UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA
MESTRADO EM FITOTECNIA

GILSIVAN SALES MEDEIROS DE AQUINO

ANÁLISE FILOGENÉTICA E PROTEÔMICA COMPARATIVA DE MICRORGANISMOS DEGRADANTES DO OXIFLUORFENO

MOSSORÓ
2025

GILSIVAN SALES MEDEIROS DE AQUINO

ANÁLISE FILOGENÉTICA E PROTEÔMICA COMPARATIVA DE MICRORGANISMOS DEGRADANTES DO OXIFLUORFENO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitotecnia.

Linha de Pesquisa: Biotecnologia

Orientadora: Profª. Drª. Ioná Santos Araújo Holanda.

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Valadão Silva.

Mossoró

2025

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei n° 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei n° 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

A657a Aquino, Gilsivan Sales Medeiros de.
ANÁLISE FILOGENÉTICA E PROTEÔMICA COMPARATIVA DE MICRORGANISMOS DEGRADANTES DO OXIFLUORFENO / Gilsivan Sales Medeiros de Aquino. - 2025.
81 f. : il.

Orientadora: Drª. Ioná Santos Araújo Holanda.
Coorientador: Dr. Daniel Valadão Silva.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em , 2025.

1. Biorremediação. 2. Sequenciamento de Sanger. 3. Bottom-up. 4. Enzimas biocatalisadoras. I. Holanda, Drª. Ioná Santos Araújo, orient. II. Silva, Dr. Daniel Valadão, co-orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automáto em conformidade com AACR2 e os dados fornecidos pelo) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC´s) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

GILSIVAN SALES MEDEIROS DE AQUINO

ANÁLISE FILOGENÉTICA E PROTEÔMICA COMPARATIVA DE MICRORGANISMOS DEGRADANTES DO OXIFLUORFENO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitotecnia.

Linha de Pesquisa: Biotecnologia

Defendida em: 30/05/2025

BANCA EXAMINADORA

Ioná Santos Araújo Holanda, Profª. Drª. (UFERSA)
Presidente

Andréia Mitsa Paiva Negreiros, Drª. (Externo)
Membro examinador

Carlos Roberto Koscky Paier, Prof°. Dr. (UFC)
Membro examinador

Lais Lacerda Brasil de Oliveira, Ma. (UFC)
Membro exminador

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, que um dia me salvou na cruz do calvário. Porque dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Agradeço à minha mãe, Maria Vanusa da Cruz Sales (in memoriam), que acreditava em mim, a quem me deu todo seu amor, proteção e me tornou hoje o homem que sou; escrevo em lágrimas, pois queria que soubesse a falta que seus braços e colo me fazem.

Agradeço ao meu pai, Gilson Medeiros de Aquino, que sempre esteve ao meu lado, tanto em momentos de felicidade quanto em momentos em que enfrentei tristezas e angústias, e sempre me incentivou a buscar o melhor.

Agradeço à minha amada esposa, Maíla de Morais Medeiros Costa, essa mulher tão meiga, linda, amorosa e sonhadora, que o Senhor colocou ao meu lado, que tem suportado minhas virtudes e defeitos, que tem compartilhado comigo fracassos e vitórias. A ela, minha devoção e meu amor.

Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal; sem vocês, os dias no laboratório não teriam graça. Um grande abraço!

Agradeço ao programa de Pós-graduação em Fitotecnia e a seu corpo docente pela contribuição durante a minha formação no mestrado.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço à Universidade Federal Rural de Semi-Árido – UFERSA, que me proporcionou aprendizados de qualidade, tornando-me um acadêmico e profissional um pouco mais capaz de contribuir com a sociedade.

Agradeço ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC) pela parceria e por ter aberto as portas para que eu pudesse realizar a principal parte dos experimentos deste trabalho.

Agradeço à minha orientadora, Profª. Drª. Ioná Santos Araújo Holanda, que é um exemplo para mim e me confiou este desafio.

Agradeço à banca examinadora, Drª Andréia Mitsa Paiva Negreiros, Ma. Lais Lacerda Brasil de Oliveira e ao Prof. Dr. Carlos Roberto Koscky Paier pela disponibilidade e contribuições.

“Dado após dado, espectro após espectro, a verdade que é enfatizada a cada avanço da Ciência é esta, que grandes são as obras do Senhor.”

Joseph John Thomson

RESUMO

O herbicida oxifluorfeno, pertencente à classe dos difeniléteres, é amplamente empregado em sistemas agrícolas devido à sua eficácia no controle de plantas daninhas. No entanto, seu uso recorrente tem levado ao acúmulo em solos e recursos hídricos, elevando os riscos ecotoxicológicos e ameaçando organismos não-alvo. Frente a essa problemática, a busca por estratégias sustentáveis para eliminar esse composto estranho do ambiente, como a biorremediação microbiana, tem se intensificado. Microrganismos são capazes de metabolizar compostos xenobióticos, transformando-os em subprodutos menos tóxicos ou promovendo sua completa mineralização. Diante desse cenário, este estudo teve como objetivo identificar microrganismos e enzimas envolvidos na degradação desse composto, por meio de sequenciamento e abordagem proteômica *shotgun* por espectrometria de massas de alta resolução. Cinco microrganismos habitantes de solo, anteriormente isolados de campo agrícola com longo histórico de aplicação de oxifluorfeno, foram identificados por meio de sequenciamento dos genes 16S rRNA (bactérias) e ITS/26S rDNA (levedura) como *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus paralicheniformis* e *Moesziomyces aphidis*. As análises filogenéticas confirmaram essas identificações, e as sequências para cada locus V1-V9 e V3-V4 PQ666461, PQ666462 e PQ666463 (*B. licheniformis* ISO 04), PQ665371, PQ665372 e PQ665373 (*B. pumilus* ISO 14), PQ665374, PQ665375 e PQ665376 (*M. luteus* ISO 28), PQ665368, PQ665369 e PQ665370 (*B. paralicheniformis* ISO 31) e PQ666543 e PQ666789 (*M. aphidis* ISO 26) foram depositadas no banco de dados GenBank, respectivamente. Em uma segunda etapa, *B. licheniformis* ISO 04 foi cultivado em meio mínimo líquido com oxifluorfeno nas concentrações de 25 e 50 mg L^{-1} e uma curva de crescimento foi determinada. Para as análises proteômicas, a cepa foi cultivada nas mesmas condições por 32 horas. Em seguida, as proteínas foram extraídas, reduzidas, alquiladas, tripsinizadas e analisadas por LC-MS/MS em sistema UHPLC acoplado ao espectrômetro de massas Q Exactive Plus Orbitrap. Os dados brutos estão disponíveis no ProteomeXchange com o identificador PXD062118. O comportamento de *B. licheniformis* ISO 04 observado na presença do herbicida revelou uma redução na densidade celular proporcional ao aumento da concentração do herbicida. As análises estatísticas e de bioinformática revelaram alterações significativas em vias metabólicas relacionadas ao metabolismo central e energético, à biossíntese de cofatores e aminoácidos, à resposta ao estresse, à manutenção celular, além de funções ribossômicas e de transporte. Duas enzimas destacaram-se por sua expressão exclusiva nos tratamentos com oxifluorfeno: *O-succinilbenzoato sintase* e *α-acetolactato descarboxilase*, sugerindo um papel potencial como biocatalisadoras na degradação do herbicida. Os resultados indicam, ainda, a ativação de rotas metabólicas alternativas como estratégia de adaptação ao estresse químico. Esses achados contribuem para o avanço do conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos na biorremediação de ambientes contaminados por oxifluorfeno.

Palavras-chave: Biorremediação. Sequenciamento de Sanger. Bottom-up. Enzimas biocatalisadoras.

ABSTRACT

The herbicide oxyfluorfen, belonging to the diphenylether class, it is widely used in agricultural systems due to its effectiveness in controlling weeds. Nevertheless, its recurrent use has led to accumulation in soils and water resources, increasing ecotoxicological risks and threatening non-target organisms. Faced to this problem, for sustainable strategies to eliminate this foreign compound from the environment, such as microbial bioremediation, has intensified. Microorganisms can metabolize xenobiotic compounds, transforming them into less toxic by-products or promoting their complete mineralization. Thus, this study aimed to identify microorganisms and enzymes involved in the degradation of this compound through sequencing, and a shotgun proteomic approach using high-resolution mass spectrometry. Five soil-dwelling microorganisms previously isolated from agricultural fields with a long history of oxyfluorfen application were identified by sequencing the 16S rRNA (bacteria) and ITS/26S rDNA (yeast) genes as Bacillus licheniformis, Bacillus pumilus, Micrococcus luteus, Bacillus paralicheniformis, and Moesziomyces aphidis. Phylogenetic analyses confirmed these identifications, and the sequences for each locus V1-V9 and V3-V4, PQ666461, PQ666462, and PQ666463 (B. licheniformis ISO 04), PQ665371, PQ665372, and PQ665373 (B. pumilus ISO 14), PQ665374, PQ665375, and PQ665376 (M. luteus ISO 28), PQ665368, PQ665369, and PQ665370 (B. paralicheniformis ISO 31), and PQ666543 and PQ666789 (M. aphidis ISO 26) were deposited in the GenBank database, respectively. In a second step, B. licheniformis ISO 04 was grown in minimal liquid medium with oxyfluorfen at concentrations of 25 and 50 mg L^{-1} and a growth curve was determined. For proteomic analyses, the strain was grown under the same conditions for 32 hours. The proteins were then extracted, reduced, alkylated, trypsinized, and analyzed by LC-MS/MS in a UHPLC system coupled to a Q Exactive Plus Orbitrap mass spectrometer. The raw data are available at ProteomeXchange with the identifier PXD062118. The behavior of B. licheniformis ISO 04 observed in the presence of the herbicide revealed a reduction in cell density proportional to the increase in herbicide concentration. The statistical and bioinformatics analyses revealed significant changes in metabolic pathways related to central and energy metabolism, cofactor and amino acid biosynthesis, stress response, cell maintenance, as well as ribosomal and transport functions. Two enzymes stood out for their exclusive expression in oxyfluorfen treatments: O-succinylbenzoate synthase and α-acetolactate decarboxylase, suggesting a potential role as biocatalysts in herbicide degradation. The results indicate the activation of alternative metabolic pathways as a strategy for adaptation to chemical stress. These findings contribute to the advancement of knowledge about the molecular mechanisms involved in the bioremediation of environments contaminated with oxyfluorfen.

Keywords: Bioremediation. Sanger sequencing. Bottom-up. Biocatalytic enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do oxifluorfeno. Fonte: Google imagens.....16

CAPÍTULO I

Figura 1. Amplificação por PCR do gene 16S rRNA das cepas bacterianas, ITS e a região do domínio D1/D2 da sequência 26S rDNA da cepa de levedura. Faixas: 04: ISO 04; 14: ISO 14; 28: ISO 28; 31: ISO 31; 26: ISO 26 e M: Marcador DNA Ladder de 100 pb. Números inscritos no topo indicam os respectivos *primers* universais utilizados para a PCR.....28

Figura 2. Árvore filogenética concatenada, construída por meio do método Neighbor-Joining obtida através das sequências da região 16S rRNA dos quatro isolados bacterianos, usando o programa MEGAX (v.10.2.6) e renderizando no programa R (v.4.3.2). Os valores de Bootstrap são indicados nos nós de ramificação. As cepas estão representadas por caixas de cores distintas.....31

Figura 3. Árvore filogenética concatenada, construída por meio do método Neighbor-Joining obtida através das sequências das regiões ITS e domínio D1/D2 26S rDNA do isolado de levedura ISO 26, usando o programa MEGAX (v.10.2.6) e renderizando no programa R (v.4.3.2). Os valores de Bootstrap são indicados nos nós de ramificação. A cepa está representada por caixa de cor azul.....33

CAPÍTULO II

Figura 1. Perfil de crescimento do *B. licheniformis* ISO 04, controle e tratamentos (Goal 25 mg/L e 50 mg/L) durante 40 h. Os valores são médias das absorbâncias e as barras corresponde ao Erro Padrão de três réplicas. Círculo preenchido (Meio nutriente e herbicida ausente), quadrado preenchido (25 mg/L de Goal) e triangulo preenchido (50 mg/L de Goal). $O.D._{600\ nm}$ = densidade ótica a 600 nanômetros.....52

Figura 2. Diagrama de Venn mostrando as proteínas compartilhadas e exclusivas dos grupos controle e tratamentos (25 mg/L e 50 mg/L de oxifluorfeno).....53

Figura 3. Alterações induzidas por concentrações de 25 e 50 mg/L de oxifluorfeno no perfil proteômico de *B. licheniformis* ISO 04. Os gráficos de *volcano plot* de todas as proteínas identificadas (a) e (c) e as representações gráficas das quantidades de proteínas diferencialmente expressas (DAPs) aumentadas, reduzidas e exclusivas (b) e (d). As manchas representam a variação relativa (log_2 fold change) de proteínas identificadas em função de significância estatística ($-log_{10}$ teste T). Manchas em amarelo representam proteínas aumentadas e proteínas exclusivas, enquanto manchas em roxo representam proteínas reduzidas e proteínas exclusivas. Proteínas discrepantes reduzidas foram representadas por manchas azul escuro, enquanto proteínas discrepantes aumentadas foram representadas por manchas laranja (a). Manchas em azul claro representam proteínas aumentadas e proteínas exclusivas, enquanto manchas em vermelho representam proteínas reduzidas e proteínas exclusivas. Proteínas discrepantes reduzidas foram representadas por manchas rosa (c).....54

Figura 4. Análise de Componentes Principais da abundância de proteínas que diferenciam entre o grupo controle e os grupos tratamentos (25 mg/L e 50 mg/L de oxifluorfeno).....56

Figura 5. Análise de *Gene ontology* (GO) quanto ao Componente Celular de proteínas expressas de forma diferente e exclusivas de *B. licheniformis* ISO 04 no processo catabólico do oxifluorfeno em concentrações de 25 e 50 mg L^{-1}, expresso em porcentagem. Proteínas

sobrepostas entre o grupo controle e o grupo tratado com 25 mg L^{-1} (a). Grupo controle e o grupo tratado com 50 mg L^{-1} (b). Grupo tratado com 25 mg L^{-1} e o grupo tratado com 50 mg L^{-1} (c). Proteínas exclusivas do grupo tratado com 25 mg L^{-1} (d).....60

Figura 6. Análise de *Gene ontology* (GO) quanto a Função Molecular de proteínas expressas de forma diferente e exclusivas de *B. licheniformis* ISO 04 no processo catabólico do oxifluorfeno em concentrações de 25 e 50 mg L^{-1}, expresso em porcentagem. Proteínas sobrepostas entre o grupo controle e o grupo tratado com 25 mg L^{-1} (a). Grupo controle e o grupo tratado com 50 mg L^{-1} (b). Grupo tratado com 25 mg L^{-1} e o grupo tratado com 50 mg L^{-1} (c). Proteínas exclusivas do grupo tratado com 25 mg L^{-1} (d).....61

Figura 7. Análise de *Gene ontology* (GO) quanto ao Processo Biológico de proteínas expressas de forma diferente e exclusivas de *B. licheniformis* ISO 04 no processo catabólico do oxifluorfeno em concentrações de 25 e 50 mg L^{-1}, expresso em porcentagem. Proteínas sobrepostas entre o grupo controle e o grupo tratado com 25 mg L^{-1} (a). Grupo controle e o grupo tratado com 50 mg L^{-1} (b). Grupo tratado com 25 mg L^{-1} e o grupo tratado com 50 mg L^{-1} (c). Proteínas exclusivas do grupo tratado com 25 mg L^{-1} (d).....62

Figura 8. Análise de enriquecimento de vias (KEGG) de proteínas diferencialmente expressas no processo de degradação do oxifluorfeno em concentrações de 25 e 50 mg/L por *B. licheniformis* ISO 04.....63

Figura 9. Análise de enriquecimento de vias (KEGG) de proteínas exclusivas no processo de degradação do oxifluorfeno em concentrações de 25 e 50 mg/L por *B. licheniformis* ISO 04.....64

Figura 10. Rede de interação proteína-proteína entre DAPs e exclusivas identificadas em células de *B. licheniformis* ISO 04 após 32 h de cultivo com 25 mg L^{-1} de oxifluorfeno em comparação a cultivo sem o herbicida.....66

Figura 11. Rede de interação proteína-proteína entre DAPs e exclusivas identificadas em células de *B. licheniformis* ISO 04 após 32 h de cultivo com 50 mg L^{-1} de oxifluorfeno em comparação a cultivo sem o herbicida.....67

Figura 12. Ilustração esquemática das principais respostas de *B. licheniformis* ISO 04 ao oxifluorfeno. Os símbolos em azul e vermelho representam proteínas classificadas como suprarreguladas e infrarreguladas, respectivamente. Os símbolos amarelo, verde, lilás e marrom representam proteínas exclusivas. A molécula do herbicida é representada por esferas vermelhas.....72

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Genes utilizados para amplificação via PCR e suas respectivas sequências.....26

Tabela 2. Identidade das sequências parciais (%) do gene 16S rRNA das cepas tolerantes/degradantes do oxifluorfeno, obtidos de amostras de solo.....29

Tabela 3. Identidade das sequências parciais (%) dos genes ITS e D1/D2 26S rDNA da cepa de levedura tolerante/degradante do oxifluorfeno, obtido de amostras de solo.....34

APÊNDICES

Apêndice I. Sequências referência e das cepas bacterianas 16S rRNA utilizadas na construção da árvore filogenética……...……...……..80

Apêndice II. Sequências referência e da cepa de levedura das regiões ITS e 26S rDNA utilizadas na construção da árvore filogenética……....81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCR	Polymerase chain reaction
DNA	Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
ITS	Internal Transcribed Spacer
16S rRNA	16S ribosomal RNA
MS	Mass spectrometry
LSU	Large subunit ribosomal ribonucleic acid
NA	Nutrient agar
BOD	Biochemical Oxygen Demand
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
TBE	Tris - Boric acid – EDTA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
BLAST	Basic Local Alignment Tool
pb	Base pairs
UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography
LC-MS/MS	Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry
PPO	Protoporfirinogênio oxidase
MudPIT	Multi-dimensional Protein Identification Technology
NaCl	Sodium chloride
D.O.	Optical density
°C	Degrees Celsius
DTT	Dithiothreitol
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
W	Watts
RPM	Revolutions per minute
kDa	kilo Dalton
FASP	Filter aided sample preparation
DDA	Data dependent acquisition
m/z	mass/load
HCD	Higher-energy Collisional Dissociation
AGC	Automatic predictive gain control
PSM	Peptide Spectrum Matching
XIC	Extract Ion Chromatogram
FDR	False Discovery Rate
GO	Gene Ontology
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
PCA	Principal component analysis
PPI	Protein-protein interaction network
DAPs	Differentially accumulated proteins

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL **15**
REFERÊNCIAS **19**
CAPÍTULO I: ANÁLISE FILOGENÉTICA DE MICRORGANISMOS DEGRADANTES DO OXIFLUORFENO **22**
1 INTRODUÇÃO **23**
2 MATERIAL E MÉTODOS **25**
2.1 Extração de DNA bacteriano e de levedura 25
2.2 Amplificação das sequências via PCR 25
2.3 Sequenciamento de DNA 27
2.4 Análises filogenéticas 27
3 RESULTADOS **28**
3.1 Identificação das cepas bacterianas ISO 04, 14, 28 e 31 28
3.2 Identificação da levedura ISO 26 32
4 DISCUSSÃO **35**
5 CONCLUSÃO **38**
REFERÊNCIAS **39**
CAPÍTULO II: ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DE *Bacillus licheniformis* ISO 04 REVELAM ENZIMAS BIOCATALÍTICAS DE OXIFLUORFENO **44**
1 INTRODUÇÃO **45**
2 MATERIAL E MÉTODOS **47**
2.1 Cultivo microbiano e curva de crescimento 47
2.2 Extração de proteínas 47
2.3 Digestão de proteínas 48
2.4 Análises LC-MS/MS 49
2.5 Análises estatística 50
2.6 Análise de bioinformática de proteínas diferencialmente expressas e exclusivas 50
3 RESULTADOS **51**
3.1 Efeito do herbicida oxifluorfeno na taxa de crescimento de *B. licheniformis* 51
3.2 Indução de alterações no perfil proteômico de *B. licheniformis* por oxifluorfeno 52
3.3 Principais grupos de proteínas regulados em *B. licheniformis* em resposta ao oxifluorfeno 56
3.3.1 Metabolismo central e energético 56

3.3.2 Resposta ao estresse e manutenção celular 57
3.3.3 Biossíntese de cofatores e aminoácidos 58
3.3.4 Funções relacionadas a ribossomos e tradução 58
3.3.5 Transporte 59
3.4 Análise GO de proteínas diferencialmente expressas e exclusivas de *B. licheniformis* na degradação de oxifluorfeno 59
3.5 Análise de enriquecimento das vias metabólicas de proteínas diferencialmente expressas e exclusivas no processo de biodegradação do oxifluorfeno por *B. licheniformis* 63
3.6 Rede de interação proteína-proteína sobre vias-chave na degradação de oxifluorfeno por *B. licheniformis* 64
4 DISCUSSÃO 68
5 CONCLUSÃO 73
REFERÊNCIAS 74
APÊNDICES 80

INTRODUÇÃO GERAL

A presença de plantas daninhas em áreas agrícolas de produção comercial representa um risco à produtividade. Sem o devido controle, as atividades agrícolas podem sofrer danos severos, levando a perdas significativas de rendimento, tornando as colheitas inviáveis. A utilização de herbicidas é uma forma simples e econômica de controlar plantas daninhas, e os métodos de implementação nas culturas são fáceis e eficazes, o que acarretou na intensificação do seu uso em áreas agrícolas, florestais e de pastagens no Brasil (Procópio *et al.*, 2024; Barros *et al.*, 2021).

Todavia, a utilização exacerbada desses defensivos agrícolas representa riscos ao bem-estar humano e ambiental, devido à capacidade desses compostos de permanecerem biodisponíveis e persistirem na natureza. Quando aplicado no solo, o herbicida é altamente adsorvido pelos coloides do solo, porém, devido às características físico-químicas da molécula e do ambiente, o agrotóxico pode persistir por meses e até anos no solo. Também pode ocorrer lixiviação dos resíduos, resultando em acúmulo em corpos hídricos, tanto superficiais quanto subterrâneos. A maior problemática é a eventual geração de danos em organismos não-alvo, como a microbiota nativa, a fauna e a flora, visto que são substâncias genotóxicas e carcinogênicas (Filimon *et al.*, 2021; Parven *et al.*, 2025).

O oxifluorfeno ($C_{15}H_{11}ClF_3NO_4$) (2-cloro-1-(3-etoxi-4-nitrofenoxi)-4-(trifluorometil)benzeno), por exemplo, é um herbicida éter difenílico utilizado em culturas de arroz irrigado, café, citros, soja e pinus. É aplicado nas fases de pré e pós-emergência, devido ao seu amplo espectro no controle de plantas invasoras no campo. Em razão de suas inúmeras características físico-químicas, como alta solubilidade em água, baixa pressão de vapor e biodegradação muito baixa, esse composto já foi relatado afetando negativamente o sistema nervoso, endócrino e imunológico de animais aquáticos e terrestres, além de influenciar na formação óssea de recém-nascidos e possuir comportamento carcinogênico (Figura 1) (Ibrah Filimon *et al.*, 2021; Mansour *et al.*, 2023).

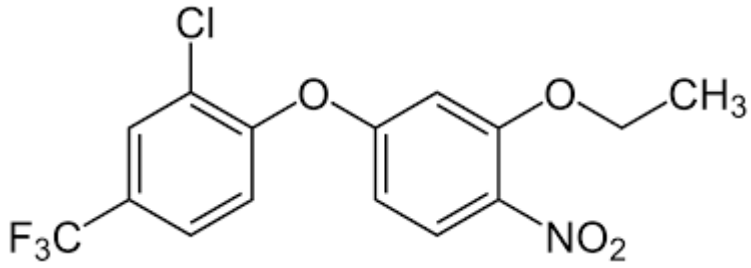


Figura 1. Estrutura química do oxifluorfeno. Fonte: Google imagens.

