



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE SOBRAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ANTÔNIO FRANCISCO DE SOUSA**

**BIODEGRADAÇÃO DO ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) POR**  
*Burkholderia* sp. SMF042

**SOBRAL**

**2013**

**ANTÔNIO FRANCISCO DE SOUSA**

**BIODEGRADAÇÃO DO ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) POR  
*Burkholderia* sp. SMF042**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, *campus* Sobral como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.  
Área: Macromoléculas  
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha.

**SOBRAL**

**2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Faculdade de Medicina – *Campus* de Sobral

- 
- S696b      Sousa, Antônio Francisco de.  
              Biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) por burkholderia SP. SMF042. / Antônio Francisco de Sousa. – 2013.  
              94 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2013.  
              Área de Concentração: Macromoléculas.  
              Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha.
1. Herbicidas. 2. Biorremediação . I. Título.

**ANTÔNIO FRANCISCO DE SOUSA**

**BIODEGRADAÇÃO DO ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) POR**

***Burkholderia* sp. SMF042**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, *campus* Sobral como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.  
Área: Macromoléculas  
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha.

Aprovada em 08/05/2013.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha (orientador)

Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Theodora Thays Arruda Cavalcante

Instituto Superior de Teologia Aplicada (INTA)

---

Prof. Dr. João Garcia Alves Filho  
Instituto Superior de Teologia Aplicada (INTA)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Professor Rodrigo Maranguape pela sua orientação e por ter confiado a mim a execução deste trabalho.

A Maria Auxiliadora Silva Oliveira que me ensinou a técnica de sequenciamento de DNA.

Aos pesquisadores Sergio Viana de Faria e Cláudio de Oliveira Cunha pelos isolados de *Burkholderia*.

A Nyanne Hardy Lima Pontes por toda a sua colaboração e competência na análise dos experimentos de eletroferose bidimensional, e ao Bruno Bezerra Carneiro.

Ao Raulzito Fernandes Moreira por sua ajuda crucial no desenrolar dos experimentos de eletroferose bidimensional.

A Aurilene Gomes Cajado por sua competência e conhecimento prestandos nos experiemntos de PCR em tempo real.

Agradeço à Fundação Cearense de Apóio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP pela bolsa de pós-graduação.

Enfim, agradeço a todos que ou diretamente ou indiretamente contribuiu para a elaboração desse trabalho. Muito obrigado!

“Combati o bom combate, completei a  
carreira, guardei a fé”

2 Timóteo 4:7

## RESUMO

Bactérias do gênero *Burkholderia* possuem a capacidade de biodegradar inúmeros compostos considerados poluentes. Mediante o exposto, este trabalho visou a identificação molecular do isolado SMF042 oriundo de uma coleção de espécies de *Burkholderia*, verificar sua capacidade biodegradar o herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), identificar as enzimas envolvidas neste processo por eletroforese bidimensional (2D) e a analisar a expressão dos genes *tfdA* e *tfdB* da via TFD de biodegradação do 2,4-D. A fim de fazer a extração de RNA e proteínas foi realizado o crescimento bacteriano em dois meios de cultivo BH (meio mineral), um controle, suplementado com glicose (600 mg/L), e outro suplementado com 2,4-D (600 mg/L). A extração de RNA foi realizada na fase logarítmica enquanto a extração de proteínas foi feita no início da fase estacionária de crescimento bacteriano. A partir das proteínas extraídas foi determinado o mapa bidimensional de referência para cada condição. O ajuste das imagens dos géis bidimensionais, a detecção de *spots* protéico e a avaliação dos dados para determinar variações quantitativas e qualitativas, massa molecular (MW) e ponto isoelétrico (pI) dos *spots* foi feito pelo programa ImageMaster e a análise da expressão dos genes, foi realizado por qRT-PCR empregando o método da expressão relativa  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Por meio da análise do gene 16S rRNA o isolado SMF042 foi identificado como *Burkholderia phymatum*. No tocante a abordagem proteômica, o número médio de *spots* das réplicas dos géis foi de 535 (controle) e 705 (tratado). A maior abundância de proteínas foi observado nos géis na faixa de MW 20 e 40 KDa e pH 5-6. Enzimas envolvidas na biodegradação do 2,4-D foram identificadas utilizando os valores de pI e MW do *spot* em comparação com o banco de dados de proteínas no ExPASy, foram elas: 2,4-D alfa KG-dependente dioxigenase (*tfdA*) e clorocatecol 1,2-dioxigenase (*tfdC*) pertencentes a via TFD e 2,4-D oxigenase da via cadRABK, ambas de biodegradação do 2,4-D. Proteínas envolvidas na resistência ao estresse químico, também foram identificadas, sendo elas: proteína GrpE e chaperona DnaK. O nível de expressão do gene *tfdA* aumentou cerca de 23 vezes em relação ao controle. Pelo exposto, o isolado SMF042 foi capaz de crescer em um meio contendo 2,4-D como única fonte de carbono, expressou proteínas de vias de biodegradação do 2,4-D, resistência ao estresse químico e aumentou a expressão gênico de *tfdA*, o que indica a importância desta bactéria na biodegradação deste poluente.

**Palavras-chave:** *Burkholderia*. Biodegradação. Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

## ABSTRACT

*Burkholderia* bacteria it has ability to biodegrade pollutants considered numerous compounds. By the above, this study aimed to identify molecular SMF042 come from an isolated collection of *Burkholderia* species, verify their ability to biodegrade the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), to identify the enzymes involved in this process by electrophoresis two-dimensional (2D) and to analyze the expression of genes and TFDA *tfdB* track TFD biodegradation of 2,4-D. In order to make the extraction of RNA and protein bacterial growth was performed in two culture media BH (mineral medium), a control supplemented with glucose (600 mg / L) and another supplemented with 2,4-D (600 mg / L). RNA extraction was performed in the logarithmic phase while protein extraction was done at the beginning of the stationary phase of bacterial growth. The extracted proteins from two-dimensional map was determined for each reference condition. The adjustment of images of two-dimensional gels, the protein spot detection and evaluation of data to determine quantitative and qualitative changes, molecular weight (MW) and isoelectric point (pI) of the spots was made by the ImageMaster software and analysis of gene expression was qRT-PCR performed by using the method of relative expression  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Through the analysis of the 16S rRNA isolate SMF042 was identified as *Burkholderia phymatum*. Regarding proteomics approach, the average number of spots of the replicas of the gels was 535 (control) and 705 (treated). The most abundant protein in the gels was observed in the range of 20 and 40 MW kDa and pH 5 and 6. Enzymes involved in the biodegradation of 2,4-D were identified using the values of pI and MW of spot against a database of proteins at ExPASy, they were: 2,4-D alpha KG-dependent dioxygenase (TFDA) and chlorocatechol 1,2-dioxygenase (*tfdC*) belonging saw PDT and 2,4-D oxygenase pathway cadRABK, both biodegradation of 2,4-D. Proteins involved in resistance to chemical stress, have also been identified, which are: protein chaperone DnaK and GrpE. The level of gene expression TFDA increased about 23 times compared to control. As shown, the isolated SMF042 was able to grow on a medium containing 2,4-D as sole carbon source expressed protein degradation pathways of 2,4-D, resistance to chemical stress and increased expression of gene TFDA, which indicates the importance of this bacterium in this pollutant biodegradation.

**Keywords:** *Burkholderia*. Biodegradation. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D).



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Fórmula estrutural do ácido 2,4-diclorofenoxiacético.....	19
<b>Figura 2</b> – Possíveis mobilizações do 2,4-D no ambiente .....	23
<b>Figura 3</b> – Via TFD de biodegradação do 2,4-D por <i>Alcaligenes eutrophus</i> JMP134 .....	28
<b>Figura 4</b> –Vias de biodegradação do 2,4-D. 1 via ácido hidroxifenoxiacético e 2: via fenol. 29	
<b>Figura 5</b> –_Foto de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta.....	54
<b>Figura 6</b> –_Foto de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta.....	55
<b>Figura 7</b> – Verificação da qualidade da sequência do gene 16S rRNA conforme a quantidade dos nucleotídeos.....	57
<b>Figura 8</b> –_Verificação da qualidade da sequência do gene 16S rRNA conforme a quantidade dos nucleotídeos.....	57
<b>Figura 9</b> –_Crescimento do isolado SMF042 em meio mineral BH (Bushnell Hass) com diferentes concentrações do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) como única fonte de carbono.....	60
<b>Figura 10</b> – Curva de crescimento do isolado SMF042 em meio mineral BH (Bushnell Hass). .....	61
<b>Figura 11</b> – Curva de crescimento do isolado SMF042 em meio mineral BH (Bushnell Hass) suplementado com 600mg/L do ácido 2,4-diclorofenoxiacético.....	63
<b>Figura 12</b> – Foto de eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta.....	64
<b>Figura 13</b> – Foto de eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta.....	65
<b>Figura 14</b> – Expressão relativa dos genes <i>tfdA</i> e <i>tfdB</i> da via TFD de biodegradação do 2,4-D. ....	66
<b>Figura 15</b> – SDS-PAGE de proteínas totais do isolado SMF042 em gel de poliacrilamida 12,5%. ....	67
<b>Figura 16</b> – Géis bidimensionais de referência de proteínas de SMF042.....	68
<b>Figura 17</b> – Número médio de <i>spots</i> por gel.....	69
<b>Figura 18</b> – Gráficos de correlação linear dos géis de proteínas do isolado SMF042.....	70

<b>Figura 19</b> – Foto de eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta.....	71
<b>Figura 20</b> – Distribuição das proteínas de acordo com o pI. ....	72
<b>Figura 21</b> – <i>Spot</i> correspondente à enzima 2,4-diclorofenoxiacetato monoxigenase.....	74
<b>Figura 22</b> – <i>Spot</i> correspondente à enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase ( <i>tfdC</i> ).....	74
<b>Figura 23</b> – <i>Spot</i> correspondente à enzima 2,4-alfa KG-dependente dioxigenase ( <i>tfdA</i> ). ....	75
<b>Figura 24</b> – <i>Spot</i> correspondente à enzima 2,4-D oxigenase. ....	75
<b>Figura 25</b> – <i>Spot</i> correspondente à proteína GrpE. ....	77
<b>Figura 26</b> – <i>Spot</i> correspondente a chaperona DnaK.....	77

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Propriedades físicas e químicas do ácido diclorofenoxiacético.....	20
<b>Tabela 2-</b> Bactérias capazes de biodegradar o herbicida 2,4-D.....	26
<b>Tabela 3-</b> Sequência de <i>primers</i> para qRT-PCR usados nesse estudo .....	50
<b>Tabela 4</b> - Descrição da amostra de DNA genômico extraída do isolado SMF042.....	54
<b>Tabela 5</b> - Resultado do alinhamento mais significativo das sequências dos isolados ( <i>query</i> ) com sequências disponíveis no GenBank do NCBI.....	58
<b>Tabela 6</b> - Descrição das amostras de RNA Total extraídas dos isolados. ....	64
<b>Tabela 7</b> - Descrição das amostras de cDNA dos isolados.....	65
<b>Tabela 8</b> - Proteínas com valores de pI e massa molecular próximos dos valores teóricos de enzimas envolvidas com a biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético. ....	73
<b>Tabela 9</b> - Proteínas com valores de pI e massa molecular próximos dos valores teóricos de enzimas envolvidas na tolerância ao estresse.....	77
<b>Tabela 10</b> - Identificação das possíveis proteínas com expressão quantitativa aumentada de <i>Burkholderia</i> sp.SMF042 relacionadas com a biossíntese.....	80
<b>Tabela 11-</b> Identificação das possíveis proteínas com expressão quantitativa aumentada de <i>Burkholderia</i> sp.SMF042 relacionadas com a tolerância ao estresse oxidativo.....	81
<b>Tabela 12-</b> Identificação das possíveis proteínas com expressão quantitativa aumentada de <i>Burkholderia</i> sp.SMF042 relacionadas com a produção de energia.....	81
<b>Tabela 13</b> - Identificação das possíveis proteínas com expressão quantitativa aumentada de <i>Burkholderia</i> sp.SMF042 relacionadas com a exploração do meio ambiente.....	82
<b>Tabela 14</b> - Identificação das possíveis proteínas com expressão quantitativa reduzida de <i>Burkholderia</i> sp.SMF042 relacionadas com a biossíntese.....	84
<b>Tabela 15</b> - Identificação das possíveis proteínas com expressão quantitativa reduzida de <i>Burkholderia</i> sp.SMF042 o metabolismo celular.....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Eletroforese bidimensional
BH	Bushnell Hass
BLAST	Ferramenta de Alinhamento Básico Local
BLASTn	Ferramenta de Alinhamento Básico Local (nucleotídeo)
BSD	Biodegradative Strain Database
CBC	Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>
CM	Clorpirifós-metil
CHAPS	Ciclohexilamino dimetilamônio propano sulfonato
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
ddNTP	Didesoxirribonucleotídeos Trifosfatados
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
DBT	Dibenzotiofeno
DO	Densidade Ótica
EPS	Exopolissacarídeo
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
FC	Fibrose Cística
GENBANK	Banco de Dados de Sequencias Genéticas
H <sub>2</sub> O	Água
KDa	Kilodalton

LD <sub>50</sub>	Dose letal para 50% da população em estudo
MEGA	Análise de genética Molecular Evolutiva
IPG	Gradiente de pH Imobilizado
IEF	Focalização Isoelétrica
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
nm	Nanômetro
OP	Inseticidas Organofosforados
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
μM	Micromolar
μL	Microlitro
rRNA	RNA Ribossômico
rpm	Rotação por minuto
RNA	Ácido desoxirribonucléico
SDS PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de Dodecil sulfato de Sódio
PHA	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
Pb	Pares de Bases
pI	Ponto isoelétrico
qRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

SDS	Dodecil sulfato de Sódio
SMF	Sérgio Miana de Faria
TE	Tampão Tris-EDTA
Tom	Tolueno <i>o</i> -monoxigenase
TCP	3,5,6-tricloro-2-piridíniol
TY	Triptona-Levedura
MW	Massa molecular

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>19</b>
2.1	O herbicida 2,4-D (ácido 2,4 – diclorofenoxiacético)	19
2.1.1	<i>Toxicidade do 2,4-D (ácido 2,4 – diclorofenoxiacético)</i>	21
2.2	Biodegradação e biorremediação	24
2.3	Bactérias envolvidas na biodegradação do 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético).	25
2.3.1	<i>Metabolismo da biodegradação do 2,4-D (ácido 2,4 – diclorofenoxiacético)</i>	27
2.4	O gênero <i>Burkholderia</i>	29
2.4.1	Caracterização do gênero	29
2.4.1.1	<i>Complexo Burkholderia cepacia (CBC)</i>	33
2.4.1.2	<i>Patógenos de animais e vegetais</i>	33
2.4.1.3	<i>Burkholderia e fixação biológica de nitrogênio atmosférico</i>	34
2.4.2	Potencial biotecnológico do gênero <i>Burkholderia</i>	36
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>40</b>
3.1	Objetivo geral	40
3.2	Objetivos específicos	40
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>41</b>
4.1	Identificação do isolado SMF042	41
4.1.1	<i>Isolados empregados e condições de cultivo</i>	41
4.1.2	<i>Extração e purificação de DNA genômico</i>	41
4.1.3	<i>Verificação da qualidade e concentração de DNA genômico</i>	42
4.1.4	<i>Amplificação do gene 16S rRNA</i>	42
4.1.5	<i>Sequenciamento do gene 16S rRNA</i>	43
4.1.6	<i>Análise das sequências de nucleotídeos</i>	44
4.1.7	<i>Identificação do isolado SMF042 com base no gene 16S rRNA</i>	44

<b>4.2</b>	<b>Ensaio de biodegradação do 2,4-D (ácido 2,4 – diclorofenoxiacético) .....</b>	<b>45</b>
4.2.1	<i>Determinação da concentração preferencial de 2,4-D para o crescimento do isolado SMF042 .....</i>	45
4.2.1	<i>Crescimento do isolado SMF042 em meio mineral BH na presença de 2,4-D.....</i>	45
4.2.3	<i>Crescimento do isolado SMF042 pré-tratado com 2,4-D.....</i>	46
<b>4.3</b>	<b>Análise da expressão dos genes <i>tfdA</i> e <i>tfdB</i> envolvidos na biodegradação do 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) do isolado SMF042 por qRT-PCR.....</b>	<b>47</b>
4.3.1	<i>Crescimento do isolado SMF042 em meio mineral BH na presença de 2,4-D.....</i>	47
4.3.2	<i>Extração de RNA total .....</i>	47
4.3.3	<i>Síntese de cDNA.....</i>	48
4.3.4	<i>qRT-PCR e análise da expressão relativa .....</i>	48
4.3.4.1	<i>Desenho dos primers para os genes <i>tfdA</i> e <i>tfdB</i>.....</i>	48
4.3.3.2	<i>Reação de qRT-PCR .....</i>	49
<b>4.4</b>	<b>Análise de proteínas diferencialmente expressas do isolado SMF042 crescidas em meio BH suplementado com 2,4-D por eletroforese bidimensional (2D).....</b>	<b>50</b>
4.4.1	<i>Crescimento do isolado SMF042 em meio BH suplementado com 2,4-D.....</i>	50
4.4.2	<i>Extração de proteínas intracelulares.....</i>	50
4.4.3	<i>Eletroforese bidimensional.....</i>	51
4.4.3.1	<i>Primeira dimensão .....</i>	51
4.4.3.2	<i>Segunda dimensão .....</i>	51
4.4.3.3	<i>Identificação de proteínas.....</i>	52
4.4.3.4	<i>Análise Estatística .....</i>	52
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>53</b>
<b>5.1</b>	<b>Identificação do isolado SMF042 .....</b>	<b>53</b>
5.1.1	<i>Extração de DNA genômico .....</i>	53
5.1.2	<i>Amplificação do gene 16S rRNA.....</i>	54



5.1.3	<i>Sequenciamento do gene 16S rRNA, análise das sequencias de nucleotídeos e identificação do isolado SMF042.....</i>	54
5.2	<b>Ensaio de biodegradação do 2,4-D (ácido 2,4 – diclorofenoxiacético) .....</b>	<b>56</b>
5.2.1	<i>Determinação da concentração preferencial de 2,4-D para o crescimento do isolado SMF042 .....</i>	56
5.2.2	<i>Crescimento do isolado SMF042 em meio BH na presença de 2,4-D.....</i>	57
5.2.3	<i>Crescimento do isolado SMF042 pré-tratado ao 2,4-D.....</i>	58
5.3	<b>Análise da expressão dos genes <i>tfdA</i> e <i>tfdB</i> envolvidos na biodegradação do 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) do isolado SMF042 por qRT-PCR.....</b>	<b>60</b>
5.2.1	<i>Extração de RNA total e síntese de cDNA .....</i>	60
5.2.2	<i>qRT-PCR e análise da expressão relativa.....</i>	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
5.4	<b>Análise de proteínas diferencialmente expressas do isolado SMF042 crescidas em meio BH suplementado com 2,4-D por eletroforese bidimensional (2D).....</b>	<b>64</b>
5.4.1	<i>Extração e quantificação de proteínas.....</i>	64
5.4.2	<i>Análise do péfil proteico do isolado SMF042 por eletroforese bidimensional.....</i>	64
5.4.3	<i>Reprodutibilidade dos géis bidimensionais .....</i>	66
5.4.4	<i>Distribuição das proteínas do isolado SMF042 de acordo com o ponto isoelétrico e massa molecular.....</i>	68
5.4.5	<i>Identificação de proteínas envolvidas na biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).....</i>	69
5.4.6	<i>Identificação de proteínas envolvidas na tolerância ao estresse provocado por 2,4-D.....</i>	73
5.4.7	<i>Verificação das proteínas que apresentaram expressão quantitativa aumentada na presença do 2,4-D .....</i>	75
5.4.8	<i>Verificação das proteínas que apresentaram expressão quantitativa reduzida na presença do 2,4-D .....</i>	80
6	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>84</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Entende-se por contaminação ambiental a introdução pelo homem, direta ou indiretamente de compostos químicos no ambiente, normalmente designados de poluentes, provocando um efeito negativo no seu equilíbrio, causando assim danos na saúde humana, nos seres vivos e no ecossistema ali presente. As atividades industriais, o uso de fertilizantes e pesticidas (inseticidas e herbicidas) e a disposição de resíduos no meio ambiente sem tratamento prévio são algumas das numerosas e variadas fontes de contaminação do solo na atualidade. A contaminação do solo pode acarretar prejuízos não só ao meio ambiente como também à saúde humana (JAIN *et al.*, 2005).

Desde os primórdios da produção agrícola, houve a necessidade de se controlar o crescimento de plantas indesejadas, denominadas de ervas daninhas que cresciam juntamente com as culturas de interesse, o que acarretava prejuízos nas colheitas. O desenvolvimento da agricultura deve-se em parte a aplicação de herbicidas, os quais são compostos químicos capazes de interferir na fisiologia das ervas daninhas eliminando-as (BAIRD, 2002; PRIMEL *et al.*, 2005).

Por outro lado, em virtude de sua natureza química, os herbicidas em geral apresentam um elevado potencial poluente. A aplicação de herbicidas pode gerar problemas ambientais, uma vez que são muitas vezes extremamente tóxicos. Os herbicidas são aplicados geralmente em grandes quantidades e, persistem no solo por muito tempo, de maneira que o mesmo pode ser armazenado e translocado para recursos hídricos, prejudicando a qualidade das águas superficiais e subterrâneas (RODRIGUES *et al.*, 2005; TAUCHERT, 2006).

A contaminação ambiental provocada pelo uso indiscriminado de herbicidas tem causado uma série de preocupações no tocante ao comportamento destes compostos no ambiente. Vale ressaltar que muitas intervenções objetivando despoluir ambientes contaminados por herbicidas geralmente transferem os resíduos de um lugar para outro sem eliminar o princípio ativo. Dentre os herbicidas envolvidos na degradação ambiental destaca-se o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), muito utilizado no controle de ervas daninhas em áreas agrícolas.

Vários métodos podem ser empregados para remover poluentes do solo e água, tais como extração de vapor do solo, bombeamento e biorremediação. Não há uma regra geral que determine o melhor tratamento de uma área contaminada específica. Cada caso deve ser analisado individualmente, avaliando suas particularidades (MARIANO, 2006).

Tratamentos físicos separam os contaminantes do solo sem destruí-los ou modificá-los quimicamente, mas apresentam muitas limitações, destacando-se o alto custo. Processos biológicos, por outro lado, são uma tecnologia promissora para remover esses contaminantes devido à simplicidade e eficiência de custo quando comparados a outras alternativas (TONINIL *et al.*, 2010).

Biorremediação é um processo no qual organismos vivos, normalmente plantas ou microrganismos, são utilizados tecnologicamente para remover ou reduzir (remediar) poluentes no ambiente. Este processo biotecnológico de remediação tem sido intensamente pesquisado (URBANCE *et al.*, 2003) e recomendado pela comunidade científica atual como uma alternativa viável para o tratamento de ambientes contaminados, tais como águas superficiais, subterrâneas e solos, além de resíduos e efluentes industriais em aterro ou áreas de contenção. Embora outras tecnologias que usam processos físicos e/ou químicos sejam também indicadas para descontaminar ambientes poluídos, o processo biológico de biorremediação é uma alternativa ecologicamente mais adequada e eficaz para o tratamento de ambientes contaminados com moléculas orgânicas de difícil degradação e metais tóxicos (GAYLARDE *et al.*, 2005).

Além disso, a transformação biótica de poluentes químicos tem sido alvo de estudos visando o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para a descontaminação de ambientes, principalmente pelo alto custo e baixa adequação das estratégias físico-químicas de remediação (JAIN *et al.*, 2005).

A diversidade microbiana constitui o mais extraordinário reservatório da vida na biosfera. Dois aspectos são importantes nessa diversidade, à quantidade de diferentes organismos e sua relativa distribuição homogênea (HUSTON, 1994). Os microrganismos são recicladores naturais, que convertem compostos orgânicos tóxicos em substâncias menos perigosas, frequentemente água e dióxido de carbono. Desde a

descoberta de que alguns microrganismos possuem a capacidade de transformar e/ou degradar xenobióticos, os pesquisadores têm explorado essa diversidade microbiana visando o desenvolvimento de biotecnologias (JAIN *et al.*, 2005).

Sem dúvida, os tratamentos baseados em processos biológicos são os mais adequados, uma vez que permitem o tratamento de grandes volumes de efluentes transformando compostos orgânicos tóxicos em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, com custos relativamente baixos (FREIRE *et al.*, 2000; AVANZI *et al.*, 2009). Diversas bactérias, principalmente as do cluster genérico *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Arthrobacter* e *Burkholderia*, têm sido isoladas e suas habilidades de catabolizar esses químicos poluentes, caracterizadas.

