

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA  
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

PALOMA NATHANE NUNES DE FREITAS

Compartilhamento de moléculas de *quorum sensing* para sinalização e tolerância de *Pseudomonas* sp. a herbicidas como potencial para adaptação a diferentes condições de estresse ambiental

PONTA GROSSA

2020

PALOMA NATHANE NUNES DE FREITAS

Compartilhamento de moléculas de *quorum sensing* para sinalização e tolerância de *Pseudomonas* sp. a herbicidas como potencial para adaptação a diferentes condições de estresse ambiental

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração em Biologia Evolutiva).

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pileggi

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Olchanheski

PONTA GROSSA

2020

F866 Freitas, Paloma Nathane Nunes de  
Compartilhamento de moléculas de *quorum sensing* para sinalização e tolerância de *Pseudomonas* sp. a herbicidas como potencial para adaptação a diferentes condições de estresse ambiental / Paloma Nathane Nunes de Freitas. Ponta Grossa, 2020.  
55 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pileggi.

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Olchanheski.

1. Adaptação bacteriana. 2. Comunicação bacteriana. 3. Herbicidas. 4. Microbiologia ambiental. 5. Espectrometria de massas. I. Pileggi, Marcos. II. Olchanheski, Luiz Ricardo. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Evolutiva. IV.T.

CDD: 576

## ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 01/2020

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **Paloma Nathane Nunes de Freitas**.

Aos seis dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte, no auditório do PPG-BioEvol, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Dr Marcos Pileggi em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação da aluna **Paloma Nathane Nunes de Freitas**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de concentração em Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Marcos Pileggi (PPG-BioEvol/UEPG), Dr<sup>a</sup> Traudi Klein (LabMU/UEPG) e Dr Rafael Mazer Etto (PPG-BioEvol/UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e a candidata das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: **“Compartilhamento de moléculas de quorum sensing para sinalização e tolerância de Pseudomonas sp. a herbicidas como potencial para adaptação a diferentes condições de estresse ambiental”**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou a candidata **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de sessenta dias**; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) **até o prazo máximo de 90 dias após a defesa**; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo orientador, assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos, anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim  não

Novo título: \_\_\_\_\_

Ponta Grossa, 06 de fevereiro de dois mil e vinte.

Prof Dr Marcos Pileggi (PPG-BioEvol/UEPG)

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Traudi Klein (LabMU/UEPG)

Prof Dr Rafael Mazer Etto (PPG-BioEvol/UEPG)

## AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar o meu caminho e estar ao meu lado em todos os momentos.

Ao PPG BioEvol pela oportunidade de cursar o mestrado e a CAPES pela bolsa concedida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Pileggi, que abriu as portas do Laboratório de Microbiologia Ambiental para mim e me aceitou como aluna de iniciação científica no primeiro ano da graduação. Obrigada pela amizade, pela oportunidade, pelo incentivo, pela confiança, pelos ensinamentos e por sempre ter acreditado em mim. Além disso, por me fazer refletir sobre a importância de mantermos nossa essência, independentemente de qualquer situação e por me mostrar, sempre com muito humor, que não há problema algum em sermos baixinhos. Obrigada por todos esses anos e por ter contribuído imensamente para minha formação. Espero que nossa parceria continue por muito tempo.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Luiz Ricardo Olchanheski, que por muitas vezes me serviu de exemplo. Agradeço por me ensinar tudo da melhor forma possível.

A minha família, em especial aos meus pais, que não mediram esforços para que todas as minhas conquistas fossem alcançadas, obrigada por todo apoio, carinho e amor incondicional. E que com toda humildade e simplicidade ensinaram-me a ser uma pessoa de caráter e a buscar meus sonhos. Agradeço também à minha avó, pelo carinho e por suas orações, aos meus irmãos, pelo carinho e pela torcida e aos meus sobrinhos que me enchem de alegria.

Ao meu namorado, por todo amor, paciência, apoio, incentivo, companheirismo e por estar ao meu lado nos momentos de dificuldade e tristeza, mas também nas conquistas e alegrias.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia Ambiental.

Aos meus poucos, mas bons colegas que se tornaram amigos de coração, agradeço pela amizade, carinho, força e por me proporcionarem momentos inesquecíveis.

A banca examinadora, por suas contribuições.

Ao C-LABMU pelo uso do LC-MS/MS, fundamental para este trabalho.

A todos os professores e funcionários do PPG BioEvol, em especial a secretária Zoli, sempre tão prestativa.

E a todos que de alguma maneira, em algum momento, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*“...a única coisa de que precisamos para nos tornarmos bons filósofos é a capacidade de nos admirarmos com as coisas...”*

(Jostein Gaarder - O Mundo de Sofia)

## RESUMO

O *quorum sensing* (QS) é um sistema de comunicação bacteriano que permite que as bactérias monitorem a densidade populacional celular circundante mediada por meio de moléculas sinalizadoras químicas denominadas autoindutores e, a partir disso, coordenem coletivamente a expressão gênica, iniciando alterações fisiológicas importantes para sua sobrevivência. Desse modo, as bactérias são capazes de sobreviver em ambientes onde as condições mudam constantemente, em decorrência da adaptação genética que resulta da flexibilidade de expressão de seus genes. No ambiente, as bactérias precisam lidar com diversos componentes tóxicos. A introdução de agrotóxicos por exemplo, contribuiu para o controle de pragas e para o aumento da produção agrícola. Mas apesar de sua utilização na agricultura ter beneficiado a produtividade de culturas, surgiram algumas preocupações quanto aos efeitos adversos destes poluentes. A exposição de bactérias a componentes tóxicos pode levar a alterações no metabolismo celular, no crescimento, na atividade enzimática e na diminuição da diversidade dessas bactérias. Quando expostas a ambientes estressantes, necessitam de mudanças nos processos fisiológicos e estruturais para sobreviverem. Desse modo, diversas espécies de bactérias utilizam importantes estratégias adaptativas coordenadas pelo QS para contribuir para o aumento de sua capacidade em termos de sobrevivência sob diferentes condições ambientais. Porém, ainda não está claro na literatura se o QS pode ser utilizado pelas bactérias para coordenar comportamentos coletivos na população em resposta a herbicidas. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar se há um sistema de resposta via QS em uma linhagem de *Pseudomonas* sp. modulado pela presença de herbicidas. Utilizou-se uma linhagem de *Pseudomonas* sp. proveniente de tanques de armazenamento de água utilizada na lavagem de embalagens de agrotóxicos e os herbicidas Heat contendo o princípio ativo saflufenacil, Boral 500 SC contendo sulfentrazone, Roundup Transorb R contendo glifosato, Aminol 806 contendo 2,4-D e Atectra contendo dicamba. Realizou-se uma extração das moléculas sinalizadoras que posteriormente foram analisadas em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Aqui mostramos que na presença dos herbicidas Heat e Roundup Transorb R a linhagem parece compartilhar um controle regulatório pelas mesmas moléculas sinalizadoras de QS para controlar o estresse oxidativo produzido tanto pelo sistema de obtenção de energia quanto pela toxicidade de herbicidas. Na presença dos herbicidas Boral 500 SC, Aminol 806 e Atectra, observou-se um perfil de moléculas que estão envolvidas em diferentes estágios de formação de biofilme e a sinalização dessas pode ser um indicativo de que a linhagem esteja modulando a formação de biofilme como uma estratégia adaptativa para suportar o estresse desses herbicidas. Desse modo, o QS bacteriano pode desempenhar um papel importante na adaptação a estresses ambientais e possivelmente trazer contribuições para o estudo de biorremediação de herbicidas.

**Palavras-chave:** Adaptação bacteriana; Comunicação bacteriana; Herbicidas; Microbiologia Ambiental; Espectrometria de massas.

## ABSTRACT

Quorum sensing (QS) is a bacterial communication system that allows bacteria to monitor the surrounding cell population density mediated by means of chemical signaling molecules called autoinducers and, from that, collectively coordinate gene expression, initiating important physiological changes for its survival. In this way, bacteria are able to survive in environments where conditions change constantly, due to the genetic adaptation that results from the flexibility of expression of their genes. In the environment, bacteria have to deal with several toxic components. The introduction of pesticides, for example, contributed to pest control and increased agricultural production. But although its use in agriculture has benefited crop productivity, concerns have arisen about the adverse effects of these pollutants. Exposure of bacteria to toxic components can lead to changes in cell metabolism, growth, enzyme activity and decreased diversity of these bacteria. When exposed to stressful environments, they need changes in physiological and structural processes to survive. In this way, several species of bacteria use important adaptive strategies coordinated by the QS to contribute to the increase of their capacity in terms of survival under different environmental conditions. However, it is still unclear in the literature whether QS can be used by bacteria to coordinate collective behavior in the population in response to herbicides. Therefore, the objective of this work was to evaluate whether there is a QS response system in a *Pseudomonas* sp. modulated by the presence of herbicides. A strain of *Pseudomonas* sp. from water storage tanks used for washing pesticide packaging and Heat herbicides containing the active ingredient saflufenacil, Boral 500 SC containing sulfentrazone, Roundup Transorb R containing glyphosate, Aminol 806 containing 2,4-D and Atectra containing dicamba. An extraction of the signaling molecules was carried out and subsequently analyzed in liquid chromatography coupled with mass spectrometry. Here we show that in the presence of the Heat and Roundup Transorb R herbicides, the strain seems to share a regulatory control by the same QS signaling molecules to control the oxidative stress produced by both the energy production system and the herbicide toxicity. In the presence of the herbicides Boral 500 SC, Aminol 806 and Atectra, a profile of molecules was observed that are involved in different stages of biofilm formation and their signaling may be an indication that the lineage is modulating the formation of biofilm as an adaptive strategy to withstand the stress of these herbicides. Thus, bacterial QS can play an important role in adapting to environmental stresses and possibly bring contributions to the study of herbicide bioremediation.

**Keywords:** Bacterial adaptation; Bacterial communication; Environmental Microbiology; Herbicides; Mass spectrometry.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	– Classificação dos herbicidas estudados neste trabalho segundo os mecanismos de ação e famílias químicas descritos por (BEFFA; MENNE; KÖCHER, 2019).....	14
Quadro 2	– Estruturas químicas das famílias AHLs e AQS de moléculas sinalizadoras de <i>quorum</i> bacteriano.....	21
Figura 1	– Sistema de detecção de <i>quorum</i> LuxI/LuxR de bactérias Gram-negativas...	25
Figura 2	– Curvas de crescimento de <i>Pseudomonas</i> sp. CMA55 em (MM) controle e nos tratamentos (H) Heat, (B) Boral 500 SC, (R) Roundup Transorb R, (A) Aminol 806 e (At) Atectra.....	38
Figura 3	– Viabilidade celular de <i>Pseudomonas</i> sp. CMA55 após 14h de incubação em (MM) controle e nos tratamentos (H) Heat, (B) Boral 500 SC, (R) Roundup Transorb R, (A) Aminol 806 e (At) Atectra.....	39
Figura 4	– Análise de PCA sobre o perfil de moléculas sinalizadas por <i>Pseudomonas</i> sp. CMA55. Tratamentos, em triplicatas, representados pelos símbolos (0 e MM) controles e tratamentos (H) Heat, (B) Boral 500 SC, (R) Roundup Transorb R, (A) Aminol 806 e (At) Atectra. As porcentagens de explicação são PC1= 22 e PC2= 17,73.....	41

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Funções de algumas moléculas sinalizadoras de QS nos controles 0 e MM e nos tratamentos H e R que já foram descritas na literatura..... 42
- Tabela 2 – Funções de algumas moléculas sinalizadoras de QS nos tratamentos B, A e At que já foram descritas na literatura..... 42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>QS</b>	<i>Quorum sensing</i>
<b>AHLs</b>	N-acil homoserinas lactonas
<b>AQs</b>	2-alquil-4-(1H)-quinolonas
<b>MM</b>	Meio Mineral
<b>0</b>	Meio sem herbicida e sem bactéria
<b>H</b>	Meio Mineral com Heat
<b>B</b>	Meio Mineral com Boral 500 SC
<b>R</b>	Meio Mineral com Roundup Transorb R
<b>A</b>	Meio Mineral com Aminol 806
<b>At</b>	Meio Mineral com Atectra
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônias
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>EPS</b>	Substâncias poliméricas extracelulares
<b>LC-MS/MS</b>	Sistema de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
<b>ERO</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>EPSPS</b>	Enzima 5-enolpiruvato-chiquimato-3-fosfato sintase
<b>PROTOX</b>	Enzima protoporfirinogênio oxidase
<b>AIA</b>	Ácido indolacético
<b>C4-HSL</b>	N-butiril-L-homoserina lactona
<b>C6-HSL</b>	N-hexanoil-L-homoserina lactona
<b>C8-HSL</b>	N-octanoil-L-homoserina lactona
<b>C10-HSL</b>	N-decanoil-L-homoserina lactona
<b>C12-HSL</b>	N-dodecanoil-L-homoserina lactona
<b>C14-HSL</b>	N-tetradecanoil-L-homoserina lactona
<b>3-oxo-C4-HSL</b>	N-(3-oxobutiril)-L-homoserina lactona
<b>3-oxo-C6-HSL</b>	N-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona
<b>3-oxo-C8-HSL</b>	N-(3-oxooctanoil)-L-homoserina lactona
<b>3-oxo-C10-HSL</b>	N-(3-oxodecanoil)-L-homoserina lactona
<b>3-oxo-C12-HSL</b>	N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona
<b>3-oxo-C14-HSL</b>	N-(3-oxotetradecanoil)-L-homoserina lactona
<b>3-OH-C4-HSL</b>	N-(3-hidroxi-butiril)-L-homoserina lactona

<b>3-OH-C6-HSL</b>	N-(3-hidroxihexanoil)-L-homoserina lactona
<b>3-OH-C8-HSL</b>	N-(3-hidroxiocetanoil)-L-homoserina lactona
<b>3-OH-C10-HSL</b>	N-(3-hidroxiodecanoil)-L-homoserina lactona
<b>3-OH-C12-HSL</b>	N-(3-hidroxidodecanoil)-L-homoserina lactona
<b>3-OH-C14-HSL</b>	N-(3-hidroxitetradecanoil)-L-homoserina lactona
<b>HHQ</b>	2-heptil-4-hidroxiquinolona
<b>NHQ</b>	2-nonil-4-hidroxiquinolona
<b>UHQ</b>	2-undecil-4-hidroxiquinolona
<b>HQNO</b>	N-óxido de 2-heptil-4-hidroxiquinolona
<b>NQNO</b>	N-óxido de 2-nonil-4-hidroxiquinolona
<b>PQS</b>	2-heptil-3-hidroxi-4(1H)-quinolona
<b>C9-PQS</b>	3-hidroxi-2-nonil-4(1H)-quinolona
<b>C11-PQS</b>	3-hidroxi-2-undecil-4(1H)-quinolona

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1	O USO DE AGROTÓXICOS.....	13
1.2	IMPACTOS EM ORGANISMOS NÃO-ALVO.....	17
1.3	IMPACTOS EM COMUNIDADES MICROBIANAS.....	19
1.4	<i>QUORUM SENSING</i> .....	20
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	28
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
3.1	LINHAGEM BACTERIANA.....	29
3.2	HERBICIDAS.....	29
3.3	TRATAMENTOS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO BACTERIANO.....	29
3.4	CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO.....	30
3.5	VIABILIDADE CELULAR.....	30
3.6	EXTRAÇÃO DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS DE <i>QUORUM SENSING</i> .....	30
3.7	ANÁLISE EM LC-MS/MS (CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS).....	30
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	32
4.1	COMPARTILHAMENTO DE MOLÉCULAS DE <i>QUORUM SENSING</i> PARA SINALIZAÇÃO E TOLERÂNCIA DE <i>Pseudomonas</i> sp. A HERBICIDAS COMO POTENCIAL PARA ADAPTAÇÃO A DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE AMBIENTAL.....	32
4.1.1	Introdução.....	33
4.1.2	Material e Métodos.....	35
4.1.2.1	Linhagem bacteriana.....	35
4.1.2.2	Herbicidas.....	35
4.1.2.3	Tratamentos e condições de crescimento bacteriano.....	35
4.1.2.4	Curva de crescimento bacteriano.....	36
4.1.2.5	Viabilidade celular.....	36
4.1.2.6	Extração de moléculas sinalizadoras de <i>quorum sensing</i> .....	36
4.1.2.7	Análise em LC-MS/MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas).....	37
4.1.2.8	Análise estatística.....	37
4.1.3	Resultados e Discussão.....	38
4.1.3.1	Crecimento de <i>Pseudomonas</i> sp. CMA55.....	38
4.1.3.2	Viabilidade de <i>Pseudomonas</i> sp. CMA55.....	38
4.1.3.3	Método adaptado para identificação de moléculas sinalizadoras de <i>quorum sensing</i> por LC-MS/MS.....	39
4.1.3.4	Perfil de moléculas sinalizadoras de <i>quorum sensing</i> na presença de herbicidas... 40	