Portanto, existe uma urgência em explorar métodos eficientes para a remoção parcial ou completa dos resíduos de herbicidas do meio ambiente. Entre as variadas ferramentas que podem ser empregadas na degradação desses compostos, o catabolismo bacteriano e de leveduras tem se mostrado um dos mais eficiente, além de ser ecologicamente correto e sustentável (Chen *et al*., 2023; Wang *et al*., 2023; Mousa; Hassan, 2025).

As bactérias e leveduras exercem um papel essencial nos processos de biorremediação de ambientes poluídos. Esses microrganismos apresentam elevada capacidade de adaptação e colonização em distintos ecossistemas, inclusive em condições ambientais adversas, o que favorece sua ampla utilização com diversas finalidades. Estudos científicos têm evidenciado a eficácia desses agentes na biodegradação de moléculas herbicidas, convertendo-as em subprodutos de menor toxicidade, além de possibilitarem, em alguns casos, sua completa mineralização (Shang *et al*., 2022; Zhong *et al*., 2023).

Espécies como *Bacillus licheniformis* são capazes de produzir enzimas como lipases, que atuam como biocatalisadoras na degradação do herbicida éster butílico 2,4-D (Zhao *et al*., 2021), além de hidrolases e dioxigenases responsáveis pela catálise do clorprofame (Pujar *et al*., 2018). Essa espécie também já foi relatada na degradação do diuron (Singh; Singla, 2019). Já *Bacillus pumilus* tem demonstrado capacidade de mineralizar compostos como isoproturon (Giri *et al*., 2017) e mesotriona (Liu *et al*., 2015). Além disso, *Micrococcus luteus* tem sido associado à remoção de diversos herbicidas, incluindo 3,5,6-tricloro-2-piridinol (Yue *et al*., 2023), alacloro (Pathak *et al*., 2016), diuron (Egea *et al*., 2017) e oxifluorfeno (Yao *et al*., 2025).

Reginaldo (2023) anteriormente, isolou de um campo agrícola quatro cepas bacterianas e uma de levedura capazes de degradar o oxifluorfeno num período de 196 horas *in vitro:* três do gênero *Bacillus* (ISO 04, 14 e 31) e uma do gênero *Micrococcus* (ISO 28) e a levedura ISO 26, responsáveis por remover 69%, 69%, 73%, 80% e 77% do herbicida, respectivamente. No entanto, a identificação desses microrganismos foi realizada de modo convencional, por

métodos morfológicos e bioquímicos, sendo necessária a utilização de ferramentas mais robustas, que pudessem informar a espécie de cada cepa isolada.

A identificação molecular é uma ferramenta biotecnológica eficaz e precisa, que permite, a partir da utilização de genes-alvo altamente conservados, identificar microrganismos em nível de espécie. Técnicas como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), associada ao sequenciamento de DNA, nos permitem conhecer a sequência das bases de regiões importantes, como o RNA ribossômico e o Espaçador Transcrito Interno (ITS), que servem para a elucidação de árvores filogenéticas (Caldart *et al*., 2016; Jan-Roblero; Cruz-Maya; Cancino-Diaz, 2024; Gultom *et al*., 2025).

O gene 16S rRNA é amplamente empregado na identificação/filogenia de bactérias há décadas. Devido às suas múltiplas regiões conservadas, também conhecidas como hipervariáveis, esse gene é um marcador universal de organismos procariotos, além do seu comprimento ser ideal para tecnologias de sequenciamento (Hassler *et al*., 2022; Bartoš; Chmel; Swierczková, 2024). Já os genes ITS e LSU (Subunidade Grande) como o domínio D1/D2 do 26S rDNA, são os códigos de barras mais utilizados na taxonomia e delimitação de espécies de fungos e leveduras, uma vez que, essas regiões possuem mínimas variações intraespécie e suas cópias estão distribuídas ao longo do genoma (Ghobad-Nejhad *et al*., 2023; Doman; Makrai; Bányai, 2022; Sipiczki, 2022).

Como mencionado anteriormente, a produção de enzimas microbianas é crucial na remoção parcial ou completa de resíduos agroquímicos do ambiente. As hidrolases, amidases, redutases, oxidases, esterases e oxigenases são peças-chave que agem na desalquilação, remoção, transformação de grupamentos químicos e abertura de anéis aromáticos (Chen *et al*., 2023; Zheng *et al*., 2024). Uma vez conhecidas as espécies que estão envolvidas nesse processo, é de suma importância investigar os processos moleculares através de abordagens ômicas, que permitirão identificar de forma precisa essas enzimas.

A proteômica é uma área de pesquisa integrada que se concentra na premissa de identificação e quantificação em larga escala de proteínas constituintes de células ou tecidos. A partir da combinação da experimentação e análise de dados proteômicos, é possível compreender a composição das proteínas, estrutura, expressão e modificações pós-traducionais (PTMs), gerando uma gama de informações acerca das interações entre proteínas, que participam de redes e sistemas moleculares complexos que se comunicam entre si, regulando

as atividades essenciais da vida daquele organismo (Cui; Cheng; Zhang, 2022; Shuken, 2023; Balotf *et al*., 2022).

A alta sensibilidade e especificidade alcançáveis pela Espectrometria de Massa (MS) a tornam imprescindível na bioprospecção de enzimas microbianas biocatalisadoras de herbicidas. A abordagem também permite uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na degradação do oxifluorfeno, por exemplo (Birhanu, 2023; Ahrens *et al*., 2022).

Portanto, a identificação molecular de microrganismos isolados de solo com longo histórico de aplicação de oxifluorfeno é essencial para o apontamento dos agentes nativos tolerantes ao herbicida, sejam bactérias ou leveduras. Concomitantemente, a bioprospecção de enzimas biocatalisadoras desse herbicida éter difenílico, utilizando abordagens proteômicas, é crucial para a compreensão dos mecanismos moleculares empregados em sua degradação. Também permite selecionar as melhores espécies candidatas a biorremediadoras de ambientes contaminados por herbicidas, proporcionando o desenvolvimento de biotecnologias promissoras e sustentáveis na recuperação de ecossistemas poluídos.

Dessa forma, este trabalho teve como principais objetivos: I) identificar por meio de sequenciamento de DNA, quatro espécies de bactérias e uma de levedura com potencial para degradar o oxifluorfeno; II) identificar enzimas biocatalisadoras envolvidas na degradação desse composto, produzidas pela cepa *Bacillus licheniformis* ISO 04.

REFERÊNCIAS

AHRENS, Christian H. *et al*. A practical guide to small protein discovery and characterization using mass spectrometry. **Journal of Bacteriology**, v. 204, n. 1, p. e00353-21, 2022.

BALOTF, Sadegh *et al*. Shotgun proteomics as a powerful tool for the study of the proteomes of plants, their pathogens, and plant–pathogen interactions. **Proteomes**, v. 10, n. 1, p. 5, 2022.

BARROS, Vanessa Maria *et al*. Herbicides of biological origin: A review. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 96, n. 3, p. 288-296, 2021.

BARTOŠ, Oldřich; CHMEL, Martin; SWIERCZKOVÁ, Iva. The overlooked evolutionary dynamics of 16S rRNA revises its role as the "gold standard" for bacterial species identification. **Scientific reports**, v. 14, n. 1, p. 9067, 2024.

BIRHANU, Alemayehu Godana. Mass spectrometry-based proteomics as an emerging tool in clinical laboratories. **Clinical proteomics**, v. 20, n. 1, p. 32, 2023.

CALDART, Eloiza Teles *et al*. Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1-20, 2016.

CHEN, Shao-Fang *et al*. Insights into the metabolic pathways and biodegradation mechanisms of chloroacetamide herbicides. **Environmental Research**, v. 229, p. 115918, 2023.

CUI, Miao; CHENG, Chao; ZHANG, Lanjing. High-throughput proteomics: a methodological mini-review. **Laboratory investigation**, v. 102, n. 11, p. 1170-1181, 2022.

DOMAN, Marianna; MAKRAI, Laszlo; BÁNYAI, Krisztián. Molecular phylogenetic analysis of *Candida krusei*. **Mycopathologia**, v. 187, n. 4, p. 333-343, 2022.

EGEA, Tassia C. *et al*. Diuron degradation by bacteria from soil of sugarcane crops. **Heliyon**, v. 3, n. 12, 2017.

FILIMON, Marioara Nicoleta *et al*. Impact of the herbicide oxyfluorfen on the activities of some enzymes found in soil and on the populations of soil microorganisms. **Agronomy**, v. 11, n. 9, p. 1702, 2021.

GIRI, Krishna *et al*. Biodegradation of isoproturon by *Bacillus pumilus* K1 isolated from foothill agroecosystem of North West Himalaya. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 87, p. 839-848, 2017.

GHOBAD-NEJHAD, Masoomeh *et al*. Basidiomycete fungi: From biosystematics and biodiversity to biotechnology. **Frontiers in microbiology**, v. 14, p. 1128319, 2023.

GULTOM, Endang Sulistyarini *et al*. Molecular identification using 16S rRNA gene to identify bacteria symbiont-*Agelas* sp. sponge with antibacterial activity. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, p. e11840-e11840, 2025.

HASSLER, Hayley B. *et al*. Phylogenies of the 16S rRNA gene and its hypervariable regions lack concordance with core genome phylogenies. **Microbiome**, v. 10, n. 1, p. 104, 2022.

IBRAHIM, Amina Mohamed; SAYED, Dawlat A. Toxicological impact of oxyfluorfen 24% herbicide on the reproductive system, antioxidant enzymes, and endocrine disruption of Biomphalaria alexandrina (Ehrenberg, 1831) snails. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 8, p. 7960-7968, 2019.

JAN-ROBLERO, Janet; CRUZ-MAYA, Juan A.; CANCINO-DIAZ, Juan C. Novel Molecular Techniques for Identifying Agricultural Microorganisms. **Agriculture**, v. 14, n. 7, p. 987, 2024.

LIU, Jie *et al*. Sugarcane bagasse as support for immobilization of *Bacillus pumilus* HZ-2 and its use in bioremediation of mesotrione-contaminated soils. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, p. 10839-10851, 2015.

MANSOUR, Abdallah Tageldein *et al*. Exposure to oxyfluorfen-induced hematobiochemical alterations, oxidative stress, genotoxicity, and disruption of sex hormones in male African catfish and the potential to confront by *Chlorella vulgaris*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 267, p. 109583, 2023.

MOUSA, Nibal; HASSAN, Maysoon Abdul. Biodegradation of Glyphosate by Four Plant Growth Promoting Bacteria (4PGPB). **Pollution**, v. 11, n. 1, p. 15-22, 2025.

PARVEN, A. *et al*. Herbicides in modern sustainable agriculture: Environmental fate, ecological implications, and human health concerns. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 22, n. 2, p. 1181-1202, 2025.

PATHAK, Ashish *et al*. Whole genome sequence analysis of an Alachlor and Endosulfan degrading *Micrococcus* sp. strain 2385 isolated from Ochlockonee River, Florida. **Journal of genomics**, v. 4, p. 42, 2016.

PROCÓPIO, Sergio de Oliveira *et al*. Impacts of Weed Resistance to Glyphosate on Herbicide Commercialization in Brazil. **Agriculture**, v. 14, n. 12, p. 2315, 2024.

PUJAR, Namadev K. *et al*. Biodegradation of chlorpropham and its major products by *Bacillus licheniformis* NKC-1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 1-11, 2018.

REGINALDO, L. T. R. T. **Seleção de isolados microbianos para degradação de oxyfluorfen no solo**. 2023. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, p. 63. 2023.

SHANG, Na *et al*. Biodegradation of diphenyl ether herbicide lactofen by *Bacillus* sp. YS-1 and characterization of two initial degrading esterases. **Science of the Total Environment**, v. 806, p. 151357, 2022.

SHUKEN, Steven R. An introduction to mass spectrometry-based proteomics. **Journal of proteome research**, v. 22, n. 7, p. 2151-2171, 2023.

SINGH, Anil Kumar; SINGLA, Poonam. Biodegradation of diuron by endophytic *Bacillus licheniformis* strain SDS12 and its application in reducing diuron toxicity for green algae. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 26972-26981, 2019.

SIPICZKI, Matthias. When barcoding fails: Genome chimerization (admixing) and reticulation obscure phylogenetic and taxonomic relationships. **Molecular ecology resources**, v. 22, n. 5, p. 1762-1785, 2022.

WANG, Yu *et al*. Complete biodegradation of the oldest organic herbicide 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid by engineering *Escherichia coli*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 451, p. 131099, 2023.

YAO, Li *et al*. Metabolism of oxyfluorfen by actinobacteria *Micrococcus* sp. F3Y. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, p. 1599015, 2025.

YUE, Caixu *et al*. Identification of two possible metabolic pathways responsible for the biodegradation of 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol in *Micrococcus luteus* ML. **Biodegradation**, v. 34, n. 4, p. 371-381, 2023.

ZHAO, Junxin *et al*. Characterization of a novel lipase from *Bacillus licheniformis* NCU CS-5 for applications in detergent industry and biodegradation of 2, 4-D butyl ester. **International journal of biological macromolecules**, v. 176, p. 126-136, 2021.

ZHENG, Mingna *et al*. Enzymatic Degradation toward Herbicides: The Case of the Sulfonylureas. **Environmental Science & Technology**, v. 58, n. 45, p. 20049-20059, 2024.

ZHONG, Jianfeng *et al*. Current insights into the microbial degradation of nicosulfuron: Strains, metabolic pathways, and molecular mechanisms. **Chemosphere**, v. 326, p. 138390, 2023.

CAPÍTULO I

ANÁLISE FILOGENÉTICA DE MICRORGANISMOS DEGRADANTES DO OXIFLUORFENO

RESUMO

A utilização excessiva do oxifluorfeno tem acarretado seu acúmulo no solo e em corpos hídricos, afetando organismos não-alvo. Os microrganismos, consequentemente, são responsáveis por promover a mineralização de moléculas de herbicidas através de vias metabólicas formadas por diversas enzimas. A identificação desses microrganismos a partir de ferramentas moleculares é fundamental para compreender quais espécies estão envolvidas em processos de biorremediação, principalmente de ambientes com histórico recorrente de aplicação de herbicidas. Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi identificar espécies de bactérias e leveduras com potencial para degradar o herbicida oxifluorfeno por meio de técnicas moleculares. O experimento foi conduzido em laboratório, onde quatro cepas bacterianas (ISO 04, 14, 28 e 31) e uma de levedura (ISO 26) foram plaqueadas em meio *Nutrient Agar* (NA). O DNA de cada cepa foi extraído de acordo com o protocolo do kit de extração Wizard® (Promega®, Madison/USA), sendo posteriormente submetido à amplificação por PCR de três *loci* da região 16S rRNA (RNA ribossômico 16S) (V1-V9 e V3-V4) de bactérias, das regiões ITS (Espaçador Transcrito Interno) de levedura e de 26S rDNA (DNA ribossomal de subunidade grande - LSU), para posterior sequenciamento e identificação em nível de espécie. Árvores filogenéticas foram construídas usando o Método Neighbor-Joining, enquanto as distâncias genéticas foram calculadas utilizando o modelo de três parâmetros de Tamura para bactérias e o modelo da distância proporcional para a levedura. Com as sequências concatenadas, dos *loci* V1-V9 com V3-V4 para bactérias e dos genes ITS com 26S rDNA para a levedura no software MEGAX (versão 10.2.6), com 1000 simulações de Bootstrap, foi possível agrupar as cepas 04, 14, 26, 28 e 31 nos clados correspondentes à *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Moesziomyces aphidis*, *Micrococcus luteus* e *Bacillus paralicheniformis*, respectivamente. Por fim, todas as sequências foram depositadas no GenBank. Os resultados aqui demonstrados, apontam cinco espécies de microrganismos habitantes do solo degradantes do oxifluorfeno, que ainda não tinham sido relatadas anteriormente, podendo ser possíveis candidatos para o desenvolvimento de biotecnologias ambientais, voltadas à biorremediação.

Palavras-chave: Biodegradação. Éter difenílico. Filogenia.

1 INTRODUÇÃO

A presença de plantas daninhas em áreas agrícolas de produção comercial representa um risco à produtividade da cultura principal no campo, devido à ocorrência em todas as áreas da plantação, competição por recursos e liberação de substâncias alelopáticas no solo (Memon *et al*., 2025). Controlar a infestação dessas plantas acaba tornando-se um desafio, a fim de garantir o crescimento saudável das colheitas, melhorando o rendimento e a qualidade do produto. O uso de herbicidas, por sua vez, é o método de manejo mais empregado e eficaz quando se trata de efeitos práticos na plantação e de custo-benefício para a indústria ou o agricultor (Zhang *et al*., 2025; Ye *et al*., 2025).

O Brasil, atualmente, se encontra entre os maiores consumidores de agrotóxicos do mundo, com os herbicidas representando mais de 50% dos produtos vendidos (Pacheco *et al*., 2022). No entanto, devido ao seu uso extensivo, mesmo que em baixas dosagens, os herbicidas são adsorvidos pelo solo ou lixiviados para corpos hídricos, causando um estresse substancial no ambiente e afetando espécies não-alvo, que vão desde plantas e animais nativos até a microbiota do solo, o que resulta em perturbações ecológicas (Tang & Maggi, 2021; Bamal *et al*., 2024).

O oxifluorfeno (2-cloro-1-(3-etoxi-4-nitrofenoxi)-4-(trifluorometil)benzeno), por sua vez, é um herbicida éter difenílico classificado como um peroxidante dependente de luz, largamente empregado no controle de plantas daninhas de folhas largas e gramíneas em diversas culturas, como arroz, café, cana-de-açúcar, cebola, citros, eucalipto e pinus. Este agente é responsável por causar diversos problemas em virtude de suas características químicas. Sua capacidade de persistir no ambiente pode afetar o sistema nervoso, endócrino e imunológico de animais aquáticos e terrestres, influenciando na formação óssea de recém-nascidos, além de promover a carcinogênese (Huang *et al*., 2022; Tejada *et al*., 2022).

Tendo em vista tais problemáticas, o uso de microrganismos para a degradação ou redução do herbicida no ambiente é considerado um método ambientalmente sustentável e ecologicamente vantajoso, uma aplicação mais conhecida como biorremediação (Chen *et al*., 2024). Espécies como *Bacillus licheniformis* já foram avaliadas na mineralização de herbicidas como diuron, clorprofam e 2,4-diclorofenol (Singh; Singla, 2019; Pujar *et al*., 2018; Felshia *et al*., 2020). *Bacillus pumilus* também possui capacidade semelhante na remoção de hexazinona (Santos *et al*., 2021), mesotriona (Liu *et al*., 2015) e isoproturon (Giri *et al*., 2017).

Além desses, poucas espécies de leveduras são relatadas na degradação de herbicidas, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* e *Debaryomyces hansenii* na remoção de fluazifop-P-butil (Szpyrka *et al*., 2024). Stoyanova *et al*. (2023) também demonstraram duas espécies, *Trichosporon cutaneum* e *Candida tropicalis*, agindo na biodegradação do glifosato.

Nesse contexto, Reginaldo (2023) conseguiu isolar quatro bactérias e uma levedura capazes de degradar o oxifluorfeno, provenientes de solo agrícola com histórico de aplicação do referido agrotóxico, aplicando técnicas de caracterização morfológica e bioquímica, com o objetivo de identificar os microrganismos em nível de gênero.

A identificação preliminar de bactérias e leveduras é realizada a partir de métodos que se baseiam em características fenotípicas e bioquímicas, como a utilização de meios seletivos, a avaliação de colônias (cor, tamanho, formato e superfície), morfologia celular, dentre outros ensaios. No entanto, esses métodos possuem algumas limitações, como identificar de forma precisa microrganismos em nível de espécie (Jan-Roblero; Cruz-Maya; Cancino-Diaz, 2024; Gultom *et al*., 2025).

A aplicação de técnicas moleculares, por outro lado, permite realizar a identificação de bactérias e leveduras de forma precisa, devido à detecção de genes-alvo altamente conservados nesses organismos. Por exemplo, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) associada ao sequenciamento de DNA torna possível conhecer a sequência das bases que formam as regiões "códigos de barras", podendo ser genes do tipo RNA ribossômico ou Espaçador Transcrito Interno (ITS). Tais análises, consequentemente, possibilitam a estimativa de árvores filogenéticas, onde são organizadas as espécies estudadas e seu parentesco (Caldart *et al*., 2016; Jan-Roblero; Cruz-Maya; Cancino-Diaz, 2024; Gultom *et al*., 2025).

Portanto, este estudo teve como objetivo identificar, por meio de sequenciamento e análise filogenética, quatro espécies de bactérias e uma de levedura responsáveis por degradar o herbicida oxifluorfeno.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Extração de DNA bacteriano e de levedura

Quatro cepas bacterianas (ISO 04, 14, 28 e 31) e uma de levedura (ISO 26) foram selecionadas anteriormente devido à maior capacidade de degradação do oxifluorfeno, tanto *in vitro* quanto no solo. Além de serem provenientes de campo agrícola com histórico de aplicação recorrente desse herbicida, foram caracterizadas por métodos bioquímicos e morfológicos (Reginaldo, 2023). Contudo, fez-se necessário realizar a identificação das espécies por meio de sequenciamento.

O experimento foi conduzido no laboratório de Fitopatologia I, na Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, *campus* Mossoró. Os microrganismos foram cedidos da coleção de microrganismos do referido laboratório. As cepas foram cultivadas em meio Nutriente Ágar (NA) sólido, em placas de Petri (Reginaldo, 2023). As placas foram mantidas em estufa incubadora do tipo BOD (Biochemical Oxygen Demand), a 30 ± 2 °C, por 24 horas.

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo do kit de extração Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega®, Madison/USA), no laboratório de Biotecnologia Vegetal, com modificações. Colônias puras foram maceradas com nitrogênio líquido em microtubos, com o auxílio de um bastão de vidro, para o rompimento das células bacterianas e de levedura. A qualidade e quantidade do DNA extraído foram verificadas por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo.

2.2 Amplificação das sequências via PCR

A amplificação de três *loci* do gene 16S rRNA por PCR foi realizada utilizando *primers* universais para bactérias 27F/1492R região V1-V9 (Lachnit *et al*., 2011); 341F/518R região V3-V4 (Suriya *et al*., 2017); 338F/806R região V3-V4 (Wei *et al*., 2018), com fragmentos esperados de aproximadamente 1500, 194 e 500-600 pb, respectivamente. Para a levedura foram utilizados dois pares de *primers* universais, que amplificam a região interna transcrita do gene ribossomal (ITS), ITS1/ITS4 (White *et al*., 1990), e a região do domínio D1/D2 da sequência 26S rDNA, NL1/NL4 (Cao *et al*., 2022), com fragmentos esperados de aproximadamente 750-800 e 574 pb, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Genes utilizados para amplificação via PCR e suas respectivas sequências.

Primer	Sequência	Gene	Referência
27F/1492R	F – (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') R – (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')	16S rRNA	Lachnit *et al*., 2011
341F/518R	F – (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') R – (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')	16S rRNA	Suriya *et al*., 2017
338F/806R	F – (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') R – (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')	16S rRNA	Wei *et al*., 2018
ITS1/ITS4	F – (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') R – (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')	ITS	White *et al*., 1990
NL1/NL4	F – (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') R – (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')	26S rDNA	Cao *et al*., 2022

As condições de amplificação por PCR com os pares de *primers* universais utilizados com as cepas bacterianas e para a levedura, foram: reações com 20 µl de volume final, contendo Buffer 1X, 0,2 mM de dNTP, 1U de Taq DNA polimerase, 0,3 µM de cada *primer* (Metabion International AG) e 10 ng de DNA, em termociclador (Amplitherm). Para os *primers* 27F/1492R, 341F/518R, 338F/806R, as temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão utilizadas para as cepas ISO 04, 14 e 31 foram descritas anteriormente por Li *et al*. (2024), Hong *et al.* (2016), Zheng *et al*. (2017), respectivamente.

Para a cepa 28, com *primers* 338F/806R, a amplificação foi feita em gradiente de temperatura, com uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos a 94 °C por 1 min para desnaturação, 50 °C por 1 min para anelamento, 72 °C por 2 min para extensão, seguido de 94 °C por 1 min para desnaturação, 55 °C por 1 min para anelamento e 72 °C por 2 min para extensão, com uma etapa de extensão final a 72 °C por 10 min. Para os iniciadores ITS1/ITS4, a temperatura de anelamento utilizada foi a 50 °C (White *et al*., 1990). Por conseguinte, para o par de primers NL1/NL4, a amplificação foi realizada em gradiente de temperatura, conforme descrito acima, com temperaturas de anelamento de 59 e 62 °C.