Membros do gênero *Burkholderia* são microrganismos versáteis que ocupam uma grande diversidade de nichos ecológicos, a guisa de exemplos, podemos citar solo, água, oceanos, rizosfera de plantas e trato respiratório humano (COENYE; VANDAMME, 2003).

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), é um herbicida mundialmente utilizado na agricultura e horticultura desde 1940. No entanto, devido à sua toxicidade e recalcitrância, além de possível efeito mutagênico, a presença de 2,4-D no ambiente representa potenciais riscos tanto para a saúde humana quanto para os demais seres vivos (JING-YUN *et al.*, 2012; SANDAVAL-CARRASCO *et al.*, 2013).

Desta forma, o esclarecimento dos mecanismos moleculares relativos à adaptação e biodegradação do herbicida 2,4-D é importante no sentido de se desenvolver tecnologias para lidar com os danos ambientais e de saúde que o mesmo provoca.

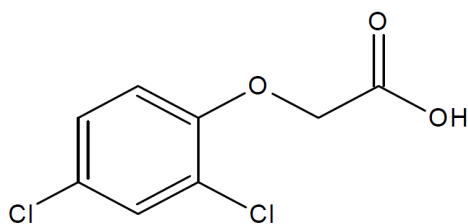
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O herbicida 2,4-D (ácido 2,4 – diclorofenoxiacético)

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético cuja estrutura é mostrada na figura 1, também conhecido como 2,4-D pela Patente PI0013646-8, trata-se de um dos herbicidas organoclorados mais antigos e mais utilizados no mundo (CASTRO, 2010). Este composto foi desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial (1939 a 1945) a partir do ácido fenóxiacético para aumentar a produção agrícola devido a sua ação contra ervas daninhas (OPAS, 1997).

No final década de 40 o produto foi registrado como herbicida devido seus efeitos negativos no crescimento de plantas. Posteriormente o 2,4-D passou a ser extensamente empregado no controle de ervas daninhas de folhas largas em culturas de arroz, cana de açúcar e milho (AKSU; KABASAKAL, 2004). A tabela 1 cita as propriedades físicas e químicas do 2,4-D. O 2,4-D em associação com o ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) produziu o agente laranja, o qual foi empregado durante a Guerra do Vietnã para desfolhar as florestas vietnamitas (1954-1975) (FRUMKIN, 2003).

Figura 1 – Fórmula estrutural do ácido 2,4-diclorofenoxiacético.



Fonte: Castro e colaboradores (2010)

Tabela 1 - Propriedades físicas e químicas do ácido diclorofenoxiacético.

<b>Propriedades</b>	<b>Valores e características</b>
Massa molar	221, 03744
Fórmula molecular	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Solubilidade em água à 25° C (mgL-1)	900
Solubilidade em metanol 19,7 a 20,3° C (gL-1)	392,8
Volume molar (cm <sup>3</sup> )	148,4
Ponto de fusão (°C)	162,8
Ponto de ebulição (°C)	345,6
Cor	Branco
Textura	Cristalino
Densidade (g cm <sup>3</sup> )	1.488
Pressão de vapor (mmHg a 25° C)	2,31.10-5
pKa	2,8

Fonte: Castro e colaboradores (2010).

O herbicida 2,4-D possui ação semelhante ao fitormônio auxina (o que torna o 2,4-D uma auxina sintética) interferindo no alongamento da célula vegetal. Uma vez atingindo o interior da planta, este composto provoca o crescimento desordenado dos tecidos acarretando enrolamento do caule e nervuras o que resulta em murchamento e por fim a queda das folhas. Por fim, os tecidos de condução da seiva são rompidos provocando a morte celular em decorrência da falta de nutrientes (VIDAL; MEROTTO, 2001).

Dois fatores foram responsáveis pelo sucesso do emprego do 2,4-D em muitos países do mundo: o baixo custo e sua alta seletividade contra dicotiledôneas deixando vivas as monocotiledôneas, o que foi uma grande vantagem nos plantios de monocotiledôneas de importância comercial como milho, arroz e cereais (VIANEZ JÚNIOR, 2007). Segundo Taiz e Zeiger (2004) essa seletividade decorre do fato de que em dicotiledôneas, o 2,4-D o qual atua como auxina sintética, não sofre metabolização na mesma proporção que as auxinas endógenas, ao passo que as monocotiledôneas podem inativar rapidamente o 2,4-D.

### 2.1.2 Toxicidade do 2,4-D (ácido 2,4 – diclorofenoxiacético)

O herbicida 2,4-D é mundialmente uma das principais ferramentas da agricultura no controle de plantas daninhas, sendo muito utilizado nos Estados Unidos, Europa e países da Ásia (QUEIROZ, 2007). Sobre isso vale ressaltar que a cultura do trigo nos Estados Unidos emprega basicamente o 2,4-D, sendo considerado o terceiro produto fitossanitário mais consumido, onde emprega-se cerca de 31.000 toneladas anualmente (VIANEZ JÚNIOR, 2007). Na região Sul do Brasil o 2,4-D também é largamente utilizado, sendo até mesmo encontrado nas águas da região (PRIMEL *et al.*, 2005). Sobre isso há relatos que cerca de 91,7% do 2,4-D acabará eventualmente contaminando os corpos hídricos, comprometendo a vida dos seres vivos que estão expostos (TAYEB *et al.*, 2010).

Tendo em vista a presença do 2,4-D nos cursos das águas das regiões agrícolas que utilizam o herbicida (TAYEB *et al.*, 2010), diversos autores têm reportado efeitos de toxicidade em peixes, dentre eles Benli e colaboradores (2007) ao mostrarem a grande sensibilidade de *Astacus leptodactylos* ao 2,4-D com valor de concentração letal (CL<sub>50</sub>) (96 horas de contato) de 32,6 mg/L. Segundo os autores o 2,4-D inibi a ação da enzima acetilcolinesterase o que provoca alterações no sistema nervoso central do peixe. Para tilápias adultas e fases larvais, Sarikaya e Selvi (2005) relatam os valores CL<sub>50</sub> (48 horas de contato) de 86,90 mg/L e 28,23 mg/L respectivamente. Por sua vez Oruç e colaboradores (2004) reportaram a ocorrência de estresse oxidativo em carpas (*Cyprinus carpio*) mediante a exposição (96 horas) ao 2,4-D.

Com relação à saúde humana, o 2,4-D acomete o sistema nervoso central, o coração, o fígado e é também cancerígeno (VIEIRA *et al.*, 1999). Em seu trabalho, Bukowska (2003) relatou que o tratamento de eritrócitos humanos *in vitro* com 2,4-D a 250 e 500 ppm resultou em diminuição dos níveis de glutathione reduzida, diminuição da atividade da enzima superóxido dismutase e aumento dos níveis de glutathione peroxidase. Estas mudanças significativas na atividade das enzimas antioxidantes e evidências de estresse oxidativo indicam que o 2,4-D deve ser levado a sério como um agente citotóxico além de potencialmente genotóxico. Sobre isso Nakbi *et al* (2010) relatam que o 2,4-D é capaz de produzir estresse oxidativo tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

No tocante ao efeito oxidativo em animais, é interessante verificar que os autores Romero-Puertas *et al* (2004) sugerem que a atividade herbicida do 2,4-D pode também ser devido a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, radicais peroxila e oxigênio singlete) o que provoca estresse oxidativo nas plantas.

Neste contexto, é preocupante o uso indiscriminado deste herbicida em decorrência de seus efeitos deletérios no meio ambiente e por seu potencial poder tóxico ao homem. Com relação a saúde humana e risco ao ambiente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) considera o 2,4-D com nível de toxicidade 1, ou seja, altamente tóxico (CASTRO, 2010).

Em um estudo realizado por Karam e colaboradores (2009) foi verificado que o uso do 2,4-D apresenta riscos a saúde do trabalhador (aplicador ou coletor) e do consumidor. Sobre isso vale ressaltar que nos Estados Unidos o 2,4-D foi associado com interferências no sistema endócrino (HORIKOSHI *et al.*, 2003). No mesmo ano a ANVISA também classificou o 2,4-D como suspeito por alterações no sistema endócrino (HORIKOSHI *et al.*, 2003). Com relação ao meio ambiente o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários do Ministério da Agricultura (<http://www.agricultura.gov.br/servicos-e-sistemas/sistemas/agrofit>) classifica o 2,4-D entre muito perigoso a perigoso e no que tange a toxicologia é considerado entre extremamente tóxico a altamente tóxico.

Para prevenir problemas de contaminação, o Brasil por meio da Portaria nº 518 do Ministério da Saúde de 25 de março de 2004 em seu artigo 14, estabelece o valor de 30,0 µg/L como máximo aceitável para 2,4-D em água potável (BRASIL, 2004). Contudo, com relação a padrões internacionais o Brasil chega a ser bem tolerante, ao ser comparado com os países da Europa que determinam como concentração máxima 0,1 µg/L de agrotóxico em água destinada a potabilidade (GUEDES, 2010).

Um fator relevante do 2,4-D é sua persistência no solo. De fato o solo é o principal reservatório do excesso de 2,4-D, contudo é também o ponto de partida para sua disseminação em lençóis freáticos, atmosfera e seres vivos (DIAS *et al.*, 2011). A grande resistência do 2,4-D a degradação natural atua como um importante agravante

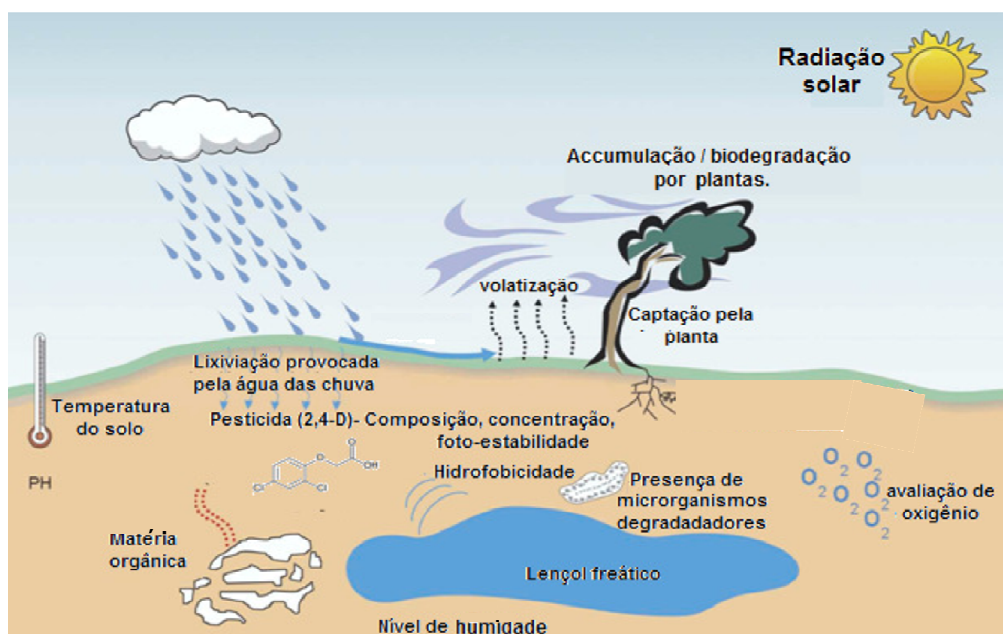


relativo à sua toxicidade. Sobre isso, Tayeb e colaboradores (2010) afirmam que a meia vida do 2,4-D no solo gira em torno de 20 a 200 dias, a qual depende das propriedades do ambiente. Por outro lado, é importante destacar que alguns resíduos do herbicida podem persistir por anos (MCCALL *et al.*, 1981).

Apesar de ser o ambiente mais atingido pelos efeitos causados pelo 2,4-D, é no solo que o herbicida sofre a maior parte de sua eliminação a qual pode se dar por degradação química, física e biológica, denominada de biodegradação. Dentre as três destaca-se a biodegradação como a principal forma de degradação de herbicidas (MACKAY; BETTS, 1989; GUEDES, 2010). Segundo Vianez Júnior (2007) há uma grande diversidade de microrganismo capazes de realizar a biodegradação do 2,4-D e empregá-lo como fonte de carbono e energia.

De acordo com Guedes (2010) herbicidas halogenados tais como o 2,4-D são poluentes relativamente comuns na natureza, de maneira que os microrganismos desenvolveram ao longo da evolução uma grande quantidade de enzimas e vias metabólicas de degradação de xenobióticos.

Figura 2 – Possíveis mobilizações do 2,4-D no ambiente.



Fonte: Adaptado de Guedes (2010).

## 2.2 Biodegradação e biorremediação

Entende-se por biodegradação a capacidade que determinados microrganismos possuem de degradar compostos químicos, ao passo que a biorremediação consiste na técnica de se utilizar destes seres vivos para realizar a remediação ambiental, ou seja, para converter compostos tóxicos, comumente designados de xenobióticos, em compostos menos nocivos ou comuns no ambiente (TONINIL *et al.*, 2010).

Os xenobióticos (xenos do grego: estrangeiro) compreendem diversas moléculas, sendo a maioria delas oriundas de atividades humanas, tais como herbicidas, inseticidas, fármacos, tintas, solventes orgânicos e hidrocarbonetos diversos, tais como derivados do petróleo que se inserem nos ambientes naturais, os quais dependendo da concentração podem ser tornar poluentes (GAYLARDE *et al.*, 2005).

Embora a biorremediação não seja exclusividade de bactérias, o aparato metabólico bacteriano é altamente versátil e apto a degradar uma infinidade de xenobióticos (GAYLARDE *et al.*, 2005). Bactérias biorremediadoras possuem um aparato enzimático capaz de degradar determinados poluentes, incorporando-os no seu metabolismo, resultando na produção de moléculas menos nocivas, ou na mineralização, produzindo CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O.

## 2.3 Bactérias envolvidas na biodegradação do 2,4-D (ácido 2,4 - diclorofenoxiacético)

A biodegradação do 2,4-D é orquestrada tanto por fatores bióticos quanto por fatores abióticos. Os tipos de microrganismos envolvidos, as condições ambientais (temperatura e pH) e os constituintes do ambiente, são elementos que afetam o processo de biodegradação (GUEDES, 2010). Ainda segundo Guedes (2010) a biodegradação do 2,4-D pode ser aeróbica ou anaeróbica, sendo esta última muito mais lenta.

Diversas bactérias do solo estão envolvidas na degradação do 2,4-D, muito embora nem todas possuam o aparato enzimático completo para degradá-lo até os

produtos finais CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Sobre isso, de acordo com Ellis e colaboradores (2006) as bactérias *Alcaligenes eutrophus*, *Azotobacter chroococcum*, *Ralstonia eutropha*, *Flavobacterium* sp, *Arthrobacter* sp, *Pseudomonas* sp, são capazes de dar início a via de biodegradação ao passo que outras como *Comamonas testosteroni* JH5 e *Pseudomonas cepacia* 166 podem dar continuidade ao processo ao executar etapas posteriores.

Diversos autores relatam a biodegradação do 2,4-D por bactérias, dentre estas podemos citar: *Flavobacterium* sp. (SILVA *et al.*, 2007), *Pseudomonas cepacia* (atual *Burkholderia cepacia*) (DAUGHERTY; KAREL, 1994), *Serratia marcescens* (SILVA *et al.*, 2007), *Bradyrhizobium* sp. (KITAGAWA *et al.*, 2002), *Xanthobacter* sp. (DITZELMULLER *et al.*, 1989), *Alcaligenes paradoxus* e *Alcaligenes eutrophus* (DON; PEMBERTON, 1981), *Acinetobacter* sp. (SILVA *et al.*, 2007), e *Arthrobacter* sp. (TIEDJE *et al.*, 1969). Com relação às espécies *Pseudomonas* sp e *Alcaligenes* sp, estas possuem uma vasta gama de oxigenases, hidroxilases, hidrolases e isomerases capazes de degradar o 2,4-D (GUEDES, 2010).

Em virtude do grande número de pesquisas envolvendo a biodegradação de xenobióticos, há atualmente na rede mundial (internet) o acúmulo de informações oriundas de trabalhos publicados em bancos de dados. Dentre eles o banco de dados BSD (Biodegradative Strain Database) (URBANCE *et al.*, 2003) contem informações sobre a diversidade de bactérias capazes de biodegradar o herbicida 2,4-D (tabela 2).

Tabela 2 - Bactérias capazes de biodegradar o herbicida 2,4-D.

<b>Bactérias</b>	<b>Estirpes</b>
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	J14a
<i>Alcaligenes xylooxidans</i>	TFD9
<i>Arthrobacter</i> sp.	DL-1
<i>Burkholderia</i> sp.	712
<i>Burkholderia</i> sp.	EML 1549
<i>Burkholderia</i> sp.	RASC
<i>Burkholderia</i> sp.	TFD2
<i>Burkholderia</i> sp.	TFD39
<i>Burkholderia</i> sp.	TFD6
<i>Corynebacterium sepedonicum</i>	KZ4
<i>Defluviobacter lusitensis</i>	S1
<i>Flavobacterium</i> sp.	50001
<i>Halomonas</i> sp.	I-18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	142
<i>Ralstonia basilensis</i>	RK1
<i>Ralstonia eutropha</i>	JMP134
<i>Ralstonia eutropha</i>	TFD38
<i>Rhodoferax fermentans</i>	B6-9
<i>Rhodoferax fermentans</i>	TFD23
<i>Rhodoferax fermentans</i>	TFD231
<i>Rhodopseudomonas</i> sp.	M1
<i>Sphingomonas</i> sp.	2,4-D-1
<i>Sphingomonas</i> sp.	B6-10
<i>Sphingomonas</i> sp.	B6-5
<i>Sphingomonas</i> sp.	EML146
<i>Sphingomonas</i> sp.	K1443

Fonte: <http://bsd.cme.msu.edu/jsp/SearchController.jsp?token=2%2C4-D>. Acessado em 28 de julho de 2012.

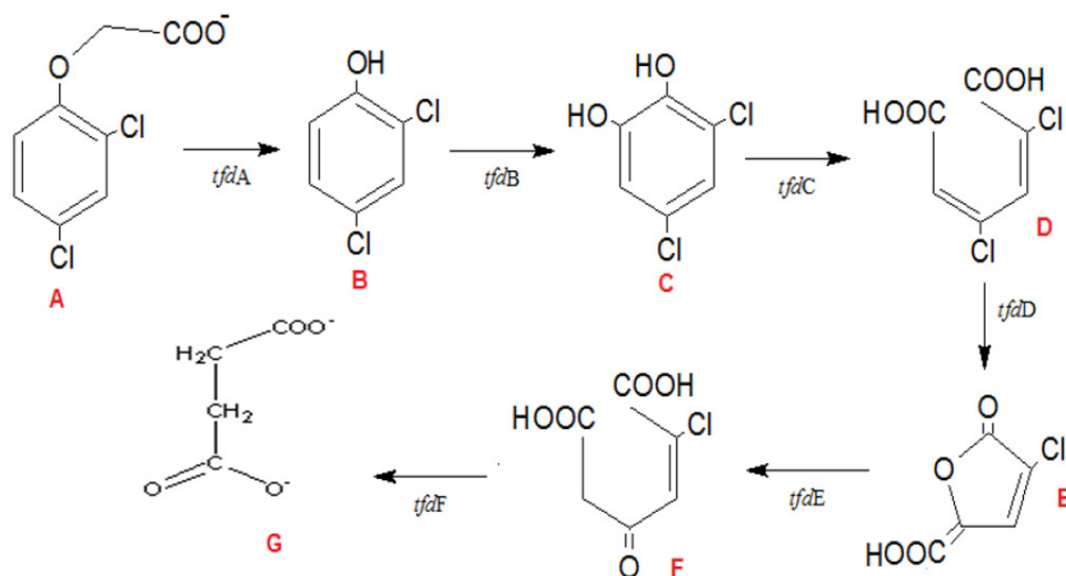
### ***2.3.1 Metabolismo da biodegradação do 2,4-D (ácido 2,4 – diclorofenoxiacético)***

Como foi mostrado no item 2.3 diversas são as bactérias capazes de realizar a biodegradação do 2,4-D, contudo pouco é conhecido sobre as vias responsáveis pela metabolização do herbicida (GUEDES, 2010).

Sobre isso, Fisher e colaboradores (1978) foram um dos primeiros pesquisadores a informarem a presença de genes plasmidiais responsáveis pelo metabolismo do 2,4-D em *Alcaligenes paradoxus*, chamado de plasmídeo pJP1.

Posteriormente muitas outras bactérias contendo genes plasmidiais responsáveis por codificar enzimas capazes de degradar o 2,4-D foram descritas. Dentre estes plasmídeos destaca-se o pJP4 isolado inicialmente de *Alcaligenes eutropha* JM134 (DON; PEMBERTON, 1981) atualmente *Ralstonia eutropha* JM134. Este plasmídeo porta os genes da via TFD de biodegradação do 2,4-D, sendo até então, a única via de metabolismo do herbicida completamente caracterizada, na qual o 2,4-D é metabolizado até succinato (FUKUMORI; HAUSINGER, 1993). Esta via é representada na figura 3.

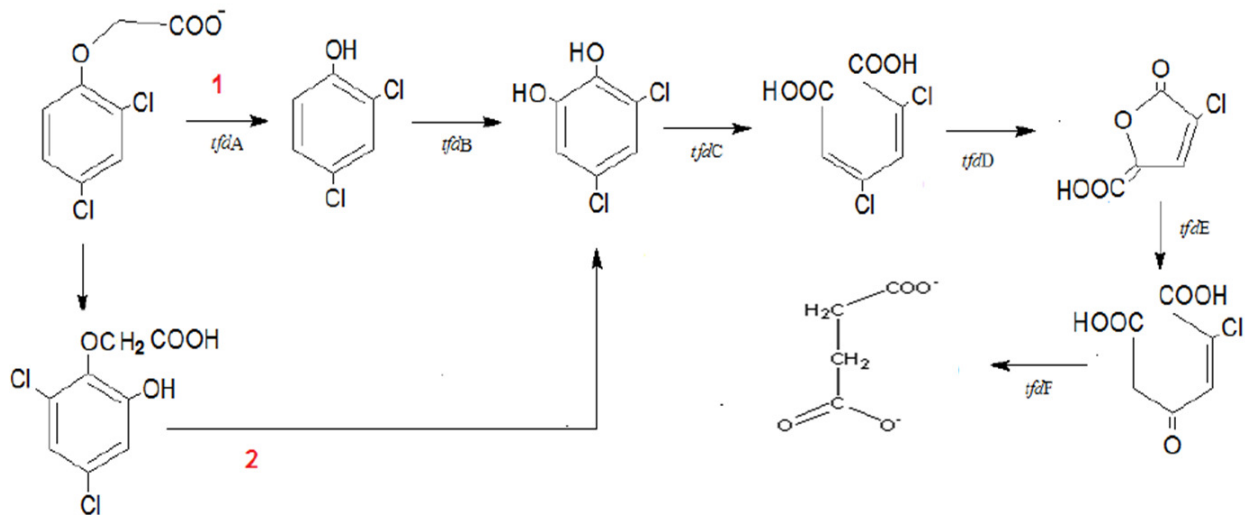
Figura 3 – Via TFD de biodegradação do 2,4-D por *Alcaligenes eutrophus* JMP134



Fonte: Adaptado de Guedes, 2010. A: 2,4-diclorofenoxiacetato; B: 2,4-diclorofenol; C: 3,5-diclorocatecol; D: 2,4-diclorocis, cis-muconato; E: cis-2-clorodieno lactona; F: 2-cloromaleilacetato; G: succinato.

De acordo com Ghassemi e colaboradores (1981) o mecanismo de biodegradação do herbicida 2,4-D mais importante é o que envolve a remoção da cadeia lateral do 2,4-D para produzir 2,4-diclorofenol seguido da produção de ácidos orgânicos até o succinato. Contudo, há duas formas de biodegradação do 2,4-D por bactérias. A primeira, chamada de via ácido hidroxifenoxiacético, ocorre na qual o 2,4-D é inicialmente hidroxilado produzindo o ácido 2,4-dicloro-6-hidroxifenoxiacético, o qual sofre clivagem na ligação éter originando o 3,5-diclorocatecol. A segunda, chamada de via fenol, não ocorre a hidroxilação do 2,4-D a 2,4-diclorofenol, neste caso a degradação se dá diretamente com a formação de 3,5-diclorocatecol. A partir do 3,5-diclorocatecol, as duas vias produzem os mesmos substratos, (figura 4) (GUEDES, 2010).

