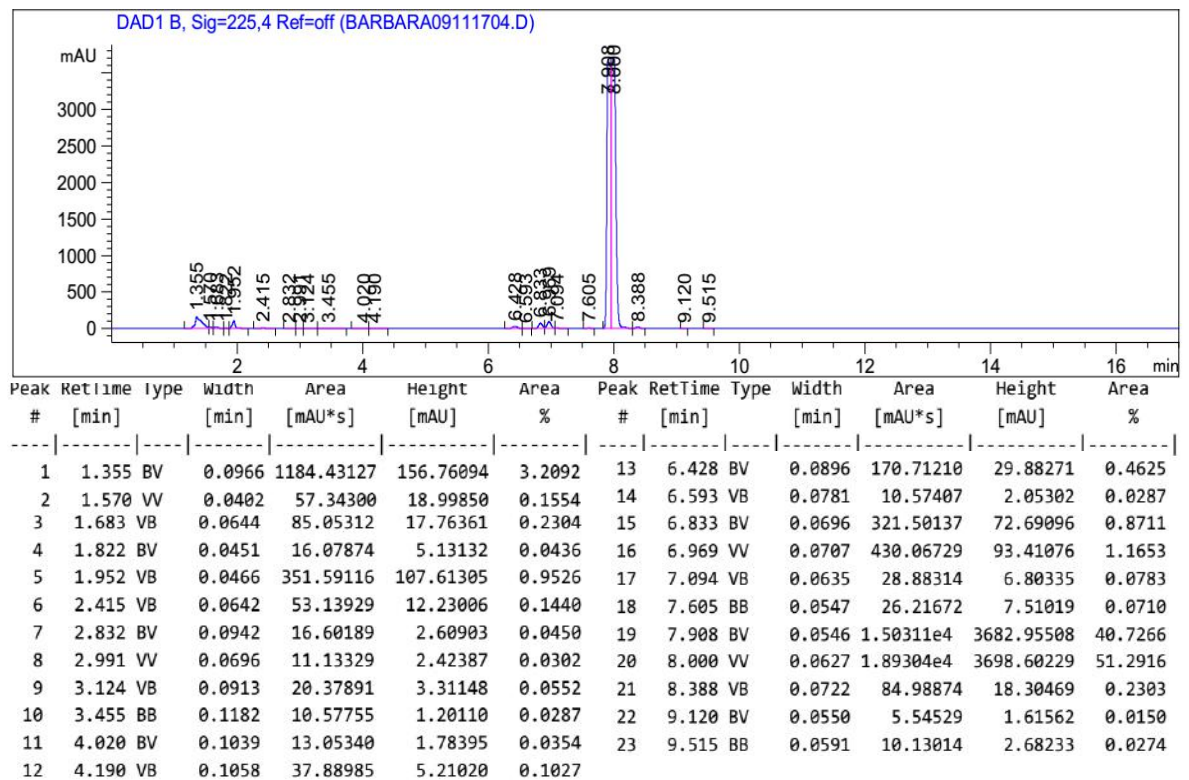
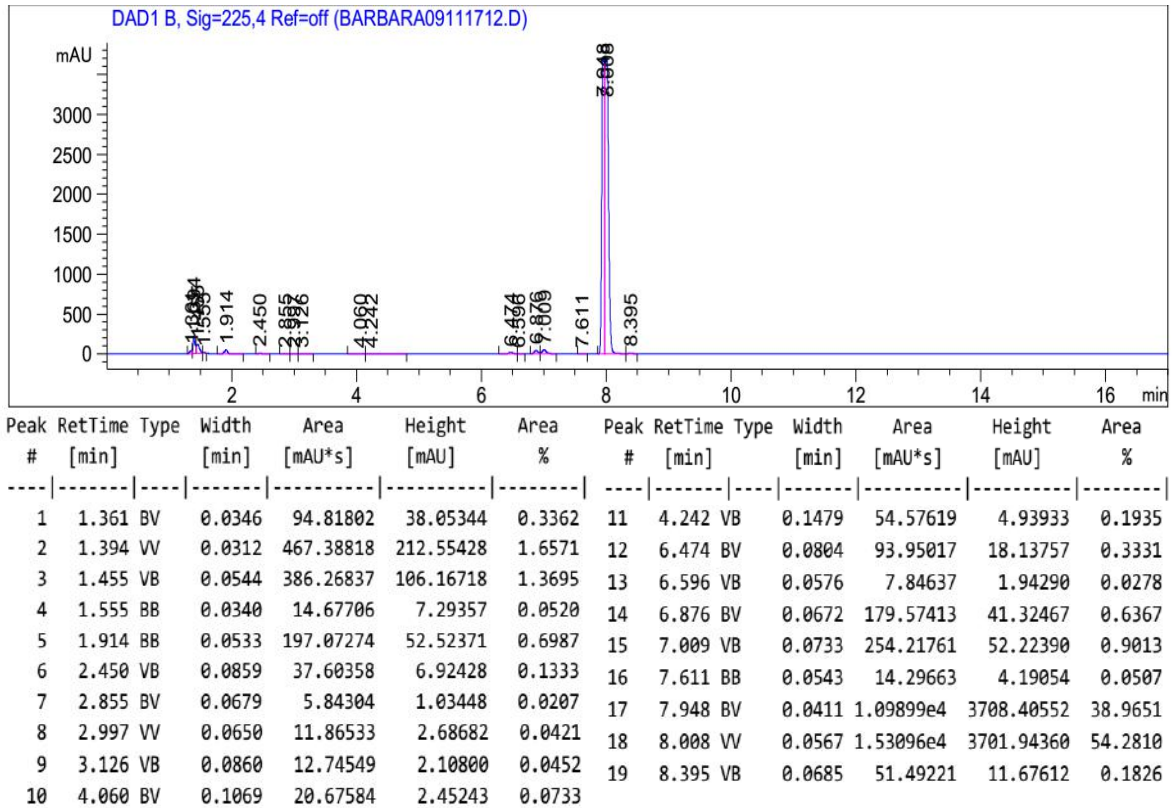


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %	Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.352	BV	0.0564	336.98032	79.57729	0.9395	13	6.415	BV	0.0984	145.62775	23.29840	0.4060
2	1.415	VV	0.0502	104.07443	31.76780	0.2902	14	6.600	VB	0.0749	6.85344	1.33565	0.0191
3	1.469	VB	0.0372	65.95450	25.43892	0.1839	15	6.818	BV	0.0694	276.84601	62.19334	0.7718
4	1.593	BV	0.0318	10.55859	4.87373	0.0294	16	6.958	VV	0.0754	310.04462	64.16614	0.8644
5	1.652	VB	0.0455	37.56106	12.34044	0.1047	17	7.094	VB	0.0673	17.36034	3.91184	0.0484
6	1.958	BV	0.0447	251.51474	78.80341	0.7012	18	7.604	BB	0.0548	15.19823	4.34795	0.0424
7	2.229	VV	0.0644	7.47991	1.66576	0.0209	19	7.903	BV	0.0365	9494.70410	3689.59106	26.4706
8	2.307	VV	0.0733	9.28640	1.62119	0.0259	20	7.995	VV	0.0857	2.46391e4	3722.45923	68.6922
9	2.444	VB	0.0816	16.14567	2.80778	0.0450	21	8.381	VB	0.0834	42.44893	8.00520	0.1183
10	2.958	BV	0.0803	11.60984	1.72996	0.0324	22	9.339	VB	0.0595	5.55416	1.45748	0.0155
11	3.132	VB	0.0907	15.14375	2.31711	0.0422	23	10.070	BB	0.0672	8.61467	1.96113	0.0240
12	4.173	BB	0.1017	22.05617	3.11217	0.0615	24	11.300	VB	0.1173	18.12509	2.15134	0.0505

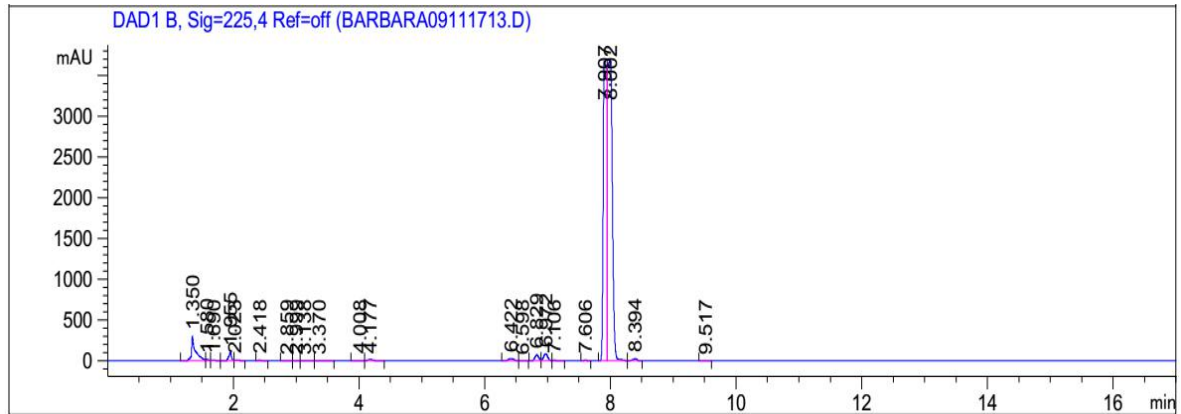


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %	Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.352	BV	0.0670	233.52927	45.03019	0.6399	11	6.602	VB	0.0748	7.63600	1.45371	0.0209
2	1.475	VB	0.0405	29.18912	10.02632	0.0800	12	6.817	BV	0.0687	304.89374	69.50883	0.8354
3	1.588	BV	0.0278	7.57090	3.62820	0.0207	13	6.961	VV	0.0758	348.60068	71.60986	0.9552
4	1.655	VB	0.0443	41.54190	14.12985	0.1138	14	7.103	VB	0.0660	17.28906	3.95459	0.0474
5	1.960	BV	0.0488	126.11104	36.08482	0.3456	15	7.613	BB	0.0523	16.89283	5.07987	0.0463
6	2.306	VV	0.0782	6.87648	1.15124	0.0188	16	7.900	BV	0.0384	1.02747e4	3697.06226	28.1538
7	2.967	BV	0.0923	13.24563	2.10753	0.0363	17	7.994	VV	0.0888	2.48035e4	3717.85059	67.9645
8	3.131	VB	0.0816	11.16595	1.81915	0.0306	18	8.386	VB	0.0827	50.36288	9.51921	0.1380
9	4.159	BB	0.1130	30.04155	3.83117	0.0823	19	10.075	BB	0.0668	8.66188	1.94961	0.0237
10	6.413	BV	0.1000	157.07613	24.94550	0.4304	20	11.301	VB	0.0839	5.95355	1.02237	0.0163