Os amplicons foram separados por eletroforese em gel de agarose (2%) em tampão TBE 1X (Tris, Ácido bórico, EDTA). Um marcador de DNA de 100 pb, DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific), e corante fluorescente de ligação ao DNA Brometo de Etídio foi utilizado para visualização, identificação e mensuração do tamanho dos produtos de PCR por

eletroforese, visualizados em fotodocumentador (Proteinsimple, Alphaimager HP) sob luz UV. Os amplicons foram então purificados com o kit ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System de acordo com o protocolo do fabricante (Promega®, Madison/USA).

2.3 Sequenciamento de DNA

Os produtos de PCR foram sequenciados pelo método do tipo Sanger, no Analisador Genético 3130xl (*Applied Biosystems*, EUA), pela Genomic Engenharia Molecular. As sequências obtidas foram submetidas à busca por similaridades no banco de dados do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/), com o *software* BLAST (Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local).

As sequências dos *loci* PQ666461 (região V1-V9), PQ666462 (região V3-V4) e PQ666463 (região V3-V4) (para *B. licheniformis* ISO 04), PQ665371 (região V1-V9), PQ665372 (região V3-V4) e PQ665373 (região V3-V4) (para *B. pumilus* ISO 14), PQ665374 (região V1-V9), PQ665375 (região V3-V4) e PQ665376 (região V3-V4) (para *M. luteus* ISO 28), PQ665368 (região V1-V9), PQ665369 (região V3-V4) e PQ665370 (região V3-V4) (para *B. paralicheniformis* ISO 31) e PQ666543 (ITS) e PQ666789 (26S rDNA) (para *M. aphidis* ISO 26) foram depositadas no banco de dados GenBank.

2.4 Análises filogenéticas

As sequências referência depositadas no Genbank (Apêndice I e II), que apresentaram maior similaridade, foram baixadas e alinhadas através do algoritmo ClustalW. A árvore filogenética foi construída concatenando os alinhamentos de sequências, através do método Neighbor-Joining (NJ), com as distâncias genéticas calculadas pelo modelo de três parâmetros de Tamura, com 1000 repetições de Bootstrap (Tamura *et al*., 2018). A sequência da proteobactéria *Azospirillum thiophilum* foi incluída como um grupo externo (Dubinina *et al*., 2017).

A análise filogenética da cepa de levedura foi construída com os mesmos métodos descritos acima, porém utilizando o modelo da distância proporcional (Domán; Makrai; Bányai, 2022). Todas as análises foram realizadas no software MEGAX, versão 10.2.6, e as árvores foram renderizadas no software R (versão 4.3.2), com o pacote ggtree (Yu *et al*., 2017).

3 RESULTADOS

3.1 Identificação das cepas bacterianas ISO 04, 14, 28 e 31

A partir da visualização da imagem do gel dos fragmentos dos genes-alvo e seus respectivos tamanhos (pb), os amplicons foram sequenciados e depositados no NCBI (Figura 1). Comparando-se com as sequências do banco de dados, o gene 16S rRNA da cepa ISO 04 mostrou 99,16%; 99,36% e 100% de similaridade com *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 para os *loci* 1 (região V1-V9), 2 (região V3-V4) e 3 (região V3-V4), respectivamente. A cepa ISO 14 apresentou 99,93%; 99,57% e 100% de similaridade com *Bacillus pumilus* DMKUB39 para os mesmos *loci*. A cepa ISO 28 correspondeu a 99,43%; 98,44% e 99,43% de similaridade com *Micrococcus luteus* ATCC 4698, também para os *loci* 1, 2 e 3, enquanto a cepa ISO 31 apresentou 99,65%; 99,58% e 98,98% de similaridade com *Bacillus paralicheniformis* Bac84 para os mesmos *loci* (Tabela 1).

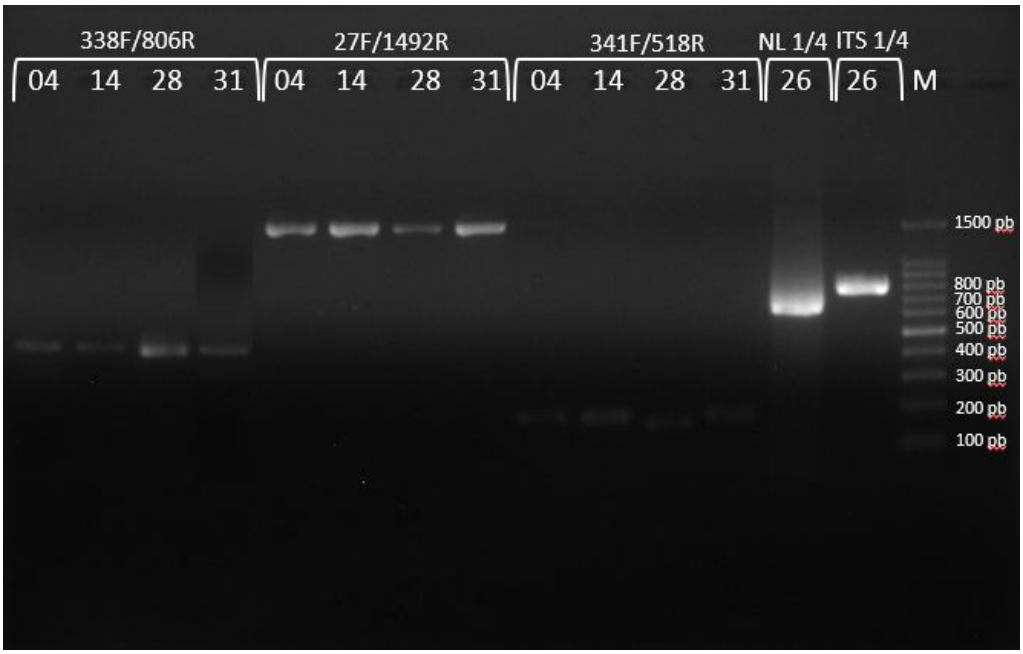


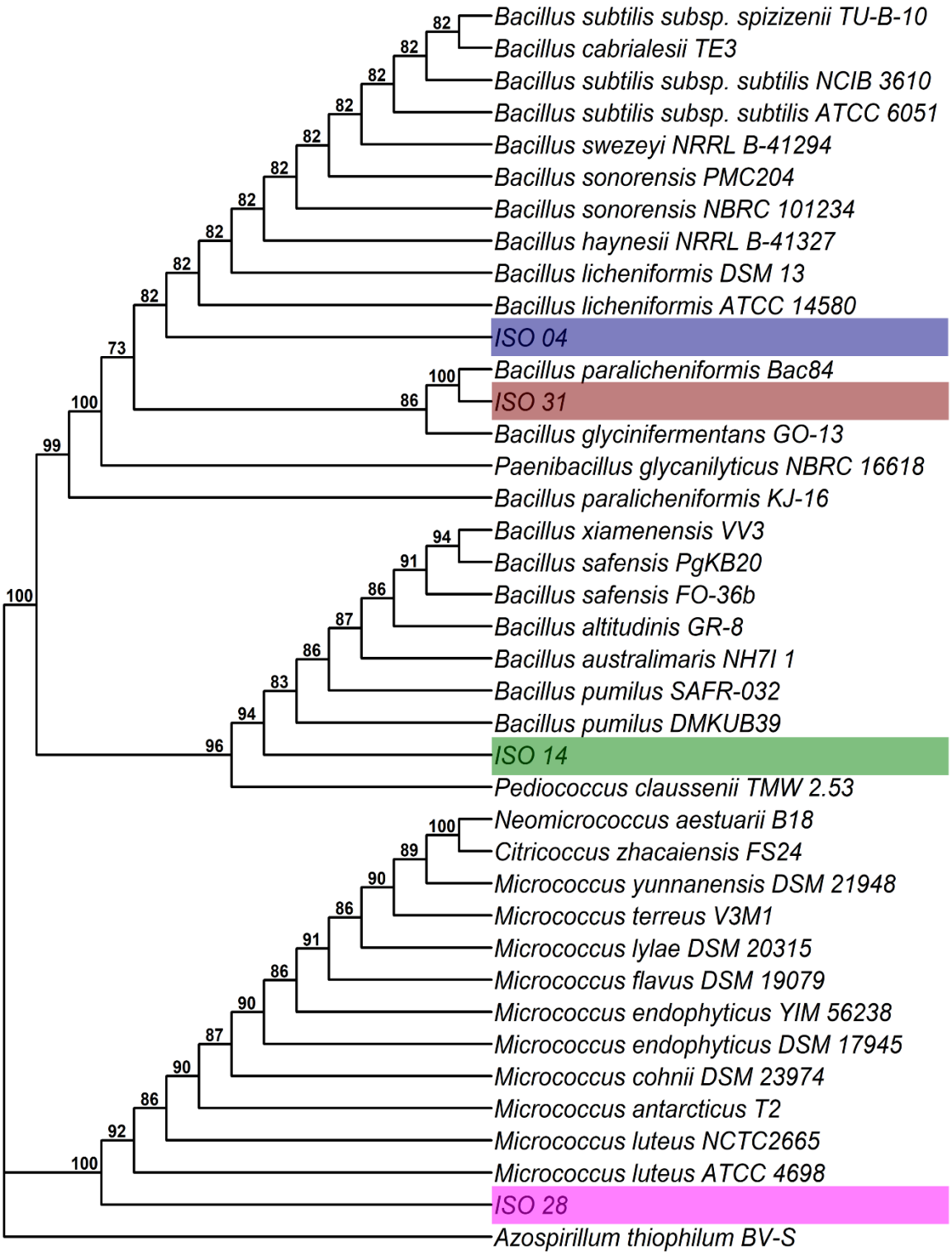
Figura 1. Amplificação por PCR do gene 16S rRNA das cepas bacterianas, ITS e a região do domínio D1/D2 da sequência 26S rDNA da cepa de levedura. Faixas: 04: ISO 04; 14: ISO 14; 28: ISO 28; 31: ISO 31; 26: ISO 26 e M: Marcador DNA Ladder de 100 pb. Números inscritos no topo indicam os respectivos *primers* universais utilizados para a PCR.

Tabela 2. Identidade das sequências parciais (%) do gene 16S rRNA das cepas tolerantes/degradantes do oxifluorfeno, obtidos de amostras de solo.

Cepa	Tamanho do Produto de PCR (pb)			Organismo correspondente	Identidade (%)						N° de acesso do GenBank
					16S rRNA			Gap (%)			
	27F/1492R	338F/806R	341F/518R		*locus* 1[a]	*locus* 2[b]	*locus* 3[c]	*locus* 1[a]	*locus* 2[b]	*locus* 3[c]	
ISO 04	1500	500	195	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580 (NZ_CP140161.1)	99,16	99,36	100,00	0	0	0	PQ666461.1 PQ666462.1 PQ666463.1
ISO 14	1500	500	194	*Bacillus pumilus* DMKUB39 (KF673350.1)	99,93	99,57	100,00	0	0	0	PQ665371.1 PQ665372.1 PQ665373.1
ISO 28	1500	480	190	*Micrococcus luteus* ATCC 4698 (NZ_CP035298.1)	99,43	98,44	99,43	0	0	0	PQ665374.1 PQ665375.1 PQ665376.1
ISO 31	1500	500	194	*Bacillus paralicheniformis* Bac84 (N005A_CP023665.1)	99,65	99,58	98,98	0	0	0	PQ665368.1 PQ665369.1 PQ665370.1

[a]: Região hipervariável V1-V9, correspondente ao *primer* 27F/1492R. [b]: Região hipervariável V3-V4, correspondente ao *primer* 338F/806R. [c]: Região hipervariável V3-V4, correspondente ao *primer* 341F/518R.

A análise filogenética, baseada nas sequências da região 16S rRNA, classificou as cepas bacterianas em quatro espécies distintas. Do gênero *Bacillus*, a cepa ISO 04 foi identificada como *Bacillus licheniformis*, com suporte de Bootstrap de 82%. A cepa ISO 14 foi classificada como *Bacillus pumilus*, com 94% de suporte; e a cepa ISO 31, como *Bacillus paralicheniformis*, com suporte de 100%. A cepa ISO 28 foi classificada como *Micrococcus luteus*, também com suporte de Bootstrap de 100% (Figura 2).

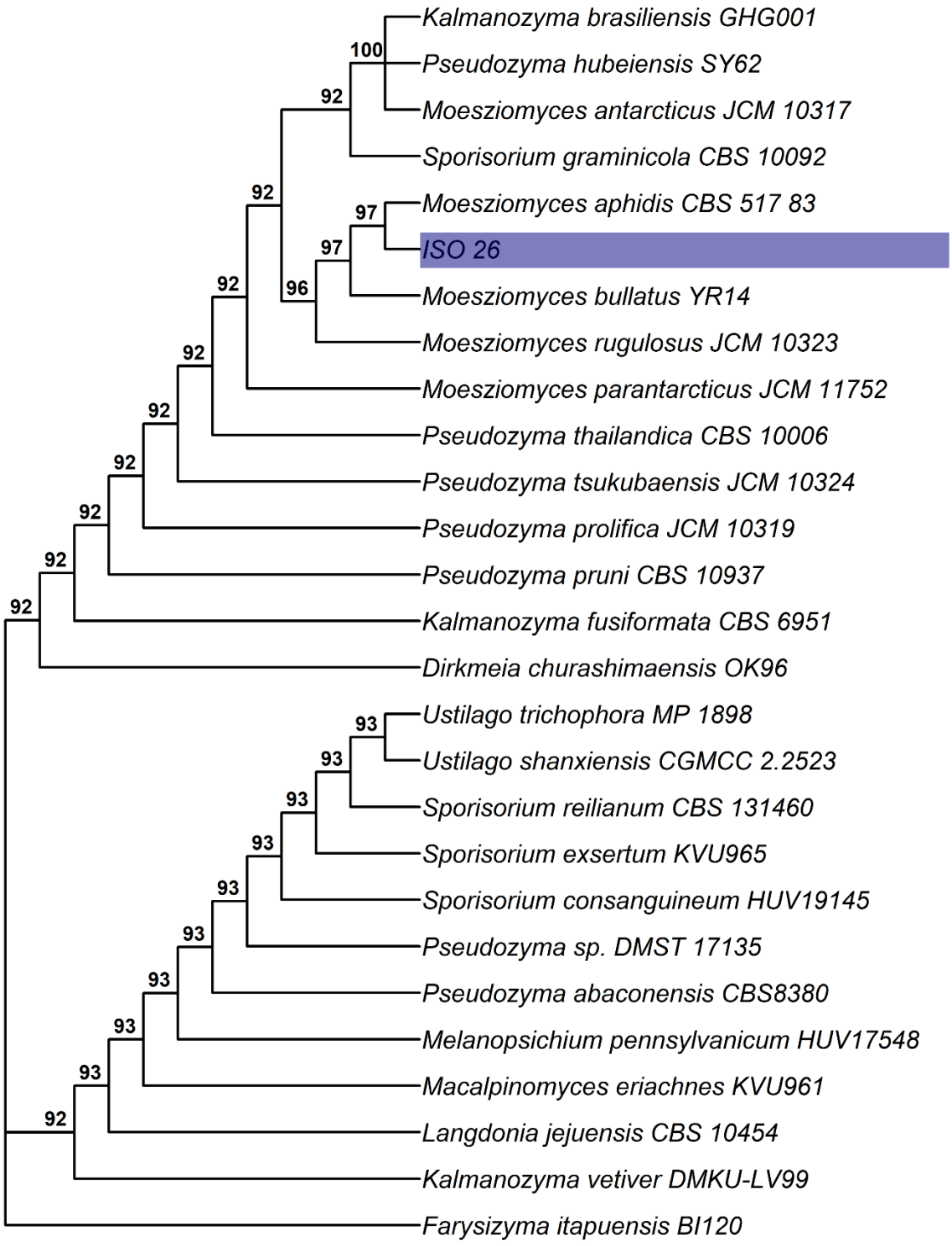


Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 2 – Árvore filogenética concatenada, construída por meio do método Neighbor-Joining obtida através das sequências da região 16S rRNA dos quatro isolados bacterianos, usando o programa MEGAX (v.10.2.6) e renderizando no programa R (v.4.3.2). Os valores de Bootstrap são indicados nos nós de ramificação. As cepas estão representadas por caixas de cores distintas.

3.2 Identificação da levedura ISO 26

Comparando as sequências do ISO 26 com as sequências do banco de dados, a região ITS apresentou 99,85% de similaridade com *Moesziomyces aphidis* CBS 517.83, enquanto a região do gene D1/D2 26S rDNA demonstrou 100% de similaridade (Tabela 2). A construção da árvore filogenética foi essencial para classificar o isolado de levedura em nível de espécie. Sendo assim, a cepa ISO 26 foi identificada como *M. aphidis*, com suporte de Bootstrap de 97% (Figura 3). As sequências modelos foram obtidas do GenBank e, consequentemente, foram utilizadas como referência para a identificação das espécies e confirmação por meio da análise filogenética.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 3 - Árvore filogenética concatenada, construída por meio do método Neighbor-Joining obtida através das sequências das regiões ITS e domínio D1/D2 26S rDNA do isolado de levedura ISO 26, usando o programa MEGAX (v.10.2.6) e renderizando no programa R (v.4.3.2). Os valores de Bootstrap são indicados nos nós de ramificação. A cepa está representada por caixa de cor azul.

Tabela 3. Identidade das sequências parciais (%) dos genes ITS e D1/D2 26S rDNA da cepa de levedura tolerante/degradante do oxifluorfeno, obtido de amostras de solo.

	Tamanho dos produtos de PCR (pb)			Identidade (%)				
Isolado	**ITS1/ITS4**	**NL1/NL4**	**Organismo correspondente**	**ITS**	**Gap (%)**	**26S rDNA**	**Gap (%)**	**N° de Acesso no GenBank**
ISO 26	800	600	*Moesziomyces aphidis* CBS 517.83 (NR_145336.1; NG_069796.1)	99,85	0	100,00	0	PQ666543.1 PQ666789.1

4 DISCUSSÃO

As espécies *B. paralicheniformis* e *B. licheniformis* pertencem ao mesmo complexo de espécies *B. subtilis* (Fan *et al*., 2017), o que dificulta sua classificação com base em genes ribossômicos, como o 16S rRNA (Asif *et al*., 2023). No presente estudo, a partir dos métodos de análise filogenética empregados, o software MEGAX foi capaz de distinguir os isolados ISO 04 e ISO 31 por meio de suas semelhanças com as sequências de referência do banco de dados.

De forma semelhante, Pujar *et al*. (2018) identificaram uma cepa bacteriana responsável por catalisar o herbicida clorprofam, isolada de solo, utilizando a mesma região gênica. Isso permitiu sua identificação com 99% de suporte de *B. licheniformis* NKC-1. A caracterização morfológica e bioquímica, associada à análise filogenética, é capaz de gerar dados de confirmação em nível de espécie altamente relevantes. Como descrito por Zhu *et al*. (2021), duas cepas capazes de degradar simazine, isoladas a partir de amostras de solo, foram identificadas com 100% de suporte com base na sequência 16S rRNA como *B. licheniformis* SIMA-N5 e *B. altitudinis* SIMA-N9.

O gene do rRNA 16S é amplamente utilizado em pesquisas como marcador genético recorrente para a identificação de bactérias. Reconhecido como o recurso mais eficaz para análises filogenéticas e classificação taxonômica bacteriana, destaca-se por sua ocorrência universal em todos os organismos desse grupo, o que o torna essencial para estudos comparativos (Alyousif, 2022).

Shang *et al*. (2022), ao isolarem do solo uma cepa bacteriana capaz de degradar o lactofeno, herbicida pertencente ao mesmo grupo químico que o oxifluorfeno (éter difenílico), empregaram não apenas métodos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, mas, principalmente, a análise filogenética para identificar *Bacillus* sp. YS-1. Zhang *et al*. (2018) igualmente identificaram a cepa *Bacillus* sp. Za, que também apresentou relação direta com a tolerância a esse mesmo composto.

A espécie *B. licheniformis* é um microrganismo Gram-positivo, formador de endósporos, comumente isolado de amostras de solo, plantas e ambientes marinhos. Possui alto interesse biotecnológico, visando suprir demandas em diversas áreas, como na indústria farmacêutica, alimentícia e na agricultura, sendo empregada em processos de biorremediação tanto da água quanto do solo. Vale ressaltar que *B. licheniformis* é amplamente explorado na

pesquisa básica, por meio do estudo de seu genoma e de aplicações em clonagem para a expressão de enzimas (Muras *et al*., 2021).

B. paralicheniformis, por sua vez, é uma espécie Gram-positiva, também formadora de esporos e anaeróbica facultativa. Já foi isolada de diversos ambientes, como solo rizosférico de regiões desérticas, água salina, minas de sal e tecidos vegetais de espécies *Brassica napus* L. var. *napus* (canola), *Enicostema axillare* e *Cenchurus americanus* (L.) R. Br. (milheto perolado). Recentemente, essa espécie tem sido alvo de estudos voltados a aplicações importantes, como a formulação de biofertilizantes para o crescimento e a nutrição de plantas, além do antagonismo contra fitopatógenos de interesse econômico, por meio da produção de metabólitos secundários, favorecendo práticas de agricultura sustentável (Jinal; Sakthivel; Amaresan, 2020; Świątczak *et al*., 2023; Chavarria-Quicaño *et al*., 2023; Iqbal *et al*., 2023; Asif *et al*., 2023; Ashajyothi *et al*., 2024).

B. pumilus é um microrganismo Gram-positivo, produtor de esporos, frequentemente encontrado em diversos ecossistemas, como águas oceânicas, sedimentos marinhos profundos e solos. Essa espécie destaca-se por sua notável capacidade de tolerar condições ambientais adversas, como escassez de nutrientes, dessecação, exposição à radiação ionizante e ultravioleta, além de resistir e degradar agentes xenobióticos como herbicidas. No passado, esteve classificada dentro do grupo *B. subtilis*, porém, atualmente, integra o grupo *B. pumilus*. Sua versatilidade e adaptabilidade a ambientes extremos reforçam sua relevância em estudos microbiológicos e biotecnológicos (Caulier *et al*., 2019; Dobrzyński; Jakubowska; Dybek, 2022; Zhu *et al*., 2022).

M. luteus, por sua vez, é uma bactéria Gram-positiva, aeróbica e não formadora de esporos, frequentemente organizada em tétrades e reconhecida pela produção de pigmentos carotenoides, características que compõem parte integrante da microflora normal da pele humana e animal. Essa espécie também está amplamente distribuída em ambientes como solo, água, ar, plantas, peixes, insetos e alimentos. Embora possua natureza aeróbica, investigações recentes indicam sua capacidade de manter a atividade biológica sob condições anaeróbicas, tolerando ambientes com baixa disponibilidade de oxigênio, além de demonstrar potencial para aplicações de descontaminação ambiental (Boraty´nski *et al*., 2020; Mafi; Greiner, 2021; Yue *et al*., 2023).

M. aphidis é uma levedura do tipo *Basidiomycota*, subfilo *Ustilaginomycota*, classe *Ustilaginomycetes* e ordem *Ustilaginales* (Wang *et al*., 2015). É um organismo saprofítico, cujo

isolamento já foi relatado em diversos ambientes, como secreções de pulgões, folhas, flores, solo, água e até mesmo sangue humano (Kruse *et al*., 2017; Sulik-Tyszka *et al*., 2025). Trabalhos anteriores descrevem essa espécie como fonte de metabólitos e enzimas, além de sua utilização em processos de biodegradação de compostos como o petróleo bruto (Faria *et al*., 2022; Song *et al*., 2024; Yu *et al*., 2022).

Em uma pesquisa envolvendo a identificação de uma levedura isolada de ovários de *Echinochloa crus-galli* (capim-arroz), Tanaka, Koitabashi & Kitamoto (2018) utilizaram as mesmas regiões ITS e D1/D2 26S rDNA. De acordo com suas análises filogenéticas, foi possível identificar o isolado como *M. antarcticus*. De semelhante modo, três isolados de levedura com atividade celulolítica, coletados do intestino de gafanhotos, foram identificados como *M. aphidis* ON22^{T}, *M. aphidis* G10^{T} e *M. antarcticus* G15^{T}, com base nas mesmas regiões "barcoding" (código de barras) de DNA (Kim *et al*., 2019). Esses dados evidenciam a relevância dessas regiões genéticas na identificação de espécies de leveduras, corroborando os achados do presente estudo.