Figura 4 – Vias de biodegradação do 2,4-D. Via 1: ácido hidroxifenoxiacético e Via 2: fenol.



Fonte: Adaptado de Guedes (2010).

## 2.4 O gênero *Burkholderia*

### 2.4.1 Caracterização do gênero

As espécies do gênero *Burkholderia* pertencem ao filo das Proteobactérias, classe das  $\beta$ -proteobactérias, ordem Burkholderiales e família Burkholderiaceae. (MOULIN *et al.*, 2001; CARAHER *et al.*, 2007). Este gênero é compreendido por bacilos Gram-negativos móveis, aeróbicos ou microaerófilos (BELOVA *et al.*, 2006) não formadores de esporos, geralmente catalase-positivo e oxidase-positivo e são quimiorganotróficos, sendo capazes de empregar uma diversidade de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia e possuem temperatura ótima de crescimento de 28 °C (BELOVA *et al.*, 2006).

Em virtude de sua vaga definição fenotípica as espécies de *Burkholderia* estiveram por muitos anos pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (COMPANT *et al.*, 2008). Posteriormente por meio de estudos baseados na homologia do gene 16S rRNA, composição celular, homologia DNA-DNA e características fenotípicas, foi constatado que o gênero *Pseudomonas* (MIGULA, 1894) apresentava organismos muito diferentes. Em seguida este gênero foi dividido em 5 grupos distintos (YABUUCHI *et al.*, 1995). Dentre esta divisão, apenas o grupo I foi aceito como pertencente ao gênero *Pseudomonas*, tendo a espécie *Pseudomonas aeruginosa* como espécie tipo (COMPANT *et al.*, 2008).

Yabuuchi e colaboradores (1992) propuseram o gênero *Burkholderia* para acomodar sete espécies de bactérias anteriormente pertencentes ao grupo II em homologia ao rRNA de *Pseudomonas*, sendo a espécie *Burkholderia cepacia* escolhida como espécie tipo do gênero: *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia solanacearum*, *Burkholderia caryophylli*, *Burkholderia gladioli*, e *Burkholderia pickettii*. Posteriormente Yabuuchi e colaboradores (1995) transferiram *Burkholderia solanacearum* e *Burkholderia pickettii* para o gênero *Ralstonia* (designando *Ralstonia pickettii* a espécie tipo do gênero).

O nome deste gênero é uma referência a Walter H. Burkholder da Cornell University, pesquisador que primeiro observou esta espécie tipo (descrita como *Pseudomonas cepacia*) como patógeno causador da podridão mole da cebola (*Allium*



*cepa* L.), conforme foi observado no Estado de Nova York nos Estados Unidos em 1940 (BURKHOLDER, 1950; HOLMES *et al.*, 1998; COMPANT *et al.*, 2008). Contudo em 1942 este pesquisador já havia descrito uma das primeiras *Burkholderia* sp; *Phytomonas caryophylli*, a qual foi posteriormente chamada de *Pseudomonas caryophylli* e agora *Burkholderia caryophylli* (COMPANT *et al.*, 2008).

Gillis e colaboradores (1995) transferiram *Pseudomonas cocovenenans* (VANDAMME *et al.*, 1960) para o gênero *Burkholderia* designando-a como *Burkholderia cocovenenans*, baseado no estudo do gene 16S rRNA desta bactéria. Contudo, Vandamme *et al* (1997) por meio de estudos de taxonomia polifásica verificaram muita similaridade entre *Burkholderia cocovenenans* e *Burkholderia gladioli*. Por sua vez, Coenye e colaboradores (1999) ao estudarem estas duas espécies verificaram que elas foram indistinguíveis pelas análises de taxonomia bioquímica. E como os testes de hibridização de DNA-DNA foram acima de 70%, os autores concluíram que ambas as espécies na verdade constituíam apenas uma única espécie, sendo *B. cocovenenans* sinônimo de *B. gladioli*.

Fato semelhante ocorreu com *Burkholderia vandii* descrita por Urakami e colaboradores (1994) para designar um isolado de *Vanda* sp. Apesar dos testes indicarem uma estreita proximidade com *Burkholderia glumae* e *Burkholderia plantarii*, a espécie *Burkholderia vandii* se mostrou distinta em alguns testes fenotípicos. Posteriormente, mais uma vez Coenye *et al* (1999) verificaram que estas espécies também foram indistinguíveis pelas análises de taxonomia bioquímica, além de apresentar testes de hibridizações de DNA-DNA superiores a 70%, indicando que ambas as espécies constituem uma única espécie, sendo *Burkholderia vandii* sinônimo de *Burkholderia plantarii*. De maneira semelhante à espécie *Burkholderia norimbergensis* (WITTKKE *et al.*, 1997) foi transferida para o gênero *Pandoraea* (COENYE *et al.*, 2000).

Os membros do gênero *Burkholderia* são detentores de uma extraordinária versatilidade metabólica, o qual torna possível sua ocorrência em ambientes distintos (MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 2008; SOUSA *et al.*, 2011). As espécies deste gênero podem ser encontradas no solo e rizosfera, água (incluindo água do mar), plantas, fungos, animais e até mesmo seres humanos (COENYE; VANDAMME, 2003).

Espécies de *Burkholderia* também podem ocorrer em ambientes inóspitos, como a espécie *Burkholderia acidipaludis*, *Burkholderia heleaia* e *Burkholderia bannensis* que foram isoladas de pântanos extremamente ácidos (pH 2-4) na China, Vietnã e Tailândia (AIZAWA *et al.*, 2010a; AIZAWA *et al.*, 2010b; AIZAWA *et al.*, 2011) e *Burkholderia oxyphila* (OTSUKA *et al.*, 2011) isolada de solo ácido e capaz de catabolizar catequina (polifenol).

Opelt e Berg (2004) ao estudarem isolados das seguintes espécies de briófitas na Alemanha, *Tortula ruralis*, *Aulacomnium palustre*, e *Sphagnum rubellum*, mostraram a ocorrência de populações de espécies de *Burkholderia*, que não apenas viviam em simbiose, mas também tinham propriedades antifúngicas. Sobre isso Belova e colaboradores (2006) mostraram a presença de *Burkholderia* (cerca de 30% dos isolados) em *Sphagnum*, uma briófitas de grande importância ecológica, que forma turfeiras. Vandamme e colaboradores (2007) ao pesquisarem as características moleculares e fisiológicas de isolados de *Burkholderia* associadas com as seguintes espécies de briófitas, *Aulacomnium palustre*, *Sphagnum rubellum* e *Sphagnum palustre* descreveram as espécies *Burkholderia megapolitana* e *Burkholderia bryophila* isoladas de *A. palustre* e *S. rubellum*, respectivamente.

Coenye e colaboradores (2001a) ao descreverem a ocorrência de *Burkholderia fungorum* em isolados de fungos, animais e de amostras clínicas de humanos, mostraram que a diversidade de locais onde estas bactérias podem ocorrer são ainda maiores, uma vez que uma única espécie pode se desenvolver em ambientes diferenciados. Estes autores também verificaram que *B. fungorum* pode se associar simbioticamente com o fungo *Phanerochaete chrysosporium*. Além de *Burkholderia fungorum*, Gee e colaboradores (2011) descrevem mais duas espécies capazes de se associarem simbioticamente com fungos, denominando-as como *Burkholderia endofungorum* e *Burkholderia rhizoxinica*, ambas isoladas de *Rhizopus microsporus*. Neste mesmo trabalho Coenye e colaboradores (2001a) também descreveram a espécie *Burkholderia caledonica* isolada de rizosfera.

Muitas espécies de *Burkholderia* apresentam potenciais aplicações biotecnológicas em virtude de sua capacidade de degradar poluentes ambientais, tais como óleos brutos de petróleo, herbicidas, compostos aromáticos e xenobióticos, são promotores de crescimento vegetal, fixadores biológicos de nitrogênio atmosférico,

produtores de hormônios vegetais, além de possuírem a capacidade de antagonizar e reprimir fitopatógenos (BEVIVINO *et al.*, 1994; PERIN, 2007; BARTHOLDSON *et al.*, 2008; SOUSA *et al.*, 2011).

Desde W. H Burkholder diversas espécies de *Burkholderia* foram descritas e outras removidas para outros gêneros, de maneira que existem atualmente cerca de 74 espécies conhecidas além de 11 *candidatus* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Quanto às bactérias candidatas ao gênero *Burkholderia*, por não serem capazes de crescer em meio de cultura, sendo, portanto, incultivadas nos meios atualmente disponíveis, não podem ser designadas como espécies novas.

Avanços na compreensão destas bactérias são obtidos atualmente por meio do sequenciamento de seus genomas, que se deu devido ao desenvolvimento da tecnologia de sequenciadores. Com base nestes sequenciamentos sabe-se que as espécies de *Burkholderia* possuem cerca de 2 a 3 cromossomos oscilando de 6 a 9 Mb, além de possuírem plasmídeos.

#### **2.4.1.1 Complexo *Burkholderia cepacia* (CBC)**

Estudos de taxonomia polifásica revelaram que *Burkholderia cepacia* não constituía uma única espécie, mais sim um complexo de espécies similares e relacionadas, as quais foram chamadas de genomovares (espécies fenotipicamente semelhantes, porém genotipicamente diferentes) conhecido como Complexo *Burkholderia cepacia* (CBC). Até o ano de 2004 o complexo *B. cepacea* compreendia 9 genomovares (MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 2008) que são a saber: *B. cepacia* genomovar I (VANDAMME *et al.*, 1997), *B. multivorans* genomovar II (VANDAMME *et al.*, 1997), *B. cenocepacia* genomovar III (VANDAMME *et al.*, 1997; 2003), *B. stabilis* genomovar IV (VANDAMME *et al.*, 1997; 2000), *B. vietnamiensis* genomovar V (GILLIS *et al.*, 1995; VANDAMME *et al.*, 1997), *B. dolosa* genomovar VI (COENYE *et al.*, 2001b), *B. ambifaria* genomovar VII (COENYE *et al.*, 2001c), *B. anthina* genomovar VIII (VANDAMME *et al.*, 2002b) e *B. pyrrocinia* genomovar IX (VANDAMME *et al.*, 2002b).

Contudo, recentemente novas espécies foram incluídas no Complexo *Burkholderia cepacia*: *Burkholderia latens*, *Burkholderia diffusa*, *Burkholderia arboris*,

*Burkholderia seminalis*, *Burkholderia metallica* e *Burkholderia ubonensis* (VANLAERE *et al.*, 2008), *Burkholderia contaminans* e *Burkholderia lata* (VANLAERE *et al.*, 2009).

Vale ressaltar que todas estas cepas foram isoladas de pacientes com fibrose cística e do meio ambiente, além de serem importantes patógenos de plantas, animais e humanos (MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 2008; SOUSA *et al.*, 2011). Sobre isso, a maioria dos isolados de pacientes com fibrose cística correspondem à *B. cenocepacia* e *B. multivorans*, enquanto que a maioria dos isolados ambientais pertencem às espécies de *B. ambifaria*, *B. cepacia* e *B. pyrrocinia* (SOUSA *et al.*, 2011).

#### **2.4.1.2 Patógenos de animais e vegetais**

A maioria das espécies de *Burkholderia* não são patogênicas, exceto as espécies *B. mallei* e *B. pseudomallei* como agentes etiológicos de mormo em animais e melioidosis em seres humanos (MIRALLES *et al.*, 2004; BARTHOLDSON *et al.*, 2008), bem como as espécies do complexo *B. cepacia* oriundas de pacientes acometidos de fibrose cística (PERIN *et al.*, 2006; MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 2008).

As espécies conhecidas como patogênicas de plantas são *B. caryophylli*, *B. plantarii*, *B. glumae*, *B. andropogonis* e *B. cepacia*. A espécie *B. caryophylli* é patógeno de cravo (*Dianthus caryophyllus*) além de também provocar a podridão mole da cebola. *B. plantarii* e *B. glumae* são causadores da morte de plântulas de arroz (*Oryza sativa*) e *B. andropogonis* é o agente causador de doenças no sorgo (*Andropogonis* sp) (COENYE; VANDAMME., 2003).

O primeiro relato a respeito da patogenicidade de *Burkholderia* é atribuído a Burkholder (1950) ao descrever a podridão mole da cebola (*Allium cepa* L.) ao ser infectada por *Burkholderia cepacia*. Com base nesta observação, Bartholdson e colaboradores (2008) ao investigarem o crescimento de membros do CBC em meio sólido contendo extrato de cebola como única fonte de nutriente, relataram que todas as cepas avaliadas foram capazes de crescer neste meio, além de produzirem um exopolissacarídeo (EPS) denominado cepaciano. Este EPS é caracterizado por unidades de heptassacarídeos altamente ramificados, constituído por D-glicose, D-manose, ácido

D-glicurônico, D-ramnose e D-galactose, além de possuir grupos substituintes de acetato (CESCUTTI *et al.*, 2000).

O cepaciano é considerado um dos fatores de virulência que pode estar associado com a persistência de CBC nas vias aéreas de pessoas acometidas de fibrose cística (FC) (RICHAU *et al.*, 2000). Segundo Bylund e colaboradores (2006) o efeito do EPS na persistência de membros de CBC nas vias respiratórias de pacientes com FC é atribuído à inibição da quimiotaxia de neutrófilos associado com a eliminação de espécies reativas de oxigênio. Sobre isso vale ressaltar o trabalho Richau e colaboradores (2000) ao verificarem que cerca de 70% dos isolados clínicos de pacientes com FC foram produtores de EPS.

#### **2.4.1.3 *Burkholderia* e fixação biológica de nitrogênio atmosférico**

Membros do gênero *Burkholderia* são capazes de realizarem a fixação biológica do nitrogênio tanto em associação simbiótica com leguminosas como em plantas não leguminosas (PERIN, 2007). Bevivino e colaboradores (1994) observaram que isolados ambientais do Complexo *Burkholderia cepacia* são também capazes de fixarem nitrogênio. Posteriormente Gillis e colaboradores (1995) por meio de taxonomia polifásica de isolados de rizosfera de cultura de arroz no Vietnã, descreveram *Burkholderia vietnamiensis* como espécie diazotrófica pertencente ao CBC, sendo esta considerado por muito tempo como a única espécie de *Burkholderia* fixadora de nitrogênio atmosférico (REIS *et al.*, 2004). Perin e colaboradores (2006b) afirmam que o gênero *Burkholderia* possui muitos membros diazotróficos, contudo essa capacidade é muitas vezes desconhecida uma vez que essa característica não é geralmente avaliada durante a descrição de uma nova espécie.

Após a descrição de *B. vietnamiensis*, muitas outras espécies diazotróficas foram descobertas a partir de isolados de plantas da família *Graminae*, tais como milho, arroz, trigo, sorgo e cana-de-açúcar (MAGNANI, 2009). *Burkholderia tropica* (REIS *et al.*, 2004) foi isolada de rizosfera, rizoplano (superfície bidimensional da raiz), raízes e caules de milho e cana-de-açúcar cultivadas em diferentes regiões do Brasil, México e África do Sul. Estas bactérias que colonizam os tecidos internos de plantas sem causar danos, tais como caules (*B. tropica*) são chamadas de diazotróficas endofíticas. Demais

espécies deste grupo são: *Burkholderia unamae* (CABALLERO-MELLADO *et al.*, 2004) isolada de rizosfera, rizoplano e raízes de café, milho e cana-de-açúcar e *Burkholderia silvatlantica* (PERIN *et al.*, 2006a) isolada de raízes de milho e cana-de-açúcar de diferentes regiões do Brasil e *Burkholderia kururiensis* (ZHANG *et al.*, 2000) isolada de aquífero poluído com tricloroetileno no Japão.

Além deste grupo acima mencionado, existem espécies de *Burkholderia* capazes de nodular e fixar nitrogênio em associação simbiótica com leguminosas. Até a descoberta destas espécies, acreditava-se que este tipo de simbiose era exclusivo apenas de membros da família *Rhizobiaceae*, em vista disso estes passaram a ser denominados alfa-rizóbios por pertencerem à classe das alfa-proteobactérias, cabendo às espécies diazotróficas simbióticas de *Burkholderia* a denominação de beta-rizóbios, por pertencerem à classe das beta-proteobactérias (YOUNG, 1996; MOULIN *et al.*, 2001).

Posterior aos trabalhos de Moulin e colaboradores (2001) os pesquisadores Vandamme e colaboradores (2002a) descreveram mais duas espécies diazotróficas isoladas de nódulos de raízes de leguminosas tropicais, as quais receberam as denominações de *Burkholderia tuberum* e *Burkholderia phymatum*.

A capacidade de *Burkholderia* de fixar nitrogênio em simbiose com leguminosas é muito ocorrente no gênero *Mimosa*. Em um estudo com isolados de nódulos de *Mimosa pigra*, *Mimosa. casta*, *Mimosa pudica* e *Abarema macradenia* os pesquisadores Barrete e Parker (2005) encontraram uma prevalência de espécies de *Burkholderia*. No ano seguinte foram descritas as seguintes espécies: *Burkholderia mimosarum* (CHEN *et al.*, 2006) isolada de nódulos de raízes de *Mimosa* spp do Taiwan e América do Sul, *Burkholderia nodosa* (CHEN *et al.*, 2007) isolada de nódulo de raízes de *Mimosa bimucronata* e *Mimosa scabrella* no Brasil e *Burkholderia sabiae* (CHEN *et al.*, 2008) isolada de nódulos de raízes de *Mimosa caesalpiniifolia* também no Brasil.

Até então não havia registros sobre a ocorrência de *Burkholderia* diazotróficas em plantas aquáticas, quando Aizawa e colaboradores (2010b) descreveram *Burkholderia heleia* isolada de *Eleocharis dulcis*, uma planta aquática que cresce em pântanos altamente ácidos (pH 2-4) no Vietnã.

### **2.4.1 Potencial biotecnológico do gênero *Burkholderia***

O gênero *Burkholderia* compreende um grupo extremamente versátil, no tocante ao metabolismo. Segundo O'SullivanL e Mahenthiralingam (2005) essa versatilidade se deve a dois fatores principais: em primeiro lugar possuem grandes genomas, cujo tamanho varia entre 6 a 9 Mb, de maneira que apresentam uma considerável capacidade de codificação e em segundo lugar, estes genomas possuem arranjos de inserções, que promovem a plasticidade genômica e adaptabilidade.

Em vista disso, muitas espécies apresentam potenciais aplicações biotecnológicas incluindo a biorremediação de xenobióticos recalcitrantes (DUA *et al.*, 2002), a nodulação de leguminosas (MENNA *et al.*, 2006), o controle biológico de doenças em plantas (HEBBAR *et al.*, 1998), a promoção de crescimento vegetal, em virtude da produção de fitormônios como auxinas, citicininas e giberelinas, além de antagonizarem fitopatógenos (BEVIVINO *et al* 1994; MAGNANI, 2009), a produção de plásticos biodegradáveis (BRAMER *et al.*, 2001) e mobilização de fósforo por meio da solubilização de fosfato inorgânico (MAGNANI, 2009).

Muitas espécies de *Burkholderia*, principalmente os membros do CBC, apresentam capacidade de degradar compostos xenobióticos recalcitrantes (O'SULLIVANL; MAHENTHIRALINGAM, 2005). O banco de dados BSD (Biodegradative Strain Database) reúne estirpes de *Burkholderia* capazes de biodegradar poluentes. Com base nessa base de informações foi elaborada o quadro abaixo mostra claramente o potencial biodegradador do gênero *Burkholderia*.

Quadro - Poluentes conhecidos por serem degradados por espécies de *Burkholderia*.

Bactérias	Poluentes
<i>Burkholderia cepacia</i> 8	Benzoato; 4-fluorobenzoato; 4-hidroxibenzoato
<i>Burkholderia cepacia</i> AC1100	2,3,4,6-tetraclorofenol; ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético; pentaclorofenol
<i>Burkholderia cepacia</i> G4	Benzeno; meta-cresol; orto-cresol; para-cresol; fenol; tolueno; tricloroetileno
<i>Burkholderia fungorum</i> LB400	Bifenol; bifenóis policlorados
<i>Burkholderia kururiensis</i> KP23	Tricloroetileno
<i>Burkholderia</i> sp.	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)
<i>Burkholderia</i> sp. CBS3	4-clorobenzoato; 2-nitrobenzoato 3-nitrobenzoato; 4-nitrobenzoato; 3-nitroclorobenzeno; 2-nitrofenol; 3-nitrofenol; 4-nitrofenol; 2,4,6-trinitrotolueno
<i>Burkholderia</i> sp. EML1549	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)
<i>Burkholderia</i> sp. JS150	Benzeno; benzoate; 1,2-diclorobenzeno; 1,4-diclorobenzeno; 2,5-diclorofenol; 2-clorofenol; 3-clorofenol; meta-cresol; orto-cresol; etilbenzeno; naftaleno; nitrobenzeno; 2-nitrotolueno; 3-nitrotolueno; 4-nitrotolueno; fenol; salicilato; tolueno; tricloroetileno
<i>Burkholderia</i> sp. RASC	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)
<i>Burkholderia</i> sp. TFD2	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)
<i>Burkholderia</i> sp. TFD39	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)
<i>Burkholderia</i> sp. TFD6	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)

Fonte: <http://bsd.cme.msu.edu/jsp/SearchController.jsp?token=burkholderia>. Acessado em 28 de julho de 2012.

Muitas espécies de *Burkholderia* biorremediadoras possuem a capacidade de empregar poluentes orgânicos como única fonte de carbono e energia, sobre isso recentemente Andreolli e colaboradores (2011) descreveram *Burkholderia fungorum* DBT1, capaz de sobreviver utilizando somente PHA (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos), tais como fenantreno, naftaleno, fluoreno, e DBT (dibenzotiofenol) como fonte de carbono.



Inseticidas também são poluentes altamente tóxicos em solo, áreas cultivadas e água. Sobre isso a bioprospecção por microrganismos capazes de removerem estes poluentes são atualmente alvos de pesquisas na área da biotecnologia de biorremediação. Em um estudo realizado por Kim e Ahn (2009) foi descrito pela primeira vez o isolado *Burkholderia* sp. KR100 capaz de hidrolisar CM (clorpirifós-metil) em TCP (3,5,6-tricloro-2-piridinol) e utilizar OP (inseticidas organofosforados) como única fonte de carbono para seu crescimento, sendo essa capacidade de degradar CM atribuído a genes presentes em um plasmídeo de 50kb denominado pKR1. O sequenciamento do gene 16S rRNA revelou a proximidade deste isolado com *Burkholderia cepacia* (99%), reforçando o potencial biotecnológico desta espécie.

Além de fixar nitrogênio, à espécie *Burkholderia vietnamiensis* mais especificamente a estirpe G4 é uma das mais conhecidas degradadoras de tricloroetileno (TCE), um dos poluentes mais comuns em aquíferos subterrâneos nos EUA (O'SULLIVANL; MAHENTHIRALINGAM, 2005). De acordo com Shields e colaboradores (1995) essa capacidade de degradar TCE é atribuída a enzima tolueno *o*-monoxigenase (Tom) presente no operon TOM do plasmídeo pTom. *Burkholderia kururiensis* KP23, outra espécie de *Burkholderia* fixadora de nitrogênio, também pode degradar tricloroetileno (TCE) (ZHANG *et al.*, 2000).

Goris e colaboradores (2004) ao estudarem o isolado *Burkholderia* sp. LB400 descreveram a espécie *Burkholderia xenovorans* capaz de realizar a degradação aeróbica de bifenis policlorados. Antes disso, Seeger e colaboradores (1995) afirmaram que a degradação de clorobifenis era atribuída a enzimas codificadas por genes presentes no *locus* bph de *Pseudomonas* sp. LB400.

Coeyne e colaboradores (2004) descreveram a espécie *Burkholderia phenoliruptrix* ao estudarem o isolado AC1100 obtido a partir de sucessivos plaqueamentos em meio contendo o herbicida ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) (um potente herbicida anteriormente empregado na composição do agente laranja) como única fonte de carbono e energia. O herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (também componente do agente laranja) pode ser degradado por espécies de *Burkholderia*. Em um estudo realizado por McGowan e colaboradores (1998) com 20 isolados capazes de degradar 2,4-D, 6 delas foram identificadas como *Burkholderia* sp: os isolados CSV90, EML1549, K712, TFD2, TFD6 e RASC.