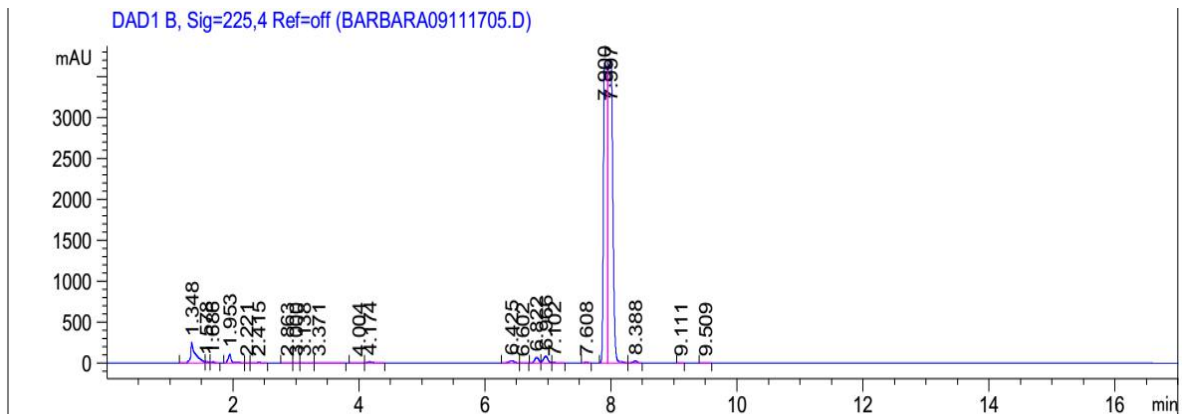
➤ MF13 – Dia 2



➤ MF13 – Dia 3



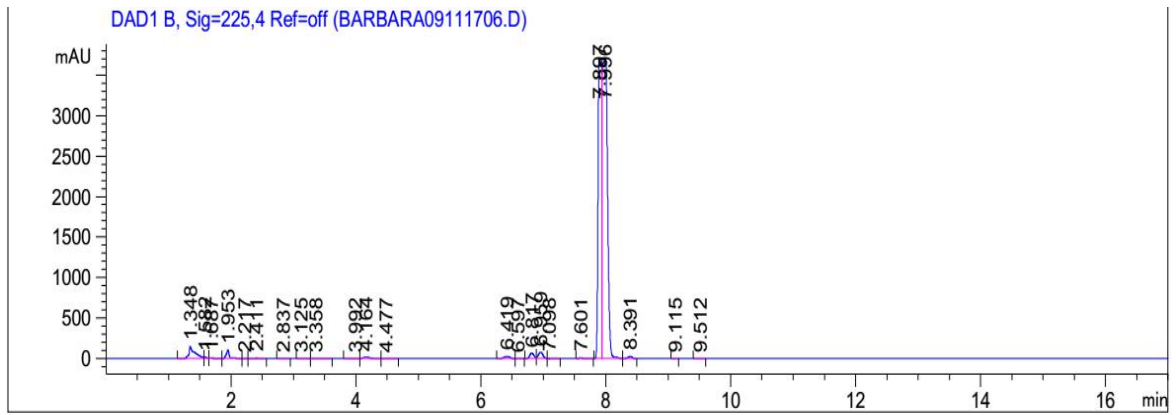
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %	Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.350	BV	0.0588	1365.42920	301.84940	3.6344	12	4.177	VB	0.1000	113.35522	16.85351	0.3017
2	1.580	VV	0.0427	52.60949	16.26039	0.1400	13	6.422	BV	0.0945	166.44734	27.92381	0.4430
3	1.690	VB	0.0579	55.35447	13.34025	0.1473	14	6.598	VB	0.0841	9.49423	1.71410	0.0253
4	1.955	BV	0.0433	302.61185	101.35077	0.8055	15	6.829	BV	0.0672	310.67941	72.25556	0.8269
5	2.023	VB	0.0696	45.59285	8.84830	0.1214	16	6.972	VV	0.0709	396.11926	86.56783	1.0544
6	2.418	VB	0.0685	26.18102	5.45137	0.0697	17	7.106	VB	0.0649	21.86852	5.01131	0.0582
7	2.859	BV	0.0913	12.03180	1.87644	0.0320	18	7.606	BV	0.0533	23.94896	7.11626	0.0637
8	2.999	VV	0.0649	7.59292	1.69019	0.0202	19	7.907	BV	0.0516	1.36877e4	3662.14478	36.4327
9	3.138	VB	0.0906	30.29608	4.76793	0.0806	20	8.002	VV	0.0747	2.07707e4	3689.72217	55.2854
10	3.370	BB	0.0847	15.46544	2.68676	0.0412	21	8.394	VB	0.0718	106.85123	22.34363	0.2844
11	4.008	BV	0.1071	40.15643	5.99861	0.1069	22	9.517	VB	0.0661	9.41762	2.14982	0.0251



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %	Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.348	BV	0.0720	1357.77002	249.47420	3.5558	13	6.425	BV	0.1048	171.79227	26.27782	0.4499
2	1.578	VV	0.0422	57.30669	17.98192	0.1501	14	6.602	VB	0.0715	9.73473	1.80378	0.0255
3	1.686	VB	0.0567	56.01729	13.70990	0.1467	15	6.822	BV	0.0707	316.99951	70.20377	0.8302
4	1.953	VV	0.0501	404.09503	111.92298	1.0583	16	6.966	VV	0.0782	412.15988	82.60658	1.0794
5	2.221	VV	0.0553	9.87616	2.65865	0.0259	17	7.102	VB	0.0672	23.19803	5.14037	0.0608
6	2.415	VB	0.0759	35.41685	6.57415	0.0928	18	7.608	BV	0.0546	25.08452	7.29326	0.0657
7	2.863	BV	0.0899	17.40734	2.45107	0.0456	19	7.900	BV	0.0558	1.52963e4	3658.42334	40.0591
8	3.000	VV	0.0687	9.51099	2.10681	0.0249	20	7.997	VV	0.0717	1.96716e4	3689.11597	51.5174
9	3.138	VB	0.0916	27.47113	4.26491	0.0719	21	8.388	VB	0.0724	104.90305	21.88306	0.2747
10	3.371	BB	0.0884	14.79580	2.36921	0.0387	22	9.111	BV	0.0545	5.48035	1.57912	0.0144
11	4.004	BV	0.1035	39.44894	5.54330	0.1033	23	9.509	VB	0.0662	9.51531	2.14688	0.0249
12	4.174	VB	0.1050	108.46320	15.15196	0.2841							

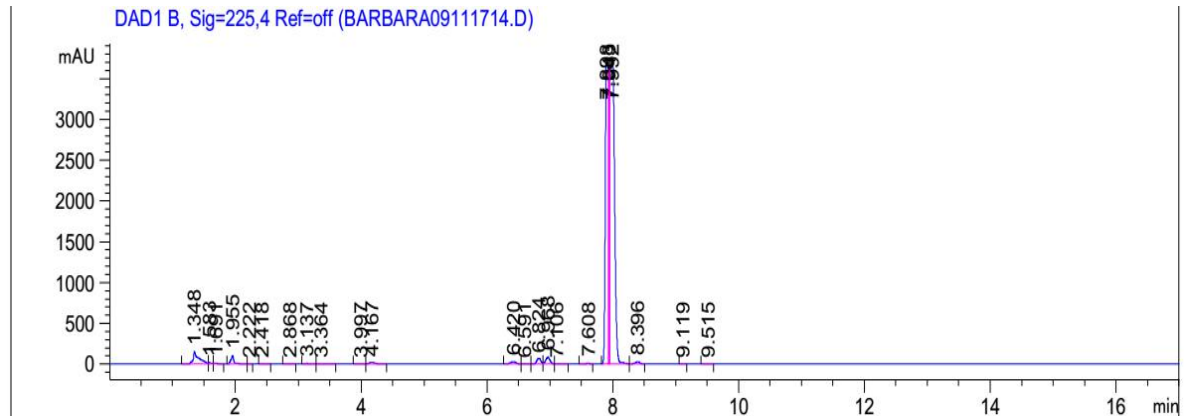
➤ MF13 – Dia 4

DAD1 B, Sig=225,4 Ref=off (BARBARA09111706.D)