Os resultados aqui relatados são particularmente relevantes por contribuírem para o conhecimento sobre microrganismos habitantes de solo com capacidade de metabolizar compostos persistentes no ambiente, como o herbicida oxifluorfeno. A partir deste ponto, abre-se espaço para novas perguntas e investigações, especialmente no campo das ciências ômicas, como a Proteômica e a Metabolômica.

Visto que já há registros de bactérias, como *Pseudomonas nitroreducens,* expressando proteínas envolvidas nas vias de degradação química de compostos xenobióticos (Aswathi *et al*., 2021). *Shewanella oneidensis* expressando proteínas de forma diferencial ao degradar o malatião, além da capacidade de produzir lipídios, peptídeos, vitaminas e aumentar suas atividades metabólicas para mineralizar o composto químico (Zhang *et al*., 2024).

Vale ressaltar que bactérias e leveduras também são excelentes produtoras de metabólitos e enzimas de interesse biotecnológico, além de funcionarem muito bem como plataformas para edição gênica em programas de melhoramento genético.

5 CONCLUSÃO

Em suma, os resultados apresentados por este estudo evidenciam que, por meio de sequenciamento e análises filogenéticas, foi possível identificar quatro espécies de bactérias: *B. licheniformis* ISO 04, *B. pumilus* ISO 14, *M. luteus* ISO 28 e *B. paralicheniformis* ISO 31, e uma de levedura, *M. aphidis* ISO 26, provenientes de solo agrícola, que possuem a capacidade de degradar o oxifluorfeno. Portanto, nossas análises contribuem de maneira significativa ao apresentar cinco espécies de microrganismos que, até então, não haviam sido relatadas como mineralizadores do herbicida éter difenílico, reforçando a importância do uso de marcadores genéticos na classificação taxonômica e na avaliação do potencial biotecnológico desses organismos.

REFERÊNCIAS

ALYOUSIF, Nassir Abdullah. Distribution, occurrence and molecular characterization of *Bacillus* related species isolated from different soil in Basrah Province, Iraq. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 23, n. 2, 2022.

ASHAJYOTHI, Mushineni *et al*. Comprehensive genomic analysis of *Bacillus subtilis* and *Bacillus paralicheniformis* associated with the pearl millet panicle reveals their antimicrobial potential against important plant pathogens. **BMC Plant Biology**, v. 24, n. 1, p. 197, 2024.

ASIF, Muhammad *et al*. Comprehensive genomic analysis of *Bacillus paralicheniformis* strain BP9, pan-genomic and genetic basis of biocontrol mechanism. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 21, p. 4647-4662, 2023.

ASWATHI, Aswathi *et al*. Chlorpyrifos induced proteome remodelling of *Pseudomonas nitroreducens* AR-3 potentially aid efficient degradation of the pesticide. **Environmental Technology & Innovation**, v. 21, p. 101307, 2021.

BAMAL, Deepika *et al*. Herbicide risks to non-target species and the environment: A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 22, n. 6, p. 2977-3032, 2024.

BORATY´NSKI, F. *et al*. Bacterial Biotransformation of Oleic Acid: New Findings on the Formation of γ-Dodecalactone and 10-Ketostearic Acid in the Culture of *Micrococcus luteus*. **mdpi.comF Boratyński, E Szczepańska, D De Simeis, S Serra, E BrennaMolecules, 2020•mdpi.com**, v. 25, p. 3024, 2020.

CALDART, Eloiza Teles *et al*. Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1-20, 2016.

CAO, Gangnan *et al*. First report of *Metschnikowia bicuspidata* infection in Chinese grass shrimp (*Palaemonetes sinensis*) in China. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 69, n. 5, p. 3133-3141, 2022.

CAULIER, Simon *et al*. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 302, 2019.

CHAVARRIA-QUICAÑO, Estefany *et al*. Native *Bacillus paralicheniformis* isolate as a potential agent for phytopathogenic nematodes control. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1213306, 2023.

CHEN, Shao-Fang *et al*. Microorganism-driven 2, 4-D biodegradation: Current status and emerging opportunities. **Molecules**, v. 29, n. 16, p. 3869, 2024.

DOBRZYŃSKI, Jakub; JAKUBOWSKA, Zuzanna; DYBEK, Barbara. Potential of Bacillus pumilus to directly promote plant growth. **Frontiers in microbiology**, v. 13, p. 1069053, 2022.

DOMÁN, Marianna; MAKRAI, László; BÁNYAI, Krisztián. Molecular phylogenetic analysis of *Candida krusei*. **Mycopathologia**, v. 187, n. 4, p. 333-343, 2022.

DUBININA, Galina *et al*. *Beggiatoa leptomitoformis* sp. nov., the first freshwater member of the genus capable of chemolithoautotrophic growth. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 67, n. 2, p. 197-204, 2017.

FAN, Ben *et al*. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an "operational group *B. amyloliquefaciens*" within the *B. subtilis* species complex. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 22, 2017.

FARIA, N. T. *et al*. High cellulase-free xylanases production by *Moesziomyces aphidis* using low-cost carbon and nitrogen sources. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 97, n. 11, p. 3076–3082, 1 nov. 2022.

FELSHIA, S. Chris *et al*. Elucidation of 2, 4-Dichlorophenol degradation by *Bacillus licheniformis* strain SL10. **Environmental Technology**, 2020.

GIRI, Krishna *et al*. Biodegradation of isoproturon by *Bacillus pumilus* K1 isolated from foothill agroecosystem of North West Himalaya. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 87, n. 3, p. 839-848, 2017.

GULTOM, Endang Sulistyarini *et al*. Molecular identification using 16S rRNA gene to identify bacteria symbiont-*Agelas* sp. sponge with antibacterial activity. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, p. e11840-e11840, 2025.

HONG, Sung Wook *et al*. Microbial community structure of Korean cabbage kimchi and ingredients with denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 1057-1062, 2016.

HUANG, Lirong *et al*. Oxyfluorfen exposure can cause acute kidney injury by promoting ROS-induced oxidative stress and inflammation in zebrafish. **Journal of Hazardous Materials**, v. 440, p. 129823, 2022.

IQBAL, Sajid *et al*. Genome mining, antimicrobial and plant growth-promoting potentials of halotolerant *Bacillus paralicheniformis* ES-1 isolated from salt mine. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 298, n. 1, p. 79-93, 2023.

JAN-ROBLERO, Janet; CRUZ-MAYA, Juan A.; CANCINO-DIAZ, Juan C. Novel Molecular Techniques for Identifying Agricultural Microorganisms. **Agriculture**, v. 14, n. 7, p. 987, 2024.

JINAL, Hardik Naik; SAKTHIVEL, Krishnan; AMARESAN, Natarajan. Characterisation of antagonistic *Bacillus paralicheniformis* (strain EAL) by LC–MS, antimicrobial peptide genes, and ISR determinants. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 113, p. 1167-1177, 2020.

KIM, J. Y. *et al*. Isolation and characterization of cellulolytic yeast belonging to *Moesziomyces* sp. from the gut of Grasshopper. **Korean Journal of Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 234–241, 2019.

KRUSE, J. *et al*. Asexual and sexual morphs of *Moesziomyces* revisited. **IMA Fungus**, v. 8, n. 1, p. 117–129, 1 jun. 2017.

LACHNIT, Tim *et al*. Epibacterial community patterns on marine macroalgae are host-specific but temporally variable. **Environmental microbiology**, v. 13, n. 3, p. 655-665, 2011.

LI, Yong *et al*. Screening and biodiversity analysis of cultivable inorganic phosphate–solubilizing bacteria in the rhizosphere of *Hydrilla verticillata*. **Plos one**, v. 19, n. 1, p. e0297047, 2024.

MAFI, M.; GREINER, A. Bioremediation of Copper-Ions by Polymer Encapsulated and Immobilized *Micrococcus Luteus*. **Macromolecular Bioscience**, v. 21, n. 11, 1 nov. 2021.

MEMON, Muhammad Sohail *et al*. Automatic visual recognition, detection and classification of weeds in cotton fields based on machine vision. **Crop Protection**, v. 187, p. 106966, 2025.

MURAS, Andrea *et al*. Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 609-627, 2021.

PACHECO, Lara Cristina Pereira da Silva *et al*. Oxyfluorfen bioavailability in Brazilian Savanna soils. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 52, p. e73107, 2022.

PUJAR, Namadev K. *et al*. Biodegradation of chlorpropham and its major products by *Bacillus licheniformis* NKC-1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 1-11, 2018.

REGINALDO, L. T. R. T. **Seleção de isolados microbianos para degradação de oxyfluorfen no solo**. 2023. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, p. 63. 2023.

SANTOS, Vanessa Silva *et al*. Selection of microorganisms and preparation of inoculants with potential applications in the remediation of soil contaminated with hexazinone. **Ciência Rural**, v. 51, n. 6, p. e20200263, 2021.

SHANG, Na *et al*. Biodegradation of diphenyl ether herbicide lactofen by *Bacillus* sp. YS-1 and characterization of two initial degrading esterases. **Science of the Total Environment**, v. 806, p. 151357, 2022.

SINGH, Anil Kumar; SINGLA, Poonam. Biodegradation of diuron by endophytic *Bacillus licheniformis* strain SDS12 and its application in reducing diuron toxicity for green algae. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 26, p. 26972-26981, 2019.

SONG, J. Z. *et al*. Simultaneous production of biosurfactant and extracellular unspecific peroxygenases by *Moesziomyces aphidis* XM01 enables an efficient strategy for crude oil degradation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 471, p. 134437, 5 jun. 2024.

SULIK-TYSZKA, Beata *et al*. *Moesziomyces aphidis* Bloodstream Infection in Oncologic Patient: First Report in Poland. **Journal of Fungi**, v. 11, n. 2, p. 95, 2025.

SURIYA, Jayaraman *et al*. Assessment of bacterial community composition in response to uranium levels in sediment samples of sacred Cauvery River. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, p. 831-841, 2017.

ŚWIĄTCZAK, Joanna *et al*. *Bacillus paralicheniformis* 2R5 and its impact on canola growth and N-cycle genes in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 99, n. 9, p. fiad093, 2023.

SZPYRKA, Ewa *et al*. The Influence of Commercial Yeast Preparations on the Degradation of Herbicide Mixtures in the Soil and the Effect on the Shell Pea (*Pisum sativum* L.) Cultivation. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 24, n. 2, p. 2509-2519, 2024.

TAMURA, K. *et al*. MEGA, X. molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 1, p. 1547-1549, 2018.

TANG, Fiona HM; MAGGI, Federico. Pesticide mixtures in soil: a global outlook. **Environmental Research Letters**, v. 16, n. 4, p. 044051, 2021.

TEJADA, Manuel *et al*. Bioremediation of an oxyfluorfen-polluted soil using biostimulants obtained by fermentation processes: Effect on biological properties. **Applied Soil Ecology**, v. 170, p. 104270, 2022.

WANG, Q. M. *et al*. Multigene phylogeny and taxonomic revision of yeasts and related fungi in the *Ustilaginomycotina*. **Studies in Mycology**, v. 81, p. 55–83, 2015.

WEI, Huawei *et al*. Succession of the functional microbial communities and the metabolic functions in maize straw composting process. **Bioresource technology**, v. 256, p. 333-341, 2018.

WHITE, T.J.B.T. PCR protocols: a guide to methods and applications. *(No Title)*, p.315. 1990.

YE, Kaiqiang *et al*. Key Intelligent Pesticide Prescription Spraying Technologies for the Control of Pests, Diseases, and Weeds: A Review. **Agriculture**, v. 15, n. 1, p. 81, 2025.

YU, G. *et al*. Efficient production of mannosylerythritol lipids by a marine yeast *Moesziomyces aphidis* XM01 and their application as self-assembly nanomicelles. **Marine Life Science and Technology**, v. 4, n. 3, p. 373–383, 27 jun. 2022.

YU, Guangchuang *et al*. ggtree: an R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 8, n. 1, p. 28-36, 2017.

YUE, C. *et al*. Identification of two possible metabolic pathways responsible for the biodegradation of 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol in *Micrococcus luteus* ML. **Biodegradation**, v. 34, n. 4, p. 371–381, 1 ago. 2023.

ZHANG, He-Yi *et al*. Automatic visualization of crop signaling markers in tomato plants for differentiation of labeled plants from weeds based on fluorescence imaging. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 231, p. 110009, 2025.

ZHANG, Jie *et al*. Combined metabolomics and proteomics to reveal the mechanism of *S. oneidensis* MR-1 degradation malathion enhanced by FeO/C. **Journal of Hazardous Materials**, v. 476, p. 135162, 2024.

ZHANG, Jing *et al*. Detoxification of diphenyl ether herbicide lactofen by *Bacillus* sp. Za and enantioselective characteristics of an esterase gene lacE. **Journal of hazardous materials**, v. 341, p. 336-345, 2018.

ZHENG, Xiafei *et al*. Bacterial composition, abundance and diversity in fish polyculture and mussel–fish integrated cultured ponds in China. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 7, p. 3950-3961, 2017.

ZHU, Jiangwei *et al*. Characteristics of two terbutylazine-degrading bacteria and the construction of a live bacterial agent for effective degradation of terbutylazine in soil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, n. 1, p. e20200658, 2022.

ZHU, Jiangwei *et al*. Isolation of 2 simazine-degrading bacteria and development of a microbial agent for bioremediation of simazine pollution. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. suppl 3, p. e20210373, 2021.

CAPÍTULO II

ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DE *Bacillus licheniformis* ISO 04 REVELAM ENZIMAS BIOCATALÍTICAS DE OXIFLUORFENO

RESUMO

A persistência do herbicida oxifluorfeno no solo e em águas ambientais tem afetado organismos não-alvo de forma prejudicial. *Bacillus licheniformis* é uma bactéria Gram-positiva, distribuída em diversos ambientes e caracterizada por degradar outros herbicidas. No entanto, os mecanismos e enzimas que estão envolvidos no processo de biocatalização necessitam ser melhor explorados. Portanto, este estudo teve como objetivo identificar enzimas biocatalizadoras de oxifluorfeno produzidas por *Bacillus licheniformis*, utilizando abordagem de proteômica comparativa do tipo *shotgun*. O experimento foi conduzido em laboratório, onde a cepa bacteriana *B. licheniformis* ISO 04, habitante de solo, foi cultivada em meio nutriente líquido, suplementado com a formulação comercial do herbicida Goal BR® nas concentrações de 25 e 50 mg L^{-1}, por 40 horas a 30 °C, e uma curva de crescimento foi determinada. Para a extração de proteínas, culturas líquidas de ISO 04, com 32 horas de crescimento foram submetidas à ultrassonicação, com tampão de lise Ureia/Tioureia. Em seguida, os extratos proteicos foram submetidos ao processo de redução, alquilação, digestão com tripsina Gold (Promega, EUA) e dessalinização. Foram injetados num sistema cromatógrafo UHPLC (Thermo Fisher Scientific), com uma coluna capilar C_{18} (PICOCHIP®) de fase reversa, acoplado a um espectômetro de massa de alta resolução Q Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific). Os dados brutos (".raw") foram obtidos e disponibilizados no ProteomeXchange com o identificador PXD062118. Posteriormente, foram realizadas análises estatísticas e de bioinformática para investigar as vias moleculares e as proteínas essenciais. A partir da curva de crescimento, foi possível observar que o desenvolvimento do microrganismo foi afetado pelo herbicida, diminuindo a densidade celular em resposta ao aumento da concentração. As principais vias moleculares identificadas pela proteômica foram relacionadas ao metabolismo central e energético, resposta ao estresse e manutenção celular, biossíntese de cofatores e aminoácidos, funções relacionadas a ribossomos e tradução, e transporte. Foi possível observar, ainda, duas enzimas que foram exclusivamente expressas nos tratamentos, que podem ser fortes candidatas a biocatalizadoras do oxifluorfeno: a *O-succinilbenzoato sintase* e a *alfa-acetolactato descarboxilase*, além do *B. licheniformis* se utilizar de vias metabólicas alternativas para contornar os efeitos deletérios provocados pelo herbicida. Os resultados obtidos no presente estudo identificaram mecanismos moleculares essenciais na adaptação de *B. licheniformis* e degradação do oxifluorfeno em ambientes contaminados.

Palavras-chave: Biorremediação. Proteômica bottom-up. LC-MS/MS.

1 INTRODUÇÃO

O controle de plantas daninhas, através do uso de herbicidas, é uma estratégia amplamente utilizada na produção de diversas culturas, devido a sua relação dose/eficácia e possibilidade de aplicação em larga escala, o que permite reduzir as perdas dos rendimentos na produção do campo (Araujo *et al*., 2021; Hasanuddin *et al*., 2022; Procópio *et al*., 2024). O Brasil é um dos maiores consumidores de defensivos agrícolas do mundo e, os herbicidas representam mais de 50% dos produtos comercializados (Pacheco *et al*., 2022).

Apesar de seu papel no aumento da produtividade agrícola e na garantia da segurança alimentar, devido às características químicas inerentes aos herbicidas, diversos problemas podem surgir a curto e longo prazo. Os resíduos de agrotóxicos e seus derivados, por sua vez, podem se fixar no solo e serem lixiviados para corpos hídricos, sejam superficiais ou no subsolo, afetando organismos não-alvo, como animais, plantas, insetos, peixes e humanos (Gandhi *et al*., 2021; Das *et al*., 2024; Parven *et al*., 2025).

O oxifluorfeno (2-cloro-1-(3-etoxi-4-nitrofenoxi)-4-(trifluorometil)benzeno) é um herbicida éter difenílico que atua na inibição da protoporfirinogênio oxidase (PPO), enzima responsável por sintetizar a clorofila e o citocromo em células vegetais (Jalali, Inceer, 2022; Paula *et al*., 2022). Esse herbicida é comumente aplicado no controle de plantas daninhas dicotiledôneas e gramíneas, em culturas de arroz irrigado, algodão, café, cana-de-açúcar, cebola, citros, eucalipto, pinus e repolho (Jang *et al*., 2023).

O herbicida possui a característica de adsorver facilmente aos coloides do solo, além de já ter sido detectado em águas superficiais, devido ao escoamento superficial. O acúmulo prejudicial de oxifluorfeno já foi relatado em minhocas, peixe-zebra, ratos; envolvido em deformações de membros e fraturas cranianas de recém-nascidos, é considerado uma substância potencialmente cancerígena para o ser humano (Huang *et al*., 2022; Pacheco *et al*., 2022; Li *et al*., 2022; Tejada *et al*., 2022; Jang *et al*., 2023; Chen *et al*., 2023).

Os microrganismos são importantes agentes na remoção de herbicidas do meio ambiente, pois são capazes de degradar compostos orgânicos complexos em moléculas mais simples inorgânicas e não tóxicas, envolvendo enzimas biocatalizadoras nesse processo. *B. licheniformis*, por sua vez, tem se destacado agindo sobre a quebra de compostos agrotóxicos, como o clorpirifós, malation, β-cipermetrina, éster butílico 2,4-D e carbaril (Jaiswal *et al*., 2019; Khan *et al*., 2016; Zhao *et al*., 2019; Zhao *et al*., 2021; Hu *et al*., 2020).

Bacillus licheniformis é uma bactéria aeróbica Gram-positiva, com formato de bastonete e capaz de formar endósporos. Já foi relatada habitando solo, plantas e ambientes marinhos

(Muras *et al*., 2021; Noaman; Al-Mayaly, 2024). É reconhecido como um microrganismo seguro e de amplo potencial em muitas aplicações industriais, em setores como alimentos, produção de fármacos e gestão ambiental (Uribe-Ramírez *et al*., 2024). Por sua vez, para melhor compreensão dos mecanismos moleculares empregados por essa espécie, torna-se necessário o emprego de ferramentas ômicas, como a proteômica.

A proteômica *shotgun* consiste, basicamente, na separação multidimensional (MudPIT) de uma mistura complexa de peptídeos, analisada por cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massa em *tandem* (LC-MS/MS), e subsequente busca automatizada em bancos de dados (Matallana-Surget; Leroy; Wattiez, 2010; Shuken, 2023).

Associada a análises de bioinformática, é uma técnica poderosa, amplamente utilizada na caracterização de proteomas de células e tecidos, que permite identificar e quantificar proteínas que se expressam no espaço/tempo. Além de fornecer informações importantes sobre sua função, estrutura, modificação pós-traducional e interações complexas, possibilita a compreensão dos processos moleculares em bactérias que estejam envolvidas na degradação de herbicidas, além de permitir a indicação das enzimas biocatalizadoras desses compostos (Prusty; Kumar, 2024; Abril *et al*., 2024).

Dessa forma, este estudo teve como objetivo identificar enzimas biocatalizadoras produzidas por *Bacillus licheniformis*, isolado de solo agrícola com histórico prolongado de aplicação do herbicida oxifluorfeno, utilizando abordagem de proteômica comparativa do tipo *shotgun*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo microbiano e curva de crescimento

O experimento foi conduzido no laboratório de Fitopatologia I da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, *campus* Mossoró. Para o crescimento da bactéria *B. licheniformis*, cepa ISO 04, isolada previamente de solo com histórico de aplicação recorrente do herbicida oxifluorfeno, foi utilizado o meio Nutriente Ágar (NA), em placas de Petri (Reginaldo, 2023). As placas foram mantidas em estufa incubadora do tipo BOD (Biochemical Oxygen Demand), a 30 ± 2 °C, por 24 horas. A cepa foi cedida pela coleção de microrganismos do referido laboratório.

Após o crescimento das colônias, estas foram utilizadas para o preparo do pré-inóculo em 20 mL de meio nutriente líquido (5 g L^{-1} de peptona, 5 g L^{-1} de NaCl, 1,5 g L^{-1} de extrato de carne e 1,5 g L^{-1} de extrato de levedura). Em seguida, o frasco foi posto em agitador tipo Shaker por 24 horas, a 30 °C e agitação de 180 rpm.

Posteriormente, Erlenmeyers contendo 50 mL de meio nutriente líquido, suplementado com 25 e 50 mg L^{-1} da formulação comercial de oxifluorfeno Goal BR®, foram adicionados de 1 mL do pré-inóculo, ajustado a uma D.O. $_{600\ nm}$ de 0,2, e postos sob agitação a 180 rpm, na temperatura de 30 °C por 40 horas. As culturas líquidas foram preparadas em triplicata e o grupo controle consistiu de culturas não suplementadas com o herbicida. Amostras foram coletadas periodicamente, a cada 4 horas, para mensuração do crescimento das culturas em espectrofotômetro, utilizando leitura da densidade ótica a 600 nm.

2.2 Extração de proteínas

O cultivo de *B. licheniformis* ISO 04 em placas de Petri e o preparo do pré-inóculo foram realizados como descrito anteriormente. O cultivo em meio nutriente líquido também ocorreu de forma semelhante, com algumas modificações. Um volume de 50 mL de meio de cultura foi inoculado com o pré-inóculo com uma D.O. $_{600\ nm}$ a 1,1 tanto para o controle quanto para os tratamentos (25 e 50 mg L^{-1} Goal BR®); em seguida, foram postos a 30 °C por 32 horas, sob agitação a 180 rpm.

A extração das proteínas foi realizada de acordo com Reis *et al*. (2021), com algumas modificações. Um volume de 20 mL de cinco amostras biológicas diferentes de *B. licheniformis*

ISO 04, com uma D.O. $_{600\,nm}$ ajustada em 0,8, não expostas (controle) e expostas ao herbicida oxifluorfeno, foi centrifugado a 4677 g por 20 min a 4 °C para retirada das células presentes no meio. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi adicionado de 2 mL de acetato de sódio a 50 mM, seguido de centrifugação para limpeza das células. Para o rompimento das membranas bacterianas, os precipitados foram ressuspensos em 1 mL de tampão de lise Ureia/Tioureia (7 M de ureia, 2 M de tioureia, 2% de Triton X-100, 1% de ditiotreitol (DTT), 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF)) e submetidos a ultrassonicação (de 5 a 10 rajadas de 40 seg a 60 W).