Tendo em vista a grande capacidade de *Burkholderia* em degradar os compostos fenólicos mencionados, e considerando ainda sua ocorrência na rizosfera, sugeriu-se que a evolução de vias catabólicas destes compostos seja oriunda da exposição de exsudatos fenólicos provenientes de raízes, nestas bactérias ao longo de seu processo evolutivo, acarretando aproveitamento destas moléculas como fonte de carbono (O'SULLIVANL; MAHENTHIRALINGAM, 2005).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade do isolado *Burkholderia* sp. SMF042 de biodegradar o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Identificar o isolado *Burkholderia* sp. SMF042 por análise do gene 16S rRNA;
2. Caracterizar os perfis de crescimento do isolado SMF042 em meio mineral mínimo BH com adição de 2,4-D;
3. Verificar a capacidade de *Burkholderia* sp. SMF042 de crescer empregando 2,4-D como única fonte de carbono;
4. Verificar a expressão dos genes *tfdA* e *tfdB* envolvidos na biodegradação do 2,4-D;
5. Obter perfis de géis bidimensionais de *Burkholderia* sp. SMF042 crescidas em meio contendo 2,4-D como única fonte de carbono;
6. Identificar enzimas responsáveis pela biodegradação do 2,4-D e proteínas diferencialmente expressas de *Burkholderia* sp. SMF042 crescidas em meio contendo 2,4-D como única fonte de carbono.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Identificação do isolado SMF042

#### 4.1.2 Isolado empregado e condições de cultivo

Neste trabalho foi estudado o isolado denominado SMF042, oriundo da coleção de beta-rizóbios do gênero *Burkholderia* do Dr. Sérgio Miana de Faria (pesquisador da Embrapa Agrobiologia, Rio de Janeiro, Brasil) obtidos de leguminosas do gênero *Mimosa*.

O isolado foi recuperado de ampola contendo esta bactéria e crescido em meio TY (yeast-tryptone) líquido (BERINGER, 1974; DÖBEREINER *et al.*, 1999) na temperatura de 28 °C (TOLEDO; MARCONDES; LEMOS, 2009). Estoques foram feitos em meio TY e armazenadas a -80° C (em glicerol 20%).

Justifica-se o emprego de SMF042 por apresentar similaridade 100% com *Burkholderia phymatum* a qual tem o genoma completamente sequenciado, e por apresentar no cromossomo 2 os genes *tfdA* e *tfdB* o qual codificam enzimas oxigenases responsáveis pela biodegradação do herbicida 2,4-D.

#### 4.1.3 Extração e purificação de DNA genômico

A extração de DNA dos isolados foi realizada através de um protocolo baseado no trabalho de Menna e colaboradores (2006). As bactérias foram cultivadas em meio TY, com incubação a 28 °C por 48 horas. Da suspensão bacteriana, 2 mL foi recolhido em tubos e centrifugado a 6000 x g por 10 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado com solução salina (NaCl 0,85%). Descartado o sobrenadante, o precipitado foi ressuspensionado em 400 µL de TE 50/20 (50 mM Tris, pH 7,5; 10 mM NaCl e 10 mM EDTA, pH 8,0), sendo as amostras incubadas a 60 °C por 1 hora. Foram adicionados 60 µL de SDS (10%), seguido de incubação a 60 °C por 30 minutos. Foram acrescentados e misturados por inversão dos tubos, 1 volume de clorofórmio:álcool isoamil (24:1), seguido por uma centrifugação por 15 minutos a 2500 x g a 4 °C. A fase aquosa de cada amostra foi coletada para novos tubos com adição de 700 mM de NaCl e incubação a 40 °C por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 15

minutos a 4 °C e recolhido o sobrenadante. Foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto frio, e, em seguida, incubadas a -20 °C *overnight*. Após centrifugação a 15.000 x g por 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1mL de etanol 70%. A seguir o DNA foi ressuscitado em 50 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). E as amostras foram preservadas a -20 °C.

#### **4.1.4 Verificação da qualidade e concentração de DNA genômico**

A concentração das amostras foi estimada por espectrofotometria (GenQuant, GE Healthcare®), com leituras das absorvâncias a 260 nm de acordo com a fórmula: Concentração do DNA = leitura de  $A_{260\text{ nm}}$  x diluição da amostra x 50 ng/µL (SAMBROOK *et al.*, 1989). A pureza foi verificada com leituras da relação entre as absorvâncias 260nm e 280 nm e a qualidade foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídeo (0,25 mg/mL). A corrida eletroforética ocorreu em tampão TBE 1X (Tris 45 mM, Ácido Bórico 45 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0) a 90 V por 1 hora, em cuba Hoefer® HE (*mini horizontal submarine unit*) Amersham Biosciences®. O gel foi fotografado sob luz UV pelo sistema de fotodocumentação em gel L-Pix.

#### **4.1.5 Amplificação do gene 16S rRNA**

A amplificação do DNA ribossomal foi realizada por PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando os *primers* universais: fD1: 5'-CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3' e rD1: 5'- CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GC-3' (WEISBURG *et al.*, 1991). Para a reação de PCR utilizou-se uma mistura com volume final de 40 µL, constituída por 150 ng de DNA molde, 0,2 mM de cada dNTP; 0,5 µM de cada *primer*; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 U de *Taq* DNA polimerase, sendo a mistura de reação diluída com água destilada esterilizada para PCR (Milli-Q) em tampão apropriado para a enzima conforme concentração sugerida pelo fabricante.

A amplificação foi realizada em 46 ciclos usando o termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf®), sendo cada ciclo consistindo de: 94 °C de desnaturação por 3 minutos, anelamento a 60 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 2

minutos e extensão final a 72 °C a 8 minutos. A amplificação dos genes foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, sendo comparados com o marcador de massa molecular 100 pb *DNA Ladder*. A corrida eletroforética seguiu tais parâmetros: 100 v por 50 minutos. Em seguida o gel foi fotografado sob luz UV pelo sistema de fotodocumentação em gel L-Pix. A concentração dos produtos de PCR foi estimada por espectrofotometria, com leituras das absorvâncias a 260 nm (GenQuant, GE Healthcare®).

#### ***4.1.6 Sequenciamento do gene 16S rRNA***

A determinação da sequência de nucleotídeos dos fragmentos amplificados foi realizada empregando o kit DYEnamic® ET terminator kit (MegaBace® Amersham Biosciences). A incorporação dos terminadores de cadeia marcados (ddNTPs ligados à fluoróforos) foi realizado através de PCR empregando o termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf®).

A reação de sequenciamento ocorreu em placa de 96 poços em triplicata. Além dos *primers* fD1 e rD1, também utilizou os seguintes *primers* intragênicos: 362f (5'-CTC CTA CGG GAG GCA GCA GTG GGG-3'), 786f (5'-CGA AAG CGT GGG GAG CAA ACA GG-3') e 1203f (5'-GAG GTG GGG ATG ACG TCA AGT CCT C-3') e Y2 (5'- CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT - 3') (MENNA *et al*, 2006) todos eles na concentração final 5 pmol, 150 ng de DNA amplificado e 4 µL de pré-mix (kit DYEnamic® ET terminator kit) em um volume final de 10 µL. A PCR consistiu em 29 ciclos de: 95 °C de desnaturação por 20 segundos, anelamento a 50 °C por 15 segundos e extensão a 60 °C por 1,5 minutos.

Após a reação, os ácidos nucléicos marcados foram e precipitados e purificados empregando etanol. Para isso em cada poço foi adicionado 1 µL de acetato de amônio (7,5 M) seguido pela adição de 27,5 µL de etanol absoluto, a placa foi selada com adesivo resistente a álcool e misturada por inversão. As amostras foram centrifugadas a 2.500 x g por 1 hora. O sobrenadante foi removido por inversão a placa foi invertida e centrifugada a 300 x g por 1 minuto para a completa remoção do álcool. O precipitado foi lavado com etanol 70% (100 µL/poço). Em seguida, uma nova remoção de álcool por inversão foi feita.

Para a ressuspensão das amostras foi adicionado a cada poço 10 µL de *megabace loading solution* do kit DYEnamic® ET terminator kit (MegaBace® Amersham Biosciences). As amostras foram misturadas por vortex durante 20 segundos e centrifugada rapidamente.

A leitura das bases marcadas foi feita pelo analisador genético MegaBace 750 (GE Healthcare®) que utiliza tecnologia de eletroforese capilar. A corrida eletroforética de sequenciamento foi realizada de acordo com os seguintes parâmetros eletroforéticos: 3 kv por 60 segundos de injeção e 9 kv por 120 minutos de corrida.

#### **4.1.7 Análise das sequências de nucleotídeos**

Os eletroferogramas oriundos do programa MegaBACE Sequece Analysis 4.0® foram analisados e reunidos em sequências consenso chamadas de *contigs* empregando os programas *Phred/Phrap/Consed* (EWING *et al.*, 1998; GORDON *et al.*, 1998) em sistema operacional Linux.

O programa *Phred* realiza a chamada de bases (*base calling*) gerando um arquivo no formato FASTA e atribui qualidade a cada uma das bases, por meio da seguinte equação:  $q = -10 \times \log_{10}(p)$ , onde “p” significa a probabilidade de erro esperado para uma chamada de base. O programa *Phrap*, levando em consideração os valores de qualidade das bases, realiza a montagem das sequências consenso por meio da sobreposição das sequências individuais. As sequências consenso obtidas foram visualizada pelo programa *Consed* (TOLEDO, 2008).

Todas as sequências foram editadas para exclusão de bases com qualidade *Phred* inferior a 20 (1 erro a cada 100 bases lidas), para assegurar uma maior confiabilidade nos resultados posteriores.

#### **4.1.8 Identificação do isolado SMF042 com base no gene 16S rRNA**

As sequências consenso foram comparadas com outras sequências de gene 16S rRNA de espécie de *Burkholderia* previamente depositadas no *GenBank* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), através da ferramenta BLASTn (ALTSCHUL *et al.*, 1997) para busca de alinhamentos de

nucleotídeos significativos. A ferramenta BLASTn realiza alinhamentos entre as sequências submetidas (*query*) e as sequências depositadas no *GenBank*, apresentando no final do processo uma lista decrescente de similaridades, identificando os alvos.

## **4.2 Ensaio de biodegradação do 2,4-D (ácido 2,4 – diclorofenoxiacético)**

### ***4.2.1 Determinação da concentração preferencial de 2,4-D para o crescimento do isolado SMF042***

A partir de um estoque inicial (-80 °C), a estirpe SMF042 foi transferida para 20 mL de meio TY caldo (pré-inóculo) e mantida sob agitação (200 rpm) a 28 °C até densidade ótica (600 nm) de aproximadamente 0,8.

Em seguida foi transferido 3 mL deste pré-inóculo para 30 mL de meio TY caldo e mantido sob agitação (200 rpm) a 28 °C até densidade ótica ( $DO_{600\text{ nm}}$ ) de aproximadamente 0,8. Na sequência, as células foram coletadas por centrifugação a 5000 x *g* por 5 minutos e lavadas com solução salina (NaCl 0,85%) para eliminar resquícios de meio TY (ANDREOLLI *et al*, 2011).

A fim de testar o crescimento do isolado SMF042 em diferentes quantidades do herbicida 2,4-D como única fonte de carbono e energia, este experimento consistiu em inocular uma suspensão bacteriana que correspondesse a uma  $DO_{600\text{ nm}}$  final de 0,01 (125 µL) (ANDREOLLI *et al*, 2011) em tubos com 10 mL de meio mineral BH (Bushnell Hass), nas seguintes concentrações de 2,4-D: 100 mg/L; 200 mg/L; 300 mg/L; 400 mg/L; 500 mg/L; 600 mg/L; 700 mg/L; 800 mg/L; 900 mg/L e 1000 mg/L, todos em triplicata. As culturas foram mantidas sob agitação a 28 °C e o crescimento celular foi avaliado após 1 semana por espectrofotometria (GenQuant, Ge Healthcare) com  $DO_{600\text{ nm}}$ .

### ***4.2.2 Crescimento do isolado SMF042 em meio mineral BH na presença de 2,4-D***

Para a realização do experimento foi realizado a reativação das células conforme exposto no item 4.2.1.



Para verificar a capacidade do isolado SMF042 de crescer em meio mineral BH (Bushnell Hass), contendo apenas 2,4-D como única fonte de carbono, este experimento consistiu em um grupo controle suplementado com 600 mg/L de D-glicose, denominado controle positivo, um grupo suplementado com 600 mg/L de 2,4-D, denominado grupo tratado e um grupo contendo apenas meio BH o qual foi denominado controle negativo.

Para esta finalidade, foi inoculado uma suspensão bacteriana que correspondeu a uma  $DO_{600nm}$  final de 0,01 (2,5 mL) (ANDREOLLI *et al*, 2011) em 200 mL de meio mineral BH (Bushnell Hass), todos em triplicata.

As culturas foram mantidas sob agitação (200 rpm) a 28 °C e o crescimento celular foi monitorado a cada 12 horas por espectrofotometria a  $DO_{600 nm}$  (GenQuant, Ge Healthcare®) até o final da fase logaritmica.

#### ***4.2.3 Crescimento do isolado SMF042 pré-tratado com 2,4-D***

Para verificar a capacidade do isolado SMF042 modificar seu metabolismo frente a um crescimento anterior em meio mineral BH (Bushnell Hass), contendo apenas 2,4-D como única fonte de carbono, foi realizado um experimento que consistiu em um grupo pré-tratado com 2,4-D e um grupo controle o qual consistiu em células bacterianas sem contato anterior com o 2,4-D, ambos em triplicata.

Para a obtenção das células do grupo controle, a partir de um estoque inicial (-80 °C), a estirpe SMF042 foi transferida para 20 mL de meio TY (triptone-yeast) líquido e mantida sob agitação (200 rpm) a 28 °C até densidade ótica ( $DO_{600 nm}$ ) de aproximadamente 0,8. Por outro lado, para a obtenção das células pré-tratadas, a partir de um estoque inicial (-80 °C), a estirpe SMF042 foi transferida para 20 mL de meio mineral BH suplementado com 600 mg/L de 2,4-D e mantida sob agitação (200 rpm) a 28 °C até densidade ótica ( $DO_{600 nm}$ ) até o final da fase logaritmica afim de induzir os genes de degradação de 2,4-D.

Após a obtenção destas células, ambos os grupos de células foram coletadas por centrifugação a 5000 x g por 5 minutos e lavadas com solução salina (NaCl 0,85%) (ANDREOLLI *et al*, 2011). Em seguinte, em frascos com 200 mL de meio mineral BH

foi inoculada uma suspensão bacteriana que correspondesse a uma  $DO_{600\text{ nm}}$  inicial de 0,01. Ambos os grupos foram suplementado com 600 mg/L de 2,4-D. O crescimento celular foi monitorado a cada 12 horas por espectrofotometria a  $DO_{600\text{ nm}}$  (GenQuant, Ge Healthcare) até o estabelecimento da fase estacionária.

### **4.3 Análise da expressão dos genes *tfdA* e *tfdB* envolvidos na biodegradação do 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) do isolado SMF042 por qRT-PCR**

#### ***4.3.1 Crescimento do isolado SMF042 em meio mineral BH na presença de 2,4-D***

Para a realização deste experimento as células foram ativadas com exposto no item 4.2.2.

Este experimento consistiu em um grupo controle suplementado com 600 mg/L de D-glicose, denominado controle positivo, um grupo suplementado com 600 mg/L de 2,4-D, denominado grupo tratado.

Para esta finalidade foi inoculado uma suspensão bacteriana que correspondeu a uma  $DO_{600\text{ nm}}$  final de 0,01 (ANDREOLLI *et al*, 2011) em 200 mL de meio mineral BH (Bushnell Hass), tanto para o controle quanto para o tratado. Todos em triplicata.

As culturas foram mantidas sob agitação (200 rpm) a 28 °C e o crescimento celular foi monitorado a cada 12 horas por espectrofotometria a  $DO_{600\text{ nm}}$  (GenQuant, Ge Healthcare®). Após as culturas atingirem a metade da fase exponencial (180 horas de cultivo) alíquotas de 100 mL foram coletadas para extração de RNA total.

#### ***4.3.2 Extração de RNA total***

As células foram coletadas por centrifugação de 100 mL de cultura de bactéria a 10.000 x g por 20 min a 4 °C. Foi adicionado ao precipitado 1 mL TRIzol® Reagent (Invitrogen) e a mistura foi incubada por 5 min. Foi adicionado 200 µL de clorofórmio resfriado, sendo, em seguida, centrifugado a 12.000 x g por 15 min a 4 °C. Os ácidos nucléicos presentes na fase superior foram precipitados pela adição de

isopropanol. Visando maximizar a precipitação, a amostra foi incubada por 10 min a 4 °C. As amostras foram centrifugadas a 15.000 x g por 10 min sob temperatura de 4 °C. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% e centrifugado a 7500 x g por 5 min a 4 °C. O precipitado foi ressuspenso em 50 µL de água livre de RNase.

A qualidade das amostras de RNA total foi mensurada pela integridade dos fragmentos de RNA ribossômico através de eletroforese em gel de agarose 1,2% e pela relação das absorvâncias a 260 e 280 nm. Para obter RNA total livre de resíduos de DNA o mesmo foi tratado com DNase I (Invitrogen) de acordo com a recomendação do fabricante.

#### **4.3.3 Síntese de cDNA**

A síntese do cDNA ( DNA complementar) foi realizada utilizando a enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase*® (Invitrogen) segundo as recomendações do fabricante e empregando *Random primers* (Promega) como iniciadores. As concentrações das amostras foram estimadas por espectrofotometria, com leituras das absorvâncias a 260 nm (GenQuant®, GE Healthcare).

#### **4.3.4 qRT-PCR e Análise da Expressão Relativa**

##### **4.3.4.1 Desenhos dos primers para os genes *tfdA* e *tfdB***

Os *primers* específicos para a amplificação dos genes *tfdA* e *tfdB* foram desenhados empregando as sequencias dos genes *tfdA* e *tfdB* do cromossomo 2 de *Burkholderia phymatum* STM815 (GenBank: CP001044.1).

Para as análises da expressão dos genes selecionados *tfdA* e *tfdB* de cada amostra, foram monitorados os níveis de expressão do gene 16S rRNA (controle endógeno) empregando os *primers* Burk16S-F/R específicos para o gene 16S ribossomal de *Burkholderia*.

Tabela 3 - Sequência de *primers* para qRT-PCR usados nesse estudo:

Gene	Sequencia	GC%	Comprimento do primer (pb)	Comprimento do amplicon (pb)
<i>tfdA</i>	F - GTGCATCCGGAAACGGGCGA	65	20	119
	R - CGCGTGACGTGGTCGTGGAA	65	20	
<i>tfdB</i>	F- ATGGAGCAGCCCGAGACGGT	65	20	132
	R – CAGGATGCGATCCACCCGCC	70	20	
16S rRNA	F – TCCAGCAATGCCGCGTGTGT	60	20	101
	R – CGGTACCGTCATCCGCCACG	70	20	

Fonte: Pr. F: *Forward*; R: *Reverso*

#### 4.3.4.2 Reação de qRT - PCR

As análises quantitativas da expressão das famílias dos genes *tfdA* e *tfdB* foram realizadas através de PCR em Tempo Real (qRT-PCR). Para tanto, utilizou 300 ng do cDNA de cada amostra na reação de qRT-PCR. Além dos ácidos nucléicos, a reação foi composta de iniciadores específicos para os genes (300 nM cada) e 10 µl de 2X Power SYBR Green Master Mix® (Applied Biosystems), com volume final de 20 µl. Realizou-se a reação de amplificação através de 40 ciclos térmicos de 95 °C por cinco segundos, 55 °C por cinco segundos e 68 °C por 20 segundos. A desnaturação inicial foi de 95 °C por cinco minutos.

Todas as reações, tanto dos genes alvo quanto do controle endógeno, foram realizadas em triplicatas. A obtenção da expressão relativa foi realizada pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

#### **4.4 Análise de proteínas diferencialmente expressas do isolado SMF042 crescidas em meio BH suplementado com 2,4-D por eletroforese bidimensional (2D)**

##### ***4.4.1 Crescimento do isolado SMF042 em meio BH suplementado com 2,4-D***

Para a realização deste experimento as células foram ativadas com exposto no item 4.2.2.

Em seguida foi transferido 3 mL deste pré-inóculo para 100 mL de meio TY líquido e mantido sob agitação (200 rpm) a 28 °C até densidade ótica ( $DO_{600\text{ nm}}$ ) de aproximadamente 0,8. Na sequência as células foram coletadas centrifugação a 5000 x g por 5 minutos e lavadas com solução salina (NaCl 0,85%) (ANDREOLLI et al, 2011).

Este experimento consistiu em um grupo controle suplementado com 600 mg/L de D-glicose, denominado controle positivo, um grupo suplementado com 600 mg/L de 2,4-D, denominado grupo tratado.

Para esta finalidade foi inoculado uma suspensão bacteriana que correspondeu a uma  $DO_{600\text{ nm}}$  final de 0,01 (ANDREOLLI *et al*, 2011) em 1 L de meio mineral BH (Bushnell Hass), tanto para o controle quanto para o tratado.

As culturas foram mantidas sob agitação (200 rpm) a 28 °C e o crescimento celular foi monitorado a cada 12 horas por espectrofotometria a  $DO_{600\text{ nm}}$  (GenQuant®, Ge Healthcare). Após as culturas atingirem a metade da fase exponencial (180 horas de cultivo) as células foram recolhidas por centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos a 4 °C.

##### ***4.4.2 Extração de proteínas intracelulares***

A extração das proteínas intracelulares foi feita de acordo com Riedel e colaboradores (2006) com algumas modificações. Para a extração das proteínas intracelulares as células foram lavadas 2 vezes com 10 mL de Tris/HCl 50 mM pH 7,5. Após as lavagens foi adicionado 10 mL de Tris/HCl 50 mM pH 7,5 acrescido de 40 µL do Inibidor de Protease Mix® (GE Healthcare®). As células foram lisadas por sonicação (10 pulsos de 20 segundos com intervalo de 1 minuto entre cada pulso – com 20% de amplitude). Após sonicadas as células foram centrifugadas a 12.000 x g por 1 hora e 30

minutos a 4 °C. Ao sobrenadante foi adicionado 1 mL de fenol e a mistura foi incubada a 70 °C por 10 minutos. As amostras foram resfriadas em gelo por 5 minutos e as fases foram separadas por centrifugação a 4000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado 2 vezes com acetona resfriada 100%. Após as lavagens o precipitado repousou em temperatura ambiente para evaporação da acetona e foi ressuspensão em uréia 7 M/tiouréia 2 M.

As proteínas totais foram quantificadas pelo o método de Bradford (1976) e a integridade protéica foi analisada por SDS-PAGE.

#### ***4.4.3 Eletroforese bidimensional***

O mapeamento de proteínas do isolado SMF042 foi realizado por meio de eletroforese bidimensional. Cada grupo foi realizado em triplicata, para aferição estatística.

##### ***4.4.3.1 Primeira dimensão***

Foram adicionados 250 µg de proteína de cada amostra ao tampão de reidratação [uréia 7 M/ tiouréia 2 M, 1 % CHAPS, 1% DTT; 0,5% (v/v) anfólitos (pH de 4-7) e azul de bromofenol] em um volume final de 250 µL por amostra. As tiras com gradiente de pH imobilizado (IPG) de 13 cm de comprimento e pH de 4-7 foram reidratadas com solução contendo proteínas em temperatura ambiente por 16 horas.

Posteriormente, foi realizada a Focalização Isoelétrica - IEF usando o sistema de focalização *EttanIPGphor III* (GE-Healthcare) nas seguintes condições: etapa 1 (500 V por 30 minutos); etapa 2 (4000 V por 2:30 horas) e etapa 3 (8000 V até atingir 18.000 V horas totais). E em seguida as tiras foram armazenadas em freezer a - 80°C para procedimentos posteriores.

##### ***4.4.3.2 Segunda dimensão***

A tira de IPG foi equilibrada com a solução I (Uréia 6 M, Tris 50 mM, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol, e DDT) por 15 min e em seguida, com a solução de equilíbrio II (Uréia 6 M, Tris 50 mM, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de

bromofenol e iodoacetamida) por 15 min. Subseqüentemente a tira foi colocada em um gel de poliacrilamida a 12,5%, a separação na segunda dimensão foi realizada na unidade de eletroforese vertical *Hoefler SE 600 Ruby* por aproximadamente 5 horas e 30 minutos. Após a corrida, o gel foi submerso na solução corante Coomassie G 250 (*Blue Silver*) por 24 horas sob agitação e armazenados em solução de ácido acético 5%. Para digitalização dos géis utilizou-se o equipamento *ImageScanner III*® gerenciados pelo programa *LabScan 6.0*® (ambos da *GEHealthcare*). As imagens obtidas foram analisadas no programa *ImageMaster 2D Platinum 6.0* (*GE-Healthcare*).