4.1.4 Conclusão.....	46
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>
<b>APÊNDICE A – LISTA DE AGROTÓXICOS PRESENTES NOS TANQUES DE ARMAZENAMENTO DE ÁGUA UTILIZADA NA LAVAGEM DE EMBALAGENS DE AGROTÓXICOS.....</b>	<b>53</b>
<b>APÊNDICE B – LISTA DE VARIÁVEIS ESPECÍFICAS DOS ANALITOS UTILIZADAS PARA CONFIGURAR O MS E PARA A ANÁLISE MRM.....</b>	<b>54</b>
<b>APÊNDICE C – ANÁLISE DE PCA SOBRE O PERFIL DE MOLÉCULAS SINALIZADAS POR <i>Pseudomonas</i> sp. CMA55. AS AMOSTRAS SÃO REPRESENTADAS PELOS PONTOS (CONTROLES 0 E MM E TRATAMENTOS H, B, R, A E AT), ENQUANTO AS MOLÉCULAS SINALIZADORAS DE QS (ABREVIATURAS EM CINZA) SÃO APRESENTADAS COMO VETORES. CADA VETOR E COR APONTAM PARA A DIREÇÃO DO AUMENTO DE UMA DETERMINADA MOLÉCULA E SEU COMPRIMENTO INDICA A FORÇA DA CORRELAÇÃO. AS PORCENTAGENS DE EXPLICAÇÃO SÃO PC1= 58,2 E PC2= 21,3.....</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O USO DE AGROTÓXICOS

A agricultura irá enfrentar um grande desafio relacionado à necessidade de alimentar as estimadas 8 bilhões de pessoas que viverão na Terra em 2024, subindo para mais de 9 bilhões até 2050, (CAMARGO et al., 2017). Portanto, o aumento na produção de alimentos é o objetivo primordial de todos os países. Para alimentar uma população desse tamanho, as estimativas são de que a produção de alimentos terá que aumentar em pelo menos 50%, se não em mais de 100%, durante os próximos 30 anos (CAMARGO et al., 2017).

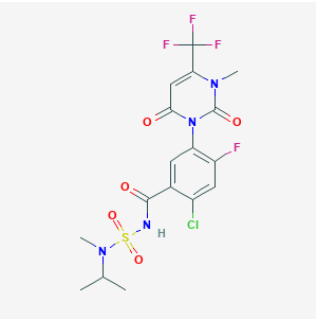
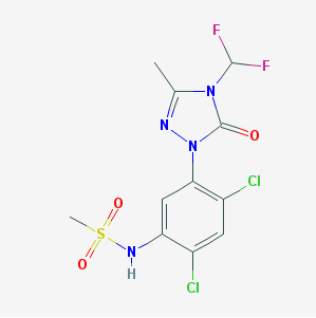
Como 30% da produção agrícola mundial é perdida devido a pragas, o uso de agrotóxicos tornou-se indispensável na agricultura (JAISWAL; VERMA; YADAV, 2017). Globalmente, 8.000 espécies de ervas daninhas prejudicam as culturas agrícolas, competindo por água, luz e nutrientes, causando perdas de 13% do rendimento (PIMENTEL et al., 2009). Por esse motivo, reduzir a perda de culturas devido a danos causados por pragas é uma das principais tarefas para garantir a produção agrícola (ZHANG, 2018).

A introdução de agrotóxicos contribuiu para o controle de pragas e o aumento da produção agrícola, trazendo maior potencial econômico em termos de aumento da produção de alimentos para atender às necessidades da população humana (JAISWAL; VERMA; YADAV, 2017).

Os agrotóxicos incluem herbicidas, fungicidas, inseticidas, entre outros (STALEY; HARWOOD; ROHR, 2015). Os herbicidas são substâncias utilizadas para realizar o controle de plantas daninhas. Esse controle ocorre por meio da inibição de processos bioquímicos que são imprescindíveis para que as plantas se desenvolvam. Os herbicidas podem ser classificados quanto à modalidade de aplicação (pré-emergentes ou pós-emergentes), seletividade (seletivo ou não seletivo), mobilidade (sistêmico ou de contato) e mecanismo de ação. Este último diz respeito ao processo bioquímico que é interrompido na presença do herbicida, a maioria ocorrendo em cloroplastos, local onde ocorre a fotossíntese. Contudo, há outros mecanismos, atuando fora do cloroplasto, que interrompem processos não relacionados diretamente com as reações fotossintéticas (VATS, 2015). O Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC) estabeleceu um sistema de classificação para herbicidas com base em seu mecanismo de ação e agrupados em diferentes famílias químicas (BEFFA; MENNE; KÖCHER, 2019). Os herbicidas estudados neste trabalho são mostrados no Quadro 1 de acordo com esta classificação.

Quadro 1 – Classificação dos herbicidas estudados neste trabalho segundo os mecanismos de ação e famílias químicas descritos por (BEFFA; MENNE; KÖCHER, 2019).

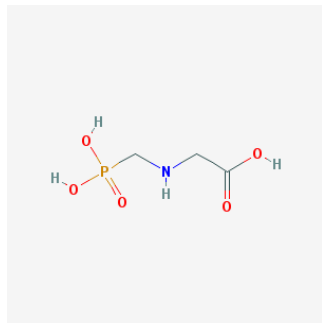
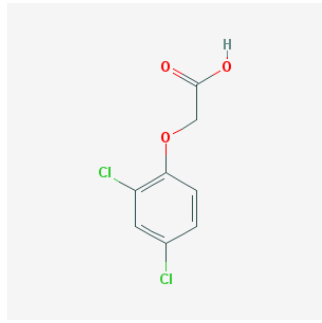
(continua)

<b>Herbicidas</b>					
<b>Marca comercial</b>	<b>Ingrediente ativo</b>	<b>Estrutura molecular</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Família química</b>	<b>Classificação HRAC</b>
Heat	Saflufenacil		Inibidores de PROTOX	Pirimidinadionas	E*
Boral 500 SC	Sulfentrazone			Triazolinonas	E*

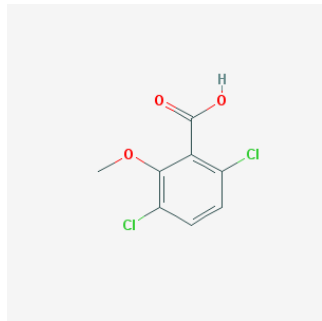


Quadro 1 – Classificação dos herbicidas estudados neste trabalho segundo os mecanismos de ação e famílias químicas descritos por (BEFFA; MENNE; KÖCHER, 2019).

(continuação)

<b>Herbicidas</b>					
<b>Marca comercial</b>	<b>Ingrediente ativo</b>	<b>Estrutura molecular</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Família química</b>	<b>Classificação HRAC</b>
Roundup Transorb R	Glifosato	 The image shows the chemical structure of glyphosate, which is a substituted glycine. It consists of a central carbon atom bonded to a hydrogen atom, a phosphate group (PO3H2), an amino group (NH2), and a carboxylate group (COO-).	Inibidores de EPSPS	Glicina substituída	G*
Aminol 806	2,4-D	 The image shows the chemical structure of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). It features a benzene ring with two chlorine atoms at the 2 and 4 positions, and a carboxymethyl group (-CH2COOH) at the 1 position.	Mimetizadores de auxinas	Fenoxiácidos	O*

Quadro 1 – Classificação dos herbicidas estudados neste trabalho segundo os mecanismos de ação e famílias químicas descritos por (BEFFA; MENNE; KÖCHER, 2019).  
(conclusão)

<b>Herbicidas</b>					
<b>Marca comercial</b>	<b>Ingrediente ativo</b>	<b>Estrutura molecular</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Família química</b>	<b>Classificação HRAC</b>
Atectra	Dicamba		Mimetizadores de auxinas	Ácido benzóico	O*

Fonte: (BEFFA; MENNE; KÖCHER, 2019).

Nota: \* Classificação das famílias químicas por letras, adotado pelo HRAC.

O glifosato tem um mecanismo de ação por inibição da EPSPS (enzima 5-enolpiruvato-chiquimato-3-fosfato sintase), pertence à família química da glicina e ao grupo de classificação G (HRAC). Na ausência do herbicida, a enzima EPSPS catalisa a reação entre chiquimato e fosfoenol-piruvato, que culmina na produção dos precursores dos aminoácidos tirosina, fenilalanina e triptofano, os quais são essenciais para as plantas. Quando aspergido nas plantas, o glifosato se liga à enzima EPSPS, ocupando o sítio de ligação onde deveria se ligar a molécula de fosfoenol-piruvato, interrompendo a reação (GOMES et al., 2014).

O saflufenacil e o sulfentrazone tem um mecanismo de ação por inibição da PROTOX (enzima protoporfirinogênio oxidase), pertencem as famílias químicas da pirimidinonas e triazolinonas respectivamente e ambos ao grupo de classificação E (HRAC). A enzima PROTOX é responsável pela oxidação enzimática de protoporfirinogênio IX, a qual resulta na produção de protoporfirina IX que, por sua vez, é precursora de clorofila e compostos heme. Na presença de herbicidas inibidores de PROTOX essa reação é inibida. Contudo, não é a falta de clorofila que causa a morte da planta, uma vez que plantas tratadas não apresentam clorose. Com a inibição da reação, ocorre o acúmulo de protoporfirinogênio IX no cloroplasto, o qual extravasa para o citoplasma. Neste local, esse composto é convertido a protoporfirina IX por meio de reações não enzimáticas. A protoporfirina IX então se acumula no citoplasma e, na presença de luz e O<sub>2</sub>, ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERRO). As ERRO são altamente tóxicas para as membranas celulares, causando a sua desintegração por estresse oxidativo (ALVES et al., 2018).

O 2,4-D e o dicamba tem um mecanismo de ação por mimetização de auxinas, pertencem as famílias químicas da fenoxiácidos e ácido benzóico, respectivamente, e ambos ao grupo de classificação O (HRAC). As auxinas, tais como o ácido indolacético (AIA) são hormônios encontrados naturalmente nas plantas. Os herbicidas auxínicos mimetizam (imitam) os efeitos das auxinas naturais. Que quando em excesso, causam distúrbios fisiológicos que levam as plantas à morte, uma vez que desregulam o balanço hormonal da planta (GOGGIN; CAWTHRAY; POWLES, 2016).

## 1.2 IMPACTOS EM ORGANISMOS NÃO-ALVO

Dentre os agrotóxicos aplicados na agricultura, em uma proporção do uso global em 2014, aproximadamente 25% são herbicidas (ZHANG, 2018). E apesar da utilização desses agrotóxicos na agricultura ter beneficiado a produtividade de culturas, surgiram algumas preocupações quanto aos efeitos adversos destes xenobióticos (SCHÜTTE et al., 2017). Os

agrotóxicos aplicados devem ser tóxicos apenas para os organismos-alvo. Porém, esse raramente é o caso, pois a maioria dos agrotóxicos são inespecíficos e a utilização excessiva e aplicação inadequada desses produtos podem causar impactos ambientais. Estima-se que apenas cerca de 0,1% dos agrotóxicos atinja os organismos-alvo e o restante contamine o meio ambiente como água, ar e solo (GILL; GARG, 2014).

A preocupação mais frequente com o impacto ambiental dos resíduos de agrotóxicos resulta de sua capacidade de lixiviação, contaminação dos lençóis freáticos, deriva de pulverização e sua persistência no solo (GILL; GARG, 2014). Em 2013, o Greenpeace informou que 70% dos agrotóxicos usados na China não foram absorvidos pelas plantas, mas se infiltraram no solo e nas águas subterrâneas (ZHANG, 2018).

O herbicida glifosato é encontrado em solos, águas superficiais, subterrâneas e de precipitação dos EUA. Em solos argentinos, níveis de resíduos de até 1500µg/kg (1.5 ppm) de glifosato também foram encontrados (SCHÜTTE et al., 2017). O herbicida 2,4-D juntamente com o glifosato são altamente voláteis, aumentando assim o potencial de danos para organismos não-alvo devido à deriva de pulverização (SCHÜTTE et al., 2017). O princípio ativo saflufenacil do herbicida heat pode lixiviar para profundidades do solo superiores a 60 cm. Devido à combinação de propriedades que favorecem a lixiviação (persistência, alta solubilidade, baixo potencial de ligação e baixa volatilidade), o princípio ativo tem alto risco de atingir e contaminar lençóis freáticos e sistemas aquáticos (LAN et al., 2014).

Os agrotóxicos também afetam outros organismos que não são seus organismos-alvo, podendo causar efeitos em plantas não-alvo como, redução na produção de frutos (REEVES; LAMMERS, 2011). E doses subletais do princípio ativo dicamba (0,1 a 1% da taxa de aplicação no campo) causaram atrasos e reduções no florescimento de duas espécies vegetais (*Medicago sativa* e *Eupatorium perfoliatum*), indicando consequências negativas para a abundância de plantas em áreas de exposição desse herbicida. Consequentemente, a diminuição na floração levou a uma menor visitação dos polinizadores às plantas, sugerindo que o herbicida pode afetar as comunidades de polinizadores. O dicamba também pode alterar o crescimento e desenvolvimento de insetos herbívoros quando estes se alimentam de plantas estressadas por doses subletais (BOHNENBLUST et al., 2016).

A poluição por agrotóxicos também é um dos principais determinantes do declínio de insetos (SÁNCHEZ-BAYO; WYCKHUYS, 2019). Os insetos polinizadores, como diferentes espécies de abelhas, moscas e besouros são agentes que desempenham um importante papel na produtividade de cultivos e que são afetados por agrotóxicos. As abelhas, por exemplo, compreendem 80% da população de insetos polinizadores, cuja eficiência de coleta de pólen

pode ser afetada por xenobióticos (KAUR; GARG, 2014). A exposição de abelhas ao glifosato pode afetar a microbiota intestinal desses insetos, aumentando a suscetibilidade a patógenos oportunistas (MOTTA; RAYMANN; MORAN, 2018).

A poluição por agrotóxicos também afeta a vida de peixes, minhocas e outros organismos devido a sua toxicidade (GILL; GARG, 2014). Em peixes e minhocas pode afetar no crescimento, na atividade reprodutiva e conseqüentemente no aumento da taxa de mortalidade (KAUR; GARG, 2014). Os seres humanos também estão expostos a agrotóxicos encontrados no solo, água, ar e alimentos por diferentes vias de exposição, como inalação, ingestão e contato dérmico (CAMARGO et al., 2017). O aumento da incidência de doenças humanas, como câncer, doenças renais crônicas, supressão do sistema imunológico, esterilidade entre homens e mulheres, distúrbios endócrinos, neurológicos e comportamentais, especialmente entre crianças, têm sido atribuídos ao envenenamento por agrotóxicos (JAISWAL; VERMA; YADAV, 2017).