As amostras lisadas por ultrasonicação foram mantidas em gelo até serem transferidas para microtubos novos, centrifugados a 16000 g a 4 °C por 30 min. Os sobrenadantes foram coletados, e a concentração das proteínas foi medida pelo método de Bradford (1976).

2.3 Digestão de proteínas

As proteínas extraídas foram precipitadas utilizando o método de metanol/clorofórmio, para remover resíduos do herbicida e quaisquer compostos interferentes das amostras (Nanjo *et al*., 2012). As amostras foram, então, ressuspensas em solução de bicarbonato de amônio 50 mM, e a digestão proteica foi realizada usando unidades de filtro Microcon-30 kDa (Millipore), com a metodologia de preparação de amostra auxiliada por filtro (FASP), descrita por Wiśniewski *et al*. (2009), com modificações.

Proteínas (80 µg) de cada amostra biológica foram lavadas nas unidades de filtração com 200 µL de bicarbonato de amônio 50 mM (pH 8,5) e centrifugadas a 14676 g por 15 min. Após a filtração, foram adicionados 100 µL da solução de DTT 50 mM em cada amostra para redução, misturados por vórtex e incubados em banho-maria a 60 °C por 20 min. Em seguida, adicionou-se 200 µL de solução gelada de ureia 8 M, e a solução foi centrifugada. A seguir, foi adicionada uma alíquota de 100 µL de solução de iodoacetamida 50 mM para alquilação, homogeneizada por vórtex e incubada a 25 °C no escuro por 20 min.

Posteriormente, adicionou-se às amostras nova alíquota da solução de ureia 8 M, e a coluna foi centrifugada. A lavagem com solução de ureia foi repetida. A solução de bicarbonato de amônio 50 mM foi adicionada à coluna, e uma nova centrifugação foi realizada, repetindo-se esta etapa por duas vezes. Logo após, as proteínas foram ressuspensas em 16 µL (50 ng μL^{-1}) de solução de tripsina Gold (Promega, EUA), preparada em bicarbonato de amônio para digestão, e incubadas em banho-maria a 37 °C por 18 horas.

Após a digestão, os peptídeos foram eluidos com bicarbonato de amônio em novos microtubos. O ácido trifluoroacético 15% foi adicionado e as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 min, para inativação da tripsina, e centrifugadas. Os sobrenadantes das amostras foram coletados e acondicionados em Vials (Analítica, Brasil) e submetidos à liofilização. Posteriormente, os peptídeos foram ressuspensos em ácido fórmico 0,1%, quantificados usando o Qubit Protein Assay Kit (ThermoFisher) e analisados por espectrometria de massas.

2.4 Análises LC-MS/MS

As análises foram executadas no laboratório de Análise de Fármacos e Proteínas do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os peptídeos (1 µg) foram injetados em um cromatógrafo UHPLC (ThermoFisher) com uma coluna capilar C_{18} (PICOCHIP®) de 75 µm de diâmetro interno x 15 µm de diâmetro da ponta interna, em fase reversa, acoplado a um espectômetro de massa Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific).

O gradiente de eluição do peptídeo foi realizado ao longo de 145 min, usando solvente A (0,1% de ácido fórmico em água LCMS) e solvente B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila), a uma vazão de 0,300 µL/min. A fase móvel B foi ajustada da seguinte forma: de 2% por 0 a 15 min, de 14% a 40% por 15 a 115 min, de 99% a 2% por 115 a 125 min, mantendo-se em 2% por 125 a 145 min. A análise proteômica foi realizada em cinco réplicas biológicas, cada uma com duas réplicas técnicas (Zelaya *et al*., 2025).

Os dados MS foram adquiridos usando o modo dependente de dados (DDA). Os íons precursores foram selecionados em uma faixa de massa de 375-2000 m/z. Um máximo de 20 íons precursores mais abundantes por ciclo de cada espectro MS foram selecionados para fragmentação de HCD (Higher-energy Collisional Dissociation).

A determinação do valor alvo foi baseada no controle automático de ganho (AGC) preditivo. O valor alvo de AGC de $3x10^6$, uma resolução de 140.000 a 140 m/z e tempo máximo de injeção de 45 ms foram definidos na varredura MS. Um valor alvo de AGC de $1x10^6$, uma resolução de 17.500 a 140 m/z e tempo máximo de injeção de 60 ms foram definidos na varredura de MS/MS. A duração da exclusão dinâmica foi de 10 s e a energia de colisão normalizada foi de 30.

2.5 Análises estatística

A geração dos arquivos ".raw" foi realizada com o auxílio do software Xcalibur™ (Thermo Fisher Scientific); a deconvolução dos espectros m/z, a quantificação e a identificação das proteínas foram realizadas com o software PatternLab (versão 5) (Santos *et al*., 2022). O banco de dados de referência do proteoma *B. licheniformis,* com 29135 proteínas do Uniprot, foi utilizado até a obtenção das sequências *decoy*. A digestão com tripsina, a modificação fixa da carbamidometilação da cisteína e a modificação variável da oxidação da metionina foram incluídas na análise. Foram realizados o *Peptide Spectrum Matching* (PSM) e o *Extract Ion Chromatogram* (XIC), obtidos com tolerância máxima de 40 ppm. O SEPro2 foi escolhido para pré-selecionar os resultados com maior confiança, mantendo uma taxa de falsa descoberta (FDR) de 1%.

As proteínas identificadas em apenas um grupo foram classificadas como exclusivas. Para proteínas encontradas em ambos os grupos, chamadas proteínas sobrepostas, foi realizada uma análise de *Fold Change* (FC) para identificar aquelas que apresentaram acúmulo positivo (*Up*) (*fold change* ≥1,20 e p ≤0,05 do teste T bicaudal) e aquelas que apresentaram acúmulo negativo (*Down*) (*fold change* ≤0,83 e p ≤0,05 do teste T bicaudal). Proteínas com *fold change* entre ≥1,20 e ≤0,83 vezes foram consideradas como não alteradas (Wang *et al*., 2020).

Os dados brutos de espectrometria de massa foram depositados no Consórcio ProteomeXchange (Deutsch *et al*., 2023), por meio do repositório parceiro PRIDE (Perez-Riverol *et al*., 2025), com o identificador do conjunto de dados PXD062118.

2.6 Análise de bioinformática de proteínas diferencialmente expressas e exclusivas

A análise funcional, ou *Gene Ontology* (GO), foi realizada manualmente para categorizar proteínas exclusivas e diferencialmente reguladas, quanto a sua função molecular, componente celular e processo biológico. Para isso, o proteoma do *B. licheniformis* do banco de dados Uniprot, e informações sobre genes do banco de dados do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) foram considerados. A análise de vias metabólicas das proteínas identificadas foi realizada por meio do banco de dados de vias da *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (https://www.genome.jp/kegg/).

O processo de enriquecimento das vias foi realizado com o teste exato de Fisher, e a correção de Benjamini-Hochberg (FDR), para testes múltiplos, também foi realizada utilizando o pacote ClusterProfiler 4.0 (Wu *et al*., 2021), com p ≤0,15 com o *software* de computação

estatística RStudio (versão 2024.12.1). A análise de componentes principais (PCA) foi realizada com o objetivo de identificar padrões de agrupamento entre as amostras controle e tratadas (25 mg L^{-1} e 50 mg L^{-1}), em que os dois primeiros componentes principais foram utilizados para a visualização gráfica da variabilidade entre os grupos experimentais.

A construção das redes de interação proteína-proteína (PPI) foi conduzida utilizando o banco de dados STRING (https://string-db.org/), com o *software* Cytoscape (versão 3.10.3). O diagrama de Venn foi processado utilizando o Venny 2.1 (https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/) (Oliveros, 2007).

3 RESULTADOS

3.1 Efeito do herbicida oxifluorfeno na taxa de crescimento de *B. licheniformis*

A densidade ótica do *B. licheniformis* ISO 04 registrada a 600 nm determinou o crescimento padrão sob condições de controle. Na presença de 25 mg L^{-1} da formulação Goal BR®, a cepa bacteriana apresentou um período de latência (0–4 h) semelhante ao grupo controle, seguido por crescimento exponencial (8–21 h) e, posteriormente, estabilização gradual após 24 h, seguida de fase de declínio até 40 h. Já o perfil na concentração de 50 mg L^{-1} mostrou um período de latência igual ao observado no grupo controle e na concentração de 25 mg L^{-1} (0–4 h), com crescimento exponencial entre 8 e 28 horas, seguido de estabilização após 32 h e fase de decaimento até 40 h (Figura 1).

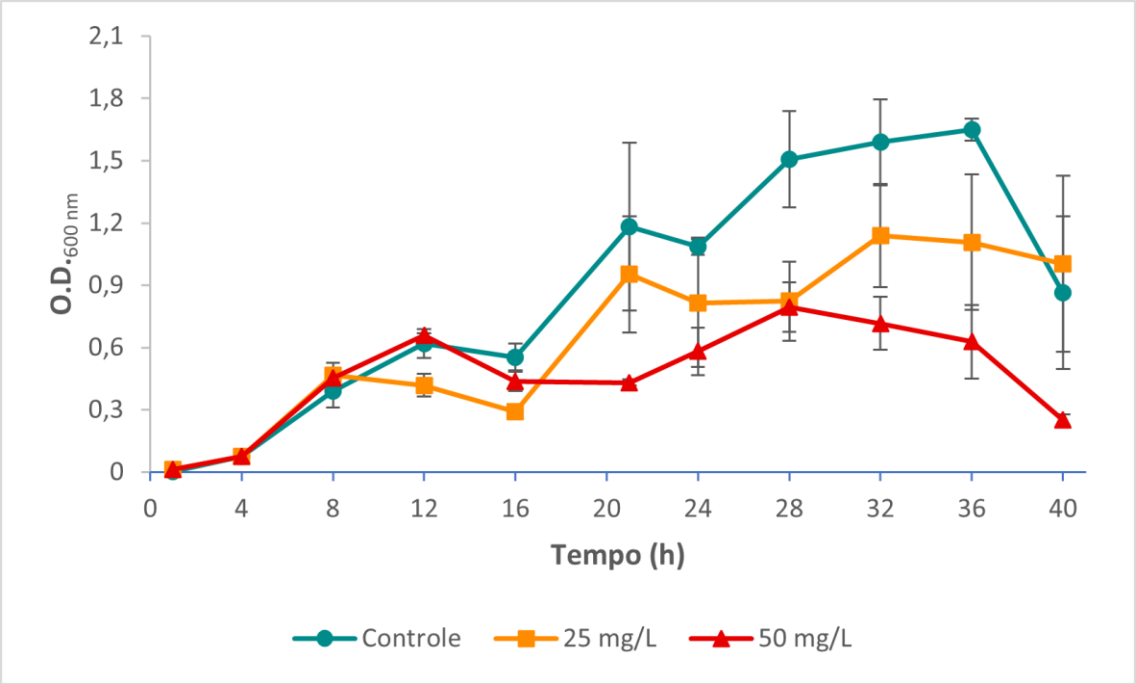


Figura 1. Perfil de crescimento do *B. licheniformis* ISO 04, controle e tratamentos (Goal 25 mg/L e 50 mg/L) durante 40 h. Os valores são médias das absorbâncias e as barras corresponde ao Erro Padrão de três réplicas. Círculo preenchido (Meio nutriente e herbicida ausente), quadrado preenchido (25 mg/L de Goal) e triangulo preenchido (50 mg/L de Goal). $O.D._{600\ nm}$ = densidade ótica a 600 nanômetros.

De forma geral, observou-se uma leve redução nos valores de absorbância em comparação ao crescimento padrão do microrganismo, quando submetido à concentração de 25 mg L^{-1}, equivalente a 27,45% de inibição do crescimento. Também foi observada uma redução mais acentuada na concentração de 50 mg L^{-1}, correspondente a 46,03% de inibição do crescimento celular. A partir da curva de crescimento, é possível inferir que, à medida que a concentração do xenobiótico aumenta, a taxa de crescimento é reduzida.

3.2 Indução de alterações no perfil proteômico de *B. licheniformis* por oxifluorfeno

Um total de 3446 proteínas foram identificadas (representando cerca de 82,75% da capacidade total de codificação do genoma de *B. licheniformis*). Na comparação das células não expostas com as células expostas ao oxifluorfeno sob uma concentração de 25 mg L^{-1}, 51 proteínas foram acumuladas diferencialmente, das quais 10 aumentadas e 41 reduzidas. Já na comparação das células não expostas com as células expostas ao mesmo herbicida sob uma concentração de 50 mg L^{-1}, 46 proteínas foram acumuladas diferencialmente, 10 aumentadas e

36 reduzidas. O diagrama de Venn, por sua vez, demonstra os elementos em comum e exclusivos entre o grupo controle e os grupos tratamentos (Figura 2, Figura 3).



Figura 2. Diagrama de Venn mostrando as proteínas compartilhadas e exclusivas dos grupos controle e tratamentos (25 mg/L e 50 mg/L de oxifluorfeno).

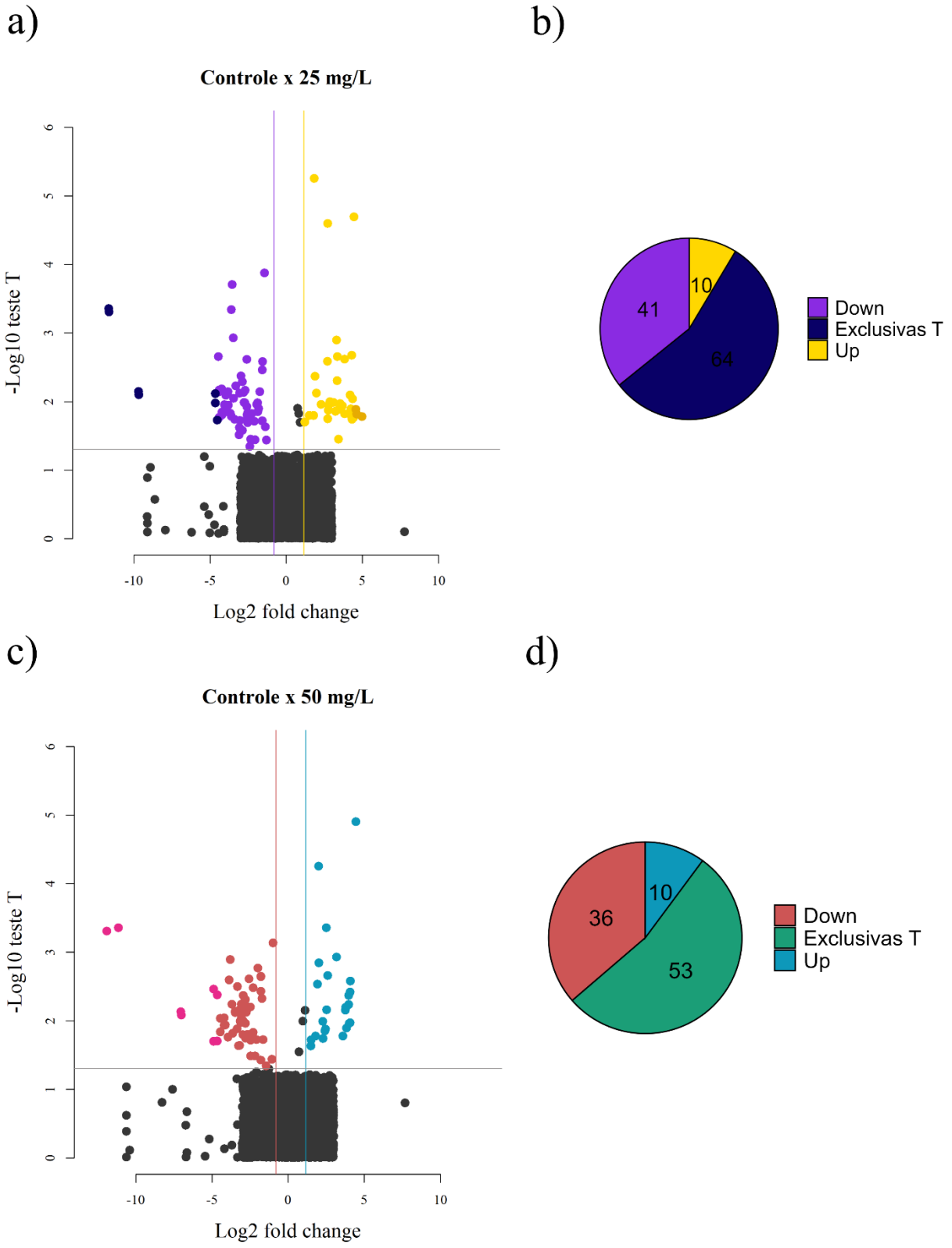


Figura 3. Alterações induzidas por concentrações de 25 e 50 mg/L de oxifluorfeno no perfil proteômico de *B. licheniformis* ISO 04. Os gráficos de *volcano plot* de todas as proteínas identificadas (a) e (c) e as representações gráficas das quantidades de proteínas diferencialmente expressas (DAPs) aumentadas, reduzidas e exclusivas (b) e (d). As manchas representam a variação relativa (log_2 fold change) de proteínas identificadas em função de significância estatística ($-log_{10}$ teste T). Manchas em amarelo representam proteínas aumentadas e proteínas

exclusivas, enquanto manchas em roxo representam proteínas reduzidas e proteínas exclusivas. Proteínas discrepantes reduzidas foram representadas por manchas azul escuro, enquanto proteínas discrepantes aumentadas foram representadas por manchas laranja (a). Manchas em azul claro representam proteínas aumentadas e proteínas exclusivas, enquanto manchas em vermelho representam proteínas reduzidas e proteínas exclusivas. Proteínas discrepantes reduzidas foram representadas por manchas rosa (c).

Foi possível observar também 12 proteínas exclusivas em células bacterianas expostas a uma concentração de 25 mg L^{-1} de oxifluorfeno, entre as quais: uma *subunidade B* da DNA *girase* (A0A0C5C9H9), uma *O-succinilbenzoato sintase* (A0A0D1JLW2), uma *componente de di-hidrolipoamida acetiltransferase do complexo piruvato desidrogenase* (A0A0D1IMJ6), duas *proteínas de quimiotaxia aceptoras metil* (A0A8B5YG28), uma *proteína de ligação a GTP* (A0A415JFV3), uma *proteína de síntese de cobalamina/proteína da família P47K* (Q62UU0), uma *3-isopropilmalato desidrogenase* (A0A0D1L4C8), uma *subunidade beta da ligase succinato-CoA* (A0A0C5C4W8), duas *N-acetilmuramoil-L-alanina amidase* (A0A0D1L472) e uma *Proteína contendo domínio RelA/SpoT* (A0AAN0T5V5).

No entanto, uma *alfa-acetolactato descarboxilase* (E7EIH6) foi observada exclusivamente em células de *B. licheniformis* ISO 04 expostas a uma concentração de 50 mg L^{-1} de herbicida. Além disso, cerca de 3232 proteínas exclusivas foram observadas em células do grupo controle, não expostas ao composto éter difenílico, e 52 proteínas em comum (sobrepostas) nas duas concentrações também foram observadas.

A Análise de Componentes Principais (PCA), feita a partir da abundância de proteínas em cada amostra biológica, revelou que o tratamento com o oxifluorfeno, independentemente da concentração aplicada, alterou o perfil global de proteínas comparado ao controle. Tanto as repetições biológicas submetidas à concentração de 25 mg L^{-1} quanto as repetições submetidas à concentração de 50 mg L^{-1} mantiveram-se agrupadas numa mesma região, demonstrando baixa variância entre si. Diferentemente do grupo controle, em que cada ponto referente a uma amostra biológica se separou dos demais que receberam o mesmo tratamento e dos grupos cultivados na presença do xenobiótico, mostrando grande variação. O primeiro componente principal é responsável por 51,5% da variância, e o segundo componente principal é responsável por 23,4% da variância (Figura 4).

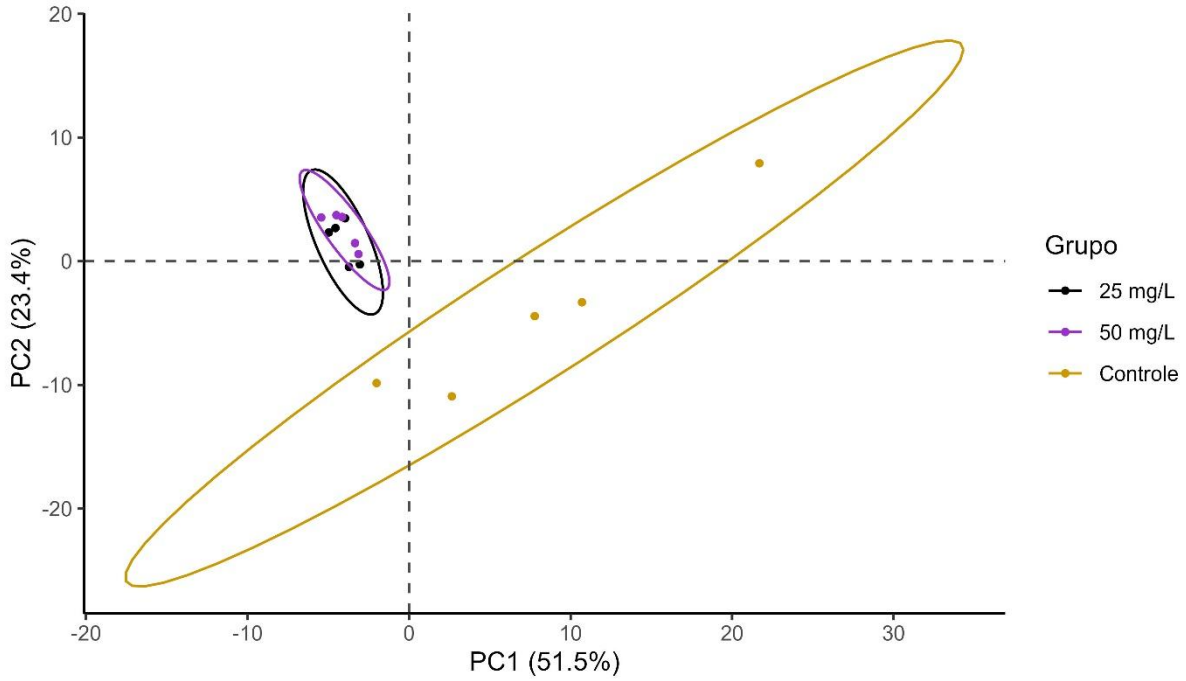


Figura 4. Análise de Componentes Principais da abundância de proteínas que diferenciam entre o grupo controle e os grupos tratamentos (25 mg/L e 50 mg/L de oxifluorfeno).

3.3 Principais grupos de proteínas regulados em *B. licheniformis* em resposta ao oxifluorfeno

Nas análises proteômicas, foram identificadas proteínas candidatas que podem mediar tanto a adaptação quanto a degradação do oxifluorfeno em células de *B. licheniformis* ISO 04. Essas proteínas foram organizadas em categorias funcionais, conforme seu papel biológico principal descrito na literatura. Os principais grupos de proteínas observados foram relacionados ao metabolismo central e energético, resposta ao estresse e manutenção celular, biossíntese de cofatores e aminoácidos, funções relacionadas a ribossomos, à tradução e a proteínas de transporte.

3.3.1 Metabolismo central e energético

Treze proteínas associadas ao metabolismo central e energético foram infrarreguladas nas células bacterianas expostas às duas concentrações do herbicida. Uma delas foi a *subunidade alfa da ATP sintase - atpA* (A0A0C5CI62), pertencente ao complexo ATP sintase, essencial para a conservação de energia por meio da síntese e hidrólise de ATP. Também foram infrarreguladas quatro *enolase - eno* (A0A1Y0YSR3, A0A0D1KBI9, A0A6I1M7E8 e Q65EN2), que participam da penúltima etapa das principais vias da glicólise, catalisando o

ácido 2-fosfoglicérico em fosfoenolpiruvato. Uma *subunidade alfa da ligase succinato-CoA - sucD* (A0A0C5CPQ1) também foi sub-regulada, constituinte da enzima *succinil-CoA*, que, por sua vez, participa de processos catalíticos reversíveis dentro do ciclo do ácido cítrico.