#### **4.4.3.3 Identificação das Proteínas**

As proteínas foram identificadas com base na comparação de pI e massa molecular (MW) no banco de dados *UniProt* utilizando a ferramenta *TagIdent* do *ExPASy* (<http://www.expasy.org/>).

#### **4.4.3.4 Análise Estatística**

Os géis foram digitalizados pelo software *ImageMaster 2D Platinum 6.0* (*GE Healthcare*) para detecção dos *Spots*. A reprodutibilidade dos géis foi realizada pelo gráfico de dispersão (*Scatter Plot*), no qual admitisse que o valor de coeficiente linear deve ser acima de 0,85.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação do isolado SMF042

#### 5.1.1 Extração de DNA genômico

A metodologia empregada para extração de DNA foi satisfatória, proporcionando uma amostra cuja concentração foi de 1790 ng/ $\mu$ L, conforme mostra a tabela 4. No tocante a pureza da amostra verificada pela relação entre as absorbâncias 260 nm e 280 nm, foi obtido o valor 1,800 o qual segundo Sambrook et al (1989) é considerado de boa qualidade, ao considerarem que relação entre as absorbâncias a 260 nm e 280 nm deve ser maior que 1,75 para assegurar sua pureza.

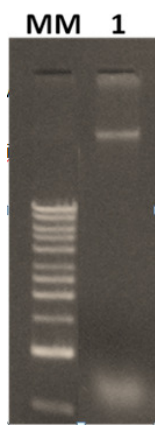
A presença de banda íntegra no gel de agarose 0,8% evidenciou que a amostra possui boa qualidade e livre de possíveis degradações e contaminações por biomoléculas, que podem dificultar a corrida eletroforética, como mostra a figura 5.

Tabela 4 - Descrição da amostra de DNA genômico extraída do isolado SMF042.

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (ng/ $\mu$ L)	A <sub>260</sub>	A <sub>260/280</sub>
SMF042	1790	0,716	1,800

Fonte: Próprio autor.

Figura 5 – Foto de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta.



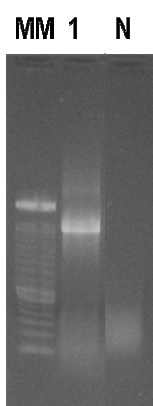
Fonte: Próprio autor. : MM (Kilobase DNA Marke, 0,5 – 10,0 Kb), 1 (SMF042).



### 5.1.2 Amplificação do gene 16S rRNA

No presente trabalho a reação de amplificação do gene 16S rRNA do isolado SMF042 por PCR apresentou-se de boa qualidade, resultado em fragmentos de DNA com cerca de 1.500 pb de comprimento quando comparadas com o marcador molecular *Ladder* 100 pb, conforme mostra a figura 6.

Figura 6 – Foto de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.



Fonte: Próprio autor. Os números representam as amostras de fragmentos de DNA amplificado correspondente ao gene 16S rRNA do isolado: MM (marcador molecular *Ladder* 100pb), 1 (SMF042), e N (controle negativo da reação).

### 5.1.3 Sequenciamento do gene 16S rRNA, análise das sequências de nucleotídeos e identificação do isolado SMF042

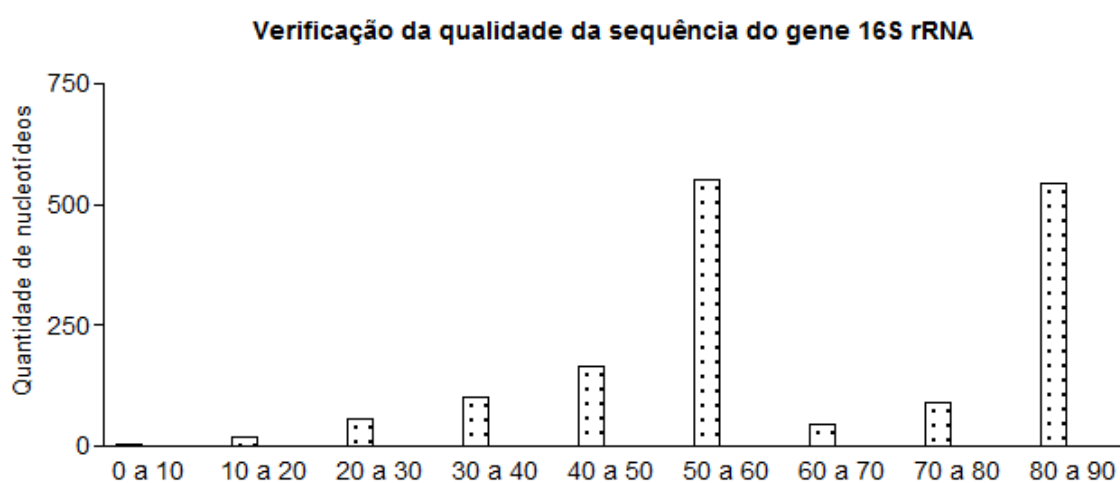
Neste trabalho foi sequenciado o gene 16S rRNA do isolado SMF042, sendo no final do processo obtido uma sequência de 1551 nucleotídeos. Uma vez que este gene possui aproximadamente cerca de 1500 nucleotídeos (ANDREOLLI *et al*, 2011) podemos afirmar que foi obtido a sequência integral do gene 16S rRNA deste isolado.

De acordo com a figura 7 a sequência do gene 16S rRNA obtida neste trabalho apresenta uma qualidade satisfatório uma vez que a maioria dos nucleotídeos encontram-se em intervalos superiores a 20. Além disso, foi verificada a ocorrência de 551 nucleotídeos no intervalo entre 50 e 60 (1 erro a cada  $10^5$  e  $10^6$  bases lidas,

respectivamente) e 545 nucleotídeos no intervalo entre 80 e 90 (1 erro a cada  $10^8$  e  $10^9$  bases lidas, respectivamente), o que atribui grande confiabilidade aos resultados (EWING *et al.*, 1998).

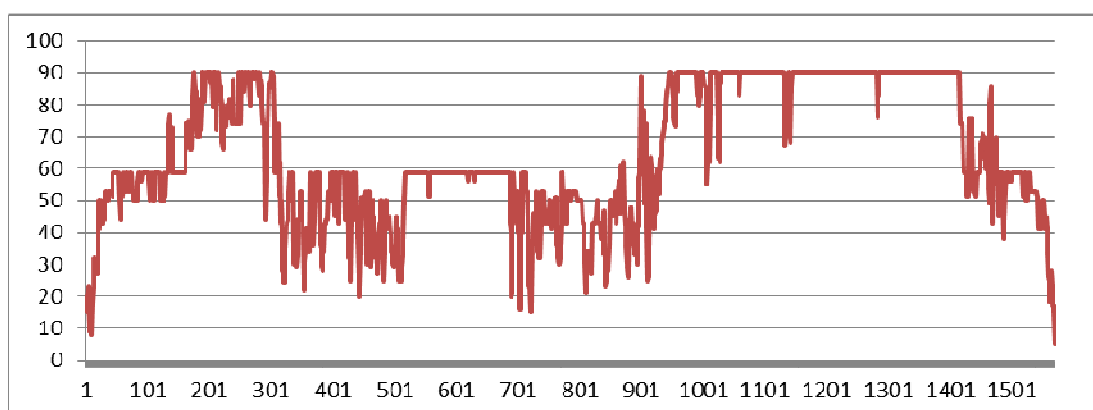
A figura 8 mostra as variações de qualidade do sequenciamento conforme as regiões da sequência. De acordo com este resultado, a qualidade foi menor nas extremidades, oscilou no meio do segmento e foi maior próximo a extremidade final.

Figura 7 – Verificação da qualidade da sequência do gene 16S rRNA conforme a quantidade dos nucleotídeos.



Fonte: Próprio autor. As colunas representam a quantidade de nucleotídeos em cada intervalo de qualidade *Phred* e o eixo vertical representa a quantidade de nucleotídeos. A construção do gráfico foi com o programa GrphPad Prissm 3.0.

Figura 8 – Verificação da qualidade da sequência do gene 16S rRNA conforme o segmento.



Fonte: Próprio autor. O eixo vertical representa a qualidade *Phred*, o eixo horizontal representa o tamanho do gene e o segmento em vermelho representa a interseção entre os valores.

A comparação desta sequência com as sequências do Genbank, mostrou similaridade que variou entre 99% e 100% com estirpes da espécie *Burkholderia phymatum* (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultado do alinhamento mais significativo das sequências dos isolados (*query*) com sequências disponíveis no GenBank do NCBI

Acesso	Descrição <sup>1</sup>	Max score <sup>2</sup>	Total score <sup>3</sup>	Query coverage <sup>4</sup>	E.value <sup>5</sup>	Max ident <sup>6</sup>
CP001043.1	<i>Burkholderia phymatum</i> STM815	2813	1.124e+04	98%	0.0	100%
CP001044.1	<i>Burkholderia phymatum</i> STM815	2808	5610	98%	0.0	99%
HM019521.1	<i>Burkholderia phymatum</i> GR05	2796	2796	98%	0.0	99%
HM019519.1	<i>Burkholderia phymatum</i> GR03	2796	2796	98%	0.0	99%
FJ560957.2	<i>Burkholderia phymatum</i> GR01	2796	2796	98%	0.0	99%
HM019522.1	<i>Burkholderia phymatum</i> GR06	2785	2785	98%	0.0	99%
JN228096.1	<i>Burkholderia phymatum</i> JNVU IL24	2743	2743	96%	0.0	99%

Fonte: NCBI.

<sup>1</sup>Identidade do organismo de maior pontuação.

<sup>2</sup>Pontuação atribuída a melhor sequência alinhada.

<sup>3</sup>Soma dos escores de todas as pontuações atribuídas às sequências alinhadas.

<sup>4</sup>Porcentagem de cobertura da sequência submetida (*query*) empregado no alinhamento.

<sup>5</sup>Número de partidas com a mesma pontuação esperada por acaso. Para valores baixos, refere-se à probabilidade de um alinhamento ao acaso. Tipicamente valores de  $E < 0,05$  é necessário para ser considerado significativo.

<sup>6</sup>Porcentagem de similaridade entre as sequências alinhadas.

A estirpe *Burkholderia phymatum* STM815 a qual SMF042 obteve o máximo de similaridade, foi inicialmente isolada de nódulos de *Machaerium lunatum* (Papilionoideae) na Guiana Francesa (MOULIN *et al.*, 2001), é conhecida por sua grande capacidade simbiótica relativa a fixação de nitrogênio com *Mimosa* sp (ELLIOTT *et al.*, 2007).

O termo *phymatum* vem do latim significando formadora de nódulos. São bacilos Gram-negativas, não formadoras de esporos e capazes de crescer a 28 °C. A espécie *Burkholderia phymatum* tem como estirpe tipo o isolado STM815 (VANDAMME *et al.*, 2002).

## **5.2 Ensaios de biodegradação do 2,4-D (ácido 2,4 – diclorofenoxiacético)**

### ***5.2.1 Determinação da concentração preferencial de 2,4-D para o crescimento do isolado SMF042***

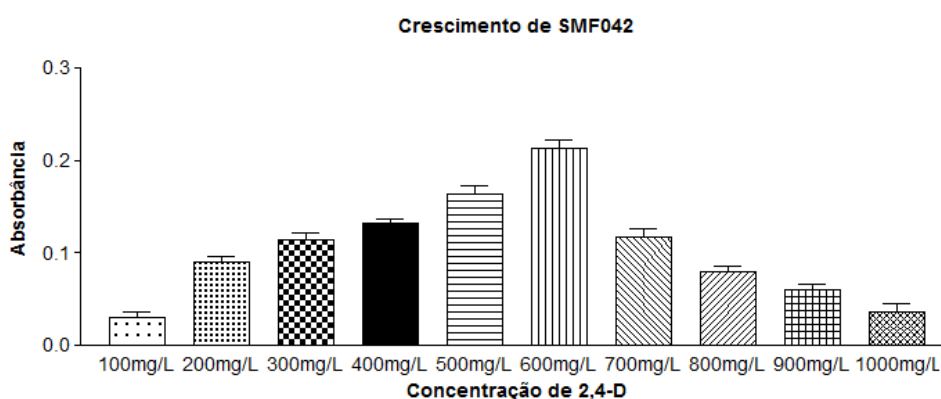
O estudo do crescimento do isolado SMF042 em meio mineral BH (Bushnell Hass) com diferentes concentrações do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) como única fonte de carbono foi realizado visando identificar a concentração do herbicida no qual o isolado em questão fosse capaz de apresentar um maior crescimento.

Os resultados sugerem com base na figura 7, que a concentração no qual foi observado maior crescimento foi a de 600 mg/L de 2,4-D. Os crescimentos anteriores a 600 mg/L foram dose dependente, o que mostra o emprego desse herbicida como fonte de carbono pelas bactérias. Contudo, a partir de 600 mg/L se observa um declínio contínuo do crescimento bacteriano o que pode ser atribuído a toxicidade do herbicida.

Em um trabalho semelhante, Cho e colaboradores (2002) ao estudarem a resposta ao estresse em *Burkholderia cepacia* YK-2 à exposição ao 2,4-D, empregaram 497 mg/L do herbicida. Neste sentido o isolado SMF042 apresenta um nível de tolerância maior a presença de 2,4-D do que *Burkholderia cepacia* YK-2. Entretanto, este trabalho está de acordo com estes autores ao descreverem a concentração letal de 2,4-D com o valor de 1547 mg/L.

Este resultado corrobora com o trabalho de Singh e Bhati (1994) ao relatarem que a toxicidade do 2,4-D apresenta uma correlação direta com a concentração do herbicida e tempo de exposição.

Figura 9 – Crescimento do isolado SMF042 em meio mineral BH (Bushnell Hass) com diferentes concentrações do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) como única fonte de carbono.



Fonte: Próprio autor. O crescimento foi verificado por espectrofotometria com densidade ótica (DO) de 600 nm após 1 semana a partir da inoculação. As barras verticais indicam o desvio padrão entre as triplicatas da medição. A construção do gráfico foi com o programa GrphPad Prissm 3.0.

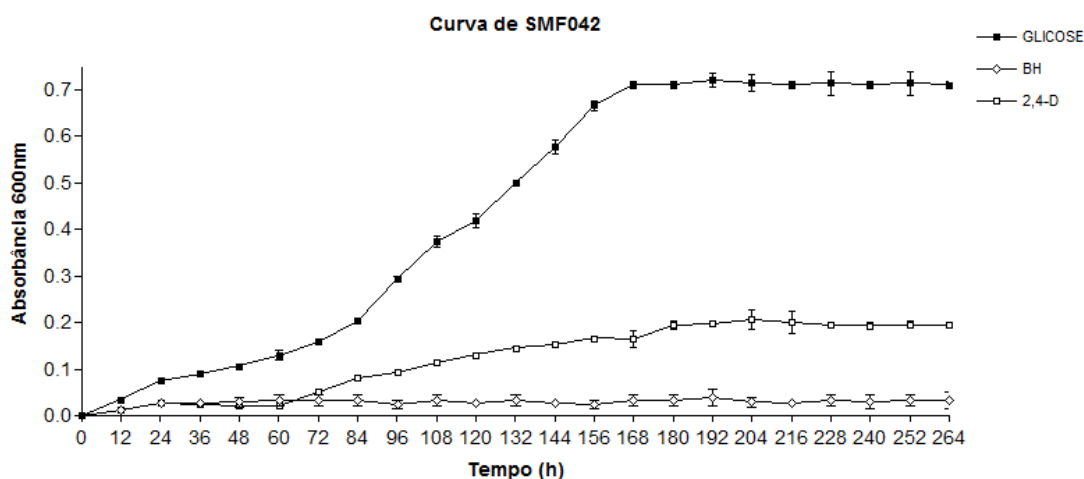
### 5.2.2 Crescimento do isolado SMF042 em meio BH na presença de 2,4-D

O crescimento do isolado SMF042 em meio mineral BH (Bushnell Hass) foi realizado para caracterizar o perfil de crescimento das bactérias e consequente emprego do 2,4-D como única fonte de carbono.

Conforme mostra a figura 8, o isolado SMF042 foi capaz de crescer empregando o 2,4-D após 72 horas de incubação, estabilizando na  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0,200 após 204 horas de incubação. Nenhum crescimento foi observado no grupo no qual as bactérias foram inoculadas em meio contendo apenas BH (controle negativo). Além disso, vale ressaltar que um grande crescimento foi observado no grupo no qual o meio BH foi suplementado com glicose como única fonte de carbono, o que mostra que o meio BH não inibiu o crescimento deste isolado (controle positivo). Estes resultados mostram que SMF042 foi capaz de empregar o 2,4-D como única fonte de carbono o que sugere um potencial poder de biodegradação deste poluente por estas bactérias.

Em um trabalho semelhante a este, Andreolli e colaboradores (2011) mostraram que *Burkholderia fungorum* DBT1 foi capaz de biodegradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos como fenantreno com fase estacionária em  $DO_{0,13}$ , naftaleno com fase estacionária em  $DO_{0,10}$ , fluoreno  $DO_{0,20}$  e DBT (dibenzotiofeno) em  $OD_{0,06}$ . Todos estes compostos foram empregados numa concentração final de 100 mg/L em meio mineral DM (meio mínimo) como única fonte de carbono.

Figura 10 – Curva de crescimento do isolado SMF042 em meio mineral BH (Bushnell Hass).



Fonte: Próprio autor. A curva com quadrado com preenchimento negro (■) corresponde ao grupo controle positivo que foi suplementado com 600 mg/L de glicose como única fonte de carbono, o quadrado branco (□) corresponde ao grupo tratado no qual o meio foi suplementado com 600 mg/L do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o quadrado branco inclinado (◊) corresponde ao grupo controle negativo no qual as bactérias foram inoculadas apenas em meio BH. O crescimento foi monitorado por espectrofotometria com densidade óptica (DO) de 600nm a cada 12 horas a partir da inoculação. As barras verticais indicam o desvio padrão entre as triplicatas da medição. A construção do gráfico foi com o programa GrphPad® Prissm 3.0.

### 5.2.3 Crescimento do isolado SMF042 pré-tratado ao 2,4-D

Para verificar a capacidade do isolado SMF042 de modificar seu metabolismo frente a uma prévia exposição ao 2,4-D, foi realizado um experimento no qual foi empregado células pré-tratadas com 2,4-D e outras não tratadas.

A figura 9 mostra que houve diferenças no perfil de crescimento. As células do grupo pré-tratado apresentam um período de latência menor comparado com o grupo

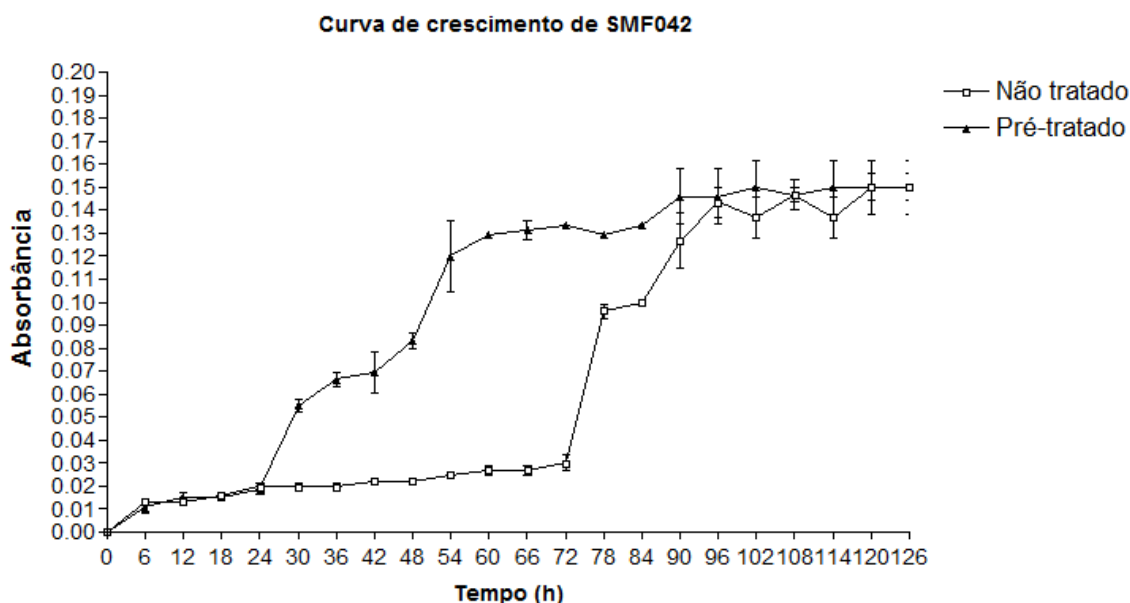
não pré-tratado, de maneira que foram capazes de empregar o 2,4-D com mais eficiência.

Este experimento obteve resultados semelhantes ao realizado recentemente por Andreolli e colaboradores (2011). Estes pesquisadores expuseram previamente o isolado *Burkholderia fungorum* DBT1 a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos de maneira que conseguiram ativar os genes de degradação destes compostos. Este trabalho também corrobora com os achados de Shaw e Burns (1998) os quais relatam que a degradação do 2,4-D é mais rápida nos solos que foram previamente expostos ao herbicida.

Estes resultados sugerem que a exposição prévia ao herbicida foi capaz de gerar modificações metabólicas nas bactérias tais como ativação dos genes de tolerância e degradação do 2,4-D. Sobre isso, este trabalho corrobora com Ko e colaboradores (1999) ao reletarem que células pré-expostas a concentrações baixas de compostos tóxicos podem ter melhor sobrevivência quando expostas a concentrações letais. Isto indica que a utilização de bactéria na biodegradação *in situ* deve preceder a exposição prévia do herbicida sobre o crescimento das bactérias *in vitro*.



Figura 11 – Curva de crescimento do isolado SMF042 em meio mineral BH (Bushnell Hass) suplementado com 600 mg/L do ácido 2,4-diclorofenoxiacético.



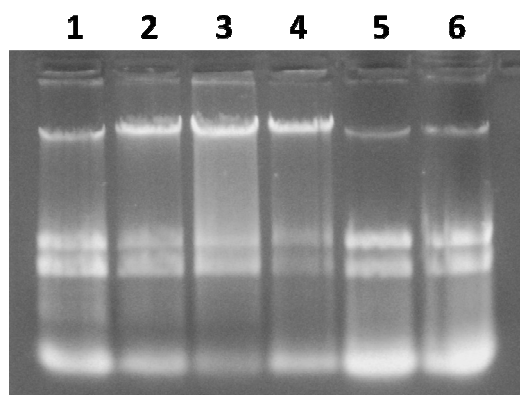
Fonte: Próprio autor. A curva com triângulo com preenchimento negro (▲) corresponde ao grupo pré-tratado com 600 mg/L do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) como única fonte de carbono, enquanto o quadrado branco (□) corresponde ao grupo que não recebeu exposição prévia ao 2,4-D. O crescimento foi monitorado por espectrofotometria com densidade ótica (DO) de 600 nm a cada 6 horas a partir da inoculação. As barras verticais indicam o desvio padrão entre as triplicatas da medição. A construção do gráfico foi com o programa GrphPad® Prissm 3.0.

### 5.3 Análise da expressão dos genes *tfdA* e *tfdB* envolvidos na biodegradação do 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) do isolado SMF042 por qRT-PCR

#### 5.3.1 Extração de RNA Total e síntese de cDNA

A figura 12 mostra o resultado da extração de RNA Total de SMF042. Segundo a imagem a extração foi bem sucedida uma vez que apresentam as bandas ribossomais 23S e 16S integras. A concentração das amostras variaram entre 812 a 3100 ng/μL. A figura 11 mostra o resultado da síntese de cDNA a partir das amostras de RNA Total obtidas de SMF042. A concentração das amostras variaram entre 2270 a 3100 ng/μL.

Figura 12 – Foto de eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta (UV).



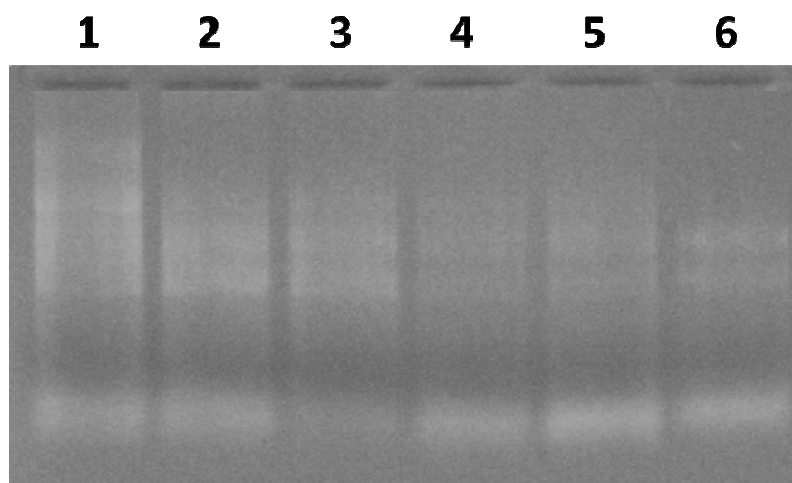
Fonte: Próprio autor. Os números representam as amostras de RNA Total de cada um dos isolados: 1, 2 e 3 (amostras de RNA Total do grupo tratado com 2.4-D), 3, 4 e 5 (amostras de RNA Total do grupo controle positivo).

