

DIANA MARIA CHICA CARDONA

A PROCURA DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE METAMIDOFÓS

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação Interunidades em  
Biotecnologia USP/Instituto  
Butantan/IPT, para obtenção do Título de  
Mestre em Biotecnologia.

São Paulo  
2011

DIANA MARIA CHICA CARDONA

A PROCURA DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE METAMIDOFÓS

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação Interunidades em  
Biotecnologia USP/Instituto  
Butantan/IPT, para obtenção do Título de  
Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia,  
Microbiologia Ambiental

Orientador: Prof. Dr. René P. Schneider

Versão original

São Paulo  
2011

**DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)**  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Chica-Cardona, Diana Maria.

A procura de bactérias degradadoras de metamidofós / Diana Maria Chica Cardona. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Prof. Dr. Rene Peter Schneider.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Microbiologia ambiental - Biorremediação.

Versão do título para o inglês: Searching for methamidophos degrading bacteria

Descritores: 1. Metamidofós 2. Biodegradação 3. GC/MS 4. Organofosforados I. Schneider, Prof. Dr. Rene Peter II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butanta III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
**Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia**  
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Diana Maria Chica Cardona.

Título da Dissertação: A procura de bactérias degradadoras de metamidofós.

Orientador(a): Prof. Dr. Rene Peter Schneider.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,  
em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

Aprovado(a)       Reprovado(a)

Examinador(a): Nome completo: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Nome completo: .....  
Instituição: .....

Presidente: Nome completo: .....  
Instituição: .....

*A ti mami,*

*porque todos mis triunfos y logros son gracias a ti.*

*A mi hermanita y mi novio,*

*Por la fuerza y el apoyo en cada paso de mi vida*

## AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por darme la fuerza en cada momento de dificultad y por haber iluminado mi camino.

A mi familia, mi mami y mi hermana porque me dieron todo el apoyo en esta nueva cruzada y porque tras tantas cosas aquí estamos con un triunfo más.

A Karina por ser mi amiga, orientadora, confidente, mamá y hermana, porque al lado tuyo siempre crezco como persona, haces ver lo mejor en mí, con regaños y consejos. Por haberme dado la oportunidad de venir atrás de un sueño y por buscar en cada momento lo mejor para mí. Te quiero mucho!!!

A mi orientador René por haber confiado en mí, por enseñarme a pensar y a ser más crítica, por haberme dado la oportunidad de volver a Brasil y a su laboratorio y creer que sería capaz de finalizar algunos proyectos, siento mucho no haberlo logrado.

A Gabriel por ser un papá para mí, quien me ha guiado y me ha enseñado a ser paciente en momentos importantes.

A mis amigas Bianca y Heloisa, porque como innumerables veces lo he dicho, fueron ellas las que hicieron que me sintiera como en casa, por escucharme, apoyarme, por reir juntas, porque después de tanto tiempo en un lugar tan lejano no creí que pudiera encontrar amigas como ustedes!!! Las voy a extrañar muchíiiimoooooooo y espero que algún día nos encontremos de nuevo, las quiero mucho!!!

A las niñas, Jú y Lú, por los chismecitos en las tardes, los jueguitos, las risas y todas las torticas que nos comimos, por saber que puedo contar con ustedes, Gracias!!!!!!

A todos en el laboratorio, a André por enseñarme un idioma nuevo, jeje, a Paola, por ser tan buena amiga, a Georges, Thiago, Leandro, Fernando, Victor y Má por todos los buenos momentos compartidos.

A mi novio por haberme esperado, apoyado y respaldado durante todo este tiempo, por creer en mí y darme todas las energías para continuar este proyecto de vida, te amo!!!

Al Sr Luis por facilitar mi proyecto al organizar todo el material y estar atento a todo lo que necesitaba.

Al laboratorio de Beny por haberme brindado la posibilidad de utilizar los equipos para el desarrollo de este trabajo.

En fin a todos aquellos que formaron parte de esta gran experiencia, gracias!

*Mucho mejor atreverse a hacer cosas grandes,  
a obtener triunfos gloriosos,  
aún cuando matizados con fracasos,  
que formar en las filas de aquellos pobres de espíritu,  
que ni gozan mucho, ni sufren mucho,  
porque viven en el crepúsculo gris  
que no conoce la victoria, ni la derrota.*

Theodore Roosevelt

## **RESUMO**

CHICA, D. M. **A procura de bactérias degradadoras de metamidofós.** 2011. 151 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011

O metamidofós é um inseticida organofosforado altamente tóxico por ser um forte inibidor da acetilcolinesterase, sendo utilizado em diversas culturas para o controle de pragas. Há poucas informações sobre a biodegradação deste composto disponíveis na literatura. Foram isoladas e caracterizadas 12 bactérias a partir de amostras de solo e água de uma área contaminada com metamidofós, as quais mostraram inicialmente capacidade de degradar o pesticida, utilizando-o como fonte de enxofre/nitrogênio e fósforo/enxofre. Estes isolados foram identificados por métodos de biologia molecular e pela caracterização do perfil lipídico da célula como pertencentes aos gêneros, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* e *Curtobacterium*. Ensaios preliminares da cinética de degradação do metamidofós por GC/MS evidenciaram o consumo do pesticida pelas bactérias isoladas. A retomada destes ensaios após alguns meses de armazenamento em glicerol a -80 °C resultou na perda da capacidade de biodegradação do composto-alvo por causas não-identificadas. Fatores que podem ter contribuído para este resultado negativo incluem eventual perda de plasmídeos com partes das vias de biodegradação ou interferentes utilizados na estabilização do metamidofós.

Palavras chave: Metamidofós. Biodegradação. GC/MS. Organofosforado.

## ABSTRACT

CHICA, D. M. **Searching for methamidofos degrading bacteria.** 2011. 151 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011

Methamidophos is a strong acetylcholinesterase inhibitor and, therefore, a very toxic organophosphorus insecticide. This product has been widely employed for pest control in a variety of cultures, but little information is available about its biodegradation. 12 bacteria were isolated and characterized, from water and soil samples obtained from a site contaminated with methamidophos, which in preliminary tests showed the ability to degrade methamidophos, using it as a combined source of sulfur/nitrogen and/or phosphorus/sulfur. These isolates were identified by molecular biology methods and by characterization of its fatty acids profile as members of the genus *Serratia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* and *Curtobacterium*. The ability to biodegrade the compound was lost after prolonged storage at -80 °C for unknown reasons. It was hypothesized that this negative result may have occurred due to loss of plasmids or by interference of products used in the stabilization of commercial methamidophos formulations.

Key Words: Methamidophos. Biodegradation. GC/MS. Organophosphorus.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estruturas e Nomenclatura dos Ácidos Fosfórico e Tiofosfórico .....	19
<b>Figura 2.</b> Estrutura química do metamidofós .....	19
<b>Figura 3.</b> Efeitos do pH na Ionização do Metamidofós.....	24
<b>Figura 4.</b> Via de degradação de metamidofós no solo (FAO, 2003).....	26
<b>Figura 5.</b> Principal via de degradação de compostos organofosforados .....	28
<b>Figura 6.</b> Via de degradação proposta do metamidofós por <i>Hyphomicrobium sp.</i> MAP-1 .....	31
<b>Figura 7.</b> Estratégias nutricionais para o isolamento de bactérias degradadoras de metamidofós. As variações de cada meio de cultivo são S/SP + N: Sem enxofre e fósforo, mais nitrogênio; S/NP + S: Sem nitrogênio e fósforo, mais enxofre; S/NS + P: Sem nitrogênio e enxofre, mais fósforo; S/PSN: Sem fósforo, enxofre e nitrogênio. A três fontes de carbono são GGC: Glicerol, Glicose e Citrato; GC: Glicerol e Citrato; MET: Metamidofós. Os meios de cultura correspondentes a cada estratégia são: A1 – A4; B1 – B4; C1 – C4 .....	39
<b>Figura 8.</b> Contagem total de células por DAPI. Cultivos com Glicose, Glicerol e Citrato como fonte de carbono e metamidofós como fonte simultânea de enxofre e fósforo. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo .....	50
<b>Figura 9.</b> Contagem total de células por DAPI. Cultivos com Glicerol e Citrato como fonte de carbono e metamidofós como fonte simultânea de enxofre e fósforo. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo. ....	51
<b>Figura 10.</b> Contagem total de células por DAPI. Cultivos com metamidofós como fonte simultânea de carbono, enxofre e fósforo. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo. ....	52
<b>Figura 11.</b> Contagem total de células por DAPI. Cultivos com Glicose, Glicerol e Citrato como fonte de carbono e metamidofós como fonte simultânea de nitrogênio e fósforo. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo. ....	53
<b>Figura 12.</b> Contagem total de células por DAPI. Cultivos com Glicerol e Citrato como fonte de carbono e metamidofós como fonte simultânea de nitrogênio e fósforo. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo. ....	54
<b>Figura 13.</b> Contagem total de células por DAPI. Cultivos com metamidofós como fonte simultânea de carbono, nitrogênio e fósforo. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo. ....	55
<b>Figura 14.</b> Contagem total de células por DAPI. Cultivos com Glicose, Glicerol e Citrato como fonte de carbono e metamidofós como fonte simultânea de enxofre e nitrogênio. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo. ....	56
<b>Figura 15.</b> Contagem total de células por DAPI. Cultivos com Glicerol e Citrato como fonte de carbono e metamidofós como fonte simultânea de enxofre e nitrogênio. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo. ....	57
<b>Figura 16.</b> Contagem total de células por DAPI. Cultivos com metamidofós como fonte simultânea de carbono, enxofre e nitrogênio. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo. ....	58

<b>Figura 17.</b> Contagem total de células por DAPI. Cultivos com Glicose, Glicerol e Citrato como fonte de carbono e metamidofós como fonte simultânea de nitrogênio, enxofre e fósforo. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo.....	59
<b>Figura 18.</b> Contagem total de células por DAPI. Cultivos com Glicerol e Citrato como fonte de carbono e metamidofós como fonte simultânea de nitrogênio, enxofre e fósforo. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo.....	60
<b>Figura 19.</b> Contagem total de células por DAPI. Cultivos com metamidofós como fonte simultânea de carbono, nitrogênio, enxofre e fósforo. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo.....	61
<b>Figura 20.</b> Controle de crescimento dos consórcios da estratégia 1 (metamidofós como fonte simultânea de fósforo e enxofre) e 3 (metamidofós como fonte simultânea de nitrogênio e enxofre) ..	62
<b>Figura 21.</b> Curva de calibração obtida para o Metamidofós. ....	63
<b>Figura 22.</b> Cromatograma gerado a partir da injeção de uma solução padrão de 70 $\mu$ g/ml com adição de acenaphtene D-10 (A) Metamidofós e D-10; (B) Espetro de massas do metamidofós; C) Espectro de massas do acenaphtene D-10.....	64
<b>Figura 23.</b> Consumo de Metamidofós (g/l) nos isolados com melhor perfil de crescimento.....	65
<b>Figura 24.</b> (A) Cromatograma gerado a partir da injeção do extrato de meio de cultura no tempo inicial com adição de acenaphtene D-10 – Metamidofós; (B) Espetro de massas do metamidofós .....	65
<b>Figura 25.</b> Cromatograma gerado a partir da injeção do extrato de meio de cultura no tempo inicial com adição de acenaphtene D-10 – Metamidofós.....	66
<b>Figura 26.</b> Eletroforese em gel de agarose 3.5% da digestão dos fragmentos do gene rDNA 16s de cada isolado com as enzimas <i>HaeIII</i> e <i>BsuRI</i> . Padrão 50 pb <i>DNA Ladder</i> (1000 a 50pb).....	75
<b>Figura 27.</b> Árvore filogenética Ilustrativa do Gene rRNA 16s das Bacterias Degradadoras de metamidofós pelo Método de Neighbor-joining com a utilização do programa Mega3.....	78
<b>Figura 28.</b> Controle de Crescimento do isolado B3/Ata na Presença e Ausência de EDTA como Contaminante do Meio de Cultura. ....	85
<b>Figura 29.</b> Controles de Crescimento de B1/Sqa na Presença e Ausência de Metamidofós.....	85
<b>Figura 30.</b> Controles de Crescimento de B3/Ata na Presença e Ausência de Metamidofós .....	86
<b>Figura 31.</b> Comparação do crescimento do isolado B1/Sqa em cultivos de MM com várias concentrações de metamidofós.....	87
<b>Figura 32.</b> Comparação do crescimento do isolado B3/Ata em cultivos de MM com várias concentrações de metamidofós.....	87

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Tipos de culturas de uso do metamidofós .....	20
<b>Tabela 2</b> - Limites Máximos de resíduos do Metamidofós nas culturas .....	21
<b>Tabela 3</b> - Micro-organismos isolados para a degradação de organofosforados (continua) .....	32
<b>Tabela 3</b> - Componentes do Meio Mínimo Mineral Líquido .....	36
<b>Tabela 4</b> - Meios de cultura ricos em nutrientes e sua composição .....	37
<b>Tabela 6</b> - Reagentes e Meios de Cultura para a Extração de Ácidos Graxos.....	46
<b>Tabela 7</b> - Molécula do metamidofós com quebra nas ligações P-S e P-N.....	67
<b>Tabela 9</b> - Caracterização macroscópica e microscópica das cepas isoladas em meio R2A.....	73
<b>Tabela 10</b> - Grupos de padrões de ARDRA das cepas isoladas .....	74
<b>Tabela 11</b> - Matriz de Similaridade da cepa A1/Ab identificadas como <i>Curtobacterium</i> sp.....	76
<b>Tabela 12</b> - Matriz de Similaridade da cepa A3/Ska, B1/Sqa e B3/Ata identificadas como <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	76
<b>Tabela 13</b> - Matriz de Similaridade da cepa A1/Aba identificadas como <i>Serratia marcescens</i> .....	77
<b>Tabela 14</b> - Parâmetros de identificação pela análise do perfil de Ácidos Graxos Metil Éster (MEAG) .....	80
<b>Tabela 15</b> - Comparação de métodos de identificação das cepas isoladas .....	81

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
1.1	Cenário Atual .....	16
1.2	Defensivos Agrícolas .....	17
1.3	Metamidofós .....	19
1.3.1	<i>Características Físico – Químicas .....</i>	19
1.3.2	<i>Utilização .....</i>	20
1.3.3	<i>Modo de Ação e Toxicidade .....</i>	21
1.3.4	<i>Adsorção de Metamidofós no Solo .....</i>	23
1.3.5	<i>Degradação do Metamidofós .....</i>	25
1.3.5.1	<i>Fotodegradação .....</i>	25
1.3.5.2	<i>Degradação no Solo .....</i>	26
1.3.5.3	<i>Biodegradação .....</i>	27
2	OBJETIVOS .....	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
3.1	Vidrarias .....	35
3.2	Reagentes .....	35
3.2.1	<i>Solução Estoque de Vitaminas .....</i>	35
3.2.2	<i>Solução Estoque de Elementos Traços .....</i>	35
3.3	Meios de Cultura .....	36
3.3.1	<i>Meio Mínimo Mineral Líquido .....</i>	36
3.3.2	<i>Meio Mínimo Mineral Sólido .....</i>	37
3.3.3	<i>Meios Complexos .....</i>	37
3.4	Amostras para Isolamento de Bactérias .....	37
3.5	Cultivo de Bactérias Degradoras de Metamidofós .....	38
3.6	Avaliação do Crescimento .....	38
3.6.1	<i>Peso Seco .....</i>	38
3.6.2	<i>Densidade Óptica .....</i>	40
3.6.3	<i>Contagem Total de Células .....</i>	40
3.6.3.1	<i>Lavagem de lâminas .....</i>	40
3.6.3.2	<i>Preparo de lâminas .....</i>	40
3.6.3.3	<i>Coloração de DAPI .....</i>	40
3.7	Isolamento e Caracterização de Bactérias Degradoras de Metamidofós .....	41

<b>3.7.1</b>	<i>Caracterização Macroscópica dos Isolados .....</i>	<b>41</b>
<b>3.7.2</b>	<i>Caracterização Microscópica dos Isolados .....</i>	<b>41</b>
<b>3.8</b>	<b>Identificação de Bactérias Degradadoras de Metamidofós .....</b>	<b>42</b>
<b>3.8.1</b>	<i>Identificação por Métodos Moleculares .....</i>	<b>42</b>
<b>3.8.1.1</b>	<i>Extração de DNA .....</i>	<b>42</b>
<b>3.8.1.2</b>	<i>Amplificação do Fragmento DNAr 16s por PCR .....</i>	<b>43</b>
<b>3.8.1.3</b>	<i>Análise de Restrição do DNAr Amplificado (ARDRA) .....</i>	<b>44</b>
<b>3.8.1.4</b>	<i>Seqüenciamento e Identificação do DNAr 16s .....</i>	<b>44</b>
<b>3.8.2</b>	<i>Análise do Perfil de Ácidos Graxos .....</i>	<b>45</b>
<b>3.9</b>	<b>Avaliação do Potencial de Degradação.....</b>	<b>46</b>
<b>3.9.1</b>	<i>Cultivo das Bactérias para Avaliação da Degradação de Metamidofós .....</i>	<b>46</b>
<b>3.9.2</b>	<i>Analise de Metamidofós por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC/MS ) .....</i>	<b>46</b>
<b>3.9.2.1</b>	<i>Extração do Metamidofós para Análise de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas .....</i>	<b>47</b>
<b>3.9.2.2</b>	<i>Análise de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas.....</i>	<b>47</b>
<b>3.9.2.3</b>	<i>Curva de Calibração Padrão para Análise de Metamidofós .....</i>	<b>47</b>
<b>3.9.3</b>	<i>Análise de Cromatografia Iônica .....</i>	<b>48</b>
<b>3.10</b>	<b>Avaliação do Crescimento das Bactérias em Metanol .....</b>	<b>48</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b>Enriquecimento de Bactérias Degradadoras de Metamidofós .....</b>	<b>49</b>
<b>4.2</b>	<b>Isolamento de Bactérias Degradadoras de Metamidofós.....</b>	<b>71</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Caracterização Macroscópica e Microscópica dos Isolados .....</b>	<b>72</b>
<b>4.3</b>	<b>Identificação de Bactérias Degradadoras de Metamidofós .....</b>	<b>74</b>
<b>4.3.1</b>	<i>Identificação por Métodos Moleculares.....</i>	<b>74</b>
<b>4.3.1.1</b>	<i>Análise de Restrição de rDNA Amplificado (ARDRA) .....</i>	<b>74</b>
<b>4.3.1.2</b>	<i>Seqüenciamento e Identificação do rDNA 16s .....</i>	<b>75</b>
<b>4.3.2</b>	<i>Análise do Perfil de Ácidos Graxos Metil Éster (MEAG) .....</i>	<b>79</b>
<b>4.3.3</b>	<i>Comparação dos Métodos de Identificação .....</i>	<b>81</b>
<b>4.3.4</b>	<i>Características das Bactérias Identificadas .....</i>	<b>82</b>
<b>4.3.4.1</b>	<i>Serratia sp.....</i>	<b>82</b>
<b>4.3.4.2</b>	<i>Pseudomonas sp.....</i>	<b>82</b>
<b>4.3.4.3</b>	<i>Stenotrophomonas maltophilia .....</i>	<b>83</b>
<b>4.3.4.4</b>	<i>Curtobacterium sp. .....</i>	<b>83</b>
<b>4.4</b>	<b>Avaliação da Biodegradação de Metamidofós .....</b>	<b>84</b>

<b>4.4.1</b>	<i>Avaliação de Nitrato, Amônio, Fosfato e Sulfato .....</i>	<b>84</b>
4.4.1.1	<i>Influência de Nutrientes N, P e S Contaminantes do Meio no Crescimento das Bactérias Degradoras de Metamidofós .....</i>	<b>84</b>
<b>4.4.2</b>	<i>Avaliação da Cinética de Degradação de Metamidofós .....</i>	<b>86</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>922</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>933</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>1044</b>
	<b>APÊNDICE A - Calibração de Cromatografia Iônica.....</b>	<b>1044</b>
	<b>APÊNDICE B – Alinhamento das Seqüências.....</b>	<b>1111</b>
	<b>APÊNDICE C – Identificação Bacteriana Através da Análise de Ácidos graxos .....</b>	<b>1377</b>

## 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

O uso de defensivos agrícolas para a proteção de culturas representa uma alternativa tecnológica importante na agricultura, que permite enfrentar as exigências de produtividade agronômica, sendo uma solução economicamente viável, rápida e efetiva para o controle de pragas.

Dentre os defensivos utilizados, o metamidofós, composto organofosforado com atividade inseticida e acaricida, tem sido amplamente utilizado em diferentes culturas tais como, algodão, tabaco, tomate, batata, entre outros (BASF, 2011). Este pesticida aparece como produto de degradação do princípio ativo acefato (YEN; LIN; WANG, 2000), por sua N-desacetilação (SINGH, 1984; HUSSAIN, 1987). Cabe ressaltar que o acefato é um inseticida organofosforado, quimicamente conhecido como O,S-dimetil-N-acetil fosforamidotioato, o qual, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) só poderá ser usado em culturas de algodão e soja, até 31 de outubro de 2013 (ANVISA, 2011), assim como o metamidofós, que foi proibido no Brasil com data limite de utilização até 30 de junho de 2012.

O metamidofós atua como inibidor da acetilcolinesterase, o que, além de exterminar pragas, representa um risco para a saúde humana e os recursos naturais. Além disso, o uso irresponsável deste tipo de composto aumenta os níveis de contaminação ambiental, principalmente no solo, incrementando o potencial de resistência dos organismos alvo destes defensivos agrícolas.

Desta forma, considerando a ampla utilização de metamidofós e os poucos relatos sobre a biodegradação do mesmo, este projeto visa avaliar a biodegradabilidade deste composto, através do isolamento de bactérias de uma área contaminada por este defensivo.

### 1.1 Cenário Atual

O Brasil é o maior mercado de defensivos agrícolas do mundo, assumindo a liderança mundial no consumo destes compostos desde 2008. Dados preliminares indicaram que em 2008 os produtores brasileiros compraram entre US\$ 6,9 bilhões e US\$ 7 bilhões em defensivos agrícolas, US\$ 200 milhões mais que os norte-americanos, até então líderes mundiais (PACHECO, 2010).

O levantamento do Instituto Internacional de Pesquisa em Agronegócios mostrou um crescimento de quase 30% no mercado de insumos agrícolas no ano 2008. O rápido aumento no consumo de tais compostos no Brasil deve-se ao clima tropical propício para pragas nas lavouras e ao crescente uso de tecnologias avançadas no campo, sendo que, quanto mais avançado o sistema produtivo, maior o consumo de agrotóxico.

Apesar do grande volume de recursos movimentados pela indústria de pesticidas no mercado brasileiro, o consumo, assim como o gasto do produtor brasileiro com agrotóxico ainda é pequeno por hectare se comparado a outros países. Neste cenário econômico e industrial o Brasil leva vantagem na pesquisa por se tratar de um país com grande área cultivada e também pelo tamanho da produção agrícola, pois o país é um grande produtor de alimentos.

Esta situação acompanhada do emprego indiscriminado, sem as devidas precauções e cuidados em relação à manipulação, produção, estocagem e destino final, gera um risco não só ao meio ambiente, mas também à saúde das pessoas que direta ou indiretamente estão em contato com estes compostos.

A preocupação com o meio ambiente e sua degradação tem levado ao desenvolvimento de novas tecnologias, as quais promovem a recuperação ou a remediação de áreas contaminadas com a utilização de micro-organismos, plantas ou mesmo enzimas. Entre as tecnologias, destaca-se a biorremediação, que emprega processos biológicos aplicados à recuperação ou remediação de áreas contaminadas, o tratamento de compostos orgânicos voláteis ou efluentes contendo resíduos tóxicos que devam ser eliminados antes da descarga no ambiente (DAMS, 2006).

Em relação às técnicas convencionais (incineração, aterro, entre outros), a biorremediação é normalmente mais econômica, elimina permanentemente o risco da contaminação e tem boa aceitação pública.

## **1.2 Defensivos Agrícolas**

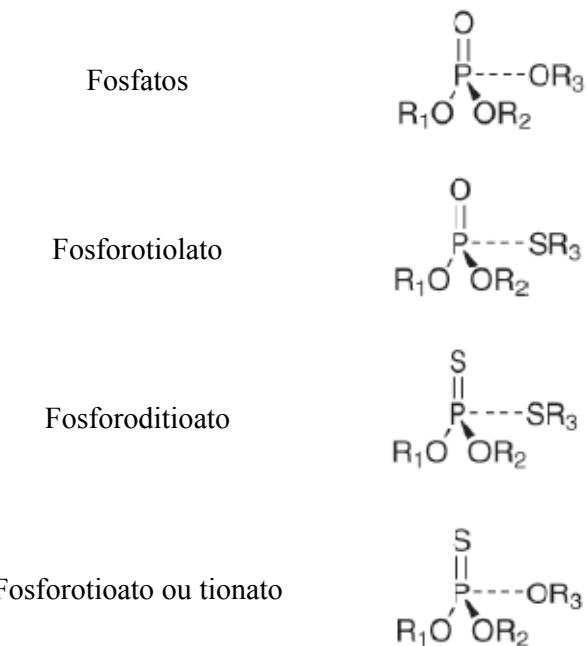
Os defensivos agrícolas começaram a ser utilizados em escala mundial após a Segunda Guerra e na agricultura nacional a partir da década de 70. No Brasil, estes compostos foram primeiramente utilizados em programas de saúde pública, no combate a vetores e no controle de parasitas e depois na agricultura, tendo incentivo do Plano Nacional de Desenvolvimento (DAMS, 2006).

Os defensivos agrícolas são classificados como inseticidas organofosforados (OP), organoclorados e carbamatos; rodenticidas, como os anticoagulantes; herbicidas, como paraquat, diquat, ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D); fungicidas, como ditiocarbamatos, captan; e fumigantes, como dibrometo de etileno, brometo de metilo, fosfinas (SOLTANINEJAD e ABDOLLAHI, 2009).

Os organoclorados tais como o DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), lindano, entre outros, têm sido considerados os grandes responsáveis pelos problemas de contaminação ambiental, devido à sua toxicidade para organismos não alvo, a degradação natural lenta e à tendência de se bioacumular na cadeia trófica. O seu uso tem sido reduzido drasticamente em países desenvolvidos (SANCHES et al., 2000), sendo substituídos pelos organofosforados, que são mais efetivos e menos persistentes no meio ambiente, embora ainda possuam elevada toxicidade para mamíferos (SINGH e WALKER, 2006).

Dentre os defensivos utilizados no Brasil, os OPs representam um terço do total dos princípios ativos em uso que oferecem elevado risco de saúde para seres humanos (JOKANOVIC, 2001). No entanto, os OPs são os candidatos mais populares para a substituição dos organoclorados, uma vez que estes últimos apresentam maior persistência no ambiente e tendência de bioacumulação na cadeia alimentar (SOLTANINEJAD e ABDOLLAHI, 2009; GARRIGUES, 1995), além de serem geralmente mais tóxicos para os animais vertebrados do que os outros defensivos (ZHANG et al., 2002).

Os OPs de maior interesse comercial e toxicológico são os ésteres ou tiois derivados do ácido fosfórico, fosfônico, fosfinico ou fosforamídico sendo que, geralmente as cadeias laterais R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são grupos aril ou alquil que se ligam diretamente ao átomo de fósforo (fosfinatos) ou que se encontram unidos a um átomo de oxigênio ou enxofre (fosfatos ou fosfotioatos). Além disso, o R<sub>1</sub> pode estar ligado diretamente ao átomo de fósforo e o R<sub>2</sub> unido ao átomo de oxigênio ou enxofre (fosfonatos ou tiofosfonatos) e, no caso dos fosforamidatos, pelo menos uma das cadeias laterais é o grupo amino (-NH<sub>2</sub>) (Figura 1) (SINGH e WALKER, 2006).

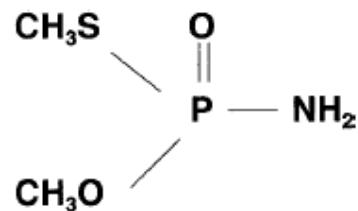


**Figura 1.** Estruturas e Nomenclatura dos Ácidos Fosfórico e Tiofosfórico

### 1.3 Metamidofós

#### 1.3.1 Características Físico – Químicas

O ácido O-S dimetil éster tiofosforamidotioato ( $C_2H_8NO_2PS$ ), também conhecido como metamidofós (Figura 2), é um inseticida acaricida organofosforado que possui elevada solubilidade em água ( $>2000$  g/l a  $25^\circ C$ ) e aparece como produto de degradação do princípio ativo acefato (YEN; LIN; WANG, 2000). Este composto apresenta propriedades físico - químicas tais como, ponto de fusão entre  $82-89^\circ C$ , pressão de vapor  $0,226$  mPa e peso molecular  $141,1$  g/mol (WARE, 1990).



**Figura 2.** Estrutura química do metamidofós

### 1.3.2 Utilização

O metamidofós era comercializado no Brasil há vários anos sob diferentes nomes comerciais, entre eles Tamaron BR (Bayer), Hamidop 600 (Arysta), Metamidofos Fersol 600 (Fersol), Metafos (Milenia), Metasip (Sipcam Agro) e Dinafos (Cheminova). Este composto é formulado como concentrado solúvel ou solução aquosa não concentrada, que contém 600 g do ingrediente ativo metamidofós por litro do produto comercial.

Este produto estava autorizado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), do Ministério da Saúde, apenas para uso em pulverização foliar nas culturas de algodão, amendoim, batata, feijão, soja, tomate e trigo, via trator, pivô central ou aplicação aérea, evitando-se o maior contato dos aplicadores em exposição ocupacional. Na cultura do tomate, o uso está autorizado somente para tomate rasteiro, com fins industriais (massa de tomate, etc.), sendo seu uso proibido para tomate de mesa (ANVISA, 2003).

O metamidofós é efetivo frente a insetos e é usado para o controle de áfidos, vermes, e demais, ver Tabela 1 (BASF).

**Tabela 1 - Tipos de culturas de uso do metamidofós**

CULTURA	NOME CIENTÍFICO	NOME COMUM
Batata	<i>Diabrotica speciosa</i>	Vaqueirinha-verde-amarela
Batata	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	Pulgão-das-solanáceas
Batata	<i>Myzus persicae</i>	Pulgão verde
Batata	<i>Epicauta atomaria</i>	Vaqueirinha-das-solanáceas
Feijão	<i>Bemisia tabaci</i>	Mosca branca
Feijão	<i>Empoasca kraemerii</i>	Cigarrinha verde
Feijão	<i>Diabrotica speciosa</i>	Vaqueirinha-verde-amarela
Soja	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Lagarta-da-soja
Soja	<i>Nezara viridula</i>	Percevejo-da-soja
Tomate	<i>Neoleucinodes elegantalis</i>	Broca pequena do fruto
Algodão	<i>Aphis gossypii</i>	Pulgão-do-algodoeiro
Algodão	<i>Frankliniella schultzei</i>	Tripes
Amendoim	<i>Enneothrips flavens</i>	Tripes-do-bronzeamento
Amendoim	<i>Stegasta bosquella</i>	Lagarta do pescoço vermelho

### 1.3.3 Modo de Ação e Toxicidade

O metamidofós está classificado pela EPA como composto Classe I (Altamente Perigoso), sendo de uso restrito (MALATO et al., 1999; ANVISA, 2002). Este composto é altamente tóxico por via oral, dérmica e respiratória apresentando uma DL50 oral em ratos entre 14-30 mg/Kg de peso do animal (MAHAJNA; QUISTAD; CASIDA, 1997).

A Tabela 2 apresenta os LMR (Limites Máximos de Resíduos) para metamidofós nas culturas onde seu emprego era autorizado, definida como a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico legalmente aceita no alimento, e os intervalos de segurança, intervalo de tempo entre a última aplicação do agrotóxico e a colheita ou comercialização.

A reavaliação feita pela ANVISA (2011) determinou a retirada do produto do mercado brasileiro, baseando-se em estudos científicos que relacionam o uso de metamidofós a problemas no sistema endócrino, reprodutor e desenvolvimento embriofetal. O metamidofós já teve o uso banido em países como China, Paquistão, Indonésia, Japão, Costa do Marfim e Samoa (ANVISA, 2009).

De acordo com o cronograma de retirada programada do produto do mercado brasileiro, as empresas só poderão produzir agrotóxicos com o ingrediente ativo metamidofós com base nos quantitativos históricos de comercialização de anos anteriores de cada empresa e com base nos estoques já existentes no país de matérias-primas, produtos técnicos e formulados. A comercialização destes produtos só poderá ser feita até 31 de dezembro de 2011 e a utilização, até 30 de junho de 2012 (ANVISA, 2011).

**Tabela 2 - Limites Máximos de resíduos do Metamidofós nas culturas**

CULTURAS	LMR (mg/kg)	INTERVALO DE SEGURANÇA
Algodão	0,05	21 dias
Amendoim	0,1	21 dias
Batata	0,01	21 dias
Feijão	0,01	23 dias
Soja	0,01	23 dias
Tomate	0,5	21 dias
Trigo	0,1	21 dias

**Fonte:** ANVISA, 2003

O efeito tóxico dos OPs nos insetos e mamíferos deve-se a inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE), a qual catalisa a hidrólise da acetilcolina gerando colina e ácido acético após a transmissão sináptica; este efeito é originado pela fosforilação (fosforilação e fosfonilação) do centro ativo da enzima deixando-a inativa (TAYLOR et al., 1995).

A impossibilidade da AChE hidrolisar a acetilcolina gera uma acumulação deste transmissor causando a superestimulação dos receptores colinérgicos produzindo paralisia neuromuscular (WOREK et al., 2004).

As manifestações clínicas das intoxicações com OPs levam a crises colinérgicas agudas. A superestimulação dos receptores nicotínicos, devido ao excesso da acetilcolina também pode produzir uma superestimulação simpática. A segunda manifestação é a síndrome neurotóxica intermediária, caracterizada por paralissias nervosas craniais, debilidade do pescoço e membros próximos e paralisia respiratória.

Os OPs são químicos altamente reativos e sua toxicidade não está limitada à ligação com a acetilcolinesterase, haja vista que esta pode reagir com centros ativos de outras enzimas gerando outros sintomas neurológicos (AARDEMA et al., 2008).

Nos humanos o metamidofós é rapidamente absorvido através do estomago, pulmões e pele, sendo eliminado na maior parte pela urina. Em países em desenvolvimento foram relatados casos de intoxicações ocupacionais e intencionais causadas por OPs, incluindo casos com mortes (WU et al., 2001).

Os sinais e sintomas de envenenamentos sistêmicos agudos por este composto incluem dor de cabeça, nervosismo, náuseas, sudoração, salivação, visão embaçada, cãibras, diarréia, tremedeira muscular e, em casos severos, neuropatias, convulsões, coma e perda de reflexos e controle muscular (WEINBAUM et al., 1997).

Castro, Chiorato e Pinto (2000) relataram que o metamidofós não tem um efeito letal em embriões de ratos e, em estudos preliminares, não houve malformações congênitas. Karabay e Oguz (2005) estudaram o efeito citotóxico e genotóxico do metamidofós evidenciando um aumento de anomalias nos cromossomos dos camundongos e a indução de mutações em *Salmonella* pelo Teste de Ames.

Outros estudos demonstraram que o metamidofós apresentou resultados positivos nos testes de genotoxicidade ou mostrou a capacidade de induzir alterações nos cromossomos (ATHANASOPOULOS et al., 2005).

Gary e Lorenzen (1989) avaliaram o efeito na capacidade de vôo das abelhas após a sua exposição ao metamidofós observando o prejuízo deste sobre a polinização e, por conseguinte o efeito nocivo numa parte importante do ciclo reprodutivo das plantas.

A toxicidade crônica e o potencial de carcinogenicidade do metamidofós foram avaliados em 03 estudos reportados pela ANVISA, conduzidos com ratos, camundongos e cães, nos quais o mesmo não foi considerado carcinogênico (ANVISA, 2009).

### **1.3.4 Adsorção de Metamidofós no Solo**

A adsorção tem um papel importante na mobilidade e biodisponibilidade dos defensivos agrícolas no solo (YEN; LIN; WANG, 2000). Esta característica é condicionada pelas propriedades físico-químicas da solução (pH e concentração do defensivo agrícola) e da molécula, a textura do solo, as superfícies minerais e a quantidade de matéria orgânica presente (KOLELI et al., 2006).

O metamidofós é pouco adsorvido no solo e pode ser classificado como um composto móvel (FAO - Food and Agriculture Organization, 2003). A sua elevada taxa de degradação em ensaios de campo e de laboratório sugere que a molécula não persiste por muito tempo no meio-ambiente.

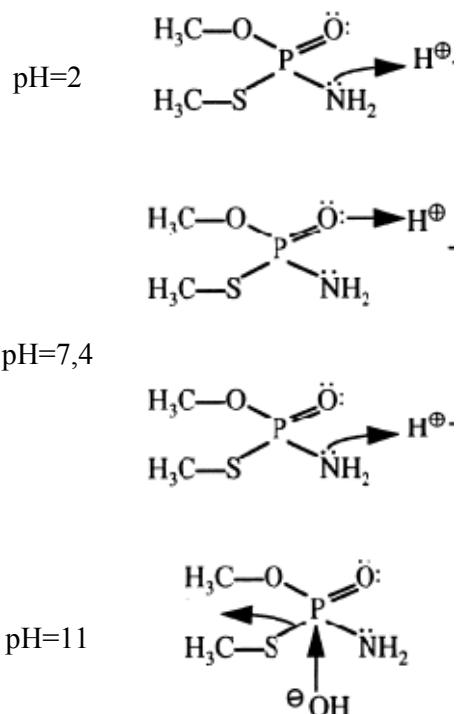
Ismail et al. (2002) observou em solos da Malásia que a mobilidade do metamidofós é maior comparada com a do endosulfan, notando a facilidade que pode ter o metamidofós para contaminar as águas subterrâneas, considerando a pobre retenção deste no solo.

Koleli et al. (2007) calculou a sorção do metamidofós, como a diferença entre a concentração aquosa do metamidofós (mg/l) em amostras com solo e a concentração total deste em amostras sem solo. Desta forma, o autor avaliou a influencia do pH na sorção de 100 mg/l de metamidofós em solos com um teor de matéria orgânica entre 5,5 e 1,5%, observando que, a um pH de aproximadamente 11,5 atingia-se uma sorção de 100% do metamidofós no solo.

O grupo amina do metamidofós participa de reações de ácido/base. Como o pKa deste grupo é cerca de 10 (SINGH et al., 1998), o metamidofós deveria ser uma molécula neutra em soluções com  $pH > pKa$ , e possuir carga positiva em valores de  $pH < pKa$ . Portanto, esta molécula deveria ser solúvel em água em pHs abaixo do pKa e insolúvel em pHs acima do pKa.

Dados experimentais de solubilidade obtidos por Singh et al. (1998), porém, demonstram que a solubilidade de metamidofós é independente do pH. Este fato ocorre devido à molécula permanecer polar mesmo quando desprotonada. O elemento P no metamidofós está ligado a átomos de O, S e N, que são mais eletronegativos, o que resulta em uma carga parcial positiva no P e cargas parciais negativas principalmente nos átomos de O e S devido à delocalização dos elétrons nas ligações covalentes entre estes átomos. Como a eletronegatividade dos átomos de S e O ligados a grupos metila é muito inferior à do oxigênio com ligação dupla no P, a carga parcial negativa do metamidofós fica concentrada praticamente neste oxigênio (Figura 3).

Ensaios de reatividade química deste estudo indicam que a protonação da molécula pode ocorrer tanto no grupo amina quanto no grupo P=O, sendo que a protonação, por razões de estabilidade química, não pode ocorrer simultaneamente nas duas posições (SINGH et al., 1998).



**Figura 3.** Efeitos do pH na Ionização do Metamidofós

Koleli et al. (2006) observaram que a sorção de 100 mg/l de metamidofós a pH 8,1, em solos argilosos, com pequena superfície de contato, é maior quando comparada com solos arenosos, devido à textura do solo e a concentração do defensivo agrícola, que são, de fato, elementos importantes na sorção e migração do poluente no ambiente subsuperficial. A afinidade de sorção do solo argiloso pelo metamidofós é maior em solos compostos por partículas com pequena superfície de contato, contudo, esta afinidade diminui com o aumento da concentração do pesticida, haja vista que todos os sítios da superfície das partículas do solo disponíveis são ocupados. Em contrapartida, em solos arenosos, a isoterma de sorção deste composto sugere que a afinidade das partículas de solo pelo metamidofós é menor do que a da água pelo solo em baixas concentrações de metamidofós. Estes diferentes comportamentos de sorção são devidos, provavelmente, às diferentes propriedades físico-químicas da solução e do solo e à temperatura.

Yu e Zhou (2005) avaliaram a adsorção do metamidofós em diferentes tipos de solo e observaram que esta diminuiu entre 34,9 - 46,1% com a remoção da matéria orgânica dos mesmos. Contudo, os outros 55-65% sítios de adsorção se encontram nos óxidos de metais e nas frações de silicatos, devido à exposição destes após a remoção da matéria orgânica, mostrando a importância dos minerais do solo neste processo.

Contrário aos resultados de adsorção em solo citados anteriormente, Yen et al. (2000) relataram a boa retenção de 100 mg/l de metamidofós em solos subtropicais tipo marga siltosa e marga silto arenosa de Taiwan, com pH 7,0 e 4,2 e carbono orgânico de 1,02 e 1,36%, respectivamente. Por tanto, teoricamente o metamidofós não deveria contaminar as águas subterrâneas em condições normais de uma área subtropical.

### **1.3.5 Degradção do Metamidofós**

#### *1.3.5.1 Fotodegradação*

Em ambientes aquáticos os OPs sofrem processos químicos, físicos ou biológicos de transformação, sendo que dentre os processos físicos verifica-se a fotólise direta, processo no qual o defensivo agrícola absorve a luz ocorrendo a fotosensibilização ou fotodegradação indireta, a qual é produzida pelos componentes dissolvidos na água, tais como, matéria orgânica, íons de nitrato ou o ferro e ácidos fúlvicos e húmicos. Desta forma, o processo de fotodegradação constitui uma via de transformação significativa para a eliminação dos OPs na fase aquosa (ZAMY et al., 2004; PEHKONEN et al., 2002).

A taxa de fotólise direta depende do coeficiente de absorção molar e da eficiência da transformação fotoquímica. Apesar da adsorção dos OPs na faixa do comprimento de onda UV entre 280-320nm ser geralmente fraca, a intensidade do espectro solar nesta região é suficiente para quebrar as ligações químicas da molécula (ETO, 1974).

Chopade reportou que o [S-methyl-14C] metamidofós foi fotodegradado lentamente em soluções tampão estéreis a pH 5, sob condições de luz artificial e natural (FAO, 2003).

Vários estudos sobre fotodegradação do metamidofós (WEI et al., 2009; DAÍ et al., 2008) demonstraram que esta se acelerava com 12 g/l de photocatalizador (Óxido de titânio), em pH alcalino e temperatura de reação elevada. De igual forma, observou-se que a presença de aceptores de elétrons, íons metálicos e ânions não interferiam na velocidade da reação.

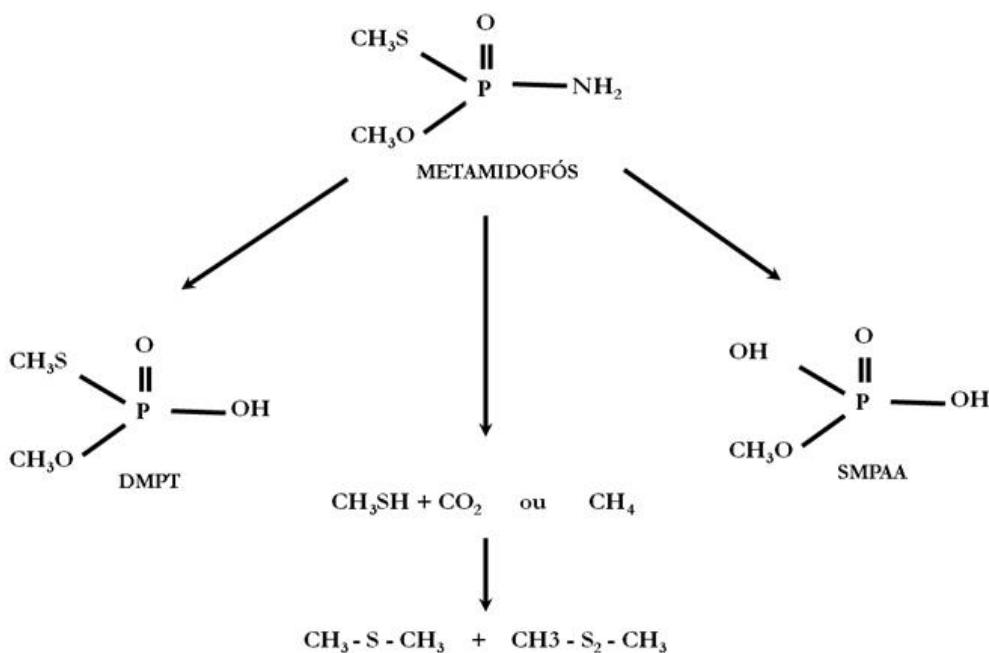
Malato et al. (1999) observou que na ausência de um photocatalizador a fotodegradação do metamidofós não ocorreu, porém com a utilização deste obteve uma taxa de reação de 4,5  $\mu\text{M}/\text{min}$  em um ambiente parcialmente ensolarado e na presença de compostos orgânicos.

#### 1.3.5.2 Degradação no Solo

Segundo a revisão feita pela FAO (2003), observa-se que o metamidofós possui meia vida de aproximadamente 6 dias em solos em condições aeróbias sugerindo que, provavelmente, o mecanismo de degradação é metabolismo microbiano. Neste estudo, foram verificados produtos de degradação SMPAA (S-metil fosforamidotioato) e DMPT (Desamino metamidofós) os quais junto ao metamidofós são degradados a  $\text{CO}_2$ .

Nesta mesma revisão, verificou-se que este composto é estável à hidrólise em pH 5, mas é degradado facilmente em pH 7-9, demonstrando que a taxa de hidrólise depende do pH do meio (FAO, 2003). Malato et al. (1999) demonstrou que o metamidofós apresentou meia vida de 3 dias em pH 9 e 309 dias a pH 5, confirmado a informação acima.

No estudo realizado pela FAO (2003), com carbono marcado isotopicamente ( $^{14}\text{C}$ ), foi proposta uma possível via de degradação do metamidofós no solo (Figura 4), porém, não foi esclarecido o mecanismo de biodegradação ou os organismos que participaram deste processo.



**Figura 4.** Via de degradação de metamidofós no solo  
Fonte: (FAO, 2003)

Segundo a EPA (2008), em solos aeróbios, o metamidofós é degradado ao O-desmetil metamidofós que pode ser rapidamente metabolizado pelos micro-organismos do solo a ácido fosfórico, CO<sub>2</sub> e biomassa microbiana (meia vida de 5 dias), já em condições anaeróbicas este composto pode persistir por mais tempo (meia vida de 441 dias).

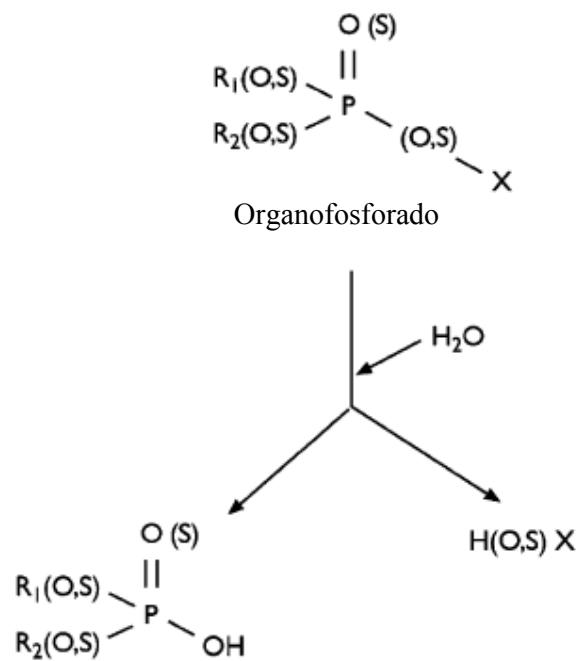
#### *1.3.5.3 Biodegradação*

Vários tipos de biorremediação podem restaurar a qualidade do solo e do ambiente, tais como, a atenuação natural, na qual a biorremediação ocorre pela ação dos micro-organismos nativos do solo; a bioestimulação e/ou bioventing, mediante a adição de nutrientes ou nutrientes gasosos (oxigênio), respectivamente, a fim de promover o crescimento dos micro-organismos degradadores; a bioaumentação, na qual são inoculados micro-organismos que facilitam a biodegradação dos compostos xenobióticos, entre outros (SYLVIA, 1999).

A maioria dos compostos orgânicos, xenobióticos, tais como agroquímicos em geral, não se perpetuam no ambiente, pois podem ser biodegradados pela ação de organismos vivos presentes na natureza, que atacam a estrutura molecular destes compostos orgânicos.

Os micro-organismos, pela sua capacidade degradadora, participam de forma significativa na eliminação ou redução acentuada dos níveis de defensivos agrícolas empregados na indústria agropecuária. Uma vez que os micro-organismos presentes nos solos são capazes de degradar e mineralizar defensivos agrícolas, pode-se desenvolver remediação biológica ou biorremediação de sítios contaminados empregando-se micro-organismos selecionados.

Considerando que os organofosforados são ésteres que possuem vários sítios vulneráveis à hidrólise, as principais reações envolvidas são oxidação, hidrólise, alquilação e desalquilação. Contudo, é importante destacar que, a degradação microbiana mediante a hidrólise das ligações P-O-alquil e P-O-aryl é considerada a etapa mais significativa da destoxificação destes compostos (Figura 5) (SINGH et al., 2006).



**Figura 5.** Principal via de degradação de compostos organofosforados

Em 1973 foi isolada a primeira bactéria capaz de degradar compostos organofosforados de uma amostra de solo coletado nas Filipinas, a qual foi identificada como *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 (SETHUNATHAN e YOSHIDA, 1973). A partir deste momento, bactérias, algas, fungos e cianobactérias têm sido estudados pela sua capacidade de utilizar este tipo de compostos como fonte de carbono, nitrogênio e/ou fósforo.

A destoxificação metabólica dos compostos organofosforados ocorre pela quebra de uma das ligações covalentes no fósforo, o que geralmente produz uma molécula com carga negativa. Nestes processos, tanto as enzimas hidrolíticas, como os mecanismos de transferência de certos grupos funcionais são importantes (JOKANOVIC, 2001).

Os organofosforados são detoxificados basicamente através de reações de oxidação e hidrólise. Este ultimo processo é catalisado pelas carboxilesterases (CbEs) e as fosfotriesterases (PTEs) (SOGORB e VILANOVA, 2002). A fosfotriesterase, codificada pelo gene *opd*, foi isolada pela primeira vez em bactérias de solo, *Pseudomonas diminuta* e *Flavobacterium* sp. (SETHUNATHAN e YOSHIDA, 1973). Esta enzima possui uma ampla variedade de substratos e é capaz de degradar compostos organofosforados com ligações tipo P-O, P-CN e P-F e é a única conhecida que hidrolisa ligações P-S, típica de agentes nervosos, tais como o VX (THERIOT e GRUNDEN, 2011).

A biorremediação enzimática é um método rápido para a remoção de resíduos de defensivos agrícolas, a qual tem a vantagem de poder ser otimizada constantemente com o uso da engenharia genética, incrementando o potencial da enzima, evitando assim, a liberação dos organismos no meio ambiente (SUTHERLAND et al., 2004).

Rosenberg e Alexander (1979) estudaram a especificidade de enzimas obtidas de *Pseudomonas* capazes de degradar organofosforados utilizando-os como única fonte de fósforo observando que, após 48 horas, a concentração de proteínas aumentou acompanhada da diminuição dos defensivos agrícolas e da produção de intermediários metabólicos.

Considerando estes dados, ressalta-se a importância do estudo do efeito dos defensivos agrícolas sobre a microbiota do solo e suas atividades benéficas na avaliação do risco destes, já que, dependendo da biodisponibilidade e toxicidade, estes podem inibir reações bioquímicas vitais no solo (CÁCERES et al., 2009). Vários estudos têm demonstrado que a aplicação de defensivos agrícolas destrói a composição e estrutura original das comunidades microbianas do solo causando a redução da diversidade ecológica e funcional e a atividade metabólica do solo (SU et al., 2007).

Wu et al. (2010) avaliou o efeito do metamidofós na estrutura da comunidade de *Pseudomonas* com atividade antagonista, assim como o gene funcional antifúngico *phiD*, observando, com o aumento da concentração de metamidofós, a redução significativa do numero de padrões de ARDRA, após a digestão feita com as enzimas *TaqI*, *HaeIII*, e *HinfI*.

No estudo feito por Su et al. (2007) observou-se que 250 mg/kg de metamidofós inibiram o gene *nifH* que codifica a proteína ferro-nitrogenase demonstrando o detimento que este tem sobre a estrutura da comunidade de organismos diazotróficos, a qual se restaurou após a paulatina degradação do defensivo agrícola.

Wang et al. (2006) observou que após a adição de 0,2 e 2 mg de metamidofós no solo houve uma diminuição na comunidade microbiana, porém ocorreu um aumento do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de bactérias metabolizadoras de metamidofós em 86,1% e 188,9% respectivamente, aumentando a diversidade funcional da comunidade microbiana do solo.

Li et al. (2008) observou um estímulo significativo do pesticida metamidofós (250 mg/kg) sobre crescimento das populações fúngicas em um microcosmo durante 60 dias. Focht e Joseph (1974) trataram diversos tipos de solo com três aplicações repetidas de 20 ppm de metamidofós durante 50 dias e observaram que este não afetou substancialmente os níveis de actinomicetos, bactérias e fungos permanecendo estáveis as taxas de amonificação, nitrificação, oxidação do enxofre e respiração dos micro-organismos.

O isolamento de micro-organismos degradadores de defensivos agrícolas é importante para determinar o mecanismo do processo de biodegradação microbiana e da evolução dos genes e enzimas envolvidos neste e, para utilizar os micro-organismos para a destoxificação e descontaminação dos ambientes aquáticos e terrestres. É importante também caracterizar os produtos da hidrólise destes compostos, pois estes podem ser mais tóxicos do que a molécula original.

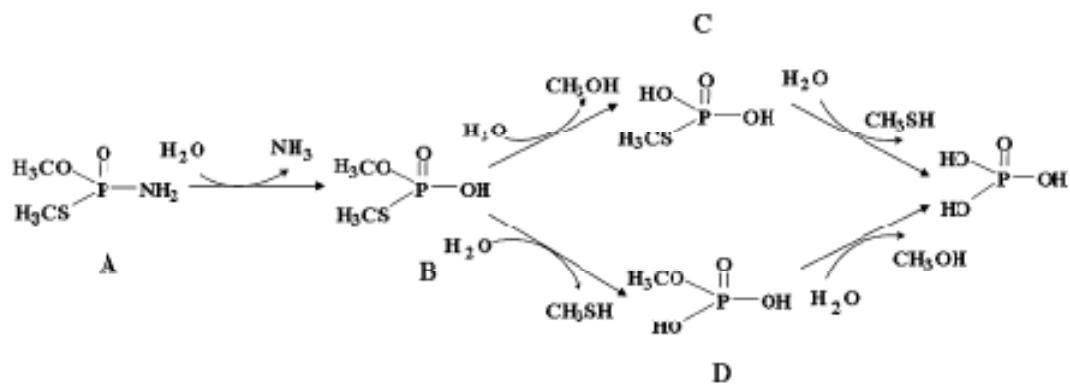
A biomineralização é o processo mediante o qual um composto orgânico é transformado em inorgânico e o co-metabolismo é a transformação de um substrato por um micro-organismo sem obter energia, carbono ou nutrientes a partir deste (SYLVIA et al., 1999). Até o momento, há trabalhos que descrevem estes dois processos na degradação de compostos organofosforados por bactérias isoladas, porém, na Tabela 3, observa-se que são poucos os relatos sobre bactérias degradadoras de metamidofós (SINGH, 2006). Apenas uma enzima capaz de degradar este defensivo agrícola, produzida por *Methylotroph WB-1*, foi descrita na literatura (CHAO et al., 2000).

Zhao et al. (2010) isolou o fungo *Penicillium oxalicum* utilizando glicose como fonte de carbono e, o metamidofós como única fonte de nitrogênio ou fósforo, sendo que este micro-organismo foi capaz de degradar até 99% de 800 mg/l de metamidofós após 12 dias de incubação.

Wang et al. (2011) isolou, a partir de uma amostra de solo de uma fábrica produtora de metamidofós, uma bactéria Gram negativa (JW-64-1<sup>T</sup>) pertencente ao gênero *Luteibacter* capaz de degradar aproximadamente 50% de 100 mg/l de metamidofós como única fonte de carbono, atingindo uma densidade óptica de 0.22 após 96 horas de incubação.

A cepa *Hyphomicrobium sp.* MAP-1 foi isolada por Wang et al. (2010) de solo contaminado na China. Esta cepa é capaz de utilizar o metamidofós (3000 mg/l) como única fonte de carbono, nitrogênio e fósforo para o seu crescimento após 84 horas sob condições ótimas (pH 7 e 30 °C).

Neste estudo foi sugerida pela primeira vez uma via de degradação do metamidofós por atividade microbiana (Figura 6) na qual o metamidofós (A) é clivado inicialmente na ligação P-N formando o NH<sub>3</sub> e O,S-dimetil hidrogênio tiofosfato (B), posteriormente, este último é hidrolisado na ligação P-O para liberar -CH<sub>3</sub> e formar S-dimetil dihidrogênio tiofosfato; ou pode ser hidrolisado na ligação P-S gerando -SCH<sub>3</sub> e formar metil dihidrogênio fosfato. Finalmente, o S-dimetil dihidrogênio tiofosfato e o metil dihidrogênio fosfato são transformados provavelmente em ácido fosfórico.



**Figura 6.** Via de degradação proposta do metamidofós por *Hyphomicrobium sp.* MAP-1

**Tabela 3** - Micro-organismos isolados para a degradação de organofosforados

(continua)

Composto	Micro-organismos	Modo de Degradação	Referência
<b>Acefato</b>	Bactéria <i>Hypomicrobium sp.</i>	Catabólica	Wang et al. (2010)
<b>Clorpirifós</b>	Bactéria <i>Enterobacter sp.</i>	Catabólica (C, P)	Singh et al. (2003c)
	<i>Flavobacterium sp. ATCC27551</i>	Co-metabólica	Mallick et al. (1999)
	<i>Pseudomonas diminuta</i>	Co-metabólica	Serdar et al. (1982)
	<i>Micrococcus sp.</i>	Co-metabólica	Serdar et al. (1982)
	Fungos <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Catabólica (C)	Bumpus et al. (1993)
<b>Paration</b>	<i>Hypoloma fascicularae</i>	--	Bending et al. (2002)
	<i>Coriolus versicolor</i>	--	Bending et al. (2002)
	<i>Aspergillus sp.</i>	Catabólica (P)	Obojska et al. (2002)
	<i>Trichoderma harzianum</i>	Catabólica (P)	Omar (1998)
	<i>Pencillium brevicompactum</i>	Catabólica (P)	Omar (1998)
	Bactéria <i>Flavobacterium sp. ATCC27551</i>	Co-metabólica	Sethunathan e Yoshida (1973)
	<i>Pseudomonas diminuta</i>	Co-metabólica	Serdar et al. (1982)
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Co-metabólica	Daughton e Hsieh (1977)
	<i>Arthrobacter spp.</i>	Co-metabólica	Nelson et al. (1982)
	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Co-metabólica	Horne et al. (2002b)
<b>Metil Paration</b>	<i>Bacillus spp.</i>	Co-metabólica	Nelson et al. (1982)
	<i>Pseudomonas sp.</i>	Catabólica (C, N)	Siddaramappa et al. (1973)
	<i>Pseudomonas spp.</i>	Catabólica (P)	Rosenberg e Alexander (1979)
	<i>Arthrobacter sp.</i>	Catabólica (C)	Nelson et al. (1982)
	<i>Xanthomonas sp.</i>	Catabólica (C)	Rosenberg e Alexander (1979)
	Bactéria <i>Pseudomonas sp.</i>	Co-metabólica	Chaudry et al. (1988)
	<i>Bacillus sp.</i>	Co-metabólica	Sharmila et al. (1989)
<b>Glifosato</b>	<i>Plesimonas spM6</i>	Co-metabólica	Zhongli et al. (2001)
	<i>Pseudomonas putida</i>	Catabólica (C)	Rani e Lalitha-kumari (1994)
	<i>Pseudomonas sp. A3</i>	Catabólica (C, N)	Zhongli et al. (2002)
	<i>Pseudomonas sp. WBC</i>	Catabólica (C, N)	Yali et al. (2002)
	<i>Flavobacterium balustinum</i>	Catabólica (C)	Somara e Siddavattam (1995)
	Bactéria <i>Pseudomonas ssp.</i>	Catabólica (P)	Kertesz et al. (1994a)
	<i>Alcaligene sp.</i>	Catabólica (P)	Tolbot et al. (1984)
	<i>Bacillus megaterium 2BLW</i>	Catabólica (P)	Quinn et al. (1989)
	<i>Rhizobium sp.</i>	Catabólica (P)	Liu et al. (1991)
	<i>Agrobacterium sp.</i>	Catabólica (P)	Wacket et al. (1987)

**Tabela 3** - Micro-organismos isolados para a degradação de organofosforados

(conclusão)

	Fungos <i>Penicillium citrium</i> <i>Penicillium natum</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Trichoderma viridae</i> <i>Scopulariopsis spand</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Alternaria alternata</i>	Co-metabólica Catabólica (P) Catabólica (N) Catabólica (P) Catabólica (P) Catabólica (P) Catabólica (N)	Pothuluri et al. (1998) Pothuluri et al. (1992) Klimek et al. (2001) Zboinska et al. (1992b) Zboinska et al. (1992b) Zboinska et al. (1992b) Lipok et al. (2003)
<b>Coumafós</b>	<i>Nocardioides simplex NRRL B24074</i>	Co-metabólica	Mulbry (2000)
	<i>Agrobacterium radiobacter P230</i>	Co-metabólica	Horne et al. (2002b)
	<i>Pseudomonas monteilli</i>	Co-metabólica	Horne et al. (2002c)
	<i>Flavobacterium sp.</i>	Co-metabólica	Adhya et al. (1981)
	<i>Pseudomonas diminuta</i>	Co-metabólica	Serdar et al. (1982)
	<i>Nocardia strain B-1</i>	Catabólica (C)	Mulbry (1992)
<b>Monocrotofós</b>	<i>Pseudomonas spp.</i>	Catabólica (C)	Bhadbhade et al. (2002b)
	<i>Bacillus spp.</i>	Catabólica (C)	Rangaswamy e Venkateswaralu (1992)
	<i>Arthrobacter spp.</i>	Catabólica (C)	Bhadbhade et al. (2002b)
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Catabólica (C)	Bhadbhade et al. (2002a)
	<i>Bacillus megaterium</i>	Catabólica (C)	Bhadbhade et al. (2002b)
	<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	Catabólica (C)	Bhadbhade et al. (2002b)
	<i>Pseudomonas aeruginosa F10B</i>	Catabólica (P)	Bhadbhade et al. (2002b)
	<i>Clavibacter michiganense SBL11</i>	Catabólica (P)	Singh e Singh (2003)
	<i>Flavobacterium sp.</i>	Co-metabólica	Singh e Singh (2003)
<b>Fenitrotión</b>	<i>Arthrobacter aurescenes TW17</i>	Catabólica (C)	Adhya et al. (1981)
	<i>Burkholderia sp. NF100</i>	Catabólica (C)	Ohshiro et al. (1996)
			Hayatsu et al. (2000)
<b>Metamidofós</b>	Bactéria <i>Luteibacter</i> <i>Hyphomicrobium sp.</i>	Catabólica (C) Catabólica (C, N, P)	Wang et al. (2011) Wang et al. (2010)
	Fungos <i>Penicillium oxalicum</i>	Catabólica (N, P)	Zhao et al. (2010)
<b>Diazinón</b>	<i>Flavobacterium sp.</i>	Catabólica (P)	Sethunathan e Yoshida (1973)
	<i>Pseudomonas spp.</i>	Co-metabólica	Rosenberg e Alexander (1979)
	<i>Arthrobacter spp.</i>	Co-metabólica	Barik et al. (1979)

Fonte: Singh et al. modificado, 2006

Góes (2009) isolou *Rhodococcus* sp sendo eficiente na degradação de acefato (99.24%) como única fonte de carbono, seguido da acumulação e degradação de metamidofós. Por este motivo, a degradação de Metamidofós continua sendo um problema ambiental, visto que este composto não está presente no solo apenas pelo uso do mesmo, mas pela degradação do seu precursor acefato.

## 2      OBJETIVOS

Considerando o uso do metamidofós, defensivo agrícola altamente tóxico, em diversas classes de lavouras para o controle de pragas, a sua elevada toxicidade e os poucos relatos na literatura sobre a biodegradação deste composto, os objetivos deste trabalho são:

- Utilizar diferentes estratégias para o isolamento de bactérias capazes de metabolizar o metamidofós como fonte de nitrogênio, fósforo e/ou enxofre.
- Caracterizar e identificar as bactérias mediante técnicas básicas de microbiologia e de biologia molecular.
- Avaliar a cinética de degradação do metamidofós por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS) das bactérias com melhor perfil de crescimento.
- Avaliar o consumo e/ou produção de íons, tais como, nitrato, fosfato, sulfato e/ou amônio, provenientes da degradação bacteriana do metamidofós por cromatografia iônica.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Vidorrias**

Todas as vidrarias foram lavadas com detergente EXTRAN MA 02 NEUTRO a 4% v/v (Merck S.A.), enxaguadas com água destilada e três vezes com água ultrapura Milli-Q.

Os materiais utilizados com fins microbiológicos foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 20 minutos a 1atm de pressão.

#### **3.2 Reagentes**

Todos os reagentes utilizados foram de alta pureza, exceto quando indicado diferente.

##### ***3.2.1 Solução Estoque de Vitaminas***

A solução estoque de vitaminas era constituída por 50 mg/l de ácido *p*-amino benzóico, 100 mg/l de piridoxina, 50 mg/l de tiamina, 50 mg/l de riboflavina, 50 mg/l de ácido nicotínico, 50 g/l de pantotenato de cálcio, 50 g/l de ácido lipóico, 50 g/l de nicotinamida, 50 g/l de vitamina B<sub>12</sub>, 20 g/l de biotina e 20 g/l de ácido fólico em água destilada. A solução foi filtrada com membrana com porosidade de 0.2 µm e mantida a 4 °C em ambiente escuro.

##### ***3.2.2 Solução Estoque de Elementos Traços***

A solução estoque de elementos traços continha 8 g/l de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,07 g/l de ZnCl<sub>2</sub>, 0,1 g/l de MnCl<sub>2</sub>.4 H<sub>2</sub>O, 0,12 g/l de CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,025 g/l de NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,015 g/l de CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O e 0,025 g/l de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O em água destilada. A solução foi acidificada com 6,5 ml 25% HCl para evitar a precipitação e filtrada com membrana com porosidade de 0.2 µm e mantida a 4 °C em ambiente escuro.

### 3.3 Meios de Cultura

#### 3.3.1 Meio Mínimo Mineral Líquido

Meios de cultura com composição diferente foram empregados para implementar diferentes estratégias de enriquecimento de organismos biodegradadores de metamidofós (Tabela 4). As quantidades de metamidofós variaram segundo a estratégia utilizada (Figura 7).

Todos os meios de cultura foram preparados em água destilada estéril.

**Tabela 3 - Componentes do Meio Mínimo Mineral Líquido**

Fontes de carbono	Glicerol, Citrato e Glicose (Estratégia A)	1 g/l
	Citrato e Glicerol (Estratégia B)	1,3 g/l
	Metamidofós (73,79%, Milenia Agrociências, Fersol 60%, Brasil) (Estratégia C)	2,94 g/l
Componentes comuns em todos os Meios de Cultura	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,8 g/l
	Solução Estoque de Vitaminas	1 ml
	Solução Estoque de Elementos Traços	1 ml
	EDTA	4 ml
Componentes Específicos dos Meios de Cultura Sem Adição de Fósforo e Enxofre	NaNO <sub>3</sub>	3,85 g/l
	mgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,7 g/l
	Tampão Tris 1M	1,5 ml
	Metamidofós Estratégia A	0,68 g/l
	Metamidofós Estratégia B	2,11 g/l
	Metamidofós Estratégia C	2,94 g/l
Componentes Específicos dos Meios de Cultura Sem Adição de nitrogênio e fósforo	MgSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,8 g/l
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,4 g/l
	Tampão Tris 1M	1,5 ml
	Metamidofós Estratégia A	3,32 g/l
	Metamidofós Estratégia B	3,32 g/l
	Metamidofós Estratégia C	2,94 g/l
Componentes Específicos dos Meios de Cultura Sem Adição de nitrogênio e enxofre	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,7 g/l
	Tampão Fosfato 1M	1,5 ml
	Metamidofós Estratégia A	2,11 g/l
	Metamidofós Estratégia B	2,11 g/l
	Metamidofós Estratégia C	2,94 g/l
Componentes Específicos dos Meios de Cultura Sem Adição de Nitrogênio, Fósforo e Enxofre	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,7 g/l
	Tampão Tris 1M	1,5 ml
	Metamidofós Estratégia A	3,32 g/l
	Metamidofós Estratégia B	3,32 g/l
	Metamidofós Estratégia C	2,94 g/l

### **3.3.2 Meio Mínimo Mineral Sólido**

A fim de isolar as bactérias em meio mínimo mineral sólido foram adicionados 16 g/l de Bacto Agar (Merck) aos meios descritos no item 3.3.1.

### **3.3.3 Meios Complexos**

Os meios complexos utilizados TSB (Tryptic Soy Broth, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e R2A Agar (Merck) foram preparados em água destilada seguindo as instruções do fabricante (Tabela 5). Para o preparo do TSBA (Tryptic Soy Broth Agar) foram adicionados 15 g/l de Bacto Agar (Merck) ao TSB, como indicado para a análise de ácidos graxos. Todos os meios foram autoclavados a 121 °C durante 15 minutos a 1atm.

**Tabela 4 - Meios de cultura ricos em nutrientes e sua composição**

<b>Meio de Cultura</b>	<b>Composição (g/l)</b>
<b>TSB (Tryptic Soy Broth)</b>	Peptona de Caseína 17,0
	Peptona de farinha de soja 3,0
	Glicose 2,5
	Cloreto de Sódio 5,0
	Hidrogenofosfato dipotássico 2,5
<b>R2A</b>	Extrato de Levedura 0,5
	Peptona de proteose 0,5
	Caseína hidrolisada 0,5
	Glicose 0,5
	Amido Solúvel 0,5
	Piruvato Sódico 0,3
	Hidrogenofosfato dipotássico 0,3
	Sulfato magnésico heptahidratado 0,05
	Agar-Agar 12,0

### **3.4 Amostras para Isolamento de Bactérias**

As amostras de solo e água utilizadas para o isolamento de bactérias com potencial degradador de metamidofós foram coletadas em uma área próxima a uma fábrica de defensivos agrícolas, localizada em Londrina (Paraná, Brasil).

### **3.5 Cultivo de Bactérias Degradadoras de Metamidofós**

Para o isolamento de bactérias degradadoras de metamidofós utilizou-se frascos de penicilina esterilizados com inóculo inicial de 10% do volume total do meio mineral líquido (2 g e 2 ml de solo e água da área contaminada, respectivamente). Estes microcosmos foram incubados em condições escuras, na temperatura ambiente durante duas semanas. Posteriormente foram feitos três sub-cultivos em meio mineral líquido adicionando 1% do cultivo inicial.

Com o objetivo de verificar que a turbidez observada nos microcosmos não era produto de contaminação microbiológica utilizou-se como controle negativo o meio mínimo mineral sem inóculo acrescentado de metamidofós.

Quatro estratégias de isolamento baseadas na presença ou ausência de nitrogênio, fósforo e enxofre (Figura 7) foram testadas a fim de gerar uma limitação nutricional nas bactérias de forma que fossem selecionados apenas organismos que obtivessem estes elementos da molécula de metamidofós.

A estratégia 1 baseou-se no fornecimento de nitrogênio e na ausência de fósforo e enxofre; a estratégia 2, no fornecimento enxofre e na ausência de nitrogênio e fósforo; a estratégia 3, no fornecimento de fósforo e na ausência de nitrogênio e enxofre; e finalmente, a estratégia 4, na ausência de enxofre, nitrogênio e fósforo. Nos meios de cultivo utilizados foram, também, modificadas as fontes de carbono, utilizando Glicerol, Citrato, Glicose e/ou Metamidofós (Figura 7).

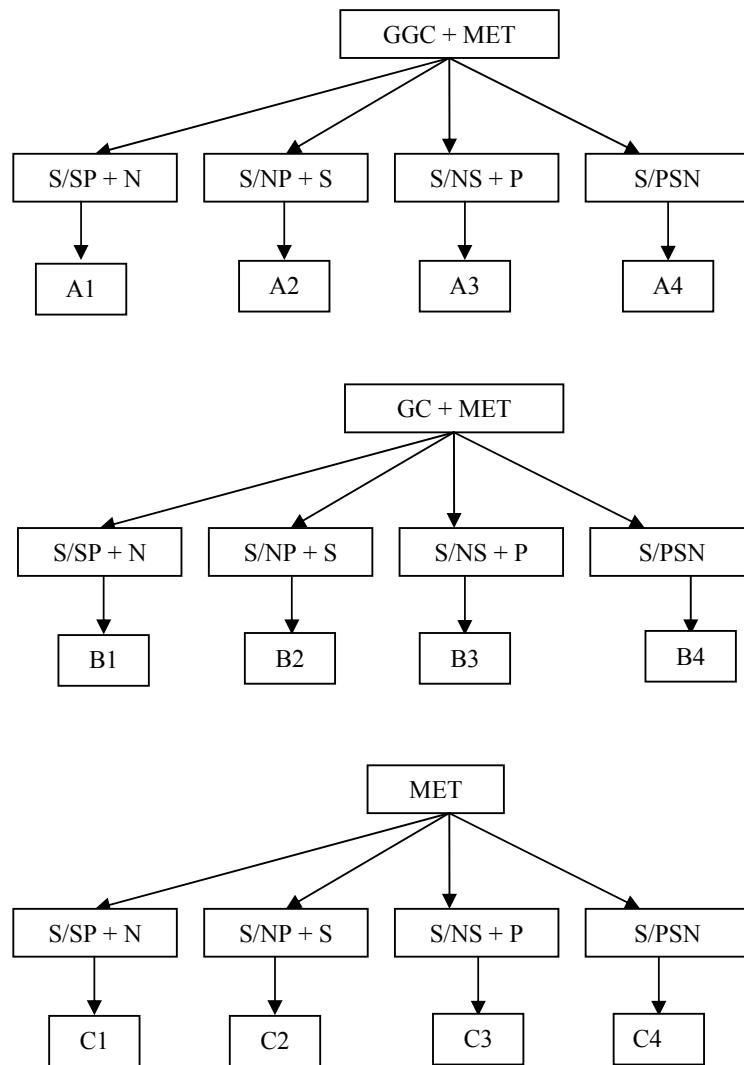
Para verificar que os meios de cultivo em que houve crescimento bacteriano não estavam contaminados e as bactérias se reproduziram pela sua capacidade de usar o metamidofós como fonte de nutrientes (C, N, P ou S), preparou-se meios de cultivo com todos os componentes nutricionais exceto o defensivo agrícola, acrescentando um inóculo de 1% dos micro-organismos.

### **3.6 Avaliação do Crescimento**

#### **3.6.1 Peso Seco**

O crescimento microbiano foi avaliado através do peso seco, para o qual foram filtrados 10 ml de amostra de cada cultivo em membrana de porosidade de 0,2 µm, sendo que estas membranas foram previamente secas em estufa (Quimis, Brasil) durante 30 minutos a

105 °C, esfriadas em dessecador por 15 minutos e pesadas em balança analítica (Adventurer, Ohaus Corp, USA). Após a filtragem, as membranas foram novamente secas em estufa (Quimis, Brasil) durante 4 horas a 105 °C, esfriadas em dessecador por 15 minutos e pesadas em balança analítica (Adventurer, Ohaus Corp, USA).



**Figura 7.** Estratégias nutricionais para o isolamento de bactérias degradadoras de metamidofós. As variações de cada meio de cultivo são S/SP + N: Sem enxofre e fósforo, mais nitrogênio; S/NP + S: Sem nitrogênio e fósforo, mais enxofre; S/NS + P: Sem nitrogênio e enxofre, mais fósforo; S/PSN: Sem fósforo, enxofre e nitrogênio. As três fontes de carbono são GGC: Glicerol, Glicose e Citrato; GC: Glicerol e Citrato; MET: Metamidofós. Os meios de cultura correspondentes a cada estratégia são: A1 – A4; B1 – B4; C1 – C4

### ***3.6.2 Densidade Óptica***

O crescimento microbiano foi acompanhado também, pela medição da densidade óptica a 540 nm. Foi retirado 1 ml de cada cultivo e colocado numa cubeta para a leitura da densidade óptica no espectrofotômetro Ultrospec 1000 (Amersham Pharmacia Biotech), usando água destilada como branco.

### ***3.6.3 Contagem Total de Células***

#### ***3.6.3.1 Lavagem de lâminas***

As lâminas foram dispostas num becker com 20 g de KOH e 200 ml de etanol durante 40 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas suavemente com os dedos para não remover a cobertura de teflon. Foram enxaguadas com abundante água e secas a temperatura ambiente.

#### ***3.6.3.2 Preparo de lâminas***

Em uma solução de 50 mg de gelatina e 0,01% de KCr(SO<sub>4</sub>) em água quente foram dispostas as lâminas recém lavadas. Estas foram secas a temperatura ambiente e armazenadas a -4 °C.

#### ***3.6.3.3 Coloração de DAPI***

O crescimento bacteriano dos primeiros microcosmos foi acompanhado através da contagem total de células utilizando a coloração com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). As amostras do cultivo do primeiro inóculo com amostra de solo foram diluídas 10 vezes a fim de diminuir a interferência das partículas de solo na contagem de micro-organismos.

As amostras foram sonicadas durante 10 minutos para o melhor desprendimento das bactérias. Posteriormente, foram aplicados 10 µl de cada amostra nos poços das lâminas. Estas foram secas em estufa durante 40 minutos a 47 °C e em seguida foram adicionados 9 µl de água destilada e 1 µl do corante DAPI (1 mg/10 ml) e incubadas durante 8 minutos na escuridão.

As lâminas foram lavadas com água destilada e foram secas na escuridão. A cada poço foram adicionados 2 µl de PBS/Glicerol e uma lamínula para ser observada no microscópio de fluorescência Axiovert S100 (1000x) no comprimento de onda na faixa 490 – 511 nm (BLOEM JAAP, 1995).

### **3.7 Isolamento e Caracterização de Bactérias Degradadoras de Metamidofós**

Nos meios de cultivo nos quais foi observado crescimento foram feitas diluições seriadas decimais semeadas em placa de meio semisólido, em duplicata, usando meio rico R2A (Merck) e Meio Mínimo Mineral Sólido suplementado com Metamidofós de acordo à estratégia de isolamento utilizada. Os cultivos foram incubados por aproximadamente 8 dias na temperatura ambiente e no escuro.

#### ***3.7.1 Caracterização Macroscópica dos Isolados***

As colônias com aparência (morfologia, cor e rugosidade) diferente foram transferidas com aça de níquel cromo ao meio de cultura R2A (Merck) pela técnica de esgotamento. Depois de verificada a pureza das colônias, estas foram cultivadas em TSB (Merck) durante aproximadamente 18 horas a 37 °C e preservadas em glicerol 20% no freezer a -80 °C.

#### ***3.7.2 Caracterização Microscópica dos Isolados***

A caracterização microscópica das bactérias isoladas foi realizada com a coloração de Gram a qual permite observar sua morfologia e classificá-las como bactérias Gram positivas ou Gram negativas.

Com a ajuda de uma aça de níquel – cromo foi transferida uma colônia a uma lâmina e seca no fogo para a fixação das células na superfície. A lâmina foi coberta com uma solução de cristal violeta fenicada (1 g de cristal violeta, 10 ml de álcool 95%, 2 g de fenol fundido para 100 ml de água) durante um minuto, posteriormente foi adicionado lugol (1 g de iodo, 2 g de iodeto de potássio para 300 ml de água destilada) durante um minuto. Inclinou-se a lâmina e foi gotejado álcool acetona até que não houvesse desprendimento do corante.

Em seguida a lâmina foi lavada rapidamente com água e coberta com fucsina (0,3g de fucsina básica, 10 ml de álcool 95%, 5 g de fenol fundido para 100 ml de água) e após 30 segundos a lâmina foi lavada. Uma gota de óleo de imersão foi colocada na lâmina seca que foi analisada no microscópio Olympus CHS (Olympus Optical Co. Ltd. Japão) no aumento de 100 x.

### **3.8 Identificação de Bactérias Degradadoras de Metamidofós**

A fim de realizar um *screening* das bactérias foi extraído o DNA genômico de cada cepa utilizando o protocolo de Pick up et al. (1995) modificado. O gene rDNA 16S foi amplificado através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o fragmento amplificado foi digerido para a comparação do padrão de bandas das amostras (ARDRA) (MASSOL-DEYA et al., 1995).

#### **3.8.1 Identificação por Métodos Moleculares**

##### **3.8.1.1 Extração de DNA**

O DNA total das bactérias foi extraído segundo o protocolo de Pickup et al. (1995) modificado. As bactérias foram cultivadas em 9 ml de meio rico TSB (Merck) durante 18 horas sob agitação na rotação de 150rpm à temperatura de 37 °C. O pellet das bactérias foi obtido por centrifugação em tubos Eppendorf de 2 ml durante 6 minutos a 7000rpm e o sobrenadante foi descartado. Este procedimento foi repetido duas vezes ou até atingir um pellet denso. O pellet foi ressuspensionado em 150 µl de solução de lisozima 50 mg/ml (125 µl de enzima a 400 mg/ml e 875 µl de TE) e incubado em banho maria a 37 °C durante uma hora. Posteriormente, foram adicionados 500 µl de solução de lise (tiocianato de guanidina, EDTA, e sarcosyl), a solução foi misturada rapidamente no aparelho vórtex e a solução foi incubada no gelo por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 250 µl de acetato de amônia gelado, a solução foi homogeneizada gentilmente e incubada no gelo por 10 minutos. Após a incubação foram adicionados 500 µl de clorofórmio álcool isoamílico, a amostra foi misturada por inversão e centrifugada por 10 minutos a 13000 rpm. A fase aquosa foi transferida para outro tubo eppendorf no qual foi adicionado meio volume de isopropanol, seguido de incubação por 40 minutos a -80 °C.

Após a incubação, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 13000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 500 µl de etanol 70%, seguido de centrifugação durante 3 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado novamente e o pellet secado a 37 °C por 15 minutos. O DNA extraído foi dissolvido em 20 µl de água estéril.

Para verificar a pureza e qualidade do DNA extraído realizou-se uma corrida de eletroforese em gel de agarose 1% a 100 volts em TAE 1x utilizando 3 µl do material corado com 2 µl de Loading buffer (0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose). O padrão da corrida foi o λ DNA (Gibco) a 53 ng/µl. Após a corrida o gel foi corado com uma solução de brometo de etídio (0,1 mg/ml) e observado em luz ultravioleta (GEL LOGIC 100 IMAGING SYSTEM, KODAK, USA) e fotografado (Kodak 1D Versão 3.6).

### *3.8.1.2 Amplificação do Fragmento DNAr 16s por PCR*

O fragmento do DNAr 16s foi amplificado com o uso da técnica PCR utilizando os *primers* externos 27F e 1401R com seqüências 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' e 5'- CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3', respectivamente e os *primers* internos 338F e 1100R com seqüências 5'ATC CCT ACG GGA GGC-3' e 5'AGG GTT GCG CTC GTT G-3', respectivamente. Para o preparo da reação de PCR foram utilizados de 50 a 100 ng de DNA extraído dos isolados, 2,5 µl de tampão de PCR (10x - Invitrogen), 1 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM – Invitrogen), 0,2 µl de dNTPs (25 mM de cada - Fermentas), 1U de Taq polimerase (Invitrogen) e 0,25 µl de cada *primer* (20 µM - Integrated DNA Technologies), completando com água ultra pura (GIBCO) a um volume final de 25 µl.

A amplificação do fragmento de DNAr 16s ocorreu no termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha), sendo as seguintes condições empregadas: desnaturação a 95 °C por 3 minutos, anelamento a 62,5 °C por um minuto, extensão a 72 °C por 30 segundos durante 30 ciclos e extensão final de 7 minutos a 72 °C. O controle negativo utilizado na reação teve adição de água ao invés de DNA do isolado sob as mesmas condições acima mencionadas.

Para verificar o tamanho do fragmento amplificado realizou-se uma corrida de eletroforese em gel de agarose 1% a 100 volts com TAE 1% utilizando 3 µl do material corado com 2 µl de *Loading buffer*. O padrão do peso molecular do fragmento foi o *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen).

Após a corrida o gel foi corado com uma solução de brometo de etídio (0,1 mg/ml) e observado em luz ultravioleta (GEL LOGIC 100 IMAGING SYSTEM, KODAK, USA) e fotografado (Kodak 1D Versão 3.6).

### *3.8.1.3 Análise de Restrição do DNAr Amplificado (ARDRA)*

Os fragmentos de DNAr 16s amplificados foram digeridos por enzimas de restrição para realizar a comparação do padrão de bandas das bactérias isoladas. Uma alíquota de 10 µl dos produtos de amplificação, 0,6 µl (10 U/µl – Fermentas) das enzimas *BsuRI* (*HaeIII*) (5'...GG<sup>CC</sup>...3' / 3'...CC<sup>GG</sup>...5' - Fermentas) e *HhaI* (5'...GCG<sup>C</sup>...3' / 3'...C<sup>GCG</sup>...5' - Fermentas) e 3 µl de Buffer Tango (Fermentas), completando com água ultra pura (Gibco) a um volume final de 30 µl. A solução foi incubada durante 2 horas a temperatura de 37 °C em banho maria.

Para verificar a digestão dos fragmentos amplificados realizou-se uma corrida de eletroforese em gel de agarose 3% a 80 volts em TAE 1% utilizando os 30 µl do material corado com 5 µl de *Loading buffer* (0.25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose). O padrão da corrida foi o *50 pb DNA Ladder* (50 a 1000pb – Fermentas). Posteriormente, o gel foi corado com uma solução de brometo de etídeo (0,1 mg/ml) e observado em luz ultravioleta (GEL LOGIC 100 IMAGING SYSTEM, KODAK, USA) e fotografado (Kodak 1D Versão 3.6).

### *3.8.1.4 Seqüenciamento e Identificação do DNAr 16s*

A identificação de cada bactéria foi obtida através do seqüenciamento do fragmento do gene DNAr 16s. A amplificação do gene para o seqüenciamento foi realizada utilizando dois *primers* externos, 27f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG –3') (LANE et al., 1991) e 1401r (3'- CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG – 5') (HEUER et al., 1997) e dois *primers* internos, 338f (5'- ATC CCT ACG GGA GGC AGC – 3') (AMANN et al., 1995) e 1100r (3'- AGG GTT GCG CTC GTT G – 5') (WEISBURG et al., 1991). Após a amplificação do DNAr, o DNA foi purificado para retirar os nucleotídeos não incorporados e os primers restantes utilizando o kit *Wizard PCR Preps DNA Purification System* (Invitrogen, Madison, WI, USA). A quantificação dos produtos foi feita no nanodrop.

O seqüenciamento foi realizado pelo Centro de Estudos do Genoma Humano – USP no seqüenciador *ABI 3730 DNA Analyser utilizando DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit*. As seqüências obtidas foram analisadas pelo software *Sequencing Analysis 5.3.1 o Base Caller KB*.

As seqüências dos nucleotídeos foram analisadas e editadas manualmente no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.0.9.0 e os alinhamentos múltiplos foram realizados com *Clustal W*. As seqüências foram então comparadas com as disponíveis no banco de dados *GenBank* utilizando o programa *BLAST* do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) (ALTSCHUL et al., 1997).

### **3.8.2 Análise do Perfil de Ácidos Graxos**

A análise do perfil de ácidos graxos foi executada segundo o protocolo descrito no manual MIDI (MIDI, Microbial ID, INC., Newark, DeL.) modificado. As culturas bacterianas foram semeadas pelo método de esgotamento em meio TSBA (Tryptic Soy Broth Agar) (Tabela 6) e incubadas por  $24 \pm 2$  horas sob temperatura de  $28 \pm 1$  °C. Após o período de incubação foram transferidas quatro “alçadas” de células bacterianas do terceiro quadrante riscado na placa para um tubo de cultura de 13x100 cm. Foi adicionado 1 ml do reagente de saponização (Tabela 6) a cada tubo contendo as células. Os tubos foram agitados por 5–10 segundos e aquecidos em água fervente por 5 minutos. Logo em seguida, os tubos foram novamente agitados e retornaram ao banho para serem aquecidos por mais 25 minutos. Os tubos foram esfriados e foram adicionados 2 ml do reagente de metilação (Tabela 6). A mistura foi agitada por inversão e aquecida a 80 °C por 10 minutos. Foram adicionados 1,25 ml do reagente de extração (Tabela 6) aos tubos resfriados que foram em seguida agitados em rotador clínico por 10 minutos. A fase aquosa (inferior) foi descartada e a fase orgânica foi acrescentada de 3 ml do reagente de lavagem. Os tubos foram agitados por 5 minutos em rotador clínico, e após esta etapa, cerca de 2/3 da fase orgânica foram transferidos para um frasco específico para cromatografia gasosa.

**Tabela 6 - Reagentes e Meios de Cultura para a Extração de Ácidos Graxos**

<b>TSBA</b>	Tryptic Soy Broth	30 g
	Agar	15 g
	Água destilada	1l
<b>Reagente de Saponificação</b>	Hidróxido de Sódio	45 g
	Metanol	150 ml
	Água destilada	150 ml
<b>Reagente de Metilação</b>	Ácido clorídrico 6N	375 ml
	Metanol	275 ml
<b>Reagente de Extração</b>	Hexano	200 ml
	Terbutil metil éter (MTBE)	200 ml
<b>Reagente de Lavagem</b>	Hidróxido de sódio	10,8 g
	Água destilada	900 ml

### 3.9 Avaliação do Potencial de Degradação

#### 3.9.1 *Cultivo das Bactérias para Avaliação da Degradação de Metamidofós*

As bactérias isoladas foram cultivadas em 500 ml do meio de cultivo sem enxofre e fósforo e no meio de cultivo sem nitrogênio e fósforo, durante 15 dias na temperatura ambiente no escuro. Foram retirados 5 ml de amostra durante 15 dias para análise por cromatografia gasosa e cromatografia iônica.

#### 3.9.2 *Analise de Metamidofós por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC/MS)*

Para avaliar o consumo do metamidofós após o crescimento bacteriano, este defensivo agrícola foi extraído em fase líquido – líquido e foi analisado no GC/MS utilizando o cromatógrafo gasoso (Trace GC, Thermo Finnigan Thermo Electron Corporation, USA) acoplado a um espectrômetro de massas (PolarisQ, Thermo Finnigan, Thermo Electron Corporation, USA).

### *3.9.2.1 Extração do Metamidofós para Análise de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas*

Para extração do defensivo agrícola na fase líquido-líquido foram adicionados 5 ml de acetato de etila e 250 µl de Cloreto de Sódio saturado (25 g/50 ml) a 2,5 ml do meio de cultura filtrado com membrana de porosidade de 0,22 µm. Agitou-se a mistura por inversão durante 20 minutos em um agitador clínico (AP 22, Phoenix). Logo depois, se adicionaram aproximadamente 2 g de sulfato de sódio anidro e agitou-se durante 10 minutos e deixou-se em repouso durante 5 minutos. Uma alíquota de aproximadamente 2 ml foi transferida para um vial âmbar e mantido a -20 °C até sua análise (GÓES, 2009).

### *3.9.2.2 Análise de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas*

A análise no cromatógrafo gasoso Trace GC (Thermo Electron Corporation, USA) acoplado a um espectrômetro de massas PolarisQ (Thermo Electron Corporation) foi feita com injeção de 1 µL em modo *splitless*, em injetor *split/**splitless* na temperatura de 250 °C em coluna capilar 5MS-HP de 30m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme (Agilent, USA), com fluxo de 1 ml/minuto com gás Helio como fase móvel. A rampa de temperatura de cromatografia foi iniciada a 90 °C, mantida durante 1 minuto, aquecimento de 10 °C por minuto até atingir 120 °C, e posteriormente, a temperatura foi aumentada na taxa de 40 °C por minuto até atingir a 300 °C durante 3 minutos. A temperatura da linha de transferência foi de 275 °C e a fonte de íons a 250 °C (GÓES, 2009).

### *3.9.2.3 Curva de Calibração Padrão para Análise de Metamidofós*

Para a obtenção da curva de calibração de metamidofós foi injetado 1 µl de cada padrão com as seguintes concentrações, 10 µg/ml, 30 µg/ml, 50 µg/ml, 70 µg/ml e 90 µg/ml. Para o preparo dos padrões 10, 30, 50, 70, e 90 µg/ml foram adicionados 10, 30, 50, 70 e 90 µl de padrão puro de metamidofós (Monitor, 100 µg/ml, AccuStandard, New Heaven, USA), respectivamente; e 88, 68, 48, 28 e 8 µl de acetato de etila grau defensivo agrícola (VETEC, Brasil), respectivamente. Em todos os padrões foram utilizados 1,2 µl de padrão interno, Acenaphtene-d10 (4 mg/ml AccuStandard, New Heaven, USA) e foram feitos em vials âmbar mantidos a -20 °C.

A injeção de 1 $\mu$ l dos 5 padrões foi feita em triplicata no cromatógrafo gasoso (Trace GC, Thermo Finnigan Thermo Electron Corporation, USA) acoplado a um espectrômetro de massas (PolarisQ, Thermo Finnigan, Thermo Electron Corporation, USA).

### **3.9.3 Análise de Cromatografia Iônica**

Para avaliar o consumo de fósforo (P), nitrogênio (N) e enxofre (S) presentes na molécula de metamidofós foi avaliada a variação da quantidade dos íons fosfato, sulfato, amônio e/ou nitrato nos meios de cultura. A análise de ânions e cátions foi feita por cromatografia iônica (761 Compact IC – Metrohm Ltd. Herisau, Switzerland).

A quantificação foi realizada utilizando uma curva de calibração externa de 6 concentrações, 1 mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l, 6 mg/l, 8 mg/l e 10 mg/l, para os ânions cloreto, brometo, fosfato, nitrato, sulfato e fluoreto com o padrão Multiânions da Pensalab (IsoSol – Quimilab, Jacareí, SP, Brasil) e para os cátions sódio, magnésio, amônia, potássio e cálcio com o padrão Multicátions da Pensalab (IsoSol – Quimilab, Jacareí, SP, Brasil) no programa IC NET 2.3.

Na análise de ânions foi utilizada a coluna Metrosep A Supp 5, com pré filtro Metrosep RP Guard, fluxo de 0,7 ml/min do eluente (3,2 mM de bicarbonato de sódio e 1,0 mM de carbonato de sódio) filtrado em membrana de porosidade de 0,22  $\mu$ m e desgaseificado durante 30 minutos.

A análise de cátions foi feita com a coluna Metrosep C4 150 e pré coluna C4 Guard com fluxo de 0,9 ml/min do eluente (1,7 mM de ácido nítrico e 0,7 mM de ácido dipicolínico) desgaseificado por 30 minutos antes da análise.

## **3.10 Avaliação do Crescimento das Bactérias em Metanol**

O crescimento bacteriano em metanol foi avaliado por medição de DO em 20 ml de meio mínimo mineral sem fonte de carbono, com várias concentrações de metanol (0,05%v/v, 0,1%v/v, 0,5%v/v, 1%v/v, 2%v/v e 1 g/l) durante 15 dias sob condições escuras.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Enriquecimento de Bactérias Degradadoras de Metamidofós

Quatro estratégias diferentes foram avaliadas para o enriquecimento e isolamento de bactérias degradadoras de metamidofós, utilizando amostras de água e solo de uma área em constante contato com uma ampla variedade de defensivos agrícolas, incluindo o metamidofós.

Todos os meios de cultura foram elaborados com o objetivo de disponibilizar a fonte de carbono para a célula na concentração de 1 g/l de carbono. Como a molécula de metamidofós pode suprir, potencialmente as necessidades de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre da célula, elaboraram-se diferentes meios de cultura para verificar, especificamente, a capacidade do pesticida de servir como fonte específica destes elementos.

O critério de sucesso adotado para isolamento foi o crescimento das culturas de enriquecimento no quarto subcultivo, onde compostos eventualmente presentes na amostra original já teriam sido diluídos ao ponto de não interferirem, favorecendo ou prejudicando o crescimento das bactérias e, por conseguinte, alterando o resultado dos experimentos.

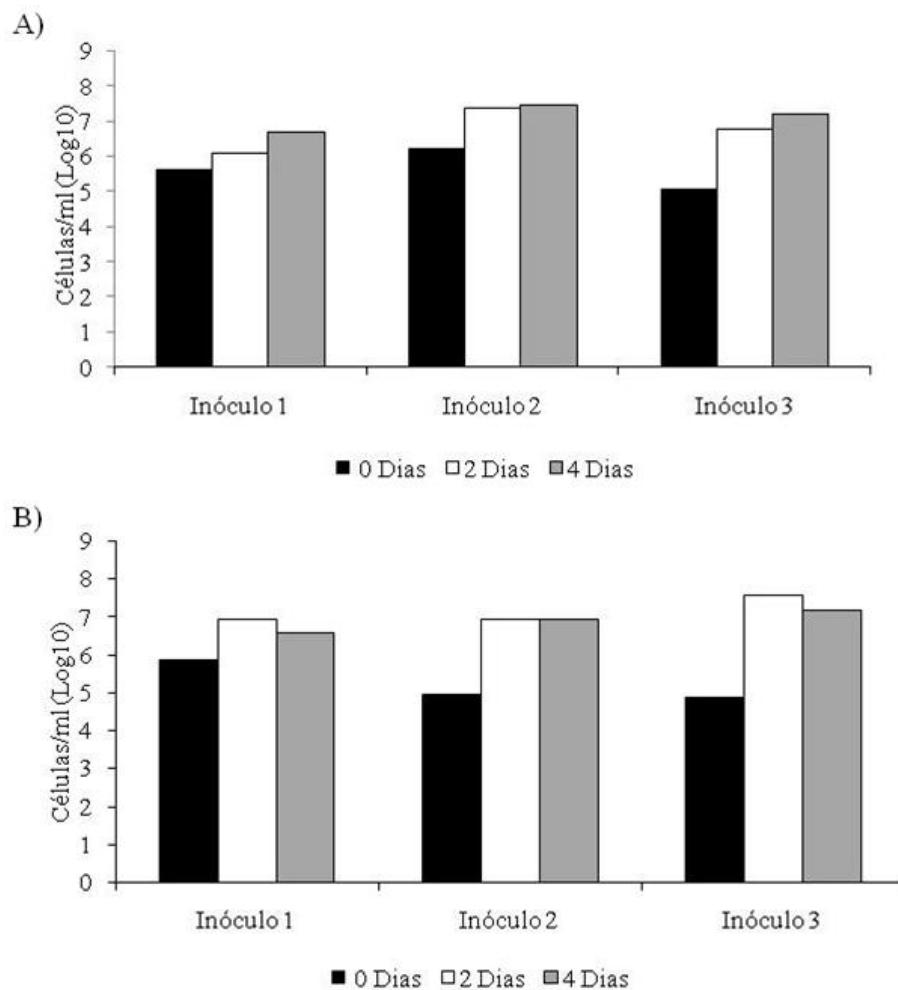
A análise nutricional indica que para 1 átomo de carbono de metamidofós a quantidade de nitrogênio, enxofre e fósforo da molécula atenderia todas as necessidades nutricionais da célula com respeito a estes elementos, considerando a sua proporção no metamidofós de 1C: 0,5N: 0,5P: 0,5S, comparado com a proporção na biomassa de bactérias de 1C: 0,28N: 0,06P: 0,02S (BAILEY e OLLIS, 1986).

Apesar de esta análise indicar não ser necessário complementar um meio onde metamidofós é a fonte de carbono com outras fontes de N, S e P, também foram avaliados meios de enriquecimento com o pesticida como fonte de carbono e fontes externas de N, S e P, porém, em nenhum dos ensaios onde metamidofós foi a única fonte de carbono foi observado crescimento celular (dados não apresentados).

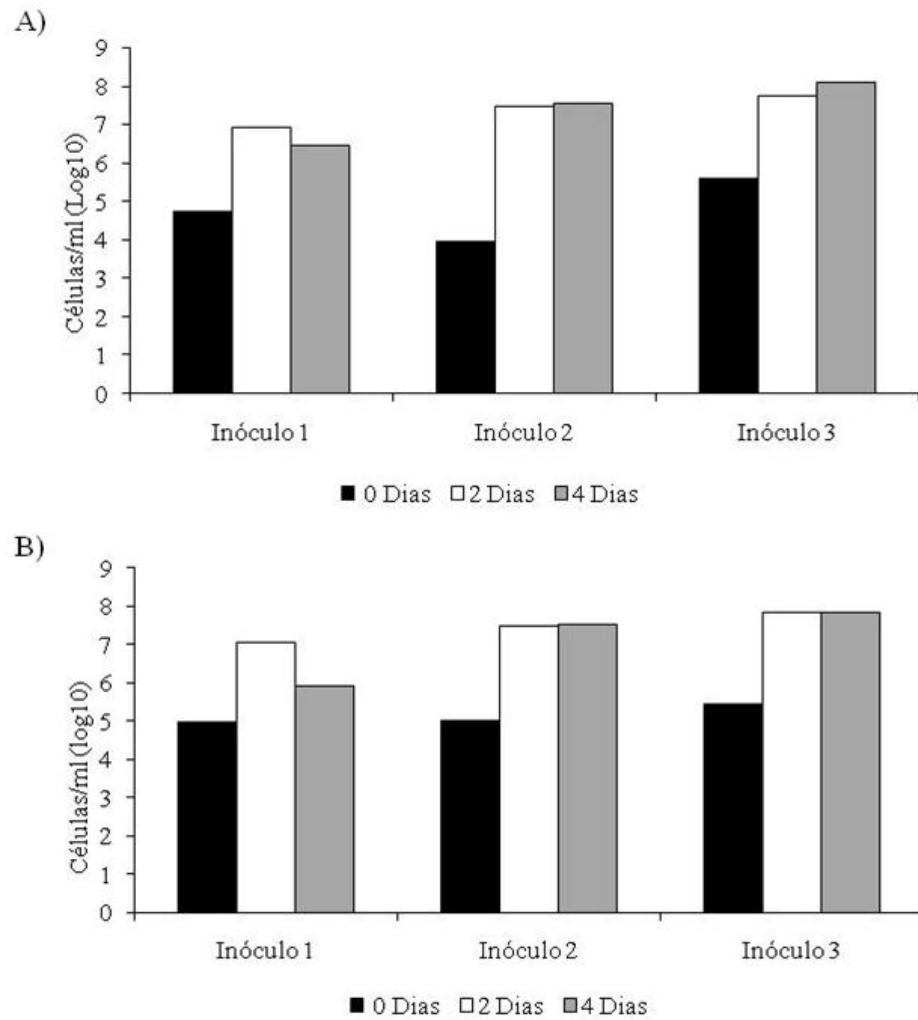
Em função do não-isolamento de organismos capazes de empregar o pesticida como única fonte de carbono, foram avaliadas alternativas, onde outras fontes de carbono foram combinadas com o metamidofós como fonte de N, S, ou P. Nestes casos é importante ressaltar que o teor de carbono do metamidofós foi desconsiderado no cálculo da composição do meio, ou seja, a concentração de 1 g/l de carbono se refere unicamente ao carbono contido nas substâncias usadas como fonte de carbono.

Experimentos preliminares demonstraram enriquecimento de consórcios capazes de utilizar metamidofós como fonte isolada de N, P ou S. Em função destes resultados foram conduzidos experimentos para isolamento de culturas de enriquecimento capazes de utilizar o metamidofós como fonte simultânea de dois conjuntos de nutrientes.

Na estratégia de isolamento onde o metamidofós foi a única fonte de enxofre e fósforo no meio de cultura, os consórcios de água e solo com fonte de carbono, glicose, glicerol e citrato ou apenas glicerol e citrato (Figura 8 e 9) apresentaram crescimento aproximadamente duas vezes maior, atingindo contagens de  $10^7$  e  $10^8$  células/ml, respectivamente, após os três subcultivos.

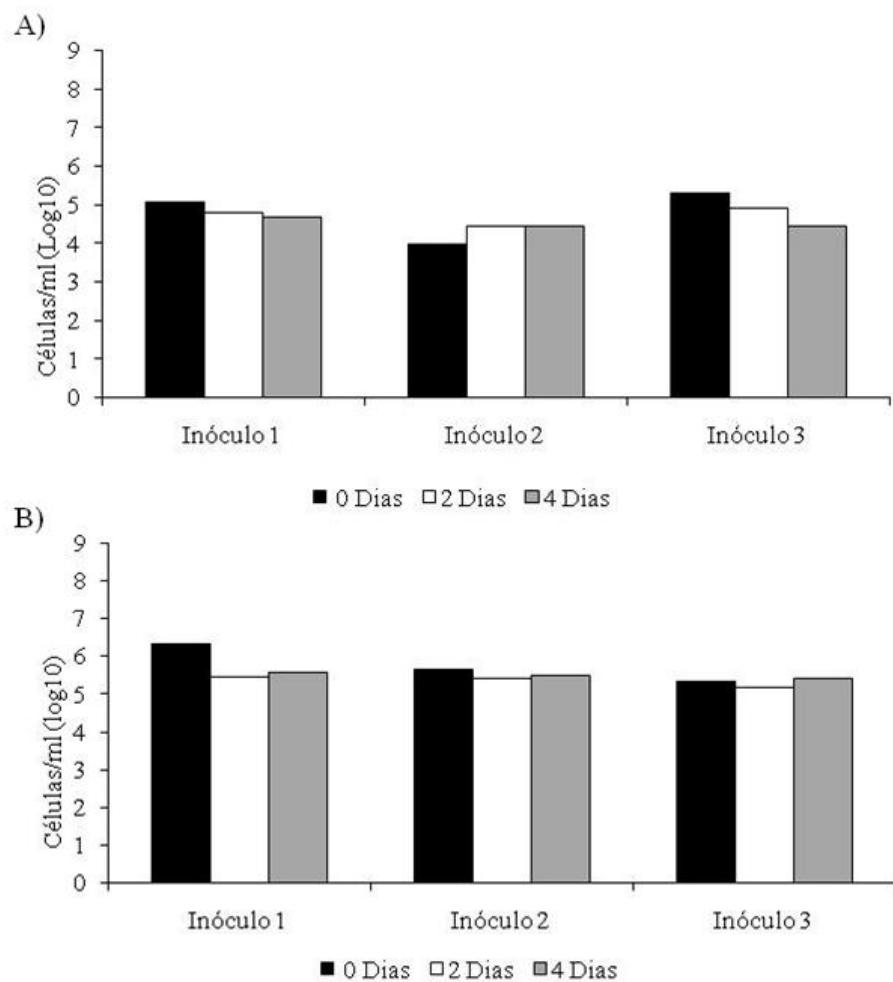


**Figura 8.** Contagem total de células por DAPI. Cultivos com Glicose, Glicerol e Citrato como fonte de carbono e metamidofós como fonte simultânea de enxofre e fósforo. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo



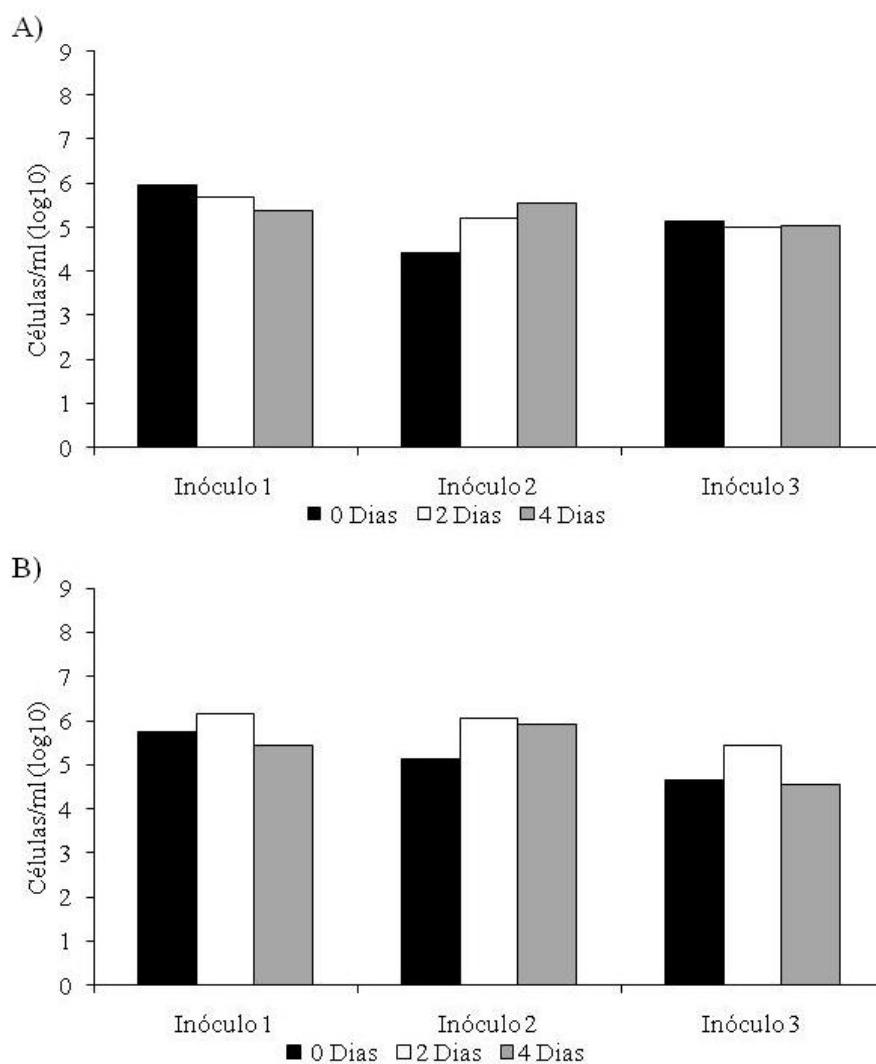
**Figura 9.** Contagem total de células por DAPI. Cultivos com Glicerol e Citrato como fonte de carbono e metamidofós como fonte simultânea de enxofre e fósforo. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo.

Já nos consórcios nos quais o metamidofós serviu como fonte simultânea de enxofre, fósforo e carbono, observa-se na figura 10 que não houve crescimento após os três subcultivos, visto que as contagens permaneceram na mesma unidade logarítmica nas amostras de solo e água.

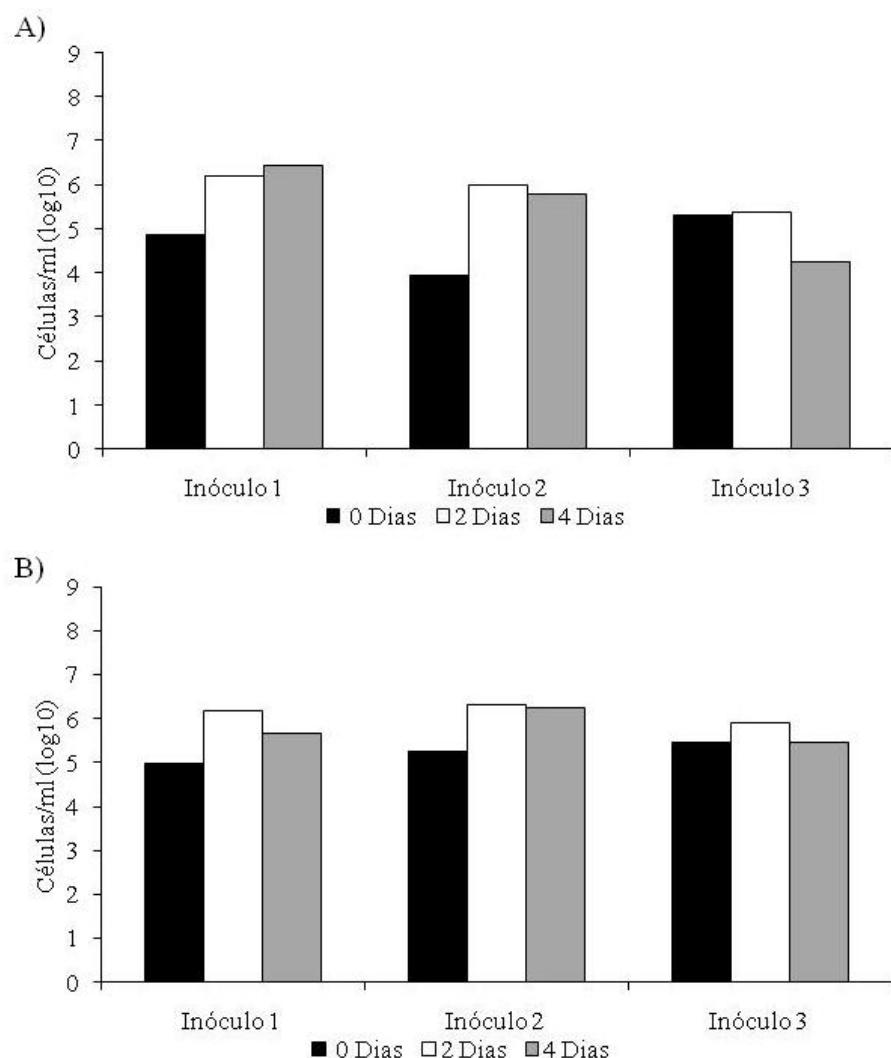


**Figura 10.** Contagem total de células por DAPI. Cultivos com metamidofós como fonte simultânea de carbono, enxofre e fósforo. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo.

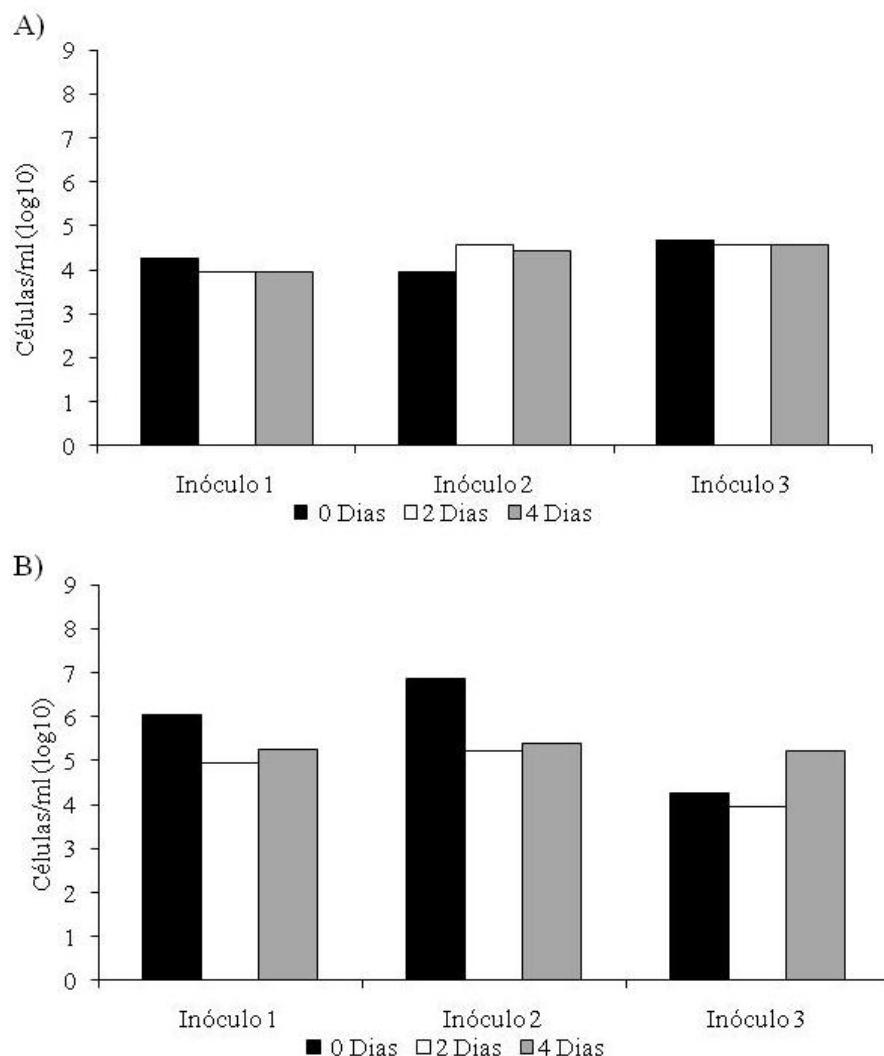
Quando o metamidofós serviu como única fonte de nitrogênio e fósforo com as mesmas fontes de carbono citadas na estratégia anterior (A2, B2 e C2), os consórcios das amostras de água e solo não mantiveram o crescimento no terceiro subcultivo, apesar de evidenciar-se um aumento na contagem das bactérias no segundo subcultivo (Figura 11, 12 e 13).



**Figura 11.** Contagem total de células por DAPI. Cultivos com Glicose, Glicerol e Citrato como fonte de carbono e metamidofós como fonte simultânea de nitrogênio e fósforo. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo.

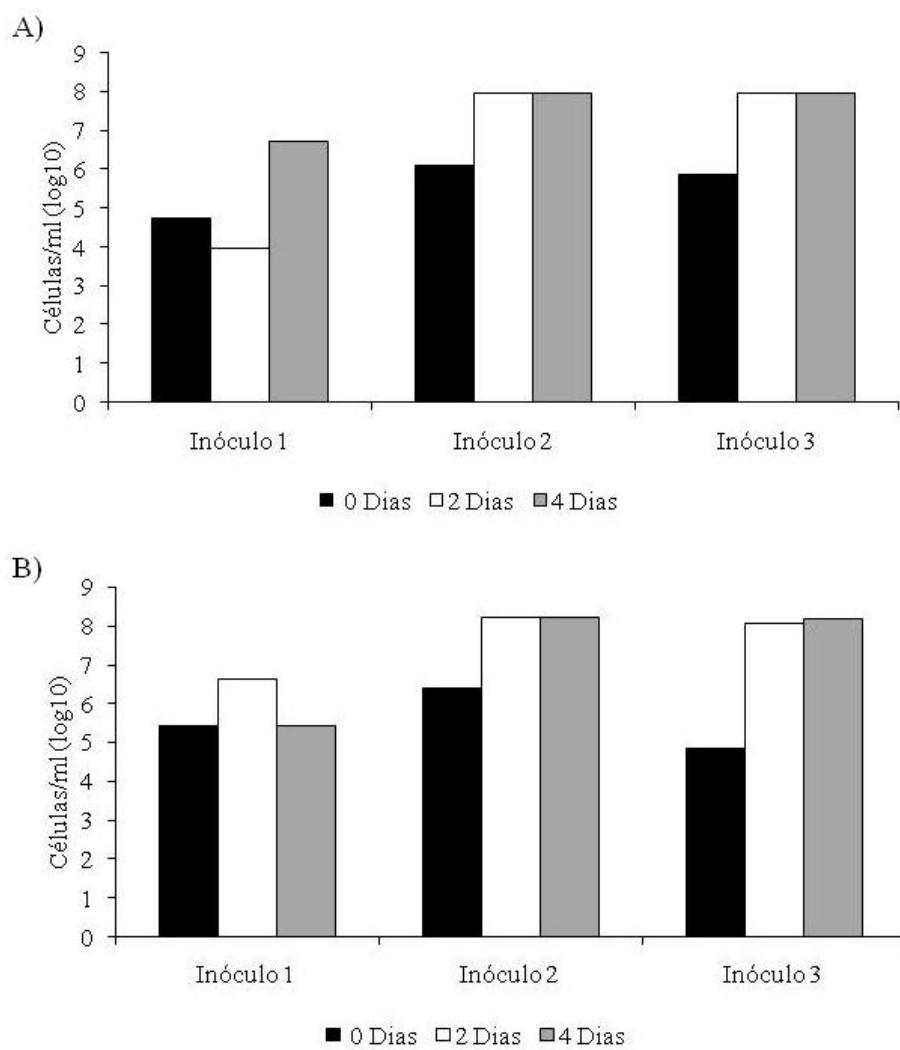


**Figura 12.** Contagem total de células por DAPI. Cultivos com Glicerol e Citrato como fonte de carbono e metamidofós como fonte simultânea de nitrogênio e fósforo. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo.

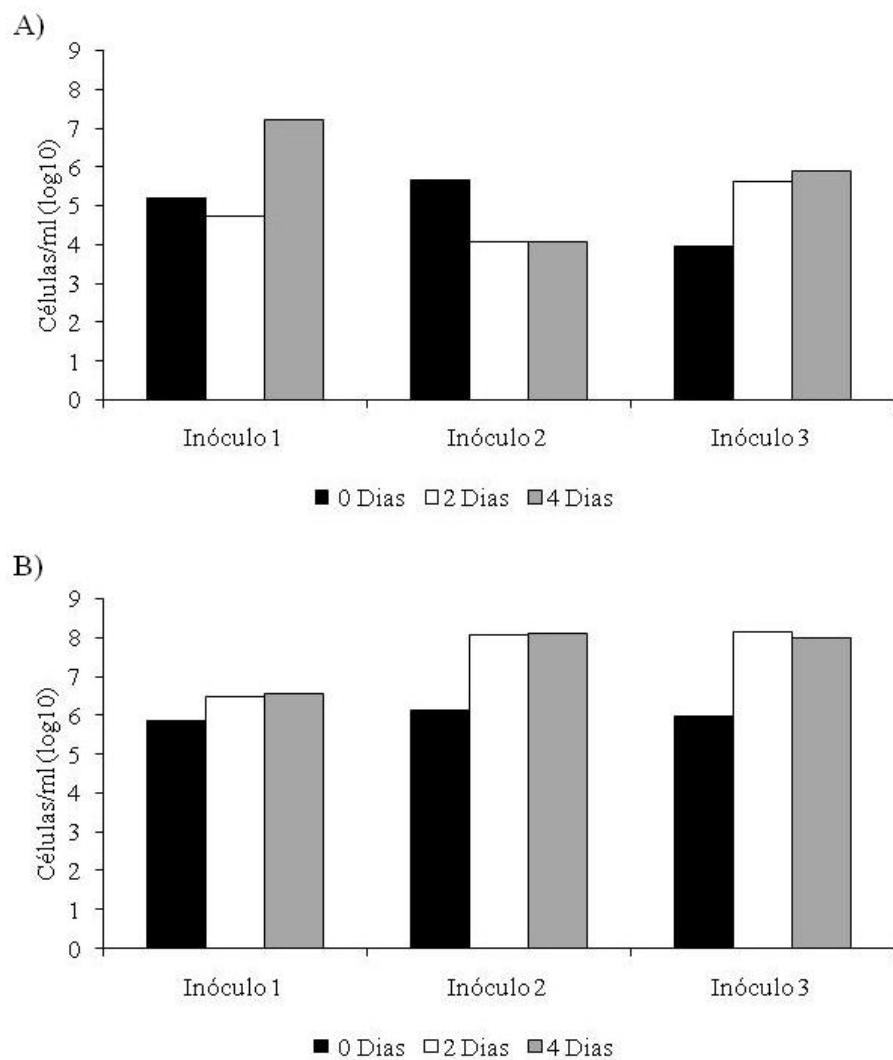


**Figura 13.** Contagem total de células por DAPI. Cultivos com metamidofós como fonte simultânea de carbono, nitrogênio e fósforo. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo.

No meio onde o metamidofós serviu como fonte de enxofre e nitrogênio, observou-se crescimento nos cultivos de água e solo com as mesmas fontes de carbono atingindo contagens na ordem de  $10^9$  bactérias/ml no terceiro subcultivo (Figuras 14 e 15).

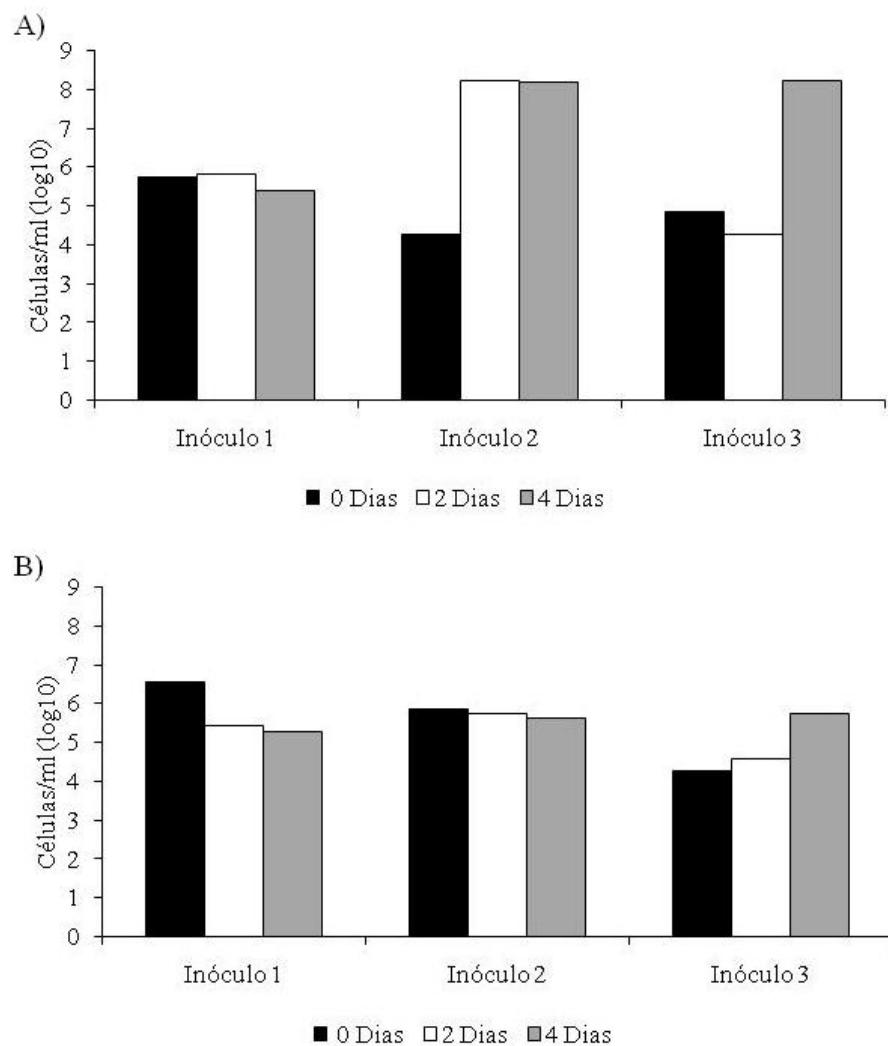


**Figura 14.** Contagem total de células por DAPI. Cultivos com Glicose, Glicerol e Citrato como fonte de carbono e metamidoftôxido como fonte simultânea de enxofre e nitrogênio. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo.



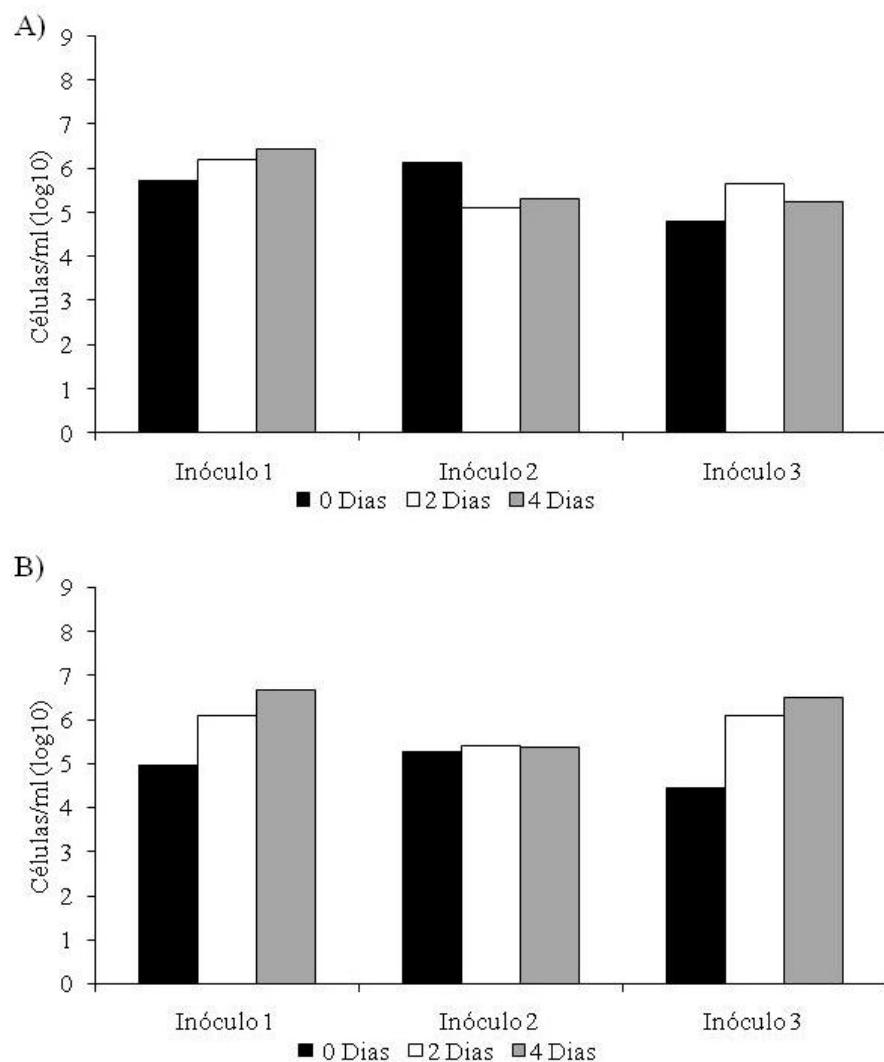
**Figura 15.** Contagem total de células por DAPI. Cultivos com Glicerol e Citrato como fonte de carbono e metamidofós como fonte simultânea de enxofre e nitrogênio. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo.

Ainda nos cultivos onde foi fornecido metamidofós como única fonte de carbono observa-se o aumento significativo no número de células até o terceiro subcultivo, porém este crescimento não se manteve nos cultivos posteriores o que não satisfaz o critério de sucesso adotado (Figura 16).

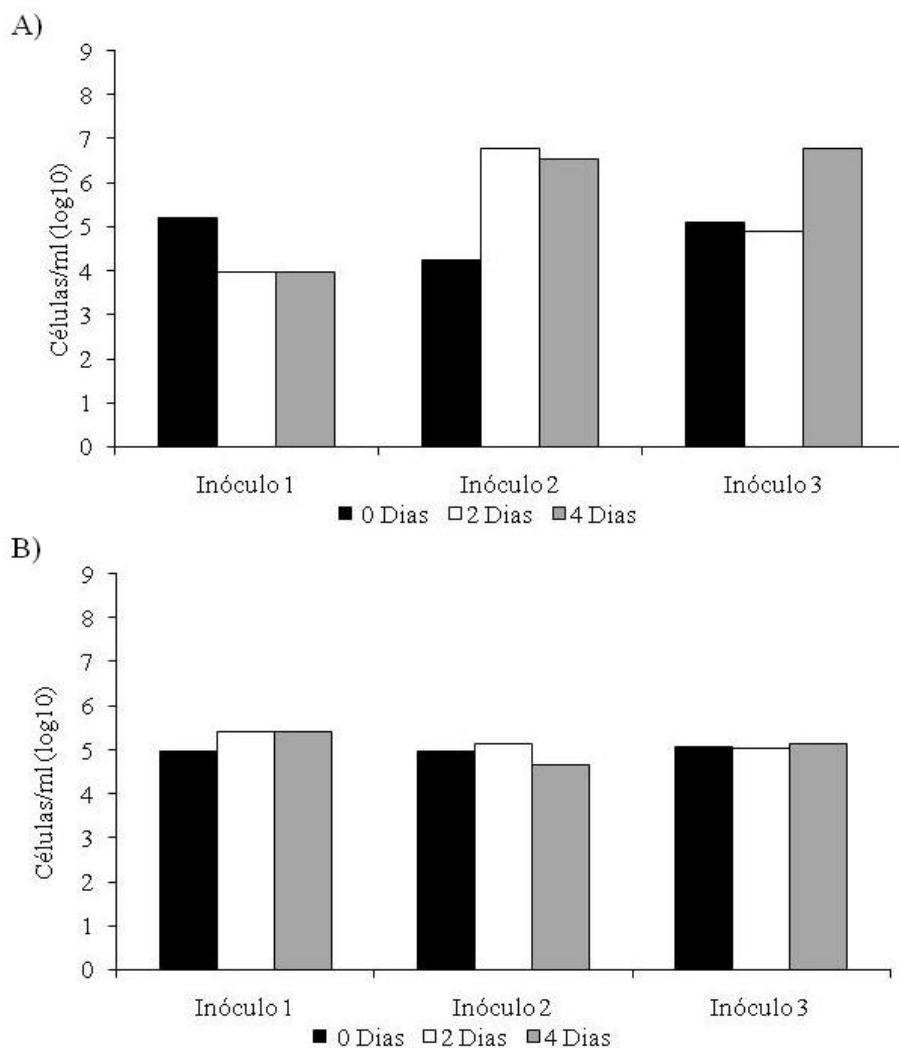


**Figura 16.** Contagem total de células por DAPI. Cultivos com metamidofós como fonte simultânea de carbono, enxofre e nitrogênio. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo.

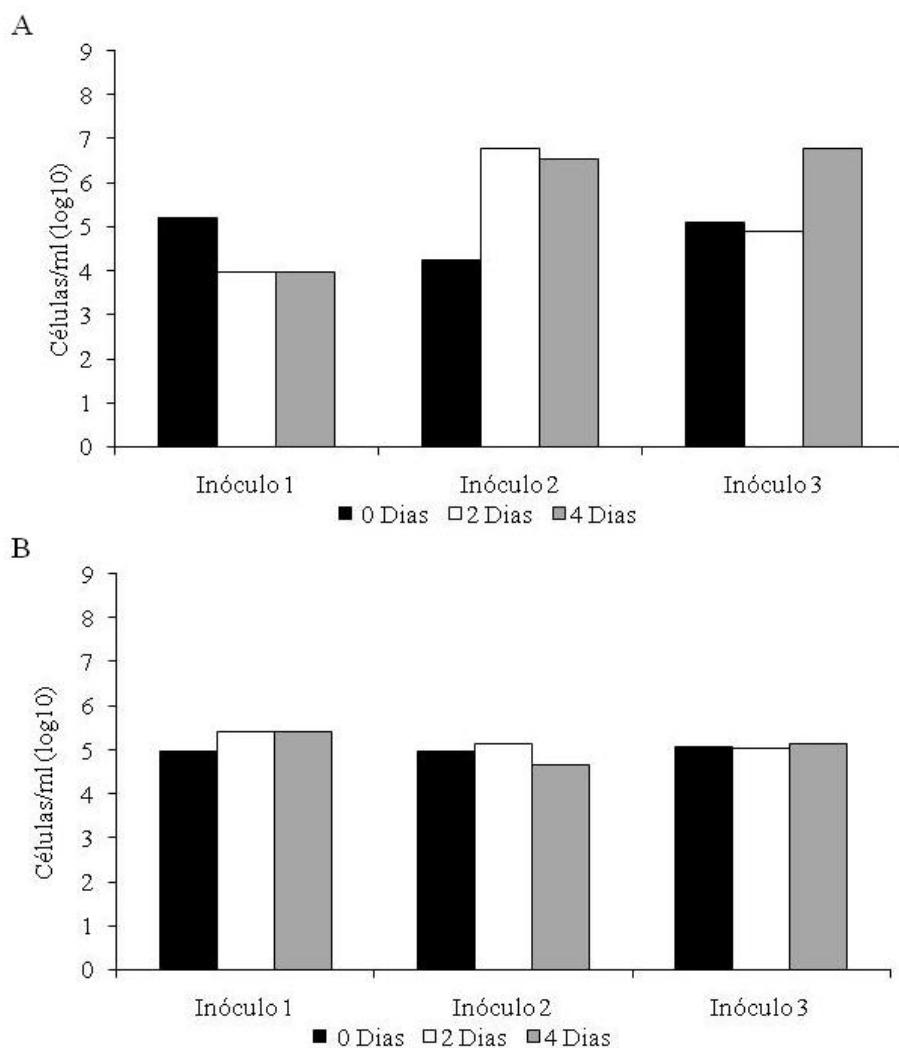
Testes de enriquecimento em meios de cultura onde o metamidofós serviu como única fonte de S, N e P não resultaram em consórcios estáveis no quarto subcultivo, independentemente da fonte de carbono empregada (metamidofós, glicose, glicerol e citrato) (Figura 17, 18 e 19).



**Figura 17.** Contagem total de células por DAPI. Cultivos com Glicose, Glicerol e Citrato como fonte de carbono e metamidofós como fonte simultânea de nitrogênio, enxofre e fósforo. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo.

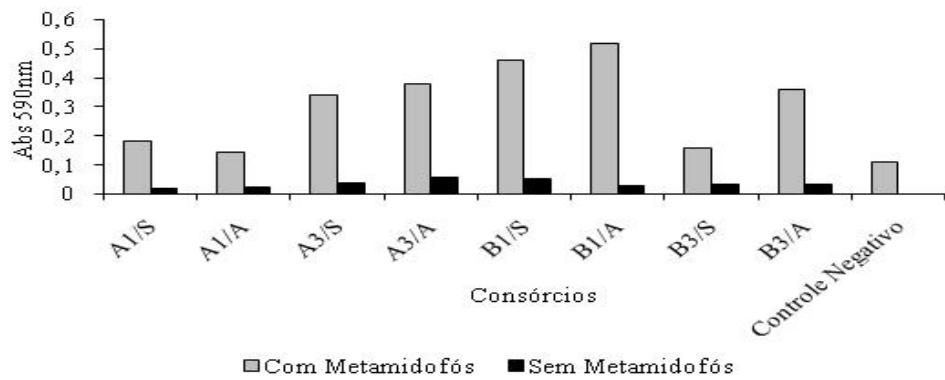


**Figura 18.** Contagem total de células por DAPI. Cultivos com Glicerol e Citrato como fonte de carbono e metamidofós como fonte simultânea de nitrogênio, enxofre e fósforo. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo.



**Figura 19.** Contagem total de células por DAPI. Cultivos com metamidofós como fonte simultânea de carbono, nitrogênio, enxofre e fósforo. A) Amostra de Água; B) Amostra de Solo.

A fim de avaliar se os consórcios apresentaram crescimento pela capacidade de utilizar o metamidofós como fonte de nutrientes e descartar a contaminação química do meio de cultivo como fonte destes nutrientes, foram feitos controles nos consórcios nos quais houve crescimento. Para isto as culturas de enriquecimento sem fósforo e enxofre (estratégia 1) e sem nitrogênio e enxofre (estratégia 3) com fonte de carbono glicerol, glicose e citrato, foram cultivadas sem metamidofós (Figura 20). Claramente a presença do pesticida resultou em crescimento significativamente melhor dos isolados, demonstrando a sua importância como fonte de nutrientes no meio de cultura.



**Figura 20.** Controle de crescimento dos consórcios da estratégia 1 (metamidofós como fonte simultânea de fósforo e enxofre) e 3 (metamidofós como fonte simultânea de nitrogênio e enxofre)

Para os ensaios iniciais de enriquecimento e isolamento de bactérias degradadoras foi utilizado Metamidofós de grau técnico com concentração de 60 g/l (Fersol, Brasil).

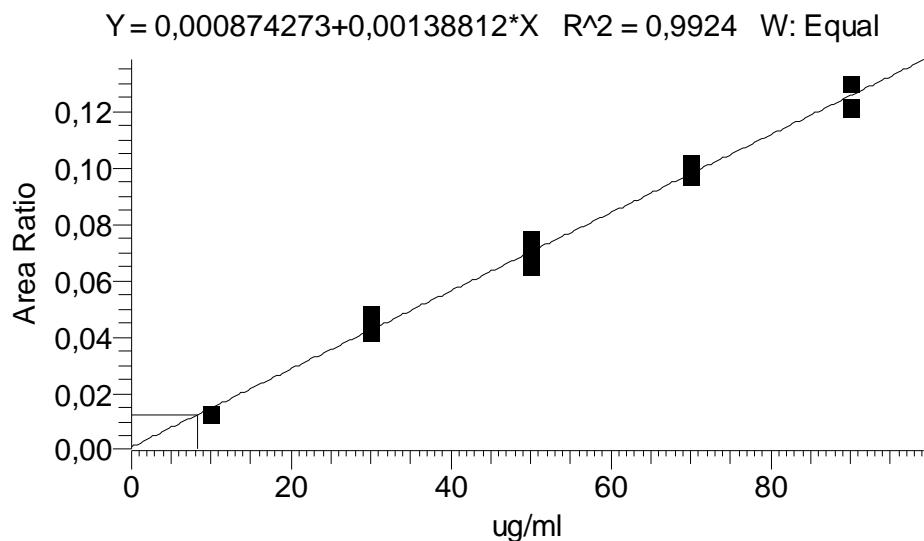
A fim de dar continuidade aos ensaios foi avaliada a degradação de metamidofós mediante análise por cromatografia gasosa (GC), uma das técnicas mais utilizadas para a determinação de resíduos de pesticidas em diversas matrizes de análise a qual pode estar acoplada a vários detectores, tais como Nitrogênio - Fósforo (NPD), Chama fotométrica (FPD) ou Espectrometria de massas (MS) (GOBO et al., 2004).

Um parâmetro vital na análise de pesticidas, e no caso específico dos organofosforados, é o procedimento de extração por suas propriedades físico - químicas as quais, podem dificultar a extração dos mesmos e por tanto interferir no resultado final da análise.

As normas internacionais, nacionais e sistemas da qualidade destacam a importância da validação de métodos analíticos e a documentação do trabalho de validação para a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso desejado. As características de desempenho investigadas no processo de validação, a fim de demonstrar o bom funcionamento do método são: especificidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, faixa de aplicação e robustez (DE BARROS, 2002).

Considerando que a validação de métodos é um aspecto vital da garantia da qualidade analítica, Góes (2009) validou a metodologia de análise adotada neste trabalho demonstrando que esta foi seletiva, linear, precisa e reprodutiva, podendo ser aplicada para amostras de água.

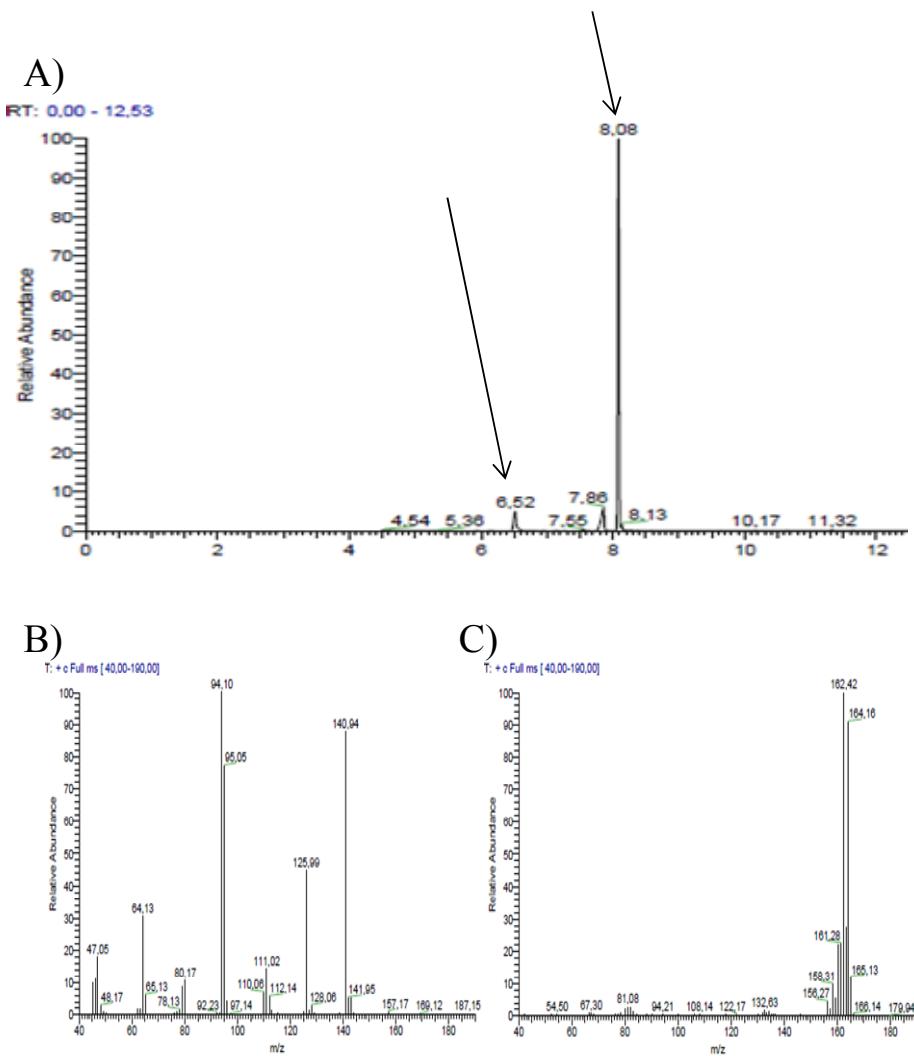
A curva de calibração para a análise cromatográfica foi realizada com 5 pontos de concentrações que mantiveram a linearidade a qual apresentou um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0.9924, o que indica que há uma forte correlação entre a concentração e a razão área do analito com a área do padrão interno (Figura 21).



**Figura 21.** Curva de calibração obtida para o Metamidofós.

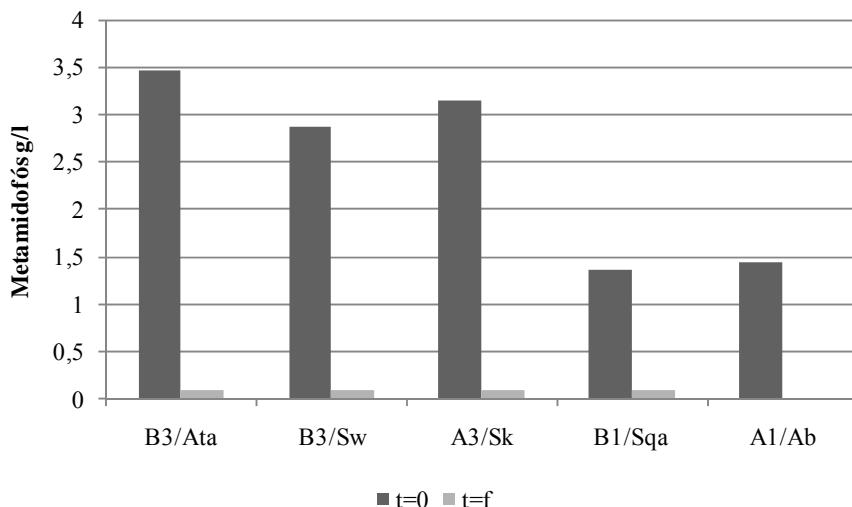
Destaca-se que o método utilizado foi o do padrão interno visando reduzir os erros inerentes do manuseio da amostra, tais como, extração, preparo, injeção, entre outros, desta forma se garante a confiabilidade dos dados obtidos na análise cromatográfica. O padrão interno usado foi o acenafteno-d10 o qual mostrou um desvio standard de 11,5% considerado confiável, visto que para este tipo de análise foi estabelecido como limite máximo 20%.

Na figura 22 observa-se o cromatograma gerado após a injeção de 1 $\mu$ l da solução de metamidofós em acetato de etila com o padrão interno com tempo de retenção estabelecido 6.52, e para o padrão interno 8.08, os quais foram confirmados pelos espectros de massas obtidos.



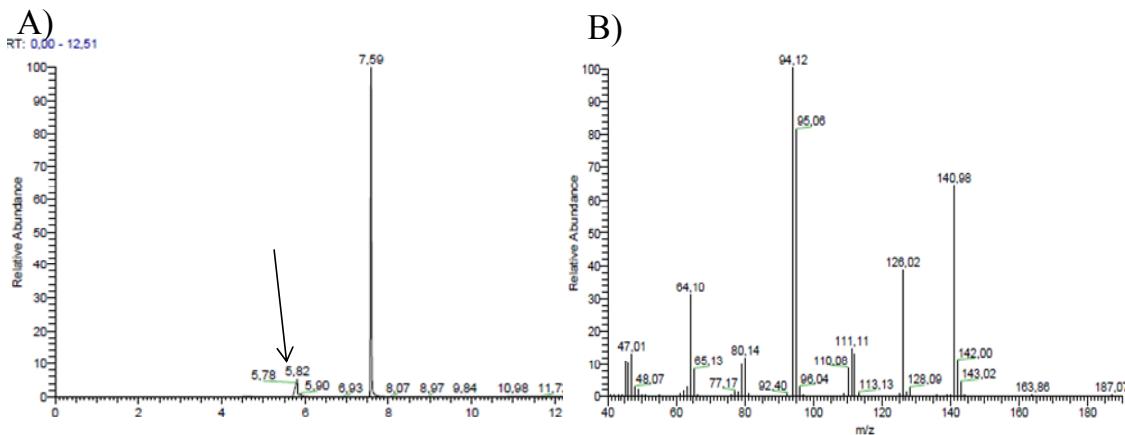
**Figura 22.** Cromatograma gerado a partir da injeção de uma solução padrão de 70 $\mu$ g/ml com adição de acenaphtene D-10 (A) Metamidofós e D-10; (B) Espetro de massas do metamidofós; C) Espetrcos de massas do acenaphtene D-10

Uma vez estabelecidas as condições da corrida da análise cromatográfica foram feitas análises preliminares da concentração inicial de metamidofós, as quais foram 1.37, 3.14, 1.44, 3.46 e 2.87 g/l para os isolados A1/Ab, A3/Sk, B1/Sqa, B3/Ata e B3/Sw, respectivamente. Destaca-se que a porcentagem de degradação de metamidofós para todas as bactérias, após 22 dias de cultivo, foi aproximadamente 99%, visto que a concentração final do composto estava abaixo do limite de detecção da análise de cromatografia gasosa (Figura 23).

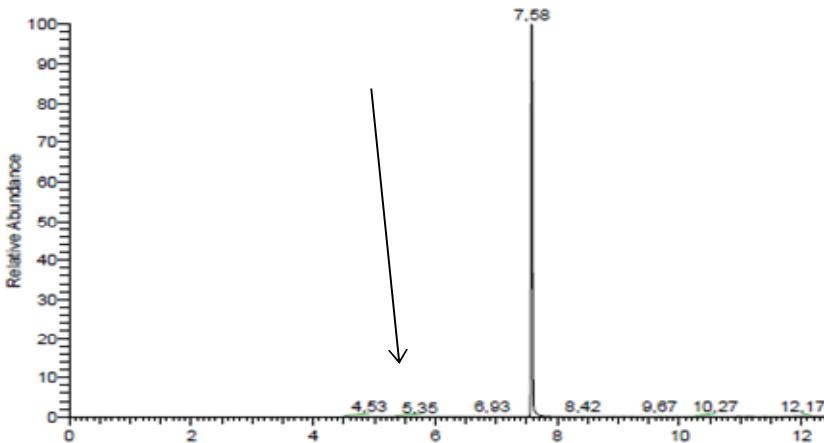


**Figura 23.** Consumo de Metamidofós (g/l) nos isolados com melhor perfil de crescimento

No cromatograma obtido na análise do tempo inicial de uma das cepas avaliadas (B1/Sqa) observa-se a presença do pico do metamidofós com o seu respectivo espectro de massas (Figura 24), indicando a presença do composto no inicio do experimento, e na Figura 25 observa-se a ausência do mesmo no cromatograma gerado a partir da análise do tempo final, comprovando novamente, que o composto foi degradado por ação bacteriana.



**Figura 24.** (A) Cromatograma gerado a partir da injeção do extrato de meio de cultura no tempo inicial com adição de acenaphtene D-10 – Metamidofós; (B) Espetro de massas do metamidofós



**Figura 25.** Cromatograma gerado a partir da injeção do extrato de meio de cultura no tempo inicial com adição de acenaphtene D-10 – Metamidofós

Dessa forma, os cultivos utilizados para os ensaios posteriores foram os provenientes dos consórcios da primeira (sem adição de enxofre e fósforo) e terceira estratégia (sem adição de enxofre e nitrogênio), visto que foram estes os que mantiveram o crescimento utilizando metamidofós como fonte de algum nutriente.

Estes resultados apresentam algumas discrepâncias importantes. Por que foi possível isolar organismos capazes de utilizar simultaneamente S e P ou N e S do metamidofós, mas não N e P ou N, P e S?

Na tabela 7 encontram-se os metabolitos gerados a partir da provável quebra do metamidofós servindo como fonte simultânea de N, P e S, e observa-se que nenhum destes poderia ser potencialmente tóxico para as bactérias, por tanto até o momento acredita-se que o fato das bactérias serem capazes de crescer nos meios com metamidofós como fonte de NS e PS e não nos meios com metamidofós como fonte de NP e NPS não está relacionado aos metabolitos gerados durante o crescimento.

Após a hidrólise da molécula do metamidofós usada com fonte simultânea de NS, pode ser produzido como metabólito, o metil fosfato (Tabela 7), que pode representar para a bactéria uma fonte de fosfato, seja para a formação de ATP, vital nas vias metabólicas, ou na síntese de ácidos nucléicos e compostos de alta energia. Dentre os grupos que podem sofrer reações de substituição se encontram os ortofosfatos e os pirofosfatos inorgânicos, ésteres e anidros do ácido fosfórico (LEHNINGER et al., 2004).

**Tabela 7** - Molécula do metamidofós com quebra nas ligações P-S e P-N

Meio de cultura	Prováveis Quebras do Metamidofós	Prováveis Metabólitos
S/N		$\text{CH}_3\text{S}(\text{PO}_4)\text{CH}_3$
S/S		$\text{CH}_3\text{OH} + \text{CH}_3(\text{PO}_4)\text{NH}_4$
S/P		$\text{CH}_3\text{OH} + \text{NH}_2 + \text{SCH}_3$
S/SP		$2\text{CH}_3\text{OH} + \text{NH}_3$
S/NS		$\text{CH}_3\text{OH} + \text{CH}_3(\text{PO}_4)$
S/NP		$\text{HSCH}_3 + \text{CH}_3\text{OH}$
S/NSP		$2\text{CH}_3\text{OH}$

A incapacidade das bactérias de se desenvolverem na ausência de enxofre e fósforo pode estar relacionada à presença no meio de metabolitos tóxicos para a célula, como o metil mercaptano, após a quebra da ligação P-S da molécula do metamidofós, sendo este último fonte simultânea de PS (Tabela 7). Porém, a fermentação bacteriana da metionina, aminoácido sulfurado, produz metil mercaptano, amônio e  $\alpha$ -cetobutirato indicando que este composto forma parte do metabolismo das bactérias (PARES, 1997).

O metamidofós possui também na sua estrutura, o grupo amônia (Figura 2), o qual pode ser liberado pela hidrolise da ligação P-N (Tabela 7). Este grupo é facilmente incorporado nas vias biosintéticas dos aminoácidos e nucleotídeos a partir de dois aminoácidos, glutamato e glutamina, os quais são o ponto de entrada critico nas vias metabólicas (LEHNINGER et al., 2004).

A maioria dos estudos de isolamento de organismos degradadores de organofosforados estão baseados no uso dos pesticidas apenas como fonte de carbono ou fósforo, portanto, estudos com estratégias de isolamento onde os OPs serviram como fonte simultânea de nutrientes são raros.

Rosenberg e Alexander (1979) reportaram o crescimento de culturas isoladas capazes de utilizar Aspon, Azodrin, Dasanit, Diazinon, Malation, Ortene, Paration, Trition, Dimetoato, Dylox, Metil paration e Vapona como única fonte de fósforo, porém nenhum destes pesticidas foi utilizado como fonte de carbono. Neste estudo observou-se que durante a degradação de alguns destes compostos houve a produção de dialquilfosfatos, fosforotioatos e fosforoditioatos que não serviram como fonte de fósforo para o crescimento bacteriano.

Este fato pode ser justificado pela utilização de compostos não-iônicos, que no metabolismo foram transformados em alquilfosfatos iônicos. Porém, quando estes compostos iônicos foram fornecidos como substratos externamente não houve degradação, possivelmente devido à impermeabilidade da bactéria a estes compostos (ROSENBERG e ALEXANDER, 1979).

Singh et al. (2004) isolou 6 bactérias pertencentes ao gênero *Enterobacter* capazes de utilizar o clorpirifós como fonte de fósforo e carbono, gerando como produto de hidrólise o dietiltiofosfato. Estes organismos possuíram a capacidade de utilizar este composto para o seu crescimento e como fonte de energia.

Sethunathan e Yoshida (1973) isolaram várias espécies de *Flavobacterium* que utilizavam o paration como fonte de fósforo, mas não como fonte de carbono. Porém, estas bactérias não eram capazes de utilizar outros pesticidas organofosforados como fonte de fósforo ou de carbono. Da mesma forma, Shelton (1988) isolou um consórcio que podia utilizar o ácido dietiltiofosfórico como fonte de carbono, porém era incapaz de utilizá-lo como fonte de fósforo ou enxofre.

A cepa de *Pseudomonas stutzeri* isolada para utilizar paration como fonte de carbono produziu como metabólito da biotransformação do pesticida, dietilfosforotioanato, no entanto não tinha a capacidade de metabolizá-lo novamente mesmo quando a fonte alternativa de fósforo ou enxofre era removida do meio de cultura (DAUGHTON e HSIEH, 1977).

Na maior parte dos estudos de degradação do herbicida glifosato, este foi utilizado como única fonte de fósforo e os organismos estudados não foram capazes de utilizá-lo como fonte de carbono ou nitrogênio (KERTESZ et al., 1994).

No estudo feito por McLoughlin et al. (2004) observou-se que *Escherichia coli* apesar de expressar a fosfotriesterase era incapaz de utilizar o paraoxon como única fonte de fósforo. Por este motivo o autor clonou um fragmento do DNA genômico de *Enterobacter aerogenes* que expressa uma fosfohidrolase em *E. coli* a fim de permitir a esta última o emprego do dimetilfosfato como única fonte de fósforo. Desta forma, McLoughlin et al. (2004), propôs como via catabólica de paraoxon uma serie de hidrólises partindo do paraoxon a dimetilfosfato e mediante a ação de uma fosfodiesterase a hidrólise do dimetil fosfato a metil fosfato, o qual por sua vez, foi hidrolisado pela fosfomonoesterase, a fosfato e assim entrar nas vias metabólicas do organismo.

As alquilsulfatas são enzimas que degradam compostos sulfurados e podem ser altamente específicas e seletivas, e ser reguladas principalmente por síntese constitutiva, indução por substrato e por repressão. Estas enzimas são sintetizadas pelas células durante o crescimento em meio rico em nutrientes com excesso de carbono e enxofre e, para a sua expressão não precisam ser induzidas por um agente externo (KERTESZ et al., 1994).

Compostos conhecidos por reprimir algumas destas enzimas, como o acetato, citrato ou piruvato, não apresentaram um efeito negativo na síntese das sulfatas constitutivas no meio de cultura. Outro fator importante a considerar, é a quantidade da fonte de enxofre presente no meio de cultura, a qual pode não ser importante na regulação de um tipo de alquilsulfatas em *Pseudomonas* sp., porém tem relevância em outras espécies (FITZGERALD e KIGHT, 1977).

Outros efeitos relacionados com a concentração da fonte de carbono têm sido observados na presença de intermediários dos ácidos tricarboxílicos, glicose, acetato ou piruvato, na qual a síntese de sulfatas podia ser promovida ou reprimida (KERTESZ et al., 1994).

Sutherland et al. (2002) isolou uma *Mycobacterium* capaz de degradar endosulfan como fonte de enxofre na ausência de sulfito, sulfato ou metionina, porém, na presença destes compostos a degradação foi inibida. O autor sugere que esta bactéria expressa um conjunto de proteínas, denominado SSIS (*Sulphate-Starvation-Induced Stimulon*), importantes na utilização de fontes de enxofre na ausência do mesmo.

Kertesz (1994) sugere que o fato de alguns micro-organismos serem capazes de utilizar um composto como fonte de carbono e não de fósforo, nitrogênio e/ou enxofre e vice-versa pode ser devido às condições nas quais os isolados foram cultivados, pois não basta o organismo possuir uma via de catabolismo do composto-alvo, mas a regulação desta via deve permitir a indução dos genes nas condições de cultivo. A regulação da expressão dos genes de enzimas da rota metabólica de biodegradação de pesticidas depende do papel do composto na nutrição do organismo. Freqüentemente, moléculas de pesticida são utilizadas como fontes de apenas um elemento carbono, fósforo ou enxofre (KERTESZ et al., 1994).

Mazel e Marlibre (1989) observaram que durante a ausência de sulfato, genes que codificam proteínas com uma quantidade mínima de aminoácidos com enxofre foram expressos, enquanto que o excesso de sulfato no meio de cultura levou à produção de outro conjunto de proteínas, as quais continham uma grande quantidade de aminoácidos com enxofre.

Como foi mencionado anteriormente não foi isolada nenhuma bactéria da estratégia na qual o metamidofós foi utilizado como única fonte de carbono, indicando que este não possui uma quantidade representativa de carbono para suprir a necessidade das bactérias isoladas ou estas não possuem a maquinaria enzimática para utilizar compostos C<sub>1</sub>, tais como, metano, metanol, formiato ou metilamina como única fonte de carbono e energia, seja via serina ou ribulose monofosfato.

Para avaliar a capacidade das bactérias de utilizarem compostos C<sub>1</sub>, estas foram cultivadas na presença de metanol como fonte alternativa de carbono, porém não houve crescimento (dados não apresentados).

#### **4.2 Isolamento de Bactérias Degradadoras de Metamidofós**

Experimentos de isolamento de bactérias degradadoras de metamidofós a partir dos consórcios que apresentaram resultados positivos para a utilização do pesticida como fonte de nutrientes (A1/S, A1/A, A3/S, A3/A, B1/S, B1/A, B3/S e B3/A) resultaram no isolamento de 12 bactérias em meio mineral com metamidofós e 12 em meio rico R2A.

A fração atual da comunidade que vai ser cultivada depende do meio de cultura escolhido para a contagem, por isto a seleção do meio de cultura é crucial no isolamento de culturas puras.

O meio rico em nutrientes utilizado, o R2A, se caracteriza por permitir que um amplo espectro de bactérias possam se desenvolver na mesma taxa de crescimento pela baixa concentração de extrato de levedura, caseína hidrolisada, peptona e glicose. Os organismos cultiváveis podem chegar a ser não cultiváveis devido ao estresse imposto durante sua manipulação no laboratório, além disso, há competição das bactérias para formar colônias, o que pode reprimir o crescimento de algumas delas. Por este motivo, alguns micro-organismos crescem muito devagar ou não crescem definitivamente na placa. O conteúdo de amido e piruvato do meio R2A permitem particularmente que as bactérias injuriadas se desenvolvam rapidamente (MERCK, 2000).

Observou-se que sete das bactérias isoladas em meio mineral que foram posteriormente cultivadas em R2A apresentaram características morfológicas similares às que tinham sido isoladas previamente neste meio de cultivo, reduzindo o grupo de 24 bactérias a 17 colônias macroscopicamente diferentes. As cepas B1/Sq, B1/Sqa e B3/Sx foram isoladas do meio rico em nutrientes R2A e as cepas A1/Ab, A1/Aba, A3/Sk, A3/Ska, A3/Ag, B3/Sw, B3/Ata, B3/At e B3/Au foram isoladas de meio mínimo mineral, mostrando a importância que tem o uso de estratégias de isolamento baseadas na pressão seletiva.

Para avaliar a capacidade de crescimento das bactérias isoladas em metamidofós de forma individual foi utilizado o meio mínimo mineral líquido acrescido de metamidofós, sendo que, apenas 12 isolados foram capazes de manter o crescimento após vários repiques no mesmo meio.

**Tabela 8** - Bactérias degradadoras de Metamidofós a partir das diferentes estratégias de enriquecimento. S/SP: Sem enxofre e fósforo; S/NP: Sem nitrogênio e fósforo; S/NS: Sem nitrogênio e enxofre; S/PSN: Sem fósforo, enxofre e nitrogênio e tipo de amostra

Fonte de Carbono		Tipo de Amostra	S/SP 1	S/SN 2	S/NS 3	S/NSP 4
<b>Glicose, Glicerol e Citrato</b>	<b>A</b>	Solo	--	--	A3/Sk, A3/Ska	--
		Água	A1/Ab, A1/Aba	--	A3/Ag	--
<b>Glicerol e Citrato</b>	<b>B</b>	Solo	B1/Sq, B1Sqa	--	B3/Sw, B3/Sx	--
		Água	--	--	B3/At, B3/Ata, B3/Au	--
<b>Metamidofós</b>	<b>C</b>	Solo	--	--	--	--
		Água	--	--	--	--

A partir dos consórcios da estratégia 1, na qual não houve adição de fósforo e enxofre, foram isoladas quatro bactérias, duas de água que consumiram glicerol, glicose e citrato como fonte de carbono (A1/Ab e A1/Aba) e duas de solo usando glicerol e citrato como fonte de carbono (B1/Sq e B1Sqa). Por outra parte, dos consórcios nos quais não foi acrescentado nitrogênio e enxofre, foram isoladas oito bactérias, três delas utilizaram como fonte de carbono glicose, glicerol e citrato (A3/Sk, A3/Ska e A3/Ag isoladas de água e solo, respectivamente) e as cinco restantes usaram glicerol e citrato (B3/Sw, B3/Sx, B3/Ata e B3/At, B3/Au isoladas de solo e água, respectivamente) (Tabela 8).

#### 4.2.1 Caracterização Macroscópica e Microscópica dos Isolados

A técnica de espalhamento em placa permite que as colônias que se desenvolvem na superfície do Agar possam ser diferenciadas com base na sua morfologia, o que facilita o seu isolamento.

As bactérias isoladas foram semeadas em R2A pela técnica de esgotamento a fim de observar as características morfológicas, tamanho, cor, textura e forma. Na coloração Gram foi observado que onze isolados eram bacilos Gram negativos e um bacilo Gram positivo. Seis isolados apresentaram colônias com forma redonda definida e seis de forma irregular, a cor foi basicamente clara, observando algumas mudanças com o transcurso do tempo (Tabela 9).

Wang et al. (2008) observou que a exposição de solo a altas concentrações de metamidofós (23,8 mg/kg) resultou na redução do carbono de biomassa microbiana total ( $C_{mic}$ ) e de biomassa fúngica, no entanto ocorreu um aumento do número de bactérias Gram negativas sem alterar a população de bactérias Gram positivas. Este resultado está condizente com o maior número de isolados Gram-negativos neste experimento (Tabela 9).

**Tabela 9** - Caracterização macroscópica e microscópica das cepas isoladas em meio R2A.

Cepa Isolada	Tamanho da Colônia	Forma da Colônia	Cor da Colônia	Coloração de Gram	Morfologia
<b>A1/Ab</b>	Média	Redonda de borda definida	Amarela escura	Positivo	Bacilo
<b>A1/Aba</b>	Média	Irregular	Branca	Negativo	Bacilo
<b>A3/Ag</b>	Grande	Irregular, com borda de cor escura	Branca	Negativo	Bacilo
<b>A3/Sk</b>	Grande	Irregular	Branca, com ponto branco mais escuro no centro	Negativo	Bacilo
<b>A3/Ska</b>	Grande	Redonda	Branca	Negativo	Bacilo
<b>B1/Sqa</b>	Grande	Irregular, borda transparente	Branca	Negativo	Bacilo
<b>B1/Sq</b>	Média	Irregular, borda transparente	Branca	Negativo	Bacilo
<b>B3/At</b>	Média	Redonda	Bege escuro com halo	Negativo	Bacilo
<b>B3/Ata</b>	Média	Redonda	Bege	Negativo	Bacilo
<b>B3/Au</b>	Grande	Irregular	Branca	Negativo	Bacilo
<b>B3/Sw</b>	Grande	Redonda	Branca quando jovem e amarelada quando envelhece	Negativo	Bacilo
<b>B3/Sx</b>	Média	Redonda	Branca	Negativo	Bacilo

## 4.3 Identificação de Bactérias Degradadoras de Metamidofós

### 4.3.1 Identificação por Métodos Moleculares

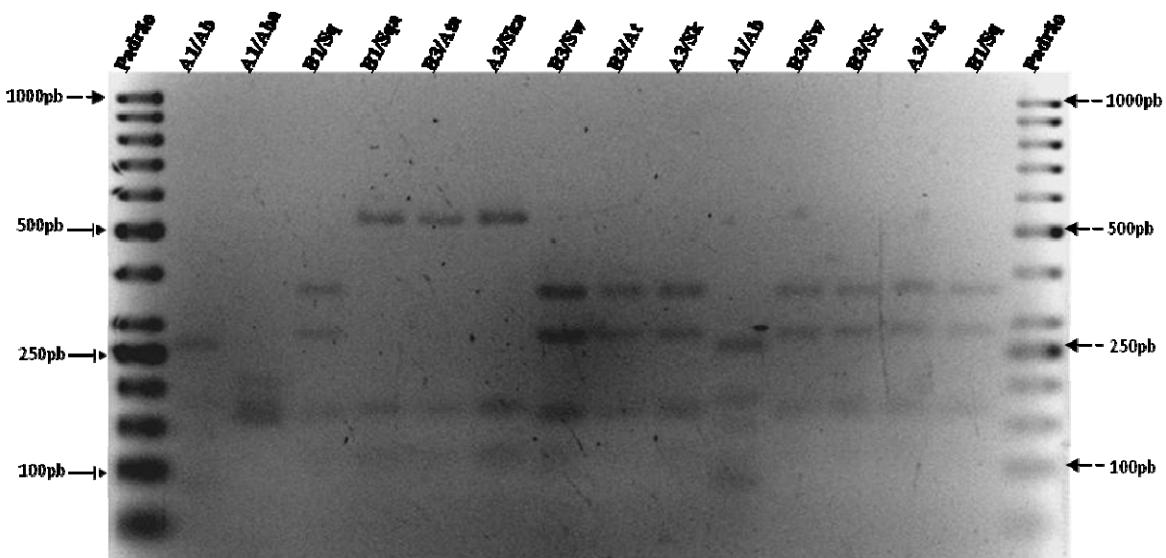
#### 4.3.1.1 Análise de Restrição de rDNA Amplificado (ARDRA)

Os perfis de ARDRA baseados na especificidade dos sítios de digestão dos genes de rRNA 16s são biomarcadores úteis na análise da estrutura da comunidade das bactérias do solo e tem sido adotado como um método para quantificar a diversidade bacteriana nos solos contaminados por defensivos agrícolas e outros químicos (WU et al., 2010).

A digestão do gene rRNA 16s das cepas isoladas gerou quatro padrões de restrição diferentes (Figura 26). Os perfis de restrição G1 e G3 foram observados em apenas uma bactéria cada, A1/Ab e A1/Aba, respectivamente, um bacilo Gram positivo e um Gram negativo, isolados na ausência de fósforo e enxofre. O perfil de digestão do grupo G2 foi observado em três bactérias (A3/Ska, B1/Sqa, B3/Ata); e o perfil de digestão do grupo G4 foi observado em 7 organismos diferentes (A3/Ag, A3/Sk, B1/Sq, B3/At, B3/Au, B3/Sw e B3/Sx) isolados dos meios de cultivo onde não houve fornecimento de nitrogênio e enxofre. Os grupos G2 e G4 tiveram predominância de bacilos Gram negativos (Tabela 10).

**Tabela 10** - Grupos de padrões de ARDRA das cepas isoladas

Grupo	Cepas Isoladas
<b>G1</b>	A1/Ab
<b>G2</b>	B1/Sqa, B3Ata, A3/Ska
<b>G3</b>	A1/Aba
<b>G4</b>	A3/Ag, A3/Sk, B1/Sq, B3/At, B3/Sw, B3/Sx, B3/Au



**Figura 26.** Eletroforese em gel de agarose 3.5% da digestão dos fragmentos do gene rDNA 16s de cada isolado com as enzimas *HaeIII* e *BsuRI*. Padrão 50 pb *DNA Ladder* (1000 a 50pb)

No estudo feito por Wang et al. (2008) verificou-se, através da análise dos padrões de ARDRA, que a diversidade genética do solo (riqueza e equitatividade) diminuiu sob estresse de metamidofós, observando também, a predominância de bactérias Gram negativas. Wu et al. (2010) foi o primeiro a utilizar o ARDRA para avaliar o efeito de diferentes concentrações de metamidofós sobre a estrutura da comunidade do solo de *Pseudomonas*, gênero bacteriano importante para o biocontrole no solo.

As alterações de perfis de ARDRA detectadas demonstram que o ARDRA é uma ferramenta útil para realizar estudos preliminares da estrutura da comunidade do solo sob várias condições de estresse, pois se observa que o grupo de bactérias isoladas a partir da caracterização macroscópica e microscópica em R2A foi reduzido a apenas 4 grupos de padrões de restrição de ARDRA.

#### 4.3.1.2 Seqüenciamento e Identificação do rDNA 16s

A análise de seqüências do rDNA 16S tem sido utilizada com o intuito de elucidar as afinidades taxonômicas de uma ampla variedade de *taxa* e é também uma ferramenta útil e eficaz na avaliação da diversidade genética das amostras ambientais (BAKER et al., 2003)

Além disso, os genes do rRNA 16s são ideais para este tipo de identificação, uma vez que possuem regiões com seqüências conservadas entre todas as bactérias ou fungos, o que facilita o alinhamento das seqüências no momento de fazer comparações, assim como também possui regiões que mostram diferentes níveis de variação, permitindo a distinção e identificação de seqüências que são comuns nas bactérias ou fungos e, entre os diferentes grupos filogenéticos (PROSSER, 2002)

Desta forma, foi feito o seqüenciamento do gene rRNA 16s das doze cepas isoladas, no qual se obteve seqüências entre 1233 e 1298pb, para posterior análise mediante o BLAST na base de dados do NCBI.

**Tabela 11** - Matriz de Similaridade da cepa A1/Ab identificadas como *Curtobacterium* sp.

Seqüência	1	2	3	4	5	6
A1/Ab	ID	1	1	0,998	1	1
AY688357.1  <i>Curtobacterium</i> sp.	1	ID	1	0,998	1	1
AY688361.1  <i>Curtobacterium</i> sp.	1	1	ID	0,998	1	1
AY864656.1  <i>Curtobacterium</i> sp.	0,998	0,998	0,998	ID	0,998	0,998
EF411134.1  <i>Curtobacterium</i> sp.	1	1	1	0,998	ID	1
FJ876396.1  <i>Curtobacterium</i> sp.	1	1	1	0,998	1	ID

Nesta análise a cepa A1/Ab do grupo G1 apresentou 100% de semelhança com várias cepas identificadas como *Curtobacterium* sp. (Tabela 11), as quais foram isoladas de amostras humanas, de ambientes extremos (Antártida) e ambientes de ambientes brancos. As seqüências das cepas B1/Sqa, B3/Ata e A3/Ska, do grupo G2, foram identificadas como *Stenotrophomonas maltophilia* com 100% de identidade, isolada de raízes de cana de açúcar de solos da China (Tabela 12).

**Tabela 12** - Matriz de Similaridade da cepa A3/Ska, B1/Sqa e B3/Ata identificadas como *Stenotrophomonas maltophilia*

Seqüência	1	2	3	4	5	6	7
A3/Ska	ID	1	1	0,998	0,999	1	0,996
B1/Sqa	1	ID	1	0,998	0,999	1	0,996
B3/Ata	1	1	ID	0,998	0,999	1	0,996
AJ131907.1  <i>S. maltophilia</i>	0,998	0,998	0,998	ID	0,997	0,998	0,995
EU931549.1  <i>S. maltophilia</i>	0,999	0,999	0,999	0,997	ID	0,999	0,995
FN645734.1  <i>S. maltophilia</i>	1	1	1	0,998	0,999	ID	0,996
GQ381284.1  <i>Xanthomonas</i> sp.	0,996	0,996	0,996	0,995	0,995	0,996	ID

S.: *Stenotrophomonas*

A cepa A1/Aba do grupo G3 apresentou 98% de identidade com *Serratia marcescens* (Tabela 13), isolada em um estudo de bactérias degradadoras do inseticida fipronil. Na tabela 14 observa-se que todos os isolados do grupo G4 tiveram 99% de identidade com *Pseudomonas sp.*, isolada de diversas fontes, sendo as A3/Ag e B3/Au com *Pseudomonas sp.* (EU680989) isolada de água de rio; A3/Sk, B3/At e B1/Sq com *Pseudomonas sp.* (AY880843) isolada da rizosfera de trigo; B3/Sx com *Pseudomonas sp.* (DQ411818) isolada da filosfera de palmeiras; e, B3/Sw com *Pseudomonas sp.* (DQ453823).

**Tabela 13 - Matriz de Similaridade da cepa A1/Aba identificadas como *Serratia marcescens***

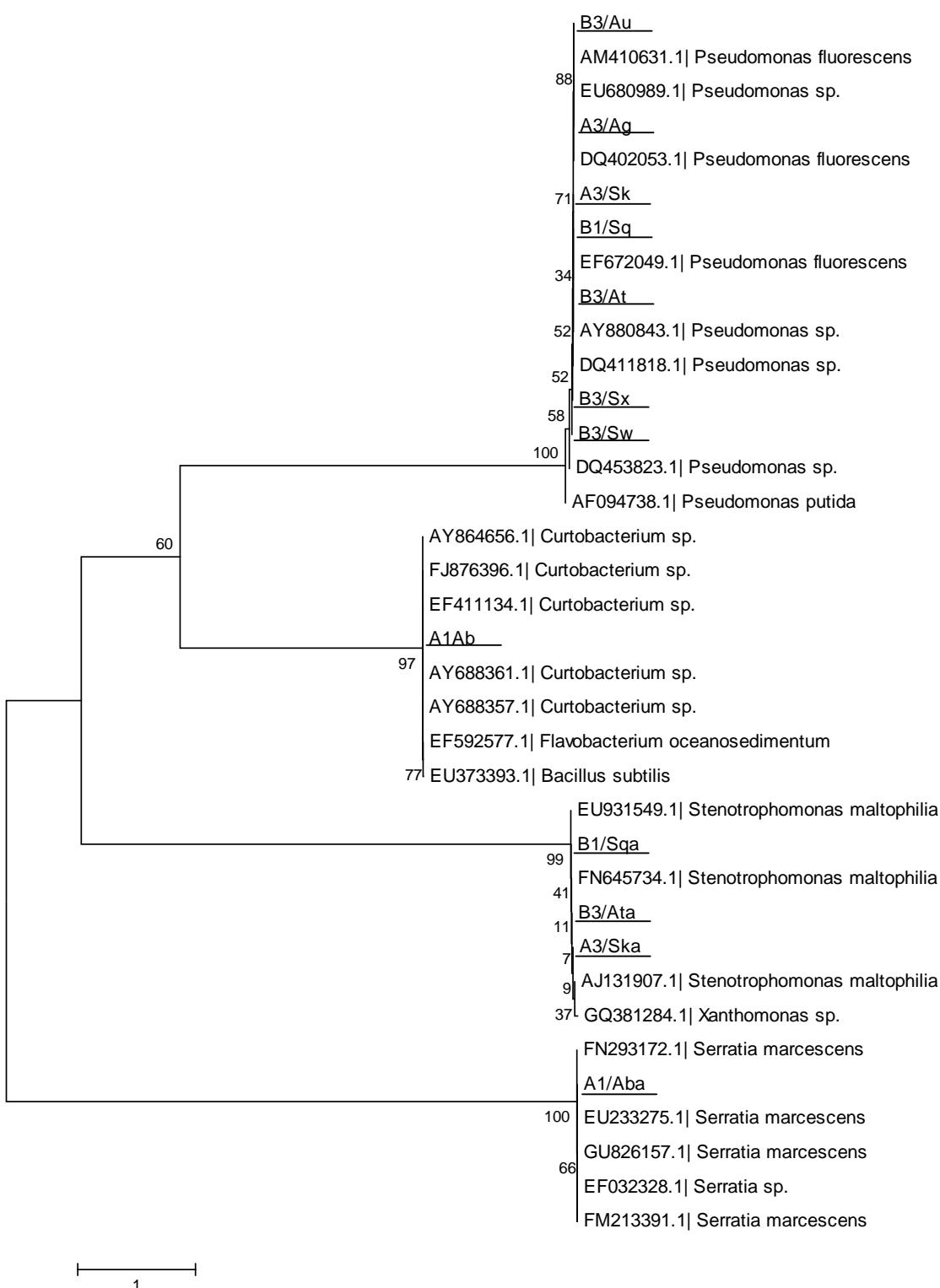
Seqüência	1	2	3	4	5	6
A1/Aba	ID	0,988	0,988	0,988	0,987	0,988
EF032328.1  <i>Serratia</i> sp.	0,988	ID	0,998	0,998	0,997	0,997
EU233275.1  <i>Serratia marcescens</i>	0,988	0,998	ID	0,998	0,999	0,997
FM213391.1  <i>Serratia marcescens</i>	0,988	0,998	0,998	ID	0,997	0,999
FN293172.1  <i>Serratia marcescens</i>	0,987	0,997	0,999	0,997	ID	0,996
GU826157.1  <i>Serratia marcescens</i>	0,988	0,997	0,997	0,999	0,996	ID

**Tabela 14 - Matriz de Similaridade da cepa A3/Ag-, A3/Sk-, B1/Sq-, B3/At-, B3/Au-, B3/Sw- e B3/Sx- identificadas como *Pseudomonas sp.***

Seqüência	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14
A3/Ag-	ID	0,994	0,994	0,994	1	0,988	0,991	0,985	0,999	0,995	0,998	0,993	0,996
A3/Sk-	0,994	ID	0,999	0,997	0,994	0,988	0,994	0,987	0,994	0,997	0,994	0,993	0,998
B1/Sq-	0,994	0,999	ID	0,996	0,994	0,987	0,994	0,986	0,993	0,996	0,994	0,992	0,997
B3/At-	0,994	0,997	0,996	ID	0,994	0,987	0,994	0,986	0,993	0,996	0,994	0,992	0,997
B3/Au-	1	0,994	0,994	0,994	ID	0,988	0,991	0,985	0,999	0,995	0,998	0,993	0,996
B3/Sw-	0,988	0,988	0,987	0,987	0,988	ID	0,991	0,992	0,987	0,989	0,988	0,993	0,989
B3/Sx-	0,991	0,994	0,994	0,994	0,991	0,991	ID	0,989	0,99	0,994	0,991	0,994	0,994
AF094738.1  <i>P. putida</i>	0,985	0,987	0,986	0,986	0,985	0,992	0,989	ID	0,984	0,988	0,985	0,99	0,989
AM410631.1  <i>P. fluorescens</i>	0,999	0,994	0,993	0,993	0,999	0,987	0,99	0,984	ID	0,994	0,997	0,992	0,995
AY880843.1  <i>Pseudomonas sp.</i>	0,995	0,997	0,996	0,996	0,995	0,989	0,994	0,988	0,994	ID	0,995	0,994	0,999
DQ402053.1  <i>P. fluorescens</i>	0,998	0,994	0,994	0,994	0,998	0,988	0,991	0,985	0,997	0,995	ID	0,993	0,996
DQ411818.1  <i>Pseudomonas sp.</i>	0,993	0,993	0,992	0,992	0,993	0,993	0,994	0,99	0,992	0,994	0,993	ID	0,994
EF672049.1  <i>P. fluorescens</i>	0,996	0,998	0,997	0,997	0,996	0,989	0,994	0,989	0,995	0,999	0,996	0,994	ID

P.: *Pseudomonas*

A árvore filogenética foi montada a partir dos alinhamentos das cepas isoladas neste estudo com as cepas provenientes do banco de dados, que apresentaram maior similaridade de seqüência do rDNA16S (Figura 27). Como foi mencionado anteriormente o gene avaliado (16s) apresenta regiões variáveis assim como conservadas, segundo o descrito para *E. coli* (BAKER et al., 2003).



**Figura 27.** Árvore filogenética Ilustrativa do Gene rRNA 16s das Bactérias Degradadoras de metamidofós pelo Método de Neighbor-joining com a utilização do programa Mega3.

#### **4.3.2 Análise do Perfil de Ácidos Graxos Metil Éster (MEAG)**

Os componentes lipídicos celulares podem ser utilizados para a identificação e especiação bacteriana a partir do estudo do perfil dos ácidos graxos metil éster (MEAG). Estes ácidos estão localizados na membrana citoplasmática (BUSSE et al., 1996) e são obtidos pela conversão dos fosfolipídeos da membrana celular a metil ésteres e são avaliados por cromatografia gasosa (BROWN e LEFF, 1996).

Este método é importante na identificação de bactérias, visto que está baseado nas diferenças estruturais dos ácidos graxos, tais como, o comprimento (ácidos graxos entre 8-20 átomos de carbono), a presença de ácidos graxos saturados e insaturados (geralmente monoinsaturados) e a freqüência de ácidos graxos ramificados e ciclopropanos (BUSSE et al., 1996).

Atualmente, existe um sistema automatizado, Sistema de Identificação Microbiana Sherlock (MIDI) (SASSER, 1990) que identifica micro-organismos baseados nos padrões únicos MEAG de cepas referência. O sistema utiliza uma base de dados com aproximadamente 2000 entradas, que inclui bactérias e leveduras (WHITTAKERA et al., 2003).

O MEAG está determinado pelo uso de índice de similaridade, o qual estabelece que se este valor é maior ou igual que 0,700 e a diferença entre os valores dos índices de similaridade da 1º e 2º cepa referência é de 0,200, a identificação da bactéria pode ser considerada excelente; se o índice está entre 0,500 e 0,700 e a diferença entre a 1º e 2º cepa referência é de 0,100 a identificação é boa; se o valor do índice de similaridade está entre 0,300 e 0,500 os resultados podem ser ainda aceitos, porém estes dados indicam a presença de uma cepa atípica; e finalmente, se o índice é menor que 0,300, isto sugere o padrão de ácidos graxos da cepa não corresponde a nenhum dos perfis da base de dados (BROWN e LEFF, 1996).

O uso dos ácidos graxos ligados de forma específica aos ésteres da fração lipídica polar aumenta radicalmente a sensibilidade e a especificidade na detecção de populações microbianas. Por este motivo, esta análise foi feita para identificar as 12 cepas isoladas, como método alternativo ao seqüenciamento.

A leitura dos picos das cepas avaliadas foi de 100%, exceto para as cepas B3/Sw e B3/Sx, as quais apresentaram leituras de 99,81% e 99,2%, respectivamente. Todas as porcentagens de similaridade obtidas foram maiores do que 70%, menos do isolado A1/Ab (Tabela 14).

Quanto às diferenças entre os índices de similaridade, ressalta-se que a maioria são menores que 0,200, gerando resultados confiáveis. A cepa A1/Ab e A1/Aba apresentou 35,5% e 78,7% de similaridade com *Bacillus-coagulans* e *Enterobacter-pyrinus*, respectivamente valores baixos se comparado com as outras bactérias identificadas.

Os isolados A3/Ag, B1/Sq, B3/At, B3/Au foram identificados como *Pseudomonas putida* com índices de similaridade maiores que 87%; B3/Sw e B3/Sx foram identificadas como *Pseudomonas savastanoi* com índices de similaridade de 85,8% e 78,3%, respectivamente; a A3/Sk foi identificada como *Pseudomonas fluorescens* com um índice de similaridade de 89,4%.

**Tabela 14 - Parâmetros de identificação pela análise do perfil de Ácidos Graxos Metil Éster (MEAG)**

Cepas	Índice de Similaridade	Cepa referencia do MIS <sup>a</sup>	Diferença de índices de similaridade	Leitura Picos
<b>A1/Ab</b>	0,355	<i>Bacillus-coagulans</i>	-	
	0,338	<i>Clavibacter-michiganensis</i>	0,017	100%
	0,318	<i>Microbacterium-halophilum</i>	0,02	
<b>A1/Aba</b>	0,787	<i>Enterobacter-pyrinus</i>	-	
	0,692	<i>Serratia-marcescens-GC subgroup B</i>	0,095	100%
<b>A3/Ag</b>	0,895	<i>Pseudomonas-putida-biotype B</i>	-	
	0,795	<i>Pseudomonas-putida-biotype A</i>	0,1	100%
<b>A3/Sk</b>	0,894	<i>Pseudomonas-fluorescens-biotype B</i>	-	
	0,870	<i>Pseudomonas-fluorescens-biotype G</i>	0,024	100%
	0,869	<i>Pseudomonas-putida-biotype B</i>	0,01	
<b>A3/Ska</b>	0,926	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	99.52%
<b>B1/Sq</b>	0,936	<i>Pseudomonas-putida-biotype B</i>	-	
	0,824	<i>Pseudomonas-fluorescens-biotype G</i>	0,112	100%
<b>B1/Sqa</b>	0,91	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	99.49%
<b>B3/At</b>	0,871	<i>Pseudomonas-putida-biotype B</i>	-	
	0,833	<i>Pseudomonas-vancouverensis</i>	0,038	100%
<b>B3/Ata</b>	0,912	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	99.52%
<b>B3/Au</b>	0,878	<i>Pseudomonas-putida-biotype B</i>	-	
	0,776	<i>Pseudomonas-vancouverensis</i>	0,102	100%
<b>B3/Sw</b>	0,858	<i>Pseudomonas-savastanoi-nerium</i>	-	
	0,746	<i>Pseudomonas-mucidolens</i>	0,112	99.81%
<b>B3/Sx</b>	0,783	<i>Pseudomonas-savastanoi-nerium</i>	-	
	0,607	<i>Pseudomonas-mucidolens</i>	0,176	99.2%

a) MIS: Microbial Identification System

### 4.3.3 Comparação dos Métodos de Identificação

O seqüenciamento do gene rDNA 16s, gene que por ser altamente conservado, com regiões comuns entre os organismos e possuir também variações que se concentram em zonas específicas, permite a obtenção de informação filogenética e taxonômica (WOESE et al., 1985) foi comparado com a análise de ácidos graxos metil éster (MEAG) da membrana celular.

Os resultados obtidos nas duas técnicas foram comparados para verificar se os mesmos organismos foram identificados. Organismos alocados a espécies diferentes nas duas técnicas de identificação foram os da cepa A1/Ab, a qual teve 35,5% de similaridade com *Bacillus-coagulans* pela análise de ácidos graxos e, no seqüenciamento, foi identificada como *Curtobacterium sp.* com uma porcentagem de 99%. E, a cepa A1/Aba a qual foi identificada como *Serratia sp.* pelo seqüenciamento e na análise do MEAG foi identificada como *Enterobacter-pyrinus* com um índice de similaridade de 78,7% (Tabela 15).

**Tabela 15** - Comparação de métodos de identificação das cepas isoladas

CEPA ISOLADA	MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO (Porcentagem de Similaridade)	
	Seqüenciamento rDNA 16s	Análise Ácidos Graxos Metil Éster
A1/Ab	<i>Curtobacterium sp.</i> (99%)	<i>Bacillus-coagulans</i> (35,5%)
A1/Aba	<i>Serratia marcescens</i> (98%)	<i>Enterobacter-pyrinus</i> (78,7%)
A3/Ag	<i>Pseudomonas sp.</i> (99%)	<i>Pseudomonas putida</i> (89,5%)
A3/Sk	<i>Pseudomonas sp.</i> (99%)	<i>Pseudomonas-fluorescens</i> (89,4%)
A3/Ska	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (99%)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (92,6%)
B1/Sqa	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (99%)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (91,2%)
B1/Sq	<i>Pseudomonas sp.</i> (99%)	<i>Pseudomonas putida</i> (93,6%)
B3/At	<i>Pseudomonas sp.</i> (99%)	<i>Pseudomonas putida</i> (87,1%)
B3/Ata	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (99%)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (91%)
B3/Au	<i>Pseudomonas sp.</i> (99%)	<i>Pseudomonas putida</i> (87,8%)
B3/Sw	<i>Pseudomonas sp.</i> (99%)	<i>Pseudomonas savastanoi</i> (85,8%)
B3/Sx	<i>Pseudomonas sp.</i> (99%)	<i>Pseudomonas savastanoi</i> (75,39%)

Ressalta-se, que os resultados obtidos para esta linhagem no MIDI ficaram fora dos padrões de confiança do método, visto que quando a diferença entre os índices é menor do que 0.200 a identificação não é confiável (BROWN e LEFF, 1996) e, portanto, será considerado o resultado de seqüenciamento.

Os isolados do G4 do ARDRA A3/Ag, A3/Sk, B1/Sq, B3/At, B3/Au, B3/Sw e B3/Sx e os A3/Ska, B3/Ata e B1/Sqa do G2 do ARDRA, foram identificados com o mesmo gênero *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* sp., respectivamente, e, a variação limitou-se apenas às espécies identificadas (Tabela 15).

Os resultados obtidos nos dois métodos foram mostraram aproximadamente 83% de concordância, visto que apenas duas das bactérias analisadas não foram identificadas como o mesmo micro-organismo.

#### **4.3.4 Características das Bactérias Identificadas**

##### **4.3.4.1 *Serratia* sp.**

A isolado A1/Aba foi identificada pelo seqüenciamento do rDNA 16s e a análise do perfil de ácidos graxos como *Serratia* sp., a qual é um bacilo Gram negativo pertencente às γ proteobacterias, catalase e citocromo oxidase positivo, capaz de reduzir nitritos a nitratos, além de ser encontrado no solo, água, alimentos e amostras clínicas. Estudos reportam esta bactéria como degradadora de hidrocarbonetos de petróleo (MACHÍN-RAMÍREZ et al., 2008; ABU e DIKE, 2008), gasolina, querosene, óleo diesel e óleo lubrificante (WONGSA et al., 2004), dibenzofurano (JAISWAL e THAKUR, 2007). Têm sido reportados estudos que demonstram a capacidade desta bactéria de degradar pesticidas como o pentaclorofenol (SINGH et al., 2008), o herbicida glufosinato (HSIAO et al., 2007) e organofosforados tais como, o metil paration, os seus produtos de degradação como p-nitrofenol (PAKALA et al., 2007), o diazinon (CYCÓN et al., 2009) e o clorpirifós (LAKSHMI et al., 2009).

##### **4.3.4.2 *Pseudomonas* sp.**

O gênero *Pseudomonas* compreende bacilos Gram negativos, conhecidos por serem bactérias com um amplo potencial catabólico, o que lhes confere a capacidade de degradar um amplo espectro de xenobióticos, ter resistência a metais pesados, solventes orgânicos e detergentes. Assim, podem colonizar ambientes em condições adversas para o crescimento bacteriano. Este gênero é conhecido por sua capacidade degradadora de defensivos agrícolas, como os organofosforados utilizando-os como única fonte de fósforo (ROSENBERG e ALEXANDER, 1979) dentre estes encontram-se o clorpirifós, paration, metilparation, entre outros (CYCÓN et al., 2009; LAKSHMI et al., 2009).

A hidrolase de organofosforados (OPH) capaz de hidrolisar uma ampla variedade de defensivos agrícolas organofosforados tem sido identificada em *Pseudomonas* (BENNING et al., 2000).

#### 4.3.4.3 *Stenotrophomonas maltophilia*

*Stenotrophomonas sp* é uma bactéria Gram negativa, encontrada no ambiente, solo e plantas. Esta bactéria vem sendo amplamente estudada em função de sua patogenicidade sendo um patógeno oportunista associado a infecções hospitalares (ORTÍN et al., 2007; FOUHY et al., 2007).

Apesar do enfoque clínico, este gênero tem aplicações na fitoremediação e na biorremediação, visto que é capaz de metabolizar uma ampla variedade de compostos orgânicos presentes na rizosfera (RYAN et al., 2009). Merroun e Selenska-Pobell (2008) observaram a capacidade desta bactéria de acumular intracelularmente urânio; assim como a tolerância a metais pesados (PAGES et al., 2008). Esta bactéria é degradadora de compostos xenobióticos como p-nitrofenol, 4-nitroanilina e 4-clorofenol (LIU et al., 2007), benzeno, tolueno e etilbenzeno (LEE et al., 2002), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, tais como, fenantreno, fluoreno, pireno, criseno, benzo (a) pireno, dibenzo (a,h) antraceno e benzo (a) antraceno (JUHASZ et al., 2000; BOONCHAN et al., 1998). Também foram isoladas cepas de *Stenotrophomonas* sp. capazes de degradar os pesticidas clorpirimifós, paration, metil-paration e fenitrotion utilizando-os como fonte de carbono e fósforo (KUMAR et al., 2007; KUMAR e PHILIP, 2006; BARRAGÁN-HUERTA et al., 2007).

#### 4.3.4.4 *Curtobacterium* sp.

Membros do grupo de bactérias Gram positivas de actinomicetos degradam pesticidas com diferentes estruturas químicas, incluindo organoclorados, s-triazinas, triazinonas, carbamatos, organofosforados, acetanilidas e sulfonilureas. O gênero *Curtobacterium* sp não tem sido descrito na literatura como degradador de defensivos agrícolas, porém actinomicetos, tais como, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Clavibacter*, *Corynebacterium*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Streptomyces* são conhecidos por sua capacidade de metabolizar xenobióticos (DE SCHRIJVER e DE MOT, 1999).

## 4.4 Avaliação da Biodegradação de Metamidofós

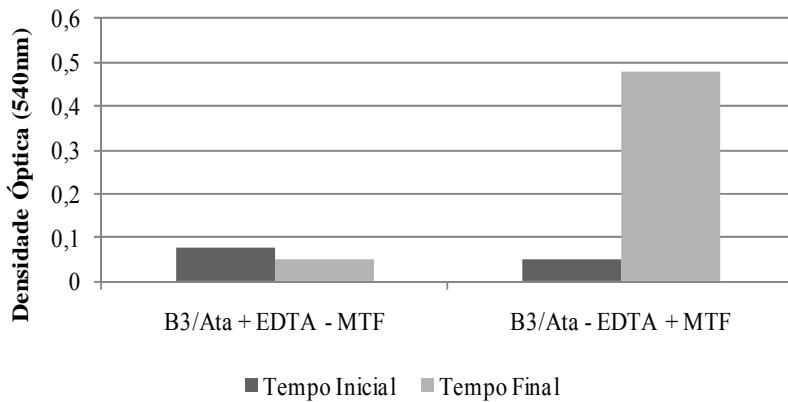
### 4.4.1 Avaliação de Nitrato, Amônio, Fosfato e Sulfato

#### 4.4.1.1 Influência de Nutrientes N, P e S Contaminantes do Meio no Crescimento das Bactérias Degradadoras de Metamidofós

A disponibilidade de nutrientes essenciais tais como, carbono, nitrogênio, fósforo e oxigênio, pode limitar a taxa de degradação bacteriana de defensivos agrícolas (AISLABIE e LLOYD-JONES, 1995). Como as únicas estratégias de enriquecimento que resultaram no isolamento de bactérias degradadoras de metamidofós foram as estratégias onde o pesticida foi utilizado como fonte simultânea de S e P ou como fonte de N e S foi necessário verificar a presença destes nutrientes como contaminantes nos meios de cultura.

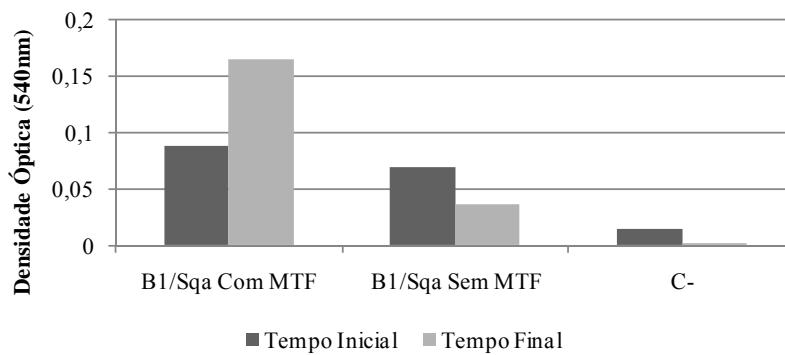
Os contaminantes detectados nas concentrações em que os ingredientes foram adicionados nos meios de cultura foram 0,12 g/l de nitrato oriundo do EDTA e 0,12 g/l de fosfato do metamidofós. De acordo com a proporção dos elementos na biomassa, seriam necessários 0,15 g/l de fósforo e 0,33 g/l de nitrogênio (BAILEY e OLLIS, 1986) para produzir os 200 mg de biomassa obtidos no ensaio. A contaminação por apenas 0,04 g/l de fósforo e de 0,025 g/l de nitrogênio no meio de cultura não teria sido capaz de suprir as necessidade destes elementos na constituição da biomassa.

Para confirmar se o pesticida serviu pelo menos parcialmente como fonte destes nutrientes nestes ensaios, foi acompanhado o crescimento da cepa B3/Ata na presença e ausência de EDTA, observando que a presença de EDTA como única fonte de nitrogênio não é suficiente para manter o crescimento desta cepa, pois observa-se que na presença de metamidofós, a bactéria atinge aproximadamente 0,5 unidades de densidade óptica (Figura 28).

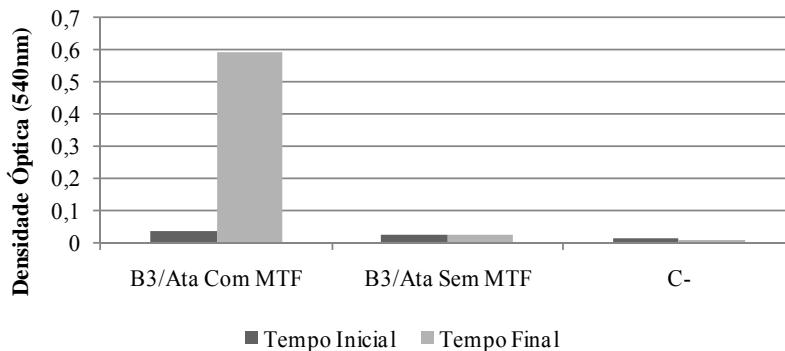


**Figura 28.** Controle de Crescimento do isolado B3/Ata na Presença e Ausência de EDTA como Contaminante do Meio de Cultura.

Controles nos quais as bactérias (B3/Ata e B1/Sqa) foram cultivadas sem a presença do pesticida foram feitos novamente a fim de confirmar se o crescimento observado era dependente da presença do metamidofós ou não. Nas figuras 29 e 30 observa-se que a densidade óptica nos cultivos sem o pesticida não mudou, a comparação dos que continham a presença deste, nos quais o a densidade óptica aumentou radicalmente.



**Figura 29.** Controles de Crescimento de B1/Sqa na Presença e Ausência de Metamidofós



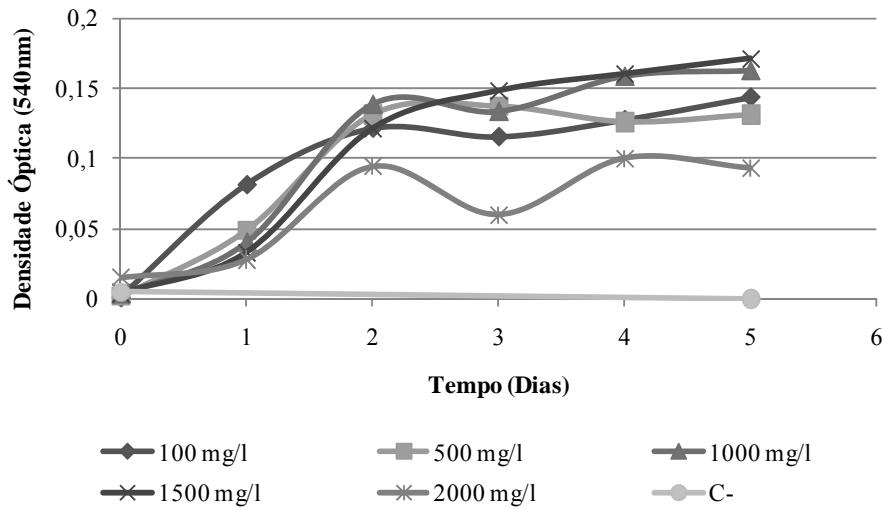
**Figura 30.** Controles de Crescimento de B3/Ata na Presença e Ausência de Metamidofós

#### 4.4.2 Avaliação da Cinética de Degradação de Metamidofós

Como etapa final do trabalho foram retomados os experimentos de caracterização da cinética de degradação do metamidofós pelos dois isolados que apresentaram o melhor crescimento com o composto (B3/Ata e B1/Sqa), ressaltando que, o metamidofós utilizado para essas análises apresentava uma pureza maior de 74,79 % (Milenia) a comparação do utilizado para as análises de enriquecimento e isolamento das bactérias (60%, Fersol).

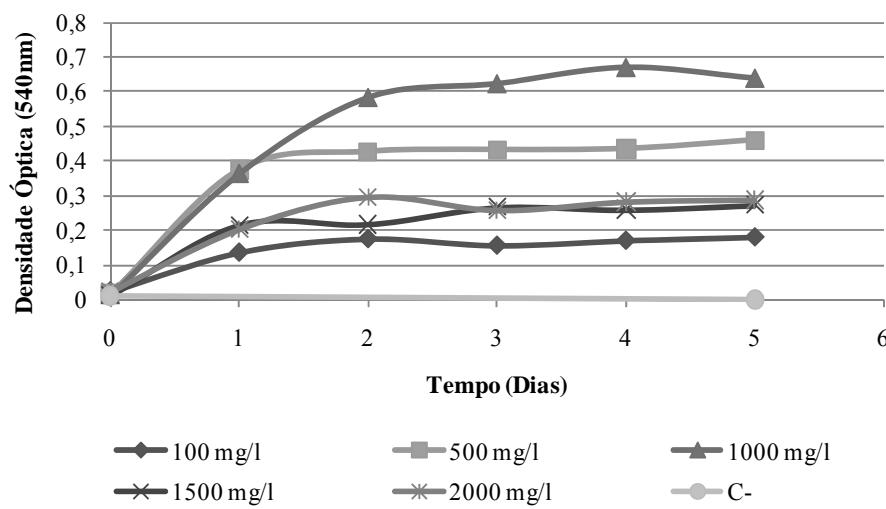
Após 5, 10, 20 e 30 dias de cultivo sob as mesmas condições de crescimento estabelecidas inicialmente, foi observado o crescimento dos organismos, mas sem degradação significativa do metamidofós (dados não apresentados).

Várias concentrações de metamidofós foram avaliadas no crescimento das bactérias (100, 500, 1000, 1500 e 2000 mg/l) para descartar a possibilidade de toxicidade inerente às elevadas concentrações do pesticida, observando que, as bactérias conservaram a sua capacidade de crescimento no composto (Figura 31 e 32) sem o consumo do pesticida pelas culturas após 10, 20 e 30 dias (dados não apresentados). No entanto, neste ensaio observou-se que para o isolado B1/Sqa, as diferentes concentrações de metamidofós não tiveram um efeito significativo no crescimento, visto que com todas foram obtidos valores de densidade óptica finais semelhantes (Figura 31).



**Figura 31.** Comparação do crescimento do isolado B1/Sqa em cultivos de MM com várias concentrações de metamidofós.

Para o isolado B3/Ata, observa-se que a concentração na qual houve maior crescimento foi 1000 mg/l, seguido de 500 mg/l, destacando que a concentrações muito elevadas (2000 mg/l) este composto pôde ter sido tóxico para as bactérias e em concentrações muito baixas, provavelmente não proporcionou os nutrientes em quantidades suficientes para manter o crescimento bacteriano (Figura 32).



**Figura 32.** Comparação do crescimento do isolado B3/Ata em cultivos de MM com várias concentrações de metamidofós.

Uma vez que o metamidofós utilizado durante todas as análises, desde o enriquecimento até a avaliação da sua biodegradação, não era 100% puro, sugere-se que as bactérias foram capazes de manter o crescimento na presença do composto graças à presença de contaminantes que serviram como fonte de nutrientes, porém a natureza química destes não pode ser elucidada, visto que nas análises de cromatografia iônica não houve identificação dos íons analisados.

Considerando que o metamidofós foi estudado como fonte de N, P, S, acreditou-se que a fonte de carbono não seria suficiente para que as bactérias esgotassem estes elementos a partir do mesmo, por este motivo, foram realizados cultivos, nos quais foi feita uma alimentação da fonte de carbono no inicio da fase estacionaria. Assim, se verificaria se as bactérias após tiverem utilizado todos os contaminantes com carbono excedente disponível atacariam o metamidofós, porém observou-se que não houve um aumento notório no crescimento das mesmas (dados não apresentados).

Ressalta-se uma vez mais que os estudos realizados após o enriquecimento e isolamento das bactérias foram continuados após ter sido analiticamente confirmada a degradação do metamidofós (99%) nos experimentos iniciais por análises de GC/MS.

Várias hipóteses foram propostas para justificar a perda da capacidade de degradação do metamidofós por parte das bactérias, tais como, a possível mutação pontual e irreversível do gene envolvido no metabolismo deste composto, a indução ou repressão enzimática pela presença de algum contaminante do metamidofós e/ou problemas técnicos de conservação das cepas isoladas.

As condições de conservação e congelamento das cepas preservadas não foram mantidas, visto que o equipamento apresentou falhas técnicas no seu funcionamento o que poderia ter gerado um dano irreversível nas bactérias, já que estas foram recuperadas, porém, aparentemente perderam a capacidade de degradar o metamidofós. Possivelmente ciclos de descongelamento e recongelamento a baixas temperaturas podem ter selecionado organismos da população dos isolados desprovidos de plasmídeos com genes de biodegradação, caso esta tenha sido a localização destes genes, que ressalta-se, era desconhecida para os isolados iniciais.

Uma mutação pontual e irreversível do gene envolvido pode ter sido outra causa possível para a perda da capacidade de degradação das cepas. Os transpósons são seqüências genéticas que permitem aos genes se mover entre outras bactérias distantes filogeneticamente e, facilitam também a mobilidade dos plasmídeos entre espécies de bactérias do mesmo ou diferente gênero (BOYD e HARTL, 1997). Este processo, denominado transferência lateral ou horizontal de plasmídeos, confere aos hospedeiros a capacidade de adaptação instantânea à ambientes muito diversos e mutáveis (VALDES e PINERO, 1992).

Os elementos transponíveis encontrados nos plasmídeos são usados como veículos que facilitam a transferência destes à novos hospedeiros, os quais, uma vez transmitidos podem se manter associados ao plasmídeo ou se transpor no cromossomo, este fenômeno parece ser o responsável pela existência de transposões catabólicos idênticos em organismos não relacionados taxonomicamente (ARBER, 2000).

Estes elementos carregam informações genéticas necessárias para mineralizar diversas fontes de carbono (TAN, 1999), assim como a capacidade de crescer em alguns compostos tóxicos e recalcitrantes (TOP et al., 2002).

As enzimas microbianas chamadas hidrolases de organofosforados (OPH), anidrases ácidas de organofosforados (OPA) e fosfotriesterases (PTE) mostraram atividade hidrolítica na ligação triéster encontrada estruturalmente em diversos grupos de compostos organofosforados (BENNING et al., 1994). Os genes homólogos que codificam enzimas hidrolíticas de degradação de organofosforados *opd* e *opdA* foram isoladas das bactérias em *Flavobacterium* sp. e *Agrobacterium*, respectivamente, os quais podem formar parte de elementos transponíveis ativos (HORNE et al., 2003).

A existência de genes que codificam outras hidrolases capazes de degradar organofosforados tem sido relatada na literatura (HORNE et al., 2003), porém, ressalta-se que alguns destes, *mpd* (gene de degradação de metil paration) e *opdA* em *Agrobacterium radiobacter* P230 não estão localizados em plasmídeos, e apesar destes genes serem transponíveis por natureza, estes elementos cromossomais não possuem tanta facilidade na mobilidade horizontal (PANDEETI, 2011).

Um aspecto importante a ser considerado na discussão dos fatores que causaram a perda da capacidade de biodegradação do metamidophós pelos isolados é que este fenômeno ocorreu simultaneamente com todos os isolados testados (A1/Ab, A1/Aba, A3/Sk, A3/Ska, A3/Ag, B3/Sw, B3/At, B3/Au, B1/Sq, B1/Sqa e B3/Sx), o que torna improvável o envolvimento de mecanismos de perda de plasmídeos ou de mutação, cujo caráter aleatório torna improvável a sua ocorrência simultânea em todas as bactérias isoladas.

Outro aspecto importante a ser considerado nesta discussão é a composição das soluções de metamidofós empregadas nos ensaios iniciais de confirmação de biodegradação e nos ensaios posteriores de cinética de degradação. Os ensaios de enriquecimento e isolamento de bactérias degradadoras de metamidofós foram feitos inicialmente com metamidofós, 60% de pureza, (Fersol) e nas análises finais de avaliação da cinética de degradação por GC/MS foi utilizado um metamidofós mais puro (73,79%, Milenia), foram investigadas as possíveis diferenças na composição das duas soluções do pesticida.

Assim, após contato informal com a empresa Milenia, foi encontrado que o pesticida deste fabricante apresentava problemas de estabilidade, visto que os controles feitos no teste acelerado, 54 °C durante 14 dias, indicaram 10% de degradação, excedendo o limite de 4-5%, de tal forma que a empresa deu inicio a alguns estudos para melhorar esta propriedade do pesticida.

A empresa sugeriu que a instabilidade do composto estava relacionada com o pH da solução que era ácido, portanto, foi utilizada a trietanolamina para aumentar o pH da solução neutralizando-o e desta forma incrementando a sua estabilidade nos testes estabelecidos.

A trietanolamina, agente alcalinizante, é utilizada geralmente como ingrediente para equilibrar o pH em produtos cosméticos, de higiene e limpeza, além de ser biocida, por ser tensoativo e/ou pela capacidade de danificar a membrana celular. No estudo feito por Bakalova (2008) foi evidenciado que além da concentração da trietanolamina, o pH influencia a ação antimicrobiana deste composto, observando que a pHs mais elevados (9,9) o efeito biocida aumenta.

Considerando que a adição deste composto à solução de metamidofós não mostrou um efeito letal nas bactérias previamente isoladas com o pesticida fornecido pela Fersol, visto que estas mantiveram o crescimento, sugere-se que pode ter ocorrido é interferência de um ou vários dos componentes adicionados para estabilização na indução da via de degradação ou na atividade da enzima-chave de ataque ao metamidofós.

De tal forma que, estas tiveram que optar pelos contaminantes presentes na solução do pesticida para a manutenção do crescimento, gerando a perda final e irreversível da sua capacidade de degradação do metamidofós. O crescimento dos organismos na presença de metamidofós ocorreu, claramente, devido à presença de contaminantes que forneceram os nutrientes (N, P, S) que deveriam ter sido extraídos do metamidofós pelas culturas.

Isto pode ter acontecido por repressão ou indução enzimática, visto que não se possuem informações do efeito que esta molécula poderia ter gerado nas vias metabólicas das bactérias. Sugere-se que esta pode ser a hipótese mais provável, considerando que a perda da capacidade de degradação ocorreu em todos os isolados, portanto, o elemento limitante teve que ter entrado em contato com todas as bactérias para gerar este efeito.

## 5 CONCLUSÕES

A partir de amostras de solo e água de uma área contaminada foram isoladas e caracterizadas 12 bactérias que inicialmente mostraram capacidade de degradar o pesticida organofosforado metamidofós, utilizando-o como fonte de enxofre/nitrogênio e fósforo/enxofre. Estes isolados foram identificados por métodos de biologia molecular e pela caracterização do perfil lipídico da célula como pertencentes aos gêneros, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* e *Curtobacterium*.

Ensaios preliminares de cinética de degradação do metamidofós evidenciaram o potencial de degradação do pesticida pelas bactérias isoladas, porém após um período de tempo estas perderam esta capacidade, detectando o composto após vários dias de cultivo sob as mesmas condições iniciais.

Recomenda-se que para o enriquecimento e posterior isolamento de bactérias degradadoras de metamidofós, seja utilizado um composto de alta pureza para minimizar a presença de contaminantes que possam ser fonte de nutrientes para as bactérias sendo um interferente nos resultados finais.

## REFERÊNCIAS\*

AARDEMA, H.; MEERTENS, J. H. J. M.; LIGTENBERG, J. J. M.; PETERS-POLMAN, O. M.; TULLEKEN, J. E.; ZIJLSTRA J.G. Organophosphorus pesticide poisoning: cases and developments. **Netherlands Journal of Medicine**, v. 66, n. 4, p. 45, 2008.

ABU, G.; DIKE, P. A study of natural attenuation processes involved in a microcosm model of a crude oil-impacted wetland sediment in the Niger Delta. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4761–4767, 2008.

AISLABIE, J.; LLOYD-JONES, G. A Review of Bacterial Degradation of Pesticides. **Aust. J. Soil Res.**, v. 33, p. 925-942, 1995.

ALTSCHUL S. F.; MADDEN T. L.; SCHAFFER A. A.; ZHANG J.; ZHANG Z.; MILLER W.; LIPMAN D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3444, 1997.

AMANN, R. I. In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. **Kluwer Academic Publishers Printed in the Netherlands**, v. 25, p. 3389–3444, 1995.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução-RDC No. 1. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 jan. 2011. p. 56.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Consulta Pública nº 50, de 09 de junho de 2003. 2003. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B4882-2-0%5D.PDF>>. Acesso em: 20 fev. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Memória de Reunião – Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo Metamidofós. 2002. Reavaliação estabelecida pela Resolução nº 06 de 14/10/1999 e Resolução nº 07 da mesma data. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/reavaliacao/metamidofos.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Consulta Pública nº 89, de 27 de novembro de 2009. Gerência Geral de Toxicologia. Nota Técnica: Reavaliação toxicológica do ingrediente ativo metamidofós. 2009. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/316c0a8042f5894c8a559e536d6308db/NT+Metamidof%C3%B3s.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 20 fev. 2011.

ARBER, W. Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 24, n. 1, p. 1-7, 2000.

\*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ATHANASOPOULOS, P.; PAPPAS, C.; KYRIAKIDIS, N.; THANOS, A. Degradation of methamidophos on sultana grapes on the vines and during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 91, n. 2, p. 235–240, 2005.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 1986.

BAKER, G.; SMITH, J.; COWAN, D. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, n. 3, p. 541–555, 2003.

BARRAGÁN-HUERTA, B. E.; COSTA-PÉREZ, C.; PERALTA-CRUZ, J.; BARRERACORTÉS, J.; ESPARZA-GARCÍA, F.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. Biodegradation of organochlorine pesticides by bacteria grown in microniches of the porous structure of green bean coffee. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, n. 3, p. 239-244, 2007.

BADISCHE ANILIN UND SODA-FABRIK (BASF). Crop Protection. Disponível em: <<http://www.agro.bASF.com.br/UI/Produtos.aspx?CodProduto=38>>. Acesso em: 20 fev. 2011.

DE BARROS, C. Validação de Métodos Analíticos. **Biológico**, v. 64, n. 2, p.175-177, 2002.

BAKALOVA, S.; MINCHEVA, V.; DOYCHEMA, A.; GROUDEV, V.; DIMKOV, R. Microbial Toxicity of Ethanolamines. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 22, n. 2, p. 716-720, 2008

BENNING, M.; HONG, S.; RAUSHEL, F.; HOLDEN, H. The binding of Substrate Analogs to Phosphotriesterase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 39, p. 30556-30560, 2000.

BLOEM JAAP. Fluorescent staining of microbes for total direct counts. **Molecular Microbial Ecology Manual**. [S. l.], 1995. p. 1-12.

BOONCHAN, S.; BRITZ, M. L.; STANLEY, G. A. Surfactant enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, n. 4, p. 482-494, 1998.

BROWN, B. J.; LEFF, L. G. Comparison of identification of aquatic bacterial using fatty acid methyl ester analysis and API 20E and NFT strips. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 2183-2185, 1996.

BOYD, E.; HARTL, D. Recent Horizontal Transmission of Plasmids between Natural Populations of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 5, p. 1622–1627, 1997.

BUSSE H.; DENNER, E.; LUBITZ, W. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematic. **Journal of Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 3–38, 1996.

CÁCERES, T.; HE, W.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. Effect of insecticide fenamiphos on soil microbial activities in Australian and Ecuadorean soils. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 44, n. p. 13–17, 2009.

CASTRO, V.; CHIORATO, S.; PINTO, N. Biological monitoring of embryo-fetal exposure to methamidophos or chlorothalonil on rat development. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 42, n. 6, p. 361-365, 2000.

CHAO, Y.; ZHAO, Y.; LIU, B.; WANG, Y. Production, partial purification and characterization of methamidophos-degrading enzyme from methylotroph WB-1. **Wei Sheng Wu Xue Bao = Acta microbiologica Sinica**, v. 40, n. 5, p. 523-527, 2000.

CHOPADE, H.; FREESEMAN, P. **Photodescomposition of [<sup>14</sup>C] methamidophos on soil**. [S. l.]: Mobay Chemical Corporation, 1985.

CYCÓN, M.; WOJCIK, M.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil. **Chemosphere**, v. 76, n. 4, p. 494–501, 2009.

DAI K.; PENG, T.; CHEN, H.; ZHANG, R.; ZHANG, Y. Photocatalytic Degradation and Mineralization of Commercial Methamidophos in Aqueous Titania Suspension. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 5, p. 1505–1510, 2008

DAMS, R. I. Pesticidas: Usos e perigos à saúde e ao meio ambiente. **Revista Saúde e Ambiente/Health and Environment Journal**, v. 7, n. 2, p. 37-44, 2006.

DAUGHTON, C. G.; HSIEH, D. P. Parathion utilization by bacterial symbionts in a chemostat. **Applied Environmental Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 175-184, 1977.

DE SCHRIJVER, A.; DE MOT, R. Degradation of pesticides by actinomycetes. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 85–119, 1999.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Interim Reregistration Eligibility Decision for Methamidophos Case No. 0043. July 31, 2006. Disponível em <[www.epa.gov/opprrd1/reregistration/REDs/methamidophos\\_red.pdf](http://www.epa.gov/opprrd1/reregistration/REDs/methamidophos_red.pdf)> Acesso em: 20 fev. 2010.

ETO, M. **Organophosphorus pesticides**: organic and biological chemistry. 3rd ed. Cleveland, OH, USA: CRC Press Inc, 1974.

FITZGERALD, J.W.; KIGHT, L. C. Physiological control of alkylsulfatase synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: effects of glucose, glucose analogues and sulfur. **Canadense Journal Microbiology**, v. 23, n. p. 1456-1464, 1977.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Methamidophos (100). Disponível em:  
[http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/2003\\_eva/methamidophos%202003.pdf](http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/2003_eva/methamidophos%202003.pdf). Acesso em: 20 fev. 2010.

FOCHT, D.; JOSEPH, H. Microbial Activity in soils treated with acephate and monitor. **Journal of Environmental Quality**, v. 3, n. 4, p. 327-328, 1974.

FOUHY, Y.; SCANLON, K.; SCHOUEST, K.; SPILLANE, C.; CROSSMAN, L.; AVISON, M. B.; RYAN, R. P.; DOW, J. M. Diffusible signal factor-dependent cell-cell signaling and virulence in the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 13, p. 4964-4968, 2007.

GARRIGUES, P. P. Degradation kinetics of organophosphorus and organonitrogen pesticides in different waters under various environmental conditions. **Environmental Science and Technology**, v. 29, n. 5, p. 1246-1254, 1995.

GARY, N. E.; LORENZEN, K. Effect of Methamidophos on Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) During Alfalfa Pollination. **Journal of Economic Entomology**, v. 82, n. 4, p. 1067-1072, 1989.

GOBO, A. B.; ZANELLA, R.; KURZ, M. H. S.; PIZZUTTI, I. R.; ADAIME, M. B. Development and validation of methodology for the determination of residues of 108 organophosphorus pesticides in tomatoes. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 6, p. 945-950, 2004.

GÓES, P. K. **Isolamento e Caracterização de Bactérias Degradadoras de Acefato**. 2009. 162 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, M. H. Analysis of *Actinomycete* communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-eletrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3233–3241, 1997.

HORNE, I.; QIU, X.; RUSSELL, R.; OAKESHOTT, J. The phosphotriesterase gene opdA in *Agrobacterium radiobacter* P230 is transposable. **FEMS Microbiology Letters**, v. 222, n. 1, p. 1 - 8, 2003.

HSIAO, C.; YOUNG, C.; WANG, C. Screening and Identification of Glufosinate-Degrading Bacteria from Glufosinate-Treated Soils. **Weed Science**, v. 55, n. 6, p. 631-637, 2007.

ISMAIL, B.; ENOMA, A.; CHEAH, B.; LUM, K.; MALIK, Z. Adsorption, Desorption, and Mobility of Two Insecticides in Malaysian Agricultural Soil. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 37, n. 4, p. 355–364, 2002.

JAISWAL, P. K.; THAKUR, I. Isolation and Characterization of Dibenzofuran-Degrading *Serratia marcescens* from Alkalophilic Bacterial Consortium of the Chemostat. **Current Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 447–454, 2007.

JOKANOVIC, M. Biotransformation of organophosphorus compounds. **Toxicology**, v. 166, n. 3, p. 139–160, 2001.

JUHASZ, A. L.; STANLEY, G. A.; BRITZ, M. L. Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, n. 5, p. 396–401, 2000.

KARABAY, N.; OGUZ, G. Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, n. 4, p. 653-662, 2005.

KERTESZ, M.; COOK, A.; LEISINGER, T. Microbial metabolism of sulfur and phosphorus-containing xenobiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2-3, p. 195-215, 1994.

KOLELI, N.; KANTAR, C.; CUVALCI, U.; YILMAZ, G. Movement and adsorption of methamidophos in clay loam and sandy loam soils. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 86, n. 15, p. 1127–1134, 2006

KOLELI, N.; DEMIR, A.; ARSLAN, H.; KANTAR, C. Sorption behavior of methamidophos in a heterogeneous alluvial soil profile. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 301, n. 1-3, p. 94–99, 2007.

KUMAR, K.; DEVI, S. S.; KRISHNAMURTHI, K.; KANADE, G. S.; CHAKRABARTI, T. Enrichment and isolation of endosulfan degrading and detoxifying bacteria. **Chemosphere**, v. 68, n. 2, p. 317-322, 2007.

KUMAR, M.; PHILIP, L. Enrichment and isolation of a mixed bacterial culture for complete mineralization of endosulfan. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 41, n. 1, p. 81-96, 2006.

LAKSHMI, C.; KUMAR, M.; KHANNA, S. Biodegradation of Chlorpyrifos in Soil by Enriched Cultures. **Current Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 35–38, 2009.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester: John Wiley & Sons, 1991. p. 15

LEE, E. Y.; JUN, Y. S.; CHO, K. S.; RYU, H. W. Degradation characteristics of toluene, benzene, ethylbenzene, and xylene by *Stenotrophomonas maltophilia* T3-c. **Journal of the Air and Waste Management Association**, v. 52, n. 4, p. 400–406, 2002.

LEHNINGER, L.; NELSON D.; COX, M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4<sup>th</sup> ed. Gordonsville: W. H. Freeman, 2004.

LI, X.; ZHANG, H.; WU, M.; ZHANG, Y.; ZHANG, C. Effect of methamidophos on soil fungi community in microcosms by plate count, DGGE and clone library analysis. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n. 5, p. 619–625, 2008.

LIU, Z.; YANG, C.; QIAO, C. L. Biodegradation of *p*-nitrophenol and 4-chlorophenol by *Stenotrophomonas* sp. **FEMS Microbiology Letters**, v. 277, n. 2, p. 150–156, 2007.

MACHÍN-RAMÍREZ, C.; OKOH, A. I.; MORALES, D.; MAYOLO-DELOISA, K.; QUINTERO, R.; TREJO-HERNÁNDEZ, M. R. Slurry-phase biodegradation of weathered oily sludge waste. **Chemosphere**, v. 70, n. 4, p. 737–744, 2008.

MAHAJNA, M.; QUISTAD, G.; CASIDA, J. Acephate Insecticided Toxicity: Safety Conferred by Inhibition of the Bioactivating Carboxyamidase by the Metabolite Methamidophos. **Chemical Research Toxicology**, v. 10, n. 1, p. 64-69, 1997.

MCLOUGHLIN, S.; JACKSON, C., LIU, J.; OLLIS, D. Growth of *Escherichia coli* Coexpressing Phosphotriesterase and Glycerophosphodiester Phosphodiesterase, Using Paraoxon as the Sole Phosphorus Source. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 404–412, 2004.

MALATO, S.; BLANCO, J.; RICHTER, C.; MILOW, B.; MALDONADO, I. Solar Photocatalytic Mineralization of Commercial Pesticides: Methamidophos. **Chemosphere**, v. 38, n. 5, p. 1145-1156, 1999.

MASSOL-DEYA, M.; ODELSON, D.; HICKEY, R.; TIEDJE, J. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-32S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). **Molecular Microbial Ecology Manual**, v. 3, p. 1-8, 1995.

MAZEL, D.; MARLIBRE, P. Adaptive eradication of methionine and cysteine from bacterial light-harvesting proteins. **Nature**, v. 341, n. 6239, p. 245-248, 1989.

MERCK. **Microbiology Manual**. Darmstadt: Merck, 2000.

MERROUN, M.; SELENSKA-POBELL, S. Bacterial interactions with uranium: An environmental perspective. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 102, n. 3-4, p. 285–295, 2008.

ORTÍN, X.; JAEN-MARTINEZ, J.; RODRIGUEZ-LUACES, M.; ALVARO, T.; FONT, L. Fatal pulmonary hemorrhage in a patient with myelodysplastic syndrome and fulminant pneumonia caused by *Stenotrophomonas maltophilia*. **Infection**, v. 35, n. 3, p. 201-202, 2007.

PACHECO, P. Brasil lidera uso mundial de agrotóxicos. **O Estado de São Paulo**. São Paulo. 22 mar. 2010. Disponível em: <[http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20090807/not\\_imp414820,0.php](http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20090807/not_imp414820,0.php)> Acesso em: 8 nov. 2010.

PAGES, D.; ROSE, J.; CONROD, S.; CUINE, S.; CARRIER, P.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W. Heavy Metal Tolerance in *Stenotrophomonas maltophilia*. **PLoS ONE**, v. 3, n. 2, p. 1539, 2008.

PAKALA, S.; GORLA, P.; PINJARI, A.; KROVIDI, R.; BARU, R.; YANAMANDRA, M.; MERRICK, M.; SIDDAVATTAM, D. Biodegradation of methyl parathion and p-nitrophenol: evidence for the presence of a p-nitrophenol 2-hydroxylase in a Gram-negative *Serratia* sp. strain DS001. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 6, p. 1452–1462, 2007.

PANDEETI, E.; CHAKKA, D.; PANDEY, J.; SIDDAVATTAM, D. Indigenous organophosphate-degrading (*opd*) plasmid pCMS1 of *Brevundimonas diminuta* is self-transmissible and plays a key role in horizontal mobility of the *opd* gene. **Plasmid**, v. 65, n. 3, p. 226-231, 2011

PARES, R. **Bioquímica de los Microorganismos**. Barcelona: Reverté, 1997.

PEHKONEN, S.; ZHANG, Q. The Degradation of Organophosphorus Pesticides in Natural Waters: A Critical Review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 1, p. 17–72, 2002.

PICKUP, R.; RHODES, G.; SAUNDERS, J. Extraction of Microbial DNA from aquatic sources: Freshwater. **Molecular Microbial Ecology Manual**, v. 1, p. 1-11, 1995.

PROSSER, J. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. **Plant and Soil**, v. 244, n. 1-2, p. 9–17, 2002.

ROSENBERG, A.; ALEXANDER, M. Microbial Cleavage of Organophosphorus Insecticides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 886-891, 1979.

RYAN, R. P.; MONCHY, S.; CARDINALE, M.; TAGHAVI, S.; CROSSMAN, L.; AVISON, M.; BERG, G.; VAN DER LELIE D.; DOW, J. M. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 514-525, 2009.

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

SASSER, M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. **MIDI Technical Note**, n. 101, 2001.

SETHUNATHAN, N.; YOSHIDA, T. A *Flavobacterium sp.* that degrades diazinon and parathion. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 19, n. 7, p. 873-875, 1973.

SHELTON, D. R. Mineralization of diethylthiophosphoric Acid by an enriched consortium from cattle dip. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, n. 10, p. 2572-2573, 1988.

SINGH, A. K.; WHITE, T.; SPASSOVA, D.; JIANG, Y. Physicochemical, molecular-orbital and electronic properties of acephate and methamidophos. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology and Endocrinology**, v. 119, n. 1, p. 107-117, 1998.

SINGH, K.; WALKER, A.; ALUN, J.; MORGAN, W.; WRIGHT, D. Biodegradation of Chlorpyrifos by *Enterobacter* Strain B-14 and Its Use in Bioremediation of Contaminated Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8 p. 4855-4863, 2004.

SINGH, A. K.; WALKER, A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 3, p. 428-471, 2006.

SINGH, B. Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications. **Nature Reviews in Microbiology**, v. 7, p. 156-164, 2009.

SINGH, S.; CHANDRA, R.; PATEL, D. K.; REDDY, M. M. K.; RAI, V. Investigation of the biotransformation of pentachlorophenol and pulp paper mill effluent decolorisation by the bacterial strains in a mixed culture. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5703-5709, 2008.

SOGORB, A.; VILANOVA, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. **Toxicology Letters**, v. 128, n. 1-3, p. 215-228, 2002.

SOLTANINEJAD, K.; ABDOLLAHI, M. Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: A systematic review. **Medical Science Monitor**, v. 15, n. 3, p. 75-90, 2009.

SU, Z.; ZHANG, H.; LI, X.; ZHANG, Q.; ZHANG, C. Toxic effects of acetochlor, methamidophos and their combination on *nifH* gene in soil. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, n. 7, p. 864–873, 2007.

SUTHERLAND, T. D.; HORNE, I.; HARCOURT, R. L.; RUSSELL R. J.; OAKESHOTT J.G. Isolation and characterization of a Mycobacterium strain that metabolizes the insecticide endosulfan. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 3, p. 380–389, 2002.

SUTHERLAND, T.; HORNE, I.; WEIR, K.; COPPIN, C.; WILLIAMS, M.; SELLECK, M.; RUSSELL, R.; OAKESHOTT, J. Enzymatic bioremediation: from enzyme discovery to applications. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 31, n. 11, p. 817–821, 2004.

SYLVIA, D.; FUHRMANN, J.; HARTEL, P.; ZUBERER, D. In: **Principles and Applications of Soil Microbiology**. New Jersey: Prentice Hall. 1999.

TAYLOR, P.; RADIC, Z; HOSEA, N. A.; CAMP, S.; MARCHOT, P.; BERMAN H. A. Structural basis for the specificity of cholinesterase catalysis and inhibition. **Toxicological Letters**, v. 82–83, p. 453–458, 1995.

TAN, H. Bacterial catabolic transposons. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 51, n. 1, p. 1-12, 1999

THERIOT, M.; GRUNDEN, M. Hydrolysis of organophosphorus compounds by microbial enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 35-43, 2011.

TOP, E.; SPRINGAEL, D.; BOON, N. Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 42, n. 2, p. 199-208, 2002.

VALDÉS, A.; PIÑERO, D. Phylogenetic Estimation of Plasmid Exchange in Bacteria. **Evolution**, v. 46, n. 3, p. 641-656, 1992.

WANG M.; GONG, M.; ZHANG, H.; HUA, X.; YAO, J.; PANG, Y.; YANG, Y. Effect of Methamidophos and Urea Application on Microbial Communities in Soils as Determined by Microbial Biomass and Community Level Physiological Profiles. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 41, n. 4, p. 399–413, 2006.

WANG, L.; WANG, G.; LI, S.; JIANG, J. *Luteibacter jiangsuensis* sp. nov.: A Methamidophos-Degrading Bacterium Isolated from a Methamidophos-Manufacturing Factory. **Current Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 289-295, 2011.

WANG, L.; WEN, Y.; GUO, X.; WANG, G.; LI, S.; JIANG, J. Degradation of methamidophos by *Hyphomicrobium* species MAP-1 and the biochemical degradation pathway. **Biodegradation**, v. 21, n. 4, p. 513-523, 2010.

WANG, M.; LIU, Y.; WANG, Q.; GONG, M.; HUA, X.; PANG, Y.; HU, S.; YANG, Y. Impacts of methamidophos on the biochemical, catabolic, and genetic characteristics of soil microbial communities. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 778–788, 2008.

WARE, G. Pesticide Water Solubilities. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 116, p. 131, 1990.

WEI, L.; SHIFU, C.; WEI, Z.; SUJUAN, Z. Titanium dioxide mediated photocatalytic degradation of methamidophos in aqueous phase. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, n. 1, p. 154-160, 2009.

WEINBAUM, Z.; SCHENKER, M. B.; GOLD, E.; SAMUELS, S.; O'MALLEY, M. Risk Factors for Systemic Illnesses Following Agricultural Exposures to Restricted Organophosphates in California, 1984–1988. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 31, n. 5, p. 572–579, 1997.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WHITTAKERA, P.; MOSSOBAB, M.; AL-KHALDIC, S.; FRYB, F.; DUNKELD, V.; TALL, B.; YURAWECZA, M. Identification of foodborne bacteria by infrared spectroscopy using cellular fatty acid methyl esters. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, p. 709–716, 2003.

WOESE, C. R.; STACKEBRANDT, E.; MACKE, T. J.; FOX, G. E. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 6, n. 2 p. 143-151, 1985.

WONGSA, P.; TANAKA, M.; UENO, A.; HASANUZZAMAN, M.; YUMOTO, I.; OKUYAMA, H. Isolation and Characterization of Novel Strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* Possessing High Efficiency to Degrade Gasoline, Kerosene, Diesel Oil, and Lubricating Oil. **Current Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 415–422, 2004.

WOREK, F.; THIERMANN, H.; SZINICZ, L.; EYER, P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 11, p. 2237–2248, 2004.

WU, M.; DENG, J.; TSAI, W.; GER, J.; WONG, S.; LI, H. Food Poisoning Due to Methamidophos-Contaminated Vegetables. **Clinical Toxicology**, v. 39, n. 4, p. 333–336 2001.

WU, M.; LI, X.; ZHANG, H.; CAI, Y.; ZHANG, C. Effects of methamidophos on the community structure, antagonism towards *Rhizoctonia solani*, and *phlD* diversity of soil *Pseudomonas*. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 45, n. 3, p. 222–228, 2010.

YEN, J.; LIN, K.; WANG, Y. Potential of the Insecticides Acephate and Methamidophos to Contaminate Groundwater. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 45, n. 1, p. 79-86, 2000.

YU, Y.; ZHOU, Q. Adsorption characteristics of pesticides methamidophos and glyphosate by two soils. **Chemosphere**, v. 58, n. 6, p. 811–816, 2005.

ZAMY, C.; MAZELLIER, P.; LEGUBE, B. Phototransformation of selected organophosphorus pesticides in dilute aqueous solutions. **Water Research**, v. 38, n. 9, p. 2305–2314, 2004.

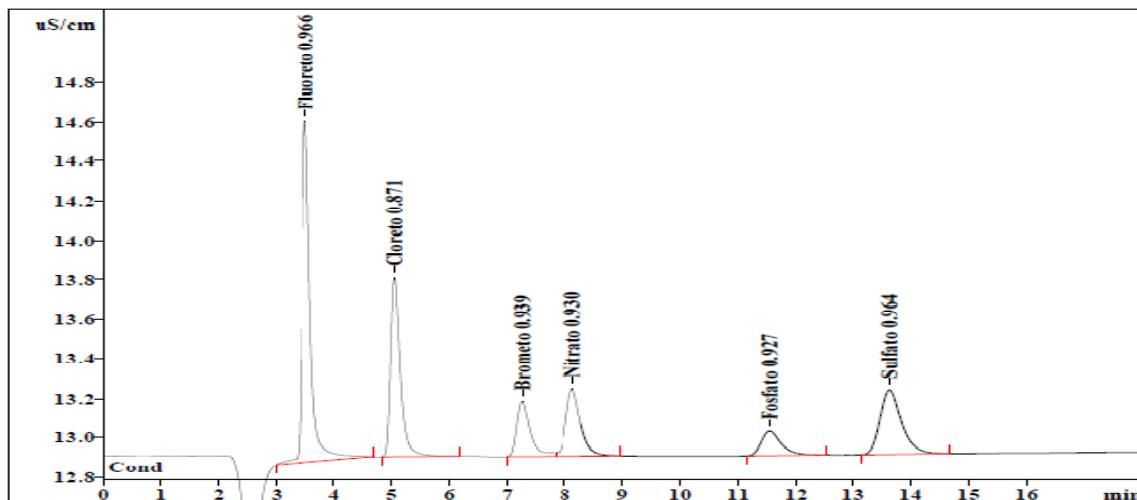
ZHANG, Z.; HONG, H.; ZHOU, J.; YUA, G. Occurrence and behaviour of organophosphorus insecticides in the River Wuchuan, southeast China. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 4, n. 4, p. 498-504, 2002.

ZHAO, R.; BAO, H.; LIU, Y. Isolation and Characterization of *Penicillium oxalicum* ZHJ6 for Biodegradation of Methamidophos. **Agricultural Sciences in China**, v. 9, n. 5, p. 695-703, 2010.

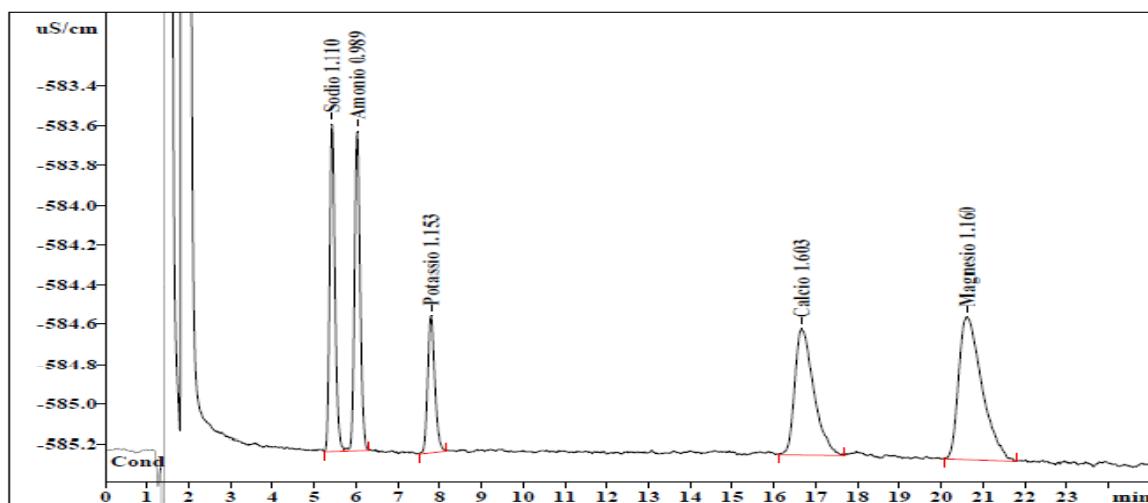
## APÊNDICES

### APÊNDICE A - Calibração de Cromatografia Iônica

**Apêndice A1** - Cromatograma da solução multiânions com fluoreto, cloreto, brometo, nitrato, fosfato e sulfato, referente a um padrão de calibração com concentração de 1 mg/l.



**Apêndice A2** - Cromatograma da solução multicátions com sódio, amônio, potássio, cálcio e magnésio, referente a um padrão de calibração com concentração de 1 mg/l.



**Apêndice A3 - Calibração de fluoreto na faixa de concentração de 1 a 10 mg/l.**

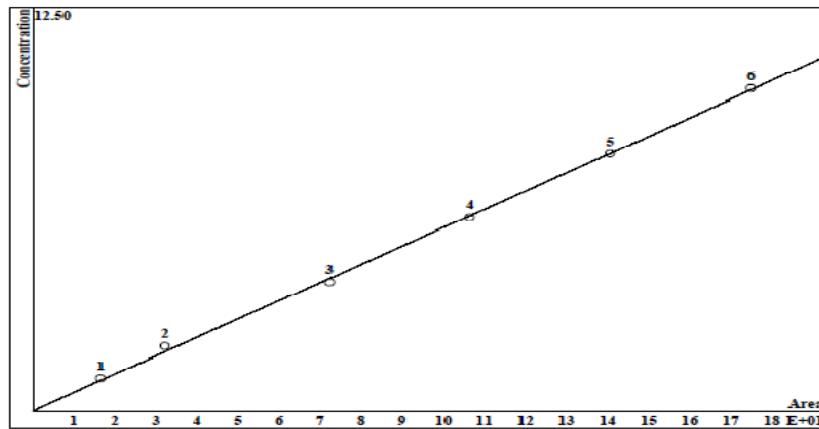
**Composto:** Fluoreto

**Coeficiente de correlação:** 0.999637

**RSD:** 1.936 %

**Níveis de calibração:**

Ponto 1	1 mg/l
Ponto 2	2 mg/l
Ponto 3	4 mg/l
Ponto 4	6 mg/l
Ponto 5	8 mg/l
Ponto 6	10 mg/l



**Apêndice A4 - Calibração de cloreto na faixa de concentração de 1 a 10 mg/l**

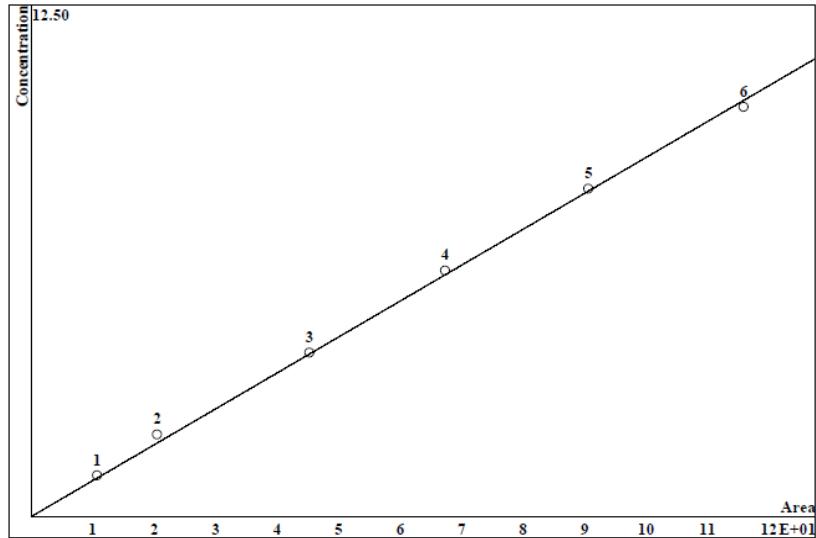
**Composto:** Cloreto

**Coeficiente de correlação:** 0.999733

**RSD:** 2.550 %

**Níveis de calibração:**

Ponto 1	1 mg/l
Ponto 2	2 mg/l
Ponto 3	4 mg/l
Ponto 4	6 mg/l
Ponto 5	8 mg/l
Ponto 6	10 mg/l



**Apêndice A5 - Calibração de brometo na faixa de concentração de 1 a 10 mg/l**

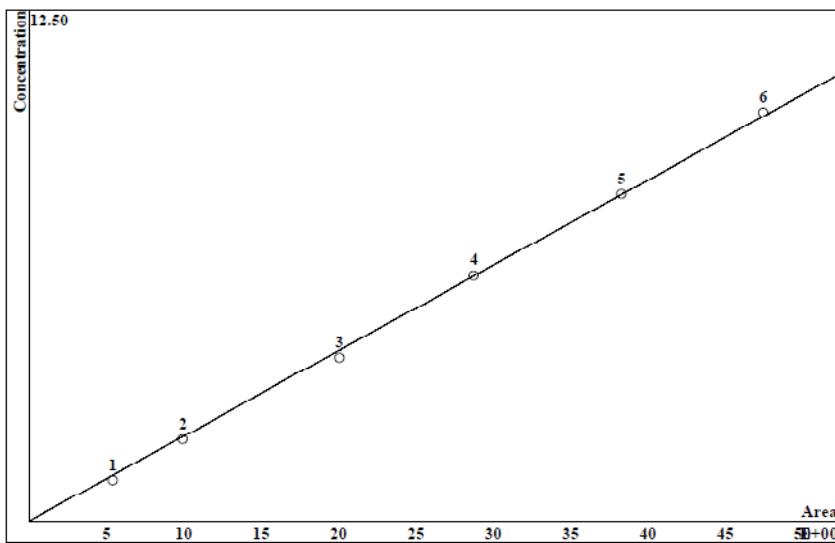
**Composto:** Brometo

**Coeficiente de correlação:** 0.999855

**RSD:** 2.196 %

**Níveis de calibração:**

Ponto 1	1 mg/l
Ponto 2	2 mg/l
Ponto 3	4 mg/l
Ponto 4	6 mg/l
Ponto 5	8 mg/l
Ponto 6	10 mg/l



**Apêndice A6 - Calibração de nitrato na faixa de concentração de 1 a 10 mg/l**

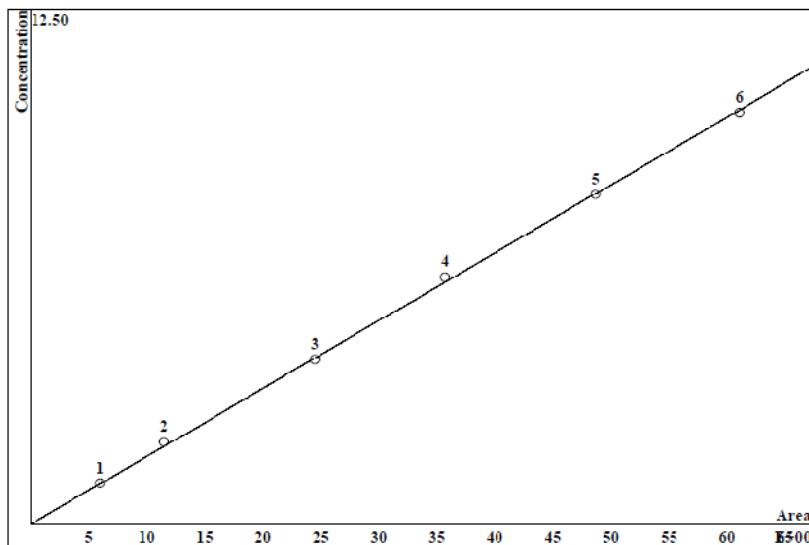
**Composto:** Nitrato

**Coeficiente de correlação:** 0.999827

**RSD:** 1.510 %

**Níveis de calibração:**

Ponto 1	1 mg/l
Ponto 2	2 mg/l
Ponto 3	4 mg/l
Ponto 4	6 mg/l
Ponto 5	8 mg/l
Ponto 6	10 mg/l



**Apêndice A7 - Calibração de fosfato na faixa de concentração de 1 a 10 mg/l**

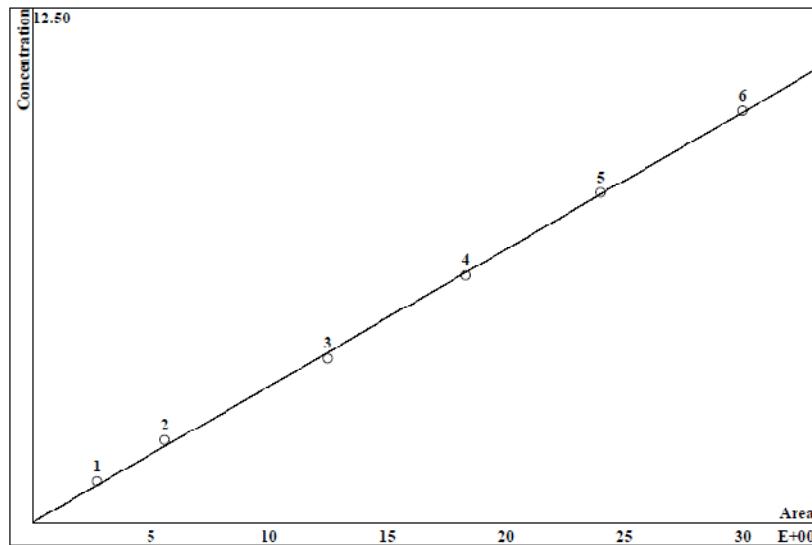
**Composto:** Fosfato

**Coeficiente de correlação:** 0.999570

**RSD:** 2.085 %

**Níveis de calibração:**

Ponto 1	1 mg/l
Ponto 2	2 mg/l
Ponto 3	4 mg/l
Ponto 4	6 mg/l
Ponto 5	8 mg/l
Ponto 6	10 mg/l



**Apêndice A8 - Calibração de sulfato na faixa de concentração de 1 a 10 mg/l**

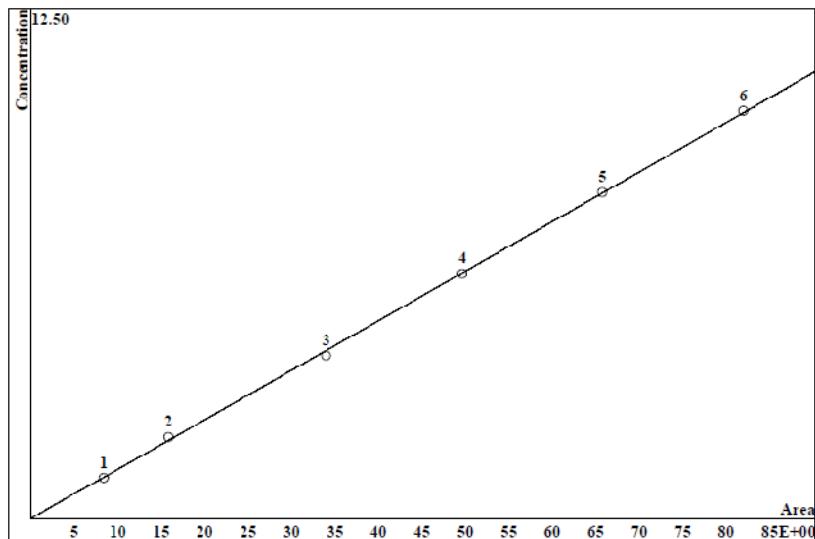
**Composto:** Sulfato

**Coeficiente de correlação:** 0.999802

**RSD:** 1.361 %

**Níveis de calibração:**

Ponto 1	1 mg/l
Ponto 2	2 mg/l
Ponto 3	4 mg/l
Ponto 4	6 mg/l
Ponto 5	8 mg/l
Ponto 6	10 mg/l



**Apêndice A9 - Calibração de sódio na faixa de concentração de 1 a 10 mg/l**

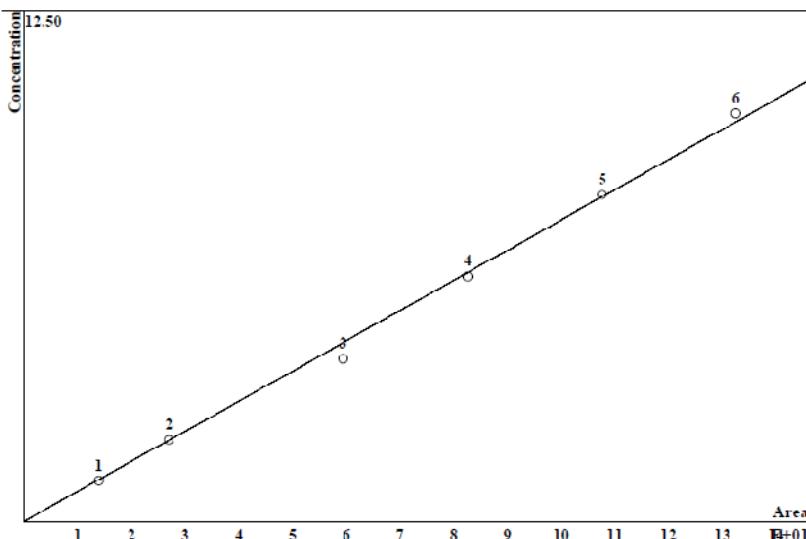
**Composto:** Sódio

**Coeficiente de correlação:** 0.998664

**RSD:** 3.918 %

**Níveis de calibração:**

Ponto 1	1 mg/l
Ponto 2	2 mg/l
Ponto 3	4 mg/l
Ponto 4	6 mg/l
Ponto 5	8 mg/l
Ponto 6	10 mg/l



**Apêndice A10 - Calibração de amônio na faixa de concentração de 1 a 10 mg/l**

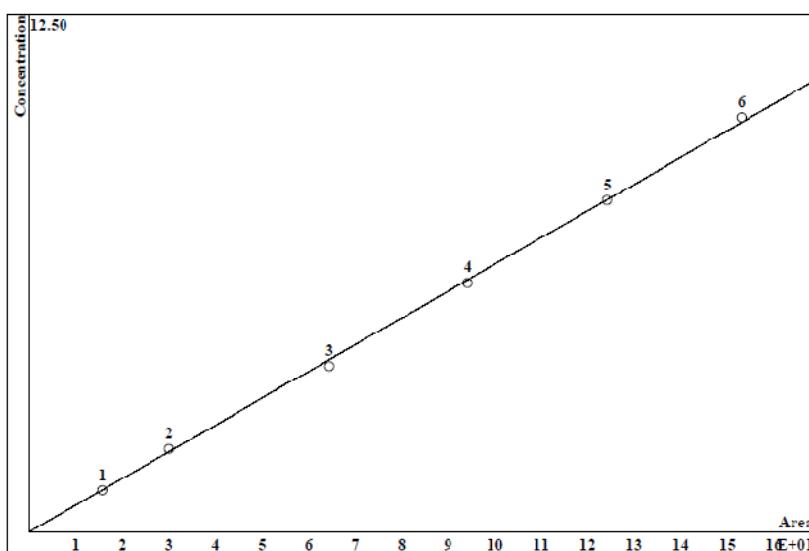
**Composto:** Amônio

**Coeficiente de correlação:** 0.999608

**RSD:** 1.975 %

**Níveis de calibração:**

Ponto 1	1 mg/l
Ponto 2	2 mg/l
Ponto 3	4 mg/l
Ponto 4	6 mg/l
Ponto 5	8 mg/l
Ponto 6	10 mg/l



**Apêndice A11 - Calibração de potássio na faixa de concentração de 1 a 10 mg/l**

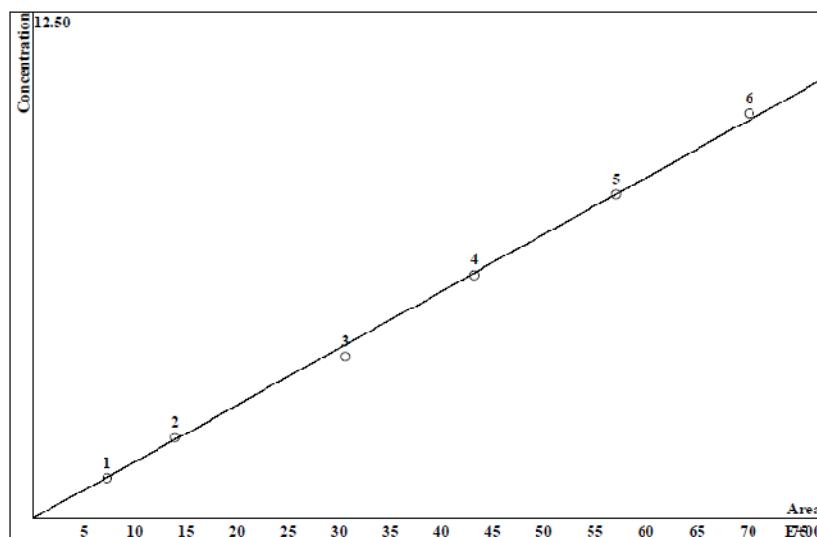
**Composto:** Potássio

**Coeficiente de correlação:** 0.999733

**RSD:** 2.550 %

**Níveis de calibração:**

Ponto 1	1 mg/l
Ponto 2	2 mg/l
Ponto 3	4 mg/l
Ponto 4	6 mg/l
Ponto 5	8 mg/l
Ponto 6	10 mg/l



**Apêndice A12 - Calibração de cálcio na faixa de concentração de 1 a 10 mg/l**

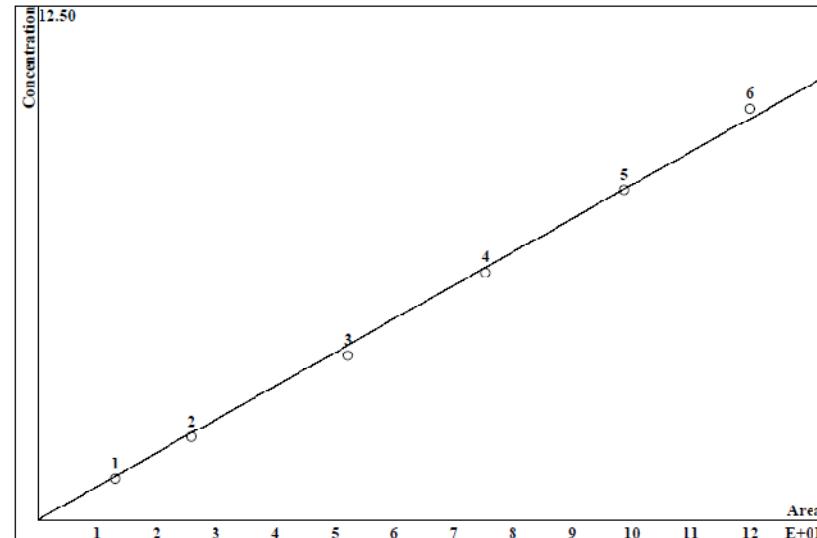
**Composto:** Cálculo

**Coeficiente de correlação:** 0.999275

**RSD:** 3.424 %

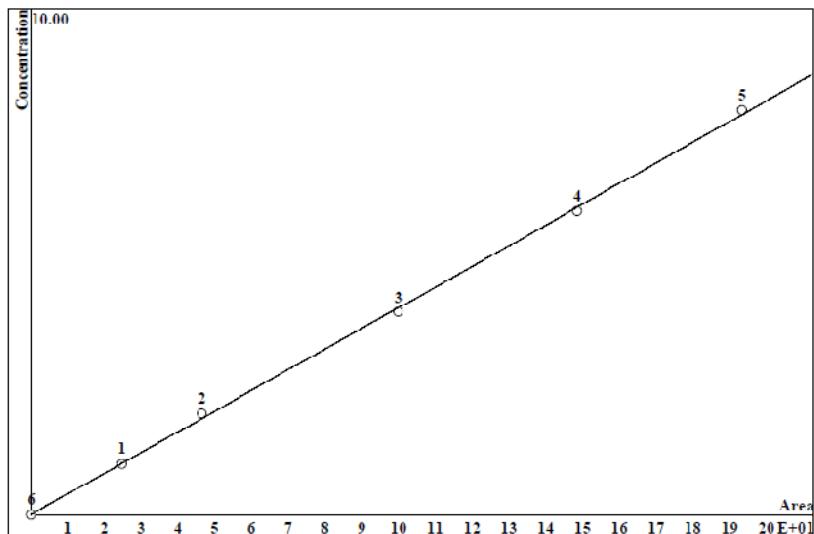
**Níveis de calibração:**

Ponto 1	1 mg/l
Ponto 2	2 mg/l
Ponto 3	4 mg/l
Ponto 4	6 mg/l
Ponto 5	8 mg/l
Ponto 6	10 mg/l



**Apêndice A13 - Calibração de magnésio na faixa de concentração de 1 a 10 mg/l****Composto:** Magnésio**Coeficiente de correlação:** 0.999525**RSD:** 2.100 %**Níveis de calibração:**

Ponto 1	1 mg/l
Ponto 2	2 mg/l
Ponto 3	4 mg/l
Ponto 4	6 mg/l
Ponto 5	8 mg/l
Ponto 6	10 mg/l



## **APÊNDICE B – Alinhamento das Seqüências**

**Apêndice B1** - Alinhamento da seqüência do rDNA 16S da cepa A1/Aba, identificada como *Serratia marcescens* com seqüências disponíveis no banco de dados *GenBank*.

	5	15	25	35	45
A1/Aba	AGTCGAGCGG	TAGCACAAGA	GAGCTTGCTC	YCTGGGTGAC	GAGCGGCCGA
EF032328.1	AGTCGAGCGG	TAGCACAAGA	GAGCTTGCTC	TCTGGGTGAC	GAGCGGCCGA
EU233275.1	AGTCGAGCGG	TAGCACAAGA	GAGCTTGCTC	TCTGGGTGAC	GAGCGGCCGA
FM213391.1	AGTCGAGCGG	TAGCACAAGA	GAGCTTGCTC	TCTGGGTGAC	GAGCGGCCGA
FN293172.1	AGTCGAGCGG	TAGCACAAGA	GAGCTTGCTC	TCTGGGTGAC	GAGCGGCCGA
GU826157.1	AGTCGAGCGG	TAGCACAAGA	GAGCTTGCTC	CCTGGGTGAC	GAGCGGCCGA
	55	65	75	85	95
A1/Aba	CGGGTGAGTA	ATGTCTGGGA	AACTGCCTGA	TGGAGGGGGA	TAACTACTGG
EF032328.1	CGGGTGAGTA	ATGTCTGGGA	AACTGCCTGA	TGGAGGGGGA	TAACTACTGG
EU233275.1	CGGGTGAGTA	ATGTCTGGGA	AACTGCCTGA	TGGAGGGGGA	TAACTACTGG
FM213391.1	CGGGTGAGTA	ATGTCTGGGA	AACTGCCTGA	TGGAGGGGGA	TAACTACTGG
FN293172.1	CGGGTGAGTA	ATGTCTGGGA	AACTGCCTGA	TGGAGGGGGA	TAACTACTGG
GU826157.1	CGGGTGAGTA	ATGTCTGGGA	AACTGCCTGA	TGGAGGGGGA	TAACTACTGG
	105	115	125	135	145
A1/Aba	AAACGGTAGC	TAATACCGCA	TAACGTCGCA	AGACCAAAGA	GGGGGACCTT
EF032328.1	AAACGGTAGC	TAATACCGCA	TAACGTCGCA	AGACCAAAGA	GGGGGACCTT
EU233275.1	AAACGGTAGC	TAATACCGCA	TAACGTCGCA	AGACCAAAGA	GGGGGACCTT
FM213391.1	AAACGGTAGC	TAATACCGCA	TAACGTCGCA	AGACCAAAGA	GGGGGACCTT
FN293172.1	AAACGGTAGC	TAATACCGCA	TAACGTCGCA	AGACCAAAGA	GGGGGACCTT
GU826157.1	AAACGGTAGC	TAATACCGCA	TAACGTCGCA	AGACCAAAGA	GGGGGACCTT
	155	165	175	185	195
A1/Aba	CGGGCCTCTT	GCCATCAGAT	GTGCCCAGAT	GGGATTAGCT	AGTAGGTGGG
EF032328.1	CGGGCCTCTT	GCCATCAGAT	GTGCCCAGAT	GGGATTAGCT	AGTAGGTGGG
EU233275.1	CGGGCCTCTT	GCCATCAGAT	GTGCCCAGAT	GGGATTAGCT	AGTAGGTGGG
FM213391.1	CGGGCCTCTT	GCCATCAGAT	GTGCCCAGAT	GGGATTAGCT	AGTAGGTGGG
FN293172.1	CGGGCCTCTT	GCCATCAGAT	GTGCCCAGAT	GGGATTAGCT	AGTAGGTGGG
GU826157.1	CGGGCCTCTT	GCCATCAGAT	GTGCCCAGAT	GGGATTAGCT	AGTAGGTGGG
	205	215	225	235	245
A1/Aba	GTAATGGCTC	ACCTAGGCGA	CGATCCCTAG	CTGGTCTGAG	AGGATGACCA
EF032328.1	GTAATGGCTC	ACCTAGGCGA	CGATCCCTAG	CTGGTCTGAG	AGGATGACCA
EU233275.1	GTAATGGCTC	ACCTAGGCGA	CGATCCCTAG	CTGGTCTGAG	AGGATGACCA

FM213391.1	GTAATGGCTC ACCTAGGCAGA CGATCCCTAG CTGGTCTGAG AGGATGACCA
FN293172.1	GTAATGGCTC ACCTAGGCAGA CGATCCCTAG CTGGTCTGAG AGGATGACCA
GU826157.1	GTAATGGCTC ACCTAGGCAGA CGATCCCTAG CTGGTCTGAG AGGATGACCA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	255 265 275 285 295
A1/Aba	GCCACACTGG AACTGAGACA CGGTCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG
EF032328.1	GCCACACTGG AACTGAGACA CGGTCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG
EU233275.1	GCCACACTGG AACTGAGACA CGGTCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG
FM213391.1	GCCACACTGG AACTGAGACA CGGTCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG
FN293172.1	GCCACACTGG AACTGAGACA CGGTCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG
GU826157.1	GCCACACTGG AACTGAGACA CGGTCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	305 315 325 335 345
A1/Aba	GGGAATATTG CACAATGGGC GCAAGCCTGA TGCAGCCATG CCGCGTGTGT
EF032328.1	GGGAATATTG CACAATGGGC GCAAGCCTGA TGCAGCCATG CCGCGTGTGT
EU233275.1	GGGAATATTG CACAATGGGC GCAAGCCTGA TGCAGCCATG CCGCGTGTGT
FM213391.1	GGGAATATTG CACAATGGGC GCAAGCCTGA TGCAGCCATG CCGCGTGTGT
FN293172.1	GGGAATATTG CACAATGGGC GCAAGCCTGA TGCAGCCATG CCGCGTGTGT
GU826157.1	GGGAATATTG CACAATGGGC GCAAGCCTGA TGCAGCCATG CCGCGTGTGT
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	355 365 375 385 395
A1/Aba	GAAGAAGGCC TTCGGGTTGT AAAGCACTTT CAGCGAGGAG GAAGGTGGTG
EF032328.1	GAAGAAGGCC TTCGGGTTGT AAAGCACTTT CAGCGAGGAG GAAGGTGGTG
EU233275.1	GAAGAAGGCC TTCGGGTTGT AAAGCACTTT CAGCGAGGAG GAAGGTGGTG
FM213391.1	GAAGAAGGCC TTCGGGTTGT AAAGCACTTT CAGCGAGGAG GAAGGTGGTG
FN293172.1	GAAGAAGGCC TTCGGGTTGT AAAGCACTTT CAGCGAGGAG GAAGGTGGTG
GU826157.1	GAAGAAGGCC TTCGGGTTGT AAAGCACTTT CAGCGAGGAG GAAGGTGGTG
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	405 415 425 435 445
A1/Aba	ARCTTAATAC GYTCATCAAT TGACGTTACT CGCAGAAAGAA GCACCGGCTA
EF032328.1	AGCTTAATAC GTTCATCAAT TGACGTTACT CGCAGAAAGAA GCACCGGCTA
EU233275.1	AGCTTAATAC GCTCATCAAT TGACGTTACT CGCAGAAAGAA GCACCGGCTA
FM213391.1	AACTTAATAC GTTCATCAAT TGACGTTACT CGCAGAAAGAA GCACCGGCTA
FN293172.1	AGCTTAATAC GCTCATCAAT TGACGTTACT CGCAGAAAGAA GCACCGGCTA
GU826157.1	AACTTAATAC GTTCATCAAT TGACGTTACT CGCAGAAAGAA GCACCGGCTA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	455 465 475 485 495
A1/Aba	ACTCCGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGGGA GGGTGCAAGC GTTAATCGGA
EF032328.1	ACTCCGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGGGA GGGTGCAAGC GTTAATCGGA
EU233275.1	ACTCCGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGGGA GGGTGCAAGC GTTAATCGGA
FM213391.1	ACTCCGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGGGA GGGTGCAAGC GTTAATCGGA
FN293172.1	ACTCCGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGGGA GGGTGCAAGC GTTAATCGGA
GU826157.1	ACTCCGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGGGA GGGTGCAAGC GTTAATCGGA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	505 515 525 535 545

A1/Aba	ATTACTGGGC	GTAAAGCGCA	CGCAGGCGGT	TTGTTAAGTC	AGATGTGAAA
EF032328.1	ATTACTGGGC	GTAAAGCGCA	CGCAGGCGGT	TTGTTAAGTC	AGATGTGAAA
EU233275.1	ATTACTGGGC	GTAAAGCGCA	CGCAGGCGGT	TTGTTAAGTC	AGATGTGAAA
FM213391.1	ATTACTGGGC	GTAAAGCGCA	CGCAGGCGGT	TTGTTAAGTC	AGATGTGAAA
FN293172.1	ATTACTGGGC	GTAAAGCGCA	CGCAGGCGGT	TTGTTAAGTC	AGATGTGAAA
GU826157.1	ATTACTGGGC	GTAAAGCGCA	CGCAGGCGGT	TTGTTAAGTC	AGATGTGAAA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	555	565	575	585	595
A1/Aba	TCCCCGGGCT	CAACCTGGGA	ACTGCATTTG	AAACTGGCAA	GCTAGAGTCT
EF032328.1	TCCCCGGGCT	CAACCTGGGA	ACTGCATTTG	AAACTGGCAA	GCTAGAGTCT
EU233275.1	TCCCCGGGCT	CAACCTGGGA	ACTGCATTTG	AAACTGGCAA	GCTAGAGTCT
FM213391.1	TCCCCGGGCT	CAACCTGGGA	ACTGCATTTG	AAACTGGCAA	GCTAGAGTCT
FN293172.1	TCCCCGGGCT	CAACCTGGGA	ACTGCATTTG	AAACTGGCAA	GCTAGAGTCT
GU826157.1	TCCCCGGGCT	CAACCTGGGA	ACTGCATTTG	AAACTGGCAA	GCTAGAGTCT
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	605	615	625	635	645
A1/Aba	CGTAGAGGGG	GGTAGAATTTC	CAGGTGTAGC	GGTGAAATGC	GTAGAGATCT
EF032328.1	CGTAGAGGGG	GGTAGAATTTC	CAGGTGTAGC	GGTGAAATGC	GTAGAGATCT
EU233275.1	CGTAGAGGGG	GGTAGAATTTC	CAGGTGTAGC	GGTGAAATGC	GTAGAGATCT
FM213391.1	CGTAGAGGGG	GGTAGAATTTC	CAGGTGTAGC	GGTGAAATGC	GTAGAGATCT
FN293172.1	CGTAGAGGGG	GGTAGAATTTC	CAGGTGTAGC	GGTGAAATGC	GTAGAGATCT
GU826157.1	CGTAGAGGGG	GGTAGAATTTC	CAGGTGTAGC	GGTGAAATGC	GTAGAGATCT
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	655	665	675	685	695
A1/Aba	GGAGGAATAAC	CGGTGGCGAA	GGCGGCCCGCC	TGGACGAAGA	CTGACGCTCA
EF032328.1	GGAGGAATAAC	CGGTGGCGAA	GGCGGCCCGCC	TGGACGAAGA	CTGACGCTCA
EU233275.1	GGAGGAATAAC	CGGTGGCGAA	GGCGGCCCGCC	TGGACGAAGA	CTGACGCTCA
FM213391.1	GGAGGAATAAC	CGGTGGCGAA	GGCGGCCCGCC	TGGACGAAGA	CTGACGCTCA
FN293172.1	GGAGGAATAAC	CGGTGGCGAA	GGCGGCCCGCC	TGGACGAAGA	CTGACGCTCA
GU826157.1	GGAGGAATAAC	CGGTGGCGAA	GGCGGCCCGCC	TGGACGAAGA	CTGACGCTCA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	705	715	725	735	745
A1/Aba	GGTGCAGAAAG	CGTGGGGAGC	AAACAGGATT	AGATACCTG	GTAGTCCACG
EF032328.1	GGTGCAGAAAG	CGTGGGGAGC	AAACAGGATT	AGATACCTG	GTAGTCCACG
EU233275.1	GGTGCAGAAAG	CGTGGGGAGC	AAACAGGATT	AGATACCTG	GTAGTCCACG
FM213391.1	GGTGCAGAAAG	CGTGGGGAGC	AAACAGGATT	AGATACCTG	GTAGTCCACG
FN293172.1	GGTGCAGAAAG	CGTGGGGAGC	AAACAGGATT	AGATACCTG	GTAGTCCACG
GU826157.1	GGTGCAGAAAG	CGTGGGGAGC	AAACAGGATT	AGATACCTG	GTAGTCCACG
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	755	765	775	785	795
A1/Aba	CTGTAAACGA	TGTCGATTG	GAGGTTGTGC	CCTTGAGGCG	TGGCTTCCGG
EF032328.1	CTGTAAACGA	TGTCGATTG	GAGGTTGTGC	CCTTGAGGCG	TGGCTTCCGG
EU233275.1	CTGTAAACGA	TGTCGATTG	GAGGTTGTGC	CCTTGAGGCG	TGGCTTCCGG
FM213391.1	CTGTAAACGA	TGTCGATTG	GAGGTTGTGC	CCTTGAGGCG	TGGCTTCCGG
FN293172.1	CTGTAAACGA	TGTCGATTG	GAGGTTGTGC	CCTTGAGGCG	TGGCTTCCGG

GU826157.1	CTGTAAACGA	TGTCGATTG	GAGGTTGTGC	CCTTGAGGCG	TGGCTTCCGG
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	805	815	825	835	845
A1/Aba	AGCTAACGCG	TTAAATCGAC	CGCCTGGGG	GTACGGCCGC	AAGGTTAAAA
EF032328.1	AGCTAACGCG	TTAAATCGAC	CGCCTGGGG	GTACGGCCGC	AAGGTTAAAA
EU233275.1	AGCTAACGCG	TTAAATCGAC	CGCCTGGGG	GTACGGCCGC	AAGGTTAAAA
FM213391.1	AGCTAACGCG	TTAAATCGAC	CGCCTGGGG	GTACGGCCGC	AAGGTTAAAA
FN293172.1	AGCTAACGCG	TTAAATCGAC	CGCCTGGGG	GTACGGCCGC	AAGGTTAAAA
GU826157.1	AGCTAACGCG	TTAAATCGAC	CGCCTGGGG	GTACGGCCGC	AAGGTTAAAA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	855	865	875	885	895
A1/Aba	CTCAAATGAA	TTGACGGGGG	CCCGCACAAG	CGGTGGAGCA	TGTGGTTAA
EF032328.1	CTCAAATGAA	TTGACGGGGG	CCCGCACAAG	CGGTGGAGCA	TGTGGTTAA
EU233275.1	CTCAAATGAA	TTGACGGGGG	CCCGCACAAG	CGGTGGAGCA	TGTGGTTAA
FM213391.1	CTCAAATGAA	TTGACGGGGG	CCCGCACAAG	CGGTGGAGCA	TGTGGTTAA
FN293172.1	CTCAAATGAA	TTGACGGGGG	CCCGCACAAG	CGGTGGAGCA	TGTGGTTAA
GU826157.1	CTCAAATGAA	TTGACGGGGG	CCCGCACAAG	CGGTGGAGCA	TGTGGTTAA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	905	915	925	935	945
A1/Aba	TTCGATGCAA	CGCGAAGAAC	CTTACCTACT	CTTGACATCC	AGAGAACTTW
EF032328.1	TTCGATGCAA	CGCGAAGAAC	CTTACCTACT	CTTGACATCC	AGAGAACTTT
EU233275.1	TTCGATGCAA	CGCGAAGAAC	CTTACCTACT	CTTGACATCC	AGAGAACTTT
FM213391.1	TTCGATGCAA	CGCGAAGAAC	CTTACCTACT	CTTGACATCC	AGAGAACTTT
FN293172.1	TTCGATGCAA	CGCGAAGAAC	CTTACCTACT	CTTGACATCC	AGAGAACTTT
GU826157.1	TTCGATGCAA	CGCGAAGAAC	CTTACCTACT	CTTGACATCC	AGAGAACTTT
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	955	965	975	985	995
A1/Aba	SCAGAGATGS	WTGGTGCCT	TCGGGAACTC	TGAGACAGGT	GCTGCATGGC
EF032328.1	GCAGAGATGG	ATTGGTGCCT	TCGGGAACTC	TGAGACAGGT	GCTGCATGGC
EU233275.1	CCAGAGATGG	ATTGGTGCCT	TCGGGAACTC	TGAGACAGGT	GCTGCATGGC
FM213391.1	CCAGAGATGG	ATTGGTGCCT	TCGGGAACTC	TGAGACAGGT	GCTGCATGGC
FN293172.1	CCAGAGATGG	ATTGGTGCCT	TCGGGAACTC	TGAGACAGGT	GCTGCATGGC
GU826157.1	CCAGAGATGG	ATTGGTGCCT	TCGGGAACTC	TGAGACAGGT	GCTGCATGGC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	1005	1015	1025	1035	1045
A1/Aba	TGTCGTCAGC	TCGTGTTGTG	AAATGTTGGG	TTAAGTCCCG	CAACGAGCGC
EF032328.1	TGTCGTCAGC	TCGTGTTGTG	AAATGTTGGG	TTAAGTCCCG	CAACGAGCGC
EU233275.1	TGTCGTCAGC	TCGTGTTGTG	AAATGTTGGG	TTAAGTCCCG	CAACGAGCGC
FM213391.1	TGTCGTCAGC	TCGTGTTGTG	AAATGTTGGG	TTAAGTCCCG	CAACGAGCGC
FN293172.1	TGTCGTCAGC	TCGTGTTGTG	AAATGTTGGG	TTAAGTCCCG	CAACGAGCGC
GU826157.1	TGTCGTCAGC	TCGTGTTGTG	AAATGTTGGG	TTAAGTCCCG	CAACGAGCGC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	1055	1065	1075	1085	1095
A1/Aba	AACCCATTATC	CTTTGTTGCC	AGCGGTTCGG	CCGGGAACTC	AAAGGAGACT

EF032328.1	AACCCTTATC	CTTTGTTGCC	AGCGGTTCGG	CCGGGAACTC	AAAGGAGACT	
EU233275.1	AACCCTTATC	CTTTGTTGCC	AGCGGTTCGG	CCGGGAACTC	AAAGGAGACT	
FM213391.1	AACCCTTATC	CTTTGTTGCC	AGCGGTTCGG	CCGGGAACTC	AAAGGAGACT	
FN293172.1	AACCCTTATC	CTTTGTTGCC	AGCGGTTCGG	CCGGGAACTC	AAAGGAGACT	
GU826157.1	AACCCTTATC	CTTTGTTGCC	AGCGGTTCGG	CCGGGAACTC	AAAGGAGACT	
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	
	1105	1115	1125	1135	1145	
A1/Aba	GCCAGTGATA	AACTGGAGGA	AGGTGGGGAY	GACGTCAAGT	CATCATGGCC	
EF032328.1	GCCAGTGATA	AACTGGAGGA	AGGTGGGGAT	GACGTCAAGT	CATCATGGCC	
EU233275.1	GCCAGTGATA	AACTGGAGGA	AGGTGGGGAT	GACGTCAAGT	CATCATGGCC	
FM213391.1	GCCAGTGATA	AACTGGAGGA	AGGTGGGGAT	GACGTCAAGT	CATCATGGCC	
FN293172.1	GCCAGTGATA	AACTGGAGGA	AGGTGGGGAT	GACGTCAAGT	CATCATGGCC	
GU826157.1	GCCAGTGATA	AACTGGAGGA	AGGTGGGGAT	GACGTCAAGT	CATCATGGCC	
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	
	1155	1165	1175	1185	1195	
A1/Aba	CTTACGAGTA	GGGCTACACA	CGTGCTACAA	TGGCATATAC	AAAGAGAAGC	
EF032328.1	CTTACGAGTA	GGGCTACACA	CGTGCTACAA	TGGCATATAC	AAAGAGAAGC	
EU233275.1	CTTACGAGTA	GGGCTACACA	CGTGCTACAA	TGGCATATAC	AAAGAGAAGC	
FM213391.1	CTTACGAGTA	GGGCTACACA	CGTGCTACAA	TGGCATATAC	AAAGAGAAGC	
FN293172.1	CTTACGAGTA	GGGCTACACA	CGTGCTACAA	TGGCATATAC	AAAGAGAAGC	
GU826157.1	CTTACGAGTA	GGGCTACACA	CGTGCTACAA	TGGCATATAC	AAAGAGAAGC	
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	
	1205	1215	1225	1235	1245	
A1/Aba	GACCTCGCGM	GASCAAGCGG	ACCTCATAAA	GTATGTCGTA	GTCCSSMTTS	
EF032328.1	GACCTCGCGA	GAGCAAGCGG	ACCTCATAAA	GTATGTCGTA	GTCCGGATTG	
EU233275.1	GACCTCGCGA	GAGCAAGCGG	ACCTCATAAA	GTATGTCGTA	GTCCGGATTG	
FM213391.1	GACCTCGCGA	GAGCAAGCGG	ACCTCATAAA	GTATGTCGTA	GTCCGGATTG	
FN293172.1	GACCTCGCGA	GAGCAAGCGG	ACCTCATAAA	GTATGTCGTA	GTCCGGATTG	
GU826157.1	GACCTCGCGA	GAGCAAGCGG	ACCTCATAAA	GTATGTCGTA	GTCCGGATTG	
	..... .....	..... .....	..			
	1255	1265				
A1/Aba	GMGTCTGCAA	CTCGACTCCA	TG			
EF032328.1	GAGTCTGCAA	CTCGACTCCA	TG			
EU233275.1	GAGTCTGCAA	CTCGACTCCA	TG			
FM213391.1	GAGTCTGCAA	CTCGACTCCA	TG			
FN293172.1	GAGTCTGCAA	CTCGACTCCA	TG			
GU826157.1	GAGTCTGCAA	CTCGACTCCA	TG			

**Apêndice B2 - Alinhamento da seqüência do rDNA 16S da cepa A1/Ab, identificada como *Curtobacterium* sp. com seqüências disponíveis no banco de dados *GenBank*.**

	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....			
5	15	25	35	45
A1Ab-	CGGGTGAGTA ACACGTGAGