

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

**JULIANE GABRIELE MARTINS**

**MOLÉCULAS SINALIZADORAS DE *QUORUM SENSING* COMO RESPOSTAS À  
TOXICIDADE DE HERBICIDAS EM *ENTEROBACTER* SP.**

**PONTA GROSSA  
2022**

**JULIANE GABRIELE MARTINS**

**MOLÉCULAS SINALIZADORAS DE *QUORUM SENSING* COMO RESPOSTAS À  
TOXICIDADE DE HERBICIDAS EM *ENTEROBACTER SP.***

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

**PONTA GROSSA  
2022**

M386

Martins, Juliane Gabriele

Moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* como respostas à toxicidade de herbicidas em *Enterobacter* sp. / Juliane Gabriele Martins. Ponta Grossa, 2022. 87 f.

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

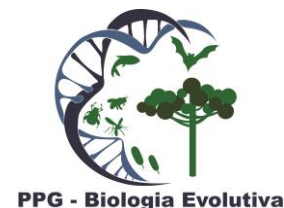
Orientador: Prof. Dr. Marcos Pileggi.

1. Estresse oxidativo. 2. Moléculas auto indutoras. 3. Exopolissacarídeos. 4. Heat. 5. Roundup. I. Pileggi, Marcos. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Evolutiva. III.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°. 07/2022/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, pela candidata Juliane Gabriele Martins.

Aos trinta e um dias de agosto de dois mil e vinte e dois, sob a presidência do(a) Prof. Dr. Marcos Pileggi em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação da aluna **Juliane Gabriele Martins**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de concentração em Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos(as): Dra. Elizangela Paz de Oliveira (UEPG), Prof. Dr. Eduardo César Meurer (UFPR) e Ma. Caroline Rosa Silva (UEPG) – Suplente, Dra. Zelinda Schemczssen Graeff (UFPR) - 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 a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: “Moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* como respostas à toxicidade de herbicidas em *Enterobacter sp.*”. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o candidato **APROVADO**. 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, 31 de agosto de dois mil e vinte e dois.

Prof. Dr. Marcos Pileggi (UEPG)

Dra. Elizangela Paz de Oliveira (UEPG)

Prof. Dr. Eduardo César Meurer (UFPR)

## AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial ao meu pai, pelo apoio, por estar sempre presente, e por todas as vezes que ficou até tarde comigo no laboratório para me ajudar a lavar os materiais. A minha mãe, por sempre me escutar, consolar e ser a melhor amiga. A minha irmã, Elisandra, pela parceria no laboratório (que não foi pouca), por compartilhar tantos momentos, pelos ensinamentos, e principalmente, pela paciência em me aguentar estressada. A minha irmã Andressa, por ser minha inspiração diária.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Pileggi, por todo aprendizado, por ter contribuído para o meu crescimento profissional e pessoal, pela amizade construída ao longo desses anos e por acreditar no meu potencial.

A Banca examinadora, pela disponibilidade e contribuições.

Aos meus amigos da turma do mestrado, em especial a Érica, parceira da micro, com quem desabafei inúmeras vezes. Ao Jhon, meu primeiro amigo da graduação, que apesar de toda correria, continua sempre presente.

Aos meus amados amigos, por terem me acompanhado durante esses anos e pela força em tantos momentos. Todo meu carinho por vocês.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia Ambiental. Em especial, a Carol, por me salvar tantas vezes nas análises estatísticas. Ao Dorozo e ao Bruno, que chegaram anos depois, mas se tornaram meus grandes parceiros. A Gabi, Paola e Gi, pelas conversas e risadas, que deixavam a rotina menos cansativa. A Eliz, pelas contribuições e ensinamentos quando iniciei no lab. Ao Ricardo, pelas explicações. A Vitória, por toda ajuda e parceria em algumas etapas desta pesquisa. E a cada um que faz parte do lab, agradeço por tonarem meus dias mais leves.

A Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao PPG-BioEvol pela oportunidade em cursar o mestrado.

Ao Laboratório Fenn de Espectrometria de Massas, pela disponibilidade no uso do LC-MS/MS, essencial para a realização deste trabalho. Ao Prof. Dr. Eduardo, por ter aberto as portas do LabFenn para que eu pudesse concluir esta pesquisa. A Angélica, pelas contribuições. E a Evelin, por ter me acolhido tão bem e por toda ajuda antes, durante e depois da parte experimental no LabFenn.

A todos os professores, técnicos e funcionários do PPG BioEvol.

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

“Os sonhos são como uma bússola, indicando os caminhos que seguiremos e as metas que queremos alcançar. São eles que nos impulsionam, nos fortalecem e nos permitem crescer.”

(Augusto Cury)

## RESUMO

Com o aumento da população humana, a agricultura precisa elevar sua produtividade em pelo menos 50% para suprir esta demanda. Uma parte desta produção é perdida por causa de ervas daninhas, o que torna o uso de agrotóxicos necessário. Conseqüentemente ocorre contaminação do ambiente e pressão seletiva sobre microbiomas ambientais, podendo alterar ciclos biogeoquímicos dos quais fazem parte. Microrganismos se adaptam a condições tóxicas desenvolvendo estratégias como a produção de exopolissacarídeos (EPS) e formação de biofilmes, que permitem a formação de uma barreira protetora aos antimicrobianos e biocidas. O biofilme é modulado pela comunicação célula-célula, conhecida como *quorum sensing* (QS), que coordena comportamentos coletivos nas comunidades bacterianas e obtêm respostas ao estresse por meio de moléculas auto indutoras. O objetivo desse trabalho foi avaliar uma possível associação entre moléculas sinalizadoras de QS e sistemas de respostas, compostas por enzimas antioxidativas aos herbicidas Heat e Roundup. Foi estudada nesse trabalho a bactéria *Enterobacter* sp. CMA55A, isolada de tanques de lavagem de embalagens de pesticidas, em relação a tolerância aos herbicidas Heat e Roundup, presente e ausente no local de isolamento, respectivamente. Foi realizada extração das moléculas sinalizadoras de QS e analisadas em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Na presença de ambos os herbicidas, as moléculas C6-HSL, C7-HSL e C8-HSL foram geradas. Estas moléculas atuam principalmente na maturação de biofilme, formação de biofilme e proteção contra estresse oxidativo, respectivamente. Há relatos na literatura sobre relação entre moléculas sinalizadoras de QS e produção de EPS, sendo que para a linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A, a produção foi observada para ambos os herbicidas e no controle, possivelmente por um sistema antioxidante modulado por QS, como estratégia para sobreviver a diferentes condições ambientais, inclusive presença de herbicidas. As moléculas C6-HSL e C8-HSL foram produzidas em controle e em 1x, enquanto a molécula C7-HSL foi produzida em 10x, 40x e 50x. Isso pode indicar que a C7-HSL está mais relacionada com sistema de respostas a concentrações mais altas dos herbicidas, mesmo que essa condição não seja normalmente encontrada em solos agrícolas. É possível que a linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A tenha respostas que não dependem da seleção prévia, visto que produziu as mesmas moléculas de QS equivalentes para as mesmas concentrações dos dois herbicidas. Desta forma, sugere-se que o microrganismo possua plasticidade fenotípica para conseguir se adaptar a condições de estresse semelhantes, mesmo que originadas por substâncias diferentes. Os resultados deste trabalho podem servir como triagem para pesquisas sobre a resposta de bactérias a ambientes contaminados, e possíveis usos na biorremediação por consórcios controlados por moléculas sinalizadoras de QS.

**PALAVRAS-CHAVE:** Estresse oxidativo; Moléculas auto indutoras; Exopolissacarídeos; Heat; Roundup.

## ABSTRACT

With the increase in the human population, agriculture needs to increase its productivity by at least 50% to meet this demand. A part of this production is lost to weeds, which makes the use of pesticides necessary. Consequently, contamination of the environment and selective pressure on environmental microbiomes occurs, which can alter biogeochemical cycles of which they are part. Microorganisms adapt to toxic conditions by developing strategies such as the production of exopolysaccharides (EPS) and biofilm formation, which allow the formation of a protective barrier to antimicrobials and biocides. The biofilm is modulated by cell-cell communication, known as quorum sensing (QS), which coordinates collective behaviors in bacterial communities and elicits stress responses through self-inducing molecules. The objective of this work was to evaluate a possible association between QS signaling molecules and response systems, composed of antioxidant enzymes to the herbicides Heat and Roundup. The bacterium *Enterobacter* sp. CMA55A, isolated from pesticide packaging washing tanks, in relation to tolerance to Heat and Roundup herbicides, present and absent at the isolation site, respectively. QS signaling molecules were extracted and analyzed using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. In the presence of both herbicides, molecules C6-HSL, C7-HSL and C8-HSL were generated. These molecules act mainly on biofilm maturation, biofilm formation and protection against oxidative stress, respectively. There are reports in the literature on the relationship between QS signaling molecules and EPS production, and for the *Enterobacter* sp. CMA55A, production was observed for both herbicides and in the control, possibly by an antioxidant system modulated by QS, as a strategy to survive different environmental conditions, including the presence of herbicides. The C6-HSL and C8-HSL molecules were produced in control and 1x, while the C7-HSL molecule was produced in 10x, 40x and 50x. This may indicate that C7-HSL is more related to the response system to higher concentrations of herbicides, even though this condition is not normally found in agricultural soils. It is possible that the *Enterobacter* sp. CMA55A has responses that do not depend on previous selection, as it produced the same equivalent QS molecules at the same concentrations of the two herbicides. Thus, it is suggested that the microorganism has phenotypic plasticity to be able to adapt to similar stress conditions, even if originated by different substances. The results of this work can serve as a screening for research on the response of bacteria to contaminated environments, and possible uses in bioremediation by consortia controlled by QS signaling molecules.

**KEYWORDS:** Oxidative stress; Self-inducing molecules; Exopolysaccharides; Heat; Roundup.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Molécula Saflufenacil, princípio ativo do herbicida Heat.....	14
Figura 2- Molécula Glifosato, princípio ativo do herbicida Roundup Transorb R.....	14
Figura 3 - Sistema <i>quorum sensing</i> (QS) em <i>Vibrio fischeri</i> , uma bactéria gram-negativa.....	19
Figura 4 - Sequência das etapas realizadas na pesquisa.....	22
Figura 5 – Teste de tolerância da linhagem <i>Enterobacter</i> sp. CMA55A após 24 h de incubação em meio LB 0x, 1x, 10x, 40x e 50x do herbicida Heat. Letras minúsculas comparam estatisticamente diferentes tratamentos da mesma fase de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Duncan com 95% de confiança.....	34
Figura 6 – Teste de tolerância da linhagem <i>Enterobacter</i> sp. CMA55A após 24 h de incubação em meio LB 0x, 1x, 10x, 40x e 50x do herbicida Roundup. Letras minúsculas comparam estatisticamente diferentes tratamentos da mesma fase de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Duncan com 95% de confiança.....	35
Figura 7 – Curva de crescimento de <i>Enterobacter</i> sp. CMA55A em LB controle e nos tratamentos contendo o herbicida Heat, nas concentrações de 1x, 10x, 40x e 50x. O teste de Duncan foi usado com 95% de confiança e as barras representam o erro padrão das médias. Da esquerda para a direita, as setas indicam as fases de crescimento lag, log, início da fase estacionária e o período escolhido para os testes. ....	37
Figura 8 – Curva de crescimento de <i>Enterobacter</i> sp. CMA55A em LB controle e nos tratamentos contendo o herbicida Roundup Transorb R, nas concentrações de 1x, 10x, 40x e 50x. O teste de Duncan foi usado com 95% de confiança e as barras representam o erro padrão das médias. Da esquerda para a direita, as setas indicam as fases de crescimento lag, log, início da fase estacionária e o período escolhido para os testes.....	39
Figura 9 – Viabilidade celular de <i>Enterobacter</i> sp. CMA55A após 4 h, 8 h e 12 h de incubação em meio LB 0x (controle), e contendo o tratamento com 1x, 10x, 40x e 50x do herbicida Heat. Letras maiúsculas comparam estatisticamente o mesmo tratamento em diferentes fases do crescimento; letras minúsculas comparam estatisticamente diferentes tratamentos da mesma fase de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Duncan com 95% de confiança.....	42
Figura 10 – Viabilidade celular de <i>Enterobacter</i> sp. CMA55A após 4 h, 7 h e 10 h de incubação em meio LB 0x (controle), e contendo o tratamento com 1x, 10x, 40x e 50x do herbicida Roundup Transorb R. Letras maiúsculas comparam estatisticamente o mesmo tratamento em diferentes fases do crescimento; letras minúsculas comparam estatisticamente diferentes tratamentos da mesma fase de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Duncan com 95% de confiança.....	41
Figura 11 – Viabilidade celular de <i>Enterobacter</i> sp. CMA55A após 15 h de incubação em meio LB 0x, 1x, 10x, 40x e 50x do herbicida Heat. Letras minúsculas comparam estatisticamente diferentes tratamentos da mesma fase de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Duncan com 95% de confiança.....	42
Figura 12 – Viabilidade celular de <i>Enterobacter</i> sp. CMA55A após 15 h de incubação em meio LB 0x, 1x, 10x, 40x e 50x do herbicida Roundup. Letras minúsculas comparam estatisticamente diferentes tratamentos da mesma fase de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Duncan com 95% de confiança.....	43
Figura 13 – Quantificação da produção de EPS de <i>Enterobacter</i> sp. CMA55A após 15 h de incubação em meio LB 0x, 1x, 10x, 40x e 50x do herbicida Heat. Letras minúsculas comparam estatisticamente diferentes tratamentos da mesma fase de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Duncan com 95% de confiança.....	44
Figura 14 – Quantificação da produção de EPS de <i>Enterobacter</i> sp. CMA55A após 15 h de incubação em meio LB 0x, 1x, 10x, 40x e 50x do herbicida Roundup. Letras minúsculas comparam estatisticamente diferentes	

tratamentos da mesma fase de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Duncan com 95% de confiança.....	45
Figura 15 - Correlação de Pearson entre a Produção de EPS e as moléculas sinalizadoras de QS - C6-HSL, C7-HSL e C8-HSL, da linhagem <i>Enterobacter</i> sp. CMA55A, no tratamento contendo o herbicida Heat. Correlação negativa de -1 a 0 e correlação positiva de 0 a 1. ....	46
Figura 16 – Correlação de Pearson entre a Produção de EPS e as moléculas sinalizadoras de QS - C6-HSL, C7-HSL e C8-HSL, da linhagem <i>Enterobacter</i> sp. CMA55A, no tratamento contendo o herbicida Roundup. Correlação negativa de -1 a 0 e correlação positiva de 0 a 1.....	46
Figura 17 - Molécula C6-HSL.....	50
Figura 18 - Molécula C7-HSL.....	48
Figura 19 - Molécula C8-HSL.....	51
Figura 20 – Análise de PCA sobre o perfil de moléculas sinalizadoras de QS na linhagem <i>Enterobacter</i> sp. CMA55A. Tratamentos em quadruplicatas, representados pelos símbolos (0x, 1x, 10x, 40x e 50x). As porcentagens de explicação são PC1= 52,9 e PC2= 29.....	49
Figura 21 – Análise de PCA sobre o perfil de moléculas sinalizadoras de QS <i>Quorum sensing</i> na linhagem <i>Enterobacter</i> sp. CMA55A. Tratamentos em quadruplicatas, representados pelos símbolos (0x, 1x, 10x, 40x e 50x). As porcentagens de explicação são PC1= 52,9 e PC2= 29.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>QS</b>	<i>Quorum sensing</i>
<b>AHLs</b>	N-acil homoserinas lactonas
<b>AQs</b>	2-alquil-4-(1H)-quinolonas
<b>QSSM</b>	Moléculas sinalizadoras de QS
<b>LB</b>	Caldo Luria Bertani
<b>LA</b>	Caldo Luria Bertani com ágar
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colônia
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>EPS</b>	Substâncias poliméricas extracelulares
<b>MOA</b>	Modo de ação
<b>TSR</b>	Sítio alvo
<b>NTSR</b>	Sítio não alvo
<b>SOD</b>	Superóxido dismutases
<b>CAT</b>	Catalases
<b>APX</b>	Ascorbato peroxidases
<b>GPX</b>	Guaiacol peroxidases
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>LC-MS/MS</b>	Sistema de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
<b>ERRO</b>	Espécie Reativa de Oxigênio
<b>EPSPS</b>	Enzima 5-enolpiruvato-chiquimato-3-fosfato sintase
<b>PROTOX</b>	Enzima protoporfirinogênio oxidase
<b>C6-HSL</b>	N-hexanoil-L-homoserina lactona
<b>C7-HSL</b>	N-heptanoil-L-homoserina lactona
<b>C8-HSL</b>	N-octanoil-L-homoserina lactona
<b>C10-HSL</b>	N-decanoil-L-homoserina lactona
<b>C12-HSL</b>	N-dodecanoil-L-homoserina lactona
<b>C14-HSL</b>	N-tetradecanoil-L-homoserina lactona
<b>3-oxo-C6-HSL</b>	N-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona
<b>3-oxo-C7-HSL</b>	N-(3-oxoheptanoil)-L-homoserina lactona
<b>3-oxo-C8-HSL</b>	N-(3-oxooctanoil)-L-homoserina lactona
<b>3-oxo-C10-HSL</b>	N-(3-oxodecanoil)-L-homoserina lactona
<b>3-oxo-C12-HSL</b>	N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona
<b>3-oxo-C14-HSL</b>	N-(3-oxotetradecanoil)-L-homoserina lactona

<b>3-OH-C6-HSL</b>	N-(3-hidroxihexanoil)-L-homoserina lactona
<b>3-OH-C8-HSL</b>	N-(3-hidroxiocetanoil)-L-homoserina lactona
<b>3-OH-C10-HSL</b>	N-(3-hidroxi-decanoil)-L-homoserina lactona
<b>3-OH-C12-HSL</b>	N-(3-hidroxi-dodecanoil)-L-homoserina lactona
<b>UHQ</b>	2-undecil-4-hidroxiquinolina
<b>NQNO</b>	N-óxido de 2-nonil-4-hidroxiquinolina
<b>C9-PQS</b>	3-hidroxi-2-nonil-4(1H)-quinolona
<b>C11-PQS</b>	3-hidroxi-2-undecil-4(1H)-quinolona

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 O USO DE AGROTÓXICOS.....	14
1.2 SISTEMAS DE RESPOSTAS.....	16
1.2.1 Enzimas e outras proteínas .....	16
1.2.2 Biofilme.....	17
1.3 <i>QUORUM SENSING</i> .....	18
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.1 GERAL.....	21
2.2 ESPECÍFICOS.....	21
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
3.1 LINHAGEM BACTERIANA .....	22
3.2 HERBICIDAS .....	22
3.3 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO .....	23
3.4 TRATAMENTOS.....	24
3.5 TESTE DE TOLERÂNCIA .....	24
3.6 CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO .....	24
3.7 VIABILIDADE CELULAR.....	24
3.8 PRODUÇÃO DE EPS.....	25
3.9 EXTRAÇÃO DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS DE <i>QUORUM SENSING</i> .....	25
3.10 ANÁLISE EM LC-MS/MS .....	25
3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	26
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>27</b>
4.1.1 Introdução.....	28
4.1.2 Material e métodos .....	31
4.1.2.1 Linhagem bacteriana .....	31
4.1.2.2 Herbicidas.....	31
4.1.2.3. Meios de cultura e condições de crescimento .....	31
4.1.2.4 Tratamentos .....	31
4.1.2.5 Teste de tolerância.....	32
4.1.2.6 Curva de crescimento bacteriano .....	32
4.1.2.7 Viabilidade celular .....	32
4.1.2.8 Produção de EPS .....	32
4.1.2.9 Extração de moléculas sinalizadoras de <i>quorum sensing</i> .....	33
4.1.2.10 Análise em LC-MS/MS .....	33
4.1.2.11 Análises estatísticas .....	34

4.1.3 Resultados e discussão .....	34
4.1.3.1 Teste de tolerância.....	34
4.1.3.2 Curva de crescimento da linhagem <i>Enterobacter</i> sp. CMA55A.....	36
4.1.3.3 Viabilidade celular da linhagem <i>Enterobacter</i> sp. CMA55A.....	38
4.1.3.4 Produção de EPS da linhagem <i>Enterobacter</i> sp. CMA55A nos tratamentos contendo os herbicidas heat e roundup.....	43
4.1.3.5 moléculas sinalizadoras de <i>quorum sensing</i> na presença dos herbicidas heat e roundup.....	47
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>
<b>APÊNDICE A – TESTE DE DUNCAN SOBRE AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS NAS MÉDIAS DO TESTE DE TOLERÂNCIA NO TRATAMENTO CONTENDO O HERBICIDA HEAT.....</b>	<b>59</b>
<b>APÊNDICE B - TESTE DE DUNCAN SOBRE AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS NAS MÉDIAS DO TESTE DE TOLERÂNCIA NO TRATAMENTO CONTENDO O HERBICIDA ROUNDUP.....</b>	<b>60</b>
<b>APÊNDICE C – TESTE DE DUNCAN SOBRE AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS NAS MÉDIAS DA CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO NO TRATAMENTO CONTENDO O HERBICIDA HEAT. ....</b>	<b>61</b>
<b>APÊNDICE D – TESTE DE DUNCAN SOBRE AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS NAS MÉDIAS DA CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO NO TRATAMENTO CONTENDO O HERBICIDA ROUNDUP TRANSORB R. ....</b>	<b>68</b>
<b>APÊNDICE E – TESTE DE DUNCAN SOBRE AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS NAS MÉDIAS DA VIABILIDADE CELULAR BACTERIANA NO TRATAMENTO CONTENDO O HERBICIDA HEAT. ....</b>	<b>76</b>
<b>APÊNDICE F – TESTE DE DUNCAN SOBRE AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS NAS MÉDIAS DA VIABILIDADE CELULAR BACTERIANA NO TRATAMENTO CONTENDO O HERBICIDA ROUNDUP. ....</b>	<b>79</b>
<b>APÊNDICE G – TESTE DE DUNCAN SOBRE AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS NAS MÉDIAS DA VIABILIDADE CELULAR BACTERIANA NOS TRATAMENTOS CONTENDO OS HERBICIDAS HEAT EM 15H. ....</b>	<b>82</b>
<b>APÊNDICE H – TESTE DE DUNCAN SOBRE AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS NAS MÉDIAS DA VIABILIDADE CELULAR BACTERIANA NOS TRATAMENTOS CONTENDO OS HERBICIDAS ROUNDUP EM 15H. ....</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICE I – TESTE DE ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) SOBRE OS AGRUPAMENTOS DAS MOLÉCULAS SINALIZADORAS DE QS (C6 HSL, C7 HSL E C8 HSL) NOS TRATAMENTOS CONTENDO O HERBICIDA HEAT EM 15H. ....</b>	<b>84</b>
<b>APÊNDICE J – TESTE DE ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) SOBRE OS AGRUPAMENTOS DAS MOLÉCULAS SINALIZADORAS DE QS (C6 HSL, C7 HSL E C8 HSL) NOS TRATAMENTOS CONTENDO O HERBICIDA ROUNDUP EM 15H.....</b>	<b>85</b>
<b>APÊNDICE K – TESTE DE DUNCAN SOBRE AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS NAS MÉDIAS DA PRODUÇÃO DE EPS BACTERIANO NOS TRATAMENTOS CONTENDO OS HERBICIDAS HEAT EM 15H. ....</b>	<b>86</b>

<b>APÊNDICE L – TESTE DE DUNCAN SOBRE AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS NAS MÉDIAS DA PRODUÇÃO DE EPS BACTERIANO NOS TRATAMENTOS CONTENDO OS HERBICIDAS ROUNDUP EM 15H.....</b>	<b>87</b>
--	-----------

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O USO DE AGROTÓXICOS

Com o aumento da população durante os anos, a agricultura conseqüentemente irá elevar a produção de alimentos pelo menos 50% para suprir a demanda da população humana (CAMARGO et al., 2017). Uma parte desta produção agrícola é perdida por causa das plantas com maior capacidade adaptativa, as ervas daninhas, que competem por espaço e nutrientes, o que torna a inserção de agrotóxicos uma alternativa a fim de diminuir esta perda agrícola (JAISWAL; VERMA; YADAV, 2017).

Dentre os grupos de agrotóxicos mais utilizados estão os herbicidas, que podem ser de dois tipos: Os que matam as ervas daninhas por contato; e os sistêmicos, que são absorvidos pelas raízes ou folhas das plantas. O modo de ação (MOA), pode estimular a geração de ERO em ervas daninhas e assim, desencadear estresse na planta (local-alvo) e inibir o crescimento (KAUR, 2019). No entanto, os efeitos dos herbicidas podem acarretar estresse oxidativo nas espécies não-alvos e gerar espécies reativas de oxigênio (ERO).

Dentre os motivos dos herbicidas serem bastante utilizados na agricultura, então a fácil aplicabilidade, baixo custo e eficácia na diminuição das ervas daninhas. Porém, o uso intensificado de herbicidas, pode causar pressão de seleção e resultar em evolução dos mecanismos de resistência nas pragas, não surtindo o efeito esperado e sendo utilizados cada vez mais herbicidas. Existem dois tipos de resistência aos herbicidas: resistência por sítio alvo (TSR) e resistência por sítio não alvo (NTSR). O TSR está associado às mudanças gênicas frente aos herbicidas, e o NTSR envolve resistência no metabolismo (GAINES et al., 2020).

Os herbicidas utilizados neste trabalho são o Heat, que possui como molécula ativa o saflufenacil, e o Roundup Transorb R, que possui como princípio ativo o glifosato. A estrutura molecular do Heat e Roundup são representadas nas figuras 1 e 2, respectivamente.

Figura 1- Molécula Saflufenacil, princípio ativo do herbicida Heat

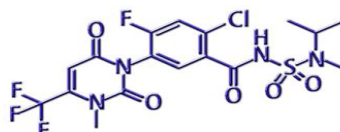
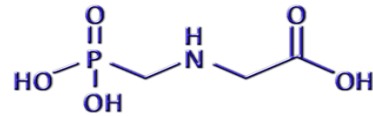




Figura 2- Molécula Glifosato, princípio ativo do herbicida Roundup Transorb R



Fonte: Weed science. Disponível em: <http://www.weedscience.org/Pages/Herbicide.aspx#>. Acesso em: 23 nov. 2021.

O saflufenacil inibe a protoporfirinogênio oxidase (PPO ou PROTOX), que atua na oxidação da protoporfirinogênio para protoporfirina IX, que é a precursora da clorofila e aglomerados de heme. Quando a PROTOX é inibida, acontece o acúmulo de protoporfirinogênio IX no cloroplasto, se dispersando no citoplasma e sendo transformado em protoporfirina IX no citoplasma, que se acumula nesse local, e com a presença de luz e oxigênio ocorre a produção de espécies reativas ao oxigênio (ERO) (ALVES et al., 2018). A PROTOX não é uma enzima presente apenas em ervas daninhas, sendo encontrada em algumas bactérias e cianobactérias, o que torna o Heat prejudicial aos microrganismos também (THIOUR-MAUPRIVEZ et al., 2019).

O Heat é usado como alternativa no controle de ervas daninhas que são resistentes ao Glifosato, e por este motivo, sua utilização está aumentando no ambiente agrícola. Entretanto, a relação com os impactos ambientais, a possibilidade de diminuição sua eficiência agrícola e contaminação de ecossistemas ainda são fatores pouco conhecidos para o herbicida Heat (BARCELLOS JÚNIOR et al., 2020).

O glifosato atua na inibição da enzima 5-enolpiruvato-chiquimato-3-fosfato sintase (EPSP sintase), que é importante na catálise entre chiquimato-3-fosfato (S3P) e fosfoenolpiruvato (PEP), para formar 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato (EPSP). A EPSP é um intermediário na formação de corismato, precursor dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano, que geram grande variedade de metabólitos secundários e intermediários do ramo principal da via chiquimato em plantas. Quando glifosato inibe a EPSP sintase, bloqueia a formação destes aminoácidos aromáticos que são essenciais para sobrevivência celular (COMONT et al., 2020).

O glifosato possui lixiviação rápida nos solos devido a sua alta mobilidade e solubilidade em solventes hidrofílicos (SINGH et al., 2020). É um dos herbicidas organofosforados mais usados na agricultura, pois possui alta eficácia contra ervas daninhas,

entretanto, o glifosato acaba se acumulando e sendo responsável por danos ambientais (GRUBE et al., 2019).

O acúmulo do glifosato ao longo da cadeia alimentar é um problema tanto para os ecossistemas terrestres e aquáticos como para a saúde humana e de outros animais (SINGH et al., 2020; ZHAN et al., 2018). Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (2015), o glifosato, é considerado como provavelmente carcinogênico para humanos (GRUBE et al., 2019).

A presença de pesticidas no solo resulta em um ambiente hostil para microrganismos sobreviverem, por isso estratégias como a formação de biofilme e *quorum sensing* (QS) tornam-se necessárias (LIMA et al., 2020). A associação entre algumas moléculas sinalizadoras específicas de QS em tratamentos com herbicidas, como o Heat e o Roundup, indica que pode haver uma resposta ao estresse oxidativo gerado por estes xenobióticos. O QS pode ajudar na expressão de algumas enzimas antioxidantes, como a SOD e CAT, e, portanto, diminuir os efeitos negativos causados pelo estresse oxidativo (FREITAS et al., 2021).

Os herbicidas podem causar o desequilíbrio entre a produção e eliminação de ERO e, conseqüentemente, resulta em distúrbios metabólicos celulares em bactérias, afetando a diversidade microbiana do solo, que é importante para a fertilidade, ciclagem de nutrientes e fixação de nitrogênio (OLIVEIRA et al., 2021). Os microrganismos podem diminuir sua densidade celular máxima e o tempo de crescimento celular quando estão na presença de glifosato, sulfentrazone e diuron (BARROSO et al., 2020). Em uma linhagem de *Escherichia coli*, por exemplo, o herbicida mesotrione gerou estresse oxidativo e diminuiu as taxas de crescimento da população (OLCHANHESKI et al., 2014).

## 1.2 SISTEMAS DE RESPOSTAS

Ambientes contaminados com xenobióticos podem gerar condições estressantes e seletivas para microrganismos. Desta maneira, fatores como adaptação metabólica e fisiológica são essenciais para garantir sobrevivência a locais tóxicos. Essas mudanças podem ocorrer por diferentes respostas aos metabólitos (LIMA et al., 2020).

### 1.2.1 Enzimas e outras proteínas

Alguns microrganismos podem tolerar herbicidas a partir de respostas não específicas, ligadas a mecanismos gerais de repostas adaptativas (THIOUR-MAUPRIVEZ et

al., 2019). Por exemplo, as bombas de efluxo, que são proteínas transportadoras de substratos do interior para o exterior da célula, podem ser bombas primárias, que recebem energia da hidrólise de ATP; ou bombas secundárias, que recebem energia do gradiente químico formado por íons (PATHANIA et al., 2019).

Os herbicidas alteram os sistemas antioxidantes de muitos organismos não-alvos, acarretando a produção de ERO, que causa desequilíbrios metabólicos e oxidativos nas células (KAUR, 2019). As enzimas antioxidantes têm papel importante no processo de tolerância desses biocidas, conseguindo diminuir as EROs e os efeitos de oxidação celular (LEI et al., 2016). As principais enzimas antioxidantes que atuam no controle dos níveis de ERO são as catalases (CAT), superóxido dismutases (SOD), ascorbato peroxidases (APX) e guaiacol peroxidases (GPX) (KAUR, 2019). Esse sistema de enzimas pode contribuir para a adaptação aos nichos com presença constante de biocidas (BRICEÑO et al., 2020). Outra resposta que os microrganismos podem ter em relação aos xenobióticos é a degradação. A degradação microbiana de biocidas é específica e baseada em reações enzimáticas (THIOUR-MAUPRIVEZ et al., 2019). Mas para que a degradação microbiana por meio de enzimas aconteça, primeiramente as bactérias precisam tolerar o estresse oxidativo acarretado pelos xenobióticos, o que pode ocorrer pelo complexo sistema de respostas antioxidativo (PILEGGI et al., 2020). Assim, torna-se importante avaliar o papel dessas respostas à toxicidade dos herbicidas.

### 1.2.2 Biofilme

Antes as bactérias eram consideradas seres que viviam individualmente e que realizavam apenas processos simples. Mas atualmente, tem-se conhecimento que conseguem formar consórcios microbianos e biofilmes, o que ajuda na sobrevivência quando ocorrem mudanças ambientais (MUKHERJEE; BASSLER, 2019; ZHANG et al., 2018). O biofilme é uma matriz de polímeros, que permite a fixação de comunidades microbianas em superfícies, como em tecidos pulmonares, válvulas cardíacas, ossos, dentes, polietileno etc., secretando fibrinas, proteínas lipídicas e matriz de polissacarídeos (LI; ZHAO, 2020).

A formação do biofilme passa por alguns estágios, sendo o primeiro e mais importante à adesão na superfície do hospedeiro, que geralmente ocorre de duas formas: ligação a proteínas na membrana externa do hospedeiro, e adesão na superfície exopolissacarídeos (EPS). Posteriormente vem as etapas de maturação e dispersão (MACHADO et al., 2019). Na etapa de maturação, as células se comunicam por sinais auto

indutores, que levam a secreção de moléculas sinalizadoras de QS. Para ocorrência da maturação, algumas moléculas são essenciais, como as C9-PQS, C11-PQS, UHQ e NQNO, que produzem piocianina e sideróforos que podem auxiliar na formação do biofilme, aumentando as interações da matriz com a superfície (ALDECOA et al, 2017), e a C6-HSL, que também atua na maturação de EPS (ALAYANDE et al., 2018). O EPS confere suporte estrutural às comunidades em aspectos físicos (adesão, proteção, coesão), químicos (pH, nutrição, metabólitos) e na proteção contra antimicrobianos, aumentando o potencial de patogenicidade (SADIQ et al., 2021).

Na última etapa, de dispersão, as células microbianas estão envoltas no biofilme realizando multiplicação e se dispersam rapidamente convertendo a forma sésil para forma móvel. Durante esse processo, as bactérias produzem diferentes enzimas sacarolíticas que contribuem na colonização de uma nova área. É nessa etapa que as células regulam a expressão de proteínas relacionadas na formação de flagelos (JAMAL et al., 2017).

Desta maneira, comunidades microbianas que formam biofilme possuem maior resistência a ambientes tóxicos, antibióticos e ao sistema imunológico do hospedeiro (GALIÉ et al., 2018). Devido a uma barreira protetora que é formada, quando o biofilme é aderido, fica difícil para retirar (LI; ZHAO, 2020), agravando casos de infecções, sendo necessária a utilização de alternativas aos antibióticos para combater as bactérias patogênicas (IBRAHIM et al., 2021). Um exemplo de bactéria patogênica que complica quadros de pacientes com infecções é a *Pseudomonas aeruginosa.*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, e o biofilme contribui para o sucesso da patogenicidade destas espécies (NZAKIZWANAYO et al., 2017).

No trabalho de Lima et al. (2020), foram isoladas bactérias dos gêneros *Enterobacter*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas* de tanques de lavagem de embalagem de agrotóxicos, onde havia condições estressantes, como aquecimento da água, presença de cloro, flúor e xenobióticos. Esses microrganismos ficaram sobrevivendo nessas condições por longo período, o que pode ser explicado possivelmente pela formação de biofilme, sistema de transporte de membrana, sinalização da comunicação entre as bactérias e detecção da densidade celular, conhecida como *quorum sensing* (QS) (WINSTANLEY; RUMBAUGH, 2018).

### 1.3 QUORUM SENSING

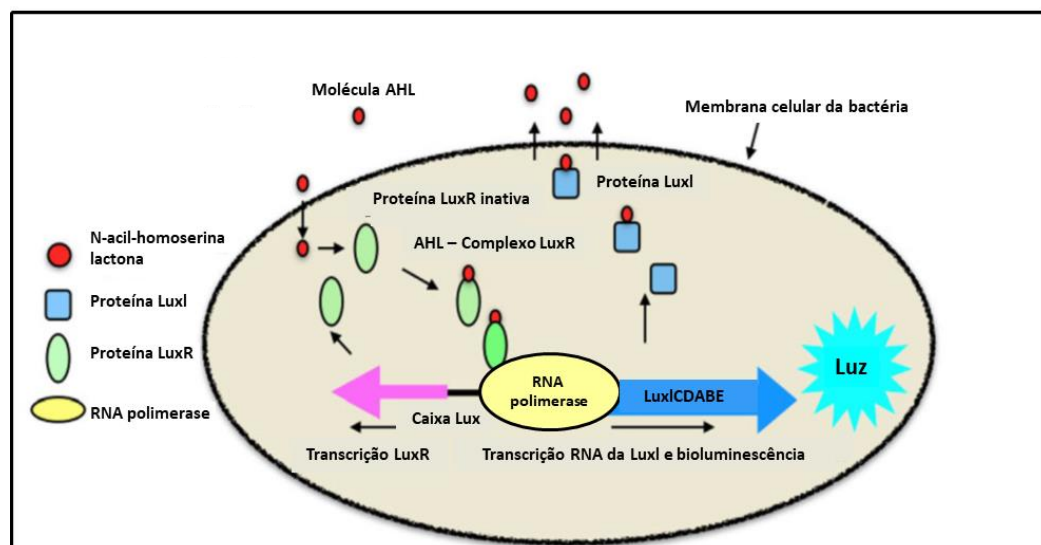
O QS é um sistema de comunicação realizado por meio de moléculas sinalizadoras e genes específicos (WHITELEY et al., 2017), reconhece a densidade populacional por meio

das moléculas de comunicação, a N-acil-homoserina-lactonas (AHLs), que está envolvida em diversos processos, como no comportamento de fatores de virulência e formação de biofilme (FREITAS et al., 2021), transferência horizontal de genes (TANG et al., 2018), controla a expressão do sistema imunológico CRISPR-CAS em *Pseudomonas aeruginosa* e em *Serratia* sp. (BROWNIWESKI et al., 2021), motilidade, além de relações simbióticas entre bactérias e invertebrados marinhos (FRANCO et al., 2018), tolerância a metais, como foi visualizado em uma linhagem de *Acinetobacter* sp. (SARKAR; CHAKRABORTY, 2008).

Tanto bactérias Gram-positivas, como Gram-negativas são capazes de realizar o QS. As bactérias Gram-positivas utilizam oligopeptídeos como auto indutores e seus receptores das moléculas são transmembranas quinases. Já as bactérias Gram-negativas, utilizam moléculas auto indutoras, duas moléculas receptoras para detectar as auto indutoras, as AHLs (MUKHERJEE; BASSLER, 2019).

As moléculas AHLs foram descobertas entre as décadas de 1960 e 1970, na bactéria marinha *Vibrio fischeri*, por atividade auto indutora condicionada com alta densidade celular, ativa sua bioluminescência. Por meio do sistema LuxI/LuxR produz a molécula N-3-oxo-hexanoil-homoserina lactona (3OC6-HSL). Esta molécula faz a ligação da proteína LuxR com o fator de transcrição LuxI, ativando os genes que permitem a ocorrência da bioluminescência, como é mostrado na Fig. 3 (ABISADO et al., 2018).

Figura 3 - Sistema *quorum sensing* (QS) em *Vibrio fischeri*, uma bactéria gram-negativa.



Fonte: Adaptado de PRESCOTT; DECHO, 2019.

Para que o QS ocorra, as bactérias devem conseguir detectar a variedade de sinais químicos, incorporar circuitos QS de vizinhos em seus próprios genomas, alterar quais

conjuntos de genes são ativados por QS ou ter a capacidade de aclimatar as mudanças da proteína receptora LuxR (PRESCOTT; DECHO, 2019).

A maior parte das sintases AHL do tipo LuxI produzem AHLs a partir de S-adenosilmetionina (SAM), e uma proteína transportadora de acila acilada (ACP) da via de biossíntese de ácidos graxos. As cadeias laterais de acil graxo podem variar em comprimento na terceira posição de carbono, e essa variação é responsável pela especificidade dos diferentes sistemas. O terminal N de LuxR interage com AHLs, induzindo o homólogo LuxR no promotor alvo. O LuxR ligado a AHL induz a transcrição de seu gene da sintase de sinal LuxI, resultando em um ciclo de feedback positivo, que aumenta proporcionalmente a concentração de AHL (ABISADO et al., 2018).

O comportamento da comunidade microbiana é regulado pelo QS, assim como a formação de biofilme, que pode causar resistência aos antimicrobianos e dificultar o tratamento de pessoas com infecções, além de conferir outras vantagens adaptativas como a sobrevivência a diversos ambientes. A interrupção do QS é uma importante estratégia na área clínica, podendo diminuir a formação de biofilmes associados a condições de patogenicidade e, conseqüentemente, promover a melhora na saúde de pacientes (LI; ZHAO, 2020; LU et al., 2021). Na área ambiental, linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*, exposta a nicotina, (TANG et al., 2018), e *Pseudomonas fluorescens*, exposta aos herbicidas Heat e Roundup *in vitro* (FREITAS et al., 2021), conseguiram tolerar o estresse oxidativo gerado possivelmente por meio da formação de biofilme coordenada por QS. Geralmente a detecção do QS pode ser inibida em células em estado não cultivável por meio do atraso ou bloqueio da geração das moléculas de detecção, ou pelo uso de homólogos das moléculas de QS bloqueando receptores, ou ainda pela degradação enzimática do sinal das moléculas de AHL por acilase e lactase (LI; ZHAO, 2020).

As bactérias também podem desenvolver resistência e tolerância aos biocidas utilizados na agricultura (ISEPPI et al., 2020). O sistema QS modulado pelas AHLs, além de estar envolvido nas etapas da formação do biofilme, auxilia na sobrevivência das comunidades microbianas em diferentes nichos ambientais, conferindo resistência a xenobióticos, falta de nutrientes, estresse oxidativos, entre outras possíveis mudanças que os microrganismos podem encontrar (LAN et al., 2014).

Desta forma, esse trabalho procurou avaliar se ocorre associação entre as moléculas sinalizadoras de QS em uma linhagem bacteriana em resposta aos herbicidas Heat e Roundup, presente e ausente no local de isolamento, respectivamente.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

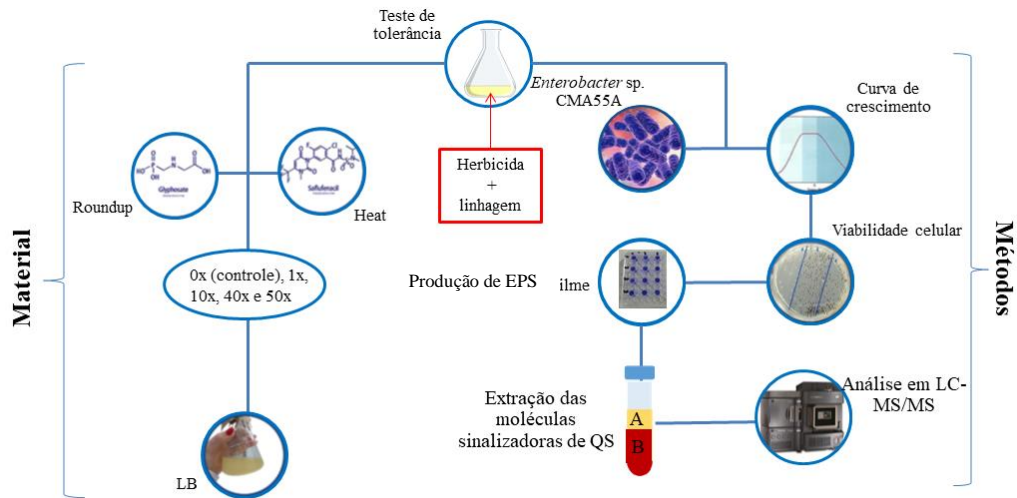
Avaliar se o QS é um dos mecanismos envolvidos na tolerância de *Enterobacter* sp. CMA55A aos herbicidas Heat e Roundup, e se essa resposta depende ou não da exposição prévia.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência dos tratamentos com os herbicidas Heat (Saflufenacil) e Roundup Transorb R (Glifosato) no estresse oxidativo em *Enterobacter* sp. CMA55A;
- Avaliar se há a geração de moléculas específicas de QS para os herbicidas Heat e Roundup pela linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Figura 4 – Sequência das etapas realizadas na pesquisa



Fonte: A autora.

Nota: Inicialmente foi selecionada a linhagem bacteriana *Enterobacter sp. CMA55A*, o meio de crescimento Luria Bertani (LB), os herbicidas Heat com o princípio ativo Saflufenacil e Roundup com o princípio ativo Glifosato, e as concentrações de 0x, 1x, 10x, 40x e 50x utilizadas nos tratamentos. Os experimentos realizados foram o teste de tolerância, curva de crescimento, viabilidade celular, produção de EPS, extração das moléculas sinalizadoras de QS (A – fase orgânica e B – fase aquosa) e análise em LC-MS/MS.

#### 3.1 LINHAGEM BACTERIANA

A linhagem bacteriana utilizada foi a *Enterobacter sp. CMA55A* (NCBI nucleotide database - OL598345), coletada na Fazenda Escola Capão da Onça da UEPG em tanques de armazenamento de água usada na lavagem de embalagens de agrotóxicos. Esta linhagem bacteriana está estocada em glicerol 50% a -80 °C na Coleção de Microrganismos Ambientais do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG.

#### 3.2 HERBICIDAS

O herbicida Heat, contendo o princípio ativo saflufenacil (N'-(2-cloro-4-fluor-5-[1,2,3,6-tetrahydro-3-metil-2,6-dioxe-4-(trifluorometil)pirimidina-1-il]benzoi)-N-isopropil-N-metilsulfamida), e o herbicida Roundup Transorb R, contendo o princípio ativo Glifosato (Sal de Potássio de (N-(fosfonometil)glicina) foram utilizados.



A lista de agrotóxicos presentes nos tanques de armazenamento de água utilizada na lavagem de embalagens de agrotóxicos é apresentada na Tabela 1 (LIMA et al., 2020).

**Tabela 1. Lista de agrotóxicos presentes nos tanques de armazenamento de água, mantida por 6 meses, na BASF – Brasil, Estação Experimental, utilizada na lavagem de embalagens de agrotóxicos**

<b>Fungicidas</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Composição</b>
Abacus HC	BASF	Pyraclostrobin, epoxiconazole
Ativum EC	BASF	Epoxiconazole, fluxapyroxad, pyraclostrobin
Brio	BASF	Epoxiconazole, kresoxim-methyl
Caramba 90	BASF	Metconazole
Comet	BASF	Pyraclostrobin, epoxiconazole
Corbel	BASF	Fempropimorph
Difere	Oxiquímica	Copper oxychloride, metallic copper equivalent
Forum Plus	BASF	Dimethomorph, chlorothalonil
Fox	Bayer	Trifloxystrobin, prothioconazole
Opera SE	BASF	Pyraclostrobin, epoxiconazole
Opera Ultra	BASF	Pyraclostrobin, metconazole
Orkestra SC	BASF	Fluxapyroxad, pyraclostrobin
Priori	Syngenta	Azoxystrobin
Priori Xtra	Syngenta	Azoxystrobin, cyproconazole
Tilt	Syngenta	Propiconazole
<b>Herbicidas</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Composição</b>
Ally	Du Pont	Metsulfuron-methyl
Aminol 806	Adama	2,4-D dimethylamine, acid equivalent of 2,4-D
Atectra	BASF	Dicamba
Heat	BASF	Saflufenacil
Topik 240 EC	Syngenta	Clodinafop-propargyl
<b>Inseticidas</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Composição</b>
Cruiser 350 FS	Syngenta	Thiamethoxam
Engeo Pleno	Syngenta	Thiamethoxam, lambda-cyhalothrin
Fastac Duo	BASF	Acetamiprid, alpha-cypermethrin
Imunit	BASF	Alpha-cypermethrin, teflubenzuron
Nomolt 150	BASF	Teflubenzuron
Pirate	BASF	Chlorfenapyr
Standak Top	BASF	Pyraclostrobin, thiophanate-methyl, fipronilI88
<b>Adjuvantes</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Composição</b>
Aureo	Bayer	Soybean oil methyl ester
Assist	BASF	Mineral oil
Nimbus	Syngenta	Mineral oil
<b>Regulador de crescimento</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Composição</b>
Moddus	Syngenta	Trinexapac-ethyl

Fonte: Lima et al. 2020.

### 3.3 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

O pré-inóculo da linhagem foi feito em caldo Luria-Bertani (LB: NaCl 10g/L, Triptona 10g/L e Extrato de Levedura 5g/L), e em Luria-Bertani com ágar (LA: LB com a adição de 20 g/L ágar). Os experimentos foram realizados em triplicata, e as condições de crescimento bacteriano foram a 30 °C sob agitação a 120 rpm por 24 h.

### 3.4 TRATAMENTOS

Para os tratamentos com os herbicidas foi utilizado o Meio LB suplementado com Heat nas concentrações de 0,49 mM; 4,9 mM; 19,6 mM; e 24,5 mM; e para o Roundup nas concentrações de 0,23 mM; 2,3 mM; 9,2 mM; e 11,5 mM. Estas concentrações equivalem a 1x, 10x, 40x e 50x às aplicadas na agricultura, respectivamente. O controle foi definido como 0x.

### 3.5 TESTE DE TOLERÂNCIA

Para o teste de tolerância foram utilizadas as mesmas condições de crescimento descritas no item 3.3. A densidade ótica (D.O) inicial foi de 0,05 de absorbância (abs) a 600 nm. Após 24 h do crescimento da cultura bacteriana em controle e em meio LB contendo os tratamentos Heat ou Roundup Transorb R a 1x, 10x, 40x e 50x, alíquotas de 1 mL foram retiradas e o crescimento foi analisado em espectrofotômetro a 600 nm.

### 3.6 CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO

A cultura foi incubada conforme descrito no item 3.3, em meios contendo os herbicidas Heat e Roundup Transorb R a 0x, 1x, 10x, 40x e 50x. O inóculo foi padronizado a uma densidade ótica (DO) inicial de 0,05 de absorbância (abs) a 600 nm. O crescimento foi avaliado nos tratamentos a cada 1h a 600 nm em espectrofotômetro.

### 3.7 VIABILIDADE CELULAR

Para avaliação da viabilidade celular, foram utilizadas as mesmas condições do pré-inóculo descritas no item 3.3. Alíquotas de 100 µL foram retiradas nas fases lag, log e fase estacionária, determinadas na curva de crescimento. As amostras foram diluídas em solução salina (NaCl a 0,9%), e inoculadas por espalhamento em LA, e incubadas por 24 h a 30 °C. Para determinar o número de células viáveis presente na amostra, foram contabilizadas as unidades formadoras de colônias (UFC).

### 3.8 PRODUÇÃO DE EPS

A produção de EPS foi realizada por meio do método descrito por Tang et al. (2018), com modificações. As condições de crescimento foram descritas no item 3.3. Foi adicionado 200 µL da cultura bacteriana em microplacas e foram incubadas em shaker por um período de 15 h a 30 °C. O meio de cultura foi descartado e nas células aderidas a superfície foram adicionados 200 µL de corante cristal violeta a 0,1%, que permaneceu reagindo pelo período de 30 min. O corante foi removido e os poços lavados três vezes com água destilada. Foram adicionados 200 µL de etanol 95% e a amostra foi analisada em leitor de microplacas a 570 nm (Elx808™, BioTek, Winooski, VT, EUA).

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

A extração das moléculas de QS ocorreu de acordo com o método de Ortori et al. (2010), com modificações. Foi realizada pela extração líquido-líquido, no período de 15 h de crescimento bacteriano. Após o crescimento da cultura bacteriana conforme as condições descritas no item 3.3, foram retiradas 100 mL e centrifugadas a 8.000 g por 5 min. Foram coletados 10 mL do sobrenadante e adicionados 20 µL do padrão interno N-heptanoil-L-homoserina lactona (C7-HSL), a solução foi centrifugada a 8.000 g por 5 min. Foram adicionados 10 mL de acetato de etila acidificado com 0,01% de ácido acético no sobrenadante. A solução foi centrifugada a 8.000 g por 5 min, e a fase orgânica foi coletada. As amostras foram secadas na estufa a 30 °C e armazenadas a -20 °C. Antes da análise em LC-MS/MS, foi adicionado 100 µL de metanol (MeOH) e homogeneizado em vórtex durante um minuto.

### 3.10 ANÁLISE EM LC-MS/MS

As análises de LC-MS/MS foram obtidas por meio do método descrito por Ortori et al. (2010), com modificações. O equipamento utilizado foi o modelo Quatro Premier XE triplo quadrupolo (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA), e o software MassLynx (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA). A coluna utilizada foi C18 3,5µm, (4,6 x 50 mm). Foram injetados 10 uL dos extratos preparados conforme o item 3.9. A fase móvel foi constituída de 0,1% de ácido fórmico, 70% de acetonitrila e 30% de água ultrapura. O perfil do gradiente foi isocrático a uma taxa de fluxo de 0,3 mL/min. O

multiplicador foi de 550 V, a ionização foi no modo positivo, e a energia de colisão foi de 15 VA temperatura de dessolvatação foi de 400 °C e do bloco foi de 110 °C. O fluxo de gás de dessolvatação foi de 300 L/H, fluxo de gás do cone foi de 0 L/H, e o fluxo de gás de colisão 0.14 mL/min. A otimização dos parâmetros analíticos em MS/MS foi realizada por meio da infusão do padrão interno N-heptanoil-L-homoserina lactona (C7-HSL), e dos padrões analíticos N-hexanoil-L-homoserina lactona (C6-HSL) e N-octanoil-L-homoserina lactona (C8-HSL).

### 3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas da curva de crescimento, viabilidade celular e produção de EPS foram submetidas à análise da variância e ao teste de Duncan. As análises do QS foram submetidas à análise de componentes principais (PCA). As análises de correlação entre as moléculas de QS e produção de EPS foram submetidas à análise de correlação de Pearson. Para tanto, foi usado o pacote ggplot2 do software R versão 4.1.0.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* como respostas à toxicidade de herbicidas em *Enterobacter* sp.

*Quorum sensing* signaling molecules as responses to herbicide toxicity in *Enterobacter* sp.

#### RESUMO

Com o aumento da população humana, a agricultura precisa elevar sua produtividade em pelo menos 50% para suprir esta demanda. Uma parte desta produção é perdida por causa de ervas daninhas, o que torna o uso de agrotóxicos necessário. Consequentemente ocorre contaminação do ambiente e pressão seletiva sobre microbiomas ambientais, podendo alterar ciclos biogeoquímicos dos quais fazem parte. Microrganismos se adaptam a condições tóxicas desenvolvendo estratégias como a produção de EPS e formação de biofilmes, que permitem a formação de uma barreira protetora aos antimicrobianos e biocidas. O biofilme é modulado pela comunicação célula-célula, conhecida como *quorum sensing* (QS), que coordena comportamentos coletivos nas comunidades bacterianas e obtêm respostas ao estresse por meio de moléculas auto indutoras. A tolerância ao estresse oxidativo causado por xenobióticos, como os herbicidas, pode ocorrer via atividade de enzimas antioxidativas seguido então pela degradação dos mesmos. Contudo, a necessidade da presença de herbicidas específicos como agentes seletivos para esses mecanismos, e os consequentes impactos na diversidade e nas funções ambientais realizadas por microbiomas ainda são poucos estudados. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar uma possível associação entre moléculas sinalizadoras de QS e sistemas de respostas, compostas por enzimas antioxidativas aos herbicidas Heat e Roundup. Foi estudada nesse trabalho a bactéria *Enterobacter* sp. CMA55A, isolada de tanques de lavagem de embalagens de pesticidas, em relação a tolerância aos herbicidas Heat e Roundup, presente e ausente no local de isolamento, respectivamente. Foi realizada extração das moléculas sinalizadoras de QS e analisadas em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Na presença de ambos herbicidas, as moléculas C6-HSL, C7-HSL e C8-HSL foram geradas. Estas moléculas atuam principalmente na maturação de biofilme, formação de biofilme e proteção contra estresse oxidativo, respectivamente. Há relatos na literatura sobre relação entre moléculas sinalizadoras de QS e produção de EPS, sendo que para a linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A, a produção foi observada para ambos os herbicidas e no controle, possivelmente por um sistema antioxidante modulado por QS, como estratégia para sobreviver a diferentes condições ambientais, inclusive presença de herbicidas. As moléculas C6-HSL e C8-HSL foram produzidas em controle e em 1x, enquanto a molécula C7-HSL foi produzida em 10x, 40x e 50x. Isso pode indicar que a C7-HSL está mais relacionada com sistema de respostas a concentrações mais altas dos herbicidas, mesmo que essa condição não seja normalmente encontrada em solos agrícolas. É possível que a linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A tenha respostas que não dependem da seleção prévia, visto que produziu as mesmas moléculas de QS equivalentes para as mesmas concentrações dos dois herbicidas. Desta forma, sugere-se que o microrganismo possua plasticidade fenotípica para conseguir se adaptar a condições de estresse semelhantes, mesmo que originadas por substâncias diferentes. Os resultados deste trabalho podem servir como triagem para pesquisas sobre a resposta de bactérias a ambientes contaminados, e possíveis usos na biorremediação por consórcios controlados por moléculas sinalizadoras de QS.

**PALAVRAS-CHAVE:** Estresse oxidativo; Moléculas auto indutoras; Exopolissacarídeos; Heat; Roundup.

### ABSTRACT

With the increase in the human population, agriculture needs to increase its productivity by at least 50% to meet this demand. A part of this production is lost to weeds, which makes the use of pesticides necessary. Consequently, contamination of the environment and selective pressure on environmental microbiomes occurs, which can alter biogeochemical cycles of which they are part. Microorganisms adapt to toxic conditions by developing strategies such as the production of exopolysaccharides (EPS) and biofilm formation, which allow the formation of a protective barrier to antimicrobials and biocides. The biofilm is modulated by cell-cell communication, known as quorum sensing (QS), which coordinates collective behaviors in bacterial communities and elicits stress responses through self-inducing molecules. The objective of this work was to evaluate a possible association between QS signaling molecules and response systems, composed of antioxidant enzymes to the herbicides Heat and Roundup. The bacterium *Enterobacter* sp. CMA55A, isolated from pesticide packaging washing tanks, in relation to tolerance to Heat and Roundup herbicides, present and absent at the isolation site, respectively. QS signaling molecules were extracted and analyzed using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. In the presence of both herbicides, molecules C6-HSL, C7-HSL and C8-HSL were generated. These molecules act mainly on biofilm maturation, biofilm formation and protection against oxidative stress, respectively. There are reports in the literature on the relationship between QS signaling molecules and EPS production, and for the *Enterobacter* sp. CMA55A, production was observed for both herbicides and in the control, possibly by an antioxidant system modulated by QS, as a strategy to survive different environmental conditions, including the presence of herbicides. The C6-HSL and C8-HSL molecules were produced in control and 1x, while the C7-HSL molecule was produced in 10x, 40x and 50x. This may indicate that C7-HSL is more related to the response system to higher concentrations of herbicides, even though this condition is not normally found in agricultural soils. It is possible that the *Enterobacter* sp. CMA55A has responses that do not depend on previous selection, as it produced the same equivalent QS molecules at the same concentrations of the two herbicides. Thus, it is suggested that the microorganism has phenotypic plasticity to be able to adapt to similar stress conditions, even if originated by different substances. The results of this work can serve as a screening for research on the response of bacteria to contaminated environments, and possible uses in bioremediation by consortia controlled by QS signaling molecules.

**KEYWORDS:** Oxidative stress; Self-inducing molecules; Exopolysaccharides; Heat; Roundup.

#### 4.1.1 Introdução

Para suprir a demanda da população humana, que está aumentando durante os anos, a agricultura irá aumentar sua produção agrícola alimentícia (CAMARGO et al., 2017). Porém, parte desta produção é perdida por causa das ervas daninhas, que competem por espaço e

nutrientes, o que torna o uso de agrotóxicos uma alternativa a fim de diminuir os impactos negativos causados pelos agrotóxicos (JAISWAL; VERMA; YADAV, 2017).

Dentre os grupos de agrotóxicos mais utilizados estão os herbicidas. O uso intensificado de herbicidas, pode causar pressão de seleção, resultando em evolução dos mecanismos de resistência nas pragas, não surtindo o efeito esperado e sendo utilizados cada vez mais herbicidas. Os herbicidas utilizados neste trabalho são o Heat, que possui como molécula ativa o saflufenacil, e o Roundup Transorb R, que possui como princípio ativo o glifosato.

O saflufenacil inibe a protoporfirinogênio oxidase (PPO ou PROTOX), que atua na oxidação da protoporfirinogênio para protoporfirina IX, que é a precursora da clorofila e aglomerados de heme. Quando a PROTOX é inibida, acontece o acúmulo de protoporfirinogênio IX no cloroplasto, se dispersando no citoplasma e sendo transformado em protoporfirina IX no citoplasma, que se acumula nesse local, e com a presença de luz e oxigênio ocorre a produção de espécies reativas ao oxigênio (ERO) (ALVES et al., 2018). A PROTOX não é uma enzima presente apenas em ervas daninhas, sendo encontrada em algumas bactérias e cianobactérias, o que torna o Heat prejudicial aos microrganismos também (THIOUR-MAUPRIVEZ et al., 2019).

O glifosato atua na inibição da enzima 5-enolpiruvato-chiquimato-3-fosfato sintase (EPSP sintase), que é importante na catálise entre chiquimato-3-fosfato (S3P) e fosfoenolpiruvato (PEP), para formar 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato (EPSP). A EPSP é um intermediário na formação de corismato, precursor dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano, que geram grande variedade de metabólitos secundários e intermediários do ramo principal da via chiquimato em plantas. Quando glifosato inibe a EPSP sintase, bloqueia a formação destes aminoácidos aromáticos que são essenciais para sobrevivência celular (COMONT et al., 2020).

A presença de xenobióticos no solo resulta em um ambiente tóxico para microrganismos sobreviverem, portanto estratégias como a formação de biofilme e *quorum sensing* (QS) tornam-se necessárias (LIMA et al., 2020). A associação entre algumas moléculas sinalizadoras específicas de QS em tratamentos com herbicidas, como o Heat e o Roundup, indica que pode haver uma resposta ao estresse oxidativo gerado por estes xenobióticos. O QS pode ajudar na expressão de algumas enzimas antioxidantes, como a SOD e CAT, e, desta maneira, diminuir os efeitos negativos causados pelo estresse oxidativo (FREITAS et al., 2021).

As bactérias são capazes de formar consórcios microbianos e biofilmes, o que ajuda na sobrevivência quando ocorrem mudanças ambientais (MUKHERJEE; BASSLER, 2019; ZHANG et al., 2018). O biofilme é uma matriz de polímeros, que permite a fixação de comunidades microbianas em superfícies bióticas e abióticas (LI; ZHAO, 2020). Desta maneira, comunidades microbianas que formam biofilme possuem maior resistência a ambientes tóxicos, antibióticos e ao sistema imunológico do hospedeiro (GALIÉ et al., 2018), agravando casos de infecções, sendo necessária a utilização de alternativas aos antibióticos para combater as bactérias patogênicas (IBRAHIM et al., 2021). A sobrevivência de microrganismos a ambientes tóxicos, pode ser explicada pela sinalização da comunicação entre as bactérias e detecção da densidade celular, conhecida como *quorum sensing* (QS) (WINSTANLEY; RUMBAUGH, 2018). O QS é um sistema de comunicação realizado por meio de moléculas sinalizadoras e genes específicos (WHITELEY et al., 2017), reconhece a densidade populacional por meio das moléculas de comunicação, a N-acil-homoserina-lactonas (AHLs), que está envolvida em diversos processos, como no comportamento de fatores de virulência, produção de EPS e formação de biofilme (FREITAS et al., 2021).

Tanto bactérias Gram-positivas, como Gram-negativas são capazes de realizar o QS. As bactérias Gram-positivas utilizam oligopeptídeos como auto indutores e seus receptores das moléculas são transmembranas quinases. Já as bactérias Gram-negativas, utilizam moléculas auto indutoras, duas moléculas receptoras para detectar as auto indutoras, as AHLs (MUKHERJEE; BASSLER, 2019). Para que o QS ocorra, as bactérias devem conseguir detectar a variedade de sinais químicos, incorporar circuitos QS de vizinhos em seus próprios genomas, alterar quais conjuntos de genes são ativados por QS ou ter a capacidade de aclimatar as mudanças da proteína receptora LuxR (PRESCOTT; DECHO, 2019).

O sistema QS modulado pelas AHLs, além de estar envolvido nas etapas da formação do biofilme, auxilia na sobrevivência das comunidades microbianas em diferentes nichos ambientais, conferindo resistência a xenobióticos, falta de nutrientes, estresse oxidativos, entre outras possíveis mudanças que os microrganismos podem encontrar (LAN et al., 2014). Desta forma, esse trabalho procurou avaliar se ocorre associação entre as moléculas sinalizadoras de QS em uma linhagem bacteriana em resposta aos herbicidas Heat e Roundup, presente e ausente no local de isolamento, respectivamente.



#### 4.1.2 Material e métodos

##### 4.1.2.1 Linhagem bacteriana

A linhagem bacteriana utilizada foi a *Enterobacter* sp. CMA55A (NCBI nucleotide database - OL598345), coletada na Fazenda Escola Capão da Onça da UEPG em tanques de armazenamento de água usada na lavagem de embalagens de agrotóxicos. Esta linhagem bacteriana está estocada em glicerol 50% a -80 °C na Coleção de Microrganismos Ambientais do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG.

##### 4.1.2.2 Herbicidas

O herbicida Heat, contendo o princípio ativo saflufenacil (N'-{2-cloro-4-fluor-5-[1,2,3,6-tetrahydro-3-metil-2,6-dioxe-4-(trifluorometil)pirimidina-1-il]benzoil}-N-isopropil-N-metilsulfamida), e o herbicida Roundup Transorb R, contendo o princípio ativo Glifosato (Sal de Potássio de (N-(fosfonometil)glicina) foram utilizados.

##### 4.1.2.3. Meios de cultura e condições de crescimento

O pré-inóculo da linhagem foi feito em caldo Luria-Bertani (LB: NaCl 10g/L, Triptona 10g/L e Extrato de Levedura 5g/L), e em Luria-Bertani com ágar (LA: LB com a adição de 20 g/L ágar). Os experimentos foram realizados em triplicata, e as condições de crescimento bacteriano foram a 30 °C sob agitação a 120 rpm por 24 h.

##### 4.1.2.4 Tratamentos

Para os tratamentos com os herbicidas foi utilizado o Meio LB suplementado com Heat nas concentrações de 0,49 mM; 4,9 mM; 19, 6 mM; e 24,5 Mm; e para o Roundup nas concentrações de 0,23 mM; 2,3 mM; 9,2 mM; e 11,5 mM. Estas concentrações equivalem a 1x, 10x, 40x e 50x às aplicadas na agricultura, respectivamente. O controle foi definido como 0x.

#### 4.1.2.5 Teste de tolerância

Para o teste de tolerância foram utilizadas as mesmas condições de crescimento descritas no item 3.3. A densidade ótica (D.O) inicial foi de 0,05 de absorbância (abs) a 600 nm. Após 24 h do crescimento da cultura bacteriana em controle e em meio LB contendo os tratamentos Heat ou Roundup Transorb R a 1x, 10x, 40x e 50x, alíquotas de 1 mL foram retiradas e o crescimento foi analisado em espectrofotômetro a 600 nm.

#### 4.1.2.6 Curva de crescimento bacteriano

A cultura foi incubada conforme descrito no item 3.3, em meios contendo os herbicidas Heat e Roundup Transorb R a 0x, 1x, 10x, 40x e 50x. O inóculo foi padronizado a uma densidade ótica (DO) inicial de 0,05 de absorbância (abs) a 600 nm. O crescimento foi avaliado nos tratamentos a cada 1h a 600 nm em espectrofotômetro.

#### 4.1.2.7 Viabilidade celular

Para avaliação da viabilidade celular, foram utilizadas as mesmas condições do pré-inóculo descritas no item 3.3. Alíquotas de 100 µL foram retiradas nas fases lag, log e fase estacionária, determinadas na curva de crescimento. As amostras foram diluídas em solução salina (NaCl a 0,9%), e inoculadas por espalhamento em LA, e incubadas por 24 h a 30 °C. Para determinar o número de células viáveis presente na amostra, foram contabilizadas as unidades formadoras de colônias (UFC).

#### 4.1.2.8 Produção de EPS

A produção de EPS foi realizada por meio do método descrito por Tang et al. (2018), com modificações. As condições de crescimento foram descritas no item 3.3. Foi adicionado 200 µL da cultura bacteriana em microplacas e foram incubadas em shaker por um período de 15 h a 30 °C. O meio de cultura foi descartado e nas células aderidas a superfície foram adicionados 200 µL de corante cristal violeta a 0,1%, que permaneceu reagindo pelo período de 30 min. O corante foi removido e os poços lavados três vezes com água destilada. Foram adicionados 200 µL de etanol 95% e a amostra foi analisada em leitor de microplacas a 570 nm (Elx808™, BioTek, Winooski, VT, EUA).

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

A extração das moléculas de QS ocorreu de acordo com o método de Ortori et al. (2010), com modificações. Foi realizada pelo método líquido-líquido, no período de 15 h de crescimento bacteriano. Após o crescimento da cultura bacteriana conforme as condições descritas no item 3.3, foram retiradas 100 mL e centrifugadas a 8.000 g por 5 min. Foram coletados 10 mL do sobrenadante e adicionados 20 µL do padrão interno N-heptanoil-L-homoserina lactona (C7-HSL), a solução foi centrifugada a 8.000 g por 5 min. Foram adicionados 10 mL de acetato de etila acidificado com 0,01% de ácido acético no sobrenadante. A solução foi centrifugada a 8.000 g por 5 min, e a fase orgânica foi coletada. As amostras foram secadas na estufa a 30 °C e armazenadas a -20 °C. Antes da análise em LC-MS/MS, foi adicionado 100 µL de metanol (MeOH) e homogeneizado em vórtex durante um minuto.

#### 4.1.2.10 Análise em LC-MS/MS

As análises de LC-MS/MS foram obtidas por meio do método descrito por Ortori et al. (2010), com modificações. O equipamento utilizado foi o modelo Quatro Premier XE triplo quadrupolo (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA), e o software MassLynx (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA). A coluna utilizada foi C18 3,5µm, (4,6 x 50 mm). Foram injetados 10 uL dos extratos preparados conforme o item 3.9. A fase móvel foi constituída de 0,1% de ácido fórmico, 70% de acetonitrila e 30% de água ultrapura. O perfil do gradiente foi isocrático a uma taxa de fluxo de 0,3 mL/min. O multiplicador foi de 550 V, a ionização foi no modo positivo, e a energia de colisão foi de 15 VA temperatura de dessolvatação foi de 400 °C e do bloco foi de 110 °C. O fluxo de gás de dessolvatação foi de 300 L/H, fluxo de gás do cone foi de 0 L/H, e o fluxo de gás de colisão 0.14 mL/min. A otimização dos parâmetros analíticos em MS/MS foi realizada por meio da infusão do padrão interno N-heptanoil-L-homoserina lactona (C7-HSL), e dos padrões analíticos N-hexanoil-L-homoserina lactona (C6-HSL) e N-octanoil-L-homoserina lactona (C8-HSL).

#### 4.1.2.11 Análises estatísticas

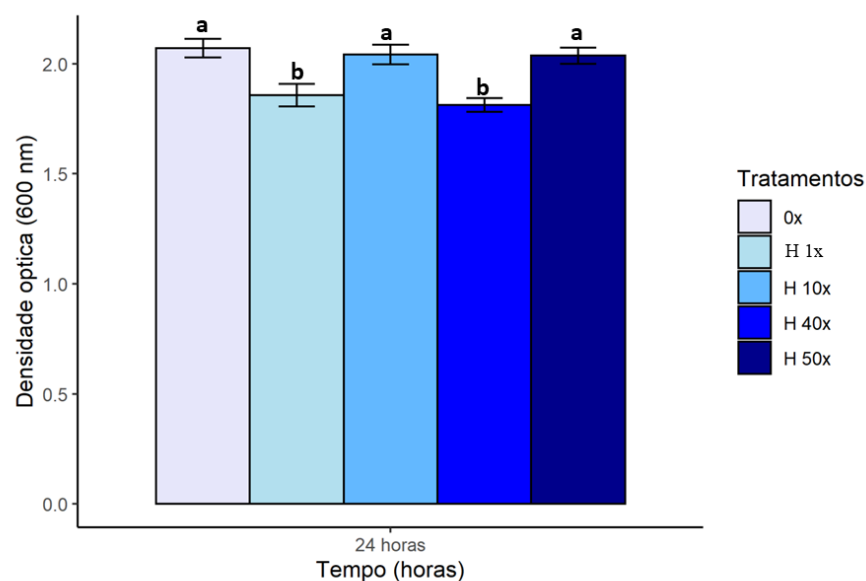
As análises estatísticas da curva de crescimento, viabilidade celular e produção de EPS foram submetidas à análise da variância e ao teste de Duncan. As análises do QS foram submetidas à análise de componentes principais (PCA). As análises de correlação entre as moléculas de QS e produção de EPS foram submetidas à análise de correlação de Pearson. Para tanto, foi usado o pacote ggplot2 do software R versão 4.1.0.

#### 4.1.3 Resultados e discussão

##### 4.1.3.1 Teste de tolerância

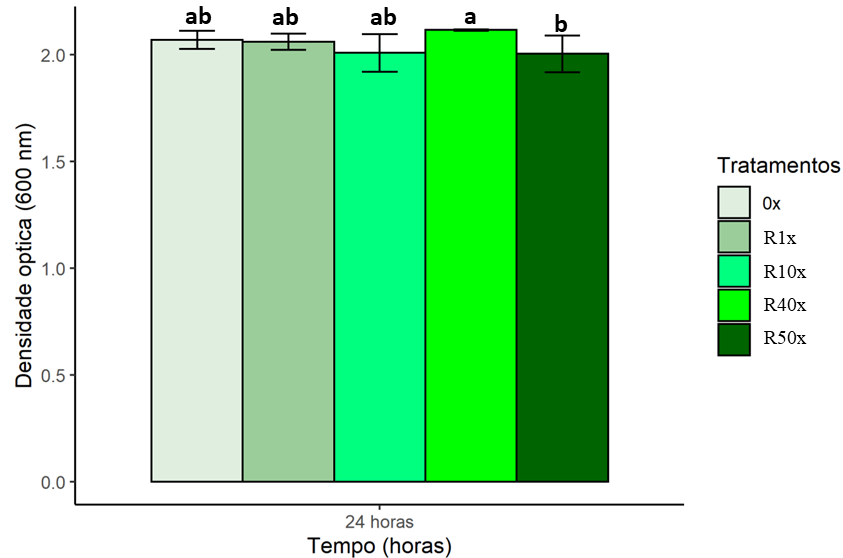
A linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A foi escolhida após mostrar-se tolerante aos tratamentos contendo os herbicidas Heat e Roundup, considerando as taxas de crescimento observadas após 24 h de incubação em meio LB com os diferentes tratamentos, como apresentado nas Figs. 5 e 6, respectivamente.

Figura 5 – Teste de tolerância da linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A após 24 h de incubação em meio LB 0x, 1x, 10x, 40x e 50x do herbicida Heat. Letras minúsculas comparam estatisticamente diferentes tratamentos da mesma fase de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Duncan com 95% de confiança.



Fonte: A autora.

Figura 6 – Teste de tolerância da linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A após 24 h de incubação em meio LB 0x, 1x, 10x, 40x e 50x do herbicida Roundup. Letras minúsculas comparam estatisticamente diferentes tratamentos da mesma fase de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Duncan com 95% de confiança.



Fonte: A autora.

A linhagem apresentou crescimento nos dois tratamentos, independente do contato prévio. Nos tratamentos controle, 10x e 50x o herbicida Heat, foi observado um crescimento bacteriano significativamente maior do que em 1x e 40x. Para o tratamento contendo o Roundup, houve diferenças estatísticas apenas entre as taxas de 40x e 50x.

Quando expostos a ambientes tóxicos, como a presença de herbicidas em seu local de crescimento, os microrganismos podem sofrer mudanças estruturais e em sua fisiologia (FREITAS et al., 2021; LIMA et al., 2020). Mudanças estruturais como na saturação de lipídeos de membrana, tendem a diminuir a permeabilidade e atuar como barreira seletiva ao herbicida, favorecendo a tolerância do organismo ao xenobiótico (PILEGGI et al., 2020). Ambientes contaminados com resíduos tóxicos expõem a microbiota a condições estressantes e seletivas, em que os microrganismos precisam se adaptar metabolicamente e rapidamente para conseguir sobreviver (OLSON et al., 2017).

Em nosso trabalho, o herbicida Heat estava presente no local de isolamento da linhagem. Esse contato pode selecionar espécies com maior capacidade adaptativa para sobrevivência em locais estressantes (LIMA et al., 2020). A questão em aberto é se diferentes sistemas de respostas podem surgir independente da presença de xenobióticos no local de isolamento.

Algumas linhagens bacterianas conseguem sobreviver na presença de biocidas, mesmo sem a exposição prévia a estes, como a *Escherichia coli* DH5- $\alpha$ , que mostrou tolerância e degradou o mesotrione, princípio ativo do herbicida Callisto (OLCHANHESKI et al., 2014). O herbicida Roundup não estava presente no local de isolamento da linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A, podendo indicar que esta linhagem consegue tolerar o Roundup por meio de mecanismos generalistas, independentes do contato prévio com o herbicida. O glifosato pode desencadear ERO em organismos não-alvos (KAUR, 2019), diminuir as taxas de crescimento bacteriano, assim como o paraquat (MAZHARI; FERGUSON, 2018), e causar perda da biodiversidade e, conseqüentemente, gerar alterações nas funções do solo (SINGH et al., 2020).

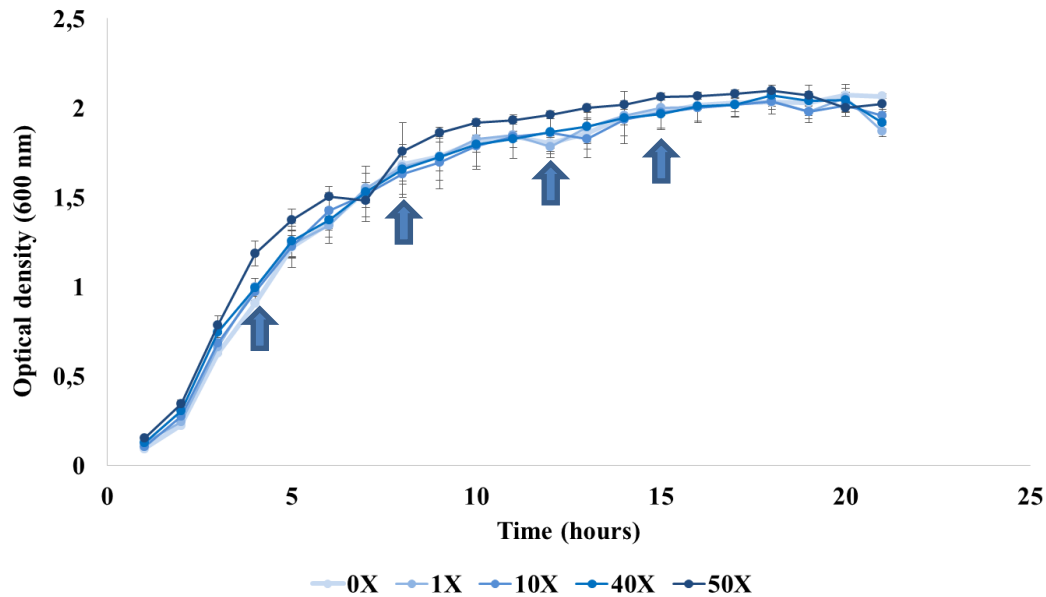
A linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A foi capaz de se desenvolver nos tratamentos com Roundup e Heat em concentrações de até 50x a utilizada na agricultura, portanto, essa linhagem possui mecanismos de tolerância para ambos os herbicidas e é apta para análises de sistemas de respostas.

#### 4.1.3.2 CURVA DE CRESCIMENTO DA LINHAGEM *Enterobacter* sp. CMA55A

A densidade populacional provoca mudanças comportamentais em comunidades bacterianas. Sinais de comunicação são gerados em baixa concentração, mas vão se acumulando à medida que a densidade populacional bacteriana aumenta. Quando a concentração limite é atingida, o sinal interage com uma proteína receptora ocasionando mudanças coordenadas na expressão gênica da população (ABISADO et al., 2020).

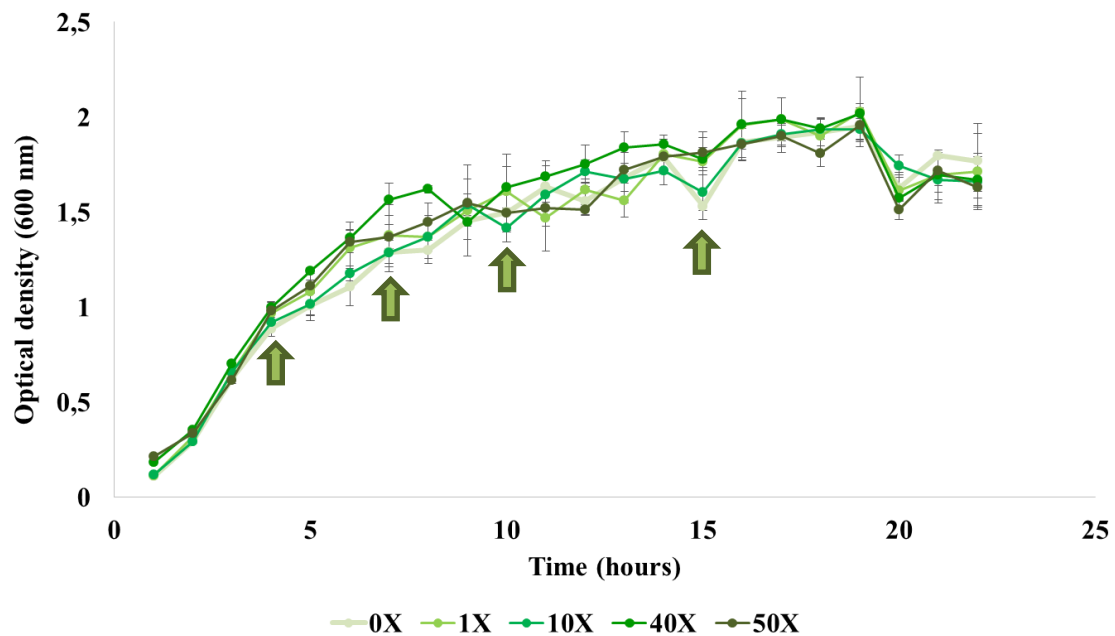
Na curva de crescimento foi atribuído o tempo de início das fases de crescimento bacteriano, o qual foi utilizado para análises da viabilidade celular e extração das moléculas sinalizadoras de QS. Na Fig. 7 é apresentada a curva de crescimento na presença do herbicida Heat, e na Fig. 8, a curva de crescimento na presença do herbicida Roundup, sendo possível observar o início das fases lag, log e estacionária, respectivamente, apontadas com a seta, em ambas as curvas.

Figura 7 – Curva de crescimento de *Enterobacter* sp. CMA55A em LB controle e nos tratamentos contendo o herbicida Heat, nas concentrações de 1x, 10x, 40x e 50x. O teste de Duncan foi usado com 95% de confiança e as barras representam o erro padrão das médias. Da esquerda para a direita, as setas indicam as fases de crescimento lag, log, início da fase estacionária e o período escolhido para os testes.



Fonte: A autora.

Figura 8 – Curva de crescimento de *Enterobacter* sp. CMA55A em LB controle e nos tratamentos contendo o herbicida Roundup Transorb R, nas concentrações de 1x, 10x, 40x e 50x. O teste de Duncan foi usado com 95% de confiança e as barras representam o erro padrão das médias. Da esquerda para a direita, as setas indicam as fases de crescimento lag, log, início da fase estacionária e o período escolhido para os testes.



Fonte: A autora.

No tratamento com o herbicida Heat, a fase inicial de crescimento foi em 4 h, a fase log iniciou em 8 h e a fase estacionária iniciou em 12 h. No tratamento com o herbicida

Roundup, a fase inicial de crescimento foi em 4 h, a fase log iniciou em 7 h e a fase estacionária iniciou em 10 h.

A fase estacionária possui maior densidade populacional, ou seja, provavelmente é o período em que ocorre o maior nível de sinalização por QS (LLAMAS et al., 2005). Portanto, o tempo de 15 h foi escolhido para extração das moléculas sinalizadoras de QS, sendo provavelmente o período em que ocorrem às respostas ativadas via QS geradas pelos xenobióticos (FREITAS et al., 2021).

Para que ocorra a comunicação entre as bactérias, é necessário que haja sinalização para a regulação gênica, o que depende da densidade celular populacional (FREITAS, et al., 2021). A exposição aos herbicidas pode diminuir a densidade celular e o tempo máximo de crescimento bacteriano, assim como aconteceu com uma cepa de *Bradyrhizobium* sp. na presença dos herbicidas glifosato, diuron e sulfentrazone (BARROSO et al., 2020). O herbicida glifosato e paraquat diminuíram o crescimento de cepas bacterianas isoladas de tanques com herbicida (MAZHARI; FERGUSON, 2018).

Sobre o herbicida Heat, existem poucos estudos, mas a partir da pesquisa de Freitas et al. (2021), a linhagem bacteriana de *Pseudomonas fluorescens* CMA55 conseguiu sobreviver e crescer na presença deste herbicida, e possivelmente esse resultado pode estar relacionado com a regulação gênica e diferentes rotas metabólicas por meio da sinalização das moléculas de QS.

#### 4.1.3.3 VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM *Enterobacter* sp. CMA55A

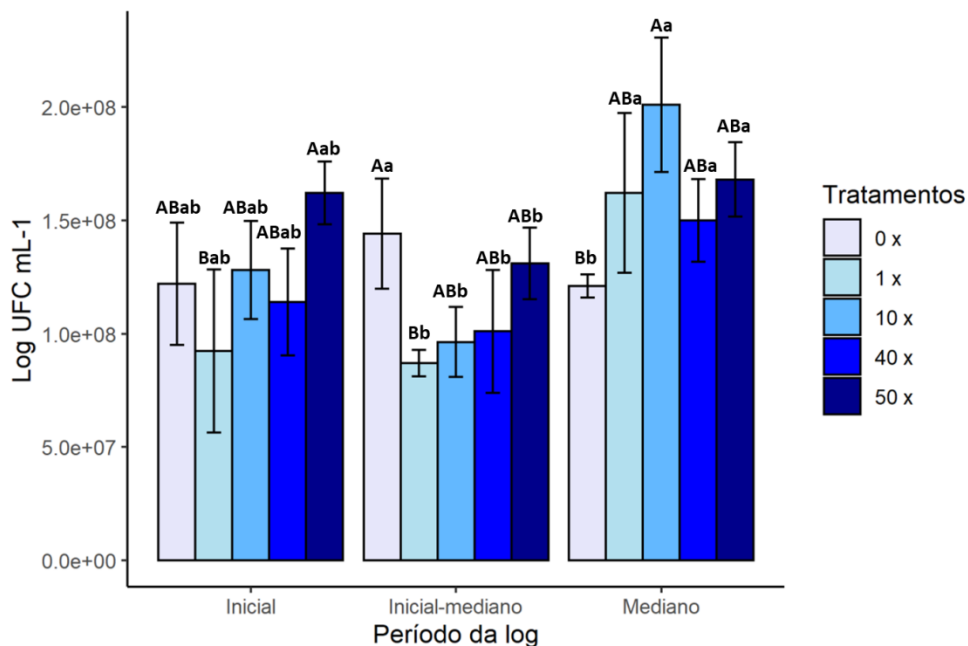
Os dados sobre viabilidade celular nas fases inicial, inicial-mediana e mediana, padronizadas a partir da curva de crescimento, se encontram nas Figs. 9 (Heat) e 10 (Roundup). No tratamento contendo o herbicida Heat mostrado na Fig. 9, a linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A apresentou o maior crescimento bacteriano nas concentrações 50x (na fase inicial), controle (na fase inicial-mediana) e 10x (na fase mediana). O menor crescimento bacteriano ocorreu nas concentrações 1x (fase inicial e inicial-mediana) e controle (fase mediana). Não foram observadas diferenças significativas entre as seguintes concentrações: 0x, 10x e 40x (fase inicial); 10x, 40x e 50x (fase inicial-mediana) e 1x, 40x e 50x (fase mediana).

Na fase inicial de crescimento no tratamento contendo o herbicida Heat, com o qual a linhagem teve contato prévio, foram observadas as maiores taxas na maior concentração do herbicida, indicando uma capacidade de tolerância além da concentração utilizada na



agricultura. Não existem muitas informações na literatura sobre o herbicida Heat, mas Lima et al. (2020), propôs que após o contato prévio com herbicidas, bactérias poderiam desenvolver maior capacidade adaptativa por meio de sistemas de respostas via QS para tolerar concentrações maiores de xenobióticos e, portanto, sobreviver em ambientes tóxicos.

Figura 9 – Viabilidade celular de *Enterobacter* sp. CMA55A após 4 h, 8 h e 12 h de incubação em meio LB 0x (controle), e contendo o tratamento com 1x, 10x, 40x e 50x do herbicida Heat. Letras maiúsculas comparam estatisticamente o mesmo tratamento em diferentes fases do crescimento; letras minúsculas comparam estatisticamente diferentes tratamentos da mesma fase de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Duncan com 95% de confiança.



Fonte: A autora.

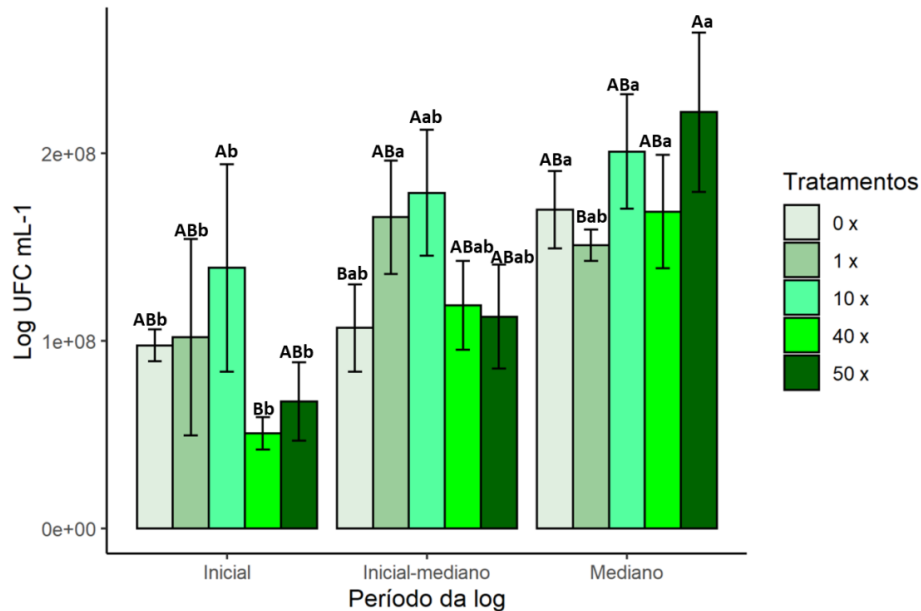
No tratamento contendo Roundup (Fig. 10), a linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A conseguiu tolerar o herbicida em todas as concentrações. A maior taxa de crescimento bacteriano ocorreu nas concentrações 10x (na fase inicial e inicial-mediana) e 50x (fase mediana). Em contrapartida, o menor crescimento bacteriano ocorreu para as concentrações 40x (fase inicial), controle (fase inicial-mediana) e 1x (fase mediana). Não foram observadas diferenças significativas entre as seguintes concentrações: 0x, 1x e 50x (fase inicial); 1x, 40x e 50x (fase inicial-mediana) e 0x, 10x e 40x (fase mediana).

O glifosato, nas concentrações 0 mM, 0,059 mM, 0,59 mM e 5,9 mM, diminuiu a taxa de crescimento bacteriano em todas as concentrações utilizadas, e após 48 h, houve declínio constante da população bacteriana (MAZHARI; FERGUSON, 2018). Em nosso trabalho, as concentrações utilizadas do Roundup foram 0,23 mM, 2,3 mM, 9,2 mM e 11,5 mM. Apesar da linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A ter diminuído seu crescimento, não foi

observado um declínio constante da população bacteriana, mesmo com concentrações de Roundup maiores que as relatadas no trabalho de Mazhari e Ferguson (2018). Como o declínio da população bacteriana pode ser um modo de resposta a xenobióticos para garantir a sobrevivência (VERMEERSH et al., 2019) e em nossos resultados não foi visualizado esse declínio constante, possivelmente se tratam de sistemas de respostas diferentes, possivelmente selecionadas pelo local de isolamento das linhagens. O QS pode estar envolvido na regulação desse sistema nessas condições específicas.

Foi observado uma maior taxa de crescimento em 50x, o que pode indicar que um sistema de respostas alternativo foi ativado, como o de enzimas antioxidantes (BRICEÑO et al., 2020). As enzimas antioxidantes têm papel importante no controle de EROs, que podem afetar a viabilidade bacteriana. A primeira enzima que atua no controle de EROs é a SOD, catalisando a dismutação do superóxido em  $O_2$  e  $H_2O_2$  (PEDERSEN et al., 2009). Além da SOD, a CAT, que atua na conversão do  $H_2O_2$  dismutado pela SOD, e o converte em  $O_2$  e  $H_2O$ , em conjunto com o APX, importante enzima no equilíbrio da EROs, que utiliza ascorbato como doador de elétrons e metaboliza o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  nas células vegetais e GPX, que utiliza guaiacol como doador de elétrons, e atua na conversão de  $H_2O_2$  em  $H_2O$ , também podem contribuir em sistemas de respostas antioxidantes, ajudando a tolerar estresses induzidos por herbicidas, assim como foi visto na linhagem *Pseudomonas* sp. CMA-7.3 (OLIVEIRA et al., 2021). No trabalho de Dobrzanski et al. (2018) foi utilizado o herbicida Callisto e seu princípio ativo mesotrione, o qual induziu diferentes estratégias de adaptação em isolados de *Bacillus megaterium* coletados em água e solo. É possível que tenha ocorrido diferentes níveis de respostas envolvendo atividade SOD e CAT, além da capacidade de metabolizar xenobióticos.

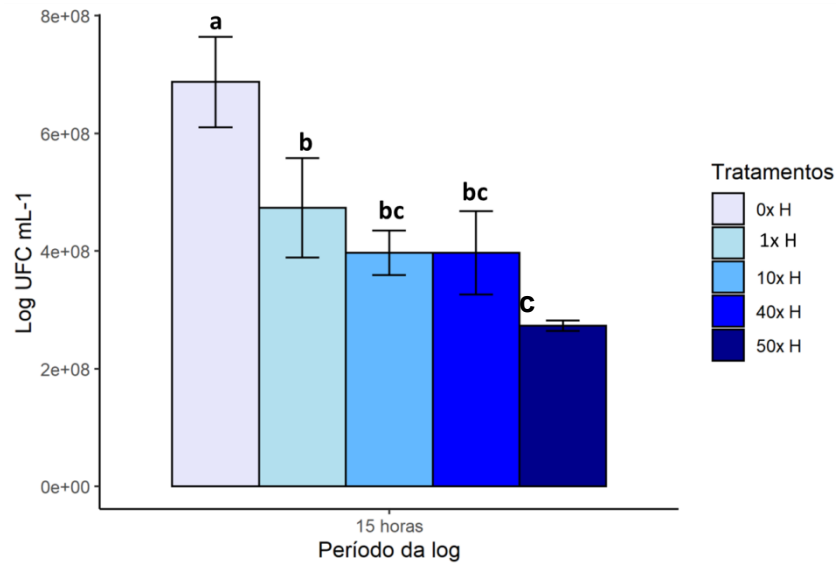
Figura 10 – Viabilidade celular de *Enterobacter* sp. CMA55A após 4 h, 7 h e 10 h de incubação em meio LB 0x (controle), e contendo o tratamento com 1x, 10x, 40x e 50x do herbicida Roundup Transorb R. Letras maiúsculas comparam estatisticamente o mesmo tratamento em diferentes fases do crescimento; letras minúsculas comparam estatisticamente diferentes tratamentos da mesma fase de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Duncan com 95% de confiança.



Fonte: A autora.

Na Fig. 11 são apresentados os resultados do crescimento bacteriano, em 15 h, da linhagem exposta ao herbicida Heat. Segundo Llamas et al. (2005), a fase estacionária é a que possui maior densidade populacional. Desta maneira, foi escolhido o tempo de 15 h para comparar o crescimento de isolados na viabilidade e extração das moléculas sinalizadoras de QS. Na concentração de 0x houve o maior valor de viabilidade, e em 50x o menor crescimento, com diferença estatisticamente significativa. Possivelmente a concentração do herbicida Heat afeta a eficiência no sistema de respostas à toxicidade na linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A. Não houve diferença significativa nas concentrações 1x, 10x e 40x.

Figura 11 – Viabilidade celular de *Enterobacter* sp. CMA55A após 15 h de incubação em meio LB 0x, 1x, 10x, 40x e 50x do herbicida Heat. Letras minúsculas comparam estatisticamente diferentes tratamentos da mesma fase de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Duncan com 95% de confiança.

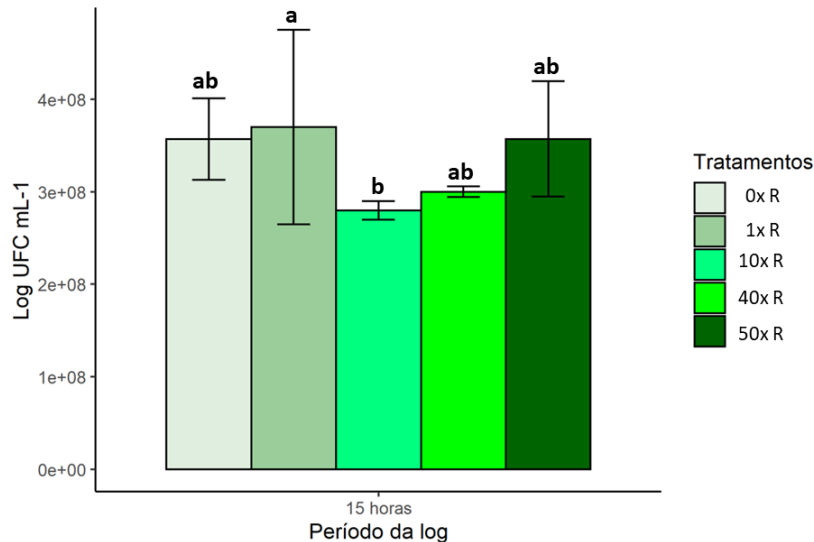


Fonte: A autora.

Na Fig. 12 são apresentados os resultados da viabilidade celular em 15 h de crescimento bacteriano exposto ao herbicida Roundup. A maior taxa de viabilidade foi observada no tratamento 1x, enquanto a menor ocorreu em 10x ocorreu o menor crescimento, com diferença estatisticamente significativa. Apesar do tratamento com glifosato ser considerado tóxico tanto para saúde humana como para o ambiente (GRUBE et al., 2019) e apresentar altos níveis de acumulação ambiental (SINGH et al., 2020; ZHAN et al., 2018), foi observado no tratamento contendo Heat maior toxicidade para linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A, porém, não há dados na literatura sobre a toxicidade deste herbicida em relação aos microbiomas. Os resultados desse estudo podem servir como triagem sobre os impactos que o Heat pode causar.

Esses resultados podem se mostrar importantes em estudos sobre degradação do glifosato, visto que a linhagem tolera o tratamento em altas concentrações, e existem trabalhos sobre a degradação e utilização desse herbicida como fonte de energia. As bactérias dos gêneros *Pantoea* e *Enterobacter* toleram o glifosato e o utilizam como fonte de fósforo (GUIJARRO et al., 2018). *Enterobacter cloacae* diminuiu o glifosato em 50% no período de cinco dias, convertendo resíduos tóxicos em sarcosina e glicina (KRYUCHKOVA et al., 2014). Nas concentrações de 0x, 40x e 50x não foram observadas diferenças significativas.

Figura 12 – Viabilidade celular de *Enterobacter* sp. CMA55A após 15 h de incubação em meio LB 0x, 1x, 10x, 40x e 50x do herbicida Roundup. Letras minúsculas comparam estatisticamente diferentes tratamentos da mesma fase de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Duncan com 95% de confiança.



Fonte: A autora.

Um dos modos de ação de herbicidas sobre bactérias é o aumento do estresse oxidativo (FREITAS et al., 2021), podendo diminuir as taxas de crescimento e possivelmente a diversidade (LIMA et al., 2020). Dessa forma, esperava-se que maiores concentrações dos tratamentos fossem mais tóxicas para a linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A. Porém, esse padrão não foi seguido, visto que a linhagem não teve diferença significativa entre controle e 50x no tratamento com Roundup.

Analisando os dados da curva de crescimento e viabilidade celular, verificou-se que a linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A apesar de crescer menos em algumas concentrações, conseguiu crescer semelhante ao controle, indicando que a bactéria é tolerante aos tratamentos. A sobrevivência aos tratamentos pode estar relacionada com respostas via QS, quando é atingida a densidade populacional máxima (FREITAS et al., 2021).

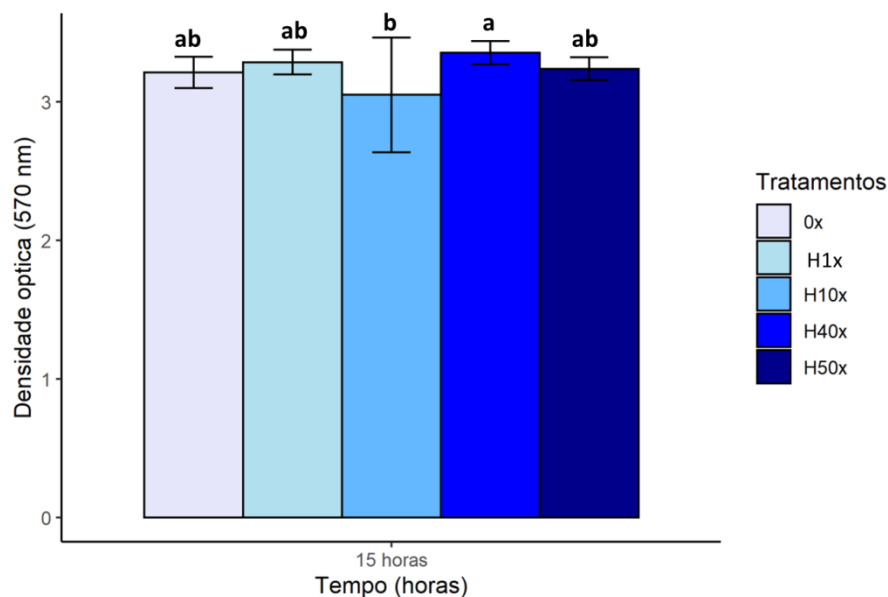
#### 4.1.3.4 Produção de EPS da linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A nos tratamentos contendo os herbicidas heat e roundup

O EPS é formado por moléculas orgânicas, como proteínas, lipídios e polissacarídeos. Supõe-se que o EPS armazena nutrientes que podem ser convertidos e utilizados como forma de energia durante períodos de baixa disponibilidade de suprimentos. Além de contribuir para formação do biofilme, em que as comunidades bacterianas ficam

envoltas por uma camada de EPS e conseqüentemente proporciona proteção para mudanças ambientais (FREDERICK et al., 2011), O biofilme é uma matriz de polímeros, que permite a fixação da comunidade bacteriana em superfícies bióticas e abióticas (LI; ZHAO 2020). O EPS confere suporte estrutural às comunidades que formam o biofilme, em aspectos físicos, químicos, e na proteção contra antimicrobianos, aumentando o potencial de patogenicidade dos microrganismos (SADIQ et al., 2021).

Na Fig. 13, pode-se visualizar a produção de EPS da linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A contendo o herbicida Heat, em 15 h de crescimento. A maior produção de EPS ocorreu na concentração de 40x. No controle, 1x e 50x não houve diferença estatística, e em 10x ocorreu a menor produção de EPS.

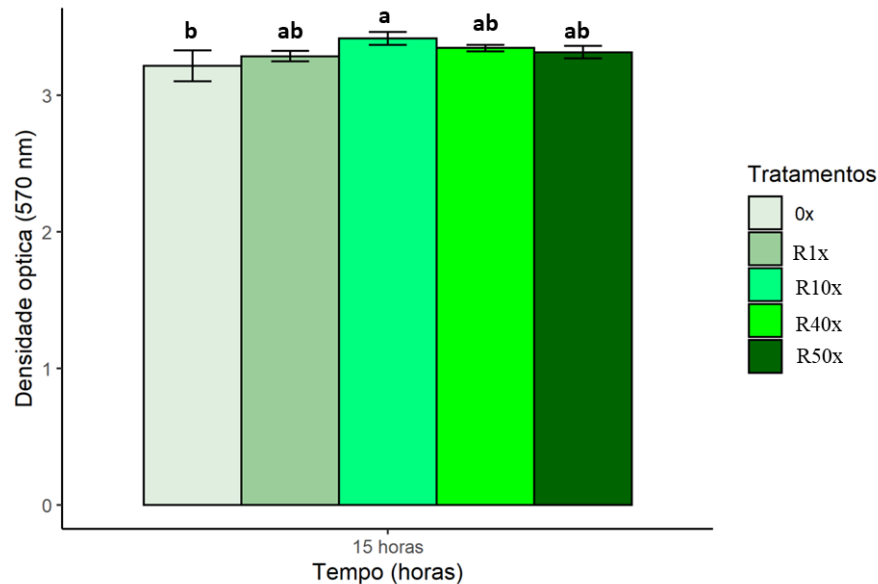
Figura 13 – Quantificação da produção de EPS de *Enterobacter* sp. CMA55A após 15 h de incubação em meio LB 0x, 1x, 10x, 40x e 50x do herbicida Heat. Letras minúsculas comparam estatisticamente diferentes tratamentos da mesma fase de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Duncan com 95% de confiança.



Fonte: A autora.

Na Fig. 14, são apresentados os resultados da produção de EPS da linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A no tratamento com o herbicida Roundup, em 15 h de crescimento. A maior produção de EPS ocorreu na concentração de 10x, sem diferença estatística entre as concentrações de 1x, 40x e 50x. No controle, ocorreu a menor produção de EPS, o que é esperado, visto que sem herbicida as condições não são estressantes e a bactéria não precisaria de uma resposta para sobrevivência.

Figura 14 – Quantificação da produção de EPS de *Enterobacter* sp. CMA55A após 15 h de incubação em meio LB 0x, 1x, 10x, 40x e 50x do herbicida Roundup. Letras minúsculas comparam estatisticamente diferentes tratamentos da mesma fase de crescimento. As barras representam os erros padrão nas médias. Teste de Duncan com 95% de confiança.



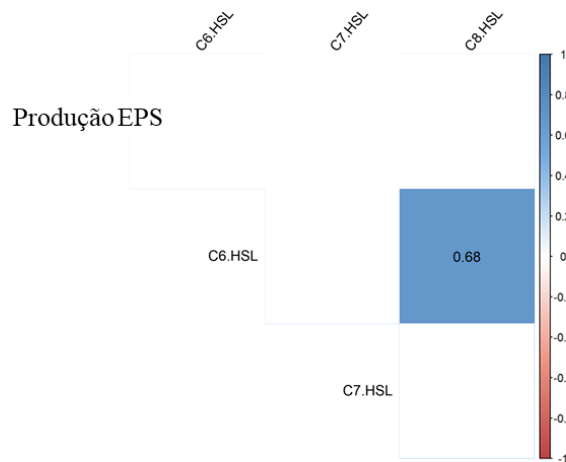
Fonte: A autora.

Em ambos os tratamentos ocorreu produção de EPS em todas as concentrações, podendo indicar que a linhagem está sobrevivendo ao estresse gerado pelos herbicidas por meio de respostas via QS. As bactérias Gram-negativas, como por exemplo, a *Enterobacter* sp., utiliza moléculas auto indutoras, conhecidas como AHLs, para gerar essas respostas (MUKHERJEE; BASSLER, 2019). O QS modulado pelas AHLs permite que as bactérias mudem seus comportamentos em alta densidade celular para se adaptar a mudanças ambientais (PRESCOTT; DECHO, 2019).

As principais AHLs envolvidas na matriz do biofilme da bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* são as C14-HSL, 3-oxo-C14-HSL, 3-OH-C10-HSL e 3-OH-C12-HSL (FARAH et al., 2005). A C6-HSL atua principalmente na maturação do biofilme em *Pseudomonas aeruginosa* (ALAYANDE et al., 2018), mas já foi visualizado que em *Pantoea stewartii*, a 3O-C6-HSL foi responsável pela produção de EPS (LAZDUNSKI et al., 2004). A C7-HSL atua principalmente na formação do biofilme em *Citrobacter rodentium* (XUE et al., 2021). Enquanto a C8-HSL além de atuar contra o estresse oxidativo, tem papel importante na produção de EPS (MA et al., 2018). Apesar de ocorrer relação entre as moléculas sinalizadoras de QS e produção de EPS, de acordo com o teste de correlação de Pearson realizado, foi observada uma correlação positiva entre as moléculas C6-HSL e C8-HSL, mas

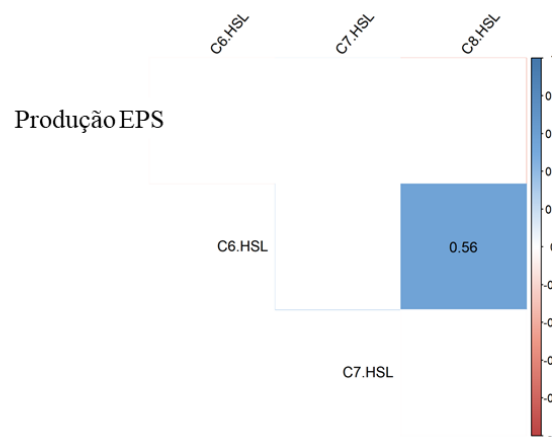
não uma correlação entre a produção de EPS e as moléculas C6-HSL, C7-HSL e C8-HSL, como pode ser visto nas Figs. 15 e 16.

Figura 15 - Correlação de Pearson entre a Produção de EPS e as moléculas sinalizadoras de QS - C6-HSL, C7-HSL e C8-HSL, da linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A, no tratamento contendo o herbicida Heat. Correlação negativa de -1 a 0 e correlação positiva de 0 a 1.



Fonte: A autora.

Figura 16 – Correlação de Pearson entre a Produção de EPS e as moléculas sinalizadoras de QS - C6-HSL, C7-HSL e C8-HSL, da linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A, no tratamento contendo o herbicida Roundup. Correlação negativa de -1 a 0 e correlação positiva de 0 a 1.



Fonte: A autora.



Esse resultado pode indicar que a produção de EPS é uma resposta de plasticidade fenotípica para diferentes eventos, e não somente indução de estresse por substâncias químicas, visto que a plasticidade fenotípica é a capacidade pela qual um organismo muda seus fenótipos em resposta as rápidas mudanças ambientais (YANG et al., 2021). Os resultados do presente trabalho podem indicar que a linhagem está respondendo à toxicidade gerada pelos herbicidas, produzindo EPS e pela sinalização das moléculas de QS, embora essas duas estratégias não estejam correlacionadas.

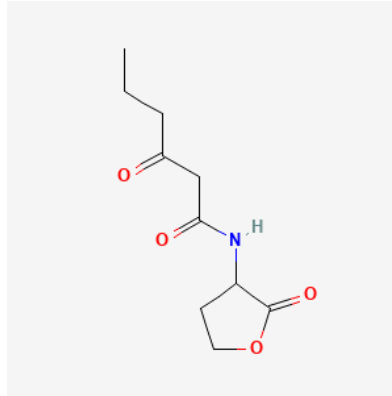
#### 4.1.3.5 Moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* na presença dos herbicidas heat e roundup

As moléculas sinalizadoras de QS atuam em diversos comportamentos bacterianos, como na formação de biofilme, fatores de virulência e produção de metabólitos (ORTORI et al., 2010), transferência horizontal de genes (TANG et al., 2018), relações simbióticas (FRANCO et al., 2018), e tolerância a ambientes estressantes (SARKAR; CHAKRABORTY, 2008).

Existem duas classes principais de moléculas sinalizadoras de QS: QSSM, que são as N-acil-L-homoserina lactonas (AHLs), e as 2-alkil-4- (1H)-quinolonas (AQs). Ambas são famílias de moléculas semelhantes a lipídios com estrutura relacionadas ao comprimento da cadeia acil/alkil. As AHLs abrangem mais de 30 moléculas sinalizadoras de QS bacteriano (QSSM) de diferentes comprimentos, variando de 4 a 18 carbonos, grau de instauração e substituição do carbono 3, que pode ser 3-oxo, 3-hidroxi ou não substituído na cadeia acil (ORTORI et al., 2010). No presente trabalho, foi estudado principalmente as moléculas AHLs: N-hexanoil-L-homoserina lactona (C6-HSL), N-heptanoil-L-homoserina lactona (C7-HSL) e N-octanoil-L-homoserina lactona (C8-HSL), apresentadas nas Figs. 17, 18 e 19, respectivamente.

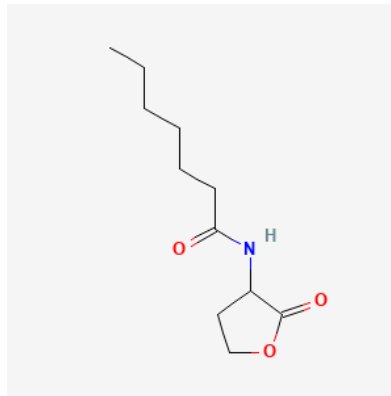
Foi possível detectar e identificar essas moléculas de acordo com o tempo de retenção, utilizando um método semiquantitativo por meio do LC-MS/MS. Por meio da análise de PCA foi visualizado o agrupamento das moléculas contendo os tratamentos com os herbicidas Heat e Roundup.

Figura 17 - Molécula C6-HSL



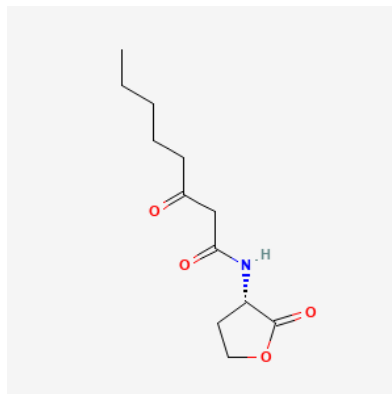
Fonte: PubChem. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/119133>>. Acesso em: 06 jul. 2022.

Figura 18 - Molécula C7-HSL



Fonte: PubChem. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5057188>>. Acesso em: 06 jul. 2022.

Figura 19 - Molécula C8-HSL

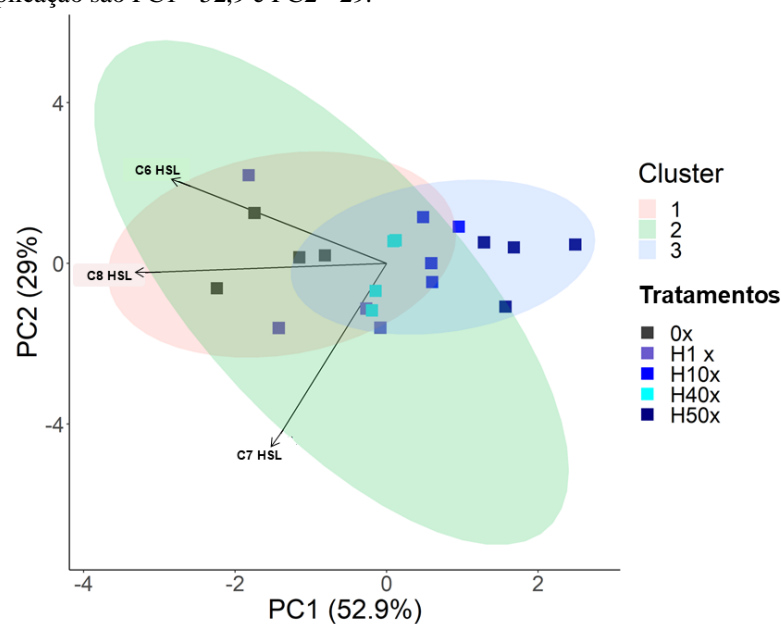


Fonte: PubChem. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4476497>>. Acesso em: 06 jul. 2022.

Na Fig. 20 são apresentados os resultados da análise de PCA da geração das moléculas sinalizadoras de QS contendo o tratamento com o herbicida Heat. Observa-se que

no controle e em 1x houve maior geração das moléculas C6-HSL e C8-HSL, que estão relacionadas principalmente com a maturação de biofilme e proteção contra o estresse oxidativo, respectivamente (ALAYANDE et al., 2018; LUMIJIKTASE et al., 2006). Nas concentrações de 10x, 40x e 50x foram geradas mais moléculas C7-HSL, que pode estar envolvida na resistência a estresses bióticos e abióticos, e formação de biofilme (XUE et al., 2021). A molécula C7-HSL altera seu perfil de produção em doses maiores do herbicida.

Figura 20 – Análise de PCA sobre o perfil de moléculas sinalizadoras de QS na linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A. Tratamentos em quadruplicatas, representados pelos símbolos (0x, 1x, 10x, 40x e 50x). As porcentagens de explicação são PC1= 52,9 e PC2= 29.



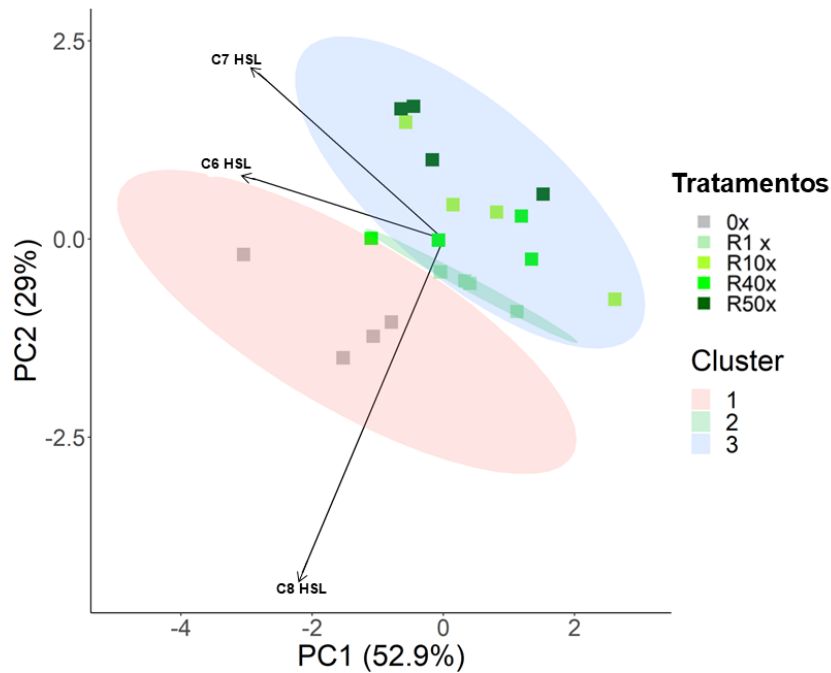
Fonte: A autora.

Em *Pseudomonas syringae*, a 3-oxo-C6-AHL está relacionada com agregação celular e aptidão epifítica (VENTURI, 2006). A C6-HSL também está relacionada na produção e regulação de fenazinas, sideróforos e proteases, e contribui na resposta de defesa de diversos gêneros como *Burkholderia*, *Serratia* e *Pseudomonas* (CHENG et al., 2019). Foi relatado que em ambientes salinos a C6-HSL ajudou contra o estresse devido ao aumento de atividade de SOD, CAT, POD e MDA (DING et al., 2016). Em *Burkholderia pseudomallei*, as moléculas C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL e 3-OH-C8-HSL desempenham um papel importante na proteção da bactéria contra o estresse oxidativo. Essas moléculas estão envolvidas na expressão do gene *dpsA*, que protege o DNA bacteriano do estresse oxidativo, por meio da atividade de CAT e POD (LUMIJIKTASE et al., 2006).

Na Fig. 21 são apresentados os resultados da análise de PCA da geração das moléculas sinalizadoras de QS no tratamento contendo o herbicida Roundup. No controle e

em 1x ocorreu maior geração das moléculas C6-HSL e C8-HSL, e em 10x, 40x e 50x teve maior geração da molécula C7-HSL. As moléculas C6-HSL, 3-OHC6-HSL, 3-oxo-C7-HSL possuem relação na indução de resistência sistêmica contra estresses bióticos e abióticos, colonização e formação de biofilme (XUE et al., 2021).

Figura 21 – Análise de PCA sobre o perfil de moléculas sinalizadoras de QS *Quorum sensing* na linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A. Tratamentos em quadruplicatas, representados pelos símbolos (0x, 1x, 10x, 40x e 50x). As porcentagens de explicação são PC1= 52,9 e PC2= 29.



Fonte: A autora.

Em *Vibrio fischeri*, as moléculas 3O-C6-HSL e C8-HSL desempenham papel na bioluminescência e fatores de colonização. Em *Pantoea stewartii*, a 3O-C6-HSL é responsável pela produção de exopolissacarídeos. Em *Agrobacterium tumefaciens*, a 3O-C8-HSL ajuda em fatores de virulência (LAZDUNSKI et al., 2004). A C6-HSL desempenha papel na indução de resistência sistêmica contra esses bióticos e abióticos, formação de biofilme, colonização bacteriana. 3-OHC6-HSL, 3-oxo-C7-HSL, 3-oxo-C-10-HSL e 3-oxo-C12-HSL também demonstraram proteger contra esses abióticos e bióticos (NAWAZ et al., 2020). Em ambos os tratamentos, a molécula C7-HSL altera seu perfil de produção em concentrações maiores. Já as moléculas C6-HSL e C8-HSL alteram seu perfil de produção em controle e em 1x. No quadro 1, são apresentados os resultados da associação entre as moléculas de QS e os tratamentos contendo os herbicidas Heat e Roundup, nas diferentes concentrações.

**Quadro 1. Associações entre as moléculas de QS e os tratamentos contendo os herbicidas Heat e Roundup**

Moléculas QS	Concentração dos herbicidas								
	0x	H1x	H10x	H40x	H50x	R1x	R10x	R40x	R50x
C6-HSL	+	+	-	-	-	+	-	-	-
C7-HSL	-	-	+	+	+	-	+	+	+
C8-HSL	+	+	-	-	-	+	-	-	-

Fonte: A autora.

Observa-se que a molécula C7-HSL está mais relacionada a altas concentrações dos herbicidas, sendo a única molécula não produzida em controle e em 1x. Isso pode indicar que a linhagem produz mais desta molécula quando está em um ambiente com maior toxicidade. Segundo Moroshi et al. (2004), a C7-HSL é produzida por poucas bactérias, como por exemplo, em *Rhizobium leguminosarum*, e em *Serratia marcescens* foi visualizada apenas na fase estacionária. Apesar de existirem poucos estudos sobre esta molécula, já foi relatado que em *Serratia* sp. e em *Ochrobactrum* sp., foi produzido a 3-oxo-C7-HSL, que contribuiu na produção de pirrolnitrina, que atua na antibiose, e sideróforos para adquirir ferro do solo, inibindo, dessa maneira, oportunistas em plantas (LIU et al., 2010). No trabalho de Nawaz et al. (2020) foi descoberto que em duas linhagens de *Aeromonas* sp., a 3-oxo-C7-HSL pode ter auxiliado no processo de controle de doenças na rizosfera em um solo salino, e juntamente com as moléculas 3-OHC6-HSL, 3-oxo-C10-HSL e 3-oxo-C12-HSL, podem ter contribuído na proteção contra estresses bióticos e abióticos, por meio do aumento na atividade das enzimas SOD, CAT e POD.

Em nossos resultados, a molécula mais abundante em altas concentrações dos herbicidas foi a C7-HSL, possivelmente como proteção ao estresse gerado. Foi observado que a bactéria respondeu as mesmas condições de estresse geradas pelos tratamentos, independente do contato prévio, visto que produziu as mesmas moléculas de QS para ambos os herbicidas em concentrações equivalentes. Este trabalho têm contribuições importantes para pesquisas relacionadas a respostas via QS de bactérias a ambientes contaminados, e possíveis aplicações para biorremediação envolvendo consórcios bacterianos cuja organização da degradação poderia ser organizada por moléculas específicas de QS.

## 5 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou a tolerância da linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A aos tratamentos contendo os herbicidas Heat (presente no local de isolamento) e Roundup (ausente no local de isolamento), visto que a bactéria conseguiu crescer independente do contato prévio e semelhante ao controle. Possivelmente a linhagem *Enterobacter* sp. CMA55A teve respostas às mesmas condições de estresse geradas pelas concentrações dos herbicidas, independente da seleção prévia, sendo que produziu as mesmas moléculas de QS equivalentes para ambos os tratamentos em concentrações equivalentes. A partir disso, sugere-se que o microrganismo possui plasticidade para conseguir se adaptar aos diversos ambientes. Foram identificadas moléculas sinalizadoras de QS importantes na produção de EPS e formação de biofilme, e isso pode ser considerado como estratégias para responder aos herbicidas. As moléculas sinalizadoras de QS: C6-HSL, C7-HSL e C8-HSL, foram geradas nas diferentes concentrações dos herbicidas, portanto, quando a bactéria estava em um ambiente com condições estressantes. As moléculas C6-HSL e C8-HSL foram geradas em controle e em 1x, e a C7-HSL teve maior produção em concentrações mais altas dos herbicidas. Esses resultados podem indicar que as moléculas C6-HSL e C8-HSL estão mais relacionadas a respostas em ambientes menos estressantes e a outras funções não estudadas, e a C7-HSL está mais relacionada com sistema de respostas tipos específicos de estresse, independentemente das substâncias que os origina. Desta forma, possivelmente a linhagem conseguiu sobreviver ao ambiente seletivo por meio de respostas moduladas por diferentes moléculas sinalizadoras de QS.

## REFERÊNCIAS

- ABISADO, R. G.; BENOMAR, S.; KLAUS, J. R.; DANDEKAR, A. A.; CHANDLER, J. R. Bacterial *Quorum Sensing* and Microbial Community Interactions. **mBio**, v. 9, n. 3, 2018.
- ALAYANDE, A. B.; AUNG, M. M.; KIM, I. S. Correlation Between *Quorum Sensing* Signal Molecules and *Pseudomonas aeruginosa*'s Biofilm Development and Virulency. **Current Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 787–793, 2018.
- ALDECOA, A. L. I. De; ZAFRA, O.; GONZÁLEZ-PASTOR, J. E. Mechanisms and Regulation of Extracellular DNA Release and Its Biological Roles in Microbial Communities. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1390, p. 1–19, 2017.
- ALVES, C.; COSTA, E.; SOFIATTI, J. R.; FORTE, C. T.; WINTER, F. L.; HOLZ, C. M.; KAIZER, R. R.; GALON, L. Effect of herbicides in the oxidative stress in crop winter species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, p. 1533–1542, 2018.
- BARCELLOS JÚNIOR, L. H.; PEREIRA, G. A. M.; MATOS, C. C.; SOUZA, P. S. R.; AGAZZI, L. R.; SILVA, E. M. G.; SILVA, A. A. Influence of Organic Matter in Sorption of the Saflufenacil in Ferralsols. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 107, n. 2, p. 263-268, 2021.
- BARROSO, G. M.; SANTOS, J. B.; OLIVEIRA, I. T.; NUNES, T. K. M. R.; FERREIRA, E. A.; PEREIRA, I. M.; SILVA, D. V.; SOUZA, M. F. Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. BR 3901 to herbicides and their ability to use these pesticides as a nutritional source. **Ecological Indicators**, v. 119, 2020.
- BEFFA, R.; MENNE, H.; KÖCHER, and H. Herbicide Resistance Action Committee (HRAC): **Herbicide Classification, Resistance Evolution, Survey, and Resistance Mitigation Activities Modern Crop Protection Compounds**. Disponível em: <http://weedsociety.org/>; Acesso em: 23 nov. 2021.
- 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.
- BRICEÑO, Gabriela et al. Pesticide-tolerant bacteria isolated from a biopurification system to remove commonly used pesticides to protect water resources. **Public Library of Science (PLoS)**, v. 15, n. 6, p. 1-20, 2020.
- BRONIEWSKI, J. M.; CHISNALL, M. A. W.; HOYLAND-KROGGHSSBO, N. M.; BUCKING, A.; WESTRA, E. R. The effect of *Quorum sensing* inhibitors on the evolution of CRISPRbased phage immunity in *Pseudomonas aeruginosa*. **The ISME Journal**, v. 15, n. 8, p. 2465-2473, 2021.
- CAMARGO, F. A. O. et al. Brazilian agriculture in perspective: great expectations vs reality. In: SPARKS, D. L. **Advance in Agronomy**, v. 141, p. 53-114, 2017.
- CHENG, Z.; ZHANG, X.; KENNES, C.; CHEN, J.; CHEN, D.; YE, J.; ZHANG, S.; DIONYSIOU, D. D. Differences of cell surface characteristics between the Bacterium

*Pseudomonas veronii* and fungus *Ophiostoma stenoceras* and their different adsorption properties to hydrophobic organic compounds. **Sci Total Environment**, p. 2095-2106, 2019.

COMONT, D.; LOWE, C.; HULL, R.; CROOK, L.; HICKS, H. L.; ONKOKESUNG, N.; BEFFA, R.; CHILDS, D. Z.; EDWARDS, R.; FRECKLETON, R. P.; NEVE, P. Evolution of generalist resistance to herbicide mixtures reveals a trade-off in resistance management. **Nature Communications**, v. 11, 2020.

DING, L.; CAO, J.; DUAN, Y.; LI, J.; YANG, Y.; YANG, G.; ZHOU, Y. Proteomic and physiological responses of *Arabidopsis thaliana* exposed to salinity stress and N-acyl-homoserine lactone. **Physiol Plant**, v. 4, p. 414-434, 2016.

DOBZANSKI, T.; GRAVINA, F.; STECKLING, B.; OLSCHANESKI, L. R.; SPRENGER, R. F.; SANTO, B. C. E.; GALVÃO, C. W.; RECHE, P. M.; PRESTES, R. A.; PILEGGI, S. A. V.; CAMPOS, F. R.; AZEVEDO, R. A.; SADOWSKY, M. J.; BELTRAME, F. L.; PILEGGI, M. *Bacillus megaterium* strains derived from water and soil exhibit differential responses to the herbicide mesotrione. **Plos one**, v. 13, n. 4, 2018.

FARAH, C.; VERA, M.; MORIN, D.; HARAS, D.; JEREZ, C. A.; GUILIANI, N. Evidence for a functional *quorum-sensing* type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Appl Environ Microbiol**, v. 11, 2005.

FRANCO, A. G.; CADAVID, L. F.; ARÉVALO-FERRO, C. Biofilms and extracts from bacteria producing “*quorum sensing*” signaling molecules promote chemotaxis and settlement behaviors in hydractinia symbiologocarpus (cnidaria: hydrozoa) larvae. **Acta biol. Colomb**, v. 24, n. 1, p. 150-162, 2019.

FREDERICK, M. R.; KUTTLER, C.; HENSE, B. A.; EBERL, H. J. A mathematical model of *quorum sensing* regulated EPS production in biofilm communities. **Theor Biol Med Model**, v. 10, n.8, 2011.

FREITAS, P. N. N.; ROVIDA, A. F. S.; SILVA, C. R.; PILEGGI, S. A. V.; OLSCHANESKI, L. R.; PILEGGI, M. Specific quorum sensing molecules are possibly associated with responses to herbicide toxicity in a *Pseudomonas* strain. **Environmental Pollution**, v. 289, 2021.

GAINES, T. A.; DUKE, S. O.; MORRAN, S.; RIGON, C. A. G.; TRANEL, P. J.; KUPPER, A.; DAYAN, F. E. Mechanisms of evolved herbicide resistance. **Journal of Biological Chemistry**, 2020.

GALIÉ, S.; GUTIÉRREZ-GARCÍA, C.; MIGUÉLEZ, M. E.; VILLAR, C. J.; LOMBÓ, F. Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Frontiers in microbiology*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

GRUBE, M.; KALNENIEKS, U.; MUTER, O. Metabolic response of bacteria to elevated concentrations of glyphosatebased herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 173, p. 372-380, 2019.



GUIJARRO, K. H.; COVACEVICH, F.; APARICIO, V. R.; GERÓNIMO, E. Bacterias nativas del suelo con potencial para la degradación de glifosato y promoción del crecimiento vegetal. **Ciencia del solo**, v. 36, n. 2, p. 105-114, 2018.

IBRAHIM, A. M.; HAMOUDA, R. A.; NAGGAR, N. E.; SHAKANKERY, F. M. A. Bioprocess development for enhanced endoglucanase production by newly isolated bacteria, purification, characterization and in-vitro efficacy as anti-biofilm of *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, 2021.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Agrotóxicos**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxicos>. Acesso em: 06 dez. 2021.

ISEPPI, R.; SABIA, C.; BONDI, M.; MARIANI, M.; MESSI, P. Virulence Factors, Drug Resistance and Biofilm Formation in *Pseudomonas* Species Isolated from Healthcare Water Systems. **Current Microbiology**, v. 77, p. 1737-1745, 2020.

JAISWAL, D. K.; VERMA, J. P.; YADAV, J. Microbe induced degradation of pesticides in agricultural soils. **Environmental Science and Engineering**, 2017.

JAMAL, M.; AHMAD, W.; ANDLEEB, S.; JALIL, F.; IMRAN, M.; NAWAZ, M. A.; JUASSAIN, T.; ALI, M.; RAFIQ, M.; KAMIL, M. A. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, n. 1, p. 07-11, 2018.

KAUR, G. Herbicides and its role in Induction of Oxidative Stress- A Review. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology (IJEAB)**, v. 4, p. 995-1004, 2019.

KRYUCHKOVA, Y.; BURYGIN, G. L.; GEOGOLEVA, N.; GEOGOLEV, Y.; CHERNYSHOVA, M. P.; MARAKOV, O.; FEDOROV, E.; TURKOVSKAYA, O. Isolation and characterization of a degrading rhizosphere strain of glyphosate, *Enterobacter cloacae* K7. **Microbiol Res.**, v. 169, v. 1., 2014.

LAN, M.; LI, S.; XU, Z.; TIAN, C.; YANG, M.; GUI, W.; GUONIAN, Z. Simultaneous determination of saflufenacil and its two metabolites in soil samples by ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **J set sci**, v. 37, p. 658-664, 2014.

LAZDUNSKI, A. M.; VENTRE, I.; STURGIS, J. N. Regulatory circuits and communication in gram-negative bacteria. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n.7, p. 581-592, 2004.

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

LEI, X. G.; Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: basic mechanisms and health implications. **American Physiological Society**, v. 96, n. 1, p. 307-364, 2016.

LI, J.; ZHAO, X. Effects of quorum sensing on the biofilm formation and viable but non-culturable state. **Food Research International**, v. 137, 2020.

LIMA, J. Y.; MOREIRA, C.; FREITAS, P. N. N.; OLCANHESKI, L. R.; PILEGGI, S. A. V.; ETTO, R. M.; STALEY, C.; SADOWSKY, M. J.; PILEGGI, M. Structuring biofilm communities living in pesticide contaminated water. **Heliyon**, v. 6, 2020.

LIU, X.; JIA, J.; ATKINSON, S.; CA'MARA, M.; GAO, K.; LI, H.; CAO, J. Biocontrol potential of an endophytic *Serratia* sp. G3 and its mode of action. **World J Microbiol Biotechnol**, n. 26, p. 1465-1471, 2010.

LU, L.; LI, M.; YI, G.; LIAO, L.; CHENG, Q.; ZHU, J.; ZHANG, B.; WANG, Y.; CHEN, Y.; ZENG, M. Screening Strategies for *Quorum Sensing* Inhibitors in Combating Bacterial Infection. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 2021.

LUMJIAKTASE, P.; GIGGLE, S. P.; LOPRASERT, S.; TUNGPRADABKUL, S.; DAYKIN, M.; CÁMARA, M.; WILLIAMS, P.; KUNAKORN, M. *Quorum sensing* regula *dpsA* e a resposta ao estresse oxidativo em *Burkholderia pseudomallei*. **Microbiology (Reading)**, v. 12, p. 3651-3659, 2006.

MA, H.; MA, S.; HU, H.; DING, L.; REN, H. The biological role of N-acylhomoserine lactone-based *quorum sensing* (QS) in EPS production and microbial community assembly during anaerobic granulation process. **Scientific reports**, v. 8, 2018.

MACHADO, I.; SILVA, L. R.; GIAOURIS, E. D.; MELO, L. F.; SIMÕES, M. Quorum sensing in food spoilage and natural-based strategies for its inhibition. **Food Research International**, 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, 2018.

MOROHOSHI, T.; INABA, T.; KATO, N.; KANAI, K.; IKEDA, T. Identification of *Quorum-Sensing* Signal Molecules and the LuxRI Homologs in Fish Pathogen *Edwardsiella tarda*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 98, n. 4, p. 274-281, 2004.

MUKHERJEE, S.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. **Nat Rev Microbiol**, v. 17, p. 371-382, jun. 2019.

NAWAZ, M. S.; ARSHAD, A.; RAJPUT, L.; KANEEZ, F.; ULLAH, S.; AHMAD, M.; IMRAN, A. Growth-Stimulatory Effect of *Quorum Sensing* Signal Molecule N-Acyl-Homoserine Lactone-Producing Multi-Trait *Aeromonas* spp. on Wheat Genotypes Under Salt Stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.

NZAKIZWANAYO, J.; SCAVONE, P.; SHIRIN, J.; JOSEPH, H.; HARRIET, P.; CINZIA, D.; SELVAGE, J. P.; HIND, C. K.; GUPPY, F. M.; BARNES, L. M.; BHAVIK, A.; RAHMAN, K. M.; SUTTON, M. J.; JONES, B. V. Fluoxetine and thioridazine inhibit efflux and attenuate crystalline biofilm formation by *Proteus mirabilis*. **Scientific reports**, v. 7, n.1, 2017.

OLCANHESKI, L. R.; DOURADO, M. N.; BELTRAME, F. L.; ZIELINSKI, A. A.; DEMIATE, I. M.; PILEGGI, S. A. V.; AZEVEDO, R. A.; SADOWSKY, M. J. PILEGGI,

M. 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, jun. 2014.

OLIVEIRA, E. P.; ROVIDA, A. F. S.; MARTINS, J. G.; PILEGGI, S. A. V.; GRAEFF, Z. S.; PILEGGI, M. Tolerance of *Pseudomonas* strain to the 2,4-D herbicide through a peroxidase system. **Plos one**, v. 16, n. 12, 2021.

ORTORI, C. A.; DUBERN, J. F.; CHHABRA, S. R.; CÁMARA, M.; HARDIE, K.; WILLIAMS, P.; BARRETT, D. A. Simultaneous quantitative profiling of N-acyl-L-homoserine lactone and 2-alkyl-4(1H)-quinolone families of *quorum-sensing* signaling molecules using LC-MS/MS. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 399, n. 2, p. 839-850. 2010.

OLSON, G.M., GAO, H., MEYER, B.M., MILES, M.S., OVERTON, E.B., Effect of 9500<sup>a</sup> Corexit on MississippiCanyon crude oil weatheringpatterns using artificial andnatural seawater. **Heliyon**, v. 3, 2017.

PATHANIA, R.; SHARMA, A.; GUPTA, V. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: from bench to bedside. **Indian Journal of Medical Research**, v. 149, n. 2, p. 129, 2019.

PEDERSEN, H. L.; WILLASSENA, N. P.; LEIROSB, I. The first structure of a cold-adapted superoxide dismutase (SOD): biochemical and structural characterization of iron SOD from *Aliivibrio salmonicida*. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**, v. 65, 2009.

PILEGGI, M.; PILEGGI, S. A. V.; SADOWSKY, M. Herbicide bioremediation: from strains to bacterial communities. **Helyon**, v. 6, 2020.

PRESCOTT, R. D.; DECHO, A. D. Flexibility and Adaptability of *Quorum Sensing* in Nature. **Trends in Microbiology**, v. 28, 2019.

SADIQ, F. A.; BURMOLLE, M.; HEYNDRICKX, M.; FLINT, S.; LU, W.; CHEN, W.; CHAO, J.; ZHANG, H. Community-wide changes reflecting bacterial interspecific interactions in multispecies biofilms. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 338-358, 2021.

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

SINGH, S.; KUMAR, V.; GILL, J. P .K.; DATTA, S.; SINGH, S.; DHAKA, V.; KAPOOR, D.; WANI, A. B.; DHANJAL, D. S.; KUMAR, M.; HARIKUMAR, S. L.; SINGH, J. Herbicide Glyphosate: Toxicity and Microbial Degradation. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, 2020.

TANG, H.; ZHANG, Y.; MA, Y.; TANG, M.; DONGSHENG, S.; WANG, M. Regulation of nicotine tolerance by *quorum sensing* and high efficiency of quorum quenching under nicotine stress in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 1–11, 2018.

THIOUR-MAUPRIVEZ, C.; MARTIN-LAURENT, F.; CALVAYRAC, C.; BARTHELMEBS, L. Effects of herbicide on non-target microorganisms: Towards a new class of biomarkers?. **Science of the Total Environment**, v. 684, p. 314-325, 2019.

VENTURI, V. Regulation of *quorum sensing* in *Pseudomonas*. **International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 30, p. 274-291, 2006.

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

WINSTANLEY, C.; RUMBAUGH, K. P. Complexity and adaptability: an introduction to the special thematic issue on the genus *Pseudomonas*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 18, 2018.

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

XUE, J.; CHI, L.; TU, P.; LAI, Y.; LIU, C.; RU, H.; LU, K. Detection of gut microbiota and pathogen produced N-acyl homoserine in host circulation and tissues. **NPJ Biofilmes Microbiomas**, v. 53, n. 1, 2021.

YANG, D.; JIN, Y.; HE, X.; DONG, A.; WANG, J.; WU, R. Inferring multilayer interactome networks shaping phenotypic plasticity and evolution. **Nat Commun**, v. 12, n. 1, 2021.

ZHAN, H.; FENG, Y.; FAN, X.; CHEN, S. Recent advances in glyphosate biodegradation. **Microbiology and Biotechnology**, 2018

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

**APÊNDICE A – TESTE DE DUNCAN SOBRE AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS NAS MÉDIAS DO TESTE DE TOLERÂNCIA NO TRATAMENTO CONTENDO O HERBICIDA HEAT**

```
> LDuncan(MDA00)
DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS
Confidence Level: 0.95
Dependent Variable: Tolerância
Variation Coefficient: 3.709304 %
Independent Variable: Trat
Factors Means
0x    2.07033333333333 a
H 10x 2.04166666666667 a
H 50x 2.03666666666667 a
H 1x  1.857          b
H 40x 1.81233333333333 b
```

**APÊNDICE B - TESTE DE DUNCAN SOBRE AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS NAS MÉDIAS DO TESTE DE TOLERÂNCIA NO TRATAMENTO CONTENDO O HERBICIDA ROUNDUP**

```
> LDuncan(MDA00)
DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS
Confidence Level: 0.95
Dependent Variable: Tolerância
Variation Coefficient: 5.107727 %
Independent Variable: Trat
Factors Means
R 40X  2.116          a
0x    2.07033333333333 ab
R 1X  2.05966666666667 ab
R 10X 2.00866666666667 ab
R 50X 2.004          b
```

**APÊNDICE C – TESTE DE DUNCAN SOBRE AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS NAS MÉDIAS DA CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO NO TRATAMENTO CONTENDO O HERBICIDA HEAT.**

> LDuncan(CURVA0hh)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: zero

Variation Coefficient: 4.163336e-14 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

0x 0.05 a

10x 0.05 a

1x 0.05 a

40x 0.05 a

50x 0.05 a

> LDuncan(CURVA1hh)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: um

Variation Coefficient: 23.0184 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

50x 0.1533333333333333 a

1x 0.126 ab

40x 0.1253333333333333 ab

10x 0.106 ab

0x 0.093 b

> LDuncan(CURVA2hh)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: dois

Variation Coefficient: 17.50733 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

50x 0.3446666666666667 a

40x 0.303 ab

10x 0.273 ab

1x 0.245 b

0x 0.2236666666666667 b

> LDuncan(CURVA3hh)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: tres  
 Variation Coefficient: 10.68599 %  
 Independent Variable: Trat  
 Factors Means  
 50x 0.7863333333333333 a  
 40x 0.744 ab  
 10x 0.6846666666666667 ab  
 1x 0.662 ab  
 0x 0.6293333333333333 b

> LDuncan(CURVA4hh)  
 DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS  
 Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: quatro  
 Variation Coefficient: 14.53244 %  
 Independent Variable: Trat  
 Factors Means  
 50x 1.185 a  
 1x 0.997 ab  
 40x 0.9953333333333333 ab  
 10x 0.9706666666666667 ab  
 0x 0.9043333333333333 b

> LDuncan(CURVA5hh)  
 DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS  
 Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: cinco  
 Variation Coefficient: 11.70064 %  
 Independent Variable: Trat  
 Factors Means  
 50x 1.372 a  
 40x 1.2566666666666667 ab  
 1x 1.2393333333333333 ab  
 10x 1.2266666666666667 ab  
 0x 1.2216666666666667 b

> LDuncan(CURVA6hh)  
 DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS  
 Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: seis  
 Variation Coefficient: 12.96789 %  
 Independent Variable: Trat  
 Factors Means  
 50x 1.5016666666666667 a  
 10x 1.426 ab  
 40x 1.371 ab  
 0x 1.3546666666666667 ab  
 1x 1.3443333333333333 b



> LDuncan(CURVA7hh)  
DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
Dependent Variable: sete  
Variation Coefficient: 11.2479 %  
Independent Variable: Trat  
Factors Means  
50x 1.672666666666667 a  
1x 1.551 ab  
0x 1.536666666666667 ab  
40x 1.531333333333333 ab  
10x 1.517333333333333 b

> LDuncan(CURVA8hh)  
DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
Dependent Variable: oito  
Variation Coefficient: 9.950363 %  
Independent Variable: Trat  
Factors Means  
50x 1.754666666666667 a  
0x 1.682333333333333 ab  
1x 1.670666666666667 ab  
40x 1.657333333333333 ab  
10x 1.631666666666667 b

> LDuncan(CURVA9hh)  
DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
Dependent Variable: nove  
Variation Coefficient: 8.768728 %  
Independent Variable: Trat  
Factors Means  
50x 1.860333333333333 a  
0x 1.728666666666667 ab  
1x 1.726666666666667 ab  
40x 1.725666666666667 ab  
10x 1.694 b

> LDuncan(CURVA10hh)  
DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
Dependent Variable: dez  
Variation Coefficient: 7.788461 %  
Independent Variable: Trat  
Factors Means

50x 1.91666666666667 a  
 1x 1.82433333333333 ab  
 0x 1.81366666666667 ab  
 40x 1.79633333333333 ab  
 10x 1.78833333333333 b

> LDuncan(CURVA11hh)  
 DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: onze  
 Variation Coefficient: 7.361422 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

50x 1.932 a  
 1x 1.84733333333333 ab  
 0x 1.84133333333333 ab  
 10x 1.83966666666667 ab  
 40x 1.82733333333333 b

> LDuncan(CURVA12hh)  
 DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: doze  
 Variation Coefficient: 7.508491 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

50x 1.95966666666667 a  
 1x 1.90366666666667 ab  
 40x 1.87066666666667 ab  
 10x 1.863 ab  
 0x 1.80366666666667 b

> LDuncan(CURVA13hh)  
 DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: treze  
 Variation Coefficient: 5.639802 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

50x 2.00233333333333 a  
 1x 1.908 ab  
 40x 1.88733333333333 ab  
 0x 1.85733333333333 ab  
 10x 1.828 b

> LDuncan(CURVA14hh)  
DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
Dependent Variable: quatorze  
Variation Coefficient: 5.00749 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

50x	2.016	a
1x	1.95466666666667	ab
0x	1.94966666666667	ab
10x	1.935	ab
40x	1.926	b

> LDuncan(CURVA15hh)  
DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
Dependent Variable: quinze  
Variation Coefficient: 4.187817 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

50x	2.062	a
1x	1.99666666666667	ab
0x	1.97733333333333	ab
10x	1.973	ab
40x	1.945	b

> LDuncan(CURVA16hh)  
DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
Dependent Variable: dezesseis  
Variation Coefficient: 3.708951 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

50x	2.064	a
0x	2.01433333333333	ab
10x	1.99833333333333	ab
1x	1.99266666666667	ab
40x	1.97666666666667	b

> LDuncan(CURVA17hh)  
DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
Dependent Variable: dezessete

Variation Coefficient: 3.839495 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

50x	2.07833333333333	a
0x	2.02666666666667	ab
10x	2.01633333333333	ab
1x	2.00533333333333	ab
40x	1.992	b

> LDuncan(CURVA18hh)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: dezoito

Variation Coefficient: 3.351338 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

50x	2.09433333333333	a
10x	2.03666666666667	ab
1x	2.01866666666667	ab
0x	2.01666666666667	ab
40x	1.99633333333333	b

> LDuncan(CURVA19hh)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: dezenove

Variation Coefficient: 4.600104 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

50x	2.07066666666667	a
40x	2.041	ab
0x	2.02966666666667	ab
10x	1.97933333333333	ab
1x	1.97766666666667	b

> LDuncan(CURVA20hh)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: vinte

Variation Coefficient: 2.909925 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

0x	2.07033333333333	a
1x	2.03533333333333	ab
10x	2.01533333333333	ab
40x	2.01233333333333	ab
50x	2.00166666666667	b

```
> LDuncan(CURVA21hh)
DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS
Confidence Level: 0.95
Dependent Variable: vinteum
Variation Coefficient: 5.344128 %
Independent Variable: Trat
Factors Means
0x  2.06533333333333 a
50x 2.02166666666667 ab
10x 1.95533333333333 ab
40x 1.91733333333333 ab
1x  1.871          b
```

**APÊNDICE D – TESTE DE DUNCAN SOBRE AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS NAS MÉDIAS DA CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO NO TRATAMENTO CONTENDO O HERBICIDA ROUNDUP TRANSORB R.**

> LDuncan(CURVA0hh)  
DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
Dependent Variable: zero  
Variation Coefficient: 4.163336e-14 %

Independent Variable: Trat  
Factors Means  
0x 0.05 a  
10x 0.05 a  
1x 0.05 a  
40x 0.05 a  
50x 0.05 a

> LDuncan(CURVA1hh)  
DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
Dependent Variable: um  
Variation Coefficient: 18.21361 %

Independent Variable: Trat  
Factors Means  
50x 0.212 a  
40x 0.1846666666666667 a  
10x 0.1173333333333333 b  
1x 0.1123333333333333 b  
0x 0.107 b

> LDuncan(CURVA2hh)  
DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
Dependent Variable: dois  
Variation Coefficient: 9.491345 %

Independent Variable: Trat  
Factors Means  
40x 0.354 a  
50x 0.3363333333333333 ab  
1x 0.317 ab

10x 0.291666666666667 b  
 0x 0.290666666666667 b

> LDuncan(CURVA3hh)

#### DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: tres  
 Variation Coefficient: 9.607849 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

40x 0.702666666666667 a  
 10x 0.66 ab  
 1x 0.653333333333333 ab  
 0x 0.624 ab  
 50x 0.613 b

> LDuncan(CURVA4hh)

#### DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: quatro  
 Variation Coefficient: 13.43105 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

40x 0.997333333333333 a  
 50x 0.982333333333333 ab  
 1x 0.967666666666667 ab  
 10x 0.921 ab  
 0x 0.886 b

> LDuncan(CURVA5hh)

#### DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: cinco  
 Variation Coefficient: 13.34153 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

40x 1.190666666666667 a  
 50x 1.111 ab  
 1x 1.08 ab  
 10x 1.014666666666667 ab  
 0x 1.008333333333333 b

> LDuncan(CURVA6hh)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: seis  
 Variation Coefficient: 13.89356 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

40x	1.365	a
50x	1.343666666666667	ab
1x	1.311333333333333	ab
10x	1.176666666666667	ab
0x	1.105333333333333	b

> LDuncan(CURVA7hh)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: sete  
 Variation Coefficient: 10.3121 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

40x	1.566666666666667	a
1x	1.375666666666667	ab
50x	1.37	ab
0x	1.289666666666667	ab
10x	1.284	b

> LDuncan(CURVA8hh)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: oito  
 Variation Coefficient: 16.12314 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

40x	1.619333333333333	a
50x	1.448666666666667	ab
1x	1.368	ab
10x	1.367666666666667	ab
0x	1.299666666666667	b

> LDuncan(CURVA9hh)



## DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: nove  
 Variation Coefficient: 14.18884 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

50x	1.54866666666667	a
10x	1.53766666666667	ab
1x	1.50833333333333	ab
0x	1.45433333333333	ab
40x	1.44833333333333	b

> LDuncan(CURVA10hh)

## DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: dez  
 Variation Coefficient: 12.34145 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

40x	1.63133333333333	a
1x	1.609	ab
0x	1.49833333333333	ab
50x	1.496	ab
10x	1.417	b

> LDuncan(CURVA11hh)

## DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: onze  
 Variation Coefficient: 7.378361 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

40x	1.685	a
0x	1.634	ab
10x	1.58966666666667	ab
50x	1.521	ab
1x	1.46733333333333	b

> LDuncan(CURVA12hh)

## DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: doze  
 Variation Coefficient: 11.65466 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

40x	1.814	a
10x	1.714	ab
1x	1.7	ab
0x	1.557666666666667	ab
50x	1.510666666666667	b

> LDuncan(CURVA13hh)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: treze  
 Variation Coefficient: 11.33109 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

40x	1.825333333333333	a
50x	1.72	ab
1x	1.679333333333333	ab
0x	1.678666666666667	ab
10x	1.671666666666667	b

> LDuncan(CURVA14hh)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: quatorze  
 Variation Coefficient: 8.10209 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

40x	1.945666666666667	a
50x	1.790666666666667	ab
0x	1.787666666666667	ab
1x	1.766333333333333	ab
10x	1.716333333333333	b

> LDuncan(CURVA15hh)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: quinze

Variation Coefficient: 9.375128 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

40x	1.93966666666667	a
50x	1.81366666666667	ab
1x	1.726	ab
10x	1.60166666666667	b
0x	1.53066666666667	b

> LDuncan(CURVA16hh)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: dezesseis

Variation Coefficient: 5.347671 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

40x	1.97433333333333	a
1x	1.9	ab
0x	1.866	ab
10x	1.86066666666667	ab
50x	1.85466666666667	b

> LDuncan(CURVA17hh)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: dezessete

Variation Coefficient: 5.008605 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

40x	1.98833333333333	a
1x	1.93333333333333	ab
10x	1.90866666666667	ab
50x	1.90066666666667	ab
0x	1.89366666666667	b

> LDuncan(CURVA18hh)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: dezoito

Variation Coefficient: 7.95823 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

10x	1.93533333333333	a
40x	1.93366666666667	ab
0x	1.91733333333333	ab
1x	1.84133333333333	ab
50x	1.80933333333333	b

> LDuncan(CURVA19hh)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: dezenove

Variation Coefficient: 5.548121 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

1x	2.02733333333333	a
40x	2.01633333333333	ab
50x	1.95733333333333	ab
0x	1.952	ab
10x	1.935	b

> LDuncan(CURVA20hh)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: vinte

Variation Coefficient: 13.65034 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

10x	1.74133333333333	a
1x	1.74	ab
40x	1.656	ab
0x	1.62666666666667	ab
50x	1.514	b

> LDuncan(CURVA21hh)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: vinteum  
Variation Coefficient: 15.41089 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

0x	1.79666666666667	a
50x	1.71766666666667	ab
1x	1.695	ab
40x	1.69333333333333	ab
10x	1.66866666666667	b

**APÊNDICE E – TESTE DE DUNCAN SOBRE AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS NAS MÉDIAS DA VIABILIDADE CELULAR BACTERIANA NO TRATAMENTO CONTENDO O HERBICIDA HEAT.**

**0x**

> LDuncan(VIA00)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: Viabilidade  
 Variation Coefficient: 28.45885 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

0 x 8h	143666666.666667	a
0 x 4h	1.22e+08	ab
0 x 12h	1.21e+08	b

**1x**

> LDuncan(VIA11)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: Viabilidade  
 Variation Coefficient: 34.59043 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

1x 12h	161666666.666667	a
1x 4h	92333333.333333	ab
1x 8h	8.7e+07	b

**10x**

> LDuncan(VIA1010)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: Viabilidade  
 Variation Coefficient: 27.8414 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

10x 12h	2.01e+08	a
10x 4h	1.28e+08	ab
10x 8h	96333333.333333	b

**40x**

> LDuncan(VIA4040)

## DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: Viabilidade

Variation Coefficient: 36.77157 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

40x 12h 149666666.666667 a

40x 4h 114333333.333333 ab

40x 8h 1.01e+08 b

**50x**

> LDuncan(VIA5050)

## DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: Viabilidade

Variation Coefficient: 17.33969 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

50x 12h 167666666.666667 a

50x 4h 162333333.333333 ab

50x 8h 131333333.333333 b

**4h**

> LDuncan(VIA4hh)

## DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: Viabilidade

Variation Coefficient: 31.92419 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

50x 4h 162333333.333333 a

10x 4h 1.28e+08 ab

0x 4h 1.22e+08 ab

40x 4h 114333333.333333 ab

1x 4h 92333333.333333 b

**8h**

> LDuncan(VIA8hh)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: Viabilidade

Variation Coefficient: 29.69111 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

0x 8h 143666666.666667 a

50x 8h 131333333.333333 ab

40x 8h 1.01e+08 ab

10x 8h 96333333.333333 ab

1x 8h 8.7e+07 b

**12h**

> LDuncan(VIA12hh)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: Viabilidade

Variation Coefficient: 25.21724 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

10x 12h 2.01e+08 a

50x 12h 167666666.666667 ab

1x 12h 161666666.666667 ab

40x 12h 149666666.666667 ab

0x 12h 1.21e+08 b



**APÊNDICE F – TESTE DE DUNCAN SOBRE AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS NAS MÉDIAS DA VIABILIDADE CELULAR BACTERIANA NO TRATAMENTO CONTENDO O HERBICIDA ROUNDUP.**

**0x**

> LDuncan(VIA00)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: Viabilidade  
 Variation Coefficient: 25.86035 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

0 x 10h	1.7e+08	a
0 x 7h	106666666.666667	ab
0 x 4h	97666666.666667	b

**1x**

> LDuncan(VIA11)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: Viabilidade  
 Variation Coefficient: 37.05486 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

1x 7h	166333333.333333	a
1x 10h	150666666.666667	ab
1x 4h	102333333.333333	b

**10x**

> LDuncan(VIA1010)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95  
 Dependent Variable: Viabilidade  
 Variation Coefficient: 41.32797 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

10x 10h	201333333.333333	a
10x 7h	1.79e+08	ab
10x 4h	1.39e+08	b

**40x**

> LDuncan(VIA4040)

## DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: Viabilidade

Variation Coefficient: 35.52215 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

40x 10h 169333333.333333 a

40x 7h 1.19e+08 ab

40x 4h 50666666.6666667 b

**50x**

> LDuncan(VIA5050)

## DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: Viabilidade

Variation Coefficient: 40.91356 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

50x 10h 221666666.666667 a

50x 7h 113333333.333333 ab

50x 4h 67666666.6666667 b

**4h**

> LDuncan(VIA4hh)

## DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: Viabilidade

Variation Coefficient: 62.22053 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

10x 4h 1.39e+08 a

1x 4h 102333333.333333 ab

0x 4h 97666666.6666667 ab

50x 4h 67666666.6666667 ab

40x 4h 50666666.6666667 b

**7h**

> LDuncan(VIA7hh)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: Viabilidade

Variation Coefficient: 35.4416 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

10x 7h 1.79e+08 a

1x 7h 166333333.333333 ab

40x 7h 1.19e+08 ab

50x 7h 113333333.333333 ab

0x 7h 106666666.666667 b

**10h**

> LDuncan(VIA10hh)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: Viabilidade

Variation Coefficient: 27.32561 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

50x 10h 221666666.666667 a

10x 10h 201333333.333333 ab

0x 10h 1.7e+08 ab

40x 10h 169333333.333333 ab

1x 10h 150666666.666667 b

**APÊNDICE G – TESTE DE DUNCAN SOBRE AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS NAS MÉDIAS DA VIABILIDADE CELULAR BACTERIANA NOS TRATAMENTOS CONTENDO OS HERBICIDAS HEAT EM 15H.**

> LDuncan(MDA00)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: Viabilidade

Variation Coefficient: 24.30273 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

H0X 686666666.666667 a

H1X 473333333.333333 b

H10X 396666666.666667 bc

H40X 396666666.666667 bc

H50X 273333333.333333 c

**APÊNDICE H – TESTE DE DUNCAN SOBRE AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS NAS MÉDIAS DA VIABILIDADE CELULAR BACTERIANA NOS TRATAMENTOS CONTENDO OS HERBICIDAS ROUNDUP EM 15H.**

> LDuncan(MDA00)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: Viabilidade

Variation Coefficient: 30.4088 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

R1X 3.7e+08 a

R0X 356666666.666667 ab

R50X 356666666.666667 ab

R40X 3e+08 ab

R10X 2.8e+08 b

**APÊNDICE I – TESTE DE ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) SOBRE OS AGRUPAMENTOS DAS MOLÉCULAS SINALIZADORAS DE QS (C6 HSL, C7 HSL E C8 HSL) NOS TRATAMENTOS CONTENDO O HERBICIDA HEAT EM 15H.**

\*\*\*VECTORS

	PC1	PC2	r2	Pr(>r)	
C6.HSL	-0.80333	0.59553	0.8686	0.001	***
C7.HSL	-0.31392	-0.94945	0.9536	0.001	***
C8.HSL	-0.99745	-0.07134	0.8359	0.001	***

---

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

Permutation: free

Number of permutations: 999

\*\*\*FACTORS:

Centroids:

	PC1	PC2
Trat0x	-1.4019	-0.0926
Trat0x	-1.7448	1.2543
TratH1 x	-0.7236	-0.1791
TratH1 x	-1.4227	-1.6095
TratH10x	0.6810	0.5303
TratH10x	0.5914	0.0043
TratH40x	-0.0314	-0.1830
TratH50x	1.4295	-0.2775
TratH50x	2.0880	0.4310

Goodness of fit:

	r2	Pr(>r)
Trat	0.6509	0.021 *

---

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

Permutation: free

Number of permutations: 999

**APÊNDICE J – TESTE DE ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) SOBRE OS AGRUPAMENTOS DAS MOLÉCULAS SINALIZADORAS DE QS (C6 HSL, C7 HSL E C8 HSL) NOS TRATAMENTOS CONTENDO O HERBICIDA ROUNDUP EM 15H.**

\*\*\*VECTORS

	PC1	PC2	r2	Pr(>r)	
C6.HSL	-0.96691	0.25510	0.7048	0.001	***
C7.HSL	-0.80246	0.59671	0.7709	0.001	***
C8.HSL	-0.45481	-0.89059	0.9800	0.001	***

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

Permutation: free  
Number of permutations: 999

\*\*\*FACTORS:

Centroids:

	PC1	PC2
Trat0x	-1.6350	-0.8241
Trat0x	-1.5280	-1.5004
TratR1 x	0.4527	-0.6047
TratR10 x	2.6156	-0.7603
TratR10x	0.1300	0.7482
TratR40x	0.3405	0.0071
TratR50x	0.0637	1.2197

Goodness of fit:

	r2	Pr(>r)	
Trat	0.6967	0.001	***

---

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

Permutation: free

Number of permutations: 999

**APÊNDICE K – TESTE DE DUNCAN SOBRE AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS NAS MÉDIAS DA PRODUÇÃO DE EPS BACTERIANO NOS TRATAMENTOS CONTENDO OS HERBICIDAS HEAT EM 15H.**

```
> LDuncan(MDA00)
DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS
Confidence Level: 0.95
Dependent Variable: Biofilme
Variation Coefficient: 10.91537 %
Independent Variable: Trat
Factors Means
H40x  3.353          a
H1x  3.28566666666667 ab
H50x  3.23766666666667 ab
0x   3.212          ab
H10x  3.04866666666667 b
```



**APÊNDICE L – TESTE DE DUNCAN SOBRE AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS NAS MÉDIAS DA PRODUÇÃO DE EPS BACTERIANO NOS TRATAMENTOS CONTENDO OS HERBICIDAS ROUNDUP EM 15H.**

> LDuncan(MDA00)

DUNCAN TEST TO COMPARE MEANS

Confidence Level: 0.95

Dependent Variable: Biofilme

Variation Coefficient: 3.256222 %

Independent Variable: Trat

Factors Means

10x 3.41366666666667 a

40x 3.34333333333333 ab

50x 3.31333333333333 ab

1x 3.29466666666667 ab

0x 3.212 b