Tabela 6 - Descrição das amostras de RNA Total extraídas dos isolados.

AMOSTRA	A <sub>260</sub>	A <sub>260/260</sub>	CONCENTRAÇÃO (ng/μL)
1	0,565	1,552	1130
2	0,408	1,329	816
3	0,406	1,678	812
4	0,600	1,724	1200
5	0,956	1,593	1912
6	1,557	1,639	3100

Fonte: Próprio autor.

Figura 13 – Foto de eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta.



Fonte: Próprio autor. Os números representam as amostras de cDNA de cada um dos isolados: 1, 2 e 3 (amostras de cDNA do grupo tratado com 2,4-D), 3,4 e 5 (amostras de cDNA do grupo controle positivo).

Tabela 7 - Descrição das amostras de cDNA dos isolados.

AMOSTRA	A <sub>260</sub>	A <sub>260/260</sub>	CONCENTRAÇÃO (ng/μL)
1	0,908	1,552	2270
2	1,087	1,576	2668
3	0,949	1,551	2373
4	1,075	1,547	2688
5	0,985	1,511	2463
6	0,914	1,504	2285

Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

### 5.3.2 qRT-PCR e análise da expressão relativa

Neste trabalho foi verificada a capacidade de SMF042 de expressar genes relacionados à biodegradação do 2,4-D. Para este propósito foi avaliado os níveis de expressão dos genes *tfdA* e *tfdB* da via TFD.

De acordo com os dados obtidos, o isolado SMF042 aumentou significativamente a expressão do gene *tfdA* em cerca de 23 vezes em relação ao grupo controle positivo. O aumento da concentração deste gene mostra o grau de

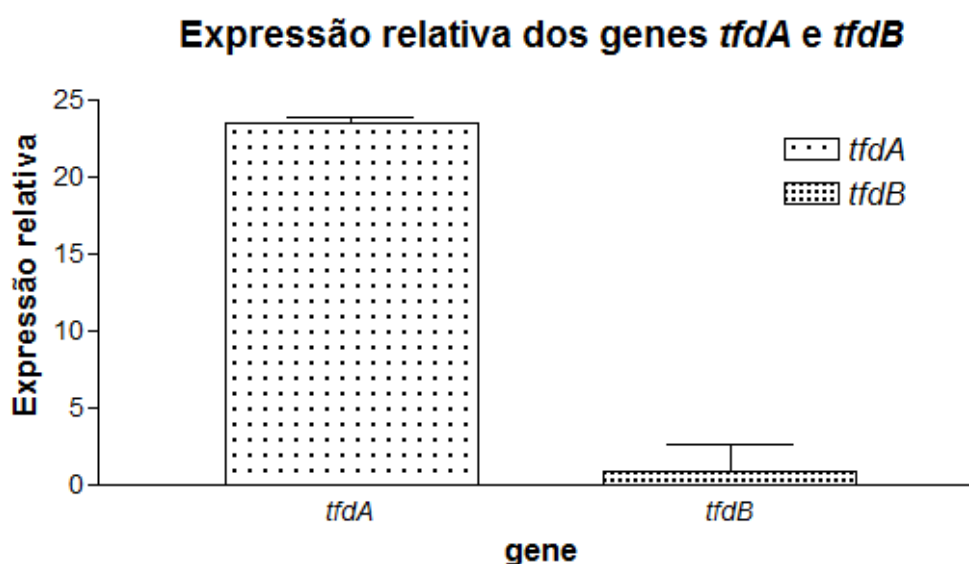
responsividade do isolado SMF042 mediante a presença do 2,4-D, o qual foi capaz de induzir a expressão gênica de *tfdA*.

O gene *tfdA* é o primeiro da via TFD a atuar na biodegradação do 2,4-D. o mesmo codifica a enzima 2,4-D alfa KG-dependente dioxigenase, a qual realiza a hidroxilação do 2,4-D tendo como resultado a remoção da cadeia lateral de ácido acético produzindo 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) (FUKUMORI; HAUSINGER, 1993).

O gene *tfdB* é o segundo da via TFD, o mesmo codifica a enzima 2,4-diclorofenol hidroxilase que realiza a conversão do 2,4-diclorofenol em 3,5-diclorocatecol. De acordo com as condições experimentais deste trabalho não houve aumento quantitativo deste gene em 180 horas de cultivo.

O termo TFD significa ácido 2,4-diclorofenoxiacético (HARKER *et al.*, 1989). A presença de genes TFD em espécies de *Burkholderia* já foram descritas. Rice e colaboradores (2005) encontraram os genes *tfdA*, *tfdB*, *tfdC* e *tfdE* em espécies de bactérias do gênero *Burkholderia* empregando oligonucleotídeos específicos para a amplificação dos mesmos.

Figura 14– Expressão relativa dos genes *tfdA* e *tfdB* da via TFD de biodegradação do 2,4-D.



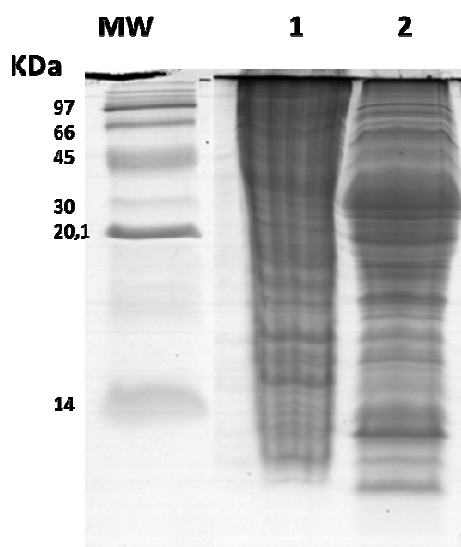
Fonte: Próprio autor.

## 5.4 Análise de proteínas diferencialmente expressas do isolado SMF042 crescidas em meio BH suplementado com 2,4-D por eletroforese bidimensional (2D)

### 5.4.1 Extração e quantificação de proteínas

O método de extração de proteínas utilizado a metodologia proposta por Riedel e colaboradores (2006) foi eficiente tanto em termos qualitativos quanto quantitativos. O valor médio da concentração de proteínas totais obtidas do isolado SMF042 crescido em meio BH suplementado com glicose (controle) foi de 9,06  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e 8,01  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para as proteínas totais obtidas do isolado SMF042 crescido em meio BH suplementado com 2,4-D (tratado) (Figura 13).

Figura 15 – SDS-PAGE de proteínas totais do isolado SMF042 em gel de poliacrilamida 12,5 %. (MW) marcador de baixo peso molecular LMW (*GE Healthcare*)



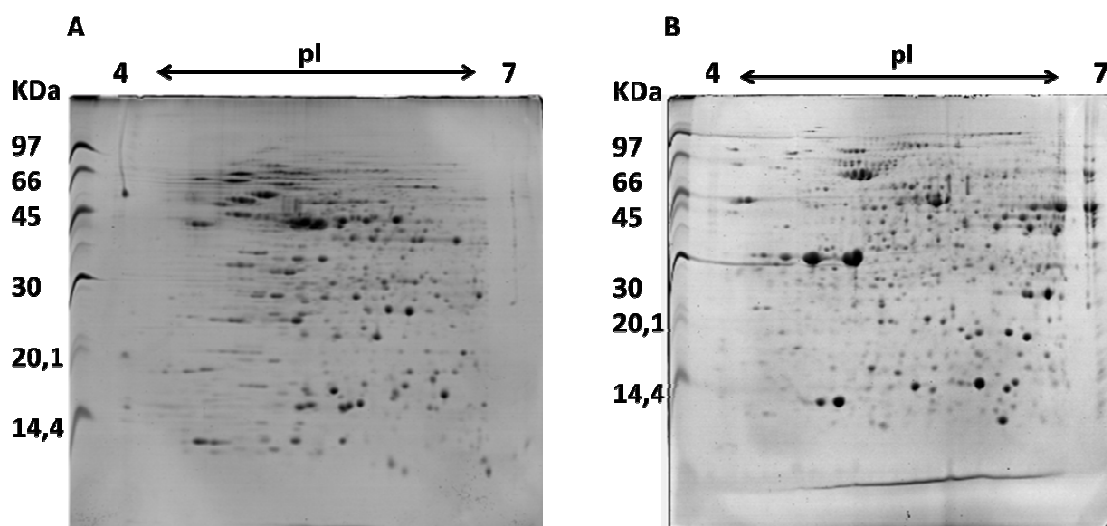
Fonte: Próprio autor. As amostras protéicas de SMF042, controle positivo (linha 1) e tratado (linha 2).

#### 5.4.2 Análise do perfil proteico do isolado SMF042 por eletroforese bidimensional

O perfil protéico de *Burkholderia* sp. SMF042 foi resolvido em géis bidimensionais em faixas de pH 4 - 7 e massas moleculares de 14,4 a 97 KDa. Os resultados podem ser visualizados nos géis de referência correspondentes a cada grupo (Figura 14).

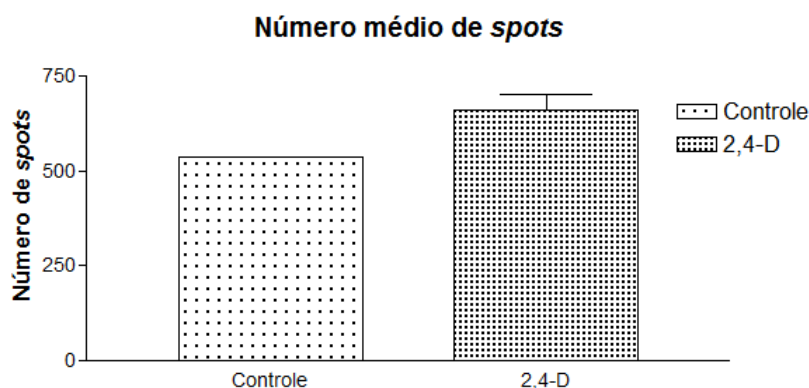
O grupo controle (A) contém 535 *spots* ao passo que o grupo tratado (B) contém 704 *spots*. Desta forma, o grupo tratado mostrou um aumento de 169 *spots* em relação ao grupo controle (Figura 15). Este aumento pode ser atribuído à necessidade do isolado de expressar proteínas adicionais para a tolerância e biodegradação do 2,4-D no meio de cultivo.

Figura 16 – Géis bidimensionais de referência de proteínas de SMF042.



Fonte: Próprio autor. O grupo A (controle positivo) e B (tratado), apresentam 535 e 704 *spots*, respectivamente.

Figura 17 – Número médio de *spots* por gel.



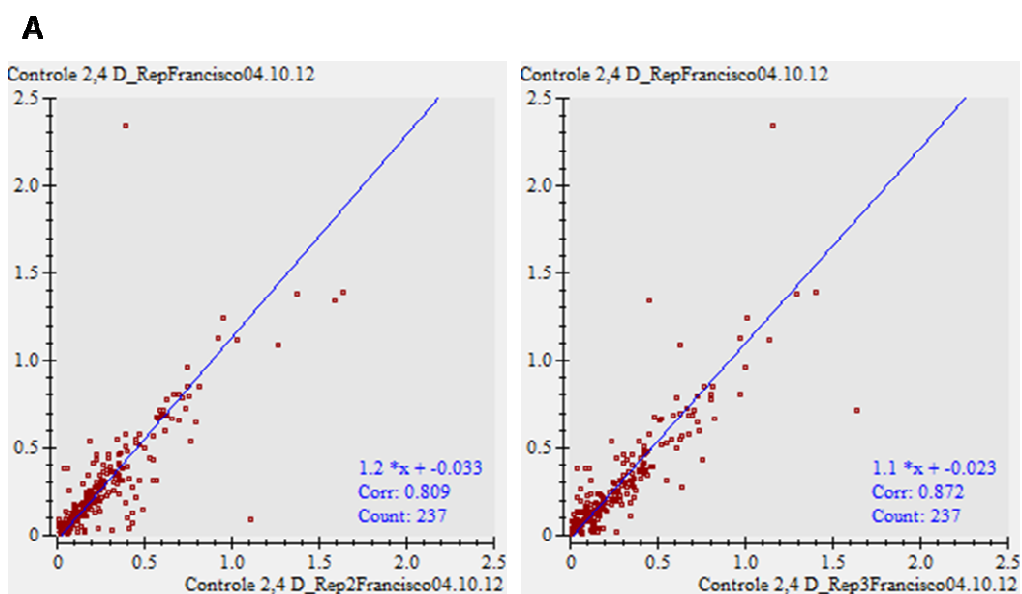
Fonte: Próprio autor.

#### 5.4.3 Reprodutibilidade dos géis bidimensionais

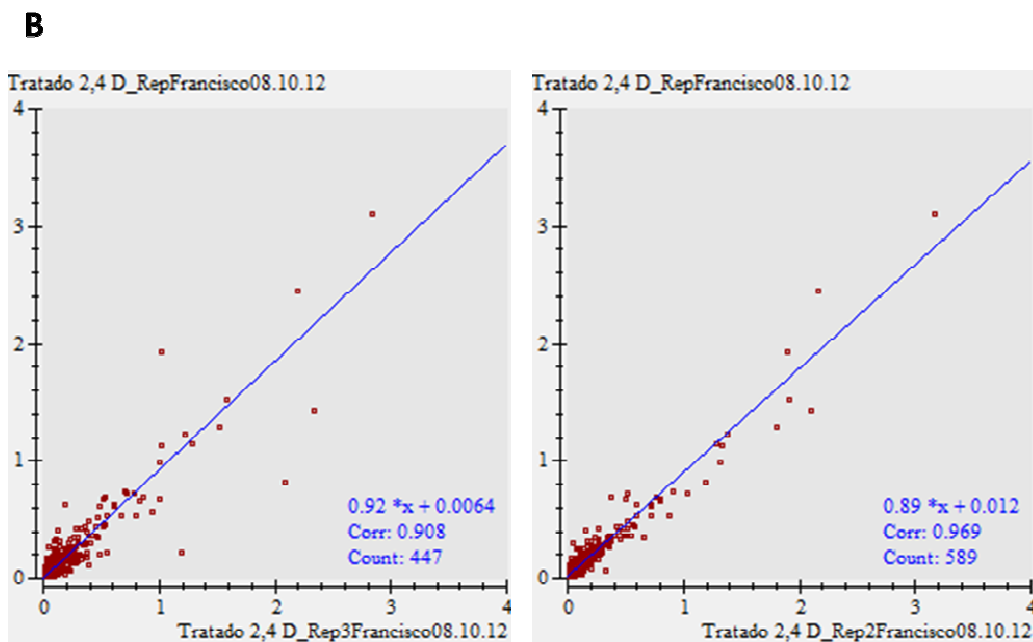
O resultado da reprodutibilidade dos géis bidimensionais realizada por meio do alinhamento entre as repetições são mostradas na figura 16. Nesta análise cada uma das repetições são confrontadas com o gel de referência de cada grupo (Controle e Tratado). O número de *matches* (*spots* compartilhados) no grupo controle (A) foi 237 na repetição 2 e 3 e o no grupo tratado (B) foi de 447 na repetição 2 e 589 na repetição 3.

Os coeficiente de correlação linear foi de 0,809 na repetição 2 e 0,872 na repetição 3 do grupo controle (A) e 0,908 na repetição 2 e 0,969 na repetição 3 no grupo tratado. Valores acima de 0,85 são aceitos como indicadores de reprodutibilidade entre duas variáveis (VIEIRA, 1980). Uma vez que os resultados deste trabalho estão próximos e superiores a esse valor, podemos afirmar a ocorrência de reprodutibilidade estatisticamente válida nestas repetições.

Figura 18 – Gráficos de correlação linear dos géis de proteínas do isolado SMF042.



**Gráfico de dispersão entre os CONTROLES :  
Rep 2 e o gel de referência; Rep 3 e o gel de referência.**



**Gráfico de dispersão entre os TRATAMENTOS :  
Rep 2 e o gel de referência; Rep 3 e o gel de referência.**

Fonte: Próprio autor.

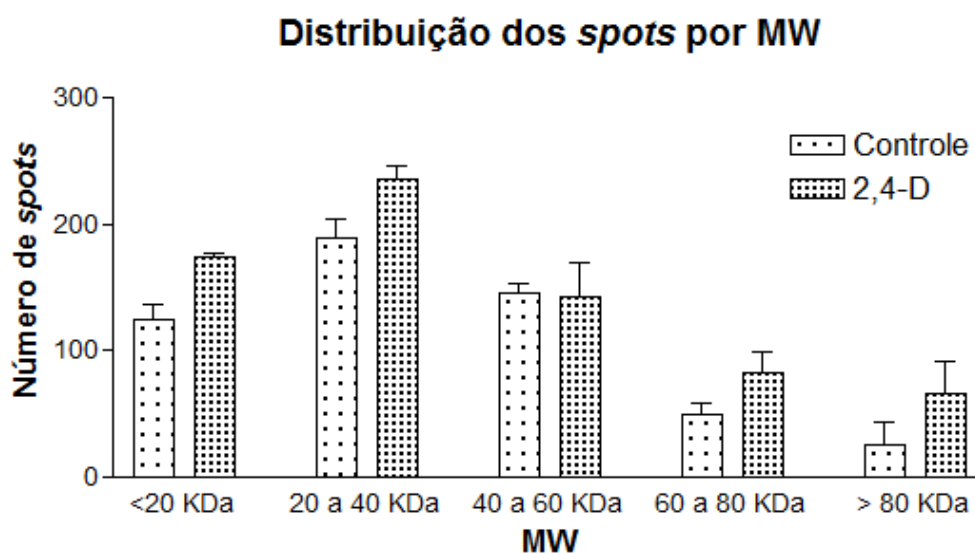


#### 5.4.4 Distribuição das proteínas do isolado SMF042 de acordo com a massa molecular e ponto isoelétrico

De acordo com o resultado da distribuição das proteínas por massa molecular (Figura 17), observa-se que o maior número de *spots* foi encontrado na faixa entre 20 e 40 KDa, tanto no grupo controle quanto no grupo tratado (2,4-D). Com excessão da faixa entre 40 e 60 KDa ocorreu um aumento do número de *spots* no grupo tratado em todas as faixas de massa molecular. Com relação ao pI, observou-se que o maior número de *spots* foi encontrado na faixa de pH entre 5 e 6 (figura18).

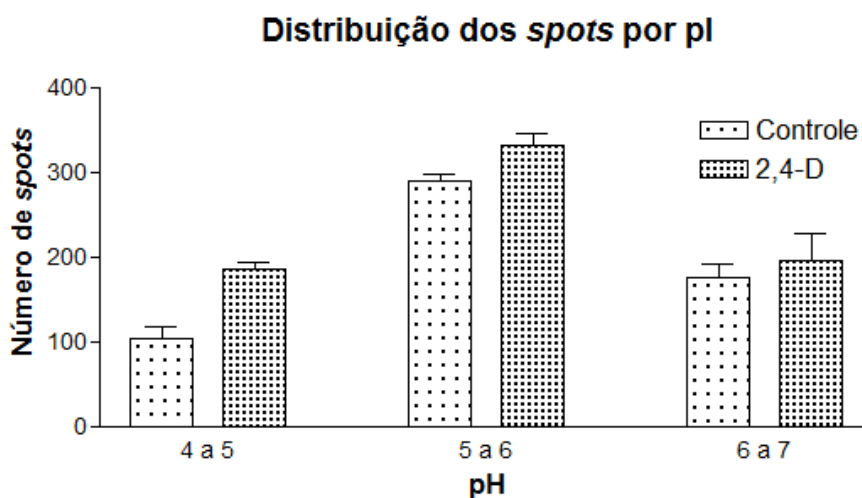
Este resultado mostra que além da necessidade do isolado SMF042 de expressar uma quantidade maior de proteínas, esta expressão adicional se deu em grupos protéicos diversos, para sustentar a versatilidade metabólica do isolado para crescer em um meio contendo 2,4-D como única fonte de carbono.

Figura 19 – Distribuição das proteínas de acordo com a massa molecular.



Fonte: Próprio autor.

Figura 20 – Distribuição das proteínas de acordo com o pI.



Fonte: Próprio autor.

#### 5.4.5 Identificação de proteínas envolvidas na biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)

O isolado SMF042 foi capaz de crescer utilizando o 2,4-D como única fonte de carbono e energia (Figura 8). Esse crescimento implica que esta bactéria possui em seu genoma um repertório de genes que codificam enzimas relativas à biodegradação deste herbicida.

Por meio da técnica de eletroforese bidimensional (2D) foram obtidos mapas protéicos de SMF042 submetidas ao crescimento com 2,4-D (tratado) e D-glicose, em meio mineral como únicas fontes de carbono. Os *spots* obtidos foram identificados pela comparação dos valores de pI e massa molecular com proteínas depositadas no banco dados *UniProt* (<http://www.expasy.org/>).

De acordo com esta busca, 4 *spots* apresentaram semelhanças com enzimas envolvidas na degradação do 2,4-D (Tabela 8). Vale ressaltar que nenhuma destas enzimas foram encontradas nos géis referente ao grupo controle, o que corrobora com o fato de que a presença do herbicida foi fator indutivo dos genes de biodegradação.

Dentre estas enzimas, conseguimos encontrar alguns *spots* candidados a membros da família TFD de biodegradação do 2,4-D, sendo elas: 2,4-D alfa KG-dependente dioxigenase (*tfdA*), 2,4-diclorofenoxiacetato monoxigenase (*tfdA*) e clorocatecol 1,2-dioxigenase (*tfdC*) (GUEDES, 2010).

Tabela 8 - Proteínas com valores de pI e massa molecular próximos dos valores teóricos de enzimas envolvidas com a biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

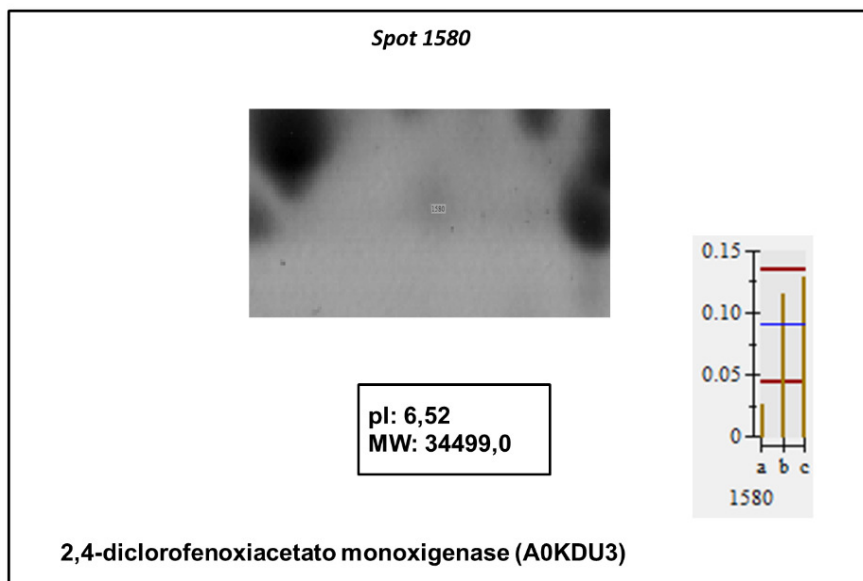
<i>Spot</i>	Proteína	pI <sup>1</sup>	MW <sup>1</sup>	pI <sup>2</sup>	MW <sup>2</sup>
441	2,4-D oxigenase	6,02	42718,0	6,02	43630,0
547	2,4-D alfa KG-dependente dioxigenase – <i>tfdA</i>	5,82	34831,0	5,89	34381,0
705	Clorocatecol 1,2-dioxigenase – <i>tfdC</i>	5,39	25910,0	5,39	28201,0
1580	2,4-diclorofenoxiacetato monoxigenase – <i>tfdA</i>	6,52	34499,0	6,57	34187,0

Fonte: Próprio autor. <sup>1</sup> pI experimental, massa molecular experimental; <sup>2</sup> pI teórico, massa molecular teórica

Com relação ao *spot* 441, este foi identificado como sendo a subunidade maior da enzima 2,4-D oxigenase. Esta molécula pertence à outra família gênica de degradação do 2,4-D designada *cadRABK*, descrita inicialmente em *Bradyrhizobium* sp. HW13 como uma nova via de degradação deste herbicida. O gene *cadA* é o responsável por sua codificação, ao passo que o gene *cadB* codifica a subunidade menor da enzima (KITAGAWA *et al.*, 2002).