Resíduos de agrotóxicos também foram detectados em amostras de leite materno humano, e há preocupações sobre a exposição pré-natal e os efeitos sobre a saúde em crianças (PIRSAHEB et al., 2015). Estudos também mostram que a exposição aos agrotóxicos pode comprometer a capacidade olfativa de humanos (BLAIR et al., 2019). Além disso, os efeitos negativos para a saúde que tem sido associados com xenobióticos incluem, efeitos respiratórios, como a exposição ao 2,4-D pode estar associada com sibilos alérgicos (HOPPIN et al., 2017).

### 1.3 IMPACTOS EM COMUNIDADES MICROBIANAS

Os microrganismos desempenham um papel fundamental na manutenção dos ecossistemas. No solo, por exemplo, são responsáveis por processos como decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, fixação biológica do nitrogênio, entre outros (VIBHA; NEELAM, 2012).

O tratamento intensivo do solo com agrotóxicos pode alterar o crescimento, a diversidade, o metabolismo celular e a atividade enzimática de populações microbianas do solo. No estudo de Mazhari e Ferguson (2018), os herbicidas glifosato e paraquat, levaram a um declínio no crescimento e na população de diferentes cepas bacterianas. Meena et al. (2020), relataram que o herbicida 2,4-D pode inibir as atividades de *Rhizobium* sp., *Nitrosomonas* sp. e *Nitrobacter* sp. microrganismos importantes para o ciclo do nitrogênio no solo. E tratamentos com o herbicida glifosato também afetaram negativamente as atividades de *Rhizobium* sp. e fungos micorrízicos arbusculares, resultando em reduções no crescimento das plantas (VAN

BRUGGEN et al., 2018). Outro estudo mostrou que o desempenho de fungos micorrízicos e rizóbios em soja foi reduzido pelo uso do herbicida sulfentrazone, contribuindo para a redução do crescimento da planta (VIEIRA; SILVA; SILVEIRA, 2007). Além disso, outros estudos mostraram alterações e diminuições na diversidade de comunidades microbianas após exposição aos herbicidas 2,4-D, atrazina, diuron (MORETTO et al., 2017) e mesotrione (DU et al., 2018). Este último herbicida também apresentou estresse oxidativo em *Pantoea ananatis* CCT7673 (PRIONE et al., 2016) e mudanças no padrão de saturação lipídica indicando alteração na permeabilidade da membrana em *Bacillus megaterium* (DOBRZANSKI et al., 2018).

Por outro lado, a exposição de agrotóxicos pode ajudar no crescimento e/ou sobrevivência desses microrganismos, como algumas bactérias que fazem uso de xenobióticos como fonte de nutrientes, podendo alterar suas propriedades tóxicas ou até mesmo levando à mineralização (JAISWAL; VERMA; YADAV, 2017). O gênero *Pseudomonas*, por exemplo, tem capacidade de degradação de herbicidas como, 2,4-D (SINGH; SINGH, 2016) e glifosato (MAKUT; BELLO, 2018), e de mineralização do herbicida atrazina (MANDELBAUM; ALLAN; WACKETT, 1995).

Desse modo, quando expostas a ambientes estressantes, necessitam de alterações nos processos fisiológicos e estruturais para sobreviverem (STALEY; HARWOOD; ROHR, 2015). Portanto, entender o comportamento de bactérias em contato com esses poluentes, ou seja, compreender quais são os danos gerados e quais são os mecanismos de adaptação e defesa, pode ser útil para elucidar o risco das contaminações por agrotóxicos e seus consequentes impactos e poderá trazer benefícios para futuras aplicações agrícolas (JAISWAL; VERMA; YADAV, 2017).

#### 1.4 QUORUM SENSING

O *quorum sensing* (QS) ou sensor de *quorum* (o termo “*quorum*” indica “número suficiente”) é um sistema de comunicação entre bactérias em função da densidade celular. Esse sistema permite que as bactérias monitorem a densidade populacional celular circundante e, a partir disso, coordenem coletivamente comportamentos na população. O sistema então é mediado pela produção, liberação, acumulação, detecção de moléculas sinalizadoras químicas denominadas autoindutores e a ativação de genes específicos (NG; BASSLER, 2009).

A regulação de comportamentos coletivos bacterianos dependentes da densidade celular foi descrita em 1970 por Neelson, Platt e Hastings, no qual mostraram que uma espécie

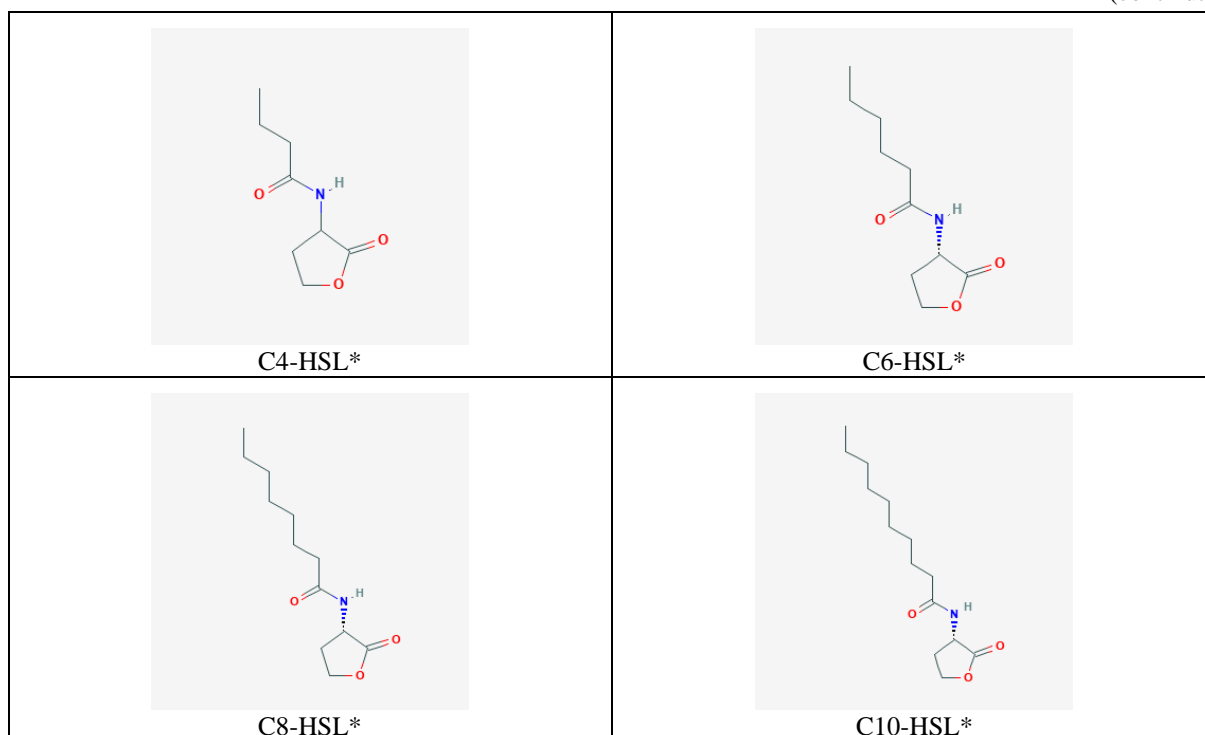
de bactéria marinha bioluminescente, *Vibrio fischeri* produzia luz em alta densidade celular mas não em suspensões diluídas (NEALSON; PLATT; HASTINGS, 1970). Porém, vinte e quatro anos depois, em 1994, foi denominada *quorum sensing* por Fuqua, Winans e Greenberg (FUQUA; WINANS; GREENBERG, 1994).

As moléculas sinalizadoras de QS podem ser classificadas em quatro grupos principais, N-acil homoserinas lactonas (AHLs) e 2-alkil-4-(1H)-quinolonas (AQs) utilizadas por bactérias Gram-negativas (ORTORI et al., 2011), peptídeos ou oligopeptídeos por bactérias Gram-positivas e Autoindutor-2 também conhecido como furanosil borato diéster que pode ser utilizado por ambos os grupos bacterianos (MILLER; BASSLER, 2001).

As AHLs e AQs são as classes mais comuns de autoindutores. Ambas com uma gama de comprimentos de cadeia acila/alkila (ORTORI et al., 2011) como mostra o Quadro 2.

Quadro 2 – Estruturas químicas das famílias AHLs e AQs de moléculas sinalizadoras de *quorum* bacteriano.

(continua)



Quadro 2 – Estruturas químicas das famílias AHLs e AQs de moléculas sinalizadoras de *quorum* bacteriano.

(continuação)

 <chem>CCCCCCCCCCCC(=O)N[C@@H]1CCOC1=O</chem>	 <chem>CCCCCCCCCCC(=O)N[C@@H]1CCOC1=O</chem>
 <chem>CC(=O)CC(=O)N[C@@H]1CCOC1=O</chem>	 <chem>CCCCC(=O)CC(=O)N[C@@H]1CCOC1=O</chem>
 <chem>CCCCC(=O)CC(=O)N[C@@H]1CCOC1=O</chem>	 <chem>CCCCC(=O)CC(=O)N[C@@H]1CCOC1=O</chem>
 <chem>CCCCC(=O)CC(=O)N[C@@H]1CCOC1=O</chem>	 <chem>CCCCC(=O)CC(=O)N[C@@H]1CCOC1=O</chem>



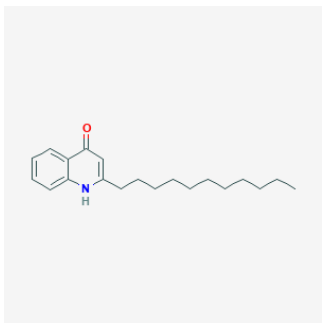
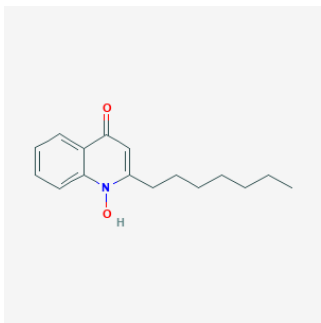
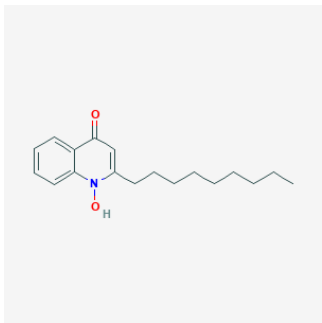
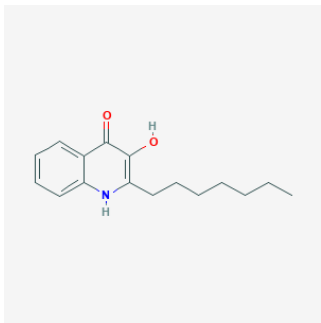
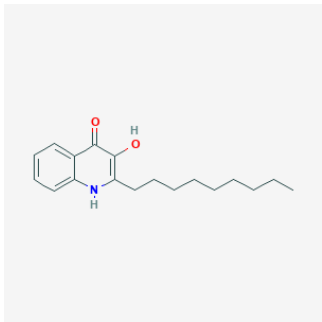
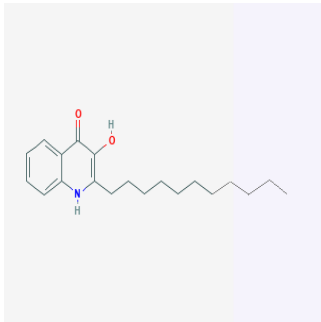
Quadro 2 – Estruturas químicas das famílias AHLs e AQs de moléculas sinalizadoras de *quorum* bacteriano.

(continuação)

<p>Chemical structure of 3-OH-C4-HSL* (N-(3-hydroxybutyl)-L-homoserine lactone). It features a five-membered lactone ring attached to a nitrogen atom, which is further bonded to a 3-hydroxybutyl chain.</p>	<p>Chemical structure of 3-OH-C6-HSL* (N-(3-hydroxyhexyl)-L-homoserine lactone). It features a five-membered lactone ring attached to a nitrogen atom, which is further bonded to a 3-hydroxyhexyl chain.</p>
<p>Chemical structure of 3-OH-C8-HSL* (N-(3-hydroxyoctyl)-L-homoserine lactone). It features a five-membered lactone ring attached to a nitrogen atom, which is further bonded to a 3-hydroxyoctyl chain.</p>	<p>Chemical structure of 3-OH-C10-HSL* (N-(3-hydroxydecyl)-L-homoserine lactone). It features a five-membered lactone ring attached to a nitrogen atom, which is further bonded to a 3-hydroxydecyl chain.</p>
<p>Chemical structure of 3-OH-C12-HSL* (N-(3-hydroxydodecyl)-L-homoserine lactone). It features a five-membered lactone ring attached to a nitrogen atom, which is further bonded to a 3-hydroxydodecyl chain.</p>	<p>Chemical structure of 3-OH-C14-HSL* (N-(3-hydroxytetradecyl)-L-homoserine lactone). It features a five-membered lactone ring attached to a nitrogen atom, which is further bonded to a 3-hydroxytetradecyl chain.</p>
<p>Chemical structure of HHQ (2-heptyl-4-oxoquinoline-3-carboxamide). It consists of a quinoline ring system with a carbonyl group at position 4 and a heptyl chain at position 2.</p>	<p>Chemical structure of NHQ (2-nonyl-4-oxoquinoline-3-carboxamide). It consists of a quinoline ring system with a carbonyl group at position 4 and a nonyl chain at position 2.</p>

Quadro 2 – Estruturas químicas das famílias AHLs e Aqs de moléculas sinalizadoras de *quorum* bacteriano.

(conclusão)

 <p style="text-align: center;">UHQ</p>	 <p style="text-align: center;">HQNO</p>
 <p style="text-align: center;">NQNO</p>	 <p style="text-align: center;">PQS</p>
 <p style="text-align: center;">C9-PQS</p>	 <p style="text-align: center;">C11-PQS</p>

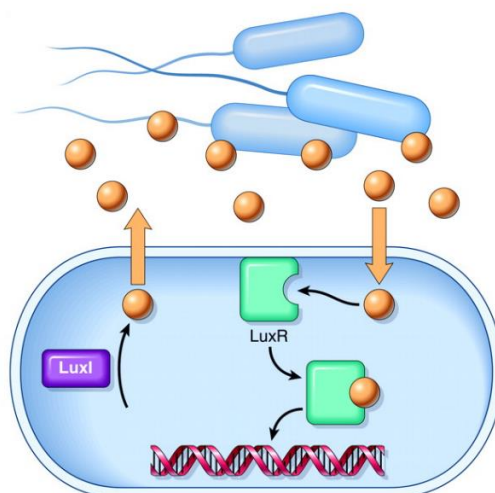
Fonte: PubChem.

Nota: As AHLs (\*) contêm em sua estrutura um anel de homoserina lactona ligado a um grupo acila lateral variável, podendo conter de quatro a dezoito carbonos, ser saturado ou insaturado, com ou sem substituinte hidroxil e oxo no terceiro carbono do grupo acila lateral variável. As Aqs ( ) são caracterizadas pela presença de hidrogênio ou hidroxila na posição três, variações de comprimento e grau de saturação da cadeia lateral 2-álquil, bem como derivados de N-óxido dessas variantes.

A produção e detecção de AHLs e Aqs envolve as proteínas LuxI e LuxR e suas homólogas. A proteína LuxI ou suas homólogas sintetiza as AHLs/Aqs e a proteína LuxR ou suas homólogas funciona como receptor de AHLs/Aqs e ativador transcricional. Cada sistema de proteínas irá sintetizar e detectar diferentes AHLs/Aqs (ATKINSON; CÁMARA; WILLIAMS, 2007). Por exemplo, a proteína LuxI produz o autoindutor N-(3-oxohexanóil)-L-homoserina lactona (3-oxo-C6-HSL) em *V. fischeri*. A proteína LasI produz o autoindutor N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona (3-oxo-C12-HSL) em *Pseudomonas aeruginosa*, entre outros (MUKHERJEE; BASSLER, 2019).

Como mostra na Figura 1, as AHLs são sintetizadas intracelularmente pela LuxI ou suas homólogas e são liberadas para o meio extracelular. Em baixa densidade celular, a concentração dessas moléculas não é suficiente para ser detectada, conforme o número de células da população bacteriana aumenta, a concentração extracelular de moléculas também aumenta, quando o acúmulo dessas moléculas alcança o nível necessário para sua detecção, essas moléculas podem difundir-se livremente pela membrana citoplasmática e se ligar ao receptor LuxR ou seus homólogos, disparando cascatas de sinalização que resultam em alterações na transcrição e expressão de genes-alvo na população (NG; BASSLER, 2009). Cada proteína LuxI ou suas homólogas produz o sinal de alta especificidade para o seu receptor LuxR ou seus homólogos e essas proteínas receptoras também possuem sítio de ligação específico, permitindo que LuxR ou seus homólogos seja ativado somente por seu ligante cognato (MUKHERJEE; BASSLER, 2019).

Figura 1 – Sistema de detecção de *quorum* LuxI/LuxR de bactérias Gram-negativas.



Fonte: (RAFFA et al., 2005).

O QS é um mecanismo que permite que as bactérias funcionem como organismos multicelulares e adquiram benefícios que possivelmente não poderiam obter se sempre agissem como organismos solitários. Ou seja, essa capacidade das bactérias de comunicarem-se e controlarem atividades coletivas, proporciona grandes avanços na sobrevivência e persistência no ambiente (MUKHERJEE; BASSLER, 2019). Ou seja, as bactérias, antes consideradas como organismos solitários e capazes de processos simples, são agora consideradas por sua capacidade de agir coletivamente como organismos multicelulares (MUKHERJEE; BASSLER, 2019).

Um dos comportamentos coordenados pelo QS é a bioluminescência. A bactéria marinha *V. fischeri* por exemplo, é capaz de habitar órgãos luminosos de lulas como *Euprymna scolopes* e proporcionar bioluminescência ao seu hospedeiro. *V. fischeri* utiliza o QS para coordenar a bioluminescência com o autoindutor N-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona (3-oxo-C6-HSL). A simbiose entre a bactéria e a lula garante bioluminescência ao organismo, sendo capaz de auxiliá-lo na camuflagem ou na atração de presas e em troca, oferecer os nutrientes necessários para o crescimento bacteriano (WHITELEY; DIGGLE; GREENBERG, 2017).

Outro comportamento coordenado pelo QS é a formação de biofilme (MUKHERJEE; BASSLER, 2019). A bactéria *P. aeruginosa* por exemplo, pode causar infecções em humanos dependendo de o paciente apresentar ou não um sistema imunológico comprometido. Tipicamente, infecções por *P. aeruginosa* são encontradas nos pulmões de pessoas com fibrose cística, levando ao declínio da função pulmonar e ao aumento da mortalidade do paciente (RUTHERFORD; BASSLER, 2012). *P. aeruginosa* utiliza o QS para coordenar a formação de biofilme com os autoindutores N-butiril-L-homoserina lactona (C4-HSL) e 3-oxo-C12-HSL (SINGH et al., 2000), que contribui para sua capacidade de persistência e progressão da doença por ser uma estrutura que pode ser capaz de resistir a antibióticos (RUTHERFORD; BASSLER, 2012).

Além desses comportamentos o QS também está presente na interação bactéria-planta como por exemplo, *Sinorhizobium meliloti* e *Medicago truncatula* respectivamente. Onde a planta apresentou aumento na nodulação das raízes com o autoindutor N-(3-oxotetradecanoil)-L-homoserina lactona (3-oxo-C14-HSL) produzido pela bactéria (SCHIKORA; SCHENK; HARTMANN, 2016). Os microrganismos que interagem com plantas podem estabelecer associações mutualísticas, onde ambos os lados da interação são beneficiados. E podendo até mesmo oferecer oportunidades para manipular a estrutura da comunidade bacteriana na rizosfera em benefício da agricultura (RAGHAVENDRA, 2017).

Além disso, os comportamentos regulados pelo QS desempenham importantes papéis ecológicos como mostram Wang et al. (2012), que em uma linhagem de *Pseudomonas* sp. a formação de biofilme foi induzida pelos autoindutores N-hexanoil-L-homoserina lactona (C6-HSL) e N-(3-oxooctanoil)-L-homoserina lactona (3-oxo-C8-HSL) e a formação da matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) foi induzida pelos autoindutores 3-oxo-C6-HSL, C6-HSL e 3-oxo-C8-HSL. A formação de biofilme melhora a capacidade das bactérias em colonizar novos ambientes e com isso, o estudo prevê o desenvolvimento de um melhor sistema de bioaugmentação bacteriano para o tratamento de efluentes de tabaco. Outro exemplo que traz

a relação de formação de biofilme regulado pelo QS com tolerância a poluentes é visto em Sarkar e Chakraborty (2008), em uma linhagem de *Acinetobacter* sp. com tolerância a metais.

Outro estudo indica a relação do QS com biodegradação, no qual AHLs como, C6-HSL e C4-HSL, são produzidas por bactérias degradadoras de poluentes como fenol, durante a biodegradação (YONG; ZHONG, 2010). A regulação de QS pode ter amplos impactos na biodegradação de poluentes e seria um novo ângulo para o desenvolvimento de tecnologia de biorremediação (HUANG et al., 2013).

O sistema de QS mediado por AHLs e AOs está envolvido em diversos processos fisiológicos, e funciona como uma estratégia adaptativa que contribui para o aumento da capacidade bacteriana em termos de sobrevivência sob determinadas condições ambientais (LADE; PAUL; KWEON, 2014). Porém, ainda não está claro na literatura se o QS pode ser utilizado pelas bactérias para coordenar comportamentos coletivos na população em resposta a herbicidas, já que esses microrganismos precisam lidar constantemente com a toxicidade desses poluentes. Desse modo, a proposta deste trabalho foi avaliar se há um sistema de resposta via QS em uma linhagem bacteriana modulado pela presença de herbicidas.

## 2 OBJETIVO

O objetivo central deste trabalho foi avaliar se há um sistema de resposta via QS em uma linhagem de *Pseudomonas* sp. modulado pela presença dos herbicidas Heat contendo o princípio ativo saflufenacil, Boral 500 SC contendo sulfentrazone, Roundup Transorb R contendo glifosato, Aminol 806 contendo 2,4-D e Atectra contendo dicamba.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LINHAGEM BACTERIANA

Foi utilizada a linhagem bacteriana *Pseudomonas* sp. CMA55 (número de acesso KY807296 – NCBI), que faz parte da Coleção de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG. A linhagem foi obtida na Fazenda Escola Capão da Onça da UEPG de tanques de armazenamento de água utilizada na lavagem de embalagens de agrotóxicos, os quais foram listados no Apêndice A, de acordo com responsáveis técnicos.

#### 3.2 HERBICIDAS

Foram utilizados os herbicidas Heat (BASF, Ludwigshafen no Reno, Renânia-Palatinado, Alemanha), contendo o princípio ativo Saflufenacil (N'-{2-cloro-4-fluor-5-[1,2,3,6-tetrahydro-3-metil-2,6-dioxe-4-(trifluorometil)pirimidina-1-il]benzoil}-N-isopropil-N-metilsulfamida); Boral 500 SC (FMC, Filadélfia, Pensilvânia, EUA), cujo princípio ativo é o Sulfentrazone (2',4'-dicloro-5'-(4-difluorometil-4,5-dihidro-3-metil-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-il) (metanosulfonilida); Roundup Transorb R (MONSANTO, Saint Louis, Missouri, EUA), princípio ativo Glifosato (Sal de Potássio de (N-(fosfonometil)glicina); Aminol 806 (ADAMA, Raleigh, Carolina do Norte, EUA) com princípio ativo 2,4-D (Dimetilamônia (2,4-diclorofenoxi) acetato (2,4-D dimetilamina); e Atectra (BASF, Ludwigshafen no Reno, Renânia-Palatinado, Alemanha), com princípio ativo Dicamba (ácido 3,6-dicloro-o-anisico).

#### 3.3 TRATAMENTOS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO BACTERIANO

Para todos os ensaios, foi utilizado o Meio Mineral (35,2 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 53 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 50 g L<sup>-1</sup> sacarose; 50 g L<sup>-1</sup> glicose; 1,696 g L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>; 2,7136 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>; 0,0672 g L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>; 0,0104 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 0,08 g L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>; 1,24 g L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>; 0,25 g L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>; 0,0056 g L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub>; 2,5 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 3 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>), segundo Gädke et al. (2017). Para os tratamentos com herbicidas, foi utilizado o Meio Mineral suplementado com: Heat (H – 0,49 mM), Boral 500 SC (B – 0,049 mM), Roundup Transorb R (R – 0,233 mM), Aminol 806 (A – 0,173 mM) e Atectra (At – 0,103 mM). As concentrações utilizadas dos herbicidas equivalem à dose de campo. As condições de crescimento foram à 30 °C sob agitação em shaker à 120 rpm. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

### 3.4 CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO

A linhagem bacteriana foi crescida durante 24h em MM (pré-inóculo). Foi realizado o inóculo nos tratamentos a partir do pré-inóculo em uma DO inicial de 0,05 a 600 nm. O crescimento bacteriano foi monitorado a cada 1h em espectrofotômetro a 600 nm.

### 3.5 VIABILIDADE CELULAR

Foram utilizadas as mesmas condições de pré-inóculo e inóculo conforme descritas no item 3.4, alíquotas de 100 µL foram retiradas após 14h de incubação. As amostras foram diluídas para  $10^{-7}$ , semeadas em MM com Ágar ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) e incubadas à 30 °C. Após 24h, foi determinada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

### 3.6 EXTRAÇÃO DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS DE *QUORUM SENSING*

A extração das moléculas de QS foi realizada pelo método líquido-líquido (LLE) no período de 14h de crescimento bacteriano. Além dos tratamentos descritos no item 3.3, aqui foi utilizado o meio 0 (MM sem herbicida e sem bactéria). Foram retiradas 100 mL de meio de cultura, centrifugadas ( $8.000 \times g$ ) por 5 min e coletado 2,0 mL do sobrenadante, adicionado 10 µM do padrão interno N-heptanoil-L-homoserina lactona (C7-HSL). O processo de extração foi realizado utilizando acetato de etila, segundo Ortori et al. (2011) com modificações. Foi adicionado 2,0 mL de acetato de etila acidificado com 0,01% de ácido acético. A solução foi agitada durante 1 min, e coletado a fase orgânica. O procedimento de extração foi repetido duas vezes e o conjunto de extratos foram secados em capela de exaustão em temperatura ambiente. As amostras secas foram armazenadas a -80 °C até o uso, sendo reconstituídas em 100 µL de metanol (MeOH) imediatamente antes da análise em LC-MS/MS.

### 3.7 ANÁLISE EM LC-MS/MS (CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS)

As análises foram realizadas de acordo com o método descrito por Ortori et al. (2011) com modificações. Foram injetados 10µL dos extratos preparados conforme descrito na seção anterior, a uma taxa de fluxo de 0,3 mL/min no equipamento LC-MS/MS modelo Acquity e Xevo TQD (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA) equipado com bombas binárias, um degaseificador a vácuo, um amostrador automático SIL-HTc e a coluna utilizada foi



ACQUITY UPLC® BEH C18 2.1x50mm (1.7µm de porosidade) mantida a 50 °C. O sistema de UPLC foi constituído de 0,1% de ácido fórmico (fase móvel A) em água ultrapura e uma fase móvel B constituída por 0,1% de ácido fórmico (Fisher Scientific, Loughborough, UK) em acetonitrila. O perfil do gradiente foi o seguinte: isocrático durante 1 min, um gradiente linear de 50% A e 50% B ao longo de 1,5 min, depois um gradiente adicional de 1% A e 99% B ao longo de 5,50 min seguido por 1% A e 99% B durante 7 min e a condição foi reestabelecida em 90% A e 10% B durante 10 min. A coluna foi reequilibrada durante um total de 2 min. Todo o experimento de espectrometria de massas (MS) foi conduzido num espectrômetro de massa de tração iônica linear triplo quadrupolo 4000 modelo Acquity e Xevo TQD (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA) equipado com uma fonte Turbo-Ion utilizado no modo de ionização positiva em ESI (ionização por electrospray). A voltagem do cone do capilar foi de 4 kV, a temperatura de dessolvatação foi de 450 °C e o volume de dessolvatação foi de 550 L/Hr. A voltagem do cone e a energia de colisão são parâmetros analíticos exclusivos de cada analito, uma lista desse, juntamente com os íons precursores e filhos utilizados para configurar o modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) para cada analito individual consta no Apêndice B. E a otimização dos parâmetros analíticos em MS/MS foi realizada por meio da infusão do padrão interno N-heptanoil-L-homoserina lactona (C7-HSL).

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas por meio de Análise de Variância (ANOVA) utilizando o critério de significância  $p < 0,05$  e por meio do software R versão 3.0.1, utilizando os pacotes “ggord, ggplot2 e vegan”.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 COMPARTILHAMENTO DE MOLÉCULAS DE *QUORUM SENSING* PARA SINALIZAÇÃO E TOLERÂNCIA DE *Pseudomonas* sp. A HERBICIDAS COMO POTENCIAL PARA ADAPTAÇÃO A DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE AMBIENTAL

Sharing quorum sensing molecules for signaling and tolerance of *Pseudomonas* sp. herbicides as a potential for adaptation to different environmental stress conditions

#### RESUMO

O *quorum sensing* (QS) é um sistema de comunicação bacteriano que permite que as bactérias monitorem a densidade populacional celular circundante mediada por meio de moléculas sinalizadoras químicas denominadas autoindutores e, a partir disso, coordenem coletivamente a expressão gênica, iniciando alterações fisiológicas importantes para sua sobrevivência. Desse modo, as bactérias são capazes de sobreviver em ambientes onde as condições mudam constantemente, em decorrência da adaptação genética que resulta da flexibilidade de expressão de seus genes. No ambiente, as bactérias precisam lidar com diversos componentes tóxicos. A introdução de agrotóxicos por exemplo, contribuiu para o controle de pragas e para o aumento da produção agrícola. Mas apesar de sua utilização na agricultura ter beneficiado a produtividade de culturas, surgiram algumas preocupações quanto aos efeitos adversos destes poluentes. A exposição de bactérias a componentes tóxicos pode levar a alterações no metabolismo celular, no crescimento, na atividade enzimática e na diminuição da diversidade dessas bactérias. Quando expostas a ambientes estressantes, necessitam de mudanças nos processos fisiológicos e estruturais para sobreviverem. Desse modo, diversas espécies de bactérias utilizam importantes estratégias adaptativas coordenadas pelo QS para contribuir para o aumento de sua capacidade em termos de sobrevivência sob diferentes condições ambientais. Porém, ainda não está claro na literatura se o QS pode ser utilizado pelas bactérias para coordenar comportamentos coletivos na população em resposta a herbicidas. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar se há um sistema de resposta via QS em uma linhagem de *Pseudomonas* sp. modulado pela presença de herbicidas. Utilizou-se uma linhagem de *Pseudomonas* sp. proveniente de tanques de armazenamento de água utilizada na lavagem de embalagens de agrotóxicos e os herbicidas Heat contendo o princípio ativo saflufenacil, Boral 500 SC contendo sulfentrazone, Roundup Transorb R contendo glifosato, Aminol 806 contendo 2,4-D e Atectra contendo dicamba. Realizou-se uma extração das moléculas sinalizadoras que posteriormente foram analisadas em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Aqui mostramos que na presença dos herbicidas Heat e Roundup Transorb R a linhagem parece compartilhar um controle regulatório pelas mesmas moléculas sinalizadoras de QS para controlar o estresse oxidativo produzido tanto pelo sistema de obtenção de energia quanto pela toxicidade de herbicidas. Na presença dos herbicidas Boral 500 SC, Aminol 806 e Atectra, observou-se um perfil de moléculas que estão envolvidas em diferentes estágios de formação de biofilme e a sinalização dessas pode ser um indicativo de que a linhagem esteja modulando a formação de biofilme como uma estratégia adaptativa para suportar o estresse desses herbicidas. Desse modo, o QS bacteriano pode desempenhar um papel importante na adaptação a estresses ambientais e possivelmente trazer contribuições para o estudo de biorremediação de herbicidas.

**Palavras-chave:** Adaptação bacteriana; Comunicação bacteriana; Herbicidas; Microbiologia Ambiental; Espectrometria de massas.

### ABSTRACT

Quorum sensing (QS) is a bacterial communication system that allows bacteria to monitor the surrounding cell population density mediated by means of chemical signaling molecules called autoinducers and, from that, collectively coordinate gene expression, initiating important physiological changes for its survival. In this way, bacteria are able to survive in environments where conditions change constantly, due to the genetic adaptation that results from the flexibility of expression of their genes. In the environment, bacteria have to deal with several toxic components. The introduction of pesticides, for example, contributed to pest control and increased agricultural production. But although its use in agriculture has benefited crop productivity, concerns have arisen about the adverse effects of these pollutants. Exposure of bacteria to toxic components can lead to changes in cell metabolism, growth, enzyme activity and decreased diversity of these bacteria. When exposed to stressful environments, they need changes in physiological and structural processes to survive. In this way, several species of bacteria use important adaptive strategies coordinated by the QS to contribute to the increase of their capacity in terms of survival under different environmental conditions. However, it is still unclear in the literature whether QS can be used by bacteria to coordinate collective behavior in the population in response to herbicides. Therefore, the objective of this work was to evaluate whether there is a QS response system in a *Pseudomonas* sp. modulated by the presence of herbicides. A strain of *Pseudomonas* sp. from water storage tanks used for washing pesticide packaging and Heat herbicides containing the active ingredient saflufenacil, Boral 500 SC containing sulfentrazone, Roundup Transorb R containing glyphosate, Aminol 806 containing 2,4-D and Atectra containing dicamba. An extraction of the signaling molecules was carried out and subsequently analyzed in liquid chromatography coupled with mass spectrometry. Here we show that in the presence of the Heat and Roundup Transorb R herbicides, the strain seems to share a regulatory control by the same QS signaling molecules to control the oxidative stress produced by both the energy production system and the herbicide toxicity. In the presence of the herbicides Boral 500 SC, Aminol 806 and Atectra, a profile of molecules was observed that are involved in different stages of biofilm formation and their signaling may be an indication that the lineage is modulating the formation of biofilm as an adaptive strategy to withstand the stress of these herbicides. Thus, bacterial QS can play an important role in adapting to environmental stresses and possibly bring contributions to the study of herbicide bioremediation.

**Keywords:** Bacterial adaptation; Bacterial communication; Environmental Microbiology; Herbicides; Mass spectrometry.

#### 4.1.1 Introdução

Sob determinadas condições, as bactérias podem alterar seu comportamento, passando a agir como um organismo multicelular (WHITELEY; DIGGLE; GREENBERG, 2017). Isso é

possibilitado por meio de um sistema de comunicação bacteriano denominado *quorum sensing* (QS). Esse sistema permite que as bactérias monitorem a densidade populacional celular circundante mediada pela produção, liberação, acumulação e detecção de moléculas sinalizadoras químicas denominadas autoindutores e, a partir disso, coordenem coletivamente a expressão gênica, iniciando alterações fisiológicas importantes para sua sobrevivência (MUKHERJEE; BASSLER, 2019). Desse modo, as bactérias são capazes de sobreviver em ambientes onde as condições mudam constantemente, em decorrência da adaptação genética que resulta da flexibilidade de expressão de seus genes (STALEY; HARWOOD; ROHR, 2015).

No ambiente, as bactérias precisam lidar com diversos componentes tóxicos. A introdução de agrotóxicos por exemplo, contribuiu para o controle de pragas e para o aumento da produção agrícola (JAISWAL; VERMA; YADAV, 2017). Mas apesar de sua utilização na agricultura ter beneficiado a produtividade de culturas, surgiram algumas preocupações quanto aos efeitos adversos destes poluentes (SCHÜTTE et al., 2017). Os agrotóxicos aplicados devem ser apenas tóxicos para os organismos-alvo. Porém, esse raramente é o caso, pois a maioria dos agrotóxicos são inespecíficos e a utilização excessiva e aplicação inadequada destes poluentes causam impactos ambientais, há uma estimativa que apenas cerca de 0,1% dos agrotóxicos atinja os organismos-alvo e o restante contamine o meio ambiente como água, ar e solo (GILL; GARG, 2014).

A exposição de bactérias a componentes tóxicos pode levar a alterações no metabolismo celular, no crescimento, na atividade enzimática e na diminuição da diversidade dessas bactérias. E quando expostas a ambientes estressantes, necessitam de mudanças nos processos fisiológicos e estruturais para sobreviverem (STALEY; HARWOOD; ROHR, 2015). Os comportamentos bacterianos coordenados por meio da expressão gênica regulados por QS, geram alterações fisiológicas importantes para a sobrevivência de bactérias em ambientes estressantes (TANG et al., 2018). Sarkar e Chakraborty (2008), mostraram que uma linhagem de *Acinetobacter* sp. apresentou tolerância a metais pesados com a produção de biofilme e que a produção do biofilme foi induzida por QS. Tang et al. (2018), relataram que a expressão de catalase (CAT) regulada por QS e a formação de biofilme contribuíram para uma linhagem de *Pseudomonas* sp. resistir ao estresse de nicotina. Desse modo, diversas espécies de bactérias utilizam importantes estratégias adaptativas coordenadas pelo QS para contribuir para o aumento de sua capacidade em termos de sobrevivência sob diferentes condições ambientais (LADE; PAUL; KWEON, 2014).

Porém, ainda não está claro na literatura se o QS pode ser utilizado pelas bactérias para coordenar comportamentos coletivos na população em resposta a herbicidas. Diante disso, o

objetivo deste trabalho foi avaliar se há um sistema de resposta via QS em uma linhagem de *Pseudomonas* sp. modulado pela presença dos herbicidas Heat contendo o princípio ativo saflufenacil, Boral 500 SC contendo sulfentrazone, Roundup Transorb R contendo glifosato, Aminol 806 contendo 2,4-D e Atectra contendo dicamba.

#### 4.1.2 Material e Métodos

##### 4.1.2.1 Linhagem bacteriana

Foi utilizada a linhagem bacteriana *Pseudomonas* sp. CMA55 (número de acesso KY807296 – NCBI), que faz parte da Coleção de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG. A linhagem foi obtida na Fazenda Escola Capão da Onça da UEPG de tanques de armazenamento de água utilizada na lavagem de embalagens de agrotóxicos, essas embalagens foram listadas no Apêndice A, de acordo com a empresa responsável.

##### 4.1.2.2 Herbicidas

Foram utilizados os herbicidas Heat (BASF, Ludwigshafen no Reno, Renânia-Palatinado, Alemanha), contendo o princípio ativo Saflufenacil (N'-{2-cloro-4-fluor-5-[1,2,3,6-tetrahydro-3-metil-2,6-dioxe-4-(trifluorometil)pirimidina-1-il]benzoil}-N-isopropil-N-metilsulfamida); Boral 500 SC (FMC, Filadélfia, Pensilvânia, EUA), cujo princípio ativo é o Sulfentrazone (2',4'-dicloro-5'-(4-difluorometil-4,5-dihidro-3-metil-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-il) (metanosulfonilida); Roundup Transorb R (MONSANTO, Saint Louis, Missouri, EUA), princípio ativo Glifosato (Sal de Potássio de (N-(fosfonometil)glicina); Aminol 806 (ADAMA, Raleigh, Carolina do Norte, EUA) com princípio ativo 2,4-D (Dimetilamonía (2,4-diclorofenoxi) acetato (2,4-D dimetilamina); e Atectra (BASF, Ludwigshafen no Reno, Renânia-Palatinado, Alemanha), com princípio ativo Dicamba (ácido 3,6-dicloro-o-anísico).

##### 4.1.2.3 Tratamentos e condições de crescimento bacteriano

Para todos os ensaios, foi utilizado o Meio Mineral (35,2 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 53 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 50 g L<sup>-1</sup> sacarose; 50 g L<sup>-1</sup> glicose; 1,696 g L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>; 2,7136 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>; 0,0672 g L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>; 0,0104 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 0,08 g L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>; 1,24 g L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>; 0,25 g L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>; 0,0056 g L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub>; 2,5 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 3 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>), segundo Gädke et al. (2017). Para os

tratamentos com herbicidas, foi utilizado o Meio Mineral suplementado com: Heat (H – 0,49 mM), Boral 500 SC (B – 0,049 mM), Roundup Transorb R (R – 0,233 mM), Aminol 806 (A – 0,173 mM) e Atectra (At – 0,103 mM). As concentrações utilizadas dos herbicidas equivalem à dose de campo. As condições de crescimento foram à 30 °C sob agitação em shaker à 120 rpm. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

#### 4.1.2.4 Curva de crescimento bacteriano

A linhagem bacteriana foi crescida durante 24h em MM (pré-inóculo). Foi realizado o inóculo nos tratamentos a partir do pré-inóculo em uma DO inicial de 0,05 a 600 nm. O crescimento bacteriano foi monitorado a cada 1h em espectrofotômetro a 600 nm.

#### 4.1.2.5 Viabilidade celular

Foram utilizadas as mesmas condições de pré-inóculo e inóculo conforme descritas no item 4.1.2.4, alíquotas de 100 µL foram retiradas após 14h de incubação. As amostras foram diluídas para  $10^{-7}$ , semeadas em MM com Ágar ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) e incubadas à 30 °C. Após 24h, foi determinada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

#### 4.1.2.6 Extração de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing*

A extração das moléculas de QS foi realizada pelo método líquido-líquido (LLE) no período de 14h de crescimento bacteriano. Além dos tratamentos descritos no item 4.1.2.3, aqui foi utilizado o meio 0 (MM sem herbicida e sem bactéria). Foram retiradas 100 mL de meio de cultura, centrifugadas ( $8.000 \times g$ ) por 5 min e coletado 2,0 mL do sobrenadante, adicionado 10 µM do padrão interno N-heptanoil-L-homoserina lactona (C7-HSL). O processo de extração foi realizado utilizando acetato de etila, segundo Ortori et al. (2011) com modificações. Foi adicionado 2,0 mL de acetato de etila acidificado com 0,01% de ácido acético. A solução foi agitada durante 1 min, e coletado a fase orgânica. O procedimento de extração foi repetido duas vezes e o conjunto de extratos foram secados em capela de exaustão em temperatura ambiente. As amostras secas foram armazenadas a -80 °C até o uso, sendo reconstituídas em 100 µL de metanol (MeOH) imediatamente antes da análise em LC-MS/MS.

#### 4.1.2.7 Análise em LC-MS/MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas)

As análises foram realizadas de acordo com o método descrito por Ortori et al. (2011) com modificações. Foram injetados 10µL dos extratos preparados conforme descrito na seção anterior, a uma taxa de fluxo de 0,3 mL/min no equipamento LC-MS/MS modelo Acquity e Xevo TQD (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA) equipado com bombas binárias, um degaseificador a vácuo, um amostrador automático SIL-HTc e a coluna utilizada foi ACQUITY UPLC® BEH C18 2.1x50mm (1.7µm de porosidade) mantida a 50 °C. O sistema de UPLC foi constituído de 0,1% de ácido fórmico (fase móvel A) em água ultrapura e uma fase móvel B constituída por 0,1% de ácido fórmico (Fisher Scientific, Loughborough, UK) em acetonitrila. O perfil do gradiente foi o seguinte: isocrático durante 1 min, um gradiente linear de 50% A e 50% B ao longo de 1,5 min, depois um gradiente adicional de 1% A e 99% B ao longo de 5,50 min seguido por 1% A e 99% B durante 7 min e a condição foi reestabelecida em 90% A e 10% B durante 10 min. A coluna foi reequilibrada durante um total de 2 min. Todo o experimento de espectrometria de massas (MS) foi conduzido num espectrômetro de massa de tração iônica linear triplo quadrupolo 4000 da QTRAP (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA) equipado com uma fonte Turbo-Ion utilizado no modo de ionização positiva em ESI (ionização por electrospray). A voltagem do cone do capilar foi de 4 kV, a temperatura de dessolvatação foi de 450 °C e o volume de dessolvatação foi de 550 L/Hr. A voltagem do cone e a energia de colisão são parâmetros analíticos exclusivos de cada analito, uma lista desse, juntamente com os íons precursores e filhos utilizados para configurar o modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) para cada analito individual consta no Apêndice B. E a otimização dos parâmetros analíticos em MS/MS foi realizada por meio da infusão do padrão interno N-heptanoil-L-homoserina lactona (C7-HSL).

#### 4.1.2.8 Análise estatística

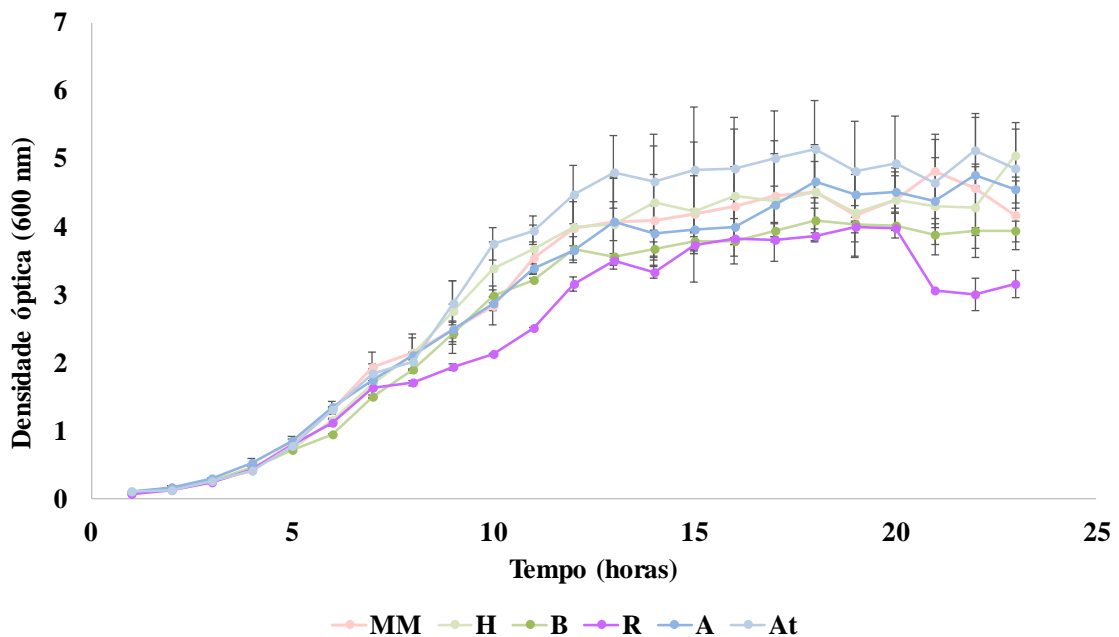
As análises estatísticas foram realizadas por meio de Análise de Variância (ANOVA) utilizando o critério de significância  $p < 0,05$  e por meio do software R versão 3.0.1, utilizando os pacotes “ggord, ggplot2 e vegan”.

### 4.1.3 Resultados e Discussão

#### 4.1.3.1 Crescimento de *Pseudomonas* sp. CMA55

O sistema de comunicação bacteriano depende de uma densidade celular populacional para produzir e perceber os sinais em níveis suficientes para a regulação gênica. Muitos genes dependentes de QS são ativados após a fase exponencial média ou tardia de crescimento e não em fases de crescimento anteriores (GOO et al., 2015). Outros são ativados durante a fase estacionária de crescimento (LLAMAS et al., 2005). Desse modo, o tempo de 14h, identificado na curva de crescimento de *Pseudomonas* sp. CMA55 (Fig. 2) como o período final da fase log e início da fase estacionária de crescimento, foi escolhido para extração e análise de moléculas sinalizadoras de QS, pois nessa fase a densidade populacional pode constituir uma situação ideal para a ocorrência do QS.