Outras proteínas que também foram reduzidas, quatro *malonato-semialdeído desidrogenase - iolA* (A0A415JF84, A0A7Z1B2A6, A0AAW6KCM3 e Q65IX1), responsável por catalisar a oxidação de malonato-semialdeído e metilmalonato semialdeído em acetil-CoA, fornecendo este produto para o ciclo do ácido cítrico. Três *2-metilcitrato desidratase* (A0A1Y0XPU5, A0A7Z0WZD9 e A0AAW6K7V5) e uma *2-metilisocitrato desidratase – mmgE* (Q65DF6), que estão envolvidas no ciclo do ácido metilcítrico, uma rota alternativa ao ciclo de Krebs para metabolizar o propionato.

Em contrapartida, as proteínas *subunidade alfa da ligase succinato-CoA – sucD* (A0A0C5CPQ1), *2-metilcitrato desidratase* (A0A1Y0XPU5) e a *2-metilisocitrato desidratase – mmgE* (Q65DF6) não apresentaram abundância diferencial no tratamento com herbicida a 50 mg L^{-1} em relação ao controle.

3.3.2 Resposta ao estresse e manutenção celular

Doze proteínas associadas à resposta ao estresse de substâncias nocivas foram reguladas. Dentre elas, cinco *chaperonina GroEL – groEL* (A0A0C3EQZ3, A0A0C5C6W2, A0A1Y0YPC3, A0A6I1MGT5 e Q65MZ8), que desempenham um papel importante ao auxiliar o dobramento de proteínas em condições normais e de estresse, foram reduzidas apenas na concentração de 25 mg L^{-1} de oxifluorfeno, enquanto na concentração de 50 mg L^{-1} não foram reguladas. Cinco *ATPase relacionadas à resposta ao estresse de classe III – clpC* (A0A6I7TTL1, A0A0D1KVK5, A0A1Y0YA38, Q65PD6 e A0A0D1L930) e uma *ATPase AAA* (A0A0C5CDS2) foram reduzidas nas duas concentrações (25 e 50 mg L^{-1}).

Todavia, apenas a *ATPase* relacionada à resposta ao estresse de classe III – *clpC* (A0A0D1L930) não foi regulada quando as células de *B. licheniformis* ISO 04 foram expostas à concentração de 25 mg L^{-1}. As proteínas caseinolíticas Clp e *ATPase AAA* desempenham um papel crucial na homeostase proteica e no controle de qualidade, atuando na degradação de proteínas danificadas ou agregadas. Uma proteína *MreB* determinante da forma celular – *mreB* (A0A0C5C6F0), foi regulada positivamente quando a bactéria foi submetida às duas concentrações de oxifluorfeno. Essa proteína atua regulando a síntese da parede celular e o alongamento celular; consequentemente, faz parte da formação característica estrutural do *Bacillus*.

3.3.3 Biossíntese de cofatores e aminoácidos

Cinco proteínas relacionadas à biossíntese de cofatores e aminoácidos foram reguladas. Três *glutamato-1-semialdeído 2,1-aminomutase – hemL/hemL2* (Q65GK4, A0A6N2GY10 e A0A8B5YB83) foram reguladas negativamente nas duas concentrações testadas em células de *B. licheniformis* ISO 04. Essa enzima participa da via C5 alternativa, que, por sua vez, é relevante para a síntese das porfirinas, para a produção de vitamina B12 e cofatores.

Uma *serina hidroximetiltransferase – glyA* (A0A0C5BYN6) foi suprarregulada. A *glyA* é uma enzima dependente de piridoxal 5'-fosfato (PLP), essencial na síntese de pirimidina, purina e aminoácidos, além de participar de múltiplas vias metabólicas que estão a jusante do metabolismo de um carbono (1C). Uma *isocitrato desidrogenase dependente de NADP – icd* (A0A0C5C637) também foi regulada positivamente. Essa enzima é responsável por catalisar a descarboxilação oxidativa do isocitrato em α-cetoglutarato no ciclo do ácido tricarboxílico. Tanto a *glyA* quanto a *icd* foram reguladas nos dois tratamentos.

3.3.4 Funções relacionadas a ribossomos e tradução

Oito proteínas envolvidas no processo de tradução também foram reguladas pelo estresse provocado por herbicida éter difenílico, em células de *B. licheniformis* ISO 04, nas concentrações de 25 e 50 mg L^{-1}. Quatro *proteínas de subunidade ribossômica grande uL5 – rplE* (A0A0D1IMB7, A0A1Y0YA80, A0A6I7TTH5 e Q65P95) foram suprarreguladas. A subunidade uL5 é componente integrante da grande subunidade ribossômica (LSU), também do rRNA 5S, e é essencial na síntese de proteínas.

Proteínas membros da família GTPase, responsáveis por catalisar a ligação de aminoacil-tRNA (aa-tRNA) ao ribossomo pela hidrólise de GTP a GDP, de modo inverso, foram infrarreguladas: quatro *fator de alongamento Tu – tuf* (A0A1Y0YJC6, A0A6I7TMM9, Q65PA9 e M4PLV2), que estão envolvidas no processo de fornecimento de aminoácidos para o alongamento de proteínas recém-sintetizadas.

3.3.5 Transporte

Três transportadores de membrana foram regulados positivamente pelo estresse em células bacterianas nas duas concentrações propostas de oxifluorfeno: um *transportador ABC de aminoácidos – yknU* (A0A6I7U111), uma proteína extracelular de ligação à arginina *ArtP* (A0A8B5YHA5) e uma proteína contendo domínio de ligação ao substrato transportador (A0AAW6KFN9). Tais proteínas transmembranas são conhecidas como transportadores de cassete de ligação de ATP (ABC), comumente envolvidas na captação e efluxo de solutos por meio da membrana celular, que podem ser compostos como aminoácidos, oligossacarídeos, açúcares, íons metálicos e moléculas xenobióticas.

3.4 Análise GO de proteínas diferencialmente expressas e exclusivas de *B. licheniformis* na degradação de oxifluorfeno

De acordo com a análise de *Gene Ontology* (GO) das proteínas diferencialmente acumuladas e exclusivas de *B. licheniformis* ISO 04 no processo catabólico do oxifluorfeno, foi possível atribuir determinadas classes para algumas proteínas em consonância com categorias de Componente Celular (CC) (Figura 5), Função Molecular (FM) (Figura 6) e Processo Biológico (PB) (Figura 7).

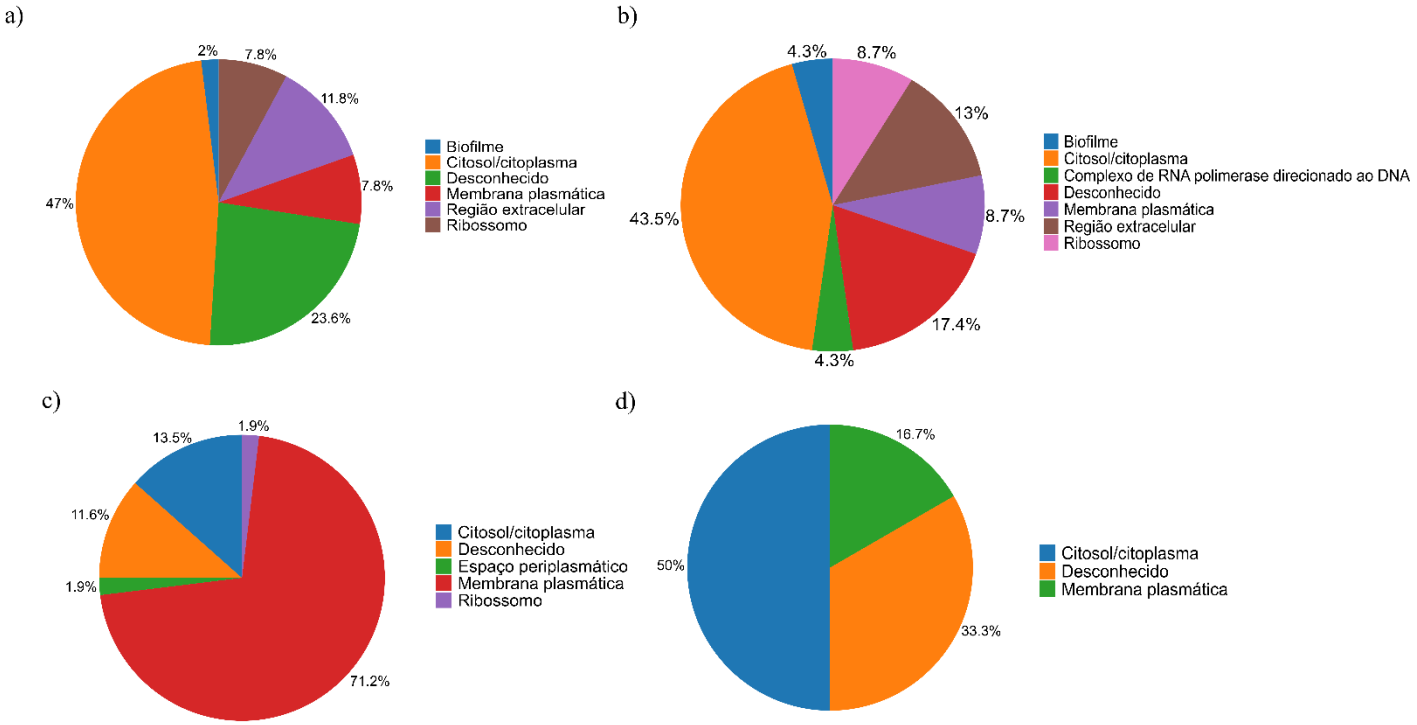


Figura 5. Análise de *Gene ontology* (GO) quanto ao Componente Celular de proteínas expressas de forma diferente e exclusivas de *B. licheniformis* ISO 04 no processo catabólico do oxifluorfeno em concentrações de 25 e 50 mg L^{-1}, expresso em porcentagem. Proteínas sobrepostas entre o grupo controle e o grupo tratado com 25 mg L^{-1} (a). Grupo controle e o grupo tratado com 50 mg L^{-1} (b). Grupo tratado com 25 mg L^{-1} e o grupo tratado com 50 mg L^{-1} (c). Proteínas exclusivas do grupo tratado com 25 mg L^{-1} (d).

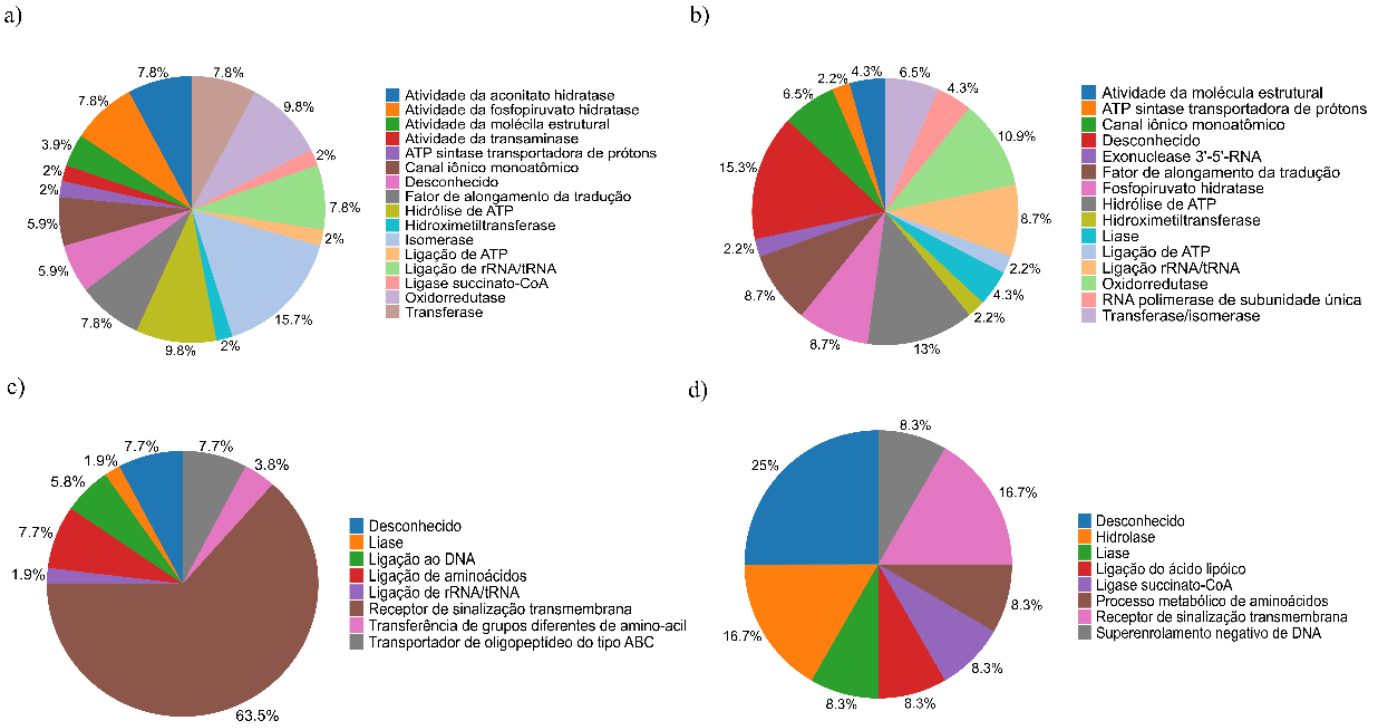


Figura 6. Análise de *Gene ontology* (GO) quanto a Função Molecular de proteínas expressas de forma diferente e exclusivas de *B. licheniformis* ISO 04 no processo catabólico do oxifluorfeno em concentrações de 25 e 50 mg L^{-1}, expresso em porcentagem. Proteínas sobrepostas entre o grupo controle e o grupo tratado com 25 mg L^{-1} (a). Grupo controle e o grupo tratado com 50 mg L^{-1} (b). Grupo tratado com 25 mg L^{-1} e o grupo tratado com 50 mg L^{-1} (c). Proteínas exclusivas do grupo tratado com 25 mg L^{-1} (d).

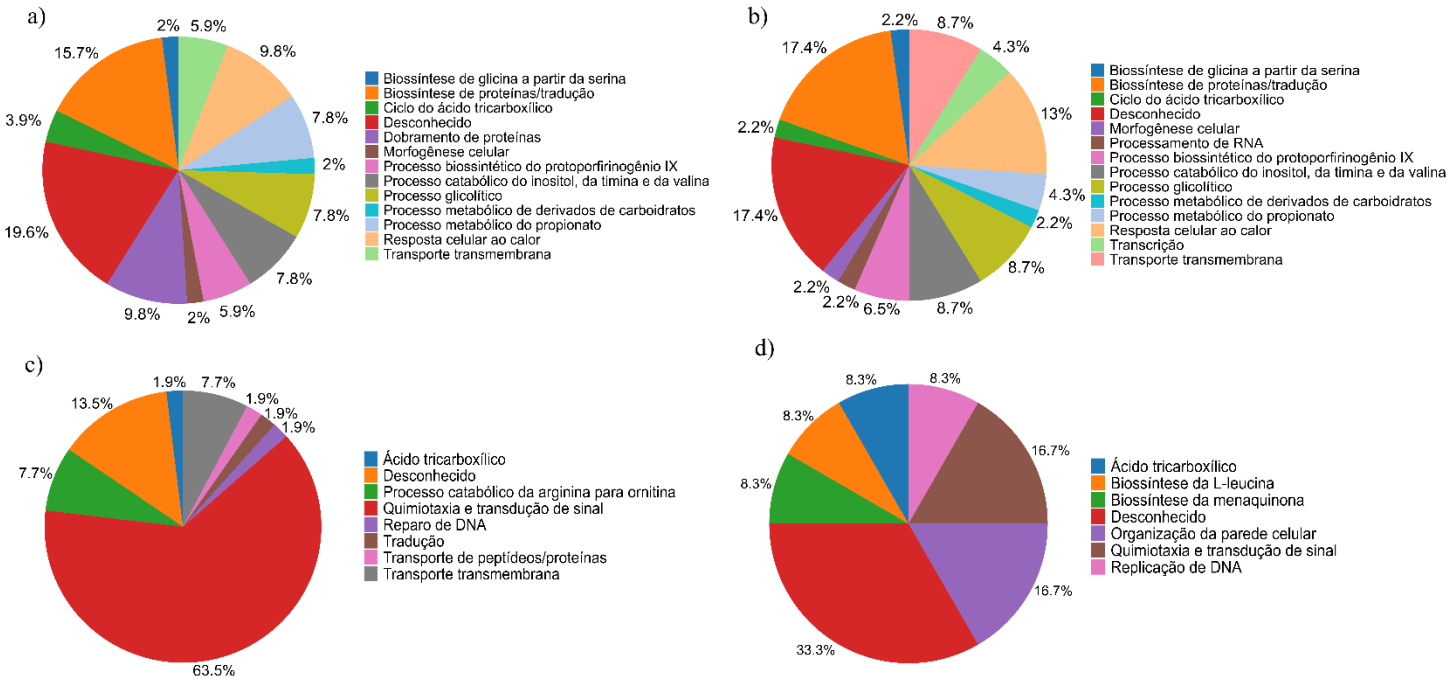


Figura 7. Análise de *Gene ontology* (GO) quanto ao Processo Biológico de proteínas expressas de forma diferente e exclusivas de *B. licheniformis* ISO 04 no processo catabólico do oxifluorfeno em concentrações de 25 e 50 mg L^{-1}, expresso em porcentagem. Proteínas sobrepostas entre o grupo controle e o grupo tratado com 25 mg L^{-1} (a). Grupo controle e o grupo tratado com 50 mg L^{-1} (b). Grupo tratado com 25 mg L^{-1} e o grupo tratado com 50 mg L^{-1} (c). Proteínas exclusivas do grupo tratado com 25 mg L^{-1} (d).

A única proteína exclusiva expressa na concentração de 50 mg L^{-1} foi categorizada no processo biológico da biossíntese da acetoína e na função molecular da descarboxilase, não havendo classificação para componente celular.

3.5 Análise de enriquecimento das vias metabólicas de proteínas diferencialmente expressas e exclusivas no processo de biodegradação do oxifluorfeno por *B. licheniformis*

Uma análise da via *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) foi realizada para investigar as vias metabólicas das proteínas diferencialmente abundantes de células expostas às concentrações de 25 e 50 mg L^{-1} de herbicida. Apesar de um pequeno número de proteínas terem sido mapeadas em treze principais vias, as mais representativas foram a "Degradação de RNA", seguido pelo "Metabolismo microbiano em ambientes diversos", "Metabolismo do carbono" e "Metabolismo do propanoato" (Figura 8).

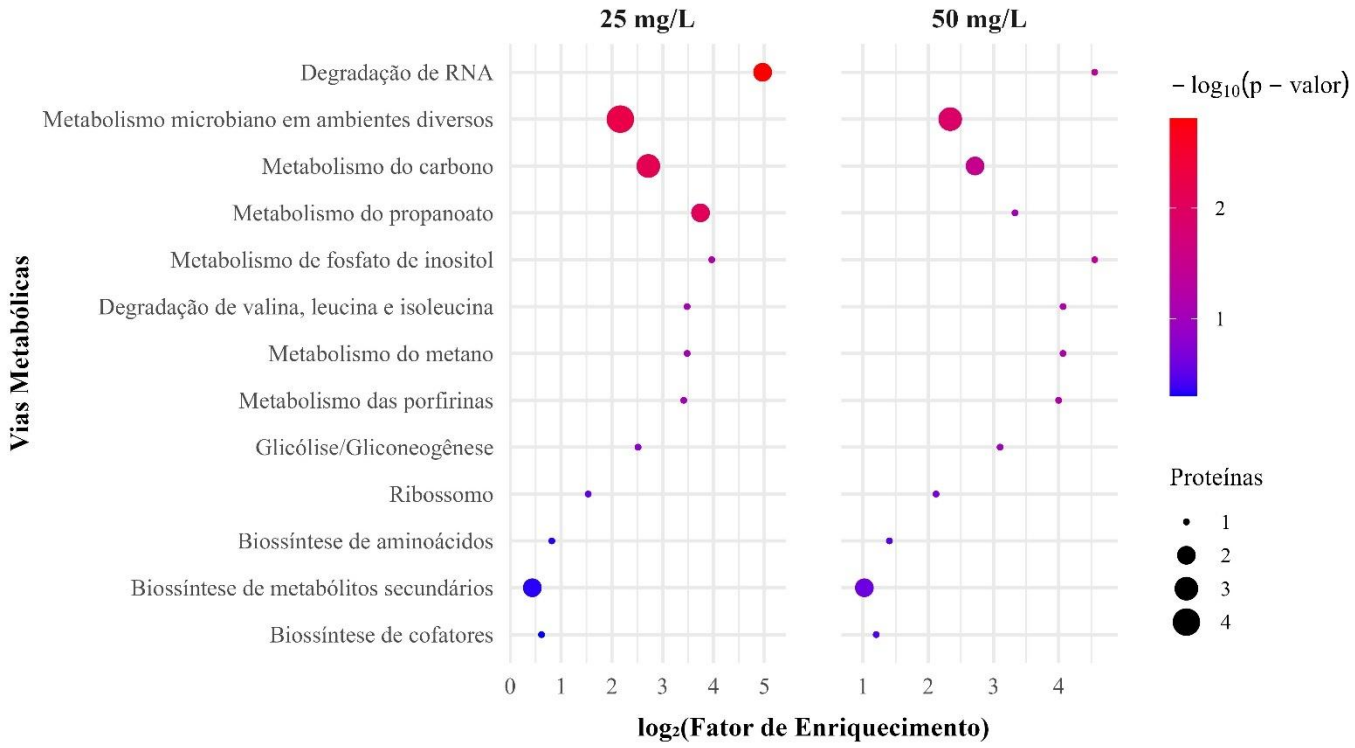


Figura 8. Análise de enriquecimento de vias (KEGG) de proteínas diferencialmente expressas no processo de degradação do oxifluorfeno em concentrações de 25 e 50 mg/L por *B. licheniformis* ISO 04.

Em seguida, a análise das vias KEGG, realizada com as proteínas exclusivas de *B. licheniformis* ISO 04 exposto ao agroquímico nas concentrações de 25 e 50 mg L^{-1}, revelou que, das seis vias metabólicas microbianas mapeadas, as mais representadas foram da "Quimiotaxia bacteriana", "Sistema de dois componentes" e "Biossíntese de arginina" (Figura 9).

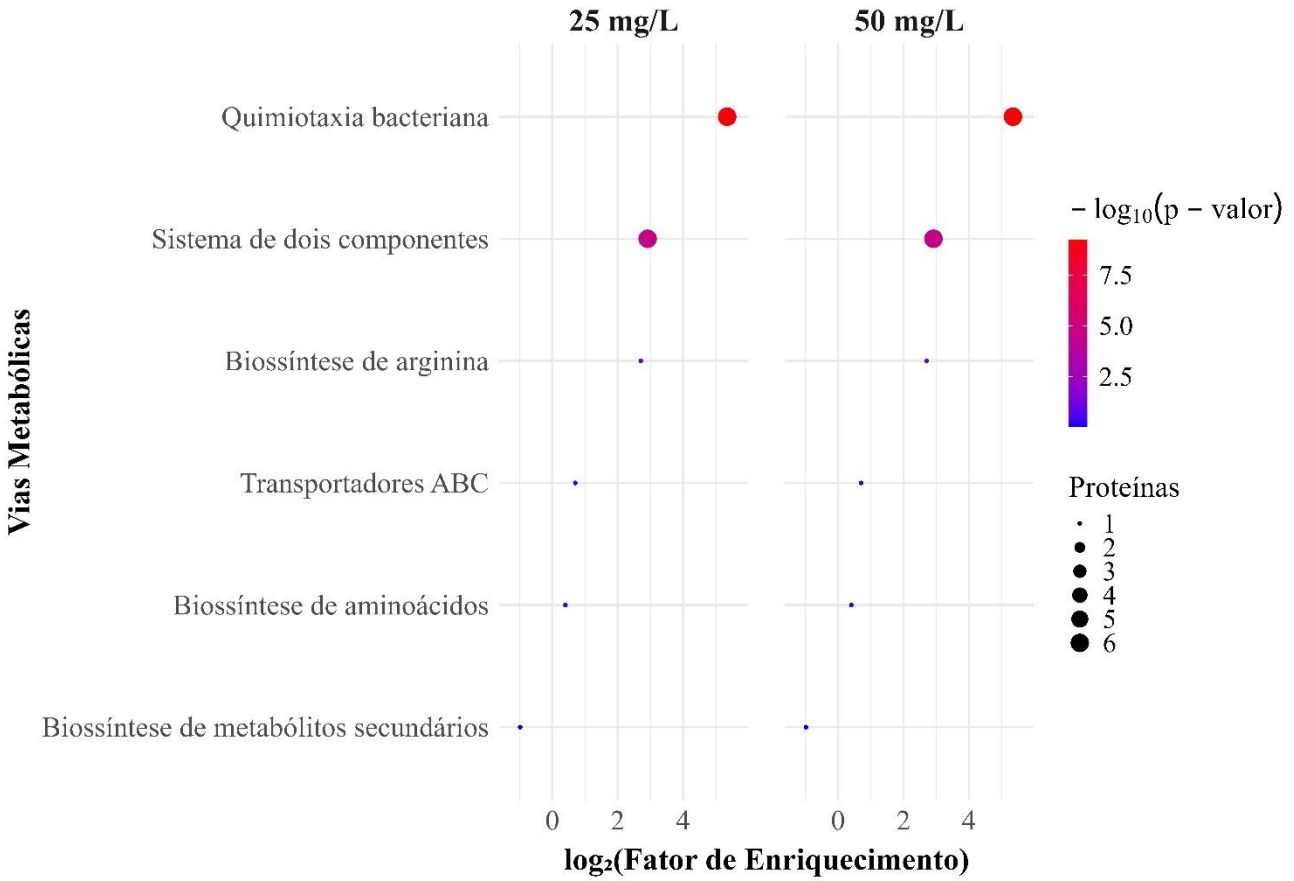


Figura 9. Análise de enriquecimento de vias (KEGG) de proteínas exclusivas no processo de degradação do oxifluorfeno em concentrações de 25 e 50 mg/L por *B. licheniformis* ISO 04.

3.6 Rede de interação proteína-proteína sobre vias-chave na degradação de oxifluorfeno por *B. licheniformis*

A rede de enriquecimento da via KEGG por STRING para proteínas diferencialmente expressas (DAPs) resultou no enriquecimento de processos biológicos de quimiotaxia bacteriana, ciclo do citrato, metabolismo do carbono, metabolismo bacteriano em ambientes diversos, biossíntese de metabólitos secundários e metabolismo do ácido dibásico ramificado C5.

Na rede de interação proteína-proteína prevista, as proteínas identificadas como a *subunidade alfa da ligase succinato-CoA* (A0A0C5CPQ1), *isocitrato desidrogenase dependente de NADP* (A0A0C5C637), *malonato-semialdeído desidrogenase* (Q65IX1), *serina hidroximetiltransferase* (A0A0C5BYN6) e *enolase* (Q65EN2), relacionadas aos processos biológicos que foram enriquecidos, foram acumuladas em células de *B. licheniformis* ISO 04

sob influência do oxifluorfeno a 25 mg L^{-1} e mostraram interações com outras proteínas identificadas.

Por conseguinte, estão envolvidas nos processos do ciclo do citrato, metabolismo do carbono, biossíntese de metabólitos secundários, metabolismo bacteriano em ambientes diversos e metabolismo do ácido dibásico ramificado C5. Proteínas únicas participantes das mesmas vias preditas, como a componente de *di-hidrolipoamida acetiltransferase do complexo piruvato desidrogenase* (A0A0D1IMJ6), *subunidade beta da ligase succinato-CoA* (A0A0C5C4W8), *fumarato hidratase classe II* (A0AAN0T8N9) e *3-isopropilmalato desidrogenase* (A0A0D1L4C8) também realizaram interações diretas com as proteínas mencionadas anteriormente e com outras diversas (Figura 10).

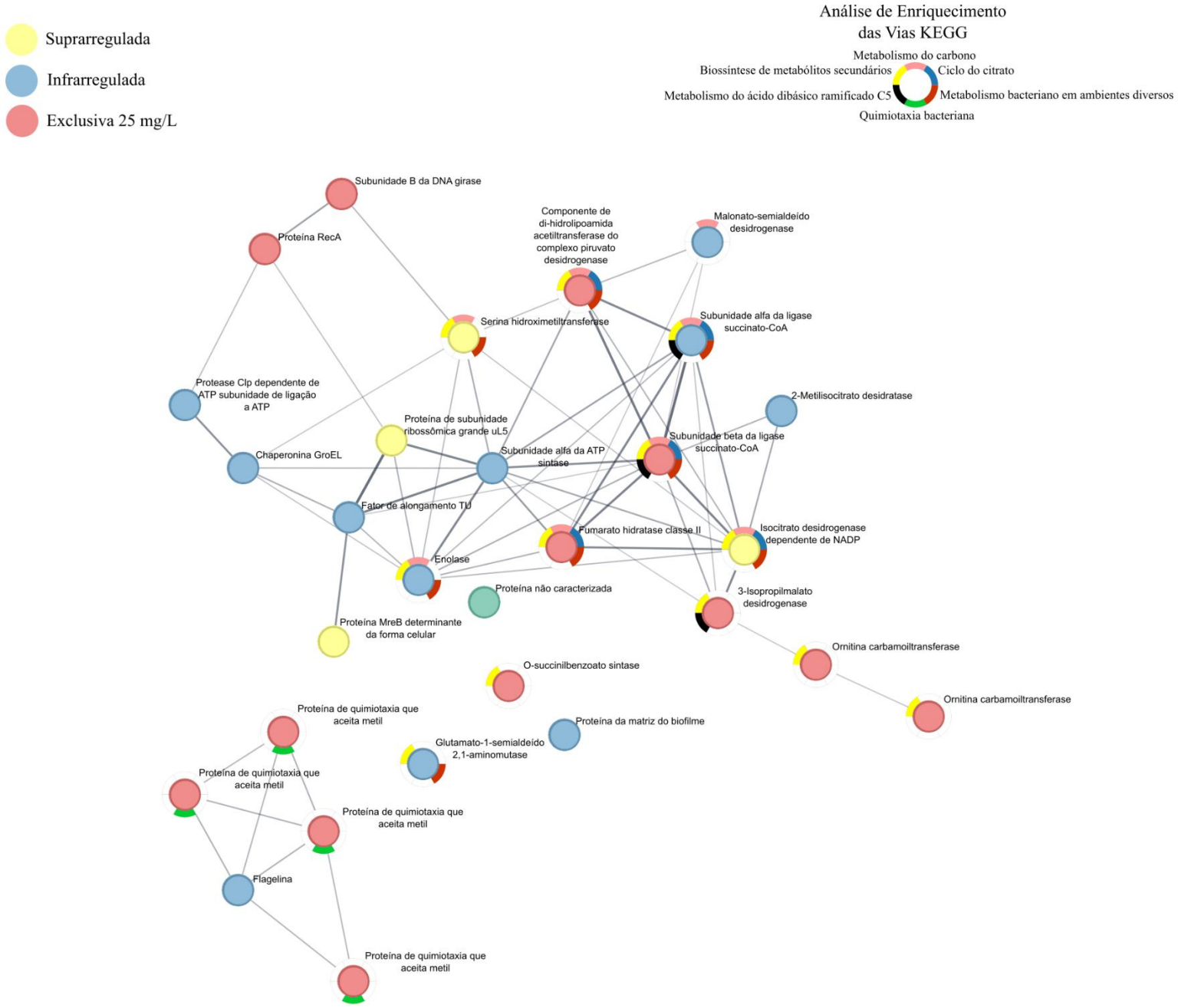


Figura 10. Rede de interação proteína-proteína entre DAPs e exclusivas identificadas em células de *B. licheniformis* ISO 04 após 32 h de cultivo com 25 mg L^{-1} de oxifluorfeno em comparação a cultivo sem o herbicida.

Na rede de interação entre proteínas das células tratadas com 50 mg L^{-1} do agroquímico, as proteínas identificadas como proteína de quimiotaxia aceptora de metil (Q65NJ1, Q65IP6, Q65FN5 e Q65FN4), relacionadas ao processo biológico de quimiotaxia bacteriana, foram acumuladas exclusivamente em células de *B. licheniformis* sob influência do oxifluorfeno a 50 mg L^{-1} e, demonstraram interação com a *flagelina* (A0A0C3LSR1).

As demais proteínas não foram enriquecidas nessa segunda rede de interação. No entanto, é possível observar proteínas hub, atuando como pontos centrais, como o *fator de alongamento TU* (Q65PA9), *subunidade alfa da ATP sintase* (A0A0C5CI62), *enolase* (Q65EN2), *subunidade beta da RNA polimerase direcionada ao DNA* (A0A0D1JCZ7), *proteína RecA* (A0A0C5CPF9) e *proteína de subunidade ribossômica grande uL5* (Q65P95), interagindo com várias proteínas adjacentes (Figura 11).

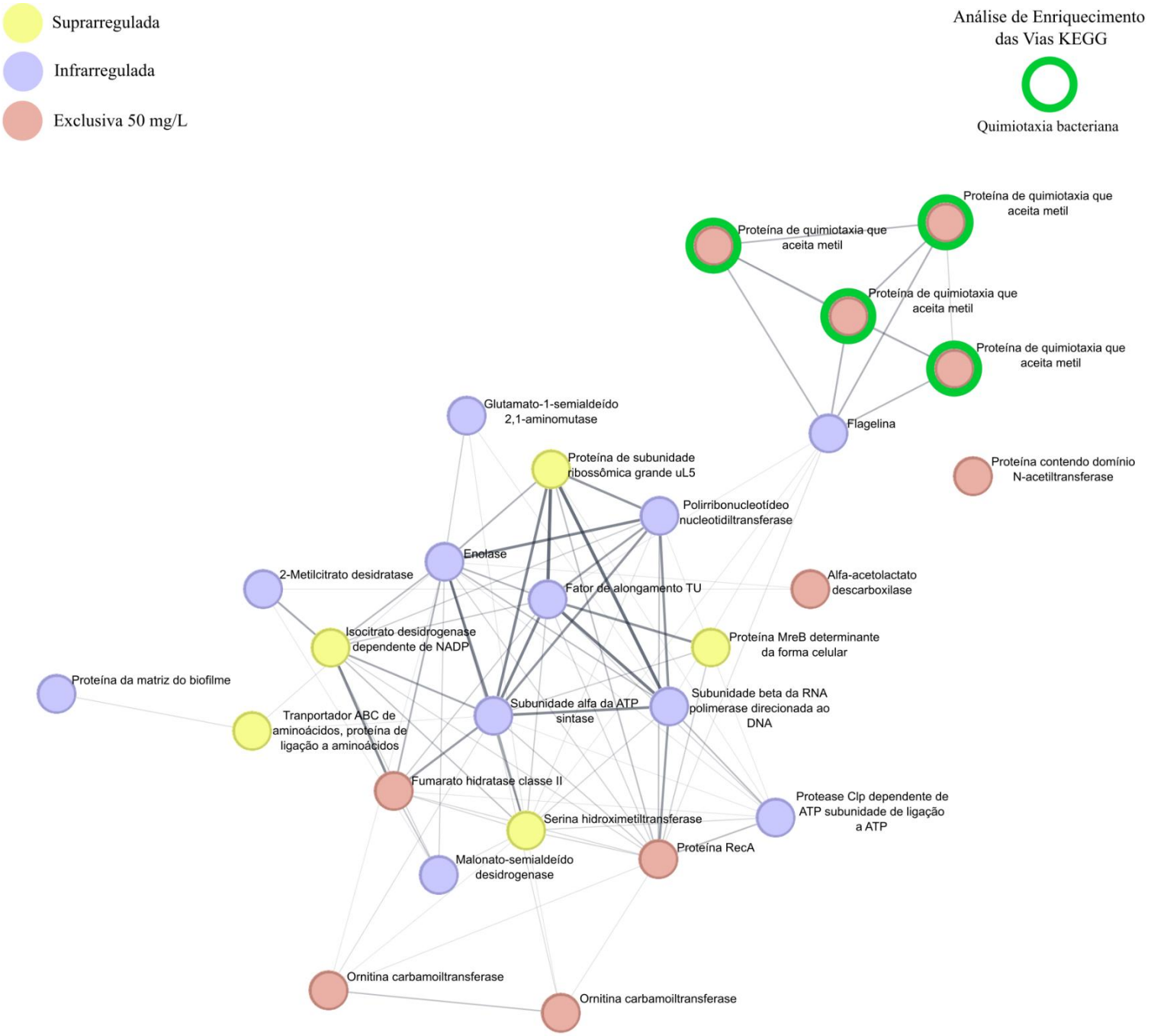


Figura 11. Rede de interação proteína-proteína entre DAPs e exclusivas identificadas em células de *B. licheniformis* ISO 04 após 32 h de cultivo com 50 mg L^{-1} de oxifluorfeno em comparação a cultivo sem o herbicida.

4 DISCUSSÃO

No presente estudo, a análise de curva de crescimento e proteômica permitiram identificar alterações comportamentais e os principais grupos proteicos envolvidos na degradação do oxifluorfeno mediada pelo *B. licheniformis* ISO 04.

O perfil de crescimento aqui evidenciado também foi relatado por Felshia *et al*. (2020), ao monitorar o crescimento da cepa *B. licheniformis* SL10 na presença do herbicida 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), utilizando diferentes níveis de concentração. Os autores demonstraram que, a partir de 50 ppm, ocorre um declínio na densidade celular bacteriana, reforçando os dados aqui apresentados.

Dessa forma, é perceptível a necessidade de uma maior quantidade de células bacterianas para metabolizar rapidamente o herbicida presente no meio. Comumente, uma fase lag prolongada está associada a um maior tempo de aclimatação, necessário para a expressão de enzimas degradativas envolvidas nesse processo (Xiao *et al*., 2015). No entanto, o período de latência da cepa ISO 04 foi significativamente menor em comparação com diversas cepas bacterianas degradadoras, como *B. licheniformis* BL010 (Wang *et al*., 2018), *B licheniformis* NKC-1 (Pujar *et al*., 2018), *B. licheniformis* B-1(Hu *et al*., 2020), *Chryseobacterium aquifrigidense* R-21 (Zhao *et al*., 2016) e *Pseudomonas zeshuii* BY-1 (Feng *et al*., 2012).

Sendo assim, é possível inferir que o tempo de resposta da cepa estudada na presença do oxifluorfeno é consideravelmente curto, mesmo diante de uma alta concentração inicial do herbicida, quando comparado aos tempos de resposta das demais cepas mencionadas anteriormente. Vale destacar, ainda, que o desenvolvimento celular em diferentes concentrações sugere que o microrganismo é capaz de utilizar o composto éter difenílico como fonte de carbono ou nitrogênio para seu crescimento e metabolismo (Fan *et al*., 2024).

Reginaldo (2023) também evidenciou a capacidade de *B. licheniformis* ISO 04 em degradar o oxifluorfeno a uma taxa de 69% em um período de 192 horas, sob concentração de 100 mg L^{-1}. Todavia, neste estudo, apresentamos seu perfil de crescimento sob outras concentrações do herbicida.

Para compreender os mecanismos moleculares da resposta bacteriana envolvida no processo metabólico de compostos agroquímicos, ferramentas proteômicas têm sido amplamente empregadas (Wang; Lu; Chen, 2008; Gangola *et al*., 2021; Aswathi *et al*., 2021; Zhao *et al*., 2021). No presente estudo, foram observadas nas análises proteômicas diversas

alterações no perfil proteico de *B. licheniformis* ISO 04, como uma pequena variedade de proteínas suprarreguladas presentes na membrana plasmática, como os transportadores *yknU*, proteínas extracelulares de ligação à arginina *ArtP*, proteínas contendo domínio de ligação ao substrato transportador e *MreB*. São proteínas com atividade de hidrolase comumente utilizadas para transportar diversos substratos através da membrana plasmática para a região intracelular, nesse caso, o oxifluorfeno (Wang; Lu; Chen, 2008; Zhang *et al*., 2024).

As proteínas transportadoras, associadas com demais proteínas de membrana, são potenciais indicadoras de adaptação, atenuação de estresse provocado por compostos xenobióticos, bem como de sua utilização como fonte de energia; o qual já foi observado em *Pseudomonas nitroreducens* AR-3 no processo de degradação do pesticida clorpirifós (Aswathi *et al*., 2021). As proteínas de quimiotaxia aceptoras de metil como as *tlpA*, *tlpB*, *mcpA* e *mcpB* fazem parte da via de quimiotaxia bacteriana e do sistema de dois componentes, segundo nossas análises; funcionam como quimiorreceptores, enviando sinais que regulam a autofosforilação da histidina quinase *CheA*, gerando uma fosfohistidina que serve como doadora de fosfato para o regulador de resposta *CheY*.

O *CheY* fosforilado transfere esse grupo ao resíduo de aspartato conservado, formando *CheY-P*, que se liga ao câmbio de sentido do motor flagelar, que por sua vez pode ter direcionado o *B. licheniformis* ISO 04 a favor do gradiente químico do meio de cultivo (Wang *et al*., 2020; Liu *et al*., 2025), induzindo a alta expressão dos *transportadores ABC*. Neste estudo conseguimos identificar como proteína exclusiva uma *appA* presente no espaço periplasmático; essa permeasse utilizada para importar oligopeptídeos (5 – 10 AA), é comumente utilizada por *B. subtilis* na comunicação célula-célula por meio de sistemas *quorum-sensing*, que codificam peptídeos utilizados por bactérias adjacentes como moléculas sinalizadoras, que, por sua vez, interagem com seu receptor, modificando a expressão genética bacteriana de forma direta ou indireta (Bareia *et al*., 2023).

Sendo assim, foi possível inferir que o *B. licheniformis* ISO 04, no solo, é capaz de produzir e liberar peptídeos sinalizadores, que são acumulados no meio e, consequentemente, detectados por outras bactérias quando expostos ao oxifluorfeno. Isso permite uma reação coletiva, com alteração de densidade celular, composição e resposta enzimática, que, de antemão, já observamos. Isso torna necessário análises mais aprofundadas, como do secretoma, para melhor compreensão dessa comunicação intercelular (Aframian; Eldar, 2020; Hellinger *et al*., 2023).

Proteínas da família *TetR*/*AcrR*, que atuam como reguladores transcricionais negativos, foram expressas exclusivamente em células expostas ao oxifluorfeno, independente da concentração. Proteínas reguladoras *AcrR* atuam na regulação de genes que comumente estão associados ao estresse osmótico, síntese de antibióticos, bombeamento de efluxo e quebra de poluentes (Xu *et al*., 2024). Essas proteínas já foram observadas de forma detalhada em *P. putida* S16, regulando o processo de degradação da nicotina, e em *Alcaligenes faecalis* e da degradação do dimetilsulfoniopropionato (Wang *et al*., 2014; Xu *et al*., 2024). É possível inferir que, em *B. licheniformis* ISO 04, o processo de degradação do oxifluorfeno e a expressão enzimática possa ter sido regulado por essas proteínas.

Apesar disso, das diversas proteínas reguladas em resposta ao estresse, aproximadamente 80%, foram reguladas negativamente na presença do herbicida éter difenílico, independentemente da concentração. A *clpC,* dependente de ATP, é uma subunidade de protease caseinolítica, participante do complexo proteolítico *ClpCP,* que são altamente conservadas em bactérias Gram-positivas. Atuam no controle de qualidade da proteína e são responsivas ao estresse geral (Queraltó *et al*., 2023).

Em nossas análises, observamos que as *clpC* de *B. licheniformis* ISO 04 foram reduzidas sob efeito do oxifluorfeno; de forma semelhante, essa resposta também foi observada em *P. nitroreducens* AR-3, quando exposto ao clorpirifós. Isso se deve ao fato de que as proteínas responsivas ao estresse auxiliarem as bactérias na desintoxicação de compostos estressantes (químicos), enquanto, em microrganismos degradantes, o herbicida precisa ser internalizado e utilizado como fonte de energia em ambientes com escassez de carbono (Aswathi *et al*., 2021).

Proteínas relacionadas ao metabolismo energético também foram reguladas negativamente, como a *atpA,* que faz parte do complexo ATP sintase e que, comumente, é utilizado como principal mecanismo de síntese de energia em bactérias (Ward *et al*., 2025). Já a *eno* participa de outras vias, a da glicólise/gliconeogênese, e comumente é observado seu acúmulo positivo em microrganismos degradantes de compostos orgânicos, como na cianobactéria *Anabaena* PD-1, no processo de degradação do policlorobifenil (PCB) (Zhang *et al*., 2014). No entanto, tanto a *atpA* quanto a *eno* foram reduzidas significativamente em células de *B. licheniformis* ISO 04, evidenciando que o oxifluorfeno prejudicou as principais vias de produção de energia.

Curiosamente, as enzimas candidatas a participarem do catabolismo do oxifluorfeno, devido à relação com a degradação de hidrocarbonetos aromáticos, foram significativamente

infrarreguladas. Além das duas proteínas mencionadas anteriormente, a *2-metilcitrato desidratase*, *mmgE* (metabolismo do propanoato) e *iolA* (metabolismo do carbono) comumente são superexpressas em microrganismos como *Corynebacterium glutamicum*, quando expostos a compostos metálicos (Ag^{+} e Co) (Fanous *et al*., 2010), em *P. putida* F1 na degradação do etilbenzeno e benzeno (Kasahara *et al*. 2012) e em *Collinsella* sp. zg1085 no catabolismo do floroglucinol (Li *et al*., 2024). Devido a capacidade dessas enzimas em converter os compostos intermediários de substâncias xenobióticas em acetil-CoA, que, em seguida, é direcionado para o metabolismo do carbono e energia.

Consequentemente, a *2-metilcitrato desidratase*, *mmgE*, *atpA*, *eno* e *iolA* não participam de forma direta da clivagem do oxifluorfeno em *B. licheniformis* ISO 04, mas talvez de seus intermediários. Para isso, seria necessário realizar análises de metabólitos provenientes do catabolismo desse herbicida.

Todavia, uma *O-succinilbenzoato sintase – MenC* (via da biossíntese de metabólitos secundários) foi expressa exclusivamente nas células bacterianas quando submetidas a uma concentração de 25 mg L^{-1} de herbicida. *MenC* é uma enzima participante do processo biossintético da menaquinona, mas possui a capacidade de se ligar a mais de um tipo de substrato e está relacionada à transformação e formação de benzoato. Já foi observada sendo superexpressa em *Aneurinibacillus aneurinilyticus* D-21 na degradação da ciflutrina (Copley, 2009; Yu *et al*., 2024). Consequentemente, *MenC* pode ser apontado como candidato a enzima catalisadora do oxifluorfeno, devido às características químicas dessa molécula.

A *alfa-acetolactato descarboxilase – alsD*, está envolvida na biossíntese da acetoína e de aminoácidos ramificados como a valina e leucina (Monnet *et al*., 2003). Essa enzima foi expressa exclusivamente sob uma concentração de 50 mg L^{-1} em *B. licheniformis* ISO 04. *AlsD* atua na descarboxilação de seu substrato gerando como um dos subprodutos CO_2 (Zheng *et al*., 2022). Também já foi relatado a produção de enzimas descarboxilases por bactérias biodegradantes de deltametrina (Zhang *et al*., 2024).

Duas enzimas foram suprarreguladas significativamente, que podem ser responsáveis por converter substâncias químicas intermediárias resultantes da clivagem do oxifluorfeno, a primeira é a *glyA*, envolvida na conversão de serina em glicina, participando também de várias vias metabólicas alternativas (metabolismo do carbono, biossíntese de metabólitos secundários e metabolismo bacteriano em ambientes diversos) (Ma'ruf *et al*., 2023). A segunda enzima é a *icd,* componente do ciclo do ácido tricarboxílico, assim como a proteína exclusiva *fumC,* que

também atuam de forma indireta na degradação de xenobióticos. Essas enzimas são expressas como resposta bacteriana ao estresse, sendo possível inferir que o *B. licheniformis* ISO 04 reprogramou suas rotas metabólicas para suprir a necessidade energética, ao se deparar com oxifluorfeno presente no meio, realocando compostos intermediários no ciclo do TCA (Debnath; Mandal; Ray, 2012; Di Bonaventura *et al.*, 2023; Melnikov *et al.*, 2023; Holert *et al.*, 2024).

Vale também ressaltar que, além da expressão de proteínas biossintéticas de aminoácidos (*alsD*, *argF* e *leuB*), as *subunidades ribossômicas grande uL5 – rplE* foram superexpressas, evidenciando os esforços empregados pelo *B. licheniformis* ISO 04 na produção de proteínas que pudessem se encarregar de remover do ambiente ou metabolizar o oxifluorfeno e manter a integridade celular (Figura 12).