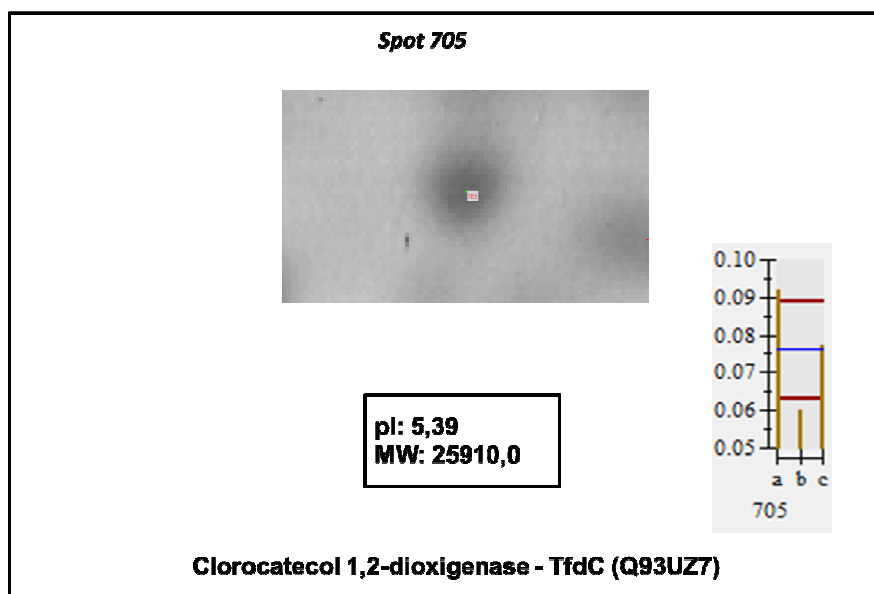
O gene *cadA* também já foi descrito em espécies de *Burkholderia*. Birren e colaboradores (não publicado: acesso ZP\_04943962: NCBI) identificaram o gene *cadA* em *Burkholderia cenocepacia* PC184 e Seo e colaboradores (2011) encontraram este gene no cromossomo 2 de *Burkholderia gladioli* BSR3.

Figura 21 – *Spot* correspondente à enzima 2,4-diclorofenoxiacetato monooxigenase.

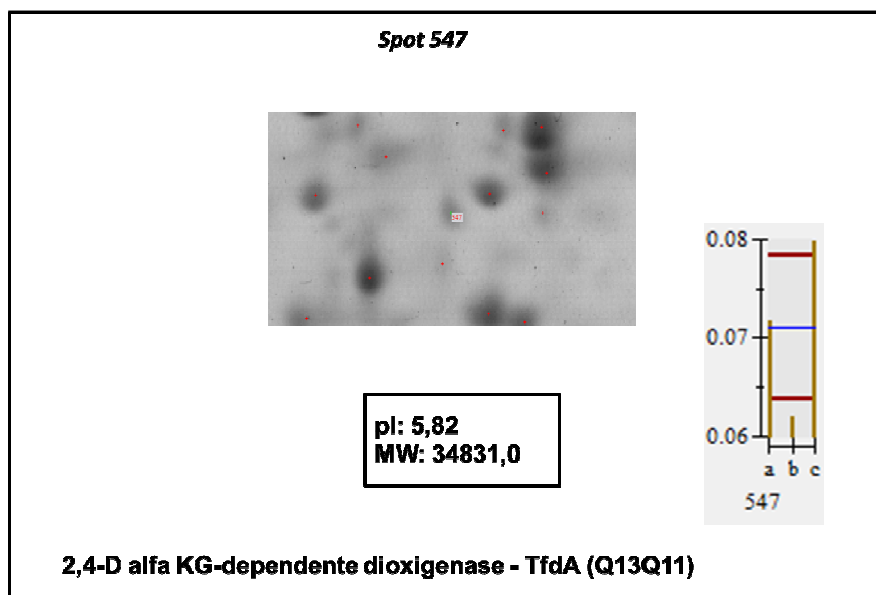


Fonte: Próprio autor. As letras a, b e c, representam as triplicatas. A linha amarela vertical representa a porcentagem do volume do *spot*, a linha horizontal azul é a média e as linhas horizontais vermelhas representam o desvio padrão.

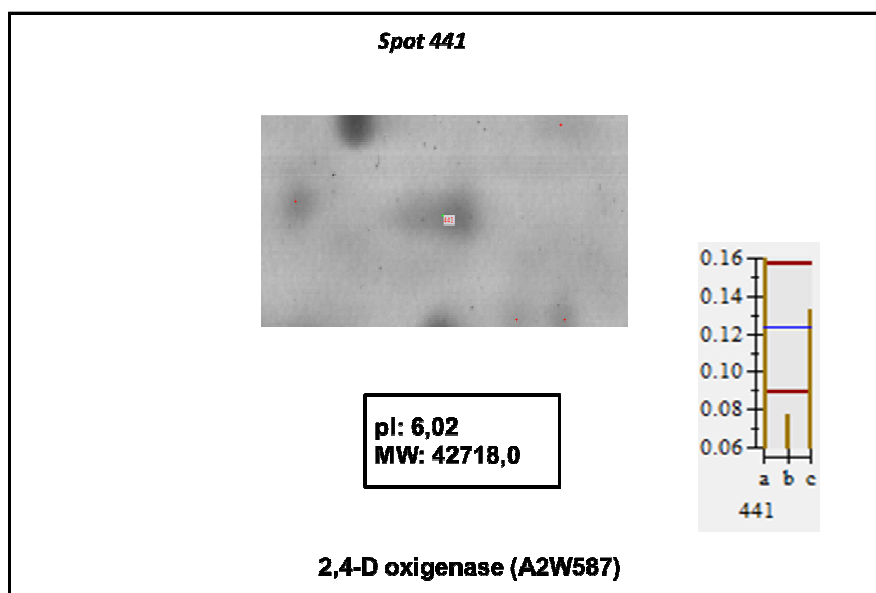
Figura 22 – *Spot* correspondente à enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase (*tfdC*).



Fonte: Próprio autor.

Figura 23 – *Spot* correspondente à enzima 2,4-alfa KG-dependente dioxigenase (*tfdA*).

Fonte: Próprio autor.

Figura 24 – *Spot* correspondente à enzima 2,4-D oxigenase.

Fonte: Próprio autor.

#### **5.4.6 Identificação de proteínas envolvidas na tolerância ao estresse provocado por 2,4-D**

O crescimento de SMF042 empregando somente 2,4-D como única fonte de carbono em associação com sua inerente toxicidade torna o meio de cultivo um ambiente capaz de provocar respostas metabólicas contra o estresse oriundo da presença deste herbicida. Neste trabalho, dois *spots* foram identificados como proteínas envolvidas na tolerância ao estresse em espécies de *Burkholderia*. São elas: proteína GrpE e chaperona DnaK (Tabela 9).

A chaperona DnaK (Hsp 70) participa ativamente na resposta a vários tipos de estresse dentre os quais destaca-se o choque hiperosmótico e calor através da promoção do enovelamento protéico e prevenção da agregação de proteínas por desnaturação (BREHMER *et al.*, 2004). A proteína GrpE (Hsp 70 cofator) é uma co-chaperona que atua em associação com a DnaK (SUGIMOTO *et al.*, 2008). A GrpE induz a dissociação de ADP a partir do domínio de ligação de nucleotídeos de DnaK e a liberação do substrato a partir do domínio de ligação ao substrato (BREHMER *et al.*, 2004).

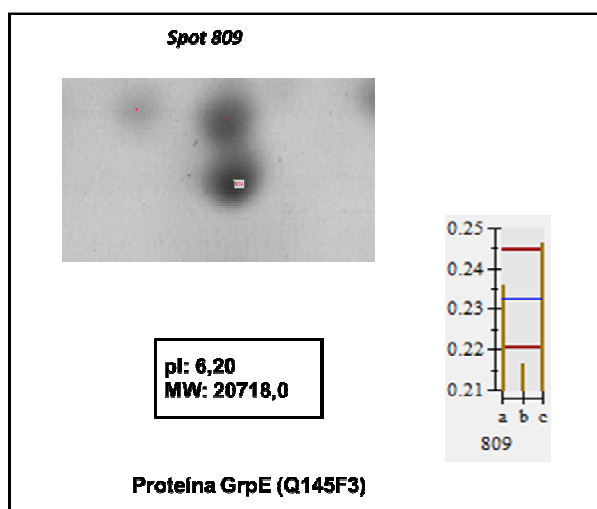
Neste sentido os resultados deste trabalho estão de acordo com Ho e colaboradores (2004) os quais relatam que o emprego de compostos aromáticos usados em culturas de crescimento bacteriano, além de induzir a expressão de enzimas de degradação, também estimula a produção de proteínas de resistência ao estresse provocado pela presença destes compostos. A exposição de *Burkholderia xenovorans* LB400 a clorobifenóis e policlorofenol induziu a expressão de DnaK em resposta ao estresse (AGULLO *et al.*, 2007). Por sua vez Zimu e colaboradores (2009) relatam a produção de DnaK por *Burkholderia cepacia* WZ1 exposta a quinclorac®.

Tabela 9 - Proteínas com valores de pI e massa molecular próximos dos valores teóricos de enzimas envolvidas na tolerância ao estresse.

<i>Spot</i>	Proteína	pI <sup>1</sup>	MW <sup>1</sup>	pI <sup>2</sup>	MW <sup>2</sup>
809	Proteína GrpE (Hsp 70 cofator)	5,20	20718,0	5,29	20782,0
1452	Chaperona DnaK (Hsp70)	4,90	69830,0	4,97	69732,0

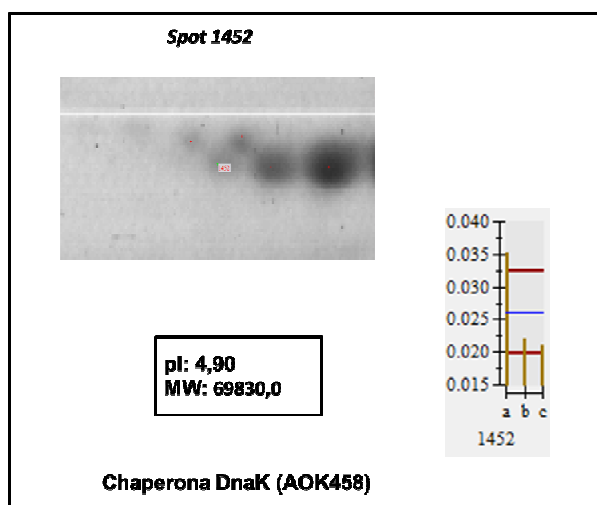
Fonte: Próprio autor. <sup>1</sup>pI experimental, massa molecular experimental; <sup>2</sup>pI teórico, massa molecular teórica

Figura 25 – *Spot* correspondente à proteína GrpE.



Fonte: Próprio autor.

Figura 26 – *Spot* correspondente à chaperona DnaK.



Fonte: Próprio autor.

#### **5.4.7 Verificação das proteínas que apresentaram expressão quantitativa aumentada na presença do 2,4-D**

As tabelas 10, 11, 12 e 13 mostram os *spots* que tiveram sua expressão quantitativa aumentada na presença de 2,4-D em comparação com o controle. Foi possível identificar 19 *spots* com expressão quantitativa aumentada. Estes *spots* foram identificados no banco de dados *UniProt/Swiss-Prot* do *ExpASy*, utilizando os valores de ponto de isoeletrico (pI) e massa molecular (MW).

O *spot* (ID:1550) foi identificado como sendo a proteína alquilhidroperoxidase redutase AhpD. Esta proteína está envolvida com a defesa antioxidante da célula. De acordo com Santos, Teixeira, Sá-Correia (2004) o aumento desta proteína sugere que a bactéria está sofrendo estresse oxidativo. Com base neste resultado, podemos aferir que o aumento da expressão desta proteína possa contribuir com a proteção celular e reparação de danos provocados pelo 2,4-D em SMF042 (Nakbi *et al.*, 2010). Em adição o *spot* (ID:1029) foi identificado como sendo a proteína OsmC a qual também está envolvida na resposta ao estresse.

O *spot* (ID: 1400) foi identificado como sendo possivelmente a enzima Bifenil dioxigenase. Esta proteína é membro de um grupo de enzimas que oxidam compostos aromáticos pela adição de átomos de oxigênio no anel aromático (HADDOCK; GIBSON, 1995).

Os *spots* (ID: 1373, 1551) identificados como sendo as proteínas Tioi-dissulfide isomerase e FMN-dependente NADH-azoredutase 5, respectivamente, estão associadas a homeostase redox e reações de oxidorredução. O aumento destas moléculas indicam possivelmente uma elevação das atividades de oxidorredução no interior da célula.

O *spot* (ID: 643) foi identificado como sendo a proteína fosfatase CheZ, a qual está associada ao sistema de quimiotaxia da célula. Em adição, o *spot* (ID: 1368) foi identificado como uma proteína que atua na composição do flagelo celular. Estas observações sugerem que houve uma necessidade do isolado SMF042 de explorar plenamente meio de cultivo, ao ampliar sua sensibilidade a compostos químicos e sua capacidade de locomoção.

Proteínas envolvidas na obtenção de energia e no Ciclo de Krebs tiveram sua expressão aumentada, sendo elas: ATP sintase, succinato desidrogenase e malato



desidrogenase 2 do Ciclo de Krebs. Sobre isso, os autores Santos, Teixeira, Sá-Correia (2004) afirmam que o aumento da expressão de proteínas envolvidas no metabolismo energético é comum em bactérias expostas a compostos tóxicos, como é o caso do 2,4-D. eles relatam ainda, que estas proteínas estão relacionadas com mecanismos de adaptação celular dependentes de energia (ATP).

Também tiveram expressão aumentada, proteínas envolvidas na biossíntese de aminoácidos, proteínas, carboidratos, ribossomos e lipopolissacarídeos. Esta observação indica a conversão das moléculas de 2,4-D em constituintes celulares. Além disso, o aumento da expressão de lipopolissacarídeos sugere a reposição dos componentes da parede celular, provavelmente danificados pela ação do 2,4-D (SANTOS, TEIXEIRA, SÁ-CORREIA, 2004). Esta observação está de acordo com (BRADBERRY *et al.*, 2000) ao relatarem que o herbicida 2,4-D desestabiliza a organização espacial dos lipídeos de membrana.

O Ciclo de Krebs é anfibólico, em decorrência de apresentar reações catabólicas e anabólicas. Sobre isso, compostos deste ciclo podem ser empregados como precursores biossintéticos e entrar na via da gliconeogênese (NELSON; COX, 2006). Nesta perspectiva, entendendo que a via de degradação do 2,4-D termina com a produção de succinato, um intermediário do Ciclo de Krebs, podemos compreender que o aumento da expressão da enzima succinato desidrogenase foi necessária para empregar o succinato oriundo do 2,4-D no Ciclo de Krebs, o qual posteriormente entraria não somente na produção de energia, mas também em vias de biossíntese (FUKUMORI; HAUSINGER, 1993). No que diz respeito à malato desidrogenase, esta enzima também está envolvida na gliconeogênese, desta forma o aumento da expressão desta proteína indica a síntese de glicose através do 2,4-D (NELSON; COX, 2006).

Tabela 10 - Identificação das possíveis proteínas com expressão quantitativa aumentada de *Burkholderia* sp.SMF042 relacionadas com a biossíntese.

spotID	pI	MW	Nome da Proteína	Processo Biológico	Número de Acesso
569	5,62	30201,0	2-dehidro-3-deoxifosfooctonato aldolase	Biossíntese de lipopolissacarídeo	B1JUY7
642	4,46	26767,0	1-(5-fosforibosil)-5-[(5-fosforibosilamino) metilideneamino] imidazole-4-carboxamide isomerase	Biossíntese de aminoácido	A0K3V
645	4,61	26619,0	1-(5-fosforibosil)-5-[(5-fosforibosilamino) metilideneamino] imidazole-4-carboxamide isomerase	Biossíntese de aminoácido	B1G8G
723	4,44	23260,0	Proteína ArgJ	Biossíntese de aminoácido	Q39JW0
832	5,75	18891,0	Fosfoheptose isomerase	Biossíntese de carboidrato	I2ME23
838	5,87	18927,0	Peptídeo deformilase	Biossíntese de proteína	Q63YR7
987	6,68	14897,0	Proteína S6 do ribossomo 30S	Transcrição	B1YRJ4
1530	6,60	26991,0	Fator RimM de maturação de ribossomo	Biogênese de ribossomo	B2T606

Fonte: Próprio autor. pI e MW experimentais.

Tabela 11 - Identificação das possíveis proteínas com expressão quantitativa aumentada de *Burkholderia* sp.SMF042 relacionadas com a tolerância ao estresse oxidativo.

spotID	pI	MW	Nome da Proteína	Processo Biológico	Número de Acesso
842	6,53	18799,0	Proteína alquilhidroperoxidase	Antioxidante	A0B3V8
1029	6,04	14110,0	Proteína OsmC	Resposta ao estresse	B1TCF3
1369	4,17	20811,0	FKBP-peptidil-prolil-cis-trans-isomerase	Enovelamento protéico	A3NB66
1373	4,47	13312,0	Tiol-dissulfide isomerase	Homeostase redox	A9AC72
1550	6,37	18836,0	Alquilhidroperóxido redutase AhpD	Resposta ao estresse oxidativo	A1V4Z6
1551	6,59	21191,0	FMN-dependente NADH-azoredutase 5	Oxirredução	Q390D0

Fonte: Próprio autor. pI e MW experimentais.

Tabela 12 - Identificação das possíveis proteínas com expressão quantitativa aumentada de *Burkholderia* sp.SMF042 relacionadas com a produção de energia, Ciclo de Krebs e gliconeogênese.

spotID	pI	MW	Nome da Proteína	Processo Biológico	Número de Acesso
985	5,18	14883,0	ATP sintase	Síntese de ATP	A1V8T0
1552	6,70	27104,0	Succinato desidrogenase	Ciclo de Krebs	A3MGS0
1593	6,93	36693,0	Malato desidrogenase 2	Ciclo de Krebs	Q2T4T8

Fonte: Próprio autor. pI e MW experimentais.

Tabela 13 - Identificação das possíveis proteínas com expressão quantitativa aumentada de *Burkholderia* sp.SMF042 relacionadas com a exploração do meio ambiente.

<b>spotID</b>	<b>pI</b>	<b>MW</b>	<b>Nome da Proteína</b>	<b>Processo Biológico</b>	<b>Número de Acesso</b>
643	4,55	26730,0	Proteína fosfatase CheZ	Quimiotaxia	A9AD42
1368	4,11	23684,0	Proteína de nivelamento flagelar	Projeção celular	B5WU12

Fonte: Próprio autor. pI e MW experimentais.

#### ***5.4.8 Verificação das proteínas que apresentaram expressão quantitativa reduzida na presença do 2,4-D***

A tabela 14 e 15 mostra os *spots* que tiveram sua expressão quantitativa reduzida na presença de 2,4-D em comparação com o controle. Foi possível identificar 32 *spots* com expressão quantitativa reduzida.

Estas proteínas estão relacionadas principalmente ao metabolismo e biossíntese de aminoácidos, proteínas, carboidratos, lipídeos, nucleotídeos e ao processamento do DNA e RNA. Estas observações são indicativas de que o isolado SMF042 disponibilizou seu metabolismo em mecanismo de adaptação, tolerância e biodegradação do 2,4-D em detrimento da biossíntese, muito provavelmente, em decorrência do alto custo energético.

Estes resultados corroboram com Santos, Teixeira e Sá-Correia (2004) ao relatarem que a ocorrência de diminuição da expressão quantitativa de proteínas envolvidas em processos biológicos, tais como metabolismo de nucleotídeos, são necessárias para contribuir com o direcionamento de energia para os mecanismos de adaptação celular.

Tabela 14 - Identificação das possíveis proteínas com expressão quantitativa reduzida de *Burkholderia* sp.SMF042 relacionadas com a biossíntese.

spotID	pI	MW	Nome da Proteína	Processo Biológico	Número de Acesso
355	6,04	42605,0	1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase	Biossíntese de isopreno	B2J19
358	6,64	42435,0	Homoserina-O-acetiltransferase	Biossíntese de aminoácido	A3MRS1
359	5,85	42379,0	tRNA 2-tiouridilase MnmA	Biossíntese de aminoácido	B1YTE9
498	5,50	33334,0	UDP-3-O-[3-hidroxi-miristoil] N-acetilglicosamina deacetilase	Biosíntese de lipídeo	Q2SZH6
600	5,57	28654,0	3-metil-2-oxobutanoato hidroximetiltransferase	Biossíntese do pantetonato	A1V0V0
622	5,80	27869,0	4-hidroxitetrahidropicolinato redutase	Biossíntese de aminoácido	A9AHB2
623	5,33	27830,0	Triptofano sintase cadeia alfa	Biossíntese de aminoácido	A1UZ42
648	5,16	26508,0	UPF0271 proteína Bxeno_A4200	Biossíntese de carboidrato	Q13T51
649	5,33	26545,0	Imidazole glicerol fosfato sintase subunidade HisF	Biossíntese de aminoácido	A3P027
901	6,47	17279,0	3-hidroxiacil-(acil-proteína) desidratase FabZ	Biossíntese de lipídeo	A0K8D2
986	5,41	14883,0	Fosforibosil ATP pirofosfatase	Biossíntese de aminoácido	Q13TR2
1041	5,05	13745,0	Fosforibosil ATP pirofosfatase	Biossíntese de aminoácido	B1JUA7
1117	5,14	12177,0	Fosforibosil ATP pirofosfatase	Biossíntese de aminoácido	A3MPU2

Fonte: Próprio autor. pI e MW experimentais.

Tabela 15 - Identificação das possíveis proteínas com expressão quantitativa reduzida de *Burkholderia* sp.SMF042 relacionadas com o metabolismo celular.

spotID	pI	MW	Nome da Proteína	Processo Biológico	Número de Acesso
581	5,90	29668,0	tRNA (guanina-N(7)-)metiltransferase	Processamento de tRNA	A4JC5
648	5,16	26508,0	UPF0271 proteína Bxeno_A4200	Metabolismo de carboidrato	Q13T51
650	5,74	26324,0	Octanoiltransferase	Metabolismo celular	A1V017
737	5,31	22528,0	Oligoribonuclease	Atividade hidrolase	A3NBZ6
738	5,53	22590,0	Deoxiribose fosfato aldolase	Catabolismo de carboidrato	A0KCV5
767	5,80	21458,0	Fosfoheptose isomerase	Metabolismo de carboidrato	Q9AI36
779	5,36	20667,0	Adenina fosforibosiltransferase	Metabolismo de carboidrato	B1YN34
799	5,61	20438,0	Adenina fosforibosiltransferase	Metabolismo de carboidrato	B2JCQ7
944	5,40	15652,0	Deoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase	Metabolismo de nucleotídeo	A0K9T8
960	5,21	15728,0	D-tirosil tRNA (Tyr) deacilase	Catabolismo de aminoácido	B1YTD6
1041	5,05	13745,0	Fosforibosil ATP pirofosfatase	Biossíntese de aminoácido	B1JUA7
1091	5,30	12670,0	Proteína Bphy_0952	Metabolismo do DNA	B2JG59
1099	4,70	12597,0	NADH-quinona oxirredutase subunidade A	Transporte	A0K923
1105	4,80	12597,0	Proteína L7/L12 50S ribossomal	Metabolismo de RNA	A1V8B3
1124	5,47	12024,0	Proteína Bcep1808_1753	Metabolismo do DNA	A4JEQ4

---

1132	5,40	12001,0	Uréase subunidade beta	Metabolismo da uréia	B1JX30
1381	5,37	15989,0	D-tirosil tRNA (Tyr) deacilase	Catabolismo de aminoácido	A0K4L0
1399	5,58	21458,0	Deoxicitina trifosfato deaminase	Metabolismo de nucleotídeo	B2T181
653	5,51	26215,0	5'-nucleotidase SurE	Atividade 5' nucleotidase	A1V4L3

---

Fonte: Próprio autor. pI e MW experimentais.



## 6 CONCLUSÃO

O isolado *Burkholderia* sp. SMF 042 identificado com pertencente à espécie *Burkholderia phymatum* demonstrou a capacidade de tolerar e biodegradar o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ao crescer em meio contendo 2,4-D como única fonte de carbono e energia. A análise de eletroforese bidimensional (2DE) revelou a presença de enzimas de vias de biodegradação do 2,4-D e de resistência ao estresse químico. Dentre estas enzimas, o gene *tfdA*, o qual codifica a 2,4-D alfa KG-dependente dioxigenase teve sua expressão aumentada. Estes resultados demonstram a potencialidade de *Burkholderia* sp. SMF042 de ser empregado na biodegradação do 2,4-D.

## REFERÊNCIAS

- AIZAWA, T. *et al.* *Burkholderia acidipaludis* sp. nov., aluminum-tolerant bacteria isolated from Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis*) growing in highly acidic swamps in South-East Asia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, n.9, p. 2036-2041, 2010a.
- AIZAWA, T. *et al.* *Burkholderia heleaia* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from an aquatic plant, *Eleocharis dulcis*, that grows in highly acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.60, n.5, 1152-1157, 2010b.
- AIZAWA, T. *et al.* *Burkholderia bannensis* sp. nov., an acidneutralizing bacterium isolated from torpedo grass (*Panicum repens*) growing in highly acidic swamps. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* v.61, p.1645–1650, 2011.
- AGULLÓ, L. *et al.*. Response to (chloro)biphenyls of the polychlorobiphenyl degrader *Burkholderia xenovorans* LB400 involves stress proteins also induced by heat shock and oxidative stress. *FEMS Microbiol. Lett.* v.267, p.167-175, 2007.
- AKSU, Z.; KABASAKAL, E. Batch adsorption of 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid (2,4-D) from aqueous solution by granular activated carbon, Separation and Purification. *Technology*, v.35, p.223–240, 2004.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**, 302 p, Academic Press, 1994.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v.25, p.3389-3402, 1997.
- ANDREOLLI, M. *et al.* *Burkholderia fungorum* DBT1: a promising bacterial strain for bioremediation of PAHs-contaminated soils. *FEMS microbiology letters*, v.319, n. 1, p.11-18, 2011.
- AVANZI, R. I.; GRACIOSO, L. H.; PERPETUO, E. A. Isolamento e Identificação de bactéria degradadora de fenol da zona industrial de Cubatão-SP, através da técnica de amplificação do 16S. *Revista Ceciliana* v.1, n.2, p.66-70, 2009.
- BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2. ed. Ed. Bookman: Porto Alegre, 2002.
- BARTHOLDSON, S. J. *et al.* Plant host and sugar alcohol induced exopolysaccharide biosynthesis in the *Burkholderia cepacia* complex. *Microbiology*, v.154, p.2513-2521, 2008.
- BELOVA, S. E.; PANKRATOV, T. A.; DEDYSH, S. N. Bacteria of the genus *Burkholderia* as a typical component of the microbial community of *Sphagnum* peat bogs. *Microbiology*, v.75, n.1, p.90–96, 2006.

BENLI, A. Ç. K. *et al.* Investigation of acute toxicity of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) herbicide on crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823). **Pestic Biochem. Physiol.** V. 88, p.296-299, 2007.

BERINGER, J. E. R. Factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, v. 84, p.188-198,1974.

BEVIVINO, A. *et al.* Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*. **Microbiology**. v.140, p.1069-77, 1994.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal. Biochem.** 72:248-254, 1976.

BRAMER, C. O. *et al.* *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.1709–1713, 2001.

BRADBERRY, S. *et al.* Mechanisms of toxicity, clinical features, and management of acute chlorophenoxy herbicide poisoning: a review. **Journal of Toxicology and Clinical Toxicology**, v. 38, p.111–122, 2000.

ELLIS, L. *et al.* The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: The First Decade. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p.D17-D521, 2006.

Ewing, B. *et al.* Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. I. Accuracy assessment. **Genome Res** v. 8, p.186-194, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria N° 518 de 25 de Março de 2004.

BREHMER, D. *et al.* Influence of GrpE on DnaK-substrate interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p.27957–27964, 2004.

BUKOWSKA, B. Effects of 2,4-D and its metabolite 2,4-dichlorophenol on antioxidant enzymes and level of glutathione in human erythrocytes **Compar. Biochem. Physiol, C**, v. 135, p. 435–441, 2003.

BURKHOLDER, W. H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**, v. 40, p. 115-117, 1950.

BEVIVINO, A. *et al.* Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*. **Microbiology**, v.140, p.1069-1077, 1994.

BARRETT, C. F.; PARKER, M. A. Prevalence of *Burkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. **Syst Appl Microbiol** v. 28, p.57–65, 2005.

BYLUND, J. *et al.* Exopolysaccharides from *Burkholderia cenocepacia* inhibit neutrophil chemotaxis and scavenge reactive oxygen species. **J Biol Chem**, v.281, p.2526–2532, 2006.

CABALLERO-MELLADO, J. *et al.* *Burkholderia unamae* sp. nov., an N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v.54, p. 1165-1172, 2004.

CARAHER, E.M. *et al.* The effect of recombinant human lactoferrin on growth and the antibiotic susceptibility of the cystic fibrosis pathogen *Burkholderia cepacia* complex when cultured planktonically or as biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.60, p.546- 554, 2007.

CASTRO, F. D. **Degradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) com ozônio Eletrogerado**. 2010. 80 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química, Uberlândia, MG.

CESCUTTI, P. *et al.* Structural study of the exopolysaccharide produced by a clinical isolate of *Burkholderia cepacia*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 273, n. 3, p.1088-1094, 2000.

CHEN, W. *et al.* *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.1847–1851, 2006.

CHEN, W. *et al.* *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.1055-1059, 2007.

CHEN, W. *et al.* *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.2174–2179, 2008.

CHO, Y. S. *et al.* Induction of stress shock proteins DnaK and GroEL by phenoxyherbicide 2,4-D in *Burkholderia* sp. YK-2 isolated from rice field. **Current Microbiology**, v.41, p.33–38, 2000.

CHO, Y. S. *et al.* Physiological and cellular responses of the 2,4-D degrading bacterium, E.-M. Ho *et al.*: Cellular Responses of *Stenotrophomonas* sp. OK-5 to TNT *Burkholderia cepaica* YK-2, to the phenoxyherbicides 2,4-D and 2,4,5-T. **Current Microbiology**, v.45, p.415–422, 2002.

COENYE, T. *et al.* *Burkholderia cocovenenans* (van Damme *et al.* 1960) Gillis *et al.* 1995 and *Burkholderia vandii* Urakami *et al.* 1994 are junior synonyms of *Burkholderia gladioli* (Severini 1913) Yabuuchi *et al.* 1993 and *Burkholderia plantarii* (Azegami *et al.* 1987) Urakami *et al.* 1994, respectively. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, n.1, p.37-42, 1999.

COENYE, T. *et al.* Description of *Pandoraea* gen. nov. with *Pandoraea apista* sp. nov., *Pandoraea pulmonicola* sp. nov., *Pandoraea pnomenus* sp. nov., *Pandoraea sputorum* sp. nov. and *Pandoraea norimbergensis* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, p.887–899, 2000.

COENYE, T. *et al.* *Burkholderia cepacia* genomovar VI, a new member of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.39, n.10, p.271-279, 2001b.

COENYE, T. *et al.* *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.1481–1490, 2001c.

COENYE, T. *et al.* *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. V. 51, p.1099-1107, 2001a.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, v.5, n.9, p.719-729, 2003.

COENYE, T.; HENRY, D.; SPEERT, D. P.; VANDAMME, P. *Burkholderia phenoliruptrix* sp. Nov., to accommodate the 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and halophenol-degrading strain AC1100. **Systematic and Applied Microbiology**, v.27, p.623-627, 2004.

COMPANT, S. *et al.* Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v.32, n.4, p-607-626, 2008.

DAUGHERTY, D.; KAREL, S. F. Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by *Pseudomonas cepacia* DBO1(pRO101) in a dual-substrate chemostat. **Applied Environmental Microbiology**, v.60, p.3261-3267, 1994.

DIAS, J. R. M.; DUBBERSTEIN, D.; TAVELLA, L. B.; FERREIRA, E.; STACHIW, R. Lixiviação de 2,4-d em solo de pastagem na Amazônia Ocidental. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 7, n. 4, p. 15 – 20, 2011.

DITZELMULLER, G.; LOIDL, M. E STREICHSBIER, F. Isolation and characterization of a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading soil bacterium. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.31, p.93-96, 1989.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V.L.D. **Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 1999. 38p.

DON, R. H.; PEMBERTON, J. M. Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes eutropha* and *Alcaligenes paradoxus*. **Journal of Bacteriology**, v. 145, p.681-686, 1981.

DUA, M.; SINGH, A.; SETHUNATHAN, N.; JOHRI, A. K. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.59, p. 143-152, 2002.

ELLIOTT, G. N.; CHEN, W.; CHOU, J.; WANG, H. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogenfixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen *ex planta*. **New Phytologist**, v.173, p.168-180, 2007.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p.175-85, 1998.

FISHER, P. R.; APPLETON, J.; PEMBERTON, J. M. isolation and characterization of the pesticide-degrading plasmid, pJP1, from *Alcaligenes paradoxus*. **Journal of Bacteriology**, v. 135, p. 798-804, 1978.

FREIRE, R. S., PELEGRINI, R., KUBOTA, L. T., DURAN, N. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p.504-511, 2000.

FRUMKIN, H. Agent orange and Cancer: An Overview for clinicians. **Environmental Carcinogens**, v. 153, n. 4, p. 245-255, 2003.

FUKUMORI, F.; HAUSINGER, R. P. *Alcaligenes eutrophus* JMP134: "2,4-dichlorophenoxyacetate mooxygenase" Is an  $\alpha$ -Ketoglutarate-dependent dioxygenase. **Journal of Bacteriology**. v.175, n. 7. p. 2083-2086, 1993.

GAYLARDE, C.C.; BELLINASSO, M.D.L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.34, 2005.

GEE, J. E. *et al.* Characterization of *Burkholderia rhizoxinica* and *B.endofungorum* isolated from clinical specimens. **PLoS ONE**, v. 6, n.1: e15731. doi:10.1371/journal.pone.0015731, 2011.

GHASSEMI, M. *et al.* Takata. Environmental Fates and Impacts of Major Forest Use Pesticides. EPA. Office of **Pesticides and Toxic Substances**. p. 101-148, 1981.

GILLIS, M. *et al.* Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N,-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, n.2, p.274-289, 1995.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v.8, n.3, p.195-202, 1998.

GORIS, J. *et al.* Classification of the PCB-and biphenyl-degrading strain LB400 and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1677-1681, 2004.

GUEDES, S. F. **Estudo da biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, um herbicida selectivo amplamente utilizado na agricultura, por uma estirpe de *penicillium***. 2010. 238f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar)-Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Monte da Caparica, Distrito de Setúbal, Portugal.

HARKER, A. R.; OLSEN, R. H.; SEIDLER, R. J. Phenoxyacetic acid degradation by the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (TFD) pathway of plasmid pJP4: mapping and characterization of the TFD regulatory gene, *tfdR*. **J. Bacteriol**, v.171, p.314–320, 1989.

HEBBAR, K. P.; MARTEL, M. H.; HEULIN, T. Suppression of pre-and post-emergence damping-off in corn by *Burkholderia cepacia*. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v. 104, p. 29-36, 1998.

HO, E. M. *et al.* Analysis of TNT (2,4,6-Trinitrotoluene)-Inducible Cellular Responses and Stress Shock Proteome in *Stenotrophomonas* sp. OK-5. **Current Microbiology**, v. 49, p. 346–352, 2004.

HOLMES, A., GOVAN, J. AND GOLDSTEIN, R. Agricultural use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: a threat to human health. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, p. 221–227, 1998.

HADDOCK, J. D.; GIBSON, D. T. Purification and Characterization of the Oxygenase Component of Biphenyl 2,3-Dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain LB400. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 20, p. 5834–5839, 1995.

HORIKOSHI, S., HIDAKA, H., SERPONE, N., Environmental remediation by an integrated microwave/UV-illumination technique IV. Non-thermal effects in the microwave-assisted degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in UVirradiated TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O dispersions. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry** v.159, p.289–300, 2003.

HUSTON, M.A. *Biological Diversity: The Coexistence of Species on Changing Landscapes*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1994.

JAIN, R.K. *et al.* Microbial diversity: Application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. **Current Science**, v.89, n.1, p.101-112. 2005.

JING-YUN, M. *et al.* Biodegradation of a mixture of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and multiple chlorophenols by aerobic granules cultivated through plasmid *pjp4* mediated bioaugmentation. **Chemical Engineering Journal**, .v.181, n.182 p.144– 151, 2012.

KARAM, D.; SILVA, J. A. A.; FOLONI, L. L. Potencial de contaminação ambiental de herbicidas utilizados na cultura do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.8, n.3, p. 247-262, 2009.

KIM, J.R.; AHN, Y. J. Identification and characterization of chlorpyrifos-methyl and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading *Burkholderia* sp. strain KR100. **Biodegradation**, v.20, n.4, p.487-497, 2009.

KITAGAWA, W. *et al.* Novel 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid degradation genes from oligotrophic *Bradyrhizobium* sp. strain HW13 Isolated from a pristine environment. **Journal of Bacteriology**, v.184, n.2, p.509-518, 2002.

KO, Y. J. *et al.* Responses of *Pseudomonas* sp. DJ-12 to pollutant stresses of benzoate and 4-chlorobenzoate. **J Microbiol Biotechnol**, v.9, p.422-428, 1999.

LIU, J.B.; AMEMIYA, T.; CHANG, Q.; XU, X.; ITOH, K. Real-time reverse transcription PCR analysis of trichloroethylene-regulated toluene dioxygenase expression in *Pseudomonas putida* F1. *Journal of Environmental Science and Health Part B*. v. 46, p.294-300, 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . **METHODS**, v. 25, p. 402-408, 2001.

MACKAY, F. W.; BETTS, W. B. Biodegradation. **Natural and Synthetic Materials**. p.92-137, 1989.

MAGNANI, G. S. **Análise da biodiversidade de bactérias endofíticas de colmo de cana-de-açúcar cultivada no noroeste do Paraná**. 2009. 153f. Tese (Doutorado em Ciências)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

MAHENTHIRALINGAM, E. *et al.* *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 104, no. 6, pp. 1539-1551, 2008.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. Tese – Doutorado. Universidade Estadual Paulista, 2006.

MCCALL, P. J.; VRONA, S. A.; KELLEY, S. S. Fate of uniformly carbon-14 ring labeled 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid. **J. Agric. Food Chem.** 29, p.100-107, 1981.

MCGOWAN, C. *et al.* Evidence for interspecies gene transfer in the evolution of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degraders. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 4089-4092, 1998.

MENNA, P. *et al.* Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 315-332, 2006.



MIGULA, W. **Arbeiten aus dem Bacteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe** v.1, p.235-238, 1894.

MIRALLES, I. S. *et al.* *Burkholderia pseudomallei*: a case report of a human infection in Ceará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n.1, p.51-54, 2004.

MOULIN, L. *et al.* Nodulation of legumes by members of the beta- subclass of Proteobacteria. **Nature**, v.411, p. 948–950, 2001.

NAKBI, A. *et al.* Effects of olive oil and its fractions on oxidative stress and the liver's fatty acid composition in 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-treated rats. **Nutrition & Metabolism**, v.7 ,n.1, p.2-11, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **LEHNINGER**. Princípios de Bioquímica. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p

OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde, 1997, Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. Brasília, Representação no Brasil, 1997.

OPELT, K.; BERG, G. Diversity and antagonistic potential of bacteria associated with bryophytes from nutrient-poor habitats of the Baltic Sea Coast. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, p.6569–6579, 2004.

ORUÇ, E.; SEVGILER, Y.; Üner, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. **Comp. Biochem. Physiol**, v. 137, p. 43-51, 2004.

O'SULLIVAN, L. A.; MAHENTHIRALINGAM, E. Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. **Lett Appl Microbiol** , v.41, n. 8–11, 2005.

OTSUKA, Y. *et al.* *Burkholderia oxyphila* sp. nov., a bacterium isolated from acidic forest soil that catabolizes (+)-catechin and its putative aromatic derivatives. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.61, n.2, p.249-254, 2011.

PERIN, L. **Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar e descrição de *Burkholderia silvatlantica***. 2007. 103f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Soropédica, RJ.

PERIN, L. *et al.* *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium associated with sugarcane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1931-1937, 2006a.

PERIN, L; ARAÚJO, J. L. S.; REIS, V. M. **O gênero *Burkholderia*; um importante componente da comunidade microbiana**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. 32 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 219)b.

PRIMEL, E. G. *et al.* Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p.605-609, 2005.

QUEIROZ, J. P. C. **Estudo sobre a distribuição do herbicida 2,4-D nos solos da região de São Pedro da Serra – RJ e sua importância ambiental**. 2007. 160 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Materiais e Metalurgia)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

REIS, V. M. *et al.* *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogenfixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary**, v.54, p.2155-2162, 2004.

RICE, J. F. *et al.* Natural selection for 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid mineralizing bacteria in agent orange contaminated soil. **Biodegradation** v.16, p.501–512, 2005.

RICHAU, J. A. *et al.* Molecular typing and exopolysaccharide biosynthesis of *Burkholderia cepacia* isolates from a portuguese cystic fibrosis center. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 4 p. 1651–1655, 2000.

RIEDEL, K. *et al.* Towards the proteome of *Burkholderia cenocepacia* H111: Setting up a 2 DE reference map. **Proteomics. Research Article**, v.6, n.1, p.207-216, 2006.

RODRIGUES, B. N., ALMEIDA F. S. **Guia de Herbicidas**. 5. ed. Londrina-Paraná: Grafmarke editora gráfica, 2005.

ROMERO-PUERTAS, M. C.; MCCARTHY, I.; GOMEZ, M.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; DEL RIO, L. A.; PALAMA, J. M. Reactive oxygen species-mediated enzymatic systems involved in the oxidative action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid Plant. **Cell. Environ**, v.27, p.1135–1148, 2004.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. **Molecular cloning: A laboratory manual**, 2.ed. New York: Cold Spring harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989.  
SARIKAYA, R.; SELVI, M. Investigation of acute toxicity of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) herbicide on larvae and adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Environ. Toxicol. Pharm**, v. 20, p. 264-268, 2005.

SANDAVAL-CARRASCO, C. A. *et al.* Biodegradation of a mixture of the herbicides ametryn, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in a compartmentalized biofilm reactor. **Bioresource Technology**, 2013.

SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C, SÁ-CORREIA, I. A análise Proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a estresse químico em microrganismos. **Boletim de Biotecnologia**, v.77, p.7–17. 2004.

SEEGER, M.; TIMMIS, K.N.; HOFER, B. Conversion of chlorobiphenyls into phenylhexadienoates and benzoates by the enzymes of the upper pathway for polychlorobiphenyl degradation encoded by the bph locus of *Pseudomonas* sp. strain LB400. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.7, p.2654-2658, 1995.

SEO, Y. S. *et al.* Complete genome sequence of *Burkholderia gladioli* BSR3. **Journal of Bacteriology**. v.193, n.12, p.3149, 2011.

SHAW, L. J.; BURNS, R. G. Biodegradation of 2,4-D in a noncontaminated grassland soil profile. *J. Environ. Qual.* 27, p.1464-1471. 1998.

SHIELDS, M.S. *et al.* a new aromatic degradative plasmid from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* G4. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1352–1356, 1995.

SILVA, T. M. *et al.* Degradation of 2,4-D herbicide by microorganisms isolated from Brazilian contaminated soil. **Journal Microbiology**. v. 38, p. 522-525 , 2007.

SINGH, S.; BHATI, D. P. S. Evaluation of liver protein due to stress under 2,4-D intoxication in *Channa punctatus* (Bloch.) *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, v.53, p. 149–152, 1994.

SOUSA, S. A.; RAMOS, C. G.; LEITÃO, J. H. *Burkholderia cepacia* Complex: Emerging Multihost Pathogens Equipped with a Wide Range of Virulence Factors and Determinants. **International Journal of Microbiology**, v.2011, p.1-9, 2011.

SUGIMOTO, S. *et al.* The proper ratio of GrpE to DnaK is important for protein quality control by the DnaK–DnaJ–GrpE chaperone system and for cell division. **Microbiology**, v. 154, n. 7, p.1876-1885, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.  
TAMURA, K. *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p. 2731- 2739, 2011.

TAUCHERT, E. Degradação de espécies organocloradas por processos avançados envolvendo ferro metálico Curitiba. 2006. 83f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

TAYEB, W. *et al.* Hepatotoxicity induced by sub-acute exposure of rats to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid based herbicide “Désormone lourde”. **Journal of Hazardous Materials**, v. 180, p. 225–233, 2010.

TIEDJE, J. M. *et al.* 2,4-D metabolism: pathway of degradation of chlorocatechols by *Arthrobacter* sp. **Journal Agriculture Food and Chemistry**. v. 17, p. 1021-1026, 1969.

TOLEDO, B. F. B. *et al.* Caracterização de rizóbios indicados para produção de inoculantes por meio de sequenciamento parcial do 16S rRNA. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.4, p.384-391, 2009.

TONINIL, R. M. C. W. *et al.* Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, v.14, n.4, p.1010-1020, 2010.

TOLEDO, B. F. B. **Identificação de estirpes de rizóbios por seqüenciamento parcial dos genes 16S rDNA e nifH**. 127f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2008.

URAKAMI, T. *et al.* Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp. and Description of *Burkholderia vandii* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, n.2, p. 235-245, 1994.

URBANCE, J. W. *et al.* The Biodegradative Strain Database. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n.1, p.152-155, 2003.

VANDAMME, P. A. *et al.* On toxoflavin, the yellow poison of *Pseudomonas cocovenenans*. **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**, v.79, p.255-267, 1960.

VANDAMME, P. *et al.* *Burkholderia bryophila* sp. nov. and *Burkholderia megapolitana* sp. nov., moss-associated species with antifungal and plant-growth-promoting properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.2228–2235, 2007.

VANDAMME, P. *et al.* *Burkholderia cenocepacia* sp. nov. – a new twist to an old story. **Research in Microbiology**, v.154, p.91–96, 2003.

VANDAMME, P. *et al.* *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 25, n.4, p.:507-512, 2002a.

VANDAMME, P. *et al.* *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 25, n.4, p.:507-512, 2002a.

VANDAMME, P. *et al.* Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, n.4, p.1188-1200, 1997.

VANDAMME, P. *et al.* *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound test results of new molecular diagnostic tools. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v.33, p.143–149, 2002b.

VANLAERE, E. *et al.* Matrix-assisted laser desorption-ionisation-time of flight mass spectrometry of intact cells allows rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex. **J. Microbiol. Meth**, v.75, p.279-286, 2008.

VANLAERE, E. *et al.* Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex comprises at least two novel species: *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, v. 59, n.1, p.102-111, 2009.

VIANEZ JÚNIOR, J. L. S. G. **Bioinformática aplicada no desenho de iniciadores para genes funcionais – degradação do herbicida 2,4-D: Um estudo de caso.** 2007. 132f. Dissertação (Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

VIDAL, R. A.; MEROTTO, A. **Herbicidologia.** Porto Alegre - Rio Grande do Sul, 2001.

VIEIRA, E. M.; PRADO, A. G. S.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. Estudo da adsorção/dessorção do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D) em solo na ausência e presença de matéria orgânica. **Química Nova**, v.22, n.3, 1999.

VIEIRA, S. **Introdução à Bioestatística.** 3. ed. Rio de Janeiro: Campus, 2002. 293p

WEISBURG, W. G. *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, n.2, p.697-703, 1991.

WITTKER, R. *et al.* Isolation and characterisation of *Burkholderia norimbergensis* sp. nov., a mildly alkaliphilic sulfur oxidizer. **Syst Appl Microbiol**, v.20, p.549-553. 1997.

YABUUCHI, E. *et al.* Proposal of *Burkholderia* gen nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v.36, p.1251–1275, 1992.

YABUUCHI, E. *et al.* Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen nov. proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v.39, p.897–904, 1995.

YAKUBU, M.B. Biological approach to oil spills remediation in the soil. *African Journal of Biotechnology*, v.6, n. 24, p.2735-2739, 2007.

YOUNG, J. P. W. Phylogeny and taxonomy of rhizobia. **Plant and Soil**, v. 186, p. 45-52, 1996.

ZHANG, J. *et al.* *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** . v.50, p. 743–749. 2000.

ZIMU, L. *et al.* Stress response of *Burkholderia cepacia* WZ1 exposed to quinclorac and the biodegradation of quinclorac. **Soil Biology and Biochemistry**, v.41, n.5, p.984-990, 2009.