Figura 2 – Curvas de crescimento de *Pseudomonas* sp. CMA55 em (MM) controle e nos tratamentos (H) Heat, (B) Boral 500 SC, (R) Roundup Transorb R, (A) Aminol 806 e (At) Atectra.



Fonte: elaboração da autora.

#### 4.1.3.2 Viabilidade de *Pseudomonas* sp. CMA55

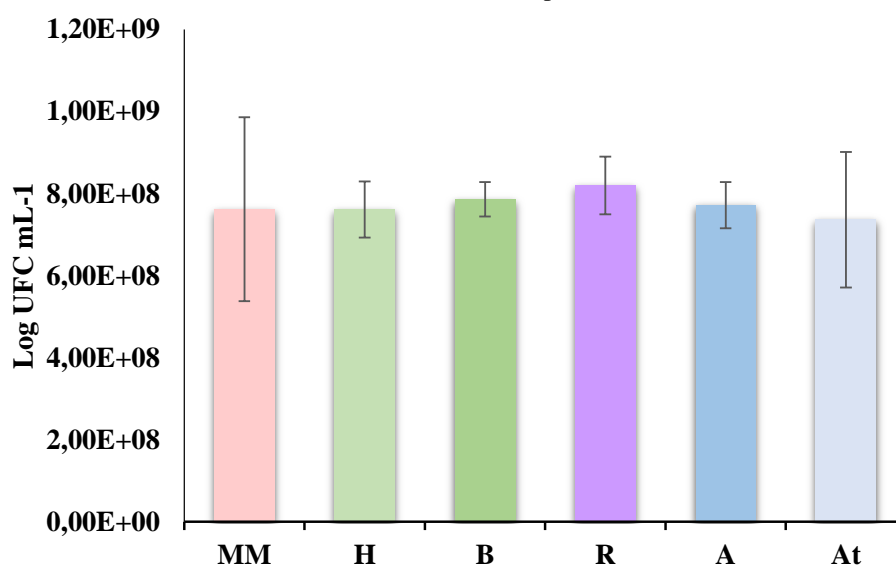
Estudos mostram que os herbicidas sulfentrazone (VIEIRA; SILVA; SILVEIRA, 2007) e glifosato pode reduzir o crescimento e desempenho de *Rhizobium* sp., *Burkholderia* sp., *Pseudomonas* sp. e fungos micorrízicos arbusculares (VAN BRUGGEN et al., 2018). Outros estudos relatam que herbicida 2,4-D alterou a superfície, rugosidade e carga superficial



do envelope celular bacteriano de *Escherichia coli*, levando a perda da integridade da estrutura, permitindo a entrada do herbicida e consequentemente levando a produção de ERO (ISLAM et al., 2017).

Ao observar os dados de viabilidade celular (Fig. 3) e de curva de crescimento (Fig. 2), verificou-se que a linhagem no período de 14h não apresentou diferenças significativas na presença dos herbicidas testados em relação ao controle, indicando que a linhagem esteja tolerando a presença dos herbicidas testados. No QS, ao atingir uma determinada densidade populacional, mudanças na expressão gênica, e consequentemente da fisiologia das células, são disparadas (PAPENFORT; BASSLER, 2016). Essas alterações fisiológicas provavelmente estariam promovendo a tolerância da linhagem aos herbicidas estudados neste trabalho.

Figura 3 – Viabilidade celular de *Pseudomonas* sp. CMA55 após 14h de incubação em (MM) controle e nos tratamentos (H) Heat, (B) Boral 500 SC, (R) Roundup Transorb R, (A) Aminol 806 e (At) Atectra.



Fonte: elaboração da autora.

#### 4.1.3.3 Método adaptado para identificação de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* por LC-MS/MS

O método de identificação de AHLs e AQs produzidas pela linhagem de *Pseudomonas* sp. CMA55 foi adaptado a partir de Ortori et al. (2011). A escolha do método deu-se por dois motivos: primeiro porque o método desenvolvido pelos autores foi em LC-MS/MS, o mesmo utilizado neste trabalho, para analisar o perfil de moléculas de QS, e segundo porque o método desenvolvido foi aplicado pelos autores em uma linhagem de *Pseudomonas* sp. para estudar a produção de AHLs e AQs produzidas pela linhagem.

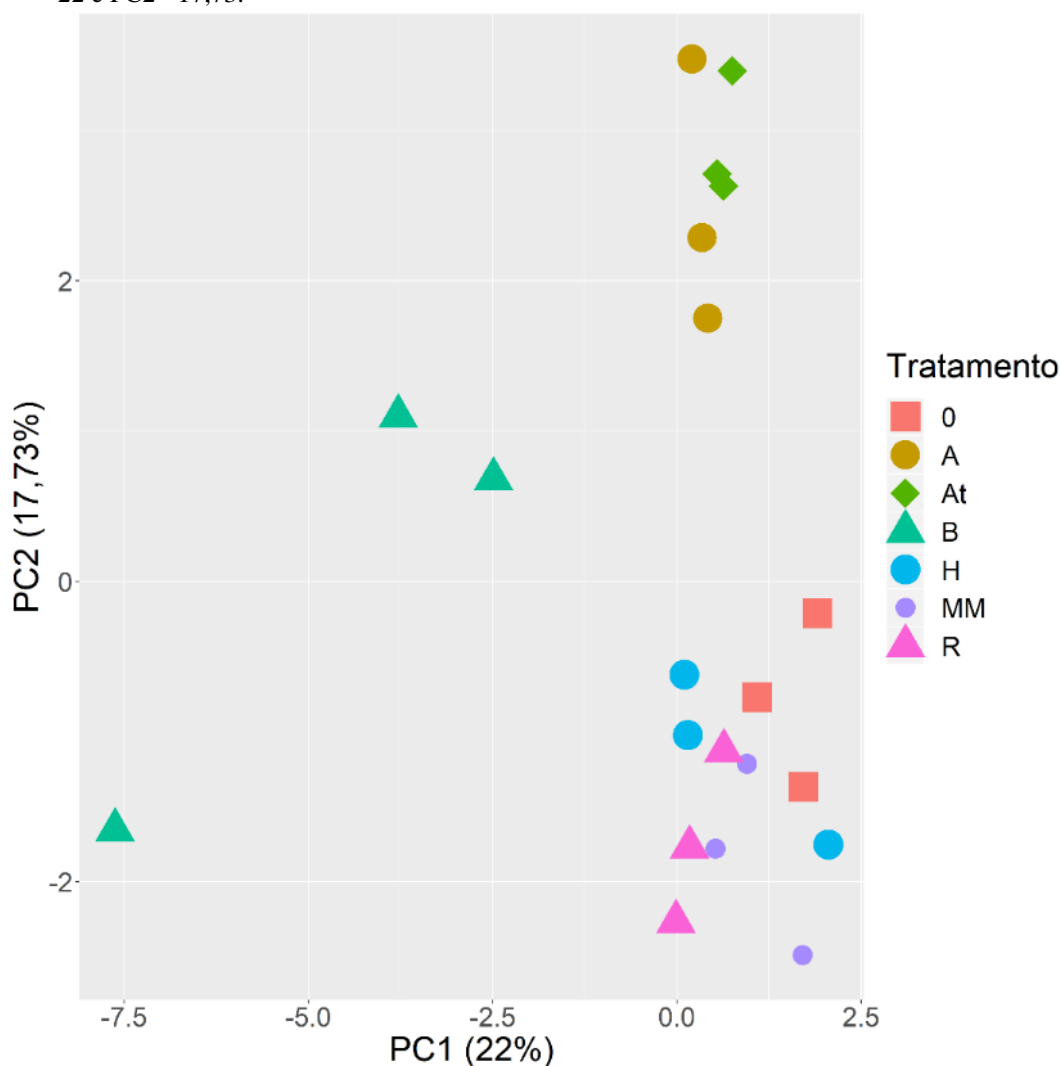
Ortori et al. (2011) utilizaram uma injeção de 5µL dos extratos preparados a uma taxa de fluxo de 0,45 mL/min e a coluna utilizada foi Gemini C18 150x 2mm (5µm de porosidade) enquanto que utilizamos 10µL dos extratos preparados a uma taxa de fluxo de 0,3 mL/min e a coluna utilizada foi ACQUITY UPLC® BEH C18 2.1x50mm (1.7µm de porosidade de porosidade). A utilização de maior quantidade de extratos permitiu a identificação mais expressiva dos analitos de interesse Além disso, os autores utilizaram o sistema de HPLC constituído de 0,1% de ácido fórmico e EDTA 200µM (fase móvel A) em água ultrapura enquanto utilizamos o sistema de UPLC constituído de 0,1% de ácido fórmico (fase móvel A) em água ultrapura. A utilização de ácido fórmico permitiu que moléculas mantivessem seu estado ionizado. Os autores sintetizaram e utilizaram o padrão interno N-pentanoil-L-homoserina lactona-d9 (C5-HSL-d9), enquanto que em nosso trabalho foi adquirido o padrão interno N-heptanoil-L-homoserina lactona – C7-HSL (Sigma-Aldrich), quimicamente similar aos analitos de interesse. Nosso trabalho não teve como objetivo o desenvolvimento e validação de método analítico para identificação de moléculas de AHLs e AQS, mas de aplicação metodológica. As alterações no método auxiliaram na identificação de 22 moléculas de AHLs e AQS produzidas pela *Pseudomonas* sp. CMA55.

#### 4.1.3.4. Perfil de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* na presença de herbicidas

A Análise de Componentes Principais (PCA), é uma técnica de análise multivariada que reduz muitas variáveis originais correlacionadas para um pequeno número de variáveis novas e não correlacionadas (GOTELLI; ELLISON, 2011). Por meio desta técnica foi possível mostrar a vinculação de determinados tratamentos com as 22 moléculas sinalizadoras de QS identificadas.

Na Fig. 4 (Apêndice C), nos controles 0 e MM e nos tratamentos H (Heat) e R (Roundup Transorb R), observa-se um determinado perfil de moléculas que apresentam similaridade entre elas, mas a similaridade destes herbicidas se manteve com os controles.

Figura 4 – Análise de PCA sobre o perfil de moléculas sinalizadas por *Pseudomonas* sp. CMA55. Tratamentos, em triplicatas, representados pelos símbolos (0 e MM) controles e tratamentos (H) Heat, (B) Boral 500 SC, (R) Roundup Transorb R, (A) Aminol 806 e (At) Atectra. As porcentagens de explicação são PC1= 22 e PC2= 17,73.



Fonte: elaboração da autora.

De acordo com a literatura, a maioria dessas moléculas (Tabela 1) estão relacionadas a estresse. As moléculas C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL e 3-OH-C8-HSL em *Burkholderia pseudomallei*, desempenham um papel fundamental na proteção da bactéria ao estresse oxidativo. Essas moléculas contribuem para a expressão do gene *dpsA*, que protege o DNA bacteriano dos danos causados pelo estresse oxidativo, com atividades de catalase e peroxidase (LUMIJIKTASE et al., 2006). Em *Salmonella* sp., a presença da molécula C12-HSL aumentou a abundância de proteínas tiol, sugerindo que as células podem se preparar para um possível estresse oxidativo (ALMEIDA et al., 2018). E as moléculas 3-oxo-C8-HSL e HQNO estão envolvidas em comportamentos de fatores de virulência (MILLER; BASSLER, 2001).

Tabela 1 – Funções de algumas moléculas sinalizadoras de QS nos controles 0 e MM e nos tratamentos H e R que já foram descritas na literatura.

Molécula	Área	Tempo de Retenção	Função
C8-HSL	756,88	6,75	Estresse oxidativo
C12-HSL	9190,68	6,36	Estresse oxidativo
3-oxo-C6-HSL	306,425	0,76	Fatores de virulência
3-oxo-C8-HSL	563,005	7,37	Estresse oxidativo
3-OH-C4-HSL	1252,065	4,39	Desconhecida
3-OH-C8-HSL	135,79	0,56	Estresse oxidativo
HQNO	35,21	7,15	Fatores de virulência

Fonte: elaboração da autora.

Como a maioria das moléculas estão relacionadas a estresse, nossa hipótese é de que o sistema antioxidativo de *Pseudomonas* sp. CMA55 esteja sob controle regulatório de QS. Bollinger et al. (2001) relatam que as respostas ao estresse oxidativo são reguladas por QS como as enzimas Mn-SOD e KatA. E o fato da similaridade desses herbicidas se manter com os controles pode ser porque a linhagem esteja utilizando esse sistema de regulação para estresse tanto na presença de herbicidas quanto na ausência, a geração de ERO faz parte do metabolismo aeróbio normal, mas em diversas situações, a produção dessas espécies é aumentada por uma fonte exógena que envolve vários fatores ambientais de estresse como metais pesados, radiação UV e poluentes ambientais (GEORGIEVA, 2005). Ou seja, a linhagem pode estar compartilhando o mesmo mecanismo de defesa para situações diferentes.

Porém, ao observar a Fig. 4 (Apêndice C), nos tratamentos B (Boral 500 SC), A (Aminol 806) e At (Atectra), verifica-se um outro perfil de moléculas que também apresentam similaridade entre elas mas que não se manteve com os controles 0 e MM, essas moléculas já foram descritas na literatura e estão relacionadas a estratégias adaptativas e de sobrevivência de bactérias via a fatores de virulência e formação de biofilme (Tabela 2).

Tabela 2 – Funções de algumas moléculas sinalizadoras de QS nos tratamentos B, A e At que já foram descritas na literatura.

(continua)

Molécula	Área	Tempo de Retenção	Função	
			Fator de Virulência	Formação de Biofilme
C4-HSL	48738,8	6,35		Maturação
C6-HSL	279,76	3,23		Maturação
C10-HSL	180,035	4,96		Adesão inicial
C14-HSL	6532,94	7,03		Matriz de EPS
3-oxo-C4-HSL	5871,44	5,16		Desconhecida

Tabela 2 – Funções de algumas moléculas sinalizadoras de QS nos tratamentos B, A e At que já foram descritas na literatura.

(conclusão)

Molécula	Área	Tempo de Retenção	Função	
			Fator de Virulência	Formação de Biofilme
3-oxo-C10-HSL	528,195	2,78		Desconhecida
3-oxo-C12-HSL	1293,435	6,50		Adesão inicial
3-oxo-C14-HSL	600,655	7,36		Matriz de EPS
3-OH-C10-HSL	426,895	3,77		Matriz de EPS
3-OH-C12-HSL	35560,6	4,56		Matriz de EPS
PQS	208,265	6,16	Produção de piocianina, ramnolipídios e regulação de bombas de efluxo	Matriz de EPS, manutenção da arquitetura e maturação
C9-PQS	2093,51	3,48		Maturação
C11-PQS	225,585	3,13		
UHQ	62,08	3,45		
NQNO	21778,5	3,48		

Fonte: elaboração da autora.

A formação de biofilme é um processo gradual que envolve a secreção de uma matriz composta de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) responsáveis pela adesão e organização estrutural de bactérias planctônicas em uma superfície, a formação de microcolônias, o desenvolvimento da arquitetura e maturação do biofilme e quando o ambiente não é mais favorável à sua manutenção, ocorre a dispersão das bactérias presentes no biofilme, que poderão agora colonizar novos ambientes, reiniciando este processo (MAUNDERS; WELCH, 2017).

Wang et al. (2019) observaram em uma estação de tratamento de águas residuais, que a molécula C10-HSL é uma das principais AHLs envolvida durante o processo de desenvolvimento de biofilme e que está intimamente relacionada ao processo de fixação inicial do biofilme em resposta a fatores ambientais variáveis. Já na área clínica, Alayande; Aung; Kim (2018) relataram que a molécula 3-oxo-C12-HSL desempenha um importante papel na fase inicial do desenvolvimento de biofilme em uma linhagem de *Pseudomonas* sp. e que o desenvolvimento do biofilme bacteriano via QS foi fundamental para a patogenicidade da bactéria. Em relação aos nossos resultados, a sinalização dessas duas moléculas, 3-oxo-C12-HSL e C10-HSL, na presença dos herbicidas Boral 500 SC, Aminol 806 e Atectra, indica que *Pseudomonas* sp. CMA55 está dando os passos iniciais para a formação de biofilme, já que essas moléculas, de acordo com a literatura, parecem estar envolvidas no processo de desenvolvimento inicial do biofilme, com a finalidade de aumentar a sua chance de sobrevivência por estarem expostas a uma condição estressante. Mukherjee e Bassler (2019)

relataram que em uma linhagem de *Pseudomonas* sp., associada a infecções em humanos, utiliza o QS para coordenar a formação de biofilme, que contribui para sua capacidade de persistência e progressão das infecções por ser uma estrutura que pode ser capaz de resistir a ação de antibióticos. Ou seja, o biofilme pode funcionar como um importante mecanismo de autodefesa bacteriano.

Silva et al. (2017) relataram que a molécula PQS em uma determinada linhagem de *Pseudomonas* sp. está envolvida na formação de um dos componentes da matriz de EPS, o DNA extracelular (eDNA), na formação do biofilme a molécula é responsável pelo aumento na produção de eDNA, que funciona como um suporte estrutural para manter a arquitetura do biofilme da bactéria. Além de PQS estar envolvida na produção de eDNA, a molécula juntamente com as moléculas C9-PQS, C11-PQS, UHQ e NQNO estão envolvidas na produção de piocianina (FLETCHER et al., 2007). O eDNA e piocianina são fundamentais para a maturação do biofilme. A piocianina se liga ao eDNA, aumentando sua viscosidade, o que influencia nas interações físico-químicas da matriz do biofilme com o ambiente, bem como facilitam as agregações celulares (ALDECOA; ZAFRA; GONZÁLEZ-PASTOR, 2017). A sinalização das moléculas PQS, C9-PQS, C11-PQS, UHQ e NQNO em nossos resultados na presença dos herbicidas Boral 500 SC, Aminol 806 e Atectra, pode indicar que a bactéria esteja produzindo uma quantidade superior de EPS para conferir maior proteção a toxicidade dos herbicidas de modo a dificultar a entrada destes e permitir maior eficiência nas interações entre as bactérias por estarem em estreito contato. Essas moléculas também estão envolvidas na produção de ramnolipídios, que contribuem para a formação de cavidades internas dentro do biofilme maduro, permitindo o fluxo de água e nutrientes (DUSANE et al., 2010) e na regulação de bombas de efluxo, complexos multiprotéicos que atravessam o envelope de bactérias Gram-negativas, responsáveis por expelir vários componentes tóxicos e uma ampla variedade de antimicrobianos (REZAIE et al., 2018). Isso pode ser um indicativo de que *Pseudomonas* sp. CMA55 possa estar utilizando bombas de efluxo como um mecanismo de proteção por estar em contato com Boral 500 SC, Aminol 806 e Atectra para combater as moléculas tóxicas desses herbicidas. Inclusive, há estudos que indicam que bombas de efluxo desempenham um importante papel na tolerância de bactérias à herbicidas (KURENBACH et al., 2015). Dessa forma, em perspectivas futuras, a relação de bombas de efluxo com tolerância à herbicidas e a regulação de bombas de efluxo via QS podem ser melhor investigadas como mecanismo de resposta desenvolvido para tolerar estresses ambientais.

Farah et al. (2005) observaram que as moléculas C14-HSL, 3-oxo-C14-HSL, 3-OH-C10-HSL e 3-OH-C12-HSL desempenham um importante papel na matriz de biofilme de

*Acidithiobacillus ferrooxidans*, extremófilo acidófilo, envolvido na biolixiviação de minérios de sulfeto de metal. A quantidade de lipopolissacarídeos que fazem parte da matriz envolvida na colonização do minério aumentou quando *A. ferrooxidans* foi cultivado em meio com baixo teor de fosfato em comparação ao meio com alto teor de fosfato. Em nossos resultados, a sinalização das moléculas C14-HSL, 3-oxo-C14-HSL, 3-OH-C10-HSL e 3-OH-C12-HSL indica que a matriz de EPS pode ser um modo de flexibilidade bacteriana que permite a sobrevivência de *Pseudomonas* sp. CMA55 em ambientes com condições nutricionais desfavoráveis, já que a bactéria está na presença de herbicidas e os nutrientes presentes no meio mineral são baixos, desse modo o estresse nutricional poderia ser um dos principais responsáveis pela agregação e formação de biofilme, sendo uma resposta adaptativa para sobrevivência em ambientes desfavoráveis. Yong e Zhong (2010) relataram que há AHLs envolvidas no processo de biodegradação de poluentes. A regulação de QS pode ter amplos impactos na biodegradação de poluentes e seria um novo ângulo para o desenvolvimento de tecnologia de biorremediação.

Alayande; Aung; Kim (2018) observaram em uma linhagem de *Pseudomonas* sp. que para que o processo de maturação do biofilme possa se desenvolver as moléculas C4-HSL e C6-HSL desempenham um importante papel durante esse estágio. A sinalização de C4-HSL e C6-HSL em nossos resultados indica que essas moléculas estão envolvidas na regulação das fases de crescimento do biofilme, principalmente na maturação, regulando a densidade populacional, a produção de EPS, a motilidade e a produção de metabólitos secundários.

As moléculas 3-oxo-C4-HSL e 3-oxo-C10 HSL não são muito discutidas na literatura. Hansen et al. (2015) mostraram que em uma linhagem de *Aeromonas salmonicida* há a produção dessas moléculas, mas ainda não se sabe que comportamentos são ativados pela sinalização dessas moléculas, mas os autores relatam que provavelmente estejam associadas a comportamentos de virulência ou formação de biofilme, os autores explicam que ainda serão necessárias mais investigações para entender a regulação desses sistemas em *A. salmonicida*. Em nossos resultados, a sinalização dessas duas moléculas pode estar vinculada a alguns dos estágios de formação de biofilme, visto que a maioria das moléculas sinalizam para esse tipo de comportamento.

O sistema de QS mediado por AHLs e AQS em bactérias Gram-negativas, como as *Pseudomonas*, está envolvido em quase todos os estágios de formação de biofilme, permitindo a sobrevivência dessas bactérias em vários nichos ambientais, pois essa estrutura protege as bactérias do ambiente que as envolve, além de conferir resistência contra antimicrobianos, fagocitose, estresse oxidativo, falta de nutrientes, entre outros (LADE; PAUL; KWEON, 2014).

Portanto, a síntese dessas 15 moléculas relacionadas a fatores de virulência e principalmente formação de biofilme na presença dos herbicidas Boral 500 SC, Aminol 806 e Atectra pode ser um indicativo de que a linhagem *Pseudomonas* sp. CMA55 possa estar regulando a expressão gênica via QS para formação de biofilme mediada pela presença desses herbicidas. Dessa forma, a formação de biofilme pode ser considerada uma estratégia adaptativa bacteriana, uma vez que o modo de vida bacteriano na forma de biofilme confere vantagens sobre o modo de vida planctônico, como resistência a estresses ambientais (MAKUT; BELLO, 2018).

#### 4.1.4 Conclusão

Este estudo apresentou a relação de moléculas sinalizadoras de QS com herbicidas. Ainda não foram encontrados relatos na literatura sobre essa mesma abordagem. Na presença dos herbicidas Heat e Roundup Transorb R, a linhagem parece utilizar o sistema antioxidativo sob controle regulatório de QS como um mecanismo de defesa para esses herbicidas e que esse sistema possa estar sendo compartilhado para controlar as ERO produzidas pelo sistema gerador de energia da bactéria.

O perfil de moléculas que foram sinalizadas por *Pseudomonas* sp. CMA55 na presença dos herbicidas Boral 500 SC, Aminol 806 e Atectra, parece estar envolvido em diferentes estágios de formação de biofilme e atuando como um sistema de resposta modulado pela presença desses herbicidas, sugerindo que a flexibilidade na expressão gênica bacteriana permite o crescimento e sobrevivência em ambientes com condições estressantes. Um tipo de resposta para remodelar sua expressão gênica com o objetivo de ajustar a fisiologia celular às exigências do ambiente. Desse modo, o QS bacteriano pode desempenhar um papel importante na adaptação a estresses ambientais e possivelmente trazer contribuições para o estudo de biorremediação de herbicidas.



## REFERÊNCIAS

- ALAYANDE, A. B.; AUNG, M. M.; KIM, I. S. Correlation Between Quorum Sensing Signal Molecules and *Pseudomonas aeruginosa*'s Biofilm Development and Virulency. **Current Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 787–793, 2018.
- ALDECOA, A. L. I. De; ZAFRA, O.; GONZÁLEZ-PASTOR, J. E. Mechanisms and Regulation of Extracellular DNA Release and Its Biological Roles in Microbial Communities. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1390, p. 1–19, 2017.
- ALMEIDA, F. A. et al. N-dodecanoyl-homoserine lactone influences the levels of thiol and proteins related to oxidation-reduction process in Salmonella. **Plos One**, p. 1-31, 2018.
- ALVES, C. et al. Effect of herbicides in the oxidative stress in crop winter species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, p. 1533–1542, 2018.
- ASWATHANARAYAN, J. B.; RAI, V. R. Quorum-Sensing Systems in *Pseudomonas*. In: KALIA, V. C. Quorum Sensing vc Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight. Springer, 2015. p. 73-84.
- ATKINSON, S.; CÁMARA, M.; WILLIAMS, P. Quorum Sensing, and Biofilm Development in Gram-negative Bacteria. **The Biofilm Mode of Life: Mechanisms and Adaptations**, p. 95–122, 2007.
- BEFFA, R.; MENNE, H.; KÖCHER, H. Herbicide Resistance Action Committee (HRAC): Herbicide Classification, Resistance Evolution, Survey, and Resistance Mitigation Activities. **Modern Crop Protection Compounds**, p. 5–32, 2019.
- BOHNENBLUST, E. W. et al. Effects of the herbicide dicamba on nontarget plants and pollinator visitation. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 144–151, 2016.
- BOLLINGER, N. et al. Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence of Iron Override Effects on Quorum Sensing and Biofilm-Specific Gene Regulation. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 6, p. 1990–1996, 2001.
- CAMARGO, F. A. O. et al. Brazilian agriculture in perspective: great expectations vs reality. In: SPARKS, D. L. Advance in Agronomy, v. 141. EUA: Academic Press - Elsevier, 2017. p. 53-114.
- DUSANE, D. H. et al. Quorum sensing : implications on Rhamnolipid biosurfactant production Quorum sensing : implications on Rhamnolipid biosurfactant production. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 27, n. 2017, p. 1–17, 2010.
- FARAH, C. et al. Evidence for a Functional Quorum-Sensing Type AI-1 System in the Extremophilic Bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 1–8, 2005.
- FLETCHER, M. P. et al. A dual biosensor for 2-alkyl-4-quinolone quorum-sensing signal molecules. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 11, p. 2683–2693, 2007.

FUQUA, W. C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators, **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 2, p. 269–275, 1994.

GÄDKE, J. et al. *In situ* affinity purification of his-tagged protein A from *Bacillus megaterium* cultivation using recyclable superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Journal of Biotechnology**, v. 242, p. 55–63, 2017.

GEORGIEVA, N. Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems—a review. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2005.

GILL, H.; GARG, H. Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies. **Pesticides - Toxic Aspects**, 2014.

GOGGIN, D. E.; CAWTHRAY, G. R.; POWLES, S. B. 2,4-D resistance in wild radish: reduced herbicide translocation via inhibition of cellular transport. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 11, p. 3223–3235, 2016.

GOMES, M. P. et al. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 17, p. 4691–4703, 2014.

GOO, E. et al. Control of bacterial metabolism by quorum sensing. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 9, p. 567–576, 2015.

GOTELLI, N. J.; ELLISON, A. M. **Princípios de Estatística em Ecologia**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 527 p.

HANSEN, H. et al. The autoinducer synthases LuxI and AinS are responsible for temperature-dependent AHL production in the fish pathogen *Aliivibrio salmonicida*. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 69, p. 1–13, 2015.

HENKE, J. M.; BASSLER, B. L. Bacterial social engagements. **Trends in Cell Biology**, v. 14, n. 11, p. 648–656, 2004.

HOPPIN, J. A. et al. Pesticides are associated with allergic and non-allergic wheeze among male farmers. **Environmental Health Perspectives**, v. 125, n. 4, p. 535–543, 2017.

HUANG, Y. et al. In silico and experimental methods revealed highly diverse bacteria with quorum sensing and aromatics biodegradation systems - A potential broad application on bioremediation. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 311–316, 2013.

JAISWAL, D. K.; VERMA, J. P.; YADAV, J. Microbe induced degradation of pesticides in agricultural soils. In: SINGH, N. S. **Microbe-induced degradation of pesticides**. Springer, 2017. p. 167-189.

KURENBACH, B. et al. Sublethal Exposure to Commercial Formulations of the Herbicides Changes in Antibiotic Susceptibility in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **MBio**, v. 6, n. 2, p. 1–9, 2015.

LAN, M. et al. Simultaneous determination of saflufenacil and its two metabolites in soil samples by ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 6, p. 658–664, 2014.

LADE, H.; PAUL, D.; KWEON, J. H. N -Acyl Homoserine Lactone-Mediated Quorum Sensing with Special Reference to Use of Quorum Quenching Bacteria in Membrane Biofouling Control. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–25, 2014.

LLAMAS, I. et al. Quorum sensing in halophilic bacteria: Detection of N-acyl-homoserine lactones in the exopolysaccharide-producing species of *Halomonas*. **Extremophiles**, v. 9, n. 4, p. 333–341, 2005.

LUMIJIKTASE, P. et al. Quorum sensing regulates *dpsA* and the oxidative stress response in *Burkholderia pseudomallei*. **Microbiology**, v. 152, n. 12, p. 3651–3659, 2006.

MAKUT, M.; BELLO, A. Assessment of the Biodegradation of Herbicides by Bacteria Isolated from the Soil. **Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology**, v. 4, n. 1, p. 1–6, 2018.

MANDELBAUM, R. T.; ALLAN, D. L.; WACKETT, L. P. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1451–1457, 1995.

MAUNDERS, E.; WELCH, M. Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 13, p. 1–10, 2017.

MAZHARI, M.; FERGUSON, J. Bacterial responses to environmental herbicide pollutants (glyphosate and paraquat). **Caspian Journal of Environmental Sciences**, v. 16, n. 1, p. 35–43, 2018.

MEENA, R. S. et al. Impact of agrochemicals on soil microbiota and management: A review. **Land**, v. 9, n. 2, p. 1–21, 2020.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum Sensing in Bacteria. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 165–199, 2001.

MORETTO, J. A. S. et al. Changes in bacterial community after application of three different herbicides. **FEMS microbiology letters**, v. 364, n. 13, p. 1–6, 2017.

MOTTA, E. V. S.; RAYMANN, K.; MORAN, N. A. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 41, p. 10305–10310, 2018.

MUKHERJEE, S.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 371–382, 2019.

NEALSON, K. H.; PLATT, T.; HASTINGS, J. W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. **Journal of Bacteriology**, v. 104, n. 1, p. 313–322, 1970.

NG, W. L.; BASSLER, B. L. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. **Annual Review of Genetics**, v. 43, n. 1, p. 197–222, 2009.

OLIVEIRA, E. P. et al. Lipídeos específicos e enzimas antioxidativas atuam na tolerância ao glifosato em *Pseudomonas* sp. (em preparação).

ORTORI, C. A. et al. Simultaneous quantitative profiling of N-acyl-L-homoserine lactone and 2-alkyl-4(1H)-quinolone families of quorum-sensing signaling molecules using LC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 2, p. 839–850, 2011.

PAPENFORT, K.; BASSLER, B. L. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 576–588, 2016.

PIMENTEL, D. Pesticides and pest control. In: PESHIN, R.; DHAWAN, A. K. **Integrated Pest Management: Innovation-Development Process**. Springer, Dordrecht, 2009. p. 83-87.

PIRSAHEB, M. et al. Organochlorine pesticides residue in breast milk: a systematic review. **Medical Journal of the Islamic Republic of Iran**, v. 29, n. 228, p. 1-10, 2015.

PRIONE, L. P. et al. GST activity and membrane lipid saturation prevents mesotrione - induced cellular damage in *Pantoea ananatis*. **AMB Express**, 2016.

**PubChem**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 10/02/2020.

RAFFA, R. B. et al. Bacterial communication (“quorum sensing”) via ligands and receptors: A novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 312, n. 2, p. 417–423, 2005.

RAGHAVENDRA, M. P. Quorum Sensing in Plant Microbe Interaction. In: MEENA, V. S. et al. **Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture**. Volume I: Plant-soil-microbe nexus. Springer, Singapore, 2017. p. 87–110.

REZAIE, P. et al. The Effect of Quorum-Sensing and Efflux Pumps Interactions in *Pseudomonas aeruginosa* Against Photooxidative Stress. **Laser Application in Medical Sciences Research Center**, v. 9, n. 3, p. 161–167, 2018.

RUTHERFORD, S. T.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing: Its role in virulence and possibilities for its control. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 11, p. 1–25, 2012.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; WYCKHUYS, K. A. G. Worldwide decline of the entomofauna: a review of its drivers. **Biological Conservation**, v. 232, p. 8–27, 2019.

SARKAR, S.; CHAKRABORTY, R. Quorum sensing in metal tolerance of *Acinetobacter junii* BB1A is associated with biofilm production. **FEMS Microbiology Letters**, v. 282, n. 2, p. 160–165, 2008.

SCHIKORA, A.; SCHENK, S. T.; HARTMANN, A. Beneficial effects of bacteria-plant communication based on quorum sensing molecules of the N-acyl homoserine lactone group. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 605–612, 2016.

SCHÜTTE, G. et al. Herbicide resistance and biodiversity: agronomic and environmental aspects of genetically modified herbicide-resistant plants. **Environmental Sciences Europe**, v. 29, n. 5, p. 1–12, 2017.

SHRESTHA, S. et al. High pesticide exposure events and olfactory impairment among U.S. farmers. **Environmental Health Perspectives**, v. 127, n. 1, p. 017005-1-017005-9, 2019.

SILVA, D. P. et al. An update on the sociomicrobiology of quorum sensing in gram-negative biofilm development. **Pathogens**, v. 6, n. 4, p. 1–9, 2017.

SINGH, B.; SINGH, K. Microbial degradation of herbicides. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 245–261, 2016.

SINGH, P. K.; SCHAEFER, A. L.; PARSEK, M. R.; MONINGER, T. O.; WELSH, M. J.; GREENBERG, E. P. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. **Nature**, v. 407, p. 762–764, 2000.

STALEY, Z. R.; HARWOOD, V. J.; ROHR, J. R. A synthesis of the effects of pesticides on microbial persistence in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 45, n. 10, p. 813–836, 2015.

STRANDBERG, B. et al. Effects of herbicides on non-target terrestrial plants. In: DUKE, S. O.; KUDSK, P.; SOLOMON, K. **Pesticide Dose: Effects on the Environment and Target and Non-Target Organisms**. 2017. p. 149-166.

TANG, H. et al. Regulation of nicotine tolerance by quorum sensing and high efficiency of quorum quenching under nicotine stress in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 1–11, 2018.

VAN BRUGGEN, A. H. C. et al. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Science of the Total Environment**, v. 616–617, p. 255–268, 2018.

VATS, S. Herbicides: history, classification and genetic manipulation of plants for herbicide resistance. In: LICHTFOUSE, E. **Sustainable Agriculture Reviews**, v. 15. Springer International Publishing. 2015. p. 153-192.

VIBHA, B.; NEELAM, G. Importance of exploration of microbial biodiversity. **ISCA Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 3, p. 78–83, 2012.

VIEIRA, R. F.; SILVA, C. M. M. S.; SILVEIRA, A. P. D. Soil microbial biomass C and symbiotic processes associated with soybean after sulfentrazone herbicide application. **Plant and Soil**, v. 300, n. 1–2, p. 95–103, 2007.

WANG, J. et al. Extraction, purification and identification of bacterial signal molecules based on N-acyl homoserine lactones. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 479–490, 2011.

WANG, M. Z. et al. Ecological roles and release patterns of acylated homoserine lactones in *Pseudomonas* sp. HF-1 and their implications in bacterial bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 119–126, 2012.

WANG, J. et al. Quorum sensing signaling distribution during the development of full-scale municipal wastewater treatment biofilms. **Science of the Total Environment**, v. 685, p. 28–36, 2019.

WHITELEY, M.; DIGGLE, S. P.; GREENBERG, E. P. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. **Nature**, v. 551, n. 7680, p. 313–320, 2017.

YONG, Y. C.; ZHONG, J. J. N-Acylated homoserine lactone production and involvement in the biodegradation of aromatics by an environmental isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 12, p. 1944–1948, 2010.

ZHANG, W. Global pesticide use: Profile, trend, cost / benefit and more. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1–27, 2018.

**APÊNDICE A – LISTA DE AGROTÓXICOS PRESENTES NOS TANQUES DE ARMAZENAMENTO DE ÁGUA UTILIZADA NA LAVAGEM DE EMBALAGENS DE AGROTÓXICOS**

<b>PRODUTOS</b>			
<b>Fungicidas</b>	<b>Função</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Composição</b>
Abacus HC	Fungicida	BASF	Pyraclostrobin, epoxiconazole
Ativum EC	Fungicida	BASF	Epoxiconazole, fluxapyroxad, pyraclostrobin
Brio	Fungicida	BASF	Epoxiconazole, kresoxim-methyl
Caramba 90	Fungicida	BASF	Metconazole
Comet	Fungicida	BASF	Pyraclostrobin, epoxiconazole
Corbel	Fungicida	BASF	Fempropimorph
Difere	Fungicida/Bactericida	Oxiquímica Agrociência LTDA	Copper oxychloride, metallic copper equivalent
Forum Plus	Fungicida	BASF	Dimethomorph, chlorothalonil
Fox	Fungicida	Bayer S.A.	Trifloxystrobin, prothioconazole
Opera SE	Fungicida	BASF S.A.	Pyraclostrobin, epoxiconazole
Opera Ultra	Fungicida	BASF S.A.	Pyraclostrobin, metconazole
Orkestra SC	Fungicida	BASF S.A.	Fluxapyroxad, pyraclostrobin
Priori	Fungicida	Syngenta	Azoxystrobin
Priori Xtra	Fungicida	Syngenta	Azoxystrobin, cyproconazole
Tilt	Fungicida	Syngenta	Propiconazole
<b>Herbicidas</b>	<b>Função</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Composição</b>
Ally	Herbicida	Du Pont	Metsulfuron-methyl
Aminol 806	Herbicida	Adama Agricultural Solutions Ltd.	2,4-D dimethylamine, acid equivalent of 2,4-D
Atectra	Herbicida	BASF	Dicamba
Heat	Herbicida	BASF	Saflufenacil
Topik 240 EC	Herbicida	Syngenta	Clodinafop-propargyl
<b>Inseticidas</b>	<b>Função</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Composição</b>
Cruiser 350 FS	Inseticida	Syngenta	Thiamethoxam
Engeo Pleno	Inseticida	Syngenta	Thiamethoxam, lambda-cyhalothrin
Fastac Duo	Inseticida	BASF	Acetamiprid, alpha-cypermethrin
Imunit	Inseticida	BASF	Alpha-cypermethrin, teflubenzuron
Nomolt 150	Inseticida	BASF	Teflubenzuron
Pirate	Inseticida/Acaricida	BASF	Chlorfenapyr
Standak Top	Inseticida/Fungicida	-	Pyraclostrobin, thiophanate-methyl, fipronil188
<b>Adjuvantes</b>	<b>Função</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Composição</b>
Aureo	Adjuvante	Bayer S.A.	Soybean oil methyl ester
Assist	Adjuvante	BASF S.A.	Mineral oil
Nimbus	Adjuvante	Syngenta Proteção de Culturas LTDA	Mineral oil
<b>Regulador de crescimento</b>	<b>Função</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Composição</b>
Moddus	Regulador de crescimento	Syngenta Proteção de Culturas LTDA	Trinexapac-ethyl

Fonte: elaboração da autora.

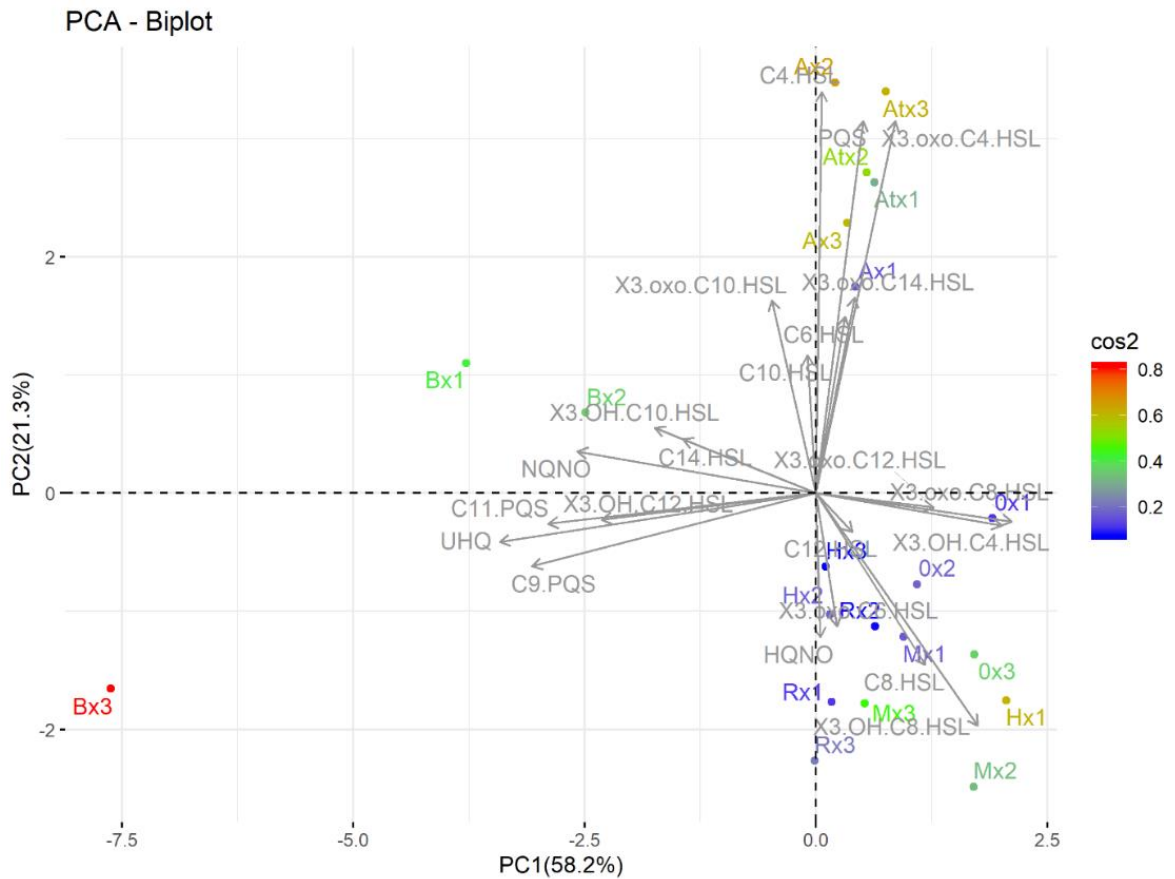
**APÊNDICE B - LISTA DE VARIÁVEIS ESPECÍFICAS DOS ANALITOS UTILIZADAS PARA CONFIGURAR O MS E PARA A ANÁLISE MRM**

<b>Analito</b>	<b>Íon precursor (m/z)</b>	<b>Íon filho (m/z)</b>	<b>Voltagem do cone</b>	<b>Energia de colisão (V)</b>
C4-HSL (N-butiril-L-homoserina lactona)	172.1	102.1	26	15
C6-HSL (N-hexanoil-L-homoserina lactona)	200.1	102.1	31	15
C8-HSL (N-octanoil-L-homoserina lactona)	228.1	102.1	26	15
C10-HSL (N-decanoil-L-homoserina lactona)	256.1	102.1	31	17
C12-HSL (N-dodecanoil-L-homoserina lactona)	284.1	102.1	31	17
C14-HSL (N-tetradecanoil-L-homoserina lactona)	312.1	102.1	45	19
3-oxo-C4-HSL (N-(3-oxobutiril)-L-homoserina lactona)	186.1	102.1	26	15
3-oxo-C6-HSL (N-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona)	214.1	102.1	26	15
3-oxo-C8-HSL (N-(3-oxooctanoil)-L-homoserina lactona)	242.1	102.1	26	17
3-oxo-C10-HSL (N-(3-oxodecanoil)-L-homoserina lactona)	270.1	102.1	26	17
3-oxo-C12-HSL (N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona)	298.1	102.1	30	19
3-oxo-C14-HSL (N-(3-oxotetradecanoil)-L-homoserina lactona)	326.2	102.1	30	21
3-OH-C4-HSL (N-(3-hidroxi-butiril)-L-homoserina lactona)	188.1	102.1	26	15
3-OH-C6-HSL (N-(3-hidroxi-hexanoil)-L-homoserina lactona)	216.1	102.1	26	15
3-OH-C8-HSL (N-(3-hidroxi-octanoil)-L-homoserina lactona)	244.1	102.1	31	17
3-OH-C10-HSL (N-(3-hidroxi-decanoil)-L-homoserina lactona)	272.1	102.1	35	17
3-OH-C12-HSL (N-(3-hidroxi-dodecanoil)-L-homoserina lactona)	300.1	102.1	35	19
3-OH-C14-HSL (N-(3-hidroxi-tetradecanoil)-L-homoserina lactona)	328.2	102.1	21	19
HHQ (2-heptil-4-hidroxi-quinolona)	244.1	159.1	31	20
NHQ (2-nonil-4-hidroxi-quinolona)	272.1	159.1	81	27
UHQ (2-undecil-4-hidroxi-quinolona)	300.1	159.1	81	27
HQNO (N-óxido de 2-heptil-4-hidroxi-quinolona)	260.1	159.1	71	32
NQNO (N-óxido de 2-nonil-4-hidroxi-quinolona)	288.1	159.1	96	20
PQS (2-heptil-3-hidroxi-4(1H)-quinolona)	260.1	175.1	71	22
C9-PQS (3-hidroxi-2-nonil-4(1H)-quinolona)	288.1	175.1	111	25
C11-PQS (3-hidroxi-2-undecil-4(1H)-quinolona)	316.1	175.12	116	35

Fonte: (ORTORI et al., 2011) com modificações.



**APÊNDICE C - ANÁLISE DE PCA SOBRE O PERFIL DE MOLÉCULAS SINALIZADAS POR *Pseudomonas* sp. CMA55. AS AMOSTRAS SÃO REPRESENTADAS PELOS PONTOS (CONTROLES 0 E MM E TRATAMENTOS H, B, R, A E AT), ENQUANTO AS MOLÉCULAS SINALIZADORAS DE QS (ABREVIATURAS EM CINZA) SÃO APRESENTADAS COMO VETORES. CADA VETOR E COR APONTAM PARA A DIREÇÃO DO AUMENTO DE UMA DETERMINADA MOLÉCULA E SEU COMPRIMENTO INDICA A FORÇA DA CORRELAÇÃO. AS PORCENTAGENS DE EXPLICAÇÃO SÃO PC1= 58,2 E PC2= 21,3**



Fonte: elaboração da autora.