

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

CAROLINE ROSA SILVA

SISTEMAS DE RESPOSTAS ANTIOXIDANTES AO ESTRESSE GERADO POR HEAT  
EM LINHAGEM BACTERIANA DE SOLO AGRÍCOLA INDEPENDENTE DE PRESSÃO  
SELETIVA PRÉVIA POR ESSE HERBICIDA

PONTA GROSSA

2021

CAROLINE ROSA SILVA

SISTEMAS DE RESPOSTAS ANTIOXIDANTES AO ESTRESSE GERADO POR HEAT  
EM LINHAGEM BACTERIANA DE SOLO AGRÍCOLA INDEPENDENTE DE PRESSÃO  
SELETIVA PRÉVIA POR ESSE HERBICIDA

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

2021

S586 Silva, Caroline Rosa  
Sistemas de respostas antioxidantes ao estresse gerado por Heat em  
linhagem bacteriana de solo agrícola independente de pressão seletiva prévia  
por esse herbicida / Caroline Rosa Silva. Ponta Grossa, 2021.  
106 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. Metabolismo bacteriano. 2. Plasticidade metabólica. 3. Evolução  
bacteriana. 4. Agrotóxicos. 5. Enzimas antioxidativas. I. Pileggi, Marcos. II.  
Olchanheski, Luiz Ricardo. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia  
Evolutiva. IV.T.

CDD: 575



**Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva**  
*Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)*



**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N°. 09/2021/UEPG**

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, pelo(a) candidato(a) **Caroline Rosa Silva**.

Aos dois dias do mês de setembro de dois mil e vinte e um, sob a presidência do(a) Prof. Dr. Marcos Pileggi em sessão pública por sessão remota, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do(a) aluno(a) **Caroline Rosa Silva**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de concentração em Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Profa. Dra. Luciana Grange (UFPR), Adriana Knob (UNICENTRO), Rafael Mazer Etto (UEPG) – Suplente. 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 ao candidato das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir o(a) candidato(a) passou a defesa de sua dissertação intitulada: “Sistemas de respostas antioxidantes ao estresse gerado por Heat em linhagem bacteriana de solo agrícola independente de pressão seletiva prévia por esse herbicida”. 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 da 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, 02 de setembro de dois mil e vinte e um.

Prof. Dr. Marcos Pileggi (UEPG)

Profa. Dra. Luciana Grange (UFPR)

Profa. Dra. Adriana Knob (UNICENTRO)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre ter estado presente na minha vida.

Ao PPG-BioEvol, pela oferta do curso e à CAPES, pela bolsa concedida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Pileggi, por toda a atenção e tempo dedicado a mim e a este trabalho. Desde o “segundo ano vespertino” estive sempre me incentivando a ser uma cientista cada vez melhor. Obrigada pela amizade e por tanto aprendizado, sobre ciência e sobre a vida. Agradeço imensamente por todos esses anos.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Luiz Ricardo Olchanheski, por toda a amizade e por tanta dedicação, sempre encontrando um tempinho para me ajudar a solucionar problemas.

À Prof. Dra. Sônia Alvim Veiga Pileggi, por ter aberto às portas do mundo científico para mim.

Aos meus pais, Ilsa de Fátima Rosa Silva e Cassemiro Teixeira da Silva, e ao meu irmão Rafael Rosa Silva, que não mediram esforços para que eu pudesse realizar os meus sonhos. Obrigada por todo o amor, apoio, sorrisos, abraços, orações e por sempre terem acreditado em mim. Vocês são a minha inspiração!

Ao meu namorado, Vinícius Streisky, por nunca ter soltado a minha mão. Obrigada por todo o amor, paciência, companheirismo e por dividir a vida comigo.

Aos meus maravilhosos amigos, Alana Denkiewicz Soares, Elen da Rosa Silva, Fernando de Moraes Teixeira, Juliana Pacheco dos Santos e Lorena Prestes Camargo que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, sendo suporte e fonte de alegria. Vocês são luz!

À Amanda Cristiane de Araújo, por todas as vezes que enxugou as minhas lágrimas e pelas alegrias compartilhadas.

À Letícia Moerschbacher, pela ajuda em todos os experimentos que deram certo, e os que também não deram (que não foram poucos). Obrigada pela amizade e pelas risadas.

À Amanda Flávia da Silva Rovida e Paloma Nathane Nunes de Freitas, por todo o apoio neste mestrado. Muito obrigada por todo o companheirismo, dentro e fora do laboratório, inclusive à distância. Vocês são incríveis!

À Dra. Traudi Klein e ao LAPMED, pelo uso do espectrofotômetro.

A todos os membros do Laboratório de Microbiologia Ambiental.

À banca examinadora, pelas contribuições.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Grandes palavras são necessárias para expressar grandes ideias.”*

(Anne with an E)

## RESUMO

Nos sistemas convencionais, a utilização de herbicidas tornou-se indispensável na agricultura para a manutenção da produção. Em contrapartida, essas substâncias causam estresse oxidativo em microrganismos não-alvo, selecionando fenótipos tolerantes. Poucos trabalhos têm investigado se microrganismos podem sobreviver frente à herbicidas sem prévia seleção e ainda não está claro se os mecanismos que envolvem a tolerância realmente precisam ser previamente selecionados. Assim, este trabalho teve o objetivo de avaliar se *Stenotrophomonas* sp. CMA26, uma linhagem tolerante ao Heat sem histórico de prévia exposição para este herbicida, pode apresentar sistemas de resposta para sobreviver em concentrações maiores do que as utilizadas em agricultura. A linhagem CMA26 foi submetida à testes de estresse oxidativo (teste de tolerância, curva de crescimento, quantificação de peróxido e malondialdeído) e avaliação dos sistemas de respostas capacidade de degradação e atividade de enzimas antioxidantes catalase e glutathione S- transferase, frente ao herbicida Heat na concentração equivalente à utilizada em campo, bem como para 10 e 50 vezes essa concentração. Os resultados indicaram que a linhagem CMA26 apresentou uma condição de estresse temporária em períodos iniciais do crescimento, que foi superada por meio da ativação e modulação das atividades das enzimas catalase e glutathione S- transferase. A tolerância à diferentes concentrações de Heat, bem como a ausência de degradação do herbicida pela linhagem CMA26 e por outros isolados do mesmo ambiente, parecem indicar que a primeira está relacionada à uma resposta enzimática generalizada, independente de prévia seleção e a segunda é possivelmente um processo dependente de seleção. Estes mecanismos possivelmente poderão ser encontrados em outros microrganismos, uma vez que em solo, os agrotóxicos podem estar direcionando a seleção de microrganismos tolerantes, mas não degradadores, impactando na estrutura populacional e na funcionalidade da microbiota. Na redução de degradação, os agrotóxicos podem estar permanecendo no solo como contaminantes ambientais, e chegando à ambientes aquáticos por deriva.

**Palavras-chave:** Metabolismo bacteriano; plasticidade metabólica; evolução bacteriana; agrotóxicos; enzimas antioxidativas.

## ABSTRACT

In conventional systems, the use of herbicides has become essential in agriculture to maintain production. In contrast, these substances causing oxidative stress in non-target microorganisms, tolerant phenotypes. Few studies have investigated whether microorganisms can survive against herbicides without prior selection, and it is still unclear whether the mechanisms that involve tolerance will be selected. Thus, this work evaluated whether *Stenotrophomonas* sp. CMA26, a Heat tolerant strain with no history of prior exposure to this herbicide, may have response systems to support in greater than those used in agriculture. The CMA26 strain was subjected to oxidative stress tests, as tolerance, growth curve, the quantification of peroxide and malondialdehyde. Also was evaluated the response systems, represented by degradation capacity and activity of antioxidant enzymes catalase and glutathione S-transferase, against the herbicide Heat at the concentration equivalent to that used in the field, as well as at 10 and 50 times that concentration. The results indicated that the CMA26 strain has a temporary stress condition in early growth periods, which was overcome by activating and modulating the activities of catalase and glutathione S-transferase enzymes. The tolerance to different levels of heat, as well as the absence of herbicide degradation by the CMA26 lineage and by others granted from the same environment, seems to indicate that the first is related to a generalized enzymatic response, independent of previous selection, and the second is possible a dependent selection process. These combined mechanisms will be found in other microorganisms, since in soil, pesticides may be directing the selection of tolerant microorganisms, but not degrading ones, impacting the population structure and functionality of the microbiota. In reducing degradation, pesticides may be remaining in the soil as environmental contaminants, and reach aquatic environments by drift.

**Keywords:** Bacterial metabolism; metabolic plasticity; bacterial evolution; pesticides; antioxidant enzymes.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Agrotóxicos utilizados na área de coleta. São apresentadas as marcas comerciais de herbicidas, fungicidas e inseticidas e suas respectivas moléculas ativas, modos de ação, famílias químicas e classificação das famílias químicas conforme o Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC), Fungicidas (FRAC) e Inseticidas (IRAC), além do tipo de cultura em que foram utilizados.....	29
Figura 1 - Estrutura química do saflufenacil, molécula ativa do herbicida comercial Heat. Fonte: PubChem.....	40
Figura 2 - Curva de crescimento de <i>Stenotrophomonas</i> sp. CMA26 nos tratamentos C, 1x, 10x e 50x. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). .....	68
Figura 3 - Níveis de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em <i>Stenotrophomonas</i> sp. CMA26 nos tratamentos C, 1x, 10x e 50x nas fases inicial, inicial-mediana e mediana da log. Letras maiúsculas comparam estatisticamente diferentes tratamentos da mesma fase de crescimento; letras minúsculas compara comparam estatisticamente os mesmos tratamentos em diferentes fases de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). .....	70
Figura 4 - Níveis de MDA da linhagem <i>Stenotrophomonas</i> sp. CMA26 nos tratamentos C, 1x, 10x e 50x nas fases inicial, inicial-mediana e mediana da log. Letras maiúsculas comparam estatisticamente diferentes tratamentos da mesma fase de crescimento; letras minúsculas comparam estatisticamente os mesmos tratamentos em diferentes fases de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). .....	72
Figura 5 - Atividade de CAT em <i>Stenotrophomonas</i> sp. CMA26 nos tratamentos C, 1x, 10x e 50x nas fases inicial, inicial-mediana e mediana da log. Letras maiúsculas comparam estatisticamente diferentes tratamentos da mesma fase de crescimento; letras minúsculas comparam estatisticamente os mesmos tratamentos em diferentes fases de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). .....	74
Figura 6 - Atividade de GST em <i>Stenotrophomonas</i> sp. CMA26 nos tratamentos C, 1x, 10x e 50x nas fases inicial, inicial-mediana e mediana da log. Letras maiúsculas comparam estatisticamente diferentes tratamentos da mesma fase de crescimento; letras minúsculas comparam estatisticamente os mesmos tratamentos em diferentes fases de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). .....	76
Figura 7- PCA das relações entre indicadores de estresse H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e MDA e perfis de atividades enzimáticas de CAT e GST da linhagem <i>Stenotrophomonas</i> sp. CMA26 nas fases inicial, inicial-mediana e mediana da log. A escala de cores indica o grau de contribuição da distribuição dos dados. CAT, catalase; GST, glutathiona S-transferase.....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>C</b>	Controle
<b>1x</b>	Caldo Lúria Bertani contendo a concentração utilizada em campo de saflufenacil
<b>10x</b>	Caldo Lúria Bertani contendo dez vezes a concentração utilizada em campo de saflufenacil
<b>50x</b>	Caldo Lúria Bertani contendo cinquenta vezes a concentração utilizada em campo de saflufenacil
<b>AChE</b>	Enzima acetilcolinesterase
<b>ALS</b>	Enzima acetolactato sintase
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CDNB</b>	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
<b>CYP51</b>	Enzima esterol 14-demetilase
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etileno diamino tetracético
<b>EPSPS</b>	Enzima 5-enolpiruvato-chiquimato-3-fosfato sintase
<b>ERO</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FRAC</b>	Comitê de Ação de Resistência a Fungicidas
<b>GSH</b>	Glutationa
<b>GST</b>	Glutationa S- transferase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HPPD</b>	Enzima 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenase
<b>HRAC</b>	Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas
<b>IRAC</b>	Comitê de Ação de Resistência a Inseticidas
<b>KI</b>	Iodeto de Potássio
<b>LB</b>	Caldo Lúria Bertani
<b>LC-MS/MS</b>	Sistema de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>nAChR</b>	Receptores nicotínicos de acetilcolina
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Radical superóxido
<b>OH</b>	Radical hidroxila
<b>PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida

<b>PCR</b>	Reação em cadeia de polimerase
<b>Protox</b>	Protoporfirinogênio oxidase
<b>PVPP</b>	Polivinilpirrolidona
<b>QQ</b>	<i>Quorum quenching</i>
<b>QS</b>	<i>Quorum sensing</i>
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>TBA</b>	Ácido 2-tiobarbitúrico
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>THG</b>	Transferência horizontal de genes
<b>C-10-HSL</b>	N-decanoil-L-homoserina lactona
<b>3-oxo-C12-HSL</b>	N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1	AGRICULTURA E UTILIZAÇÃO DE HERBICIDAS .....	13
1.2	IMPACTOS DE HERBICIDAS EM ESPÉCIES NÃO-ALVO .....	14
1.3	HEAT E SAFLUFENACIL: CARACTERÍSTICAS E POTENCIAL DE IMPACTOS EM ESPÉCIES NÃO-ALVO .....	16
1.4	ESTRESSE OXIDATIVO CAUSADO POR HERBICIDAS EM MICROORGANISMOS .....	17
1.5	SISTEMAS DE RESPOSTA ANTIOXIDANTE EM BACTÉRIAS .....	18
1.6	MECANISMOS DE EVOLUÇÃO EM BACTÉRIAS .....	19
1.7	PRESSÃO SELETIVA E SISTEMAS DE RESPOSTAS EM MICROORGANISMOS .....	22
1.8	O GÊNERO <i>Stenotrophomonas</i> .....	24
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	27
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
3.1	COLETA DE MICROORGANISMOS .....	28
3.2	LINHAGEM BACTERIANA .....	40
3.3	PRODUTOS QUÍMICOS.....	40
3.4	CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO .....	41
3.5	TESTE DE TOLERÂNCIA À HEAT .....	41
3.6	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR SEQUENCIAMENTO DO GENE RIBOSSOMAL 16S.....	41
3.7	CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO .....	42
3.8	EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS PARA AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO .....	42
3.9	QUANTIFICAÇÃO DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	42
3.10	QUANTIFICAÇÃO DE MDA .....	42
3.11	CAPACIDADE DE DEGRADAÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS .....	43
3.12	ANÁLISE EM LC-MS/MS .....	43
3.13	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS .....	44
3.14	ATIVIDADE DE CAT .....	44
3.15	ATIVIDADE DE GST .....	45
3.16	ANÁLISES ESTATÍSTICA E MATEMÁTICA .....	45
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	46

4.1	SISTEMAS DE RESPOSTAS ANTIOXIDANTES AO ESTRESSE GERADO POR HEAT EM LINHAGEM BACTERIANA DE SOLO AGRÍCOLA INDEPENDENTE DE PRESSÃO SELETIVA PRÉVIA POR ESSE HERBICIDA .....	46
4.1.1	Introdução .....	47
4.1.2	Material e Métodos .....	49
4.1.2.1	Coleta de microrganismos.....	49
4.1.2.2	Linhagem bacteriana .....	62
4.1.2.3	Produtos químicos.....	62
4.1.2.4	Condições de crescimento.....	63
4.1.2.5	Teste de tolerância à Heat .....	63
4.1.2.6	Identificação molecular por sequenciamento do gene ribossomal 16S .....	63
4.1.2.7	Curva de crescimento bacteriano .....	64
4.1.2.8	Extração de amostras para avaliação de estresse oxidativo .....	64
4.1.2.9	Quantificação de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	64
4.1.2.10	Quantificação de MDA .....	65
4.1.2.11	Capacidade de degradação de isolados bacterianos .....	65
4.1.2.12	Análise em LC-MS/MS .....	65
4.1.2.13	Extração e quantificação de proteínas.....	66
4.1.2.14	Atividade de CAT .....	66
4.1.2.15	Atividade de GST .....	67
4.1.2.16	Análises estatística e matemática.....	67
4.1.3	Resultados e Discussão .....	67
4.1.3.1	Teste de tolerância à Heat .....	67
4.1.3.2	Identificação molecular por sequenciamento do gene ribossomal 16S .....	67
4.1.3.3	Curva de crescimento bacteriano .....	68
4.1.3.4	Níveis de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em resposta à Heat .....	69
4.1.3.5	Peroxidação lipídica em resposta ao Heat.....	71
4.1.3.6	Capacidade de degradação de isolados bacterianos .....	73
4.1.3.7	Atividade enzimática de CAT em resposta à Heat .....	73
4.1.3.8	Atividade enzimática de GST em resposta à Heat .....	75
4.1.3.9	Sistemas de resposta integrados para tolerância de Heat .....	77
4.1.4	Conclusões .....	81
	REFERÊNCIAS.....	82
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	86

<b>APÊNDICE A: ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA CURVA DE CRESCIMENTO .....</b>	<b>95</b>
<b>APÊNDICE B: ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> .....</b>	<b>98</b>
<b>APÊNDICE C: ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA MDA .....</b>	<b>100</b>
<b>APÊNDICE D: ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA CAT .....</b>	<b>102</b>
<b>APÊNDICE E: ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA GST .....</b>	<b>104</b>
<b>APÊNDICE F: ESTATÍSTICA DE AGRUPAMENTO DA ANÁLISE DE PCA .....</b>	<b>106</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 AGRICULTURA E UTILIZAÇÃO DE HERBICIDAS

A agricultura depende fortemente da utilização de agrotóxicos, para o controle de pragas, sendo esse um pré-requisito para manutenção do rendimento das culturas e sustentação do crescimento populacional (STENRØD, 2015; THIOUR-MAUPRIVEZ et al., 2019). Desde 2002, autores já projetavam uma duplicação da demanda global de alimentos nos próximos 50 anos (TILMAN et al., 2002). A partir daí houve um aumento mundial no uso de agrotóxicos (SINGH; SINGH, 2016). Em contraste, reduções no uso de agrotóxicos sem afetar a lucratividade e rendimento das culturas ocorreram em 59% de 946 fazendas não orgânicas da França, correspondendo à uma redução média de 37, 47 e 60% no uso de herbicidas, fungicidas e inseticidas, respectivamente. Porém, tais reduções implicariam em mudanças profundas na organização do mercado e na balança comercial (LECHENET et al., 2017).

Herbicidas são agrotóxicos amplamente utilizados na agricultura para proteção de cultivos no controle de ervas daninhas, principalmente por serem um método fácil, econômico e eficaz (SINGH; SINGH, 2016). Mas o excesso de confiança e a dependência no controle químico, associadas à demanda de produção agrícola, passou a ameaçar a sustentabilidade dos sistemas produtivos pela seleção de pragas resistentes, além da promoção de impactos na saúde e no meio ambiente (BARZMAN et al., 2015). Ervas daninhas resistentes a herbicidas foram observadas desde os primeiros anos de desenvolvimento de herbicidas, nas décadas de 1950 e 1960 (PETERSON et al., 2018). Desde então, a resistência tornou-se cada vez mais comum, levando agricultores a usar variedades e quantidades maiores de herbicidas para controlá-las, ameaçando muitos ecossistemas por poluição (SINGH; SINGH, 2016). Em ecossistemas de solo, o uso indiscriminado de herbicidas pode elevar os níveis de toxicidade bem como promover alterações no metabolismo funcional e diminuição do potencial produtivo (OLCHANHESKI et al., 2014; TOMKIEL et al., 2018). Outro fator preocupante é a persistência de metabólitos tóxicos, como dos herbicidas Garlon XRT (triclopyr) e Arsenal Powerline (imazapyr), encontrados em solos por mais de um ano após a aplicação (JIMMO et al., 2018).

Herbicidas podem ser transportados para ambientes aquáticos por lixiviação ou escoamento superficial, contaminando águas subterrâneas ou fontes de água superficiais distantes do local de aplicação (HUANG et al., 2017), e apresentar persistência (STENRØD 2015). Ametryn, atrazina, diuron, hexazinona e tebuthiuron são herbicidas que apresentaram

meias-vidas consistentemente maiores que um ano em ensaios que simularam ambientes marinhos, devido à pouquíssima atividade de degradação (MERCURIO et al. 2015). Assim, apesar de sua importância na promoção da agricultura, o uso de herbicidas implica em problemas de contaminação ambiental promovendo impactos em muitos ecossistemas.

## 1.2 IMPACTOS DE HERBICIDAS EM ESPÉCIES NÃO-ALVO

Devido seu potencial de contaminação, tanto em solo quanto em água, os herbicidas podem atingir outras espécies que não sejam plantas daninhas, ditas espécies não-alvo, e promover impactos (HASENBEIN et al., 2017; THIOUR-MAUPRIVEZ et al., 2019). Esses impactos ocorrem porque o modo de ação da maioria dos herbicidas se dá sobre enzimas que não são exclusivas de plantas daninhas (THIOUR-MAUPRIVEZ et al., 2019).

Atrasos significativos no pico da floração e reduções na produção de flores foram observados em espécies de plantas selvagens do Canadá e Dinamarca expostas aos herbicidas bromoxinil, ioxinil, metsulfuron-metil, clopyralid e glifosato (CARPENTER et al. 2020). O glifosato também promoveu letalidade e reduções no crescimento de plantas nativas das florestas do Chaco, na Argentina (FERREIRA et al., 2017).

Além de comunidades vegetais não-alvo, herbicidas também podem causar efeitos tóxicos, a longo prazo, em concentrações relativamente baixas em animais, como no microcrustáceo *Daphnia magna*. A alimentação deste organismo com algas verdes *Pseudokirchneriella subcapitata* expostas a diuron e hexazinona provocou reduções em diferentes índices de sobrevivência, configurando que estes herbicidas causam efeitos transgeracionais negativos na cadeia alimentar (HASENBEIN et al., 2017). Em insetos, os herbicidas dicamba e 2,4-D promoveram reduções na proporção de machos em uma população de joaninhas *Coleomegilla maculata*, além disso, as larvas da mesma espécie sofreram letalidade em exposição ao 2,4-D (FREYDIER; LUNDGREN, 2016). Outros trabalhos demonstraram que cupins *Macrotermes bellicosus*, podem ter mobilidade reduzida e sofrer até 100% de mortalidade se forem pulverizados ou entrarem em contato com vegetais submetidos aos herbicidas Vestamine, cuja molécula ativa é o 2,4-D, e Ultrazine, que tem a atrazina como molécula ativa (EJOMAH; ID; EKAYE, 2020).

Vertebrados também sofrem danos causados por herbicidas. O peixe Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, submetido a doses subletais e não letais do herbicida atrazina, exibiu movimentos de natação prejudicados e necrose no fígado e rim (DELCORSO et al., 2020). Girinos de *Dendropsophus molitor*, espécie endêmica da América do Sul, expostos ao herbicida

Roundup Active, apresentaram diversas alterações histológicas crônicas no fígado (RIAÑO et al., 2020). Camundongos, após exposição ao 2,4-D, passaram a exibir problemas na espermatogênese, devido à diminuição dos níveis de colesterol e de testosterona nas células Leydig (HARADA et al., 2016). Em humanos, muitos trabalhos têm demonstrado que a exposição a doses crônicas de herbicidas causam danos à saúde (VAN BRUGGEN et al., 2018). Em células A549, por exemplo, alterações em DNA e apoptose foram induzidas pelo herbicida Roundup (HAO et al., 2019). Outras alterações em DNA, como aberrações cromossômicas e micronúcleos aumentaram em linfócitos humanos expostos ao glifosato (SANTOVITO et al., 2018). Até mesmo problemas de fertilidade masculina, como redução na motilidade de espermatozoides, podem ser causados por exposição ao 2,4-D (TAN et al., 2016).

Por fim, um grupo de espécies não-alvo a ser destacado são as comunidades microbianas. Em termos de ecossistema, os microrganismos desempenham papéis essenciais, como regulação do ciclo do nitrogênio (CROUZET et al., 2016), ciclo do carbono, ciclagem de nutrientes e muitos outros processos, chamados ciclos biogeoquímicos (FIERER, 2017). Desse modo, quando microrganismos entram em contato com herbicidas, principalmente por pressão de seleção, ocorrem impactos nesses processos ecológicos desempenhado por eles (OLCHANHESKI et al., 2014; DOBRZANSKI et al., 2018). A médio e longo prazo, esse efeito tem prejudicado irreversivelmente a física e a fertilidade dos solos. Desequilíbrios no ciclo do nitrogênio, por exemplo, ocorreram em solos expostos ao mesotrione (CROUZET et al., 2016) e ao clomazone (DU et al., 2018a) por alterações na diversidade e abundância de bactérias fixadoras de nitrogênio, nitrificantes e desnitrificantes. Outros microrganismos, como os pertencentes ao filo *Acidobacteria*, envolvidos em processos biogeoquímicos, tiveram abundância reduzida na rizosfera de milho e soja após a aplicação prolongada de glifosato (NEWMAN et al., 2016). A aplicação de herbicidas como bispiribaque sódico (KUMAR et al., 2020) e fomesafen (WU et al., 2018), além de alterar a estrutura de comunidades microbianas, podem também reduzir as atividades enzimáticas do solo, diminuindo sua qualidade. É possível observar esse efeito em reduções no rendimento de culturas de milho e trigo tratadas com os herbicidas carfentrazone-etílica (TOMKIEL et al., 2018), terbutilzilazina, mesotrione, s-metolacoloro (BOROWIK et al., 2017), flufenacet e isoxaflutol (TOMKIEL et al., 2019).

A partir disso pode-se afirmar que o estudo sobre herbicidas como contaminantes ambientais é fundamental uma vez que eles causam impactos em espécies não-alvo como as de microrganismos, acarretando prejuízos a funções essenciais nos ecossistemas como, fixação de nitrogênio, ciclagem de nutrientes, entre outros.

### 1.3 HEAT E SAFLUFENACIL: CARACTERÍSTICAS E POTENCIAL DE IMPACTOS EM ESPÉCIES NÃO-ALVO

O herbicida comercial Heat, é um agrotóxico relativamente novo, desenvolvido em 2010 (YANG et al., 2020). Heat contém o saflufenacil como molécula ativa, e é utilizado para o controle de plantas daninhas em culturas como a de cana-de-açúcar, milho, trigo, algodão e soja, como alternativa ao glifosato, devido à seleção de resistentes (MONQUERO et al., 2012; BARCELLOS JÚNIOR et al., 2020).

O modo de ação do herbicida se dá por meio da inibição da protoporfirinogênio oxidase, a Protox, enzima que participa da síntese da clorofila e dos citocromos. Em resposta à essa inibição, os níveis de protoporfirinogênio aumentam no cloroplasto, que acaba migrando para o citoplasma e é convertido para protoporfirina-IX. Este hormônio, em presença de luz e oxigênio, gera Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), provocando rompimento das membranas celulares com a peroxidação de lipídeos e proteínas, resultando em morte celular (BASF, 2017; KAUR, 2019).

A Protox não é uma enzima exclusiva de plantas daninhas. Isoformas não-homólogas dessa enzima já foram identificadas em outras plantas e em diversos procariontes como bactérias Gram-positivas aeróbicas ou facultativas, pertencentes ao filo *Firmicutes*, e em algumas Gram-negativas como *Escherichia coli* e *Salmonella*, além de algumas cianobactérias (THIOUR-MAUPRIVEZ et al., 2019). Além disso, a molécula de saflufenacil apresenta os elementos químicos flúor (F) e cloro (Cl), pertencentes ao grupo dos halogênios, que têm como característica a alta eletronegatividade. Assim, F e Cl conferem ao herbicida as características de alta atividade oxidante (ROVIDA et al., 2021)

Atualmente, o saflufenacil tem registro para uso no Canadá e no Estados Unidos, mas não para os países da União Europeia. Para os próximos anos se preveem grandes aumentos no uso do herbicida, devido a crescentes pressões regulatórias sobre o glifosato (GAUTHIER; MABURY, 2020). No Brasil, esse herbicida foi recentemente registrado e há poucas informações publicadas sobre os efeitos residuais, como o comportamento em solos (BEATRIZ et al., 2018). Porém, alguns trabalhos têm apontado uma forte relação entre retenção de saflufenacil no solo e alto teor de matéria orgânica, podendo representar um risco ambiental significativo para a contaminação nestas condições e em massas de água subterrâneas por deriva (MONQUERO et al., 2012; BARCELLOS JÚNIOR et al., 2020). Essa condição, somada à sua alta solubilidade em água, aumentam ainda mais o potencial de contaminação aquática pelo herbicida (GAUTHIER; MABURY, 2020).

Apesar dos riscos ecológicos ainda não estarem completamente elucidados na literatura, sugere-se que o saflufenacil também promova impactos em espécies não-alvo, como as de microrganismos, devido as características da molécula e do seu modo de ação.

#### 1.4 ESTRESSE OXIDATIVO CAUSADO POR HERBICIDAS EM MICRORGANISMOS

A maioria dos danos causados em ervas daninhas pela aplicação de herbicidas está relacionado com a superprodução e o acúmulo de ERO que resulta em distúrbios metabólicos celulares (IMLAY, 2019). Esses mesmos eventos de desequilíbrio de ERO podem também promover danos em espécies não-alvo como em comunidades microbianas (KAUR, 2019). A característica oxidante das ERO podem danificar a maioria das biomoléculas, inclusive causar alterações em DNA (LUSHCHAK, 2014; IMLAY, 2019), e promover peroxidação lipídica (KAUR, 2019). A peroxidação lipídica que ocorre nas ligações duplas de ácidos graxos poli-insaturados, presentes principalmente nas membranas citoplasmáticas de bactérias, levam à formação de malondialdeído (MDA), um produto aldeído citotóxico que pode reagir com proteínas celulares ou DNA, resultando em danos (TSIKAS, 2017; KHYADE; PHULE; MURAD, 2019).

Apesar das ameaças às biomoléculas em microrganismos aeróbios, a formação de ERO ocorre durante o processo de produção de ATP. Em condições normais, aproximadamente 90% do oxigênio ( $O_2$ ) consumido no processo é reduzido diretamente à água ( $H_2O$ ) pelo citocromo oxidase, enquanto os outros 10% acabam resultando na formação de ERO, com o radical superóxido ( $O_2^-$ ). Rapidamente,  $O_2^-$  é convertido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), e posteriormente em  $H_2O$  e  $O_2$  pela ação da catalase (CAT) (LUSHCHAK, 2014; VENDITTI; DI MEO, 2020).

Fatores como exposição à radiação ionizante e ultravioleta; e à agrotóxicos como os herbicidas, podem desequilibrar a produção e eliminação de ERO. Esse desequilíbrio, chamado estresse oxidativo, pode causar danos em microrganismos (LIGUORI et al., 2018; IMLAY, 2019). Em *E. coli* DH5- $\alpha$ , os efeitos tóxicos do herbicida mesotrione foram identificados pelo aumento significativo nos níveis de MDA e diminuição nas taxas de crescimento em relação ao controle, indicando uma situação de estresse oxidativo (OLCHANHESKI et al., 2014). Este herbicida também induziu aumentos significativos na produção de  $H_2O_2$  em *Pantoea ananatis* (PRIONE et al., 2016). O 2,4-D provocou estresse oxidativo em *E. coli* BL21 e induziu alterações fenotípicas na superfície celular e em vias metabólicas vitais, incluindo fosforilação oxidativa, biossíntese e metabolismo de macromoléculas (BHAT et al., 2015).

Para eliminar ou minimizar os danos que as ERO possam causar, os microrganismos aeróbios possuem um sistema antioxidante complexo e multinível, que opera em conjunto para manter os níveis de produção e eliminação de ERO equilibrados (LUSHCHAK, 2014).

### 1.5 SISTEMAS DE RESPOSTA ANTIOXIDANTE EM BACTÉRIAS

O sistema de resposta antioxidante bacteriano pode utilizar de moléculas não enzimáticas, como a glutathiona (GSH), ou necessitar da atividade de enzimas (HASANUZZAMAN et al., 2017). As principais enzimas deste sistema atuam de maneira integrada, como a SOD e a CAT (KAUR, 2019). Outras enzimas, como a GST, que atua na desintoxicação de xenobióticos utilizando glutathiona (GSH) para formar conjugados, também pode auxiliar na manutenção da estabilidade redox celular (ALLOCATI et al., 2003).

A regulação do sistema antioxidante depende de ativação de sensores que monitoram diferentes sinais redox dentro da célula bacteriana, como o aumento nos níveis de ERO. Os principais sensores incluem o sistema regulon *soxRS* e o fator de transcrição OxyR (GAMBINO; CAPPITELLI, 2016). O regulon *soxRS* detecta o  $O_2^-$  e induz a transcrição de dezenas de genes que codificam proteínas que ajudam a suprimir a toxicidade  $O_2^-$  como a SOD (IMLAY, 2015). Já o OxyR, por sua vez, detecta  $H_2O_2$  e ativa a transcrição de vários genes envolvidos na defesa antioxidante, como *katG*, que codifica a CAT HPI (IMLAY, 2015; GAMBINO; CAPPITELLI, 2016). Desse modo, quando há um aumento nos níveis de ERO em bactérias submetidas à condições estressantes, como exposição à herbicidas, há um aumento da atividade de enzimas antioxidantes, para garantir a sobrevivência da célula (GRAVINA et al., 2017). Em *P. ananatis*, por exemplo, aumentos na atividade de GST e um sistema de CAT polimórfica controlaram de maneira eficiente o estresse oxidativo causado por mesotrione (PRIONE et al., 2016). *E. coli* apresentou um modelo de plasticidade fenotípica com diferentes isoformas de SOD e CAT, para controlar os níveis de ERO induzidos pela presença de Gramoxone (GRAVINA et al., 2017).

A partir disso, percebe-se a importância dos mecanismos de respostas antioxidantes em microrganismos, que permitem rápida adaptação à ambientes sujeitos a intensas mudanças nos constituintes químicos, como o de solo agrícola (GRAVINA et al., 2017).

## 1.6 MECANISMOS DE EVOLUÇÃO EM BACTÉRIAS

A evolução e a ecologia são frequentemente entendidas como processos antagônicos: a evolução sendo um processo lento, indetectável e que ocorre durante longos períodos, e a ecologia, um processo dinâmico que responde rapidamente às mudanças ambientais (HILTUNEN; VIRTA; ANNA-LIISA, 2017). No entanto, a evolução se dá pela conjunção de ecologia e genética, envolvendo processos básicos como nascimentos, mortes, interações ecológicas, mutações e seleção (LENSKI, 2017).

Um dos principais grupos de organismos nos quais se observa a dinamicidade da evolução são as bactérias. Em espaços curtos de tempo bactérias apresentam mudanças marcantes em várias características para a adaptação, desde comportamento à fisiologia (LENSKI, 2017). A evolução da resistência à antibióticos, por exemplo, é provavelmente o caso melhor documentado atualmente (HILTUNEN; VIRTA; ANNA-LIISA, 2017).

A evolução observada em bactérias pode ser explicada por alguns fatores genéticos, como mutações espontâneas ou induzidas por uma contínua pressão seletiva (RANGASAMY et al., 2018). Porém, o principal fator responsável pela velocidade da evolução é a troca de material genético entre células bacterianas por transferência horizontal de genes (THG) (MAILLARD, 2018). Bactérias também podem atingir grandes tamanhos populacionais em tempos curtos de geração, o que aumenta a probabilidade de fixação de mutações (HALL; BROCKHURST; HARRISON, 2017). A obtenção de novos genes por THG supera a necessidade de modificação gradual dos genes preexistentes (GILLINGS, 2017). Eventos mutacionais raros, por exemplo, precisam ocorrer apenas uma vez, e poderão ser disseminados amplamente por THG na comunidade (HALL; BROCKHURST; HARRISON, 2017). Desse modo, a THG permite às bactérias a diversificação do pool gênico, o que facilita a colonização de novos nichos ecológicos e a adaptação às mudanças nas condições ambientais (OLSZAK et al., 2017). Em ambientes como os de solo agrícola, microrganismos são expostos a condições muito variáveis, como alterações em pH, temperatura, pressão osmótica e, principalmente, exposição à agrotóxicos (ULTEE et al., 2019). Essas condições são agentes de seleção de microrganismos que possuem características vantajosas obtidas por THG. Desse modo, as microbiotas de ecossistemas agrícolas, como filosfera e rizosfera, possuem potencial para taxas elevadas de THG, não porque as taxas globais são aumentadas, mas porque as taxas percebidas de THG são maiores, em decorrência da forte pressão seletiva (GILLINGS, 2017).

Um dos sistemas reguladores da THG é o sistema SOS, que induz a expressão de genes envolvidos no reparo e recombinação do DNA em resposta a danos nessa molécula. Agentes

que promovem estresse oxidativo são gatilhos potenciais para a resposta SOS (GILLINGS, 2017). Antibióticos e agrotóxicos, como os herbicidas, são agentes conhecidos por causarem estresse oxidativo em bactérias (LIGUORI et al., 2018; LU et al., 2018). Desse modo, a exposição a esses agentes pode influenciar a THG.

Durante a THG o material genético que circula entre diferentes células bacterianas é chamado de elemento móvel (HALL; BROCKHURST; HARRISON, 2017). Os principais elementos móveis são os plasmídeos, profagos, transposons e elementos conjugativos integrativos (GILLINGS, 2017). Os plasmídeos são moléculas circulares de DNA que se replicam independentemente do cromossomo hospedeiro (SAN MILLAN; MACLEAN, 2019). Já os profagos são os genomas de bacteriófagos que foram inseridos no cromossomo bacteriano (OLSZAK et al., 2017). Os transposons são elementos de DNA que podem se mover entre locais do próprio cromossomo. De maneira similar aos transposons, os elementos conjugativos integrativos, são genes que são integrados ao cromossomo bacteriano, mas obtidos de outras bactérias (GILLINGS, 2017).

Os principais mecanismos pelos quais a THG ocorre são conjugação, transdução ou transformação (RANGASAMY et al., 2018). A conjugação permite a transferência de DNA entre as células por meio do contato físico direto (HILTUNEN; VIRTA; ANNA-LIISA, 2017). Durante o processo de conjugação, o DNA é transferido por um sistema de secreção tipo IV, através de um pilus, entre as bactérias doadoras e receptoras (COSTA et al., 2016).

A transdução, por sua vez, envolve a transferência de DNA por meio de bacteriófagos, que são vírus que infectam bactérias (HILTUNEN; VIRTA; ANNA-LIISA, 2017). Esse mecanismo ocorre baseado no ciclo de vida do bacteriófago, que pode ser lítico ou lisogênico. Esses ciclos envolvem pelo menos cinco estágios: adsorção à célula bacteriana, injeção de material genético, montagem, liberação e posterior transmissão de vírions (OLSZAK et al., 2017). Após a injeção de material genético, dependendo da condição fisiológica da célula bacteriana e do tipo de vírus, o genoma do bacteriófago pode permanecer livre no citoplasma ou pode ser incorporado no genoma do hospedeiro (profago). Esses segmentos de DNA codificam para a síntese de novas partículas de vírus (OLSZAK et al., 2017). Posteriormente, durante o processo de montagem dos vírions, fragmentos de DNA bacteriano podem ser empacotados juntamente com o profago, e na etapa de liberação dos vírions o DNA bacteriano incluso no profago pode ser transferido para outras células durante a próxima rodada de infecção (GILLINGS, 2017).

Por fim, a transformação é o processo no qual pequenos fragmentos de DNA livres no ambiente são absorvidos por bactérias (HILTUNEN; VIRTA; ANNA-LIISA, 2017). O

transporte físico desse DNA através da membrana celular é realizado por mecanismos semelhantes à conjugação. O DNA pode ser proveniente de células lisadas ou DNA secretado por outras células, como ocorre em biofilmes (HALL; BROCKHURST; HARRISON, 2017). Biofilmes são amplamente discutidos na literatura referente a ambientes aquáticos, mas estão presentes também em solo, e tem papel fundamental na sobrevivência da microbiota sob estresse ambiental (WU et al., 2019).

Depois da integração na nova célula, o DNA recém-transferido por THG deve conferir uma vantagem seletiva ao novo hospedeiro para que seja mantido à longo prazo entre as gerações. A vantagem seletiva deve superar o custo de sua manutenção, caso contrário, o DNA será perdido por seleção negativa ou por deriva genética (SAN MILLAN; MACLEAN, 2019).

Ao longo do tempo, vários fenótipos complexos e ecologicamente importantes foram adquiridos ou expandidos via THG, incluindo fotossíntese procariótica, simbiose, e vias metabólicas como as de biodegradação de xenobióticos (GILLINGS, 2017). A análise do genoma de uma linhagem de *P. putida* degradadora de difenilamina revelou que a capacidade de degradação foi adquirida pelo recrutamento de operons *bph* e *tdn* via THG (PAPADOPOULOU et al., 2018). Na linhagem de *Pseudomonas* sp. C5pp, degradadora do inseticida carbaril, os genes envolvidos na degradação estavam presentes em integrons e transposons (TRIVEDI et al., 2016). Genes para degradação de herbicidas são frequentemente encontrados em plasmídeos como os associados à degradação de linuron em *Hydrogenophaga* sp. (WERNER et al., 2020) e em linhagens do gênero *Variovorax* (ÖZTÜRK et al., 2020). Outro exemplo é o de  $\beta$ -proteobactérias extraídas de campos de arroz, cujos genes para a degradação de 2,4- D estavam contidos em elementos móveis especialmente em plasmídeos (NGUYEN et al., 2018). Outros fenótipos importantes como bombas de efluxo têm sido cada vez mais identificados em plasmídeos (LI; PLÉSIAT; NIKAIDO, 2015).

Genes relacionados com controle do estresse oxidativo também podem ser obtidos por THG. A análise filogenética de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* mostrou que o gene *xoc\_2868*, envolvido na resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi obtido de um antepassado *Burkholderiaceae* (FANG et al., 2019). Em isolados de *Acidihalobacter* tolerantes a altas concentrações de metais e ao estresse oxidativo, análises *in silico* evidenciaram que genes de tolerância, incluindo para catalase, foram obtidos por THG (KHALEQUE et al., 2020). Em outro trabalho, apenas isolados de *Acinetobacter baumannii* que continham o gene *katG* em elementos móveis sobreviveram à exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (WRIGHT et al., 2017).

A THG fornece uma oportunidade ilimitada para troca de material genético, acelerando a evolução de novos fenótipos para a adaptação (PHALE; SHAH; MALHOTRA, 2019). Em

contrapartida, da perspectiva da saúde humana, a THG configura um problema, uma vez que acelera a evolução de fenótipos de resistência à antibióticos (HILTUNEN; VIRTÁ; ANNA-LIISA, 2017). Desse modo, cada vez mais se fazem necessários estudos integrados entre as áreas clínica e ambiental, no esforço de compreender as interações complexas da comunidade microbiana, para soluções mais efetivas para problemas como a resistência à antibióticos.

## 1.7 PRESSÃO SELETIVA E SISTEMAS DE RESPOSTAS EM MICRORGANISMOS

Solos agrícolas são muito variáveis e bactérias adaptadas à esses ambientes dispõem de alguns fenótipos relacionados à resistência e à tolerância (AHMAD et al., 2017; SHAHID; ZAIDI; SAGHIR KHAN, 2020). A resistência é a capacidade de impermeabilidade celular ao efeito tóxico de poluentes em concentrações inibitórias mínimas (BRAUNER et al., 2016). Já a tolerância, é a capacidade do microrganismo de sobreviver à exposição transitória a poluentes, mesmo em altas concentrações (YAN; BASSLER, 2019). Ambas podem ocorrer devido a mutações espontâneas em genomas microbianos, ou induzidas por uma contínua pressão seletiva, como a exposição à agrotóxicos que ocorre frequentemente em solo agrícola (MAILLARD, 2018). Esses genes mutantes podem ser disseminados para os descendentes e ainda para outras espécies bacterianas por THG (RANGASAMY et al., 2018; YAN; BASSLER, 2019).

Microrganismos com fenótipos resistentes ou tolerantes geralmente possuem uma vantagem no crescimento sobre os que não os apresentam, principalmente em ambientes onde ocorre pressão seletiva (BRAUNER et al., 2016; RAMAKRISHNAN et al., 2019). Desse modo, em solo agrícola, agrotóxicos podem direcionar a seleção de microrganismos com esses fenótipos (POLST et al., 2018b). Microrganismos pertencentes aos filos *Firmicutes* e *Actinobacteria*, por exemplo, tolerantes ao herbicida nicosulfuron, aumentaram em diversidade e abundância em solo exposto à este herbicida (PETRIC et al., 2016). Fenótipos de degradação de herbicidas, são frequentemente relatados em microrganismos com histórico de seleção prévia para o agente xenobiótico (RIÑO et al., 2020). Na bactéria *Ochrobactrum haematophilum*, isolada de uma pastagem cronicamente exposta ao herbicida glifosato, foram encontradas sequências de genes envolvidos em vias de degradação de fosfonatos e uma sequência da enzima EPSP sintase classe II, que confere tolerância ao glifosato (MASSOT et al., 2019).

Poucos trabalhos evidenciam que microrganismos podem sobreviverem frente à agrotóxicos sem pressão seletiva pré-existente. *E. coli* K-12, uma linhagem não ambiental e não

previamente exposta a qualquer agrotóxico, apresentou plasticidade fenotípica para sobreviver frente ao Gramoxone, com a produção de diferentes isoformas de enzimas antioxidantes (GRAVINA et al., 2017). *E. coli* DH5- $\alpha$ , outra linhagem não ambiental, apresentou sistemas de controle antioxidantes eficientes, além de vias de degradação do herbicida mesotrione (OLCHANHESKI et al., 2014). *Pseudomonas* sp. isolada de tanques de lavagem de embalagens de diversos agrotóxicos, apresentou tolerância e um sistema de modulação da atividade de enzimas antioxidantes frente à altas concentrações do herbicida Boral, ausente no local de coleta (ROVIDA et al., 2021). Há relatos sobre a exposição à agrotóxicos alterando a suscetibilidade de microrganismos à antibióticos, ou seja, mesmo sem exposição prévia a antibióticos, bactérias podem modular o padrão de resistência. *Burkholderia pseudomallei*, por exemplo, previamente exposta ao glifosato e ao paraquat teve suscetibilidade diminuída aos antibióticos doxiciclina e ceftazidime (CHAIANUNPORN; CHAIANUNPORN; CHAREONSUDJAI, 2020).

Bactérias podem apresentar respostas gerais ao estresse, caracterizadas pela capacidade da célula de defender-se, não apenas do estresse indutor específico, mas de outros fatores aparentemente não relacionados. Essas respostas são desencadeadas por várias tensões diferentes e a saída é multifacetada, como a resistência cruzada (GOTTESMAN, 2019). Esse processo pode ser explicado por mecanismos adaptativos comuns para sobrevivência frente à poluentes como: formação de biofilmes; aumento da expressão gênica e do número de cópias de genes essenciais para tolerar o estresse; e pela THG, na qual agrupamentos de genes de resistência para agrotóxicos e antibióticos são transferidos juntos para outras bactérias (RANGASAMY et al., 2018). Outro mecanismo adaptativo são as bombas de efluxo, componentes da membrana celular bacteriana que expõem substâncias tóxicas para fora da célula, reduzindo sua concentração intracelular (NIKAIDO; PAGÈS, 2012; JONES; HERNÁNDEZ LOZADA; PFLEGER, 2015). Os sistemas de efluxo frequentemente exibem níveis significativos de redundância funcional (TEELUCKSINGH; THOMPSON; COX, 2020). Inclusive há relatos de descrição de bombas de efluxo polisseletivas capazes de reconhecer e expelir vários agentes antimicrobianos, incluindo antibióticos, biocidas e detergentes (NIKAIDO; PAGÈS, 2012).

Desse modo, microrganismos podem dispor de estratégias adaptativas gerais, incluindo mecanismos antioxidantes, que independem de seleção prévia para superar o estresse em locais de pressão seletiva, como em solo agrícola.

## 1.8 O GÊNERO *Stenotrophomonas*

Bactérias do gênero *Stenotrophomonas* são bacilos Gram-negativos, aeróbios e não fermentadores de glicose (SAID; TIRTHANI; LESHU, 2021). Possuem flagelos e produzem colônias pigmentadas (amarelas) no ágar MacConkey (ADEGOKE; STENSTRÖM; OKOH, 2017). O primeiro registro do gênero ocorreu em 1943, a partir de uma amostra de líquido pleural humano. O microrganismo foi denominado *Bacterium bookeri* (SAID; TIRTHANI; LESHU, 2021). Mais tarde, revisões propuseram a reclassificação para os gêneros *Pseudomonas*, em 1961, e *Xanthomonas*, em 1983. Em 1993, uma nova revisão propôs o gênero *Stenotrophomonas* com apenas uma espécie, *S. maltophilia*. Atualmente o gênero abrange cerca de 12 espécies (SINGHAL; KAUR; GAUTAM, 2017).

Microrganismos do gênero *Stenotrophomonas* são cosmopolitas e estabelecem relações ecológicas de comensalismo e oportunismo (ADEGOKE; STENSTRÖM; OKOH, 2017). A espécie clinicamente significativa é *S. maltophilia*, e está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade em indivíduos imunocomprometidos (SAID; TIRTHANI; LESHU, 2021). As principais doenças causadas por *S. maltophilia* incluem infecções do trato respiratório e urinário, infecções na corrente sanguínea, infecções ósseas e articulares, endocardite, meningite e fibrose cística crônica (SINGHAL; KAUR; GAUTAM, 2017).

*S. maltophilia* é também amplamente encontrada no meio ambiente (SAID; TIRTHANI; LESHU, 2021). Há registros de sua ocorrência em água, microbiota intestinal de animais e em alimentos (ADEGOKE; STENSTRÖM; OKOH, 2017). Porém, o reservatório natural mais importante de *Stenotrophomonas* se dá em rizosfera, na qual frequentemente é o gênero dominante (HUEDO et al., 2018). Nesses ambientes exercem funções ecológicas importantes como biodegradação de substâncias tóxicas, síntese de macromoléculas e efeitos positivos no crescimento e saúde das plantas (ADEGOKE; STENSTRÖM; OKOH, 2017). Plantas do gênero *Populus*, por exemplo, tiveram o crescimento aumentado em decorrência da produção de grandes quantidades de auxina por *Stenotrophomonas* sp. 169 (ULRICH et al., 2021). Além desses fatores, a rizosfera é um nicho que facilita aos microrganismos o estabelecimento de redes de comunicação e a aquisição de novos genes por THG (HUEDO et al., 2018).

Uma das principais características exibidas pelo gênero é a resistência à antibióticos, que ocorre devido a genes inerentes e também adquiridos por THG (GIL-GIL; MARTÍNEZ; BLANCO, 2020). Esses genes conferem fenótipos que incluem: baixa permeabilidade da membrana externa, enzimas inativadoras de antibióticos,  $\beta$ -lactamases e bombas de efluxo, (SINGHAL; KAUR; GAUTAM, 2017). *Stenotrophomonas* também é reconhecido pela

capacidade de formação de biofilmes (ADEGOKE; STENSTRÖM; OKOH, 2017), os quais, além de aumentar a aderência das bactérias durante a infecção, funcionam como um mecanismo de tolerância a antibióticos (FLORES-TREVIÑO et al., 2019). Em *Stenotrophomonas* sp. B1-1 multirresistente à antibióticos, foram encontrados genes de resistência múltipla incluindo genes de bomba de efluxo e de formação de biofilme (WANG et al., 2021). Além disso, o biofilme facilita a THG (FLORES-TREVIÑO et al., 2019).

Outro fator relevante para o gênero é a utilização do *quorum sensing* (QS) para regulação gênica e fenotípica (ADEGOKE; STENSTRÖM; OKOH, 2017). O QS é um processo de comunicação química célula a célula, que depende da produção, detecção e resposta a moléculas sinalizadoras extracelulares, os autoindutores (MUKHERJEE; BASSLER, 2019). O QS permite que grupos de bactérias alterem o comportamento de maneira síncrona em resposta a mudanças na densidade populacional e na composição de espécies da comunidade (MUKHERJEE; BASSLER, 2019). Para *Stenotrophomonas*, já foi relatado a presença de um sistema de QS para a regulação da resistência a antibióticos (ADEGOKE; STENSTRÖM; OKOH, 2017).

O gênero também exhibe atividade de *quorum quenching* (QQ) (HUEDO et al., 2018). O QQ interrompe a comunicação microbiana, diminuindo ou inibindo completamente as atividades reguladas por QS, incluindo a formação de biofilme (PALUCH et al., 2020). Desse modo, o QQ constitui um mecanismo de proteção explorado por competidores bacterianos e por defesas do hospedeiro em caso de infecção (HUEDO et al., 2018). Em *Stenotrophomonas* sp., observou-se a atividade de QQ contra a molécula autoindutora 3-oxo-C12-HSL (TAN et al., 2015). Outro isolado do gênero *Stenotrophomonas* foi capaz de degradar o autoindutor C10-HSL (OCHIAI et al., 2013). Ambas moléculas autoindutoras estão relacionadas a formação do biofilme (FREITAS et al., 2021)

Devido seu potencial metabólico, bactérias desse gênero apresentam grande potencial para aplicações biotecnológicas, incluindo a produção de compostos orgânicos voláteis com atividade antifúngica, para controle biológico de plantas e biodegradação de xenobióticos (WANG et al., 2021). Éter decabromodifenílico, um contaminante ambiental, é degradado por um consórcio bacteriano que inclui bactérias do gênero *Stenotrophomonas* (YU et al., 2020). Inseticidas, como o DDT, também tiveram taxas de degradação aumentadas em solo com a inoculação de *Stenotrophomonas* sp., sem alterações significativas na estrutura da comunidade bacteriana (FANG et al., 2018). Em solo salino, *Stenotrophomonas rhizophila* degradou 94% do herbicida diuron em 42 dias e simultaneamente promoveu aumentos em parâmetros de crescimento em plantas de alface (SILAMBARASAN et al., 2020).

Tendo isso em vista, o gênero *Stenotrophomonas* exibe diferentes estratégias para sobreviver a condições estressantes.

## 2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar se *Stenotrophomonas* sp. CMA26, isolada de solo não previamente exposto ao herbicida Heat, é capaz de degradar o herbicida Heat ou modular a atividade das enzimas antioxidantes como mecanismo de resposta a esse composto sob concentrações maiores do que as utilizadas em agricultura.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 COLETA DE MICRORGANISMOS

A coleta de microrganismos foi realizada em quatro áreas agrícolas (M7, M8, M9 e M10) na cidade de Palotina, Paraná, Brasil, utilizando quatro transeptos paralelos (R1, R2, R3 e R4) (Tabela 1). Os microrganismos foram coletados, isolados e cedidos pela Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Grange, da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Local de coleta de microrganismos

Tabela 1: Pontos de coleta das amostras por transepto, obtidas por Global Positioning System (GPS).

Área	R1	R2	R3	R4
<b>M7</b>	S 24° 12' 52,6"	S 24° 12' 54,1"	S 24° 12' 53,9"	S 24° 12' 54,9"
	W 053° 54' 05,2	W 053° 54' 04,6	W 053° 54' 02,3	W 053° 54' 03,9
<b>M8</b>	S 24° 12' 46,1"	S 24° 12' 44,2"	S 24° 12' 44,5"	S 24° 12' 42,8"
	W 053° 53' 59,3	W 053° 53' 59,7	W 053° 54' 00,8	W 053° 54' 01,4
<b>M9</b>	S 24° 17' 14,3"	S 24° 17' 13,3"	S 24° 17' 12,9"	S 24° 17' 14,1"
	W 053° 52' 30,6	W 053° 52' 30,5	W 053° 52' 29,1	W 053° 52' 28,3
<b>M10</b>	S 24° 17' 18,1"	S 24° 17' 18,5"	S 24° 17' 17,6"	S 24° 17' 16,9"
	W 053° 53' 48,4	W 053° 53' 49,4	W 053° 53' 49,9	W 053° 53' 48,1

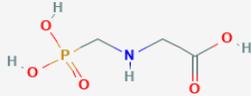
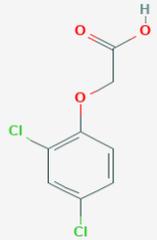
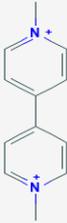
Fonte: NEIVERTH (2012).

As áreas agrícolas são de cultivo de soja e milho. Os agrotóxicos utilizados nas áreas de coleta e suas características químicas são mostrados no Quadro 1. O herbicida Heat não foi utilizado nos locais de coleta.

Agrotóxicos utilizados na área de coleta de microrganismos de solo agrícola

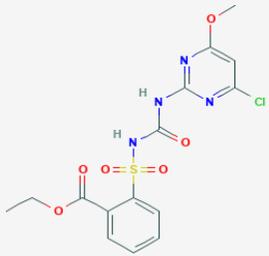
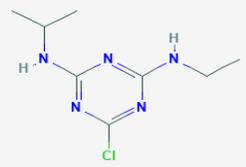
Quadro 1 - Agrotóxicos Utilizados na Área de Coleta. São apresentadas as marcas comerciais de herbicidas, fungicidas e inseticidas e suas respectivas moléculas ativas, modos de ação, famílias químicas e classificação das famílias químicas conforme o Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC), Fungicidas (FRAC) e Inseticidas (IRAC), além do tipo de cultura em que foram utilizados.

(continua)

Herbicidas						
Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Roundup Transorb R	Glifosato		Inibidor de EPSPS	Glicina substituída	G	Soja e milho
Aminol 806	2,4-D		Mimetizador de auxinas	Fenoxiácidos	O	Soja e milho
Gramoxone 200	Paraquat		Inibidor de fotossíntese no fotossistema I	Piridínios	D	Soja

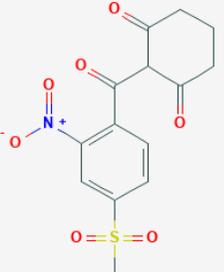
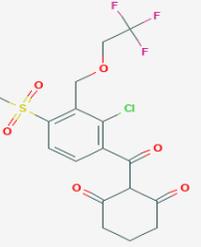
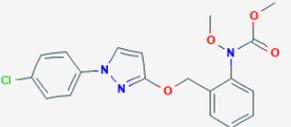
Quadro 1 - Agrotóxicos Utilizados na Área de Coleta. São apresentadas as marcas comerciais de herbicidas, fungicidas e inseticidas e suas respectivas moléculas ativas, modos de ação, famílias químicas e classificação das famílias químicas conforme o Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC), Fungicidas (FRAC) e Inseticidas (IRAC), além do tipo de cultura em que foram utilizados.

(continuação)

Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Clorimuron Nortox	Clorimuron etílico		Inibidor de ALS	Sulfonilureia	B	Soja
Accent	Nicossulfuron					Milho
Primóleo	Atrazina		Inibidor de fotossíntese no fotossistema II	Triazinas	C1	Milho

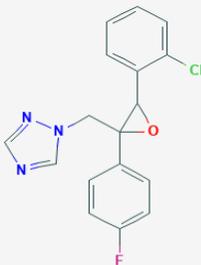
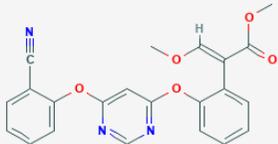
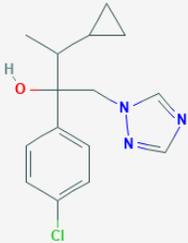
Quadro 1 - Agrotóxicos Utilizados na Área de Coleta. São apresentadas as marcas comerciais de herbicidas, fungicidas e inseticidas e suas respectivas moléculas ativas, modos de ação, famílias químicas e classificação das famílias químicas conforme o Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC), Fungicidas (FRAC) e Inseticidas (IRAC), além do tipo de cultura em que foram utilizados.

(continuação)

Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Callisto	Mesotrione		Inibidor de HPPD	Tricetonas	F2	Milho
Soberan	Tembotrione					
<b>Fungicidas</b>						
Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Ópera	Piraclostrobina		Inibidor do citocromo bc1	Carbamatos	C3	Soja e milho

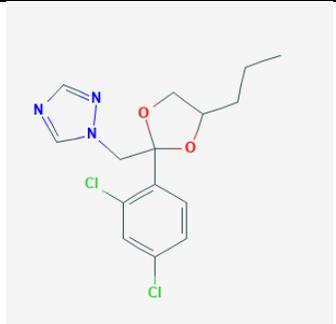
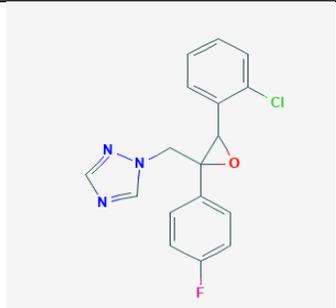
Quadro 1 - Agrotóxicos Utilizados na Área de Coleta. São apresentadas as marcas comerciais de herbicidas, fungicidas e inseticidas e suas respectivas moléculas ativas, modos de ação, famílias químicas e classificação das famílias químicas conforme o Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC), Fungicidas (FRAC) e Inseticidas (IRAC), além do tipo de cultura em que foram utilizados.

(continuação)

Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Ópera	Epoxiconazol		Inibidor da CYP51	Triazol	G1	Soja e milho
Priori Xtra	Azoxistrobina		Inibidor do citocromo bc1	Acrilatos	C3	Soja
	Ciproconazol		Inibidor da CYP51	Triazol	G1	

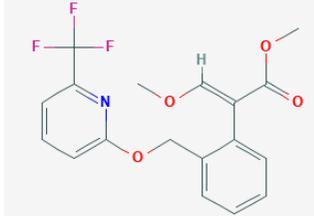
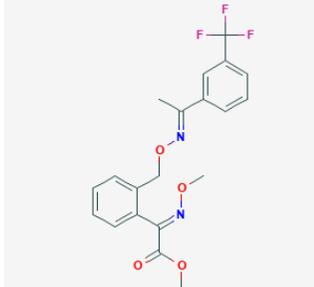
Quadro 1 - Agrotóxicos Utilizados na Área de Coleta. São apresentadas as marcas comerciais de herbicidas, fungicidas e inseticidas e suas respectivas moléculas ativas, modos de ação, famílias químicas e classificação das famílias químicas conforme o Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC), Fungicidas (FRAC) e Inseticidas (IRAC), além do tipo de cultura em que foram utilizados.

(continuação)

Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Tilt	Propiconazol		Inibidor da CYP51	Triazol	G1	Milho
Abacus	Piraclostrobina		Inibidor do citocromo bc1	Carbamatos	C3	Milho
	Epoxiconazol		Inibidor da CYP51	Triazol	G1	

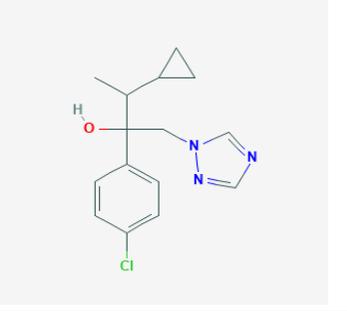
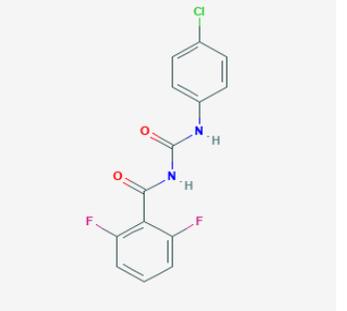
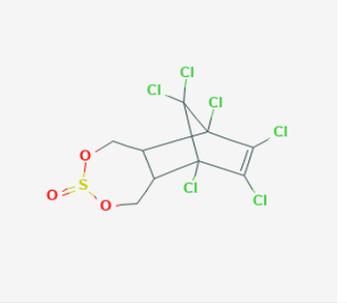
Quadro 1 - Agrotóxicos Utilizados na Área de Coleta. São apresentadas as marcas comerciais de herbicidas, fungicidas e inseticidas e suas respectivas moléculas ativas, modos de ação, famílias químicas e classificação das famílias químicas conforme o Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC), Fungicidas (FRAC) e Inseticidas (IRAC), além do tipo de cultura em que foram utilizados.

(continuação)

Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Aprouch Prima	Picoxistrobina		Inibidor do citocromo bc1	Acrilatos	C3	Milho
	Ciproconazol		Inibidor da CYP51	Triazol	G1	
Sphere Max	Trifloxistrobina		Inibidor do citocromo bc1	Oxamino-acetatos	C3	Milho

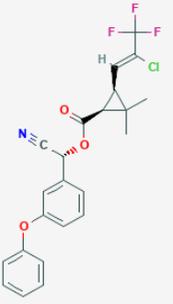
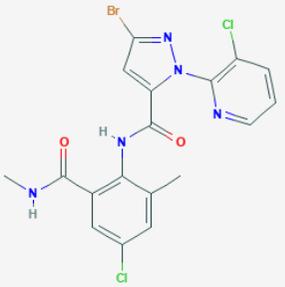
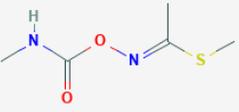
Quadro 1 - Agrotóxicos Utilizados na Área de Coleta. São apresentadas as marcas comerciais de herbicidas, fungicidas e inseticidas e suas respectivas moléculas ativas, modos de ação, famílias químicas e classificação das famílias químicas conforme o Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC), Fungicidas (FRAC) e Inseticidas (IRAC), além do tipo de cultura em que foram utilizados.

(continuação)

Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Sphere Max	Ciproconazol		Inibidor da CYP51	Triazol	G1	Milho
Inseticidas						
Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação IRAC	Cultura
Dimilin	Diflubenzurom		Inibidor de CHS1	Benzoilureias	15	Soja
Thiodan CE	Endosulfan		Bloqueadores de canais de cloreto controlados por GABA	Ciclodienoclorados	2A	Soja

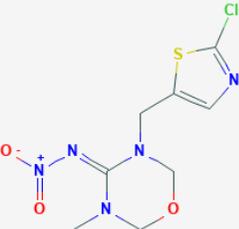
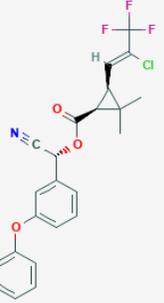
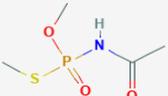
Quadro 1 - Agrotóxicos Utilizados na Área de Coleta. São apresentadas as marcas comerciais de herbicidas, fungicidas e inseticidas e suas respectivas moléculas ativas, modos de ação, famílias químicas e classificação das famílias químicas conforme o Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC), Fungicidas (FRAC) e Inseticidas (IRAC), além do tipo de cultura em que foram utilizados.

(continuação)

Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Ampligo	Lambda-cialotrina		Modulador de canal de sódio	Piretrinas	3A	Soja e milho
	Clorantraniliprole		Modulador de receptor de rianodina	Diamidas	28	
Lannate BR	Metomil		Inibidor de AChE	Carbamatos	1A	Soja

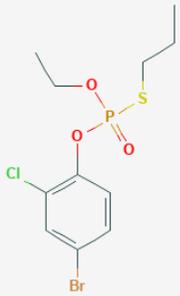
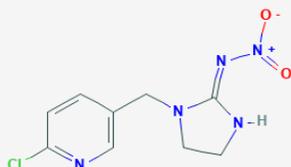
Quadro 1 - Agrotóxicos Utilizados na Área de Coleta. São apresentadas as marcas comerciais de herbicidas, fungicidas e inseticidas e suas respectivas moléculas ativas, modos de ação, famílias químicas e classificação das famílias químicas conforme o Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC), Fungicidas (FRAC) e Inseticidas (IRAC), além do tipo de cultura em que foram utilizados.

(continuação)

Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Engeo pleno S	Tiametoxam		Modulador de nAChR	Neonicotinoides	4A	Milho
	Lambda-cialotrina		Modulador de canal de sódio	Piretrinas	3A	
Acefato nortox	Acefato		Inibidor de AChE	Organofosforados	1B	Milho

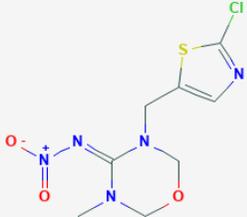
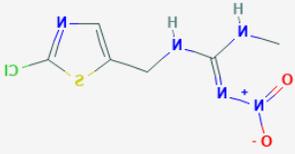
Quadro 1 - Agrotóxicos Utilizados na Área de Coleta. São apresentadas as marcas comerciais de herbicidas, fungicidas e inseticidas e suas respectivas moléculas ativas, modos de ação, famílias químicas e classificação das famílias químicas conforme o Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC), Fungicidas (FRAC) e Inseticidas (IRAC), além do tipo de cultura em que foram utilizados.

(continuação)

Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Curyom 550 EC	Profenofós		Inibidor de AChE	Organofosforados	1B	Milho
	Lufenuron		Inibidor de CHS1	Benzoilureias	15	
Cropstar	Imidacloprido		Modulador de nAChR	Neonicotinoides	4A	Milho

Quadro 1 - Agrotóxicos Utilizados na Área de Coleta. São apresentadas as marcas comerciais de herbicidas, fungicidas e inseticidas e suas respectivas moléculas ativas, modos de ação, famílias químicas e classificação das famílias químicas conforme o Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC), Fungicidas (FRAC) e Inseticidas (IRAC), além do tipo de cultura em que foram utilizados.

(conclusão)

Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Cropstar	Tiodicarbe		Inibidor de AChE	Carbamatos	1A	Milho
Cruiser 350 FS	Tiametoxam		Modulador de nAChR	Neonicotinoides	4A	Milho
Poncho	Clotianidina		Modulador de nAChR	Neonicotinoides	4A	Milho

Fonte: Os autores

### 3.2 LINHAGEM BACTERIANA

Os microrganismos isolados (item 3.1) foram adicionados à Coleção de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Os isolados foram mantidos em estoque de glicerol a -80 °C. Para o desenvolvimento deste trabalho, utilizou-se a linhagem *Stenotrophomonas* sp. CMA26 dessa coleção.

### 3.3 PRODUTOS QUÍMICOS

Utilizou-se o herbicida Heat (BASF – Ludwigshafen, Rhein, Alemanha) contendo 700 g/L (70% m/v) da molécula ativa saflufenacil (N'-(2-cloro-4-fluor-5-[1,2,3,6-tetrahidro-3-metil-2,6-dioxo-4-(trifluorometil)pirimidin-1-il]benzoil)-N-isopropil-N-metilsulfamida) (Fig. 1) (HEAT, 2017).

Estrutura química do saflufenacil

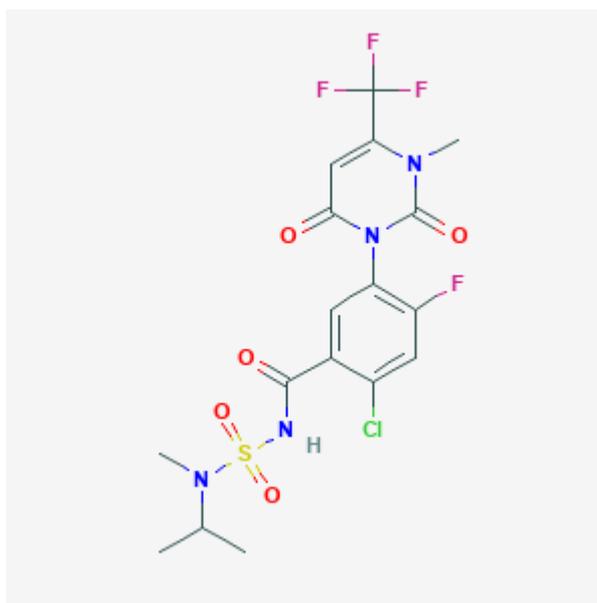


Figura 1 - Estrutura química do saflufenacil, molécula ativa do herbicida comercial Heat. Fonte: PubChem

O saflufenacil pertence à família química N-fenil-imidas e é classificado pelo Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC) com o modo de ação na categoria E, correspondente a inibição da Protox (HRAC, 2020). A dose recomendada de Heat para sua utilização em campo equivale à concentração de 0,49 mMol de saflufenacil (1x).

### 3.4 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Para o cultivo bacteriano foi utilizado o meio de cultura Caldo Luria Bertani (LB: 10 g/L triptona; 10 g/L NaCl; 5 g/L extrato de levedura, pH 7,0 ± 0,2). Os tratamentos estabelecidos com diferentes concentrações de Heat foram: controle, constituído por LB sem herbicida (C); LB + 0,49 mMol de saflufenacil (1x); LB + 4,9 mMol de saflufenacil (10x); LB + 24,5 mMol de saflufenacil (50x). Temperatura e agitação foram padronizadas em 30 °C e 200 rpm, respectivamente, em agitador orbital de mesa. Os ensaios sempre foram realizados em triplicatas.

### 3.5 TESTE DE TOLERÂNCIA À HEAT

Para avaliação da tolerância ao herbicida Heat, foram utilizados 35 isolados bacterianos de solo agrícola da cidade de Palotina, PR. Os isolados foram inoculados em placas de 96 poços nas mesmas condições descritas no item 3.4. Em cada poço foram utilizados 100 µL de meio de cultura. O crescimento foi avaliado por densidade óptica (DO) em leitor de microplacas a 600 nm.

### 3.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR SEQUENCIAMENTO DO GENE RIBOSSOMAL 16S

A linhagem foi cultivada em LB, por 24 h e incubada nas condições descritas no item 3.4. Posteriormente, 200 µL do cultivado foram coletados e submetidos à identificação molecular por sequenciamento do gene 16S rRNA. O DNA total foi extraído usando o kit ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System - Promega (Madison, WI, EUA). Foram utilizados os *primers* fD1(5'- CCGAATTTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1(5'- CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3') para a amplificação do gene ribossomal 16S. A reação de amplificação (PCR) consistiu em um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 5 min; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 s, anelamento a 55 °C por 45 s e extensão a 72 °C por 2 min; e um ciclo final de extensão por 10 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram purificados, utilizando Qiagen (Hilden, Ger), QIAquick PCR kit (nº 28104). Após purificação dos produtos de PCR e análise de integridade de bandas por meio de eletroforese, o material obtido foi enviado para sequenciamento na Ludwig Biotec (Alvorada,

Brasil). As sequências foram analisadas usando-se os recursos do sítio “*Ribosomal Database Project*”.

### 3.7 CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO

Para a obtenção da curva de crescimento, a linhagem foi incubada (item 3.4), em 100 mL de meio de cultura, até apresentar uma DO de aproximadamente 2,0 a 600 nm, em espectrofotômetro (pré-inóculo). O inóculo foi transferido para as culturas de controle e tratamento, a uma DO inicial de 0,05 a 600 nm e incubado conforme já descrito. O crescimento da cultura foi monitorado a cada hora, em espectrofotômetro, até o início da fase estacionária. Para uma maior precisão na quantificação do crescimento bacteriano, diluições com meio de cultura LB foram realizadas sempre que a DO era superior à 1,0.

### 3.8 EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS PARA AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO

A linhagem foi cultivada (item 3.4), em 100 mL de meio de cultura, e as células foram centrifugadas a 8.000 g por 10 min a 4 °C em 4, 6 e 8 h de incubação. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi macerado em nitrogênio líquido. Alíquotas de 100 mg do precipitado foram armazenadas e congeladas a -80 °C até a análise.

### 3.9 QUANTIFICAÇÃO DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Para a quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as amostras extraídas (item 3.8) foram homogeneizadas com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% e centrifugadas a 10.000 g por 15 min a 4 °C. Posteriormente, 0,2 mL do sobrenadante foram coletados e transferidos para um tubo contendo 0,2 mL de uma solução 100 mM de tampão fosfato (14,52 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,26 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 7,5 e 0,8 mL de solução 1M de iodeto de potássio (KI). A amostra foi acondicionada no escuro e em gelo por 1 h. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 390 nm. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$  de peso fresco.

### 3.10 QUANTIFICAÇÃO DE MDA

Para a quantificação de MDA, as amostras extraídas (item 3.8) foram homogeneizadas com 1 mL de ácido tricloroacético 0,1% e centrifugada a 10.000 g por 5 min. Uma alíquota de

0,25 mL do sobrenadante foi coletada e transferida para um tubo contendo 1 mL de uma solução de TCA 20% + ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,5%. A mistura foi incubada em banho-maria a 97 °C, por 30 min, e resfriada em gelo por 10 min. Posteriormente a amostra foi centrifugada a 10.000 g por 10 min, e o sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro à 535 e 600 nm, respectivamente. A quantidade de MDA foi expressa em mmol/mg de massa fresca.

### 3.11 CAPACIDADE DE DEGRADAÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS

Para determinação da capacidade de degradação de herbicidas, os isolados bacterianos foram cultivados em LB (item 3.4). Após 24 h, as células foram centrifugadas a 8000 g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células concentradas foram ressuspensas em 10 mL de LB. À amostra, foi adicionado o equivalente a dose recomendada de utilização em campo do herbicida Heat (1x), e as células foram novamente incubadas (item 3.4). Alíquotas de 1 mL foram coletadas do meio de cultura em 0 e 24 h de incubação, e centrifugadas a 12.000 g por 5 min. O sobrenadante foi congelado. As amostras foram filtro-esterilizadas antes de serem injetadas em LC-MS/MS. Os experimentos foram realizados em triplicatas, comparando as amostras de 0 e 24 h, com a finalidade de observar a diminuição da quantidade do herbicida após o tempo de incubação.

### 3.12 ANÁLISE EM LC-MS/MS

As análises de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) foram realizadas com a injeção de 10 µL dos extratos preparados (item 3.11), a uma vazão de 0,2 mL min<sup>-1</sup> no equipamento LC-MS/MS modelo Acquity e Xevo TQD (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA) equipado com bombas binárias, um desgaseificador a vácuo, um amostrador automático SIL-HTc, utilizando uma coluna ACQUITY UPLC® BEH C18 2.1 x 50 mm (1.7 µm 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 de acetonitrila padrão HPLC. O perfil do gradiente foi o seguinte: isocrático durante 1 min, um gradiente linear de 10% a 90% B ao longo de 4 min, seguido por 100% B durante 1 min, com uma taxa de fluxo de 0,2 mL/min<sup>-1</sup>. A coluna será reequilibrada durante 2 min. O experimento de espectrometria de massas (MS) foi conduzido num espectrômetro de massas é o de tração iônica linear triplo quadrupolo 4000 da QTRAP (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA) equipado com uma fonte Turbo-Ion. O instrumento foi operado no modo negativo do ESI

(ionização por electrospray) e os dados foram adquiridos no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM). As condições foram as seguintes: a voltagem capilar fixada em 2,9 kV e a voltagem do cone em 55 V; a temperatura da fonte e a temperatura de dessolvatação mantida a 150 °C e 350 °C, respectivamente; O gás de dessolvatação foi ajustado em um fluxo de 650 L h<sup>-1</sup>; 499.2 (m / z) foi selecionado como íon precursor e seus íons quantitativos e qualitativos foram 348 (m / z) e 328 (m / z), respectivamente; quando as energias de colisão forem 32 V e 41 V, respectivamente. Para análise UPLC, o software Masslynx NT v.4.1 (Waters) foi usado para processar dados. Nas condições descritas, o tempo de retenção de saflufenacil foi de aproximadamente 5,30 min.

### 3.13 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A linhagem *Stenotrophomonas* sp. CMA26 foi cultivada (item 3.4), em 100 mL de meio de cultura, utilizando as condições de pré-inóculo e inóculo (item 3.7). As células foram centrifugadas a 8000 g por 10 min a 4 °C. em 4, 6 e 8 h de incubação, horários definidos pela curva de crescimento bacteriano. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi macerado em nitrogênio líquido e homogeneizado em 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,5 contendo ácido etileno diamino tetra-acético 1 mM (EDTA), ditioneitol 3 mM (DTT) e polivinilpirrolidona 5% (PVPP). Posteriormente, esse material foi centrifugado a 10.000 g por 30 min, e alíquotas do sobrenadante foram armazenadas e congeladas para posterior análise.

A concentração de proteínas totais foi determinada usando o método descrito por Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Os resultados foram expressos como  $\mu\text{mol proteína g}^{-1}$  de peso fresco.

### 3.14 ATIVIDADE DE CAT

A atividade da CAT foi determinada de acordo com Kraus, Mckersie e Fletcher (1995), a 25 °C, em uma solução contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 2,5  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%). A reação foi iniciada com a adição de 25  $\mu\text{L}$  de extrato de proteína (item 3.13), e a atividade foi determinada por meio da decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e monitorada em espectrofotômetro a 240 nm, durante 1 min. Os resultados são expressos em  $\mu\text{mol/min/mg prot.}$

### 3.15 ATIVIDADE DE GST

A atividade de GST foi determinada em espectrofotômetro. Para o ensaio utilizou-se uma solução contendo 900  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), 25  $\mu\text{L}$  de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 40 mM e 50  $\mu\text{L}$  de GSH 0,1 mM e incubados a 30 °C (ZABLOTOWICZ et al., 1995). A reação foi iniciada com a adição de 25  $\mu\text{L}$  de extrato de proteína (item 3.13) e foi monitorada por 2 min. a 340 nm. A atividade foi expressa em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  prot.

### 3.16 ANÁLISES ESTATÍSTICA E MATEMÁTICA

As análises estatísticas foram realizadas pelo Teste de Tukey utilizando o critério de significância  $p < 0,05$ . Os dados de quantificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e MDA e das atividades de CAT e GST foram processados pela Análise de Componentes Principais (PCA). As análises obtidas no software R versão 3.5.1, utilizando os pacotes de dados “ggplot2” e “factorextra”.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 SISTEMAS DE RESPOSTAS ANTIOXIDANTES AO ESTRESSE GERADO POR HEAT EM LINHAGEM BACTERIANA DE SOLO AGRÍCOLA INDEPENDENTE DE PRESSÃO SELETIVA PRÉVIA POR ESSE HERBICIDA

#### ANTIOXIDANT RESPONSE SYSTEMS TO THE STRESS GENERATED BY HEAT IN A BACTERIAL STRAIN OF AGRICULTURAL SOIL INDEPENDENT OF PREVIOUS SELECTIVE PRESSURE BY THIS HERBICIDE

##### RESUMO

Nos sistemas convencionais, a utilização de herbicidas tornou-se indispensável na agricultura para a manutenção da produção. Em contrapartida, essas substâncias causam estresse oxidativo em microrganismos não-alvo, selecionando fenótipos tolerantes. Poucos trabalhos têm investigado se microrganismos podem sobreviver frente à herbicidas sem prévia seleção e ainda não está claro se os mecanismos que envolvem a tolerância realmente precisam ser previamente selecionados. Assim, este trabalho teve o objetivo de avaliar se *Stenotrophomonas* sp. CMA26, uma linhagem tolerante ao Heat sem histórico de prévia exposição para este herbicida, pode apresentar sistemas de resposta para sobreviver em concentrações maiores do que as utilizadas em agricultura. A linhagem CMA26 foi submetida à testes de estresse oxidativo (teste de tolerância, curva de crescimento, quantificação de peróxido e malondialdeído) e avaliação dos sistemas de respostas capacidade de degradação e atividade de enzimas antioxidantes catalase e glutathione S- transferase, frente ao herbicida Heat na concentração equivalente à utilizada em campo, bem como para 10 e 50 vezes essa concentração. Os resultados indicaram que a linhagem CMA26 apresentou uma condição de estresse temporária em períodos iniciais do crescimento, que foi superada por meio da ativação e modulação das atividades das enzimas catalase e glutathione S- transferase. A tolerância à diferentes concentrações de Heat bem como a ausência de degradação do herbicida pela linhagem CMA26 e por outros isolados do mesmo ambiente parecem indicar que a primeira está relacionada à uma resposta enzimática generalizada, independente de prévia seleção e a segunda é possivelmente um processo dependente de seleção. Estes mecanismos possivelmente poderão ser encontrados em outros microrganismos, uma vez que em solo, os agrotóxicos podem estar direcionando a seleção de microrganismos tolerantes, mas não degradadores, impactando na estrutura populacional e na funcionalidade da microbiota. Na redução de degradação, os agrotóxicos podem estar permanecendo no solo como contaminantes ambientais, e chegando à ambientes aquáticos por deriva.

**Palavras-chave:** Metabolismo bacteriano; plasticidade metabólica; evolução bacteriana; agrotóxicos; enzimas antioxidativas.

## ABSTRACT

In conventional systems, the use of herbicides has become essential in agriculture to maintain production. In contrast, these substances causing oxidative stress in non-target microorganisms, tolerant phenotypes. Few studies have investigated whether microorganisms can survive against herbicides without prior selection, and it is still unclear whether the mechanisms that involve tolerance will be selected. Thus, this work evaluated whether *Stenotrophomonas* sp. CMA26, a Heat tolerant strain with no history of prior exposure to this herbicide, may have response systems to support in greater than those used in agriculture. The CMA26 strain was subjected to oxidative stress tests, as tolerance, growth curve, the quantification of peroxide and malondialdehyde. Also was evaluated the response systems, represented by degradation capacity and activity of antioxidant enzymes catalase and glutathione S-transferase, against the herbicide Heat at the concentration equivalent to that used in the field, as well as at 10 and 50 times that concentration. The results indicated that the CMA26 strain has a temporary stress condition in early growth periods, which was overcome by activating and modulating the activities of catalase and glutathione S-transferase enzymes. The tolerance to different levels of heat, as well as the absence of herbicide degradation by the CMA26 lineage and by others granted from the same environment, seems to indicate that the first is related to a generalized enzymatic response, independent of previous selection, and the second is possible a dependent selection process. These combined mechanisms will be found in other microorganisms, since in soil, pesticides may be directing the selection of tolerant microorganisms, but not degrading ones, impacting the population structure and functionality of the microbiota. In reducing degradation, pesticides may be remaining in the soil as environmental contaminants, and reach aquatic environments by drift.

**Keywords:** Bacterial metabolism; metabolic plasticity; bacterial evolution; pesticides; antioxidant enzymes.

### 4.1.1 Introdução

Para manter o rendimento das culturas e sustentar o crescimento populacional, a agricultura depende fortemente da utilização de agrotóxicos, como herbicidas, para o controle de pragas (THIOUR-MAUPRIVEZ et al., 2019). Porém, o uso indiscriminado de herbicidas atrelado à demanda da produção agrícola, promoveu impactos na saúde e no meio ambiente, principalmente por atingir espécies não-alvo, além de selecionar plantas daninhas resistentes (BARZMAN et al., 2015; THIOUR-MAUPRIVEZ et al., 2019).

Devido à resistência ao glifosato, o herbicida Heat, contendo a molécula ativa saflufenacil, é utilizado como alternativa para o controle de plantas daninhas em lavouras (BARCELLOS JÚNIOR et al., 2020). O modo de ação desse herbicida se dá por meio da inibição da protoporfirinogênio oxidase (Protox) (KAUR, 2019). Entretanto, a Protox não é uma enzima exclusiva de plantas daninhas, e está presente em diversos procariontes, como em

bactérias pertencentes ao filo *Firmicutes*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, e em algumas cianobactérias (THIOUR-MAUPRIVEZ et al., 2019). Além disso, a molécula de saflufenacil apresenta os elementos químicos flúor e cloro, pertencentes ao grupo dos halogênios, que conferem ao herbicida alta atividade oxidante devido à eletronegatividade do grupo (ROVIDA et al., 2021). Tendo em vista esses fatores, sugere-se que o herbicida Heat apresente um elevado potencial de impacto em microrganismos não-alvo.

Um dos impactos que herbicidas promovem sobre microrganismos é o desequilíbrio entre a produção e eliminação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), condição chamada estresse oxidativo, que resulta em distúrbios metabólicos celulares (LIGUORI et al., 2018; IMLAY, 2019). Em *E. coli* DH5- $\alpha$ , por exemplo, o herbicida mesotrione promoveu estresse oxidativo e diminuiu as taxas de crescimento da população (OLCHANHESKI et al., 2014). O mesmo herbicida também induziu aumentos significativos na produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em *Pantoea ananatis* (PRIONE et al., 2016). Alterações fenotípicas na superfície celular e em vias metabólicas vitais de *E. coli* BL21 ocorreram devido ao estresse oxidativo provocado por 2,4-D (BHAT et al., 2015).

Para eliminar ou minimizar os danos que as ERO possam causar, os microrganismos possuem um sistema antioxidante, com respostas não enzimáticas e enzimáticas (HASANUZZAMAN et al., 2017). As principais enzimas deste sistema atuam de maneira integrada, como a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do superóxido ( $O_2^-$ ) em  $H_2O_2$  e oxigênio ( $O_2$ ), e a catalase (CAT), que decompõe o  $H_2O_2$  em água ( $H_2O$ ) e  $O_2$  (KAUR, 2019). Já a glutathione S-transferase (GST), atuante na desintoxicação de xenobióticos utilizando glutathione (GSH) para formar conjugados, também pode auxiliar na manutenção da estabilidade redox celular (ALLOCATI et al., 2003).

Em solo agrícola, ecossistema que exibe forte pressão seletiva principalmente devido ao uso intensivo de agrotóxicos, microrganismos com fenótipos resistentes ou tolerantes são selecionados, e os que não os apresentam desaparecem (BRAUNER et al., 2016; RAMAKRISHNAN et al., 2019). Desse modo, a pressão seletiva prévia tem papel relevante na adaptação bacteriana (POLST et al., 2018a), como os fenótipos de degradação de herbicidas, frequentemente relatados em microrganismos com histórico de seleção prévia para o agente xenobiótico (RIAÑO et al., 2020).

Contudo, alguns trabalhos demonstraram que mesmo sem pressão seletiva pré-existente, microrganismos podem sobreviver frente à agrotóxicos. Isso pode ocorrer por meio de respostas gerais ao estresse caracterizadas pela capacidade da célula de defender-se não apenas do estresse indutor específico, mas também de outros fatores aparentemente não relacionados

(GOTTESMAN, 2019). Como mecanismos adaptativos que conferem respostas gerais para sobrevivência frente à xenobióticos tem-se: formação de biofilmes; bombas de efluxo; aumento da expressão gênica e do número de cópias de genes essenciais para tolerar o estresse; e transferência horizontal de genes (JONES; LOZADA; PFLEGER, 2015; RANGASAMY et al., 2018). Outro sistema que confere respostas gerais, independente de pressão seletiva pré-existente contra o estresse por xenobióticos é o sistema antioxidante. *E. coli* K-12, uma linhagem não ambiental e não previamente exposta a qualquer agrotóxico, apresentou plasticidade fenotípica frente ao Gramoxone, com a produção de diferentes isoformas de enzimas antioxidantes (GRAVINA et al., 2017). *Pseudomonas* sp. isolada de tanques de lavagem de embalagens de diversos agrotóxicos, apresentou tolerância e um sistema de modulação da atividade de enzimas antioxidantes frente à altas concentrações do herbicida Boral, ausente no local de coleta (ROVIDA et al., 2021).

Desse modo, microrganismos podem dispor de estratégias adaptativas para superar o estresse em locais com pressão seletiva, como em solo agrícola. Mas ainda não está claro se esses mecanismos precisam ser previamente selecionados. Desse modo, este trabalho se propõe a investigar se *Stenotrophomonas* sp. CMA26, uma linhagem tolerante ao Heat e sem histórico de exposição prévia para este herbicida, pode apresentar sistemas de resposta para sobreviver em concentrações maiores do que as utilizadas em agricultura.

#### 4.1.2 Material e Métodos

##### 4.1.2.1 Coleta de microrganismos

A coleta de microrganismos foi realizada em quatro áreas agrícolas (M7, M8, M9 e M10) na cidade de Palotina, Paraná, Brasil, utilizando quatro transeptos paralelos (R1, R2, R3 e R4) (Tabela 1). Os microrganismos foram coletados, isolados e cedidos pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Grange, da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Local de coleta de microrganismos

Tabela 1 - Pontos de coleta das amostras por transepto, obtidas por Global Positioning System (GPS).

<b>Área</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>
<b>M7</b>	S 24° 12' 52,6''	S 24° 12' 54,1''	S 24° 12' 53,9''	S 24° 12' 54,9''
	W 053° 54' 05,2	W 053° 54' 04,6	W 053° 54' 02,3	W 053° 54' 03,9
<b>M8</b>	S 24° 12' 46,1''	S 24° 12' 44,2''	S 24° 12' 44,5''	S 24° 12' 42,8''
	W 053° 53' 59,3	W 053° 53' 59,7	W 053° 54' 00,8	W 053° 54' 01,4
<b>M9</b>	S 24° 17' 14,3''	S 24° 17' 13,3''	S 24° 17' 12,9''	S 24° 17' 14,1''
	W 053° 52' 30,6	W 053° 52' 30,5	W 053° 52' 29,1	W 053° 52' 28,3
<b>M10</b>	S 24° 17' 18,1''	S 24° 17' 18,5''	S 24° 17' 17,6''	S 24° 17' 16,9''
	W 053° 53' 48,4	W 053° 53' 49,4	W 053° 53' 49,9	W 053° 53' 48,1

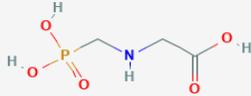
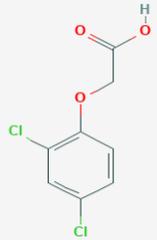
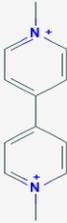
Fonte: NEIVERTH (2012).

As áreas agrícolas são de cultivo de soja e milho. Os agrotóxicos utilizados nas áreas de coleta e suas características químicas são mostrados no Quadro 1. O herbicida Heat não foi utilizado nos locais de coleta.

Agrotóxicos utilizados na área de coleta de microrganismos de solo agrícola

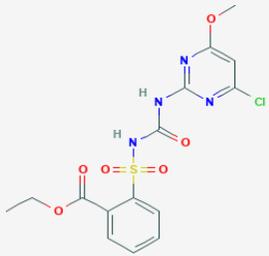
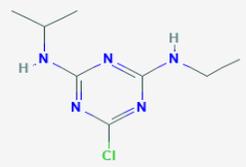
Quadro 1 - Agrotóxicos Utilizados na Área de Coleta. São apresentadas as marcas comerciais de herbicidas, fungicidas e inseticidas e suas respectivas moléculas ativas, modos de ação, famílias químicas e classificação das famílias químicas conforme o Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC), Fungicidas (FRAC) e Inseticidas (IRAC), além do tipo de cultura em que foram utilizados.

(continua)

Herbicidas						
Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Roundup Transorb R	Glifosato		Inibidor de EPSPS	Glicina substituída	G	Soja e milho
Aminol 806	2,4-D		Mimetizador de auxinas	Fenoxiácidos	O	Soja e milho
Gramoxone 200	Paraquat		Inibidor de fotossíntese no fotossistema I	Piridínios	D	Soja

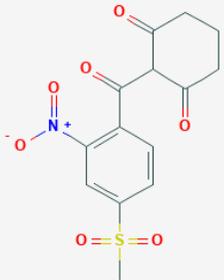
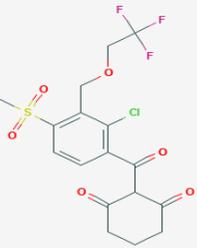
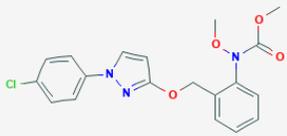
Quadro 1 - Agrotóxicos Utilizados na Área de Coleta. São apresentadas as marcas comerciais de herbicidas, fungicidas e inseticidas e suas respectivas moléculas ativas, modos de ação, famílias químicas e classificação das famílias químicas conforme o Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC), Fungicidas (FRAC) e Inseticidas (IRAC), além do tipo de cultura em que foram utilizados.

(continuação)

Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Clorimuron Nortox	Clorimuron etílico		Inibidor de ALS	Sulfonilureia	B	Soja
Accent	Nicossulfuron					Milho
Primóleo	Atrazina		Inibidor de fotossíntese no fotossistema II	Triazinas	C1	Milho

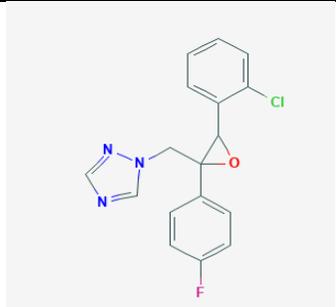
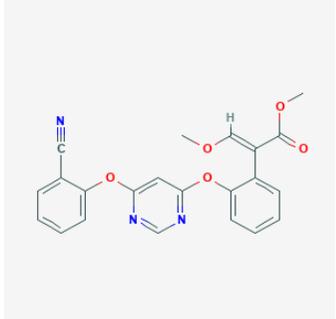
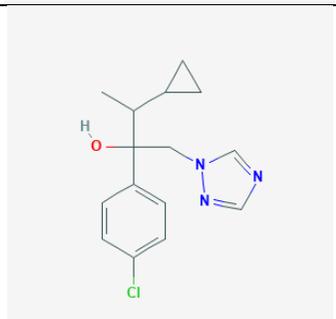
Quadro 1 - Agrotóxicos Utilizados na Área de Coleta. São apresentadas as marcas comerciais de herbicidas, fungicidas e inseticidas e suas respectivas moléculas ativas, modos de ação, famílias químicas e classificação das famílias químicas conforme o Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC), Fungicidas (FRAC) e Inseticidas (IRAC), além do tipo de cultura em que foram utilizados.

(continuação)

Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Callisto	Mesotrione		Inibidor de HPPD	Tricetonas	F2	Milho
Soberan	Tembotrione					
<b>Fungicidas</b>						
Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Ópera	Piraclostrobina		Inibidor do citocromo bc1	Carbamatos	C3	Soja e milho

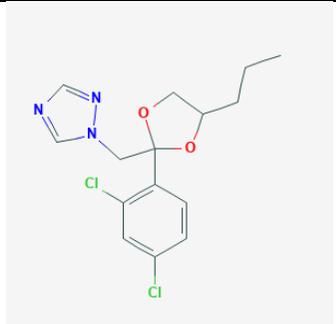
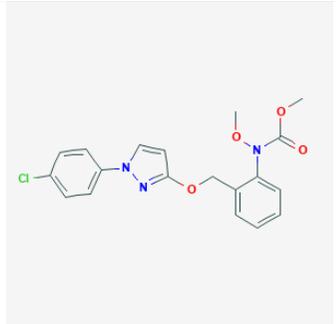
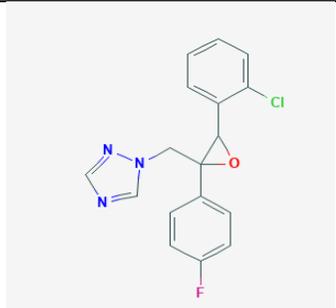
Quadro 1 - Agrotóxicos Utilizados na Área de Coleta. São apresentadas as marcas comerciais de herbicidas, fungicidas e inseticidas e suas respectivas moléculas ativas, modos de ação, famílias químicas e classificação das famílias químicas conforme o Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC), Fungicidas (FRAC) e Inseticidas (IRAC), além do tipo de cultura em que foram utilizados.

(continuação)

Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Ópera	Epoxiconazol		Inibidor da CYP51	Triazol	G1	Soja e milho
Priori Xtra	Azoxistrobina		Inibidor do citocromo bc1	Acrilatos	C3	Soja
	Ciproconazol		Inibidor da CYP51	Triazol	G1	

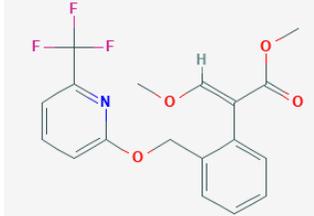
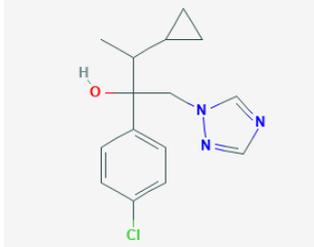
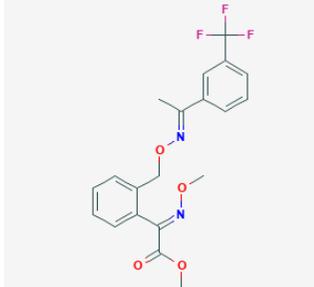
Quadro 1 - Agrotóxicos Utilizados na Área de Coleta. São apresentadas as marcas comerciais de herbicidas, fungicidas e inseticidas e suas respectivas moléculas ativas, modos de ação, famílias químicas e classificação das famílias químicas conforme o Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC), Fungicidas (FRAC) e Inseticidas (IRAC), além do tipo de cultura em que foram utilizados.

(continuação)

Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Tilt	Propiconazol		Inibidor da CYP51	Triazol	G1	Milho
Abacus	Piraclostrobina		Inibidor do citocromo bc1	Carbamatos	C3	Milho
	Epoxiconazol		Inibidor da CYP51	Triazol	G1	

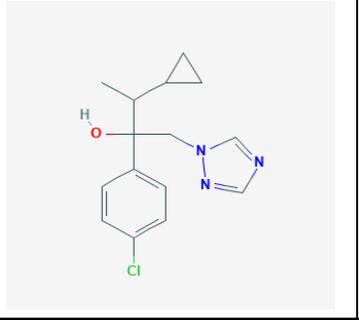
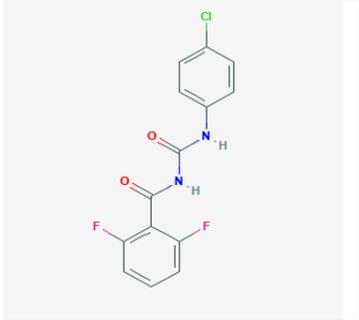
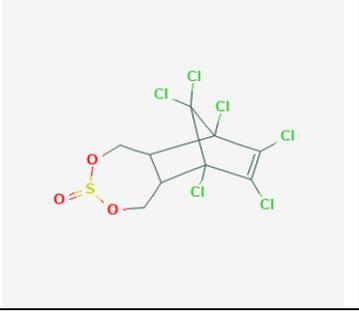
Quadro 1 - Agrotóxicos Utilizados na Área de Coleta. São apresentadas as marcas comerciais de herbicidas, fungicidas e inseticidas e suas respectivas moléculas ativas, modos de ação, famílias químicas e classificação das famílias químicas conforme o Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC), Fungicidas (FRAC) e Inseticidas (IRAC), além do tipo de cultura em que foram utilizados.

(continuação)

Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Aprouch Prima	Picoxistrobina		Inibidor do citocromo bc1	Acrilatos	C3	Milho
	Ciproconazol		Inibidor da CYP51	Triazol	G1	
Sphere Max	Trifloxistrobina		Inibidor do citocromo bc1	Oxamino-acetatos	C3	Milho

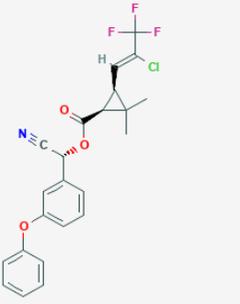
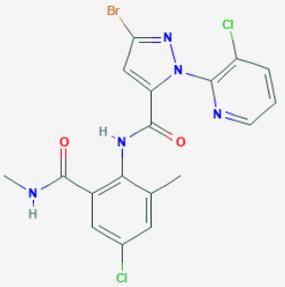
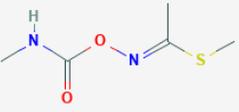
Quadro 1 - Agrotóxicos Utilizados na Área de Coleta. São apresentadas as marcas comerciais de herbicidas, fungicidas e inseticidas e suas respectivas moléculas ativas, modos de ação, famílias químicas e classificação das famílias químicas conforme o Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC), Fungicidas (FRAC) e Inseticidas (IRAC), além do tipo de cultura em que foram utilizados.

(continuação)

Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Sphere Max	Ciproconazol		Inibidor da CYP51	Triazol	G1	Milho
Inseticidas						
Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação IRAC	Cultura
Dimilin	Diflubenzurom		Inibidor de CHS1	Benzoilureias	15	Soja
Thiodan CE	Endosulfan		Bloqueadores de canais de cloreto controlados por GABA	Ciclodienoclorados	2A	Soja

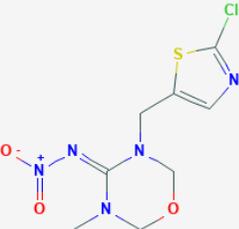
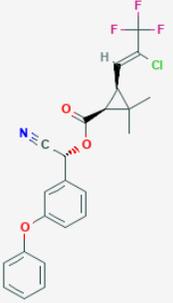
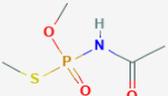
Quadro 1 - Agrotóxicos Utilizados na Área de Coleta. São apresentadas as marcas comerciais de herbicidas, fungicidas e inseticidas e suas respectivas moléculas ativas, modos de ação, famílias químicas e classificação das famílias químicas conforme o Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC), Fungicidas (FRAC) e Inseticidas (IRAC), além do tipo de cultura em que foram utilizados.

(continuação)

Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Ampligo	Lambda-cialotrina		Modulador de canal de sódio	Piretrinas	3A	Soja e milho
	Clorantraniliprole		Modulador de receptor de rianodina	Diamidas	28	
Lannate BR	Metomil		Inibidor de AChE	Carbamatos	1A	Soja

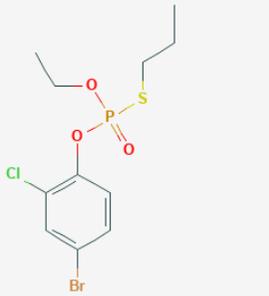
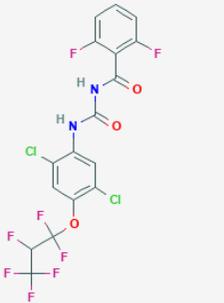
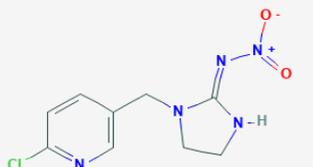
Quadro 1 - Agrotóxicos Utilizados na Área de Coleta. São apresentadas as marcas comerciais de herbicidas, fungicidas e inseticidas e suas respectivas moléculas ativas, modos de ação, famílias químicas e classificação das famílias químicas conforme o Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC), Fungicidas (FRAC) e Inseticidas (IRAC), além do tipo de cultura em que foram utilizados.

(continuação)

Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Engeo pleno S	Tiametoxam		Modulador de nAChR	Neonicotinoides	4A	Milho
	Lambda-cialotrina		Modulador de canal de sódio	Piretrinas	3A	
Acefato nortox	Acefato		Inibidor de AChE	Organofosforados	1B	Milho

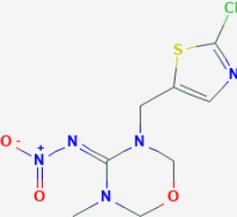
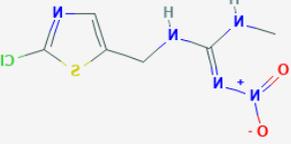
Quadro 1 - Agrotóxicos Utilizados na Área de Coleta. São apresentadas as marcas comerciais de herbicidas, fungicidas e inseticidas e suas respectivas moléculas ativas, modos de ação, famílias químicas e classificação das famílias químicas conforme o Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC), Fungicidas (FRAC) e Inseticidas (IRAC), além do tipo de cultura em que foram utilizados.

(continuação)

Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Curyom 550 EC	Profenofós		Inibidor de AChE	Organofosforados	1B	Milho
	Lufenuron		Inibidor de CHS1	Benzoilureias	15	
Cropstar	Imidacloprido		Modulador de nAChR	Neonicotinoides	4A	Milho

Quadro 1 - Agrotóxicos Utilizados na Área de Coleta. São apresentadas as marcas comerciais de herbicidas, fungicidas e inseticidas e suas respectivas moléculas ativas, modos de ação, famílias químicas e classificação das famílias químicas conforme o Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC), Fungicidas (FRAC) e Inseticidas (IRAC), além do tipo de cultura em que foram utilizados.

(conclusão)

Marca comercial	Molécula ativa	Estrutura química	Modo de ação	Família química	Classificação HRAC	Cultura
Cropstar	Tiodicarbe		Inibidor de AChE	Carbamatos	1A	Milho
Cruiser 350 FS	Tiametoxam		Modulador de nAChR	Neonicotinoides	4A	Milho
Poncho	Clotianidina		Modulador de nAChR	Neonicotinoides	4A	Milho

Fonte: Os autores.

#### 4.1.2.2 Linhagem bacteriana

Os microrganismos isolados (item 4.1.2.1) foram adicionados à Coleção de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Os isolados foram mantidos em estoque de glicerol a -80 °C. Para o desenvolvimento deste trabalho, utilizou-se a linhagem *Stenotrophomonas* sp. CMA26 dessa coleção.

#### 4.1.2.3 Produtos químicos

Utilizou-se o herbicida Heat (BASF – Ludwigshafen, Rhein, Alemanha) contendo 700 g/L (70% m/v) da molécula ativa saflufenacil (N'-(2-cloro-4-fluor-5-[1,2,3,6-tetrahidro-3-metil-2,6-dioxo-4-(trifluorometil)pirimidin-1-il]benzoil)-N-isopropil-N-metilsulfamida) (Fig. 1) (HEAT, 2017).

Estrutura química do saflufenacil

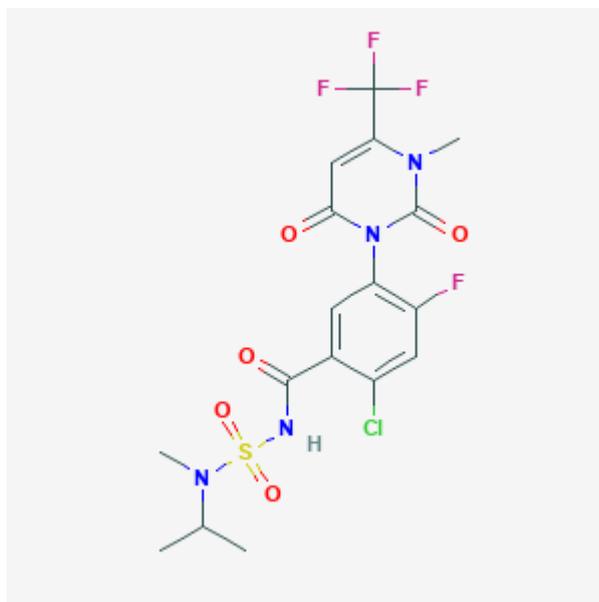


Figura 1 - Estrutura química do saflufenacil, molécula ativa do herbicida comercial Heat. Fonte: PubChem

O saflufenacil pertence à família química N-fenil-imidas e é classificado pelo Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC) com o modo de ação na categoria E, correspondente a inibição da Protox (HRAC, 2020). A dose recomendada de Heat para sua utilização em campo equivale à concentração de 0,49 mMol de saflufenacil (1x).

#### 4.1.2.4 Condições de crescimento

Para o cultivo bacteriano foi utilizado o meio de cultura Caldo Luria Bertani (LB: 10 g/L triptona; 10 g/L NaCl; 5 g/L extrato de levedura, pH 7,0 ± 0,2). Os tratamentos estabelecidos com diferentes concentrações de Heat foram: controle, constituído por LB sem herbicida (C); LB + 0,49 mMol de saflufenacil (1x); LB + 4,9 mMol de saflufenacil (10x); LB + 24,5 mMol de saflufenacil (50x). Temperatura e agitação foram padronizadas em 30 °C e 200 rpm, respectivamente, em agitador orbital de mesa. Os ensaios sempre foram realizados em triplicatas.

#### 4.1.2.5 Teste de tolerância à Heat

Para avaliação da tolerância ao herbicida Heat, foram utilizados 35 isolados bacterianos de solo agrícola da cidade de Palotina, PR. Os isolados foram inoculados em placas de 96 poços nas mesmas condições descritas no item 4.1.2.4. Em cada poço foram utilizados 100 µL de meio de cultura. O crescimento foi avaliado por densidade óptica (DO) em leitor de microplacas a 600 nm.

#### 4.1.2.6 Identificação molecular por sequenciamento do gene ribossomal 16S

A linhagem foi cultivada em LB, por 24 h e incubada nas condições descritas no item 4.1.2.4. Posteriormente, 200 µL do cultivado foram coletados e submetidos à identificação molecular por sequenciamento do gene 16S rRNA. O DNA total foi extraído usando o kit ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System - Promega (Madison, WI, EUA). Foram utilizados os *primers* fD1(5'- CCGAATTTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1(5'- CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3') para a amplificação do gene ribossomal 16S. A reação de amplificação (PCR) consistiu em um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 5 min; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 s, anelamento a 55 °C por 45 s e extensão a 72 °C por 2 min; e um ciclo final de extensão por 10 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram purificados, utilizando Qiagen (Hilden, Ger), QIAquick PCR kit (nº 28104). Após purificação dos produtos de PCR e análise de integridade de bandas por meio de eletroforese, o material obtido foi enviado para sequenciamento na Ludwig Biotec (Alvorada,

Brasil). As sequências foram analisadas usando-se os recursos do sítio “*Ribosomal Database Project*”.

#### 4.1.2.7 Curva de crescimento bacteriano

Para a obtenção da curva de crescimento, a linhagem foi incubada (item 4.1.2.4), em 100 mL de meio de cultura, até apresentar uma DO de aproximadamente 2,0 a 600 nm, em espectrofotômetro (pré-inóculo). O inóculo foi transferido para as culturas de controle e tratamento, a uma DO inicial de 0,05 a 600 nm e incubado conforme já descrito. O crescimento da cultura foi monitorado a cada hora, em espectrofotômetro, até o início da fase estacionária. Para uma maior precisão na quantificação do crescimento bacteriano, diluições com meio de cultura LB foram realizadas sempre que a DO era superior à 1,0.

#### 4.1.2.8 Extração de amostras para avaliação de estresse oxidativo

A linhagem foi cultivada (item 4.1.2.4), em 100 mL de meio de cultura, e as células foram centrifugadas a 8.000 g por 10 min a 4 °C em 4, 6 e 8 h de incubação. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi macerado em nitrogênio líquido. Alíquotas de 100 mg do precipitado foram armazenadas e congeladas a -80 °C até a análise.

#### 4.1.2.9 Quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Para a quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as amostras extraídas (item 4.1.2.8) foram homogeneizadas com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% e centrifugadas a 10.000 g por 15 min a 4 °C. Posteriormente, 0,2 mL do sobrenadante foram coletados e transferidos para um tubo contendo 0,2 mL de uma solução 100 mM de tampão fosfato (14,52 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,26 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 7,5 e 0,8 mL de solução 1M de iodeto de potássio (KI). A amostra foi acondicionada no escuro e em gelo por 1 h. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 390 nm. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$  de peso fresco.

#### 4.1.2.10 Quantificação de MDA

Para a quantificação de MDA, as amostras extraídas (item 4.1.2.8) foram homogeneizadas com 1 mL de ácido tricloroacético 0,1% e centrifugada a 10.000 g por 5 min. Uma alíquota de 0,25 mL do sobrenadante foi coletada e transferida para um tubo contendo 1 mL de uma solução de TCA 20% + ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,5%. A mistura foi incubada em banho-maria a 97 °C, por 30 min, e resfriada em gelo por 10 min. Posteriormente a amostra foi centrifugada a 10.000 g por 10 min, e o sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro à 535 e 600 nm, respectivamente. A quantidade de MDA foi expressa em mmol/mg de massa fresca.

#### 4.1.2.11 Capacidade de degradação de isolados bacterianos

Para determinação da capacidade de degradação de herbicidas, os isolados bacterianos foram cultivados em LB (item 4.1.2.4). Após 24 h, as células foram centrifugadas a 8000 g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células concentradas foram ressuspensas em 10 mL de LB. À amostra, foi adicionado o equivalente a dose recomendada de utilização em campo do herbicida Heat (1x), e as células foram novamente incubadas (item 4.1.2.4). Alíquotas de 1 mL foram coletadas do meio de cultura em 0 e 24 h de incubação, e centrifugadas a 12.000 g por 5 min. O sobrenadante foi congelado. As amostras foram filtro-esterilizadas antes de serem injetadas em LC-MS/MS. Os experimentos foram realizados em triplicatas, comparando as amostras de 0 e 24 h, com a finalidade de observar a diminuição da quantidade do herbicida após o tempo de incubação.

#### 4.1.2.12 Análise em LC-MS/MS

As análises de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) foram realizadas com a injeção de 10 µL dos extratos preparados (item 4.1.2.11), a uma vazão de 0,2 mL min<sup>-1</sup> no equipamento LC-MS/MS modelo Acquity e Xevo TQD (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA) equipado com bombas binárias, um desgaseificador a vácuo, um amostrador automático SIL-HTc, utilizando uma coluna ACQUITY UPLC® BEH C18 2.1 x 50 mm (1.7 µm 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 de acetonitrila padrão HPLC. O perfil do gradiente foi o seguinte: isocrático durante 1 min, um

gradiente linear de 10% a 90% B ao longo de 4 min, seguido por 100% B durante 1 min, com uma taxa de fluxo de 0,2 mL/min<sup>-1</sup>. A coluna será reequilibrada durante 2 min. O experimento de espectrometria de massas (MS) foi conduzido num espectrômetro de massas é o de tração iônica linear triplo quadrupolo 4000 da QTRAP (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA) equipado com uma fonte Turbo-Ion. O instrumento foi operado no modo negativo do ESI (ionização por electrospray) e os dados foram adquiridos no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM). As condições foram as seguintes: a voltagem capilar fixada em 2,9 kV e a voltagem do cone em 55 V; a temperatura da fonte e a temperatura de dessolvatação mantida a 150 °C e 350 °C, respectivamente; O gás de dessolvatação foi ajustado em um fluxo de 650 L h<sup>-1</sup>; 499.2 (m / z) foi selecionado como íon precursor e seus íons quantitativos e qualitativos foram 348 (m / z) e 328 (m / z), respectivamente; quando as energias de colisão forem 32 V e 41 V, respectivamente. Para análise UPLC, o software Masslynx NT v.4.1 (Waters) foi usado para processar dados. Nas condições descritas, o tempo de retenção de saflufenacil foi de aproximadamente 5,30 min.

#### 4.1.2.13 Extração e quantificação de proteínas

A linhagem *Stenotrophomonas* sp. CMA26 foi cultivada (item 4.1.2.4), em 100 mL de meio de cultura, utilizando as condições de pré-inóculo e inóculo (item 4.1.2.7). As células foram centrifugadas a 8000 g por 10 min a 4 °C. em 4, 6 e 8 h de incubação, horários definidos pela curva de crescimento bacteriano. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi macerado em nitrogênio líquido e homogeneizado em 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,5 contendo ácido etileno diamino tetra-acético 1 mM (EDTA), ditioneitol 3 mM (DTT) e polivinilpirrolidona 5% (PVPP). Posteriormente, esse material foi centrifugado a 10.000 g por 30 min, e alíquotas do sobrenadante foram armazenadas e congeladas para posterior análise.

A concentração de proteínas totais foi determinada usando o método descrito por Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Os resultados foram expressos como  $\mu\text{mol}$  proteína g<sup>-1</sup> de peso fresco.

#### 4.1.2.14 Atividade de CAT

A atividade da CAT foi determinada de acordo com Kraus, Mckersie e Fletcher (1995), a 25 °C, em uma solução contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 2,5  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%). A reação foi iniciada com a adição de 25  $\mu\text{L}$  de extrato de proteína (item

4.1.2.13), e a atividade foi determinada por meio da decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e monitorada em espectrofotômetro a 240 nm, durante 1 min. Os resultados são expressos em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot.}$

#### 4.1.2.15 Atividade de GST

A atividade de GST foi determinada em espectrofotômetro. Para o ensaio utilizou-se uma solução contendo 900  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), 25  $\mu\text{L}$  de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 40 mM e 50  $\mu\text{L}$  de GSH 0,1 mM e incubados a 30 °C (ZABLOTOWICZ et al., 1995). A reação foi iniciada com a adição de 25  $\mu\text{L}$  de extrato de proteína (item 4.1.2.13) e foi monitorada por 2 min. a 340 nm. A atividade foi expressa em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot.}$

#### 4.1.2.16 Análises estatística e matemática

As análises estatísticas foram realizadas pelo Teste de Tukey utilizando o critério de significância  $p < 0,05$ . Os dados de quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA e das atividades de CAT e GST foram processados pela Análise de Componentes Principais (PCA). As análises obtidas no software R versão 3.5.1, utilizando os pacotes de dados “ggplot2” e “factorextra”.

### 4.1.3 Resultados e Discussão

#### 4.1.3.1 Teste de tolerância à Heat

Os 35 isolados bacterianos testados foram considerados tolerantes à diferentes concentrações do herbicida Heat. Diante disso, uma linhagem foi selecionada para o desenvolvimento deste trabalho devido a características interessantes do crescimento.

#### 4.1.3.2 Identificação molecular por sequenciamento do gene ribossomal 16S

A linhagem cujas características de crescimento foram destacadas (seção 4.1.3.1) foi identificada como pertencente ao gênero *Stenotrophomonas*, linhagem CMA26.

#### 4.1.3.3 Curva de crescimento bacteriano

A cinética de crescimento de *Stenotrophomonas* sp. CMA26, em controle e nos tratamentos com o herbicida Heat, está demonstrada na Fig. 2. Destaca-se o tratamento 50x, no período de 2 a 6 h, que representa o início até o meio da fase de crescimento logarítmico (fase log), no qual o microrganismo apresentou crescimento significativamente menor que o controle (Apêndice A). Desse modo, concentrações elevadas de Heat provavelmente são mais tóxicas nessas fases iniciais do crescimento logarítmico. Diferentes artigos têm demonstrado o potencial tóxico de herbicidas, como o glifosato por exemplo, que pode reduzir o crescimento das bactérias *Rhizobium* sp., *Burkholderia* sp. e *Pseudomonas* sp., isoladas de rizosfera de soja e de pastagens (VAN BRUGGEN et al., 2018). Em solo agrícola, o herbicida trifluralina diminuiu a diversidade de microrganismos fixadores de nitrogênio e oxidantes de amônia (DU et al., 2018b).

Curva de crescimento

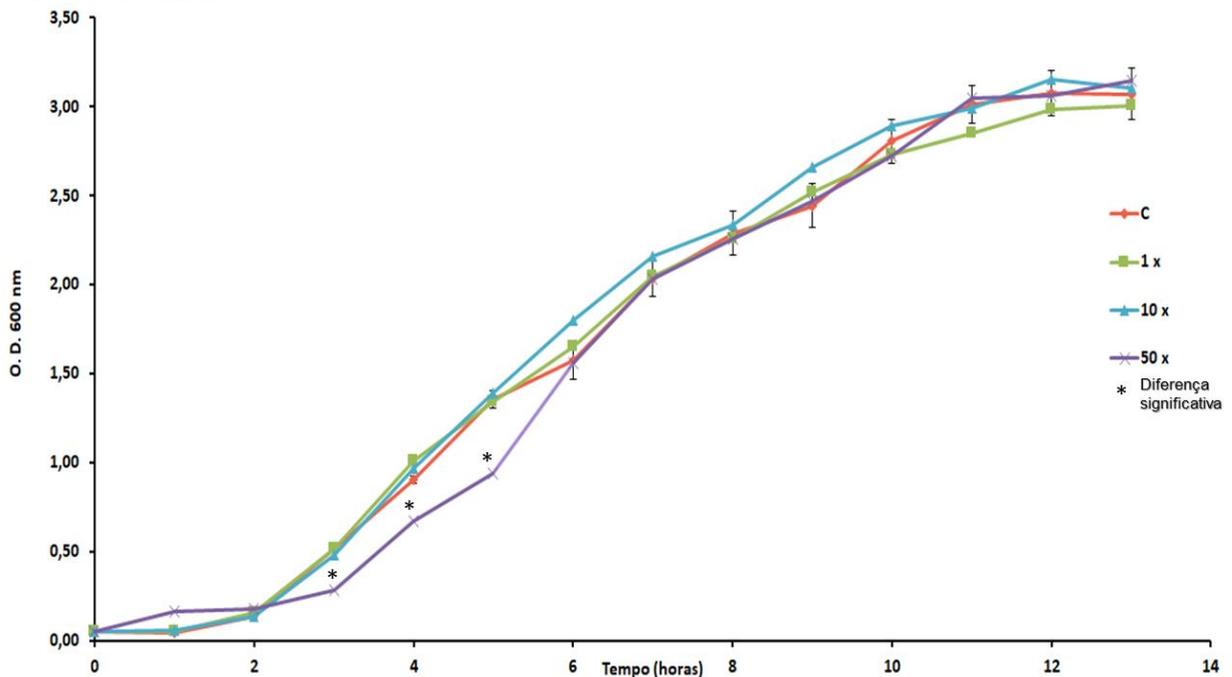


Figura 2 - Curva de crescimento de *Stenotrophomonas* sp. CMA26 nos tratamentos C, 1x, 10x e 50x. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Apesar da inibição do crescimento de *Stenotrophomonas* sp. CMA26 na concentração 50x, após o período de 6h o crescimento tornou-se estatisticamente semelhante (Apêndice A), podendo indicar a ativação de um sistema de respostas adaptativas. Comportamento semelhante foi observado em bactérias isoladas de tanques de degradação de herbicidas frente ao glifosato e paraquat devido a adaptação aos herbicidas (MAZHARI; FERGUSON, 2018).

Microrganismos podem apresentar alterações celulares para adaptar-se a variações nas condições de cultura que ocorrem durante os diferentes períodos de crescimento. *E. coli*, por exemplo, apresentou mudanças na composição de lipídeos de membrana em diferentes fases de crescimento celular (KHAKBAZ; KLAUDA, 2015).

A fim de identificar possíveis mecanismos de adaptação da linhagem *Stenotrophomonas* sp. CMA26 ao Heat durante as fases que correspondem a períodos de aparente estresse e recuperação, foram obtidos dados sobre indicadores de estresse e sistemas de respostas nos tempos de 4 h, 6 h e 8 h, caracterizados como fases inicial, inicial-mediana e mediana, respectivamente.

A cinética geral do crescimento de *Stenotrophomonas* sp. CMA26 foi considerada como de uma bactéria tolerante ao Heat, mesmo sem prévia exposição a este herbicida no ambiente de isolamento. A literatura, contudo, se atém quase exclusivamente a adaptação bacteriana direcionada pela prévia exposição a herbicidas, pois a exposição a substâncias tóxicas exerce pressão seletiva sobre espécies sensíveis, que desaparecem, e as tolerantes dominam a comunidade (POLST et al., 2018a). Exemplos disso são os microrganismos pertencentes aos filos *Firmicutes* e *Actinobacteria*, tolerantes ao herbicida nicosulfuron que aumentaram em diversidade e abundância em solo exposto à este herbicida (PETRIC et al., 2016). Outro estudo identificou duas linhagens de *Actinobacteria* tolerantes ao herbicida Granstar, isoladas de solos tratados com esse herbicida (RACHEDI et al., 2018). Além desses dados, microrganismos tolerantes ao glifosato foram mais encontrados em solos contendo esse agrotóxico (RAINIO et al., 2021).

#### 4.1.3.4 Níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em resposta à Heat

Os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observados em *Stenotrophomonas* sp. CMA26 são mostrados na Fig. 3. Na fase inicial de crescimento, os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tratamentos contendo Heat não diferem significativamente do controle (Apêndice B), mas há uma tendência de aumento nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em relação à controle, de acordo com o aumento da dose de herbicida. A partir da fase inicial-mediana, observa-se dois padrões de respostas semelhantes nos tratamentos: para controle e 1x e para 10 e 50x. Na fase inicial-mediana, há uma diminuição significativa dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em controle e 1x, enquanto nos tratamentos de 10 e 50x os níveis se mantêm elevados. Em seguida, na fase mediana, os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em controle e 1x aumentam e nos tratamentos de 10 e 50x, diminuem significativamente.

Níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

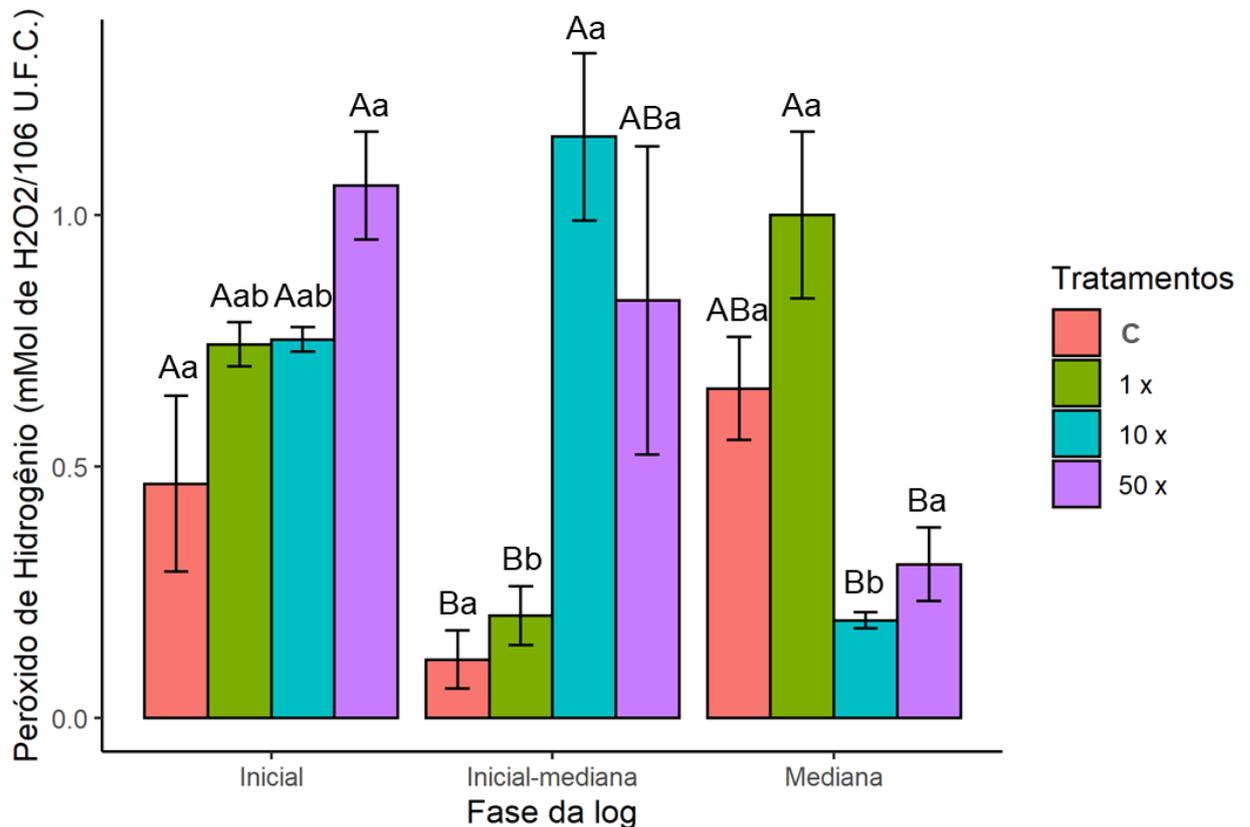


Figura 3 - Níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *Stenotrophomonas* sp. CMA26 nos tratamentos C, 1x, 10x e 50x nas fases inicial, inicial-mediana e mediana da log. Letras maiúsculas comparam estatisticamente diferentes tratamentos da mesma fase de crescimento; letras minúsculas comparam estatisticamente os mesmos tratamentos em diferentes fases de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Tukey (p < 0,05).

Os níveis elevados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para os tratamentos de 10 e 50x na fase inicial-mediana e a diminuição significativa na fase mediana podem explicar a inibição do crescimento no tratamento 50x, em curva de crescimento, e sua recuperação nos períodos seguintes, que correspondem, respectivamente, às fases inicial-mediana e mediana (Fig. 2). Apesar da ausência de alterações significativas no crescimento da linhagem no tratamento de 10x (Fig. 2), esta parece já constituir uma dose tóxica para o microrganismo. Desse modo, a exposição a doses elevadas de Heat parece aumentar a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *Stenotrophomonas* sp. CMA26 e promover impactos pontuais no crescimento celular.

Diversos fatores podem elevar os níveis de ERO em células expostas à agrotóxicos, como: subprodutos de vias de desintoxicação, alterações em cadeias de transporte de elétrons, ou até mesmo a inibição de antioxidantes enzimáticos ou não (LUSHCHAK et al., 2018). Além disso, a elevação dos níveis de ERO pode impactar temporariamente o crescimento celular. Em *E. coli* exposta à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por exemplo, há uma interrupção no crescimento celular, em períodos

iniciais, devido à desaceleração do alongamento translacional que inibiu a síntese de proteínas de defesa oxidativa. Posteriormente, as taxas de alongamento e crescimento se recuperaram (ZHU; DAI, 2019).

As respostas de aumento dos níveis de  $H_2O_2$  para controle e 1x na fase mediana parecem ser reflexo do crescimento pleno da bactéria na fase log, já que o  $H_2O_2$  é um produto do metabolismo normal de bactérias aeróbias, como as do gênero *Stenotrophomonas* (LI et al., 2020). Apesar disso, o microrganismo parece apresentar um sistema de controle de ERO equilibrado, devido à tolerância constatada em curva de crescimento.

#### 4.1.3.5 Peroxidação lipídica em resposta ao Heat

O MDA é um dos principais biomarcadores de peroxidação de lipídeos da categoria poli-insaturada por ERO, e desse modo é um indicador de estresse oxidativo (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014; KHYADE; PHULE; MURAD, 2019). Os níveis de MDA observados em *Stenotrophomonas* sp. CMA26 são apresentados na Fig. 4. Na fase inicial, há um aumento significativo (Apêndice C) nos níveis de MDA, em relação à controle, de acordo com o aumento da dose de herbicida. Esses dados correlacionam-se diretamente com os níveis de  $H_2O_2$ , que apresentam o mesmo padrão de aumento, no período correspondente (Fig. 3). Esses resultados indicam que, na fase inicial, o  $H_2O_2$  induzido pelo herbicida Heat, promove a peroxidação de lipídeos, caracterizando uma condição de estresse oxidativo. Em condições de estresse oxidativo, os lipídeos são as moléculas mais suscetíveis, e por consequência, as membranas biológicas os componentes celulares que mais sofrem danos (KHYADE; PHULE; MURAD, 2019). Danos aos lipídeos de membrana afetaram a atividade desidrogenase, diminuíram os níveis de ATP e promoveram estresse oxidativo intracelular em *E. coli* (ROWLETT et al., 2017).

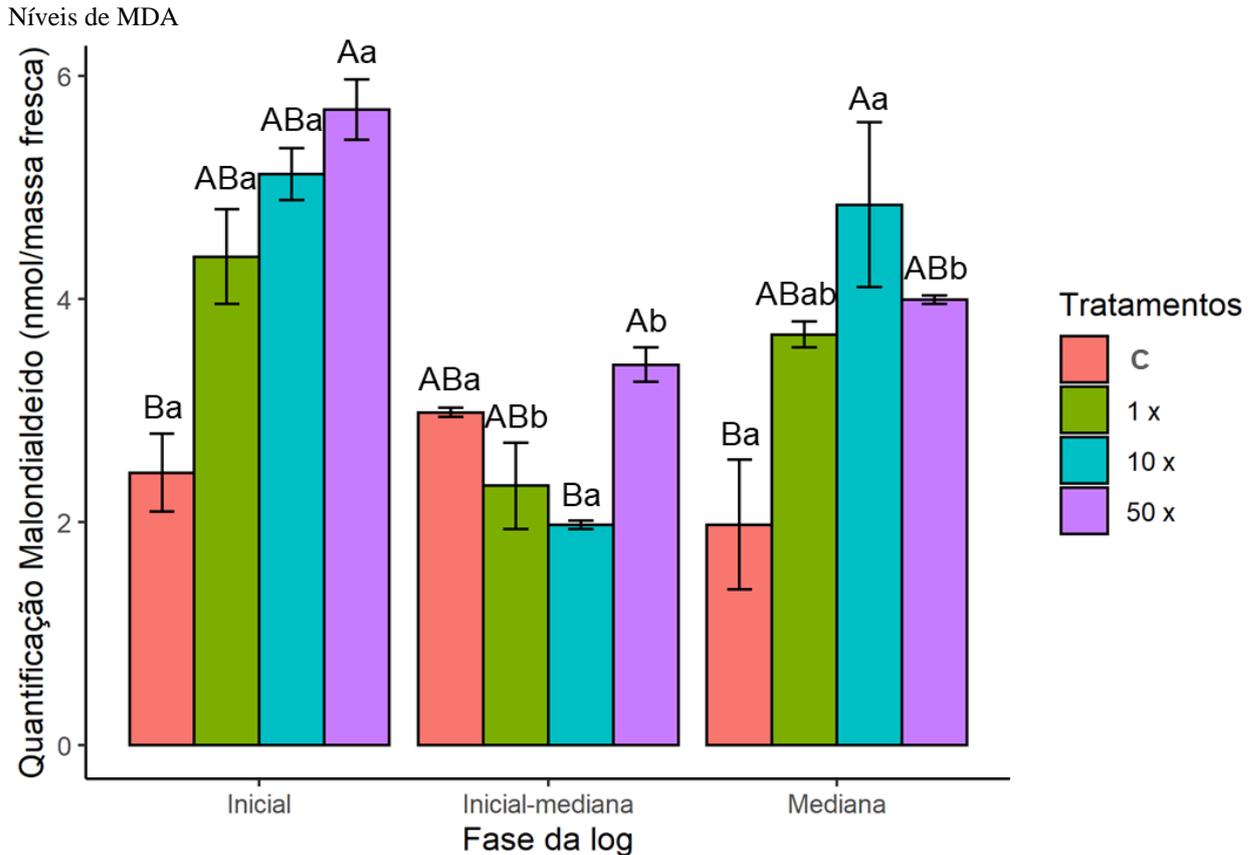


Figura 4 - Níveis de MDA da linhagem *Stenotrophomonas* sp. CMA26 nos tratamentos C, 1x, 10x e 50x nas fases inicial, inicial-mediana e mediana da log. Letras maiúsculas comparam estatisticamente diferentes tratamentos da mesma fase de crescimento; letras minúsculas comparam estatisticamente os mesmos tratamentos em diferentes fases de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Durante o período de análise (fases inicial, inicial-mediana e mediana), os níveis de MDA não diferem significativamente em controle, mas variam nos tratamentos com Heat. A partir da fase inicial-mediana, não é possível fazer uma correlação direta com os níveis de  $H_2O_2$  (Fig. 3). Esses resultados podem indicar mudanças na saturação dos lipídeos de membrana em *Stenotrophomonas* sp. CMA26 como um sistema de resposta à presença do herbicida, mas outras análises, como a caracterização dos lipídeos de membrana, deverão ser realizadas para corroborar essa hipótese. Em outros trabalhos que também não observaram uma relação direta entre níveis de ERO e de MDA, esse foi considerado como bioindicador de saturação de membranas biológicas. Em *P. ananatis* exposta ao mesotrione foram observados aumentos nos níveis de MDA como consequência na elevação na saturação dos lipídeos, o qual foi considerado um mecanismo de proteção de membrana (PRIONE et al., 2016). Aumentos na saturação dos lipídeos da membrana também ocorreram em *E. coli* DH5-*a* como sistema de defesa contra esse mesmo herbicida (OLCHANHESKI et al., 2014).

#### 4.1.3.6 Capacidade de degradação de isolados bacterianos

Nenhum dos isolados bacterianos da coleção de microrganismos de solo agrícola apresentou degradação do herbicida Heat durante o período de análise, incluindo a linhagem *Stenotrophomonas* sp. CMA26. A exposição prévia a herbicidas é frequentemente relatada como agente seletor de microrganismos degradadores. Análises genômicas de uma comunidade microbiana de água residual de sistemas de biopurificação de pesticidas permitiram a identificação de genes e clusters de genes relacionados à degradação de produtos orgânicos, incluindo herbicidas presentes nesse ambiente (DUNON et al., 2018). No mesmo trabalho foram detectados genes associados a degradação do linuron em solo previamente exposto ao herbicida. Outro exemplo é *Ochrobactrum* sp., degradadora de tifensulfuron-metil, que foi isolada de solo contaminado com este herbicida (ZHAO et al., 2015). Desse modo, a ausência de exposição prévia para o Heat no local de coleta, pode ter sido um fator que limitou a seleção de genes específicos para a degradação deste herbicida pela coleção de microrganismos de solo de Palotina, mas provavelmente isso não foi válido para os sistemas que contribuíram para a tolerância do herbicida, assumindo que esses sistemas estão relacionados a sistemas de respostas gerais ao estresse. Corroborando essa hipótese, *P. putida*, exposta aos estresses oxidativo, osmótico e ao antibiótico imipenem, apresentou uma resposta diferencial para cada estresse. Porém 194 genes, que codificam para bombas de efluxo, proteínas universais de estresse, enzimas redox, além da indução de mecanismos de proteção contra ERO, foram regulados positivamente para todos os tipos de estresse (BOJANOVIČ; D'ARRIGO; LONG, 2017). Em outro trabalho, linhagens de *E. coli* pré-adaptadas à ampicilina apresentaram tolerância para norfloxacin, um antibiótico não previamente exposto às bactérias, indicando que o mecanismo de tolerância é uma resposta adaptativa generalizada ao estresse antibiótico (FRIDMAN et al., 2014).

Como a degradação do herbicida não faz parte do sistema de resposta para superar o estresse causado por Heat em *Stenotrophomonas* sp. CMA26, outros sistemas de resposta foram avaliados, como a atividade das enzimas antioxidantes CAT e GST.

#### 4.1.3.7 Atividade enzimática de CAT em resposta à Heat

A CAT é uma enzima antioxidante responsável pela metabolização do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em oxigênio molecular e água e tem papel importante em bactérias expostas a xenobióticos

(LUSHCHAK et al., 2018; ROVIDA et al., 2021). A atividade de CAT em *Stenotrophomonas* sp. CMA26 é mostrada na Fig. 5. A fase inicial apresenta os menores níveis de atividade enzimática de CAT. Nesta mesma fase o  $H_2O_2$  permanece elevado em todos os tratamentos (Fig. 3). Já na fase inicial-mediana, percebe-se um aumento significativo da atividade de CAT em controle (Apêndice D) e há uma redução de  $H_2O_2$  para o tratamento e período correspondente (Fig. 3). Na fase mediana, há um aumento significativo na atividade de CAT para todos os tratamentos. É válido destacar o tratamento de 50x, no qual ocorreu maior atividade da enzima, e corresponde ao período de recuperação do crescimento em curva (Fig. 2) e de redução dos níveis de  $H_2O_2$  (Fig. 3). Desse modo, a CAT parece ter uma atuação importante para o controle dos níveis de  $H_2O_2$  em *Stenotrophomonas* sp. CMA26, considerado um mecanismo de resposta para superar o estresse causado por Heat.

Atividade de CAT

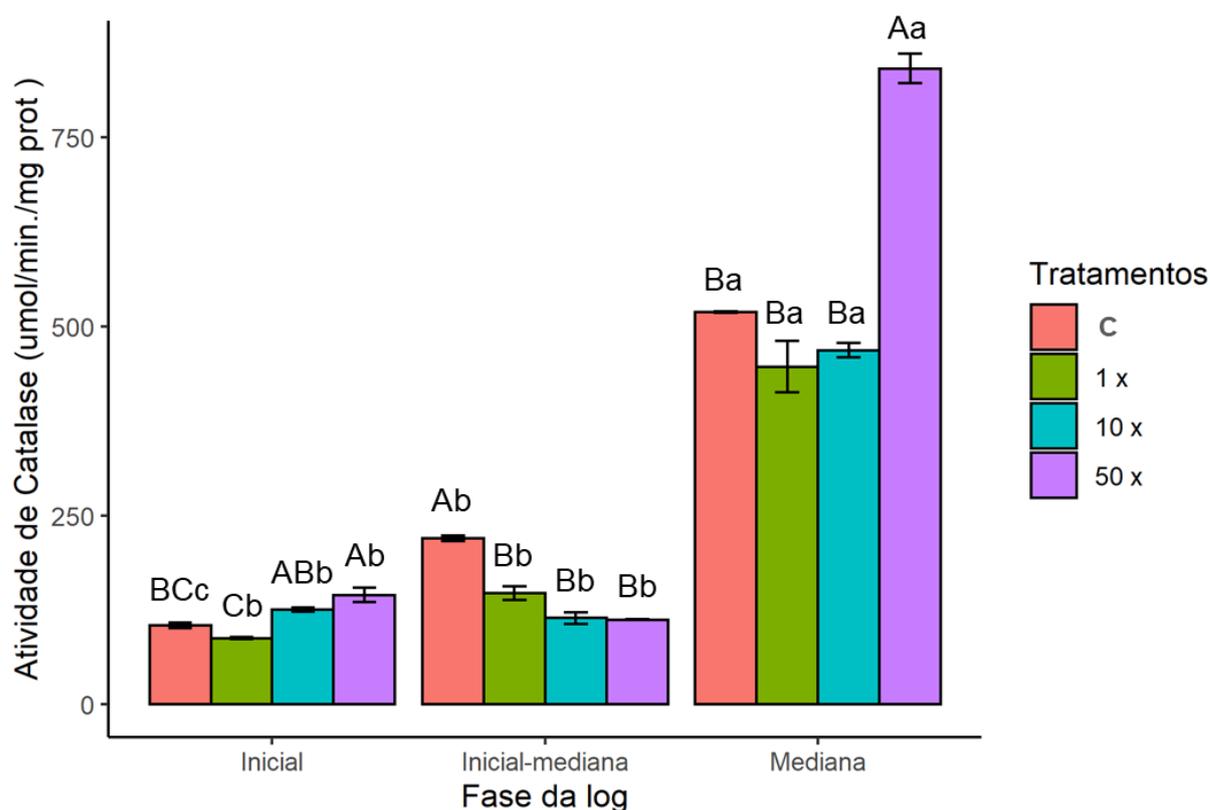


Figura 5 - Atividade de CAT em *Stenotrophomonas* sp. CMA26 nos tratamentos C, 1x, 10x e 50x nas fases inicial, inicial-mediana e mediana da log. Letras maiúsculas comparam estatisticamente diferentes tratamentos da mesma fase de crescimento; letras minúsculas comparam estatisticamente os mesmos tratamentos em diferentes fases de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A enzima CAT é frequentemente descrita como mecanismo para superar o estresse causado por xenobióticos. Em resposta ao antibiótico ácido fenazina-1-carboxílico,

*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* e *X. oryzae* pv. *oryzicola* exibiram a ativação do regulador transcricional OxyR, relacionado com genes que codificam a CAT (PAN et al., 2018). Em isolados do gênero *Enterobacter*, aumentos na atividade de CAT foram caracterizados como mecanismo de tolerância aos herbicidas metolaclo e acetocloro (MARTINS et al., 2011). *Pseudomonas* sp. apresentou um sistema de resposta ao herbicida Heat com enzimas antioxidantes, incluindo a CAT (ROVIDA et al., 2021). É válido ressaltar que nestes dois últimos trabalhos as linhagens foram selecionadas de ambientes previamente exposto aos herbicidas testados. Nesse sentido, há poucos relatos na literatura mostrando o papel de CAT para tolerância em microrganismos não previamente expostos ao agrotóxico testado, principalmente para herbicidas.

#### 4.1.3.8 Atividade enzimática de GST em resposta à Heat

A GST é uma enzima multifuncional que participa de processos de desintoxicação celular, catalisando a conjugação da GSH com compostos eletrofílicos endógenos (metabólitos secundários, hidroperóxidos) e xenobióticos, como os herbicidas (CHRONOPOULOU et al., 2017). Outra função da GST que tem sido estudada mais recentemente é a regulação dos produtos da peroxidação lipídica da via de sinalização celular (AWASTHI et al., 2017). O MDA é um dos principais produtos da peroxidação lipídica (KHYADE; PHULE; MURAD, 2019). A atividade de GST em *Stenotrophomonas* sp. CMA26 é mostrada na Fig. 6. Durante o período de análise (fases inicial, inicial-mediana e mediana), a atividade de GST não difere significativamente em controle (Apêndice E). Esse efeito ocorre também para os níveis de MDA (Fig. 4). Nos tratamentos contendo Heat há aumentos significativos da atividade de GST da fase inicial-mediana para mediana. Esses aumentos são proporcionais aos níveis de MDA na fase mediana (Fig. 4). Os dados mostrados indicam que *Stenotrophomonas* sp. CMA26 apresenta um sistema de regulação dos níveis de MDA por meio da atividade de GST.

## Atividade de GST

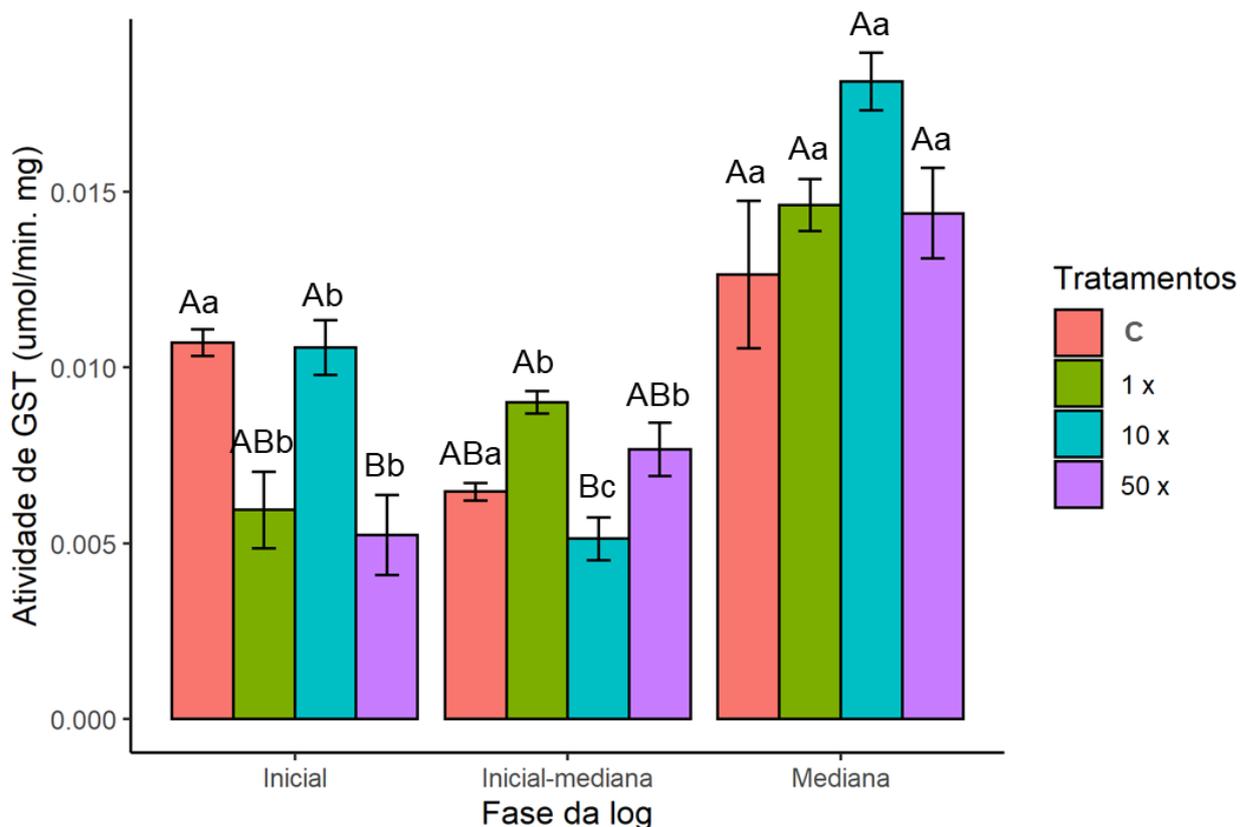


Figura 6 - Atividade de GST em *Stenotrophomonas* sp. CMA26 nos tratamentos C, 1x, 10x e 50x nas fases inicial, inicial-mediana e mediana da log. Letras maiúsculas comparam estatisticamente diferentes tratamentos da mesma fase de crescimento; letras minúsculas comparam estatisticamente os mesmos tratamentos em diferentes fases de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Poucos trabalhos abordam a relação entre GST e MDA. Alguns trabalhos apontam que a GST pode catalisar a desintoxicação celular do 4-hidroxi-2-nonenal, outro produto de peroxidação lipídica (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014). Além disso, a GST pode estar relacionada à remoção de lipídeos danificados por  $H_2O_2$  e na restauração da fluidez das membranas (KAMMERSCHEIT; CHAUVAT; CASSIER-CHAUVAT, 2019). Em *Pseudomonas* sp. a GST esteve relacionada com controle dos níveis de MDA, em resposta ao estresse induzido pelo herbicida Boral (ROVIDA et al., 2021). Essa linhagem foi isolada de um local onde não havia exposição prévia para Boral. Desse modo, o sistema GST-MDA, além de desempenhar um papel importante para a proteção de membranas biológicas parece fazer parte de um sistema que independe de seleção prévia.

#### 4.1.3.9 Sistemas de resposta integrados para tolerância de Heat

A PCA foi utilizada para avaliar interrelações entre os dados de indicadores de estresse oxidativo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA, e de atividades enzimáticas, CAT e GST (Fig. 7).

## Relações entre indicadores de estresse e atividades de enzimas antioxidantes

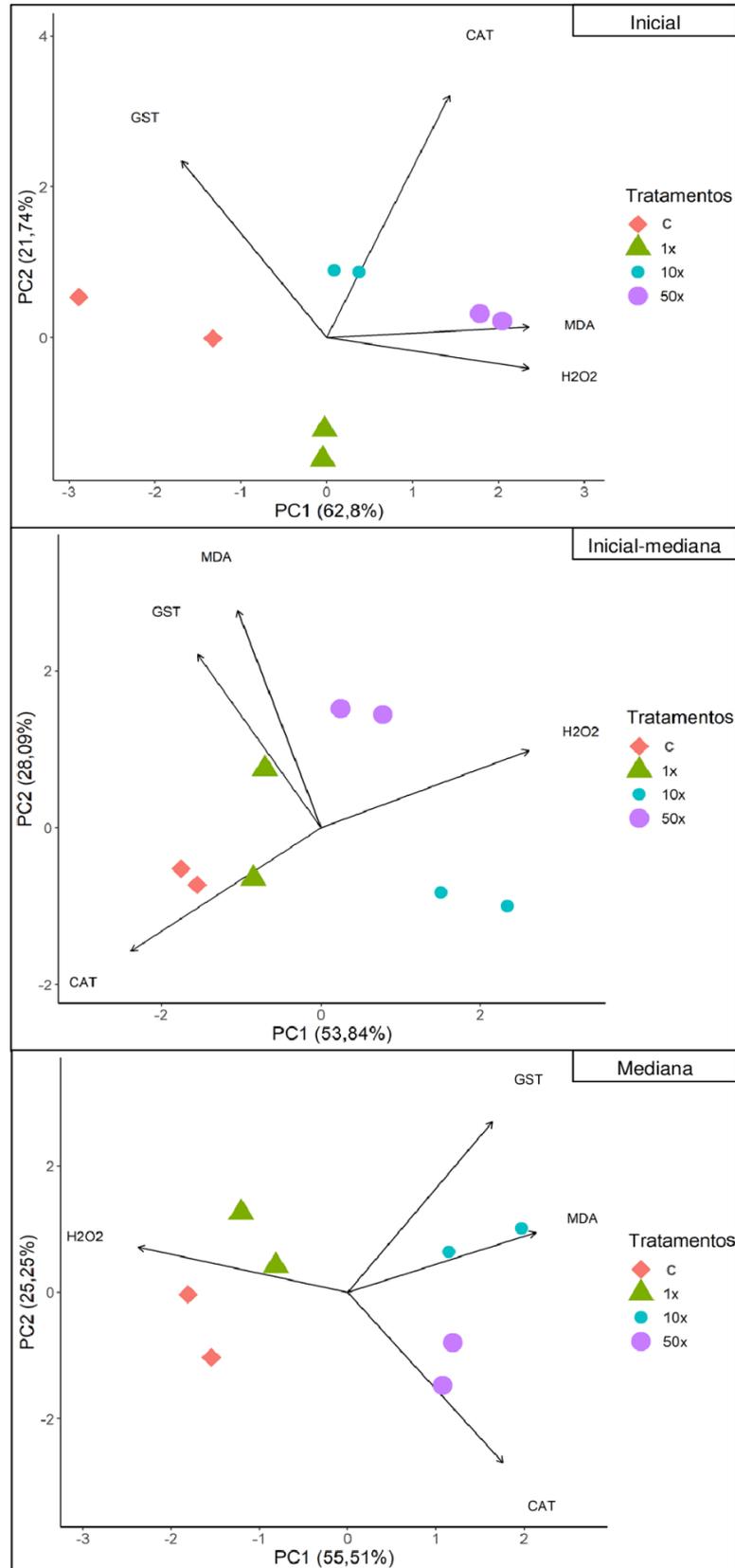


Figura 7- PCA das relações entre indicadores de estresse H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA e perfis de atividades enzimáticas de CAT e GST da linhagem *Stenotrophomonas* sp. CMA26 nas fases inicial, inicial-mediana e mediana da log. A escala de cores indica o grau de contribuição da distribuição dos dados. CAT, catalase; GST, glutathione S-transferase.

As interrelações mostram a modulação do sistema de resposta antioxidante da linhagem *Stenotrophomonas* sp. CMA26 frente ao herbicida Heat, durante o período de análise. A linhagem exhibe padrões de respostas que diferem entre as fases inicial, inicial-mediana e mediana, devido a mudanças nos padrões de agrupamentos entre os quadrantes dos componentes principais. Na fase inicial, MDA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, estão relacionados ao tratamento 50x, indicando que essa condição foi estressante para o microrganismo, por meio da possível relação peróxido-peroxidação. Os efeitos negativos sobre o crescimento nessa condição corroboram essa hipótese (Fig. 2). Além disso, não há uma atuação significativa das enzimas para o controle dos indicadores de estresse H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA. Já nas fases inicial-mediana e mediana, CAT e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentam-se de modo inversamente proporcional, caracterizando o início da atuação de CAT para o controle de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. GST e MDA estão positivamente relacionados indicando que a quantidade de MDA induz a atividade de GST.

De modo geral, Heat exerce uma condição de estresse na fase inicial em *Stenotrophomonas* sp. CMA26, que é superada a partir da fase inicial-mediana, com o início da atuação das enzimas CAT e GST, considerando que a linhagem não apresenta exposição prévia para o Heat. A adaptação bacteriana à novos ambientes está intimamente ligada à alguns fatores, como a histórico de crescimento do microrganismo (ATOLIA et al., 2020). Bactérias pré-adaptadas a condições estressantes, por exemplo, têm períodos de inibição no crescimento mais curtos quando encontram o mesmo estresse do que as bactérias que não foram pré-adaptadas (BERTRAND, 2019). Essa inibição geralmente ocorre na fase de latência (lag). A lag é comumente descrita como um período de ausência de crescimento, mas é um processo dinâmico, organizado, adaptativo e evolutivo que protege as bactérias de ameaças e promove a aptidão reprodutiva (VERMEERSCH et al., 2019). Além de um processo adaptativo, o prolongamento da fase lag é um mecanismo de defesa que permite que bactérias tolerem o estresse, inclusive para substâncias às quais não foram previamente expostas (BERTRAND, 2019). *E. coli*, tolerou o norfloxacino, antibiótico o qual não foi previamente exposta, por meio de um prolongamento na fase lag, antes do crescimento pleno. O prolongamento foi considerado como um traço adaptativo para tolerância à antibióticos (FRIDMAN et al., 2014). Desse modo, a inibição do crescimento no tratamento de 50x na fase inicial, apesar de não ocorrer na fase lag, pode ser um mecanismo de tolerância para *Stenotrophomonas* sp. CMA26, visto que as fases são metabolicamente próximas.

A tolerância também pode ser obtida quando as células em inibição de crescimento têm menor atividade metabólica do que as células em divisão ativa (BERTRAND, 2019). Quando em contato com o ferro zero valente, uma comunidade microbiana de água subterrânea não

previamente exposta ao contaminante, apresentou uma redução metabólica temporária, incluindo a interrupção da atividade redutora de nitrato, antes de recuperar a atividade metabólica normal (CRAMPON et al., 2019). Apesar de não haver uma inibição evidente no crescimento da linhagem *Stenotrophomonas* sp. CMA26 nos demais tratamentos, como ocorrem em 50x, pode-se perceber uma menor taxa metabólica dos sistemas de resposta antioxidantes na fase inicial. Desse modo, a fase inicial pode ser um período de redução metabólica e ativação de genes na *Stenotrophomonas* sp. CMA26 que conferem tolerância ao Heat.

Tendo em vista a PC1, componente principal de maior contribuição para todas as fases, pode-se identificar dois padrões de respostas, pelos agrupamentos dos tratamentos controle e 1x, e, 10x e 50x, indicando que a linhagem modula a resposta metabólica em concentrações mais altas de herbicida, o que provavelmente permite a tolerância. Em *Staphylococcus aureus*, por exemplo, a tolerância ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ocorreu devido a modulação na resposta metabólica que variou de acordo com a temperatura e pH do meio de cultura (MURPHY et al., 2018). Nesse caso, a homeostase metabólica estaria continuamente se ajustando e respondendo às mudanças nas condições da cultura, incluindo a expressão de proteínas antioxidantes, para a sobrevivência de *S. aureus* frente ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Da mesma maneira, *Stenotrophomonas* sp. CMA26 poderia estar regulando continuamente o sistema metabólico para responder ao estresse causado por Heat, apesar de não apresentar exposição prévia para o herbicida.

Bactérias do gênero *Stenotrophomonas* são conhecidas por apresentarem sistemas de metabólicos plásticos para se adaptar a diferentes nichos ambientais (LI et al., 2020). Fenótipos plásticos são importantes para a sobrevivência a mudanças ambientais. Análises metagenômicas em uma estação de tratamento de águas residuais contaminadas com iodo, mostraram que a comunidade microbiana selecionada e sobrevivente à perturbações é aquela capaz de modular rapidamente o metabolismo, seja retornando ao estágio estacionário ou de divisão (PÉREZ et al., 2019). Devido à THG, genes que codificam para fenótipos adaptativos sob pressão seletiva, têm se tornado estruturalmente ligados, gerando um potencial significativo para co-seleção (GILLINGS, 2017). A co-seleção tem sido relatada para fenótipos de resistência a antibióticos, a metais e também para agrotóxicos (PAL et al., 2017). A co-seleção pode ocorrer por co-resistência, quando os genes de resistência aos tóxicos localizam-se na mesma célula, ou por resistência cruzada, quando um único mecanismo de resistência confere resistência aos xenobióticos (HUANG et al., 2021). Bombas de efluxo são exemplos de mecanismo de resistência cruzada para metilina, zinco e cloreto de benzalcônio em *S. aureus* (SLIFIERZ; FRIENDSHIP; WEESE, 2015). Ainda não está claro na literatura se a exposição

a agrotóxicos pode selecionar microrganismos com fenótipos para tolerar outros herbicidas, para os quais não foram previamente expostos, mas esse efeito pode ter ocorrido para a linhagem *Stenotrophomonas* sp. CMA26 em relação ao herbicida Heat.

*Stenotrophomonas* sp. CMA26 deve, portanto, apresentar um sistema de plasticidade metabólica para tolerar o Heat. A plasticidade metabólica bacteriana é a capacidade de responder por meio de alterações na morfologia, fisiologia ou atividade para tolerar perturbações ambientais (COMTE; FAUTEUX; GIORGIO, 2013). Estes mecanismos de plasticidade metabólica ainda poderão ser encontrados em outros microrganismos de solo, já que os demais isolados da coleção de solo agrícola também toleraram diferentes concentrações de Heat (item 4.1.3.1). Tendo em vista que os microrganismos foram expostos a outros agrotóxicos em solo, estes podem ter atuado como um gargalo seletivo para tolerantes. Gargalos seletivos podem levar a alta divergência da população inicial, mas baixa divergência entre réplicas biológicas das populações devido à seleção de um genótipo comum (CROIX et al., 2020). Assim, esse efeito pode impactar a diversidade e a abundância da microbiota, e, portanto, a funcionalidade do solo.

#### 4.1.4 Conclusões

A linhagem *Stenotrophomonas* sp. CMA26, isolada de solo agrícola sem prévia exposição para o herbicida Heat, foi caracterizada como tolerante a esse xenobiótico. Embora haja inicialmente uma condição de estresse, a adaptação à presença do herbicida provavelmente ocorre devido a um sistema de plasticidade metabólica que inclui a atividade da enzima CAT, controlando  $H_2O_2$  e GST, controlando o MDA, uma vez que a degradação não faz parte do sistema de resposta dessa linhagem. Os padrões de resposta diferem de acordo com o aumento da concentração do herbicida. Esses sistemas metabólicos independem de seleção prévia.

Estes mecanismos adaptativos possivelmente poderão ser encontrados em outros microrganismos de solo, já que outros isolados da coleção, exibiram tolerância ao Heat sem apresentarem degradação do herbicida, o qual não estava presente no solo. Esses mecanismos que prescindem de seleção, atuantes em microbiomas de solo, podem interferir na diversidade e na funcionalidade nesse ambiente. Agrotóxicos podem estar direcionando para a seleção de microrganismos tolerantes, mas não necessariamente degradadores em solo. Com menos bactérias degradadoras, estes herbicidas podem permanecer mais tempo no solo como contaminantes ambientais, aumentando a probabilidade de chegar à ambientes aquáticos por deriva.

## REFERÊNCIAS

- ALLOCATI, N. et al. *Proteus mirabilis* glutathione S-transferase B1-1 is involved in protective mechanisms against oxidative and chemical stresses. **Biochem. J.** [s.l.: s.n.], 2003.
- ATOLIA, E. et al. Environmental and physiological factors affecting high-throughput measurements of bacterial growth. **mBio**, v. 11, n. 5, p. 1–19, 1 set. 2020.
- AWASTHI, Y. C. et al. Regulatory roles of glutathione-S-transferases and 4-hydroxynonenal in stress-mediated signaling and toxicity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 111, p. 235–243, 2017.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.
- BARCELLOS JÚNIOR, L. H. et al. Influence of organic matter in sorption of the saflufenacil in ferralsols. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, n. 2009, 2020.
- BARZMAN, M. et al. Eight principles of integrated pest management. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, n. 4, p. 1199–1215, 2015.
- BERTRAND, R. L. Lag phase is a dynamic, organized, adaptive, and evolvable period that prepares bacteria for cell division. **Journal of Bacteriology**, v. 201, n. 7, 1 abr. 2019.
- BHAT, S. V. et al. Oxidative stress and metabolic perturbations in *Escherichia coli* exposed to sublethal levels of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Chemosphere**, v. 135, p. 453–461, 1 set. 2015.
- BOJANOVIĆ, K.; D'ARRIGO, I.; LONG, K. S. Global transcriptional responses to osmotic, oxidative, and imipenem stress conditions in *Pseudomonas putida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 7, 1 abr. 2017.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, mai., 1976.
- BRAUNER, A. et al. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nature Reviews Microbiology**, mai. 2016.
- CHRONOPOULOU, E. et al. Plant glutathione transferases in abiotic stress response and herbicide resistance. In: **Glutathione in Plant Growth, Development, and Stress Tolerance**. [s.l.] p. 215–233, 2017.
- COMTE, J.; FAUTEUX, L.; GIORGIO, P. A. del. Links between metabolic plasticity and functional redundancy in freshwater bacterioplankton communities. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 112, mai., 2013.
- CRAMPON, M. et al. Shift in natural groundwater bacterial community structure due to zero-valent iron nanoparticles (nZVI). **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. mar, 2019.
- CROIX, M. et al. Selective and non-selective bottlenecks as drivers of the evolution of hypermutable bacterial loci. **Molecular Microbiology**. 1 mar. 2020.
- DU, P. et al. Effects of trifluralin on the soil microbial community and functional groups involved in nitrogen cycling. **Elsevier B.V.** [s.l.], v. 353, 2018.

- DUNON, V. et al. Targeted metagenomics demonstrates the ecological role of IS1071 in bacterial community adaptation to pesticide degradation. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 11, p. 4091–4111, 2018.
- FRIDMAN, O. et al. Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. **Nature**, v. 513, n. 7518, p. 418–421, 2014.
- GILLINGS, M. R. Lateral gene transfer, bacterial genome evolution, and the Anthropocene. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1389, n. 1, p. 20–36, 2017.
- GOTTESMAN, S. Trouble is coming: Signaling pathways that regulate general stress responses in bacteria. **Journal of Biological Chemistry**. 2 ago. 2019.
- GRAVINA, F. et al. Metabolic interference of sod gene mutations on catalase activity in *Escherichia coli* exposed to Gramoxone® (paraquat) herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, p. 89–96, 1 mai. 2017.
- HASANUZZAMAN, M. et al. Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 23, n. 2, p. 249–268, 2017.
- HEAT, A. Heat ® Herbicida. **Lista de agrotóxicos do estado do paraná**, 2017.
- HRAC. Mode of Action Classification. **Herbicide Resistance Action Committee**. p. 1, 2020.
- HUANG, L. et al. The Effects of natural products and environmental conditions on antimicrobial resistance. **Molecules**, v. 26, n. 14, 2 jul. 2021.
- IMLAY, J. A. Where in the world do bacteria experience oxidative stress? **Environmental Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 521–530, 2019.
- JONES, C. M.; HERNÁNDEZ LOZADA, N. J.; PFLEGER, B. F. Efflux systems in bacteria and their metabolic engineering applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 12 set. 2015.
- KAMMERSCHEIT, X.; CHAUVAT, F.; CASSIER-CHAUVAT, C. From cyanobacteria to human, MAPEG-type glutathione-s-transferases operate in cell tolerance to heat, cold, and lipid peroxidation. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 1. set. 2019.
- KAUR, G. Herbicides and its role in Induction of Oxidative Stress- A Review. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 995–1004, 2019.
- KHAKBAZ, P.; KLAUDA, J. B. Probing the importance of lipid diversity in cell membranes via molecular simulation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 192, p. 12–22, 2015.
- KHYADE, V. B.; PHULE, R. A.; MURAD, F. Malondialdehyde (MDA): The key product in lipid peroxidation. **International Journal of Chemical and Molecular Engineering**, v. 5, n. 2, p. 1–13, 23 dez. 2019.
- KRAUS, T. E.; MCKERSIE, B. D.; FLETCHER, R. A. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, v. 145, n. 4, p. 570–576, 1 fev. 1995.
- LI, L.-H. et al. Protection from hydrogen peroxide stress relies mainly on AhpCF and KatA2 in *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, 25 fev. 2020.
- LIGUORI, I. et al. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, 1

jan. 2018.

LUSHCHAK, V. I. et al. Pesticide toxicity: A mechanistic approach. **EXCLI Journal**, 2018.

MARTINS, P. F. et al. Effects of the herbicides acetochlor and metolachlor on antioxidant enzymes in soil bacteria. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1186–1195, 1 mai. 2011.

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, 1 mar. 2018.

MURPHY, G. R. et al. Alterations in amino acid metabolism during growth by *Staphylococcus aureus* following exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – A multifactorial approach. **Heliyon**, v. 4, n. 5, p. 620, 1 mai. 2018.

NEIVERTH, W. Diversidade morfológica e genética de rizobactérias endofíticas obtidas de solos de diferentes classes e manejos de cultivo. 2012. DISSERTAÇÃO (Mestrado em Agronomia), UNIOESTE, 2012.

OLCHANHESKI, L. R. et al. Mechanisms of tolerance and high degradation capacity of the herbicide mesotrione by *Escherichia coli* strain DH5- $\alpha$ . **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–8, 2014.

PAL, C. et al. Metal resistance and its association with antibiotic resistance. **Elsevier Ltd.** v. 70. 1. ed. [s.l.]. 2017.

PÉREZ, M. V. et al. Time series genome-centric analysis unveils bacterial response to operational disturbance in activated sludge. **mSystems**, v. 4, n. 4, 27 ago. 2019.

PETRIC, I. et al. Nicosulfuron application in agricultural soils drives the selection towards NS-tolerant microorganisms harboring various levels of sensitivity to nicosulfuron. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 5, p. 4320–4333, 2016.

POLST, B. H. et al. Hydrodynamics alter the tolerance of autotrophic biofilm communities toward herbicides. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. DEC, p. 1–12, 2018.

PRIONE, L. P. et al. GST activity and membrane lipid saturation prevents mesotrione-induced cellular damage in *Pantoea ananatis*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 70, 13 dez. 2016.

RACHEDI, K. et al. Effect of sulfonylurea tribenuron methyl herbicide on soil *Actinobacteria* growth and characterization of resistant strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 79–86, 1 jan. 2018.

RAINIO, M. J. et al. Adaptation of bacteria to glyphosate: a microevolutionary perspective of the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. **Environmental Microbiology Reports**, v. 13, n. 3, p. 309–316, 1 jun. 2021.

RAMAKRISHNAN, B. et al. Local applications but global implications: Can pesticides drive microorganisms to develop antimicrobial resistance? **Science of the Total Environment**, v. 654, p. 177–189, 2019.

RANGASAMY, K. et al. Pesticide degrading natural multidrug resistance bacterial flora. **Microbial Pathogenesis**, 1 jan. 2018. .

RIAÑO, C. et al. Effect of glyphosate (Roundup Active®) on liver of tadpoles of the colombian endemic frog *Dendropsophus molitor* (amphibia: Anura). **Chemosphere**, v. 250, 2020.

ROVIDA, A. F. da S. et al. Herbicides tolerance in a *Pseudomonas* strain is associated with

metabolic plasticity of antioxidative enzymes regardless of selection. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1430, 22 jun. 2021.

ROWLETT, V. W. et al. Impact of membrane phospholipid alterations in *Escherichia coli* on cellular function and bacterial stress adaptation. **Journal of Bacteriology**, v. 199, n. 13, 1 jul. 2017.

SLIFIERZ, M. J.; FRIENDSHIP, R. M.; WEESE, J. S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in commercial swine herds is associated with disinfectant and zinc usage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 8, p. 2690, 2015.

THIOUR-MAUPRIVEZ, C. et al. Effects of herbicide on non-target microorganisms: Towards a new class of biomarkers? **Science of the Total Environment**, v. 684, p. 314–325, 2019.

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.

VERMEERSCH, L. et al. On the duration of the microbial lag phase. **Current Genetics**, v. 65, n. 3, p. 721, 1 jun. 2019.

X, P. et al. Contribution of OxyR Towards Differential Sensitivity to Antioxidants in *Xanthomonas oryzae pathovars oryzae* and *oryzicola*. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 31, n. 12, p. 1244–1256, 1 dez. 2018.

ZHAO, W. et al. Biodegradation of thifensulfuron-methyl by *Ochrobactrum* sp. in liquid medium and soil. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 7, p. 1385–1392, 2015.

ZHU, M.; DAI, X. Maintenance of translational elongation rate underlies the survival of *Escherichia coli* during oxidative stress. **Nucleic acids research**, v. 47, n. 14, p. 7592–7604, 22 ago. 2019.

## REFERÊNCIAS

- ADEGOKE, A. A.; STENSTRÖM, T. A.; OKOH, A. I. *Stenotrophomonas maltophilia* as an emerging ubiquitous pathogen: looking beyond contemporary antibiotic therapy. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2276, nov. 2017.
- AHMAD, S. et al. An overview on phase variation, mechanisms and roles in bacterial adaptation. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 67, n. 2, p. 285–291, 2017.
- ALLOCATI, N. et al. Proteus mirabilis glutathione S-transferase B1-1 is involved in protective mechanisms against oxidative and chemical stresses. **Biochem. J.** 2003.
- ATOLIA, E. et al. Environmental and physiological factors affecting high-throughput measurements of bacterial growth. **mBio**, v. 11, n. 5, p. 1–19, 1 set. 2020.
- AWASTHI, Y. C. et al. Regulatory roles of glutathione-S-transferases and 4-hydroxynonenal in stress-mediated signaling and toxicity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 111, p. 235–243, 2017.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.
- BARCELLOS JÚNIOR, L. H. et al. Influence of organic matter in sorption of the saflufenacil in ferralsols. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, n. 2009, 2020.
- BARZMAN, M. et al. Eight principles of integrated pest management. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, n. 4, p. 1199–1215, 2015.
- BASF. Bula Heat ® Herbicida. **Agência de Defesa Agropecuária do Brasil**, 2017.
- BEATRIZ, A. T. et al. Saflufenacil and indaziflam herbicide effects on agricultural crops and microorganisms. **African Journal of Agricultural Research**, v. 13, n. 16, p. 872–885, 2018.
- BERTRAND, R. L. Lag phase is a dynamic, organized, adaptive, and evolvable period that prepares bacteria for cell division. **Journal of Bacteriology**, v. 201, n. 7, abr. 2019.
- BHAT, S. V. et al. Oxidative stress and metabolic perturbations in *Escherichia coli* exposed to sublethal levels of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Chemosphere**, v. 135, p. 453–461, set. 2015.
- BOJANOVIČ, K.; D'ARRIGO, I.; LONG, K. S. Global transcriptional responses to osmotic, oxidative, and imipenem stress conditions in *Pseudomonas putida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 7, abr. 2017.
- BOROWIK, A. et al. Response of microorganisms and enzymes to soil contamination with a mixture of terbuthylazine, mesotrione, and S-metolachlor. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 2, p. 1910–1925, jan. 2017.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, mai. 1976.
- BRAUNER, A. et al. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nature Reviews Microbiology**, mai. 2016.

- CARPENTER, D. J. et al. Effects of herbicides on flowering. **Environmental Toxicology and Chemistry**, n. p. 0–3, dez. 2020.
- CHAIANUNPORN, K.; CHAIANUNPORN, T.; CHAREONSUDJAI, S. Effects of exposure to the herbicides, glyphosate and paraquat, on the growth inhibition and antibiotic susceptibility of *Burkholderia pseudomallei*. **SNRU Journal of Science and Technology**, v. 12, n. 2, p. 174–181, 1 mai. 2020.
- CHRONOPOULOU, E. et al. Plant glutathione transferases in abiotic stress response and herbicide resistance. **Glutathione in Plant Growth, Development, and Stress Tolerance**. p. 215–233. [s.l.]. 2017.
- COMTE, J.; FAUTEUX, L.; GIORGIO, P. A. del. Links between metabolic plasticity and functional redundancy in freshwater bacterioplankton communities. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. MAY, p. 112, 9 mai. 2013.
- COSTA, T. R. D. et al. Structure of the bacterial sex F Pilus reveals an assembly of a stoichiometric protein-phospholipid complex. **Cell**, v. 166, n. 6, p. 1436–1444.e10, 8 set. 2016.
- CRAMPON, M. et al. Shift in natural groundwater bacterial community structure due to zero-valent iron nanoparticles (nZVI). **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. mar. 2019.
- CROUZET, O. et al. Functional and structural responses of soil N-cycling microbial communities to the herbicide mesotrione: a dose-effect microcosm approach. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 5, p. 4207–4217, 2016.
- CROIX, M. et al. Selective and non-selective bottlenecks as drivers of the evolution of hypermutable bacterial loci. **Molecular Microbiology**, 1 mar. 2020.
- DELCORSO, M. C. et al. Effects of sublethal and realistic concentrations of the commercial herbicide atrazine in Pacu (*Piaractus mesopotamicus*): Long-term exposure and recovery assays. **Veterinary World**, v. 13, n. 1, p. 147–159, 2020.
- DOBZANSKI, T. et al. *Bacillus megaterium* strains derived from water and soil exhibit differential responses to the herbicide mesotrione. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. 1–24, 2018.
- DU, P. et al. Clomazone influence soil microbial community and soil nitrogen cycling. **Science of the Total Environment**, v. 644, n. 2, p. 475–485, 2018a.
- DU, P. et al. Effects of trifluralin on the soil microbial community and functional groups involved in nitrogen cycling. **Elsevier B.V**, v. 353, [s.l.], 2018b.
- DUNON, V. et al. Targeted metagenomics demonstrates the ecological role of IS1071 in bacterial community adaptation to pesticide degradation. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 11, p. 4091–4111, 2018.
- EJOMAH, A. J.; ID, O. O. U.; EKAYE, S. Exposure of the African mound building termite, *Macrotermes bellicosus* workers to commercially formulated 2, 4-D and atrazine caused high mortality and impaired locomotor response. **PLoS ONE**, p. 1–14, 2020.
- FANG, H. et al. Biodegradability and ecological safety assessment of *Stenotrophomonas* sp. DDT-1 in the DDT-contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 158, n. 2017, p. 145–153, dez. 2018.
- FANG, Y. et al. Transcriptome analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reveals horizontal gene transfer contributes to its oxidative stress response. **PLoS ONE**, v. 14, n. 10, 1 out. 2019.

- FERREIRA, M. F. et al. Effects of the herbicide glyphosate on non-target plant native species from Chaco forest (Argentina). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, n. p. 360–368, abr. 2017.
- FIERER, N. Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 10, p. 579–590, 2017.
- FLORES-TREVIÑO, S. et al. *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm: its role in infectious diseases. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 17, n. 11, p. 877–893, 2019.
- FREITAS, P. N. N. et al. Specific quorum sensing molecules are possibly associated with responses to herbicide toxicity in a *Pseudomonas* strain. **Environmental Pollution**, v. 289, p. 117896, 15 nov. 2021.
- FREYDIER, L.; LUNDGREN, J. G. Unintended effects of the herbicides 2,4-D and dicamba on lady beetles. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 6, p. 1270–1277, 2016.
- FRIDMAN, O. et al. Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. **Nature**, v. 513, n. 7518, p. 418–421, 2014.
- GAMBINO, M.; CAPPITELLI, F. Mini-review: Biofilm responses to oxidative stress. **Biofouling**, v. 32, n. 2, p. 167–178, 2016.
- GAUTHIER, J. R.; MABURY, S. A. The environmental degradation and distribution of saflufenacil, a fluorinated protoporphyrinogen IX oxidase-inhibiting herbicide, on a canadian winter wheat field. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 39, n. 10, p. 1918–1928, 2020.
- GIL-GIL, T.; MARTÍNEZ, J. L.; BLANCO, P. Mechanisms of antimicrobial resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: a review of current knowledge. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 18, n. 4, p. 335–347, 2020.
- GILLINGS, M. R. Lateral gene transfer, bacterial genome evolution, and the Anthropocene. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1389, n. 1, p. 20–36, 2017.
- GOTTESMAN, S. Trouble is coming: Signaling pathways that regulate general stress responses in bacteria. **Journal of Biological Chemistry**, 2 ago. 2019.
- GRAVINA, F. et al. Metabolic interference of sod gene mutations on catalase activity in *Escherichia coli* exposed to Gramoxone® (paraquat) herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, p. 89–96, 1 mai. 2017.
- HALL, J. P. J.; BROCKHURST, M. A.; HARRISON, E. Sampling the mobile gene pool: Innovation via horizontal gene transfer in bacteria. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 5 dez. 2017.
- HAO, Y. et al. Roundup® confers cytotoxicity through DNA damage and Mitochondria-Associated apoptosis induction. **Environmental Pollution**, v. 252, p. 917–923, 1 set. 2019.
- HARADA, Y. et al. PPAR $\alpha$ -dependent cholesterol/testosterone disruption in Leydig cells mediates 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced testicular toxicity in mice. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 12, p. 3061–3071, 1 dez. 2016.
- HASANUZZAMAN, M. et al. Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 23, n. 2, p. 249–268, 2017.

- HASENBEIN, S. et al. Environmentally relevant concentrations of herbicides impact non-target species at multiple sublethal endpoints. **Science of the Total Environment**, v. 607–608, p. 733–743, 2017.
- HEAT, A. Heat ® Herbicida. **Lista de agrotóxicos do estado do paraná**. 2017.
- HILTUNEN, T.; VIRTA, M.; ANNA-LIISA, L. Antibiotic resistance in the wild: An ecoevolutionary perspective. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 372, n. 1712, 19 jan. 2017.
- HRAC. Mode of Action Classification. **Herbicide Resistance Action Committee**, p. 1, 2020.
- HUANG, L. et al. The effects of natural products and environmental conditions on antimicrobial resistance. **Molecules**, v. 26, n. 14, 2 jul. 2021.
- HUANG, X. et al. Microbial catabolism of chemical herbicides: Microbial resources, metabolic pathways and catabolic genes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 143, p. 272–297, 2017.
- HUEDO, P. et al. Quorum sensing signaling and quenching in the multidrug-resistant pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. APR, p. 122, 24 abr. 2018.
- IMLAY, J. A. Transcription factors that defend bacteria against reactive oxygen species. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 93–108, 15 out. 2015.
- IMLAY, J. A. Where in the world do bacteria experience oxidative stress? **Environmental Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 521–530, 2019.
- JIMMO, A. et al. Linking herbicide dissipation to soil ecological risk along transmission rights-of-way in the Yukon territory, Canada. **Journal of Environmental Quality**, v. 47, n. 6, p. 1356–1364, 1 nov. 2018.
- JONES, C. M.; HERNÁNDEZ LOZADA, N. J.; PFLEGER, B. F. Efflux systems in bacteria and their metabolic engineering applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 12 set. 2015.
- KAMMERSCHEIT, X.; CHAUVAT, F.; CASSIER-CHAUVAT, C. From cyanobacteria to human, MAPEG-type glutathione-S-transferases operate in cell tolerance to heat, cold, and lipid peroxidation. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 1 set. 2019.
- KAUR, G. Herbicides and its role in induction of oxidative stress- a review. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 995–1004, 2019.
- KHAKBAZ, P.; KLAUDA, J. B. Probing the importance of lipid diversity in cell membranes via molecular simulation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 192, p. 12–22, 2015.
- KHALEQUE, H. N. et al. Unlocking survival mechanisms for metal and oxidative stress in the extremely acidophilic, halotolerant *Acidihalobacter* genus. **Genes**, v. 11, n. 12, p. 1–18, 1 dez. 2020.
- KHYADE, V. B.; PHULE, R. A.; MURAD, F. Malondialdehyde (MDA): The key product in lipid peroxidation. **International Journal of Chemical and Molecular Engineering**, v. 5, n. 2, p. 1–13, 23 dez. 2019.
- KRAUS, T. E.; MCKERSIE, B. D.; FLETCHER, R. A. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant**

**Physiology**, v. 145, n. 4, p. 570–576, 1 fev. 1995.

KUMAR, U. et al. Non-target effect of bispyribac sodium on soil microbial community in paddy soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 189, p. 110019, 1 fev. 2020.

LECHENET, M. et al. Reducing pesticide use while preserving crop productivity and profitability on arable farms. **Nature Plants**, v. 3, n. p. 1–6, mar. 2017.

LENSKI, R. E. Experimental evolution and the dynamics of adaptation and genome evolution in microbial populations. **ISME Journal**, 1 out. 2017.

LI, L.-H. et al. Protection from hydrogen peroxide stress relies mainly on AhpCF and KatA2 in *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, 25 fev. 2020.

LI, X. Z.; PLÉSIAT, P.; NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 337–418, 2015.

LIGUORI, I. et al. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, 1 jan. 2018.

LU, J. et al. Triclosan at environmentally relevant concentrations promotes horizontal transfer of multidrug resistance genes within and across bacterial genera. **Environment International**, v. 121, p. 1217–1226, 1 dez. 2018.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, out. 2014.

LUSHCHAK, V. I. et al. Pesticide toxicity: A mechanistic approach. **EXCLI Journal**, 2018.

MAILLARD, J.-Y. Resistance of bacteria to biocides. **Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals**. [s.l.], p. 109–126, 2018.

MARTINS, P. F. et al. Effects of the herbicides acetochlor and metolachlor on antioxidant enzymes in soil bacteria. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1186–1195, 1 mai. 2011.

MASSOT, F. et al. First high-quality draft genome of *Ochrobactrum haematophilum* P6BS-III, a highly glyphosate-tolerant strain isolated from agricultural soil in Argentina. **3 Biotech**, v. 9, n. 3, p. 74, 1 mar. 2019.

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, 1 mar. 2018.

MERCURIO, P. et al. Herbicide persistence in seawater simulation experiments. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–19, 2015.

MONQUERO, P. A. et al. Lixiviação de saflufenacil e residual após períodos de seca. **Planta Daninha**, v. 30, n. 2, p. 415–423, 2012.

MUKHERJEE, S.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. **Nature reviews. Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 371, 1 jun. 2019.

MURPHY, G. R. et al. Alterations in amino acid metabolism during growth by *Staphylococcus aureus* following exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – A multifactorial approach. **Heliyon**, v. 4, n. 5, p. e00620, 1 mai. 2018.

NEIVERTH, W. Diversidade morfológica e genética de rizobactérias endofíticas obtidas de solos de diferentes classes e manejos de cultivo. 2012. DISSERTAÇÃO (Mestrado em

Agronomia), UNIOESTE, 2012.

NEWMAN, M. M. et al. Glyphosate effects on soil rhizosphere-associated bacterial communities. **Science of the Total Environment**, v. 543, p. 155–160, 1 fev. 2016.

NGUYEN, T. P. O. et al. Intra- and inter-field diversity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmids and their *tfd* catabolic genes in rice fields of the Mekong delta in Vietnam. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 95, n. 1, 18 nov. 2018.

NIKAIDO, H.; PAGÈS, J. M. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, mar. 2012.

OCHIAI, S. et al. Production and degradation of N-Acylhomoserine Lactone quorum sensing signal molecules in bacteria isolated from activated sludge. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 77, n. 12, p. 2436–2440, 23 dez. 2013.

OLCHANHESKI, L. R. et al. Mechanisms of tolerance and high degradation capacity of the herbicide mesotrione by *Escherichia coli* strain DH5- $\alpha$ . **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–8, 2014.

OLSZAK, T. et al. Phage life cycles behind bacterial biodiversity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 36, p. 3987–4001, 2017.

ÖZTÜRK, B. et al. Comparative genomics suggests mechanisms of genetic adaptation toward the catabolism of the phenylurea herbicide linuron in *Variovorax*. **Genome Biology and Evolution**, v. 12, n. 6, p. 827–841, 2020.

PAL, C. et al. Metal Resistance and Its Association With Antibiotic Resistance. **Elsevier Ltd.** v. 70, 1. ed. [s.l.], 2017.

PALUCH, E. et al. Prevention of biofilm formation by quorum quenching. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 5, p. 1871, 1 mar. 2020.

PAPADOPOULOU, E. S. et al. Metabolic and evolutionary insights in the transformation of diphenylamine by a *Pseudomonas putida* strain unravelled by genomic, proteomic, and transcription analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 6 abr. 2018.

PÉREZ, M. V. et al. Time series genome-centric analysis unveils bacterial response to operational disturbance in activated sludge. **mSystems**, v. 4, n. 4, 27 ago. 2019.

PETERSON, M. A. et al. The challenge of herbicide resistance around the world: a current summary. **Pest Management Science**, v. 74, n. 10, p. 2246–2259, 2018.

PETRIC, I. et al. Nicosulfuron application in agricultural soils drives the selection towards NS-tolerant microorganisms harboring various levels of sensitivity to nicosulfuron. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 5, p. 4320–4333, 2016.

PHALE, P. S.; SHAH, B. A.; MALHOTRA, H. Variability in assembly of degradation operons for naphthalene and its derivative, carbaryl, suggests mobilization through horizontal gene transfer. **Genes MDPI AG**, 1 ago. 2019.

POLST, B. H. et al. Hydrodynamics alter the tolerance of autotrophic biofilm communities toward herbicides. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n., p. 1–12, dez. 2018a.

PRIONE, L. P. et al. GST activity and membrane lipid saturation prevents mesotrione-induced cellular damage in *Pantoea ananatis*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 70, 13 dez. 2016.

RACHEDI, K. et al. Effect of sulfonylurea tribenuron methyl herbicide on soil *Actinobacteria*

growth and characterization of resistant strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 79–86, 1 jan. 2018.

RAINIO, M. J. et al. Adaptation of bacteria to glyphosate: a microevolutionary perspective of the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. **Environmental Microbiology Reports**, v. 13, n. 3, p. 309–316, 1 jun. 2021.

RAMAKRISHNAN, B. et al. Local applications but global implications: Can pesticides drive microorganisms to develop antimicrobial resistance? **Science of the Total Environment**, v. 654, p. 177–189, 2019.

RANGASAMY, K. et al. Pesticide degrading natural multidrug resistance bacterial flora. **Microbial Pathogenesis**, 1 jan. 2018. .

RIAÑO, C. et al. Effect of glyphosate (Roundup Active®) on liver of tadpoles of the colombian endemic frog *Dendropsophus molitor* (*Amphibia: Anura*). **Chemosphere**, v. 250, 2020.

ROVIDA, A. F. da S. et al. Herbicides tolerance in a *Pseudomonas* strain is associated with metabolic plasticity of antioxidative enzymes regardless of selection. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1430, 22 jun. 2021.

ROWLETT, V. W. et al. Impact of membrane phospholipid alterations in *Escherichia coli* on cellular function and bacterial stress adaptation. **Journal of Bacteriology**, v. 199, n. 13, 1 jul. 2017.

SAID, M. S.; TIRTHANI, E.; LESHO, E. *Stenotrophomonas maltophilia*. **StatPearls**, 23 jun. 2021.

SAN MILLAN, A.; MACLEAN, R. C. Fitness costs of plasmids: A limit to plasmid transmission. **Microbial Transmission**, n. May 2021, p. 65–79, 2019.

SANTOVITO, A. et al. In vitro evaluation of genomic damage induced by glyphosate on human lymphocytes. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 34, p. 34693–34700, 1 dez. 2018.

SHAHID, M.; ZAIDI, A.; SAGHIR KHAN, M. Modulations in growth, structure, cell viability and antioxidant enzyme of a nodule bacterium *Mesorhizobium ciceri* induced by pesticides. **Environment, Development and Sustainability**, n. 0123456789, 2020.

SILAMBARASAN, S. et al. Influence of plant beneficial *Stenotrophomonas rhizophila* strain CASB3 on the degradation of diuron-contaminated saline soil and improvement of *Lactuca sativa* growth. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 28, p. 35195–35207, 2020.

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

SINGHAL, L.; KAUR, P.; GAUTAM, V. *Stenotrophomonas maltophilia*: From trivial to grievous. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 469–479, 2017.

SLIFIERZ, M. J.; FRIENDSHIP, R. M.; WEESE, J. S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in commercial swine herds is associated with disinfectant and zinc usage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 8, p. 2690, 2015.

STENRØD, M. Long-term trends of pesticides in Norwegian agricultural streams and potential future challenges in northern climate. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science**, v. 65, n. 0, p. 199–216, 2015.

- TAN, C. H. et al. Community quorum sensing signalling and quenching: microbial granular biofilm assembly. **NPJ Biofilms and Microbiomes**, v. 1, p. 15006, 27 mai. 2015.
- TAN, Z. et al. Toxic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human sperm function in vitro. **Journal of Toxicological Sciences**, v. 41, n. 4, p. 543–549, 2016.
- TEELUCKSINGH, T.; THOMPSON, L. K.; COX, G. the evolutionary conservation of *Escherichia coli* drug efflux pumps supports physiological functions. **Journal of Bacteriology**, n. p. 1–40, ago. 2020.
- THIOUR-MAUPRIVEZ, C. et al. Effects of herbicide on non-target microorganisms: Towards a new class of biomarkers? **Science of the Total Environment**, v. 684, p. 314–325, 2019.
- TOMKIEL, M. et al. The sensitivity of soil enzymes, microorganisms and spring wheat to soil contamination with carfentrazone-ethyl. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 53, n. 2, p. 97–107, 2018.
- TOMKIEL, M. et al. Effect of a mixture of flufenacet and isoxaflutole on population numbers of soil-dwelling microorganisms, enzymatic activity of soil, and maize yield. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 54, n. 10, p. 832–842, 2019.
- TRIVEDI, V. D. et al. Insights into functional and evolutionary analysis of carbaryl metabolic pathway from *Pseudomonas* sp. strain C5pp. **Scientific Reports**, v. 6, 7 dez. 2016.
- TSIKAS, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. **Analytical Biochemistry**, v. 524, p. 13–30, 1 mai. 2017.
- ULRICH, K. et al. Genomic analysis of the endophytic *Stenotrophomonas* strain 169 reveals features related to plant-growth promotion and stress tolerance. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 16 jun. 2021.
- ULTEE, E. et al. Stress-induced adaptive morphogenesis in bacteria. **Elsevier Ltd**, v. 74, [s.l.] 2019.
- 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.
- VENDITTI, P.; DI MEO, S. The role of reactive oxygen species in the life cycle of the mitochondrion. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6, 2020.
- VERMEERSCH, L. et al. On the duration of the microbial lag phase. **Current Genetics**, v. 65, n. 3, p. 721, 1 jun. 2019.
- WANG, Y. et al. Draft genome sequence of a multidrug-resistant *Stenotrophomonas* sp. B1-1 strain isolated from radiation-polluted soil and its pathogenic potential. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 24, p. 121–123, 1 mar. 2021.
- WERNER, J. et al. PromA plasmids are instrumental in the dissemination of linuron catabolic genes between different genera. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 18 fev. 2020.
- WRIGHT, M. S. et al. Assessment of insertion sequence mobilization as an adaptive response to oxidative stress in *Acinetobacter baumannii* using IS-seq. **Journal of Bacteriology**, v. 199, n. 9, 1 mai. 2017.

WU, X. H. et al. Impact of fomesafen on the soil microbial communities in soybean fields in Northeastern China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 169–176, 1 fev. 2018.

WU, Y. et al. Soil biofilm formation enhances microbial community diversity and metabolic activity. **Environment International**, v. 132, p. 105116, 1 nov. 2019.

X, P. et al. Contribution of OxyR towards differential sensitivity to antioxidants in *Xanthomonas oryzae pathovars oryzae* and *oryzicola*. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 31, n. 12, p. 1244–1256, 1 dez. 2018.

YAN, J.; BASSLER, B. L. Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. **Cell Host and Microbe**, 10 jul. 2019.

YANG, J. et al. Design, synthesis and herbicidal evaluation of novel uracil derivatives containing an isoxazoline moiety. **Pest Management Science**, v. 76, n. 10, p. 3395–3402, 2020.

YU, Y. et al. Cellular changes of microbial consortium GY1 during decabromodiphenyl ether (BDE-209) biodegradation and identification of strains responsible for BDE-209 degradation in GY1. **Chemosphere**, v. 249, p. 126205, 2020.

ZHAO, W. et al. Biodegradation of thifensulfuron-methyl by *Ochrobactrum* sp. in liquid medium and soil. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 7, p. 1385–1392, 2015.

ZHU, M.; DAI, X. Maintenance of translational elongation rate underlies the survival of *Escherichia coli* during oxidative stress. **Nucleic acids research**, v. 47, n. 14, p. 7592–7604, 22 ago. 2019.

## APÊNDICE A: ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA CURVA DE CRESCIMENTO

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: zero  
 Variation Coefficient: 2.775558e-14 %

Independent variable: Trat

Factors	Means	
0x	0.05	a
10x	0.05	a
1x	0.05	a
50x	0.05	a

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: um  
 Variation Coefficient: 6.642054 %

Independent variable: Trat

Factors	Means	
50x	0.162666666666667	a
10x	0.057	b
1x	0.0543333333333333	b
0x	0.0446666666666667	b

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: dois  
 Variation Coefficient: 9.266254 %

Independent variable: Trat

Factors	Means	
50x	0.180666666666667	a
1x	0.155	ab
10x	0.139333333333333	b
0x	0.134333333333333	b

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: tres  
 Variation Coefficient: 11.32057 %

Independent variable: Trat

Factors	Means	
1x	0.519333333333333	a
0x	0.514	a
10x	0.478333333333333	a
50x	0.284	b

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: quatro  
 Variation Coefficient: 4.973888 %

Independent variable: Trat

Factors	Means	
1x	1.007	a
10x	0.969	a
0x	0.902666666666667	a
50x	0.673	b

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: cinco  
 Variation Coefficient: 4.85553 %

Independent variable: Trat  
 Factors Means  
 10x 1.39066666666667 a  
 0x 1.356 a  
 1x 1.34266666666667 a  
 50x 0.9365 b

TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: seis  
 Variation Coefficient: 8.503868 %

Independent variable: Trat  
 Factors Means  
 10x 1.79933333333333 a  
 1x 1.65333333333333 a  
 0x 1.57733333333333 a  
 50x 1.559 a

TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: sete  
 Variation Coefficient: 8.295559 %

Independent variable: Trat  
 Factors Means  
 10x 2.15766666666667 a  
 1x 2.048 a  
 0x 2.014 a  
 50x 1.95333333333333 a

TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: oito  
 Variation Coefficient: 8.559674 %

Independent variable: Trat  
 Factors Means  
 10x 2.332 a  
 0x 2.288 a  
 1x 2.259 a  
 50x 2.172 a

TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: nove  
 Variation Coefficient: 8.464004 %

Independent variable: Trat  
 Factors Means  
 10x 2.661 a  
 1x 2.521 a  
 50x 2.466 a  
 0x 2.444 a

TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: dez  
 Variation Coefficient: 11.53567 %

Independent variable: Trat

Factors	Means
10x	2.893 a
1x	2.73 a
50x	2.723 a
0x	2.564 a

TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: onze  
 Variation Coefficient: 6.592803 %

Independent variable: Trat

Factors	Means
50x	3.046 a
0x	3.014 a
10x	2.993 a
1x	2.848 a

TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: doze  
 Variation Coefficient: 7.216525 %

Independent variable: Trat

Factors	Means
10x	3.151 a
0x	3.075 a
50x	3.065 a
1x	2.984 a

TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: treze  
 Variation Coefficient: 7.637474 %

Independent variable: Trat

Factors	Means
50x	3.238 a
10x	3.107 a
0x	3.071 a
1x	3.007 a

## APÊNDICE B: ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: H2O2  
 Variation Coefficient: 39.97849 %

Independent variable: Trat

Factors Means  
 0 x 8h 0.65493 a  
 0 x 4h 0.465728 a  
 0 x 6h 0.118216 a

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: H2O2  
 Variation Coefficient: 22.70014 %

Independent variable: Trat

Factors Means  
 1x 8h 0.9993745 a  
 1x 4h 0.742254 ab  
 1x 6h 0.203756 b

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: H2O2  
 Variation Coefficient: 24.03402 %

Independent variable: Trat

Factors Means  
 10x 6h 1.154617 a  
 10x 4h 0.7519565 ab  
 10x 8h 0.1940535 b

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: H2O2  
 Variation Coefficient: 25.59115 %

Independent variable: Trat

Factors Means  
 50x 4h 1.0575905 a  
 50x 6h 0.829578 a  
 50x 8h 0.305634 a

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: H2O2  
 Variation Coefficient: 19.74811 %

Independent variable: Trat

Factors Means  
 50x 4h 1.0575905 a  
 10x 4h 0.7519565 a  
 1x 4h 0.742254 a  
 0x 4h 0.465728 a

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: H2O2

Variation Coefficient: 34.84237 %

Independent variable: Trat

Factors Means		
10x 6h	1.154617	a
50x 6h	0.829578	ab
1x 6h	0.203756	b
0x 6h	0.118216	b

TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95

Dependent variable: H2O2

Variation Coefficient: 27.31084 %

Independent variable: Trat

Factors Means		
1x 8h	0.9993745	a
0x 8h	0.65493	ab
50x 8h	0.305634	b
10x 8h	0.1940535	b

## APÊNDICE C: ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA MDA

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: MDA  
 Variation Coefficient: 22.47043 %

Independent variable: Trat

Factors Means  
 0 x 6h 2.98375 a  
 0 x 4h 2.44125 a  
 0 x 8h 1.97625 a

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: MDA  
 Variation Coefficient: 13.86026 %

Independent variable: Trat

Factors Means  
 1x 4h 4.37875 a  
 1x 8h 3.68125 ab  
 1x 6h 2.324925 b

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: MDA  
 Variation Coefficient: 20.43401 %

Independent variable: Trat

Factors Means  
 10x 8h 4.84375 a  
 10x 4h 4.7275 a  
 10x 6h 1.97625 a

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: MDA  
 Variation Coefficient: 5.8875 %

Independent variable: Trat

Factors Means  
 50x 4h 5.69625 a  
 50x 8h 3.99125 b  
 50x 6h 3.41 b

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: MDA  
 Variation Coefficient: 14.31163 %

Independent variable: Trat

Factors Means  
 50x 4h 5.69625 a  
 10x 4h 4.7275 ab  
 1x 4h 4.37875 ab  
 0x 4h 2.44125 b

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: MDA  
 Variation Coefficient: 11.13035 %

Independent variable: Trat

Factors	Means	
50x 6h	3.41	a
0x 6h	2.98375	ab
1x 6h	2.324925	ab
10x 6h	1.97625	b

TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
Dependent variable: MDA  
Variation Coefficient: 18.46276 %

Independent variable: Trat

Factors	Means	
10x 8h	4.84375	a
50x 8h	3.99125	ab
1x 8h	3.68125	ab
0x 8h	1.97625	b

## APÊNDICE D: ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA CAT

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: CAT  
 Variation Coefficient: 1.549039 %

Independent variable: Trat

Factors Means  
 0 x 8h 518.8492601 a  
 0 x 6h 219.783655 b  
 0 x 4h 104.8382558 c

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: CAT  
 Variation Coefficient: 12.32395 %

Independent variable: Trat

Factors Means  
 1x 8h 468.3801545 a  
 1x 6h 147.00392965 b  
 1x 4h 87.60054817 b

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: CAT  
 Variation Coefficient: 3.69828 %

Independent variable: Trat

Factors Means  
 10x 8h 571.3895268 a  
 10x 4h 125.70863205 b  
 10x 6h 114.03763375 b

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: CAT  
 Variation Coefficient: 4.894465 %

Independent variable: Trat

Factors Means  
 50x 8h 841.1173024 a  
 50x 4h 144.65907105 b  
 50x 6h 111.9450775 b

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: CAT  
 Variation Coefficient: 6.550276 %

Independent variable: Trat

Factors Means  
 50x 4h 144.65907105 a  
 10x 4h 125.70863205 ab  
 0x 4h 104.8382558 bc  
 1x 4h 87.60054817 c

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: CAT  
 Variation Coefficient: 5.81778 %

Independent variable: Trat  
Factors Means  
0x 6h 219.783655 a  
1x 6h 147.00392965 b  
10x 6h 114.03763375 b  
50x 6h 111.9450775 b

TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
Dependent variable: CAT  
Variation Coefficient: 4.783244 %

Independent variable: Trat  
Factors Means  
50x 8h 841.1173024 a  
10x 8h 571.3895268 b  
0x 8h 518.8492601 b  
1x 8h 468.3801545 b

## APÊNDICE E: ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA GST

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: GST  
 Variation Coefficient: 17.64066 %

Independent variable: Trat

Factors Means  
 0 x 8h 0.0126435075 a  
 0 x 4h 0.0107039575 a  
 0 x 6h 0.006463459 a

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: GST  
 Variation Coefficient: 11.21956 %

Independent variable: Trat

Factors Means  
 1x 8h 0.0146135515 a  
 1x 6h 0.0090090635 b  
 1x 4h 0.005945728 b

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: GST  
 Variation Coefficient: 9.29996 %

Independent variable: Trat

Factors Means  
 10x 8h 0.0181326695 a  
 10x 4h 0.010557746 b  
 10x 6h 0.005127837 c

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: GST  
 Variation Coefficient: 16.79654 %

Independent variable: Trat

Factors Means  
 50x 8h 0.0143823105 a  
 50x 6h 0.0076745785 b  
 50x 4h 0.005229246 b

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: GST  
 Variation Coefficient: 15.65143 %

Independent variable: Trat

Factors Means  
 0x 4h 0.0107039575 a  
 10x 4h 0.010557746 a  
 1x 4h 0.005945728 ab  
 50x 4h 0.005229246 b

### TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
 Dependent variable: GST  
 Variation Coefficient: 10.48703 %

Independent variable: Trat  
Factors Means  
1x 6h 0.0090090635 a  
50x 6h 0.0076745785 ab  
0x 6h 0.006463459 ab  
10x 6h 0.005127837 b

TUKEY TEST TO COMPARE MEANS

Confidence level: 0.95  
Dependent variable: GST  
Variation Coefficient: 12.76078 %

Independent variable: Trat  
Factors Means  
10x 8h 0.0181326695 a  
1x 8h 0.0146135515 a  
50x 8h 0.0143823105 a  
0x 8h 0.0126435075 a

## APÊNDICE F: ESTATÍSTICA DE AGRUPAMENTO DA ANÁLISE DE PCA

### Inicial

\*\*\*VECTORS

	PC1	PC2	r2	Pr(>r)	
H2O2	0.98541	-0.17023	0.8793	0.003	**
MDA	0.99826	0.05901	0.8730	0.008	**
CAT	0.40599	0.91388	0.8819	0.007	**
GST	-0.58581	0.81045	0.7475	0.046	*

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Permutation: free

Number of permutations: 999

### Inicial-mediana

\*\*\*VECTORS

	PC1	PC2	r2	Pr(>r)	
H2O2	0.93570	0.35280	0.9851	0.001	***
MDA	-0.35344	0.93546	0.6867	0.073	.
CAT	-0.83492	-0.55038	0.9401	0.002	**
GST	-0.57401	0.81885	0.6655	0.059	.

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Permutation: free

Number of permutations: 999

### Mediana

\*\*\*VECTORS

	PC1	PC2	r2	Pr(>r)	
H2O2	-0.95772	0.28771	0.8175	0.019	*
MDA	0.91411	0.40546	0.6871	0.023	*
CAT	0.54622	-0.83764	0.8905	0.004	**
GST	0.51930	0.85459	0.8354	0.006	**

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Permutation: free

Number of permutations: 999