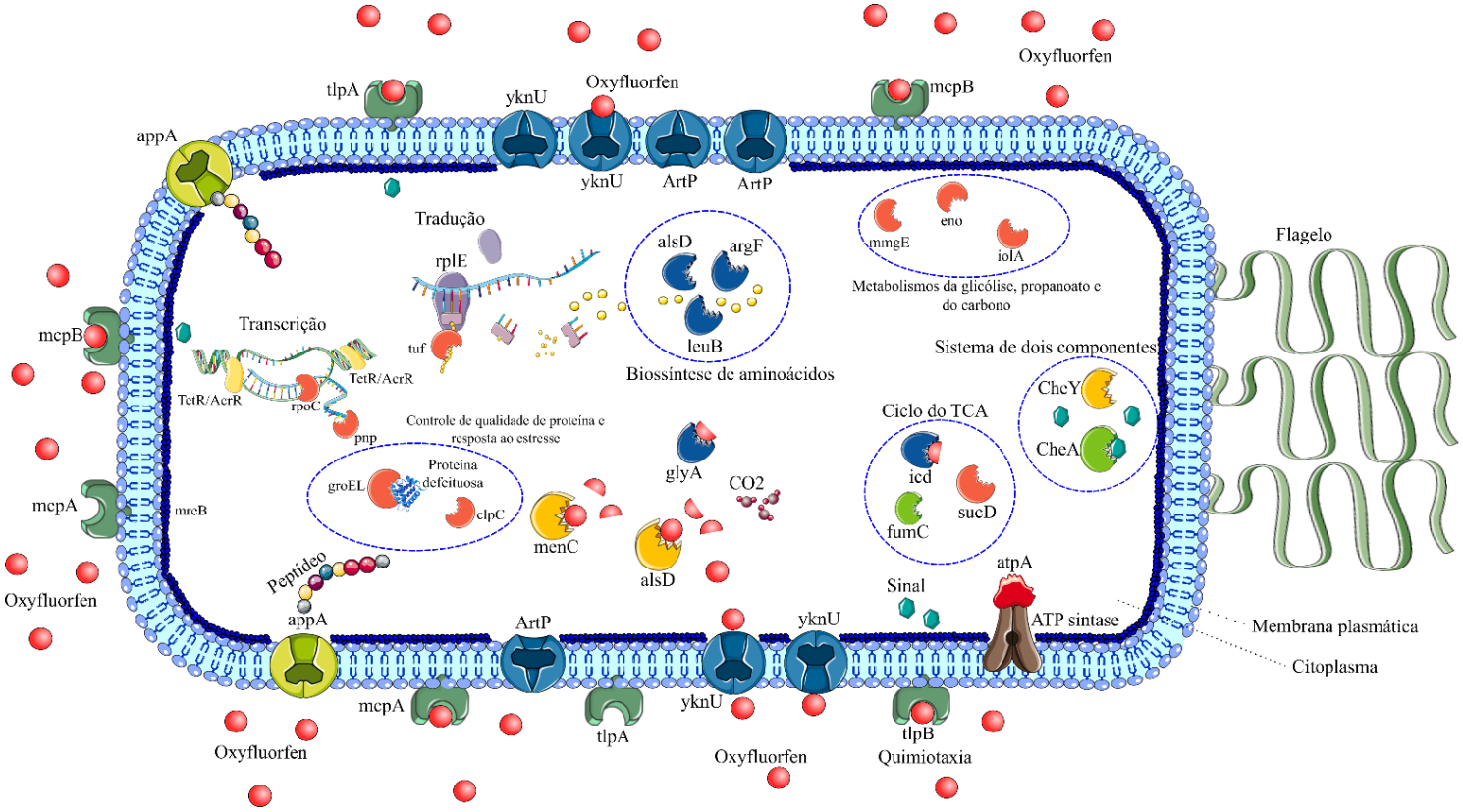


Figura 12. Ilustração esquemática das principais respostas de *B. licheniformis* ISO 04 ao oxifluorfeno. Os símbolos em azul e vermelho representam proteínas classificadas como suprarreguladas e infrarreguladas, respectivamente. Os símbolos amarelo, verde, lilás e marrom representam proteínas exclusivas. A molécula do herbicida é representada por esferas vermelhas.

5 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou o comportamento e os processos moleculares envolvidos na degradação do oxifluorfeno mediada por *B. licheniformis* ISO 04. Apesar do crescimento e das principais vias metabólicas de energia terem sido afetadas pela ação do herbicida, este trabalho aponta para duas enzimas como fortes candidatas a biocatalizadoras do oxifluorfeno, que são a *O-succinilbenzoato sintase* e a *alfa-acetolactato descarboxilase*, pela capacidade de ambas realizar interações com compostos aromáticos. Em suma, *B. licheniformis* ISO 04 é uma cepa promissora na biorremediação de ambientes contaminados com oxifluorfeno.

REFERÊNCIAS

ABRIL, Ana G. *et al*. High-resolution comparative and quantitative proteomics of biogenic-amine-producing bacteria and virulence factors present in seafood. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 72, n. 8, p. 4448-4463, 2024.

AFRAMIAN, Nitzan; ELDAR, Avigdor. A bacterial tower of babel: quorum-sensing signaling diversity and its evolution. **Annual review of microbiology**, v. 74, n. 1, p. 587-606, 2020.

ARAUJO, Aderson Costa *et al*. Efficiency and toxicity of oxyfluorfen in irrigation water in field implantation of the Eucalyptus genus. **Ciência Florestal**, v. 31, p. 634-657, 2021.

ASWATHI, Aswathi *et al*. Chlorpyrifos induced proteome remodelling of *Pseudomonas nitroreducens* AR-3 potentially aid efficient degradation of the pesticide. **Environmental Technology & Innovation**, v. 21, p. 101307, 2021.

BAREIA, Tasneem *et al*. Major distinctions between the two oligopeptide permease systems of *Bacillus subtilis* with respect to signaling, development and evolutionary divergence. **Microbiology**, v. 169, n. 9, p. 001382, 2023.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CHEN, Zhao Jie *et al*. Acetyltransferase OsACE2 acts as a regulator to reduce the environmental risk of oxyfluorfen to rice production. **Science of The Total Environment**, v. 867, p. 161599, 2023.

COPLEY, Shelley D. Evolution of efficient pathways for degradation of anthropogenic chemicals. **Nature chemical biology**, v. 5, n. 8, p. 559-566, 2009.

DAS, Tapas Kumar *et al*. Herbicides use in crop production: An analysis of cost-benefit, non-target toxicities and environmental risks. **Crop protection**, v. 181, p. 106691, 2024.

DEBNATH, Manojit; MANDAL, Narayan C.; RAY, Samit. Effect of fungicides and insecticides on growth and enzyme activity of four cyanobacteria. **Indian journal of microbiology**, v. 52, p. 275-280, 2012.

DEUTSCH, Eric W. *et al*. The ProteomeXchange consortium at 10 years: 2023 update. **Nucleic acids research**, v. 51, n. D1, p. D1539-D1548, 2023.

DI BONAVENTURA, Giovanni *et al*. Comparative proteomic analysis of protein patterns of *Stenotrophomonas maltophilia* in biofilm and planktonic lifestyles. **Microorganisms**, v. 11, n. 2, p. 442, 2023.

FAN, Qingqing *et al*. A review of remediation strategies for diphenyl ether herbicide contamination. **Toxics**, v. 12, n. 6, p. 397, 2024.

FANOUS, Ali *et al*. *Corynebacterium glutamicum* as an indicator for environmental cobalt and silver stress–a proteome analysis. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 45, n. 7, p. 666-675, 2010.

FELSHIA, S. Chris *et al*. Elucidation of 2, 4-Dichlorophenol degradation by *Bacillus licheniformis* strain SL10. **Environmental Technology**, 2020.

FENG, Zhao-zhong *et al*. Microbial degradation of fomesafen by a newly isolated strain *Pseudomonas zeshuii* BY-1 and the biochemical degradation pathway. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 29, p. 7104-7110, 2012.

GANDHI, Kavita *et al*. Exposure risk and environmental impacts of glyphosate: Highlights on the toxicity of herbicide co-formulants. **Environmental Challenges**, v. 4, p. 100149, 2021.

GANGOLA, Saurabh *et al*. Differential proteomic analysis under pesticides stress and normal conditions in *Bacillus cereus* 2D. **PLoS One**, v. 16, n. 8, p. e0253106, 2021.

HASANUDDIN, H. *et al*. Application of oxyfluorfen and pendimethalin to control weeds on soybean plantation. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2022. p. 012066.

HELLINGER, Roland *et al*. Peptídeos. **Nature Reviews Methods Primers**, v. 3, n. 1, p. 25, 2023.

HOLERT, Johannes *et al*. Bacteria use a catabolic patchwork pathway of apparently recent origin for degradation of the synthetic buffer compound TRIS. **The ISME journal**, v. 18, n. 1, p. wrad023, 2024.

HUANG, Lirong *et al*. Oxyfluorfen exposure can cause acute kidney injury by promoting ROS-induced oxidative stress and inflammation in zebrafish. **Journal of Hazardous Materials**, v. 440, p. 129823, 2022.

HU, Kaidi *et al*. Characterization of carbaryl-degrading strain *Bacillus licheniformis* B-1 and its hydrolase identification. **Biodegradation**, v. 31, p. 139-152, 2020.

JAISWAL, Durgesh Kumar *et al*. Molecular characterization of monocrotophos and chlorpyrifos tolerant bacterial strain for enhancing seed germination of vegetable crops. **Chemosphere**, v. 223, p. 636-650, 2019.

JALALI, Salar; INCEER, Huseyin. Genotoxic Effects of the Herbicide Oxyfluorfen on the Root Meristem Cells of *Helianthus annuus* (Sunflower). **Cytologia**, v. 87, n. 3, p. 281-284, 2022.

JANG, Hyewon *et al*. Oxyfluorfen induces cell cycle arrest by regulating MAPK, PI3K and autophagy in ruminant immortalized mammary epithelial cells. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 193, p. 105461, 2023.

KASAHARA, Yasuhiro *et al*. Genome-wide analytical approaches using semi-quantitative expression proteomics for aromatic hydrocarbon metabolism in *Pseudomonas putida* F1. **Journal of microbiological methods**, v. 91, n. 3, p. 434-442, 2012.

KHAN, Sara *et al*. Biodegradation of malathion by *Bacillus licheniformis* strain ML-1. **Archives of Biological Sciences**, v. 68, n. 1, p. 51-59, 2016.

LIU, Jinye *et al*. Functional characterization of the methyl-accepting chemotaxis proteins RS10830 and RS10815 in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 306, p. 141800, 2025.

LI, Yating *et al*. An aldolase-dependent phloroglucinol degradation pathway in *Collinsella* sp. zg1085. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 90, n. 8, p. e01047-24, 2024.

LI, Zekun *et al*. Oxyfluorfen induces hepatotoxicity through lipo-sugar accumulation and inflammation in zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 230, p. 113140, 2022.

MA'RUF, Ilma Fauziah *et al*. Characterization of thermostable serine hydroxymethyltransferase for β-hydroxy amino acids synthesis. **Amino Acids**, v. 55, n. 1, p. 75-88, 2023.

MATALLANA-SURGET, Sabine; LEROY, Baptiste; WATTIEZ, Ruddy. Shotgun proteomics: concept, key points and data mining. **Expert review of proteomics**, v. 7, n. 1, p. 5-7, 2010.

MELNIKOV, Oleg I. *et al*. Interchangeability of class I and II fumarases in an obligate methanotroph *Methylotuvimicrobium alcaliphilum* 20Z. **Plos one**, v. 18, n. 10, p. e0289976, 2023.

MONNET, Christophe *et al*. Regulation of branched-chain amino acid biosynthesis by α-acetolactate decarboxylase in *Streptococcus thermophilus*. **Letters in applied microbiology**, v. 36, n. 6, p. 399-405, 2003.

MURAS, Andrea *et al*. Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 609-627, 2021.

NANJO, Yohei *et al*. Mass Spectrometry-Based Analysis of Proteomic Changes in the Root Tips of Flooded Soybean Seedlings. **Journal of proteome research**. 2012.

NOAMAN, Hussein Khalid; AL-MAYALY, Ithar Kamel. Using Halophiles (*Bacillus licheniformis*) to Treat Spinetoram (pesticide) Contamination. **Iraqi Journal of Science**, p. 4921-4929, 2024.

OLIVEROS, J. C.; VENNY, C. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. **BioinfoGP, CNB-CSIC**, 2007.

PACHECO, Lara Cristina Pereira da Silva *et al*. Oxyfluorfen bioavailability in Brazilian Savanna soils. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 52, p. e73107, 2022.

PARVEN, A. *et al*. Herbicides in modern sustainable agriculture: Environmental fate, ecological implications, and human health concerns. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 22, n. 2, p. 1181-1202, 2025.

PAULA, Dilma F. de *et al*. Sustainable control of Galinsoga parviflora with oxyfluorfen, flumioxazin, and linuron application in two soils cultivated with garlic. **Sustainability**, v. 14, n. 24, p. 16637, 2022.

PEREZ-RIVEROL, Yasset *et al*. The PRIDE database at 20 years: 2025 update. **Nucleic Acids Research**, v. 53, n. D1, p. D543-D553, 2025.

PROCÓPIO, Sergio de Oliveira *et al*. Impacts of Weed Resistance to Glyphosate on Herbicide Commercialization in Brazil. **Agriculture**, v. 14, n. 12, p. 2315, 2024.

PRUSTY, Jyoti Sankar; KUMAR, Awanish. LC-MS/MS profiling and analysis of *Bacillus licheniformis* extracellular proteins for antifungal potential against *Candida albicans*. **Journal of Proteomics**, v. 303, p. 105228, 2024.

PUJAR, Namadev K. *et al*. Biodegradation of chlorpropham and its major products by *Bacillus licheniformis* NKC-1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 1-11, 2018.

QUERALTÓ, Camila *et al*. Role and regulation of Clp proteases: A target against gram-positive bacteria. **Bacteria**, v. 2, n. 1, p. 21-36, 2023.

REGINALDO, L. T. R. T. **Seleção de isolados microbianos para degradação de oxyfluorfen no solo**. 2023. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, p. 63. 2023.

REIS, Ricardo Souza *et al*. Pretreatment free of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid improves the differentiation of sugarcane somatic embryos by affecting the hormonal balance and the accumulation of reserves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 145, p. 101-115, 2021.

SANTOS, Marlon DM *et al*. Simple, efficient and thorough shotgun proteomic analysis with PatternLab V. **Nature protocols**, v. 17, n. 7, p. 1553-1578, 2022.

SHUKEN, Steven R. An introduction to mass spectrometry-based proteomics. **Journal of proteome research**, v. 22, n. 7, p. 2151-2171, 2023.

TEJADA, Manuel *et al*. Bioremediation of an oxyfluorfen-polluted soil using biostimulants obtained by fermentation processes: Effect on biological properties. **Applied Soil Ecology**, v. 170, p. 104270, 2022.

URIBE-RAMÍREZ, Daniel *et al*. Modifications of the respiratory chain of *Bacillus licheniformis* as an alkalophilic and cyanide-degrading microorganism. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 56, n. 6, p. 591-605, 2024.

WANG, Jinhua; LU, Yitong; CHEN, Yingying. Comparative proteome analysis of butachlor-degrading bacteria. **Environmental Geology**, v. 53, p. 1339-1344, 2008.

WANG, Lijuan *et al*. An unusual repressor controls the expression of a crucial nicotine-degrading gene cluster in *Pseudomonas putida* S 16. **Molecular Microbiology**, v. 91, n. 6, p. 1252-1269, 2014.

WANG, Ni *et al*. Tandem mass tag-based quantitative proteomics reveals the regulators in biofilm formation and biofilm control of *Bacillus licheniformis*. **Food Control**, v. 110, p. 107029, 2020.

WANG, Ye *et al*. Effective biodegradation of aflatoxin B1 using the *Bacillus licheniformis* (BL010) strain. **Toxins**, v. 10, n. 12, p. 497, 2018.

WARD, Katie T. *et al*. Quinoline ATP Synthase Inhibitors with Activity Against Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **ChemMedChem**, p. e202400952, 2025.

WIŚNIEWSKI, Jacek R. *et al*. Universal sample preparation method for proteome analysis. **Nature methods**, v. 6, n. 5, p. 359-362, 2009.

WU, Tianzhi *et al*. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. **The innovation**, v. 2, n. 3, 2021.

XIAO, Ying *et al*. Isolation of a novel beta-cypermethrin degrading strain *Bacillus subtilis* BSF01 and its biodegradation pathway. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, p. 2849-2859, 2015.

XU, Siqiong *et al*. The degradation of marine abundant compatible solute dimethylsulfoniopropionate was controlled by TetR-family transcriptional regulator DdaR in *Alcaligenes faecalis*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 194, p. 105879, 2024.

YU, Xuan *et al*. Microbial Fermentation as an Efficient Method for Eliminating Pyrethroid Pesticide Residues in Food: A Case Study on Cyfluthrin and *Aneurinibacillus aneurinilyticus* D-21. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 72, n. 8, p. 4393-4404, 2024.

ZELAYA, Elmer Adilson Espino *et al*. PepGAT, a chitinase-derived peptide, alters the proteomic profile of colorectal cancer cells and perturbs pathways involved in cancer survival. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 140204, 2025.

ZHANG, Hangjun *et al*. Proteomic strategy for the analysis of the polychlorobiphenyl-degrading cyanobacterium Anabaena PD-1 exposed to Aroclor 1254. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e91162, 2014.

ZHANG, Yingyue *et al*. Mechanism of deltamethrin biodegradation by *Brevibacillus parabrevis* BCP-09 with proteomic methods. **Chemosphere**, v. 350, p. 141100, 2024.

ZHAO, Huanhuan *et al*. Characterization of a novel oxyfluorfen-degrading bacterial strain *Chryseobacterium aquifrigidense* and its biochemical degradation pathway. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, p. 6837-6845, 2016.

ZHAO, Jiayuan *et al*. Substrate regulation on co-metabolic degradation of β-cypermethrin by *Bacillus licheniformis* B-1. **AMB Express**, v. 9, p. 1-11, 2019.

ZHAO, Junxin *et al*. Characterization of a novel lipase from *Bacillus licheniformis* NCU CS-5 for applications in detergent industry and biodegradation of 2, 4-D butyl ester. **International journal of biological macromolecules**, v. 176, p. 126-136, 2021.

ZHENG, Zi-Qi *et al*. Characterization of acetolactate decarboxylase of *Streptococcus thermophilus* and its stereoselectivity in decarboxylation of α-hydroxy-β-ketoacids. **Bioorganic Chemistry**, v. 122, p. 105719, 2022.

APÊNDICES

Apêndice I. Sequências referência e das cepas bacterianas 16S rRNA utilizadas na construção da árvore filogenética.

Microrganismo	Sequência (GenBank)
ISO 04	PQ666461.1 PQ666462.1 PQ666463.1
ISO 14	PQ665371.1 PQ665372.1 PQ665373.1
ISO 28	PQ665374.1 PQ665375.1 PQ665376.1
ISO 31	PQ665368.1 PQ665369.1 PQ665370.1
***Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* TU-B-10**	CP002905.1
***Bacillus cabrialesii* TE3**	NZ_CP096889.1
***Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610**	CM000488.1
***Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ATCC 6051**	CP034484.1
***Bacillus swezeyi* NRRL B-41294**	MRBK00000000.1
***Bacillus sonorensis* PMC204**	NZ_CP139190.1
***Bacillus sonorensis* NBRC 101234**	NZ_AYTN01000016.1
***Bacillus haynesii* NRRL B-41327**	NR_157609.1
***Bacillus licheniformis* DSM 13**	NZ_CP093290.1
***Bacillus licheniformis* ATCC 14580**	NZ_CP140161.1
***Bacillus paralicheniformis* Bac84**	NZ_CP023665.1
***Bacillus glycinifermentans* GO-13**	NR_137407.1
***Paenibacillus glycanilyticus* NBRC 16618**	NR_113853.2
***Bacillus paralicheniformis* KJ-16**	NR_137421.1
***Bacillus xiamenensis* VV3**	NZ_CP017786.1
***Bacillus safensis* PgKB20**	NZ_CP043404.1
***Bacillus safensis* FO-36b**	NZ_CP010405.1
***Bacillus altitudinis* GR-8**	NZ_CP009108.1
***Bacillus australimaris* NH7I 1**	NZ_LGYN01000018.1
***Bacillus pumilus* SAFR-032**	NC_009848.4
***Bacillus pumilus* DMKUB39**	KF673350.1
***Pediococcus claussenii* TMW 2.53**	NZ_CP014933.1
***Neomicrococcus aestuarii* B18**	NZ_CP018135.1
***Citricoccus zhacaiensis* FS24**	NR_116270.1
***Micrococcus yunnanensis* DSM 21948**	NZ_JACJIK010000001.1
***Micrococcus terreus* V3M1**	NR_116649.1
***Micrococcus lylae* DSM 20315**	NR_026200.1
***Micrococcus flavus* DSM 19079**	NZ_JACHMC010000001.1
***Micrococcus endophyticus* DSM 17945**	NZ_JACHMW010000001.1
***Micrococcus endophyticus* YIM 56238**	NR_044365.1

***Micrococcus cohnii* DSM 23974**	NZ_JACHNA010000001.1
***Micrococcus antarcticus* T2**	NR_025285.1
***Micrococcus luteus* NCTC2665**	NZ_LS483396.1
***Micrococcus luteus* ATCC 4698**	NZ_CP035298.1
***Azospirillum thiophilum* BV-S**	NZ_CP012401.1

Apêndice II. Sequências referência e da cepa de levedura das regiões ITS e 26S rDNA utilizadas na construção da árvore filogenética.

Microrganismo	Sequência ITS (GenBank)	Sequência 26S rDNA (GenBank)
ISO 26	PQ666543.1	PQ666789.1
***Kalmanozyma brasiliensis* GHG001**	KF737866.1	XR_001630178.1
***Pseudozyma hubeiensis* SY62**	NW_012133813.1	NW_012133813.1
***Moesziomyces antarcticus* JCM 10317**	NW_014638881.1	NW_014638881.1
***Sporisorium graminicola* CBS 10092**	NC_043718.1	NC_043718.1
***Moesziomyces aphidis* CBS 517.83**	NR_145336.1	NG_069796.1
***Moesziomyces bullatus* YR14**	MG478460.1	MG478480.1
***Moesziomyces rugulosus* JCM 10323**	NR_155364.1	AB089371.1
***Moesziomyces parantarcticus* JCM 11752**	NR_130693.1	NG_059466.1
***Pseudozyma thailandica* CBS 10006**	JALCCH010000064.1	JALCCH010000064.1
***Pseudozyma tsukubaensis* JCM 10324**	NR_167941.1	AB089373.1
***Pseudozyma prolifica* JCM 10319**	AB089368.1	AB089369.1
***Pseudozyma pruni* CBS 10937**	JALBYD010000090.1	JALBYD010000090.1
***Kalmanozyma fusiformata* CBS 6951**	NR_154094.1	NG_058309.1
***Dirkmeia churashimaensis* OK96**	AB548947.1	AB548955.1
***Ustilago trichophora* MP 1898**	AY740023.1	AJ236141.2
***Ustilago shanxiensis* CGMCC 2.2523**	DQ008956.1	DQ008955.1
***Sporisorium reilianum* CBS 131460**	KF706438.1	KF706430.1
***Sporisorium exsertum* KVU965**	JN367293.1	JN367318.1
***Sporisorium consanguineum* HUV19145**	AY740048.1	AY740101.1
***Pseudozyma* sp. DMST 17135**	AB117961.1	AB117961.1
***Pseudozyma abaconensis* CBS8380**	FJ008053.1	FJ008047.1
***Melanopsichium pennsylvanicum* HUV17548**	AY740040.1	AY740093.1
***Macalpinomyces eriachnes* KVU961**	JN367287.1	JN367312.1
***Langdonia jejuensis* CBS 10454**	EF079966.1	FN428865.1
***Kalmanozyma vetiver* DMKU-LV99**	AB809652.1	AB809649.1
***Farysizyma itapuensis* BI120**	DQ767831.1	DQ767831.1