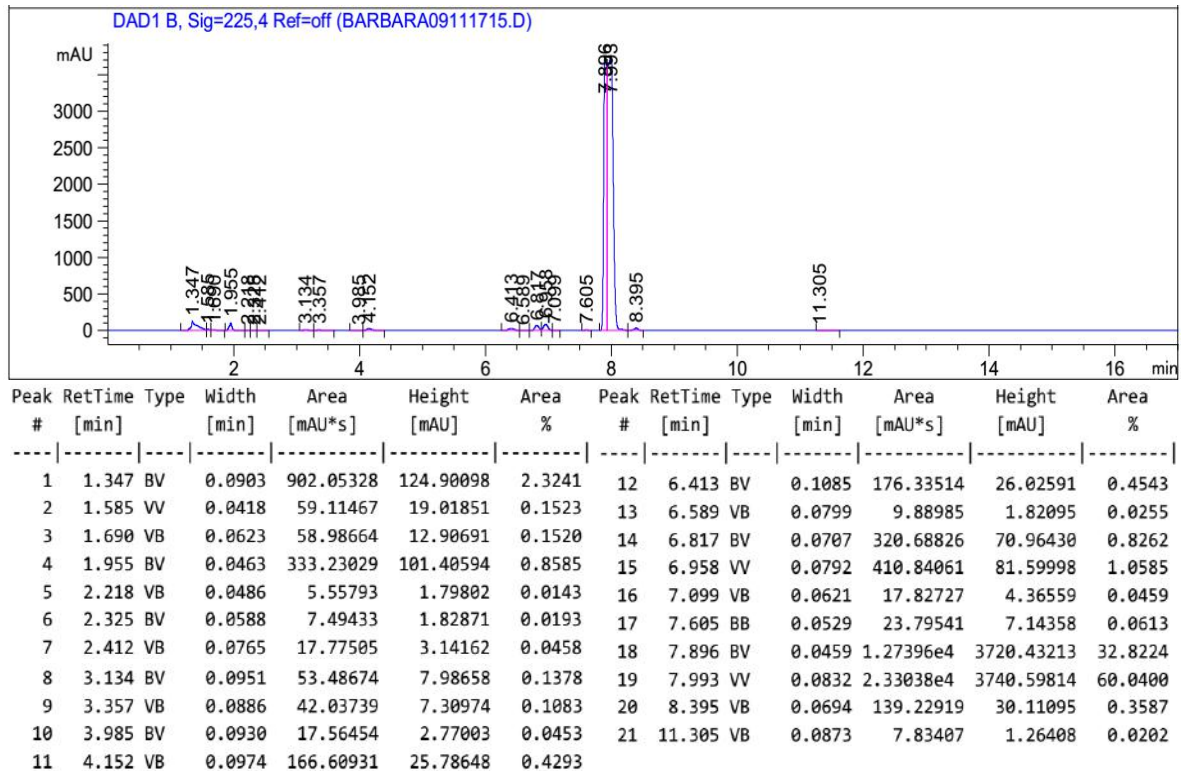
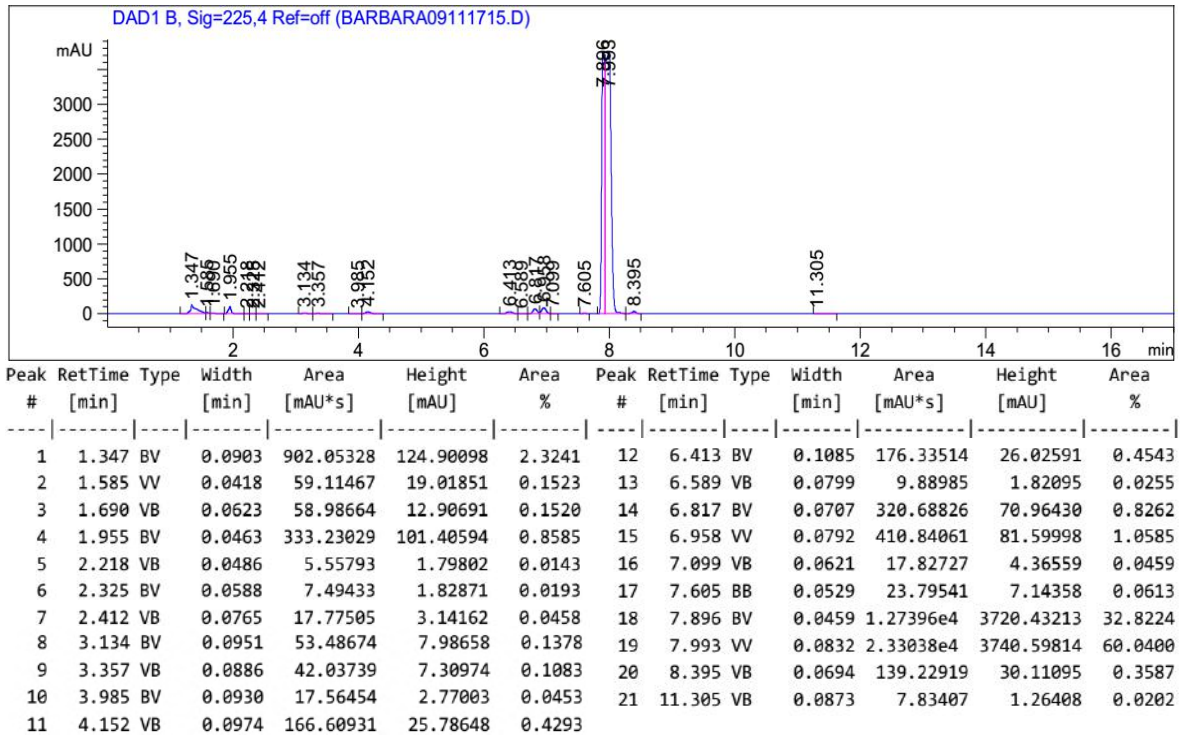
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %	Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.348	BV	0.0844	1007.22754	149.91898	2.5818	13	6.419	BV	0.1104	170.62679	24.90976	0.4374
2	1.582	VV	0.0426	58.79988	18.23667	0.1507	14	6.597	VB	0.0764	10.06152	1.82229	0.0258
3	1.687	VB	0.0584	50.91941	12.14434	0.1305	15	6.817	BV	0.0707	314.41058	69.60948	0.8059
4	1.953	BV	0.0487	368.01773	106.88544	0.9433	16	6.959	VV	0.0799	404.80273	79.46450	1.0376
5	2.217	VV	0.0573	9.96701	2.59357	0.0255	17	7.098	VB	0.0687	21.34767	4.67734	0.0547
6	2.411	VB	0.0869	32.23783	4.92241	0.0826	18	7.601	BB	0.0562	25.87230	7.23543	0.0663
7	2.837	BV	0.0925	14.80833	1.95263	0.0380	19	7.897	BV	0.0524	1.42435e4	3697.64624	36.5101
8	3.125	VV	0.0961	39.39515	5.70278	0.1010	20	7.996	VV	0.0780	2.18719e4	3695.80469	56.0638
9	3.358	VB	0.0931	29.66982	4.73510	0.0761	21	8.391	VB	0.0708	124.61737	26.53372	0.3194
10	3.992	BV	0.1000	29.53053	4.20343	0.0757	22	9.115	BV	0.0552	5.47630	1.58869	0.0140
11	4.164	VV	0.1061	159.22221	22.21863	0.4081	23	9.512	VB	0.0692	11.51040	2.43434	0.0295
12	4.477	VB	0.1013	8.61344	1.01212	0.0221							

DAD1 B, Sig=225,4 Ref=off (BARBARA09111714.D)

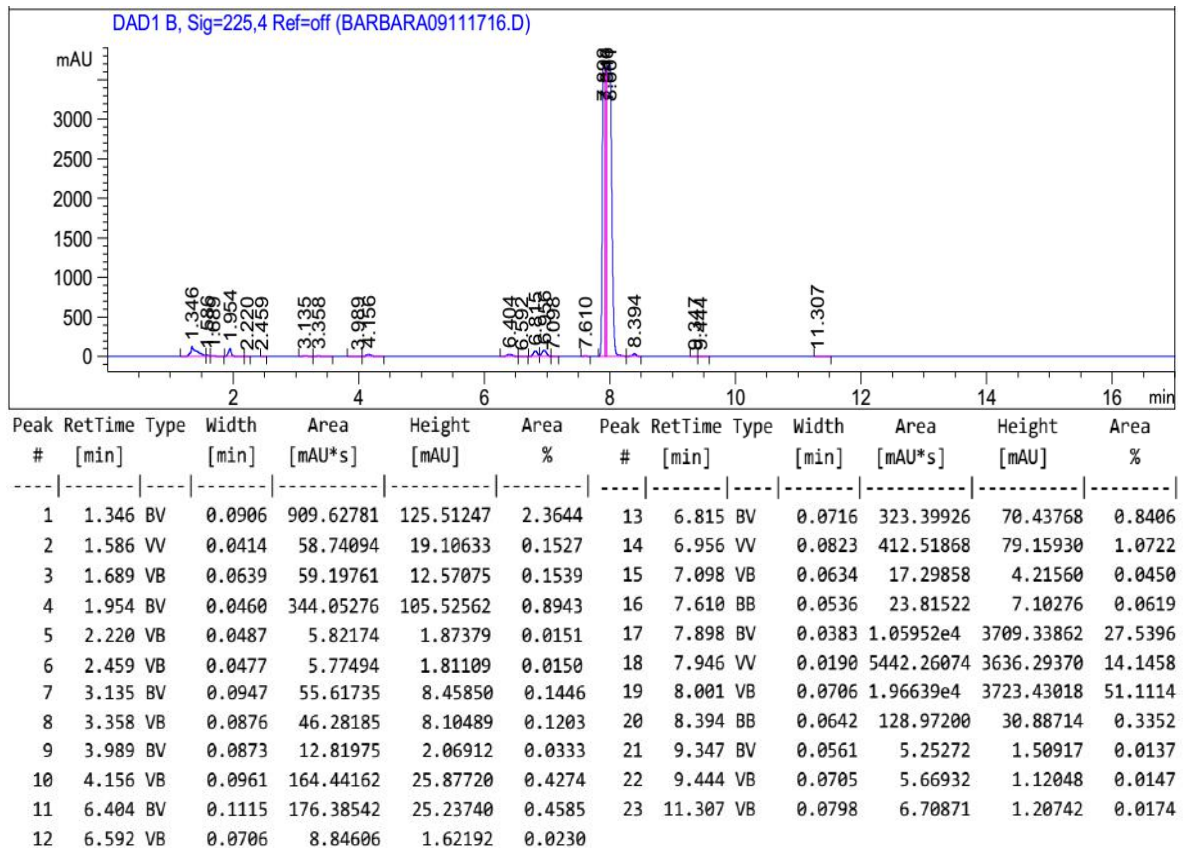
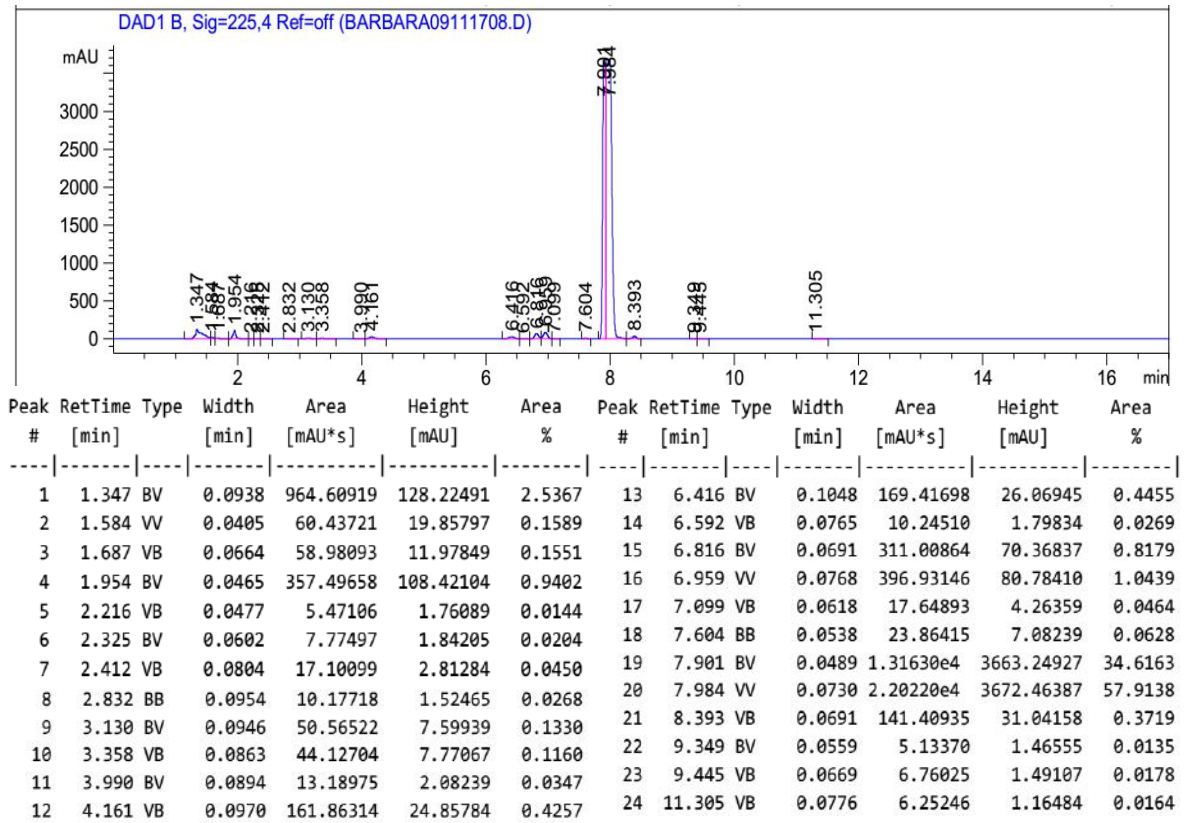


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %	Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.348	BV	0.0786	984.69720	158.16699	2.5962	13	6.591	VB	0.0682	9.86234	1.79127	0.0260
2	1.583	VV	0.0434	55.76976	17.15800	0.1470	14	6.824	BV	0.0690	312.81146	70.92948	0.8247
3	1.691	VB	0.0561	50.48141	12.49468	0.1331	15	6.968	VV	0.0752	392.98959	81.55028	1.0361
4	1.955	BV	0.0470	335.86194	100.40252	0.8855	16	7.106	VB	0.0691	21.78978	4.74343	0.0574
5	2.222	VB	0.0511	5.88278	1.87442	0.0155	17	7.608	BV	0.0556	26.60077	7.46053	0.0701
6	2.418	VB	0.0770	23.10600	4.11506	0.0609	18	7.898	BV	0.0460	1.28178e4	3690.01465	33.7946
7	2.868	BV	0.0851	10.39401	1.45986	0.0274	19	7.943	VV	0.0157	4100.30566	3624.54468	10.8106
8	3.137	VV	0.0929	40.08206	6.11680	0.1057	20	7.992	VB	0.0680	1.82351e4	3734.45532	48.0776
9	3.364	VB	0.0867	29.71679	5.04314	0.0783	21	8.396	BB	0.0657	112.24151	26.35478	0.2959
10	3.997	BV	0.0953	27.06729	4.11362	0.0714	22	9.119	BV	0.0545	5.04219	1.46958	0.0133
11	4.167	VB	0.1001	147.83549	22.22394	0.3898	23	9.515	VB	0.0644	13.91381	3.28351	0.0367
12	6.420	BV	0.1017	169.15292	26.58963	0.4460							

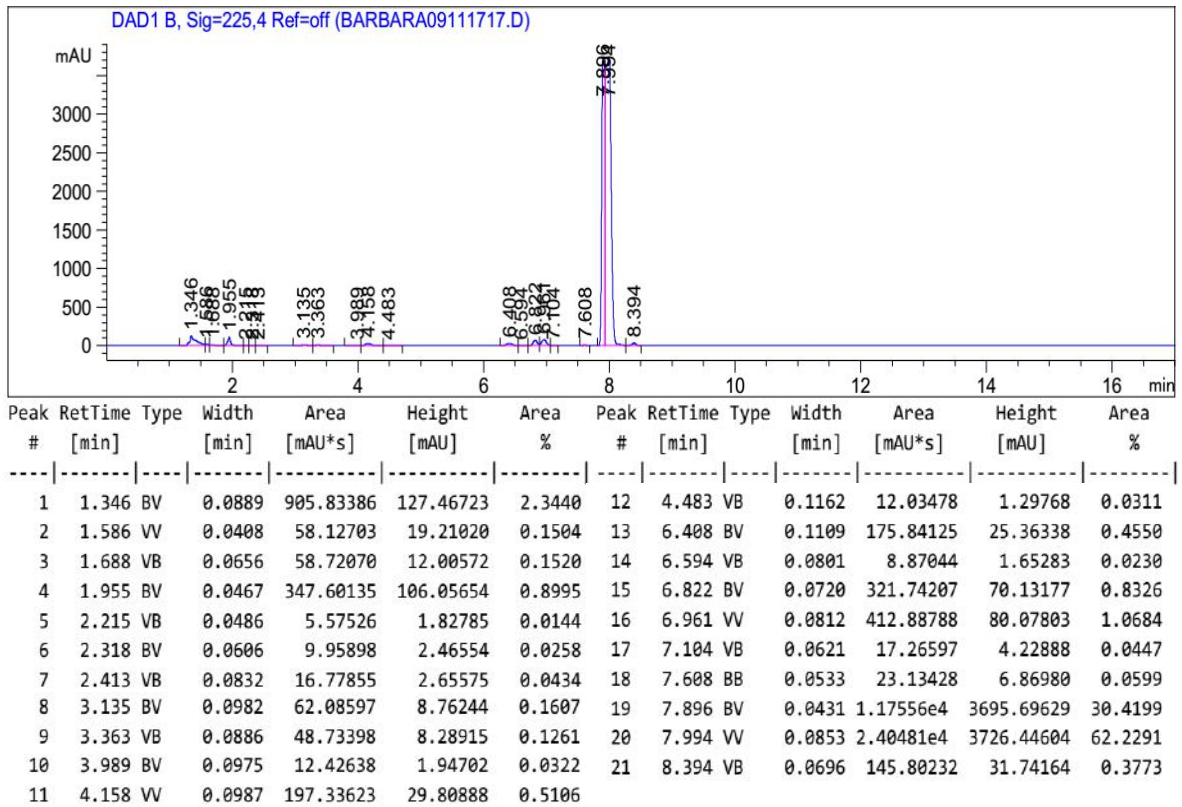
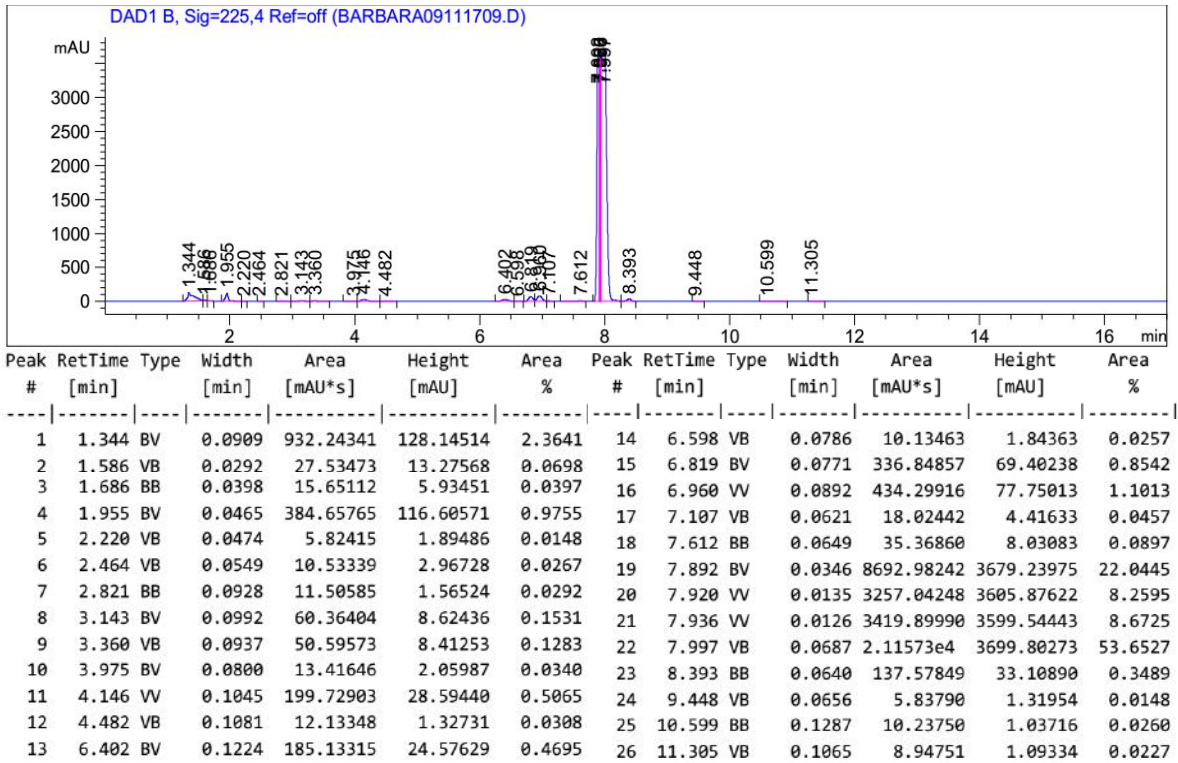
➤ MF13 – Dia 6



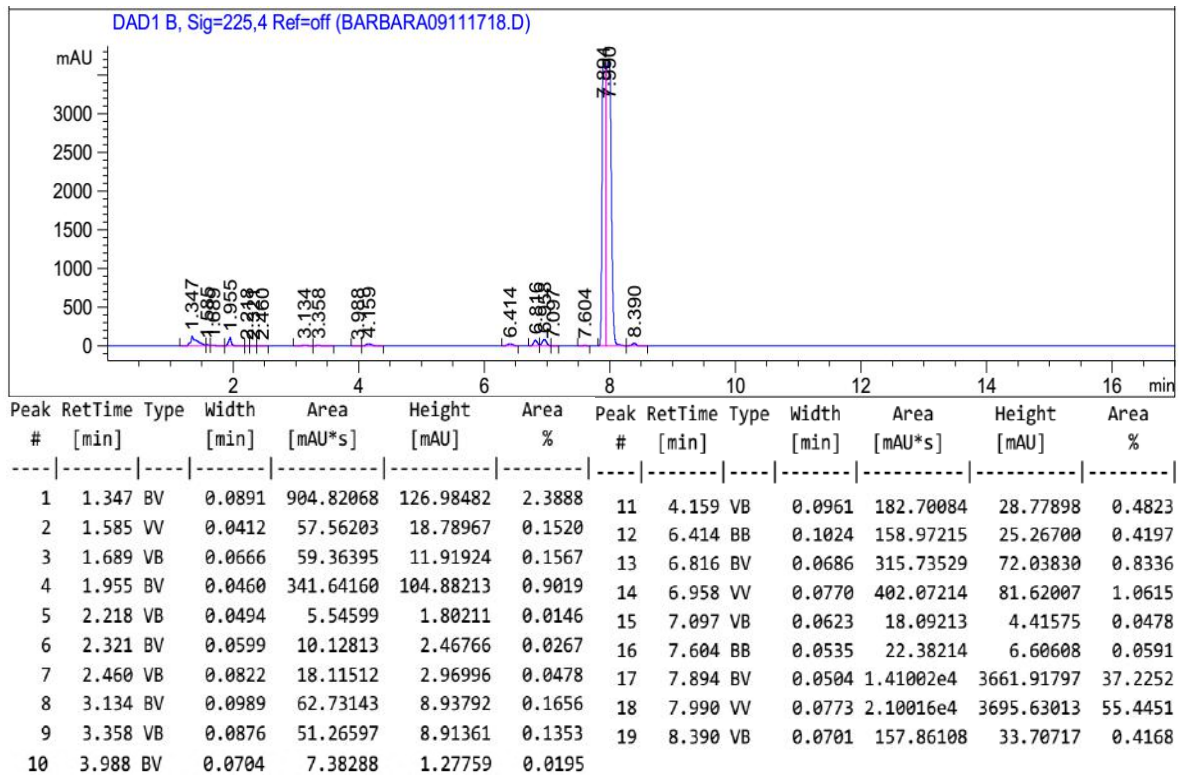
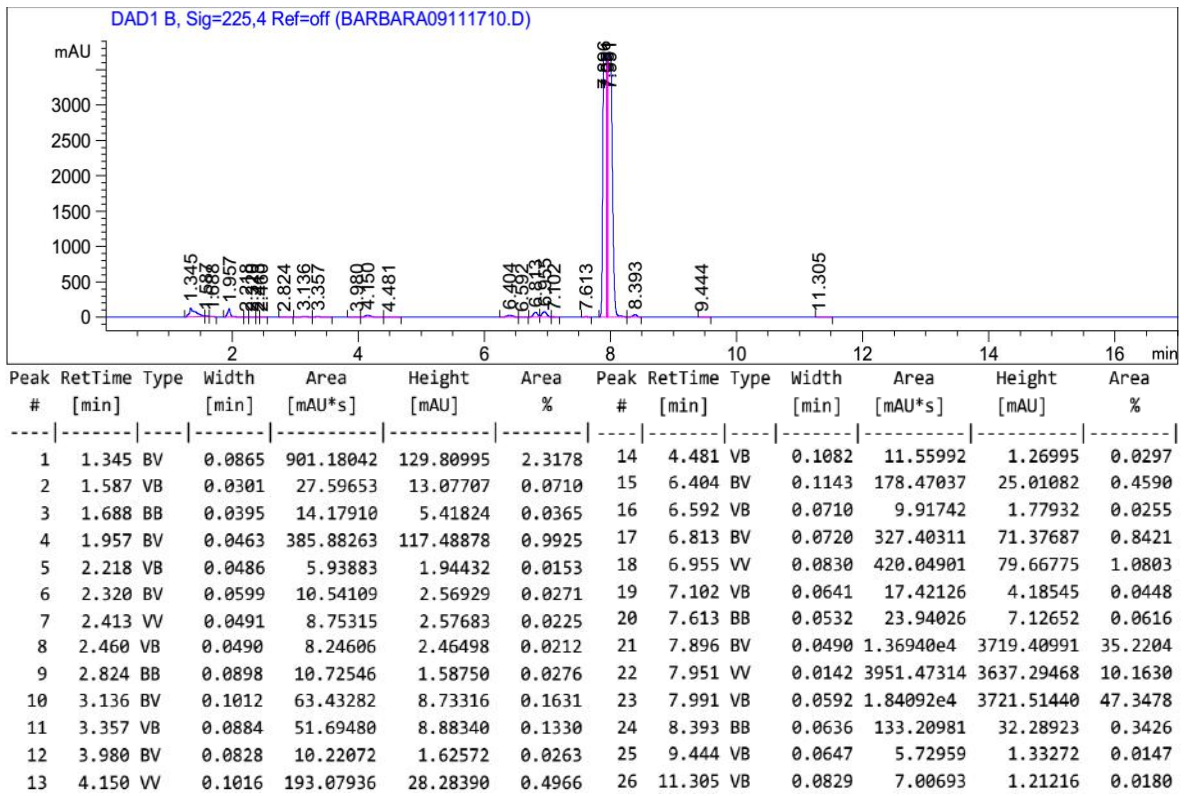
➤ MF13 – Dia 7



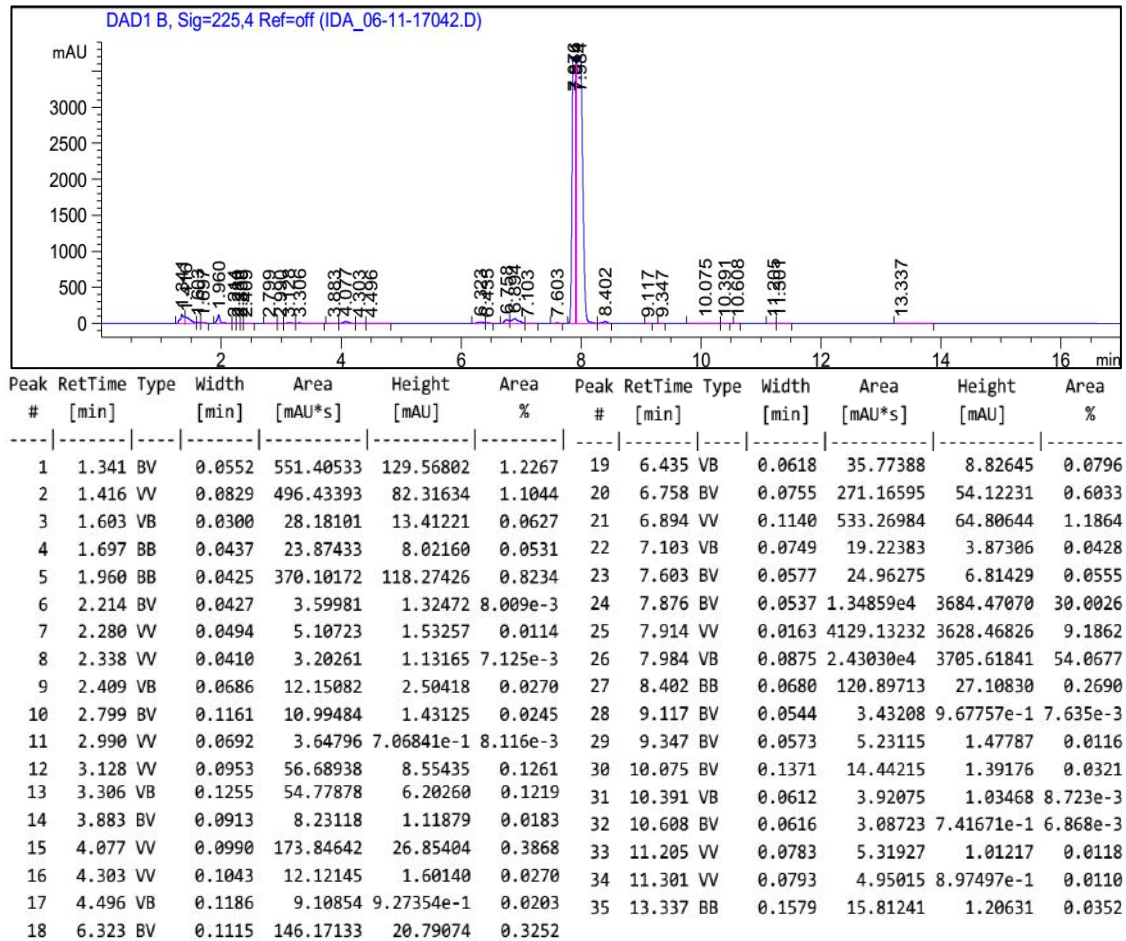
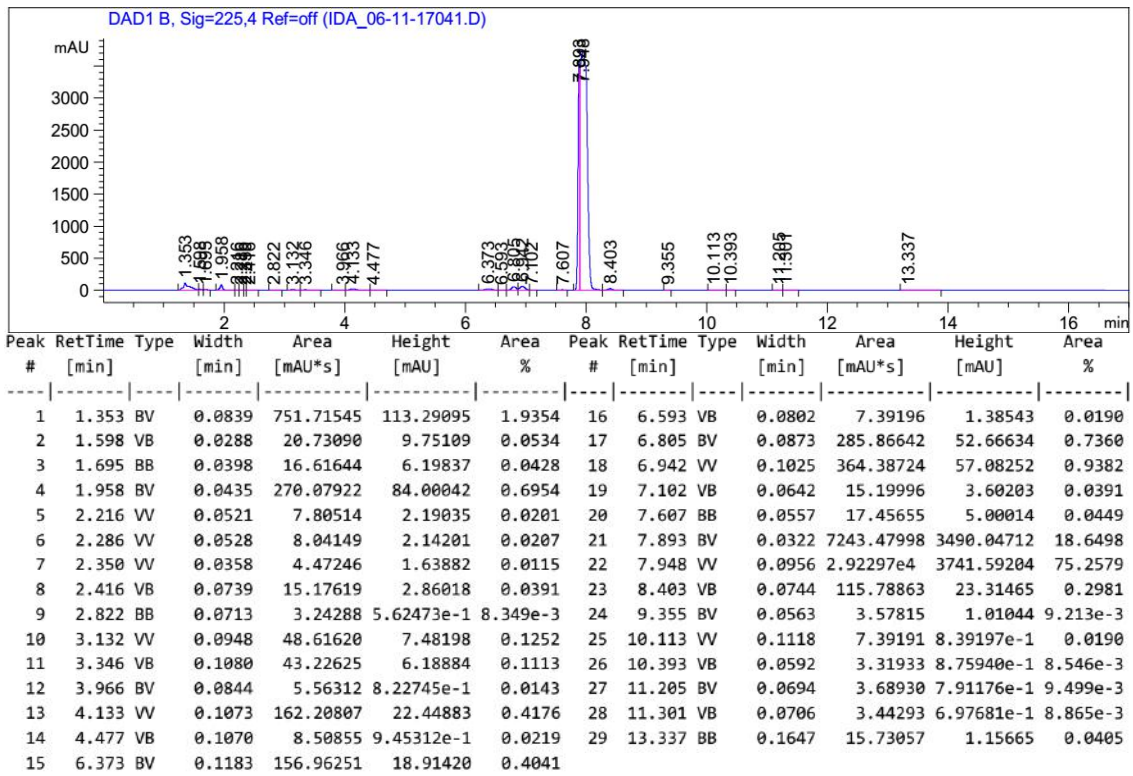
➤ MF13 – Dia 8



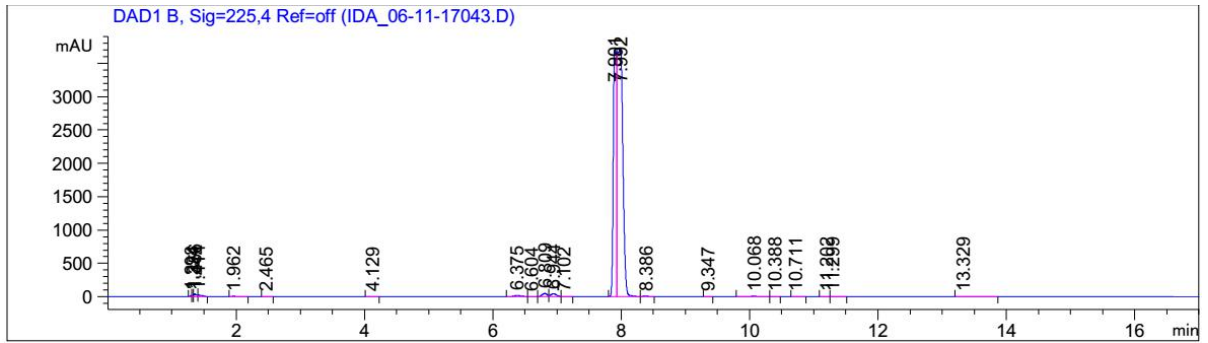
➤ MF13 – Dia 9



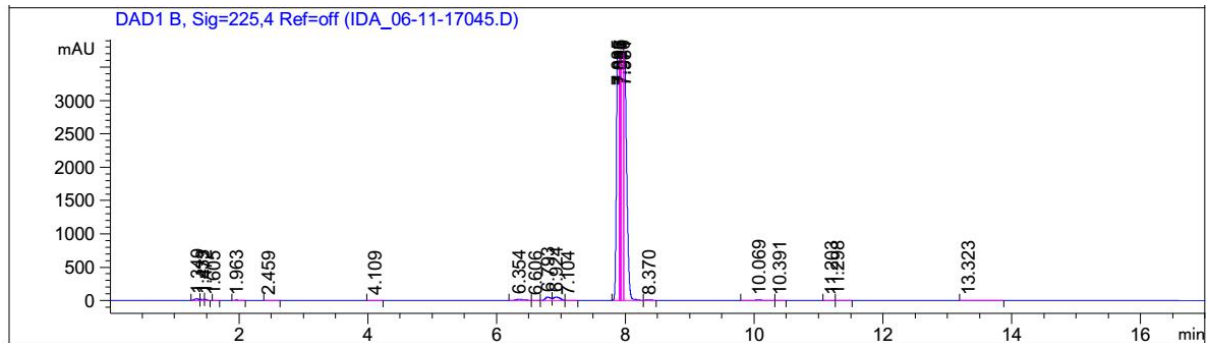
➤ MF13 – Dia 10



➤ Controle – Dia 0

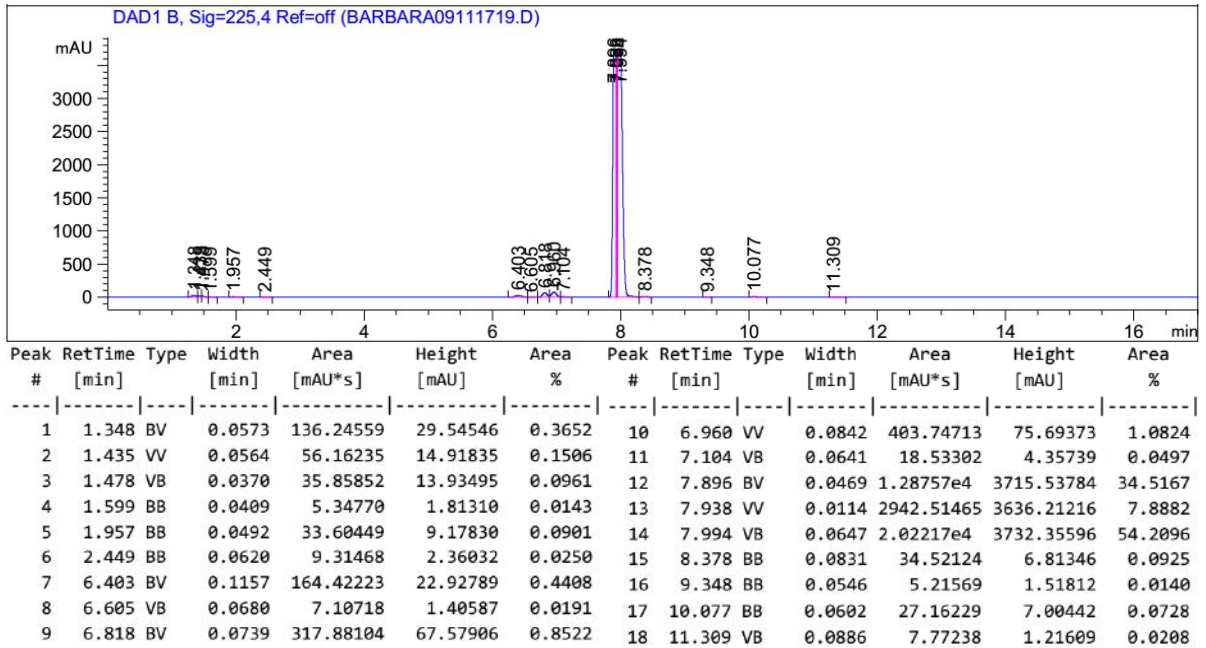


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %	Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.298	BV	0.0206	24.01145	17.38781	0.0647	12	7.102	VB	0.0671	11.25426	2.54428	0.0303
2	1.324	VV	0.0196	23.69403	17.73578	0.0639	13	7.901	BV	0.0429	1.31490e4	3704.15527	35.4445
3	1.356	VV	0.0414	120.30043	40.83321	0.3243	14	7.992	VV	0.0797	2.28612e4	3717.89258	61.6247
4	1.414	VB	0.0651	102.02029	21.59453	0.2750	15	8.386	VB	0.0970	32.79841	5.42881	0.0884
5	1.962	BB	0.0535	40.43125	10.36805	0.1090	16	9.347	BB	0.0560	3.71721	1.04566	0.0100
6	2.465	BB	0.0588	3.13463	7.12694e-1	8.450e-3	17	10.068	VV	0.0788	35.98032	6.73410	0.0970
7	4.129	BB	0.0704	3.03135	5.17407e-1	8.171e-3	18	10.388	VB	0.0588	3.49107	8.43710e-1	9.411e-3
8	6.375	BV	0.1183	133.11475	16.04970	0.3588	19	10.711	VB	0.1091	4.66540	5.18053e-1	0.0126
9	6.604	VB	0.0623	4.55814	8.88547e-1	0.0123	20	11.202	VV	0.0763	4.91900	8.65202e-1	0.0133
10	6.809	BV	0.0870	253.75987	46.97146	0.6840	21	11.299	VB	0.0760	3.80314	7.20935e-1	0.0103
11	6.944	VV	0.1021	262.84296	41.40281	0.7085	22	13.329	BB	0.1612	15.73383	1.17886	0.0424

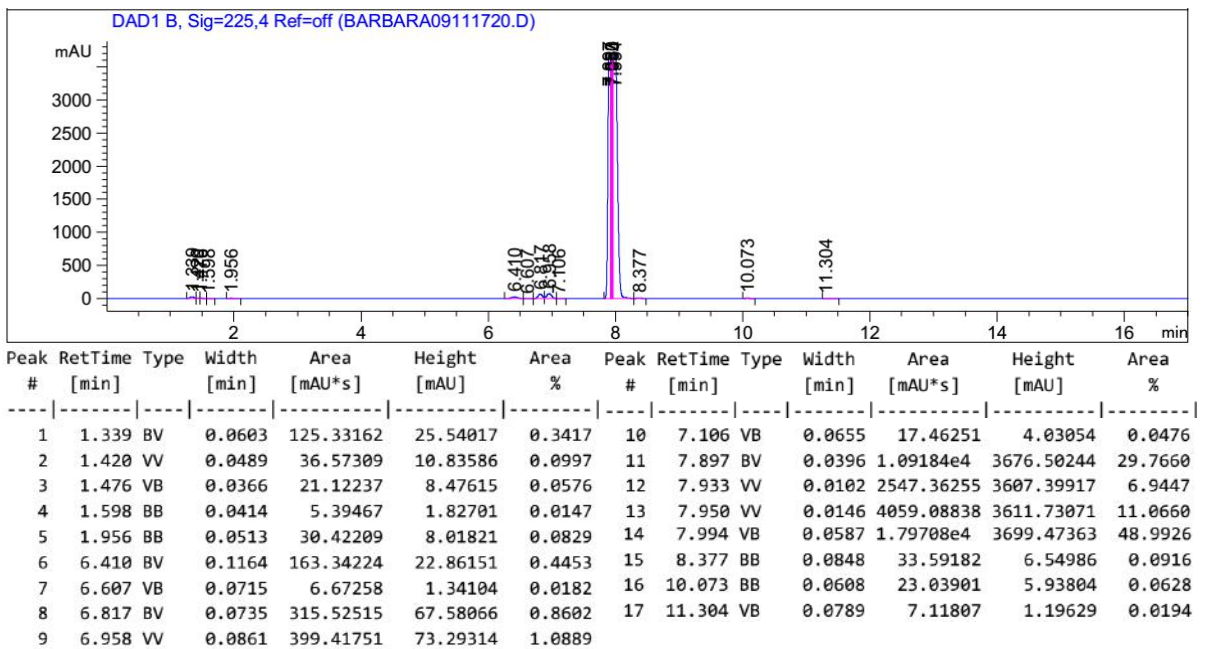


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %	Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.349	BV	0.0540	123.02135	28.40374	0.3183	13	7.885	BV	0.0426	1.13123e4	3710.03833	29.2652
2	1.433	VV	0.0559	58.01313	15.25052	0.1501	14	7.916	VV	9.55e-3	2516.17847	3647.15112	6.5094
3	1.472	VB	0.0343	34.33052	14.38558	0.0888	15	7.927	VV	9.97e-3	2492.37866	3647.41138	6.4479
4	1.605	VB	0.0387	5.36203	1.77868	0.0139	16	7.970	VV	0.0298	8853.22656	3718.47583	22.9036
5	1.963	BB	0.0528	29.40197	7.65700	0.0761	17	7.981	VB	0.0474	1.22663e4	3728.68140	31.7334
6	2.459	BB	0.0691	9.29523	2.12341	0.0240	18	8.370	BB	0.0955	29.64192	5.20374	0.0767
7	4.109	BV	0.0856	5.31266	7.50579e-1	0.0137	19	10.069	VV	0.0687	48.32017	10.69496	0.1250
8	6.354	BV	0.1267	155.07880	17.78272	0.4012	20	10.391	VB	0.0562	3.50346	8.94796e-1	9.064e-3
9	6.606	VB	0.0735	4.96056	1.00580	0.0128	21	11.203	VB	0.0877	6.43556	1.01833	0.0166
10	6.793	BV	0.0968	294.97293	48.94351	0.7631	22	11.298	VV	0.0705	4.58285	8.48139e-1	0.0119
11	6.924	VV	0.0976	369.46527	52.82884	0.9558	23	13.323	BB	0.1653	16.52585	1.19504	0.0428
12	7.104	VB	0.0651	15.68943	3.48293	0.0406							

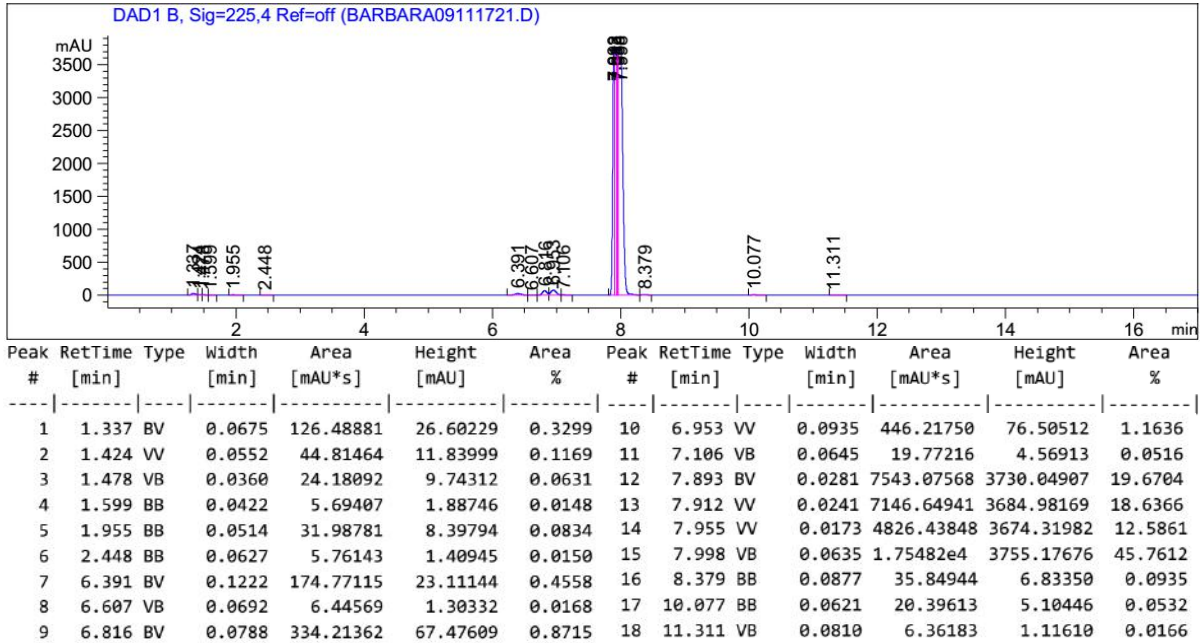
➤ Controle – Dia 1



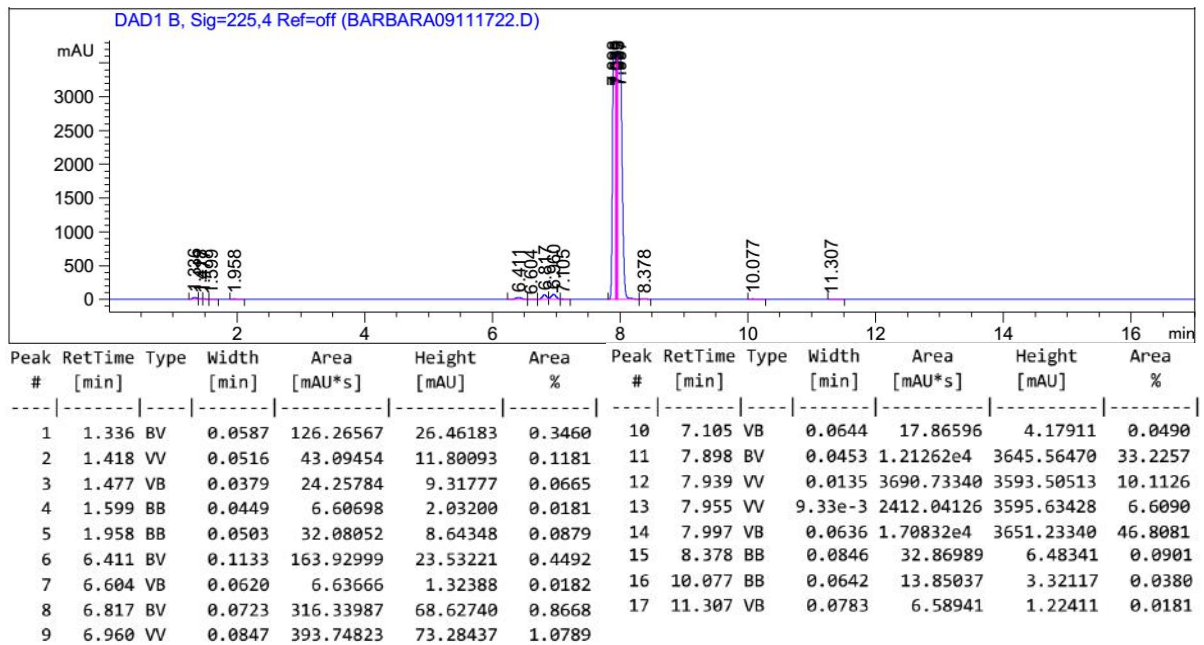
➤ Controle – Dia 2



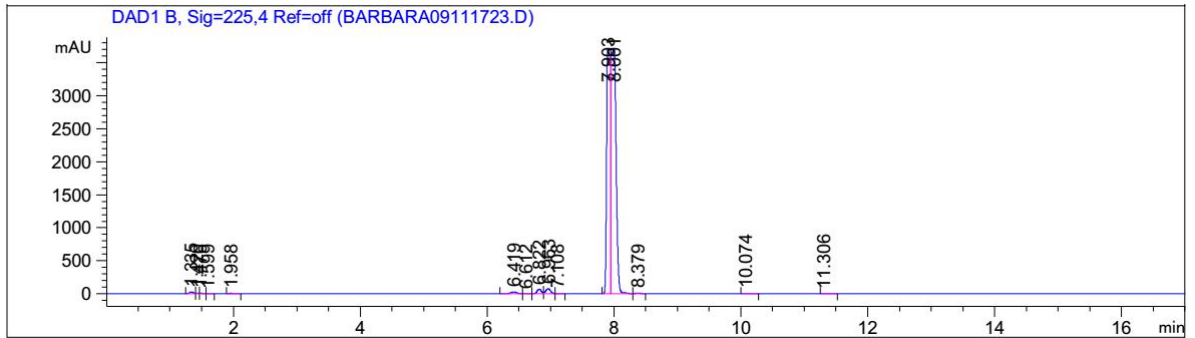
➤ Controle – Dia 3



➤ Controle – Dia 4

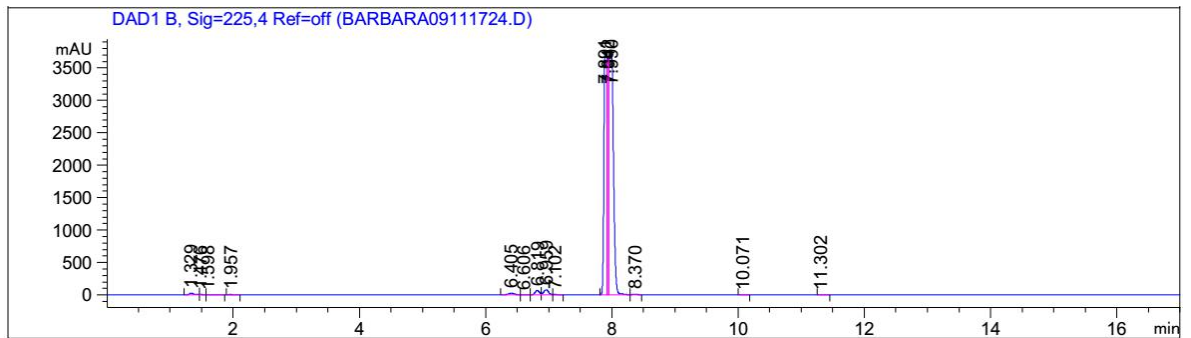


➤ Controle – Dia 6



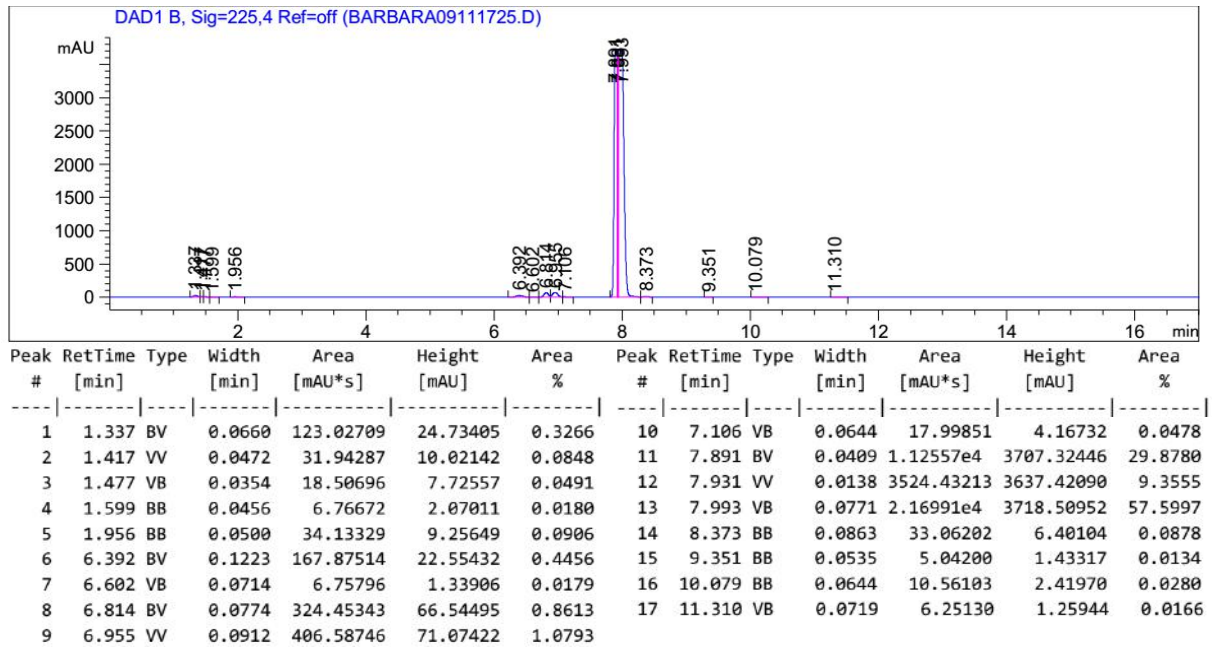
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %	Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.335	BV	0.0642	128.32974	26.64088	0.3490	9	6.963	VV	0.0844	402.19366	75.21458	1.0937
2	1.420	VV	0.0493	37.55965	10.86809	0.1021	10	7.108	VB	0.0646	17.93984	4.22395	0.0488
3	1.476	VB	0.0378	22.95000	8.83319	0.0624	11	7.903	BV	0.0528	1.49877e4	3694.94922	40.7565
4	1.599	BB	0.0412	5.27134	1.79728	0.0143	12	8.001	VV	0.0743	2.05811e4	3703.67432	55.9669
5	1.958	BB	0.0508	32.80051	8.72899	0.0892	13	8.379	VB	0.0908	43.36907	7.62932	0.1179
6	6.419	BV	0.1124	167.34126	24.12973	0.4551	14	10.074	BB	0.0652	12.79117	3.00433	0.0348
7	6.612	VB	0.0738	7.01131	1.40415	0.0191	15	11.306	VB	0.0766	5.92928	1.12212	0.0161
8	6.822	BV	0.0728	321.45300	69.64776	0.8741							

➤ Controle – Dia 7

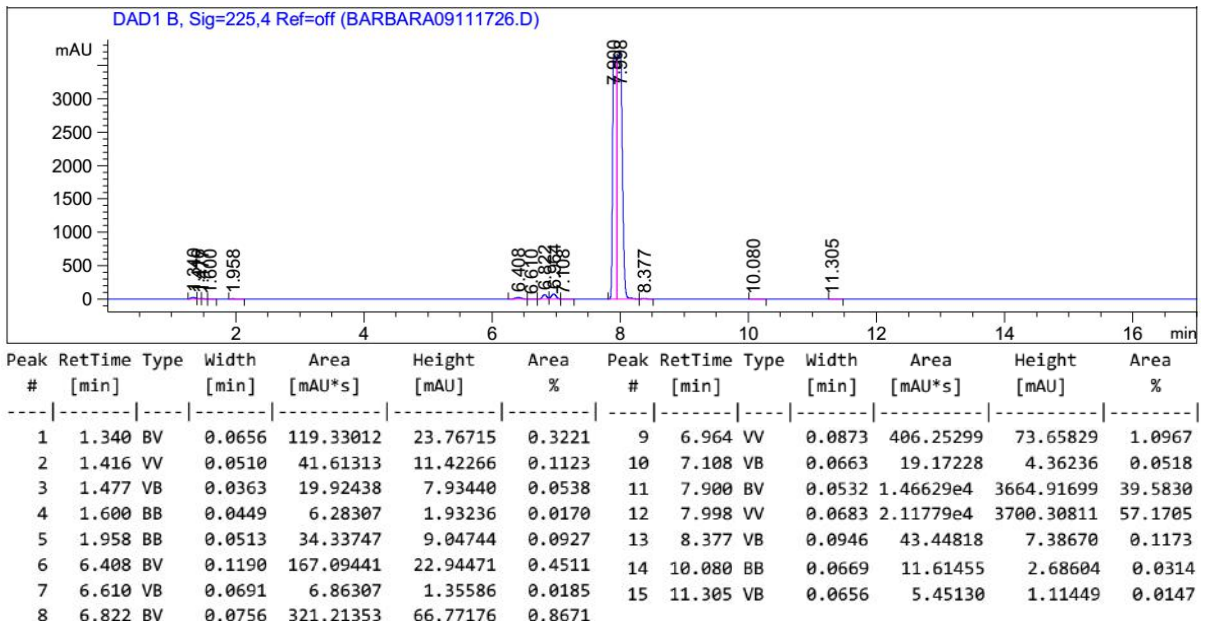


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %	Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.329	BV	0.0809	171.82372	27.51322	0.4599	9	7.102	VB	0.0651	18.48962	4.35156	0.0495
2	1.476	VV	0.0474	32.63987	9.41678	0.0874	10	7.891	BV	0.0449	1.27345e4	3719.47729	34.0823
3	1.598	VB	0.0709	22.27397	4.03288	0.0596	11	7.942	VV	0.0192	5553.18408	3663.55005	14.8624
4	1.957	BB	0.0509	31.23247	8.30528	0.0836	12	7.990	VB	0.0569	1.78508e4	3756.80640	47.7753
5	6.405	BV	0.1160	166.47166	23.27240	0.4455	13	8.370	BB	0.0844	32.49841	6.43932	0.0870
6	6.606	VB	0.0762	6.81413	1.35521	0.0182	14	10.071	BB	0.0639	8.83280	2.02558	0.0236
7	6.819	BV	0.0732	320.79910	69.10890	0.8586	15	11.302	VB	0.0693	6.05789	1.25624	0.0162
8	6.959	VV	0.0834	407.60135	76.79352	1.0909							

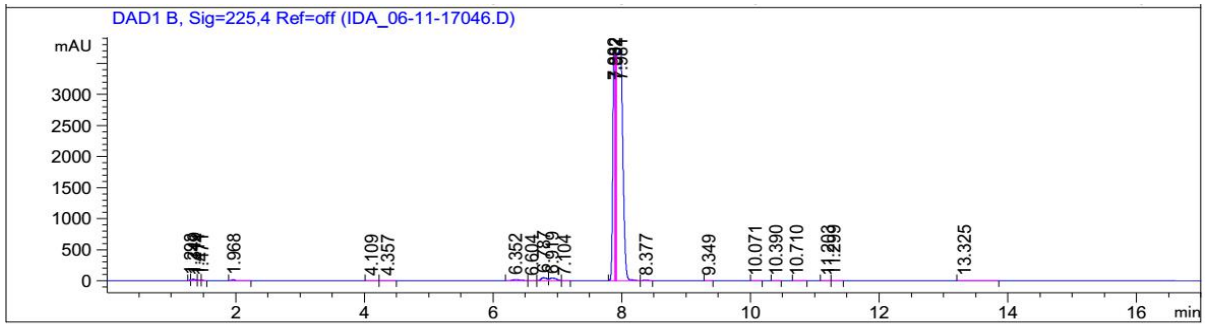
➤ Controle – Dia 8



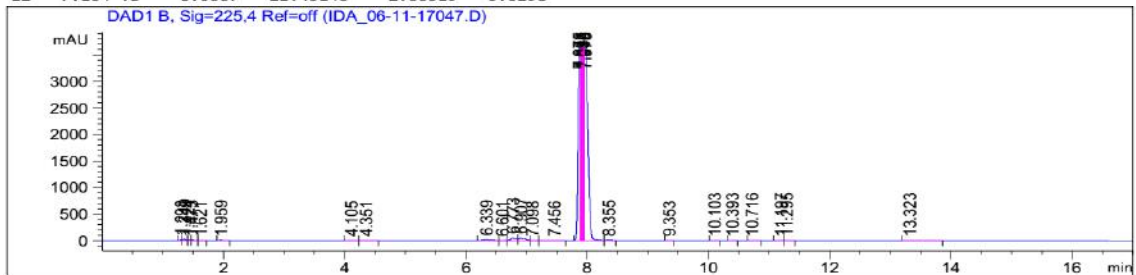
➤ Controle – Dia 9



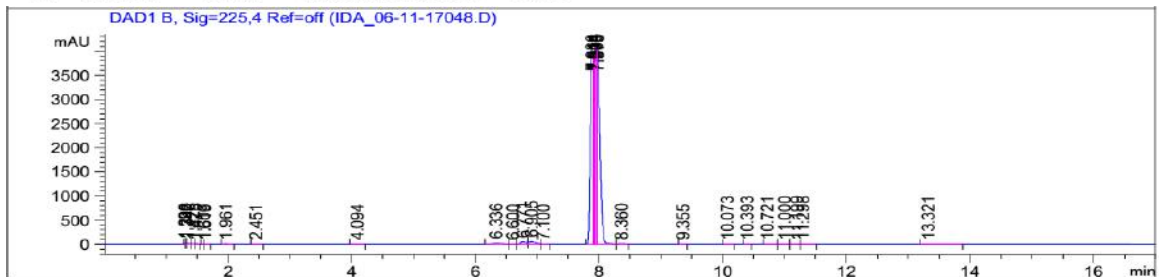
➤ Controle – Dia 10



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %	Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.298	BV	0.0184	16.66348	14.00072	0.0434	13	7.882	BV	0.0320	8310.43555	3727.29712	21.6536
2	1.349	VV	0.0504	95.17060	23.68164	0.2480	14	7.902	VV	0.0188	4961.88477	3673.53906	12.9286
3	1.414	VV	0.0473	28.01633	8.76024	0.0730	15	7.981	VB	0.0836	2.40509e4	3735.88745	62.6668
4	1.471	VB	0.0347	15.50570	6.53430	0.0404	16	8.377	BB	0.0950	25.78868	4.52188	0.0672
5	1.968	BB	0.0507	72.12053	19.49308	0.1879	17	9.349	BV	0.0567	5.44945	1.52635	0.0142
6	4.109	BB	0.0776	4.27893	6.82945e-1	0.0111	18	10.071	VB	0.0702	7.95624	1.63741	0.0207
7	4.357	BB	0.0773	5.04223	7.86068e-1	0.0131	19	10.390	BB	0.0566	3.00906	8.25028e-1	7.840e-3
8	6.352	BV	0.1244	145.73938	16.94239	0.3797	20	10.710	VB	0.1044	4.77414	5.43901e-1	0.0124
9	6.604	VB	0.0657	4.20002	8.64291e-1	0.0109	21	11.203	BV	0.0593	3.64526	7.90799e-1	9.498e-3
10	6.787	BV	0.0977	283.70059	46.82661	0.7392	22	11.299	VB	0.0591	3.37818	7.57163e-1	8.802e-3
11	6.919	VV	0.0983	304.09940	43.12315	0.7924	23	13.325	BB	0.1515	15.81334	1.23420	0.0412
12	7.104	VB	0.0667	11.43146	2.60319	0.0298							



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %	Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.298	BV	0.0194	19.89800	16.09798	0.0502	15	7.875	BV	0.0415	1.13161e4	3716.87476	28.5311
2	1.349	VV	0.0509	95.02097	23.64977	0.2396	16	7.907	VV	0.0109	2799.59277	3655.62671	7.0586
3	1.424	VV	0.0524	36.24408	9.85831	0.0914	17	7.935	VV	0.0196	5696.59424	3667.42993	14.3628
4	1.473	VB	0.0368	22.10838	8.65244	0.0557	18	7.946	VV	0.0103	2614.64404	3681.37622	6.5923
5	1.621	BB	0.0402	6.14828	1.95257	0.0155	19	7.978	VB	0.0609	1.61293e4	3735.33374	40.6668
6	1.959	BB	0.0503	32.41706	8.83233	0.0817	20	8.355	BB	0.0987	25.92446	4.37256	0.0654
7	4.105	BV	0.0820	5.97241	8.93496e-1	0.0151	21	9.353	BV	0.0579	5.22477	1.43878	0.0132
8	4.351	VB	0.0937	5.85419	7.44627e-1	0.0148	22	10.103	VB	0.0736	4.37656	7.08404e-1	0.0110
9	6.339	BV	0.1290	156.07454	17.59928	0.3935	23	10.393	BB	0.0553	3.26799	9.01718e-1	8.240e-3
10	6.601	VB	0.0671	4.20700	8.90293e-1	0.0106	24	10.716	VB	0.1104	4.90130	5.40095e-1	0.0124
11	6.773	BV	0.0904	296.78720	47.49268	0.7483	25	11.197	VB	0.0570	3.51753	7.60399e-1	8.869e-3
12	6.907	VV	0.1010	339.19901	46.84479	0.8552	26	11.295	VB	0.0614	3.12726	7.03182e-1	7.885e-3
13	7.098	VB	0.0661	12.63478	2.88622	0.0319	27	13.323	BB	0.1518	15.41197	1.20870	0.0389
14	7.456	BV	0.1707	7.65596	5.28039e-1	0.0193							



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %	Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.298	BV	0.0202	22.06403	16.89078	0.0525	16	7.880	BV	0.0463	1.33568e4	4017.43213	31.7799
2	1.320	VV	0.0181	20.06792	16.03795	0.0477	17	7.914	VV	0.0131	3910.58838	3916.34814	9.3045
3	1.347	VB	0.0294	40.89966	18.45696	0.0973	18	7.935	VV	0.0120	3202.17749	3936.56787	7.6190
4	1.429	BV	0.0525	9.93068	2.72773	0.0236	19	7.960	VV	0.0204	6180.06689	4069.32544	14.7043
5	1.475	VB	0.0309	8.77615	4.19260	0.0209	20	7.975	VB	0.0422	1.42938e4	4144.35742	34.0093
6	1.606	BV	0.0169	3.00688	2.52678	7.154e-3	21	8.360	BB	0.1010	27.50580	4.54915	0.0654
7	1.619	VB	0.0323	5.42777	2.40747	0.0129	22	9.355	BV	0.0548	5.06467	1.41378	0.0121
8	1.961	BB	0.0490	31.45330	8.73147	0.0748	23	10.073	VV	0.0754	10.32917	1.96221	0.0246
9	2.451	BB	0.0621	3.93418	8.81789e-1	9.361e-3	24	10.393	BB	0.0532	3.17744	8.79198e-1	7.560e-3
10	4.094	BV	0.0767	5.34089	8.45831e-1	0.0127	25	10.721	VB	0.1072	4.71092	5.29865e-1	0.0112
11	6.336	BV	0.1306	158.73338	17.86845	0.3777	26	11.000	BV	0.0753	3.80553	7.23934e-1	9.055e-3
12	6.600	VB	0.0626	4.07383	8.78709e-1	9.693e-3	27	11.199	VB	0.0809	5.53835	9.87592e-1	0.0132
13	6.771	BV	0.0886	293.74149	47.84877	0.6989	28	11.298	VB	0.0728	4.35462	8.42166e-1	0.0104
14	6.905	VV	0.1013	383.09073	52.39458	0.9115	29	13.321	BB	0.1863	16.70524	1.21948	0.0397
15	7.100	VB	0.0676	13.86167	3.16511	0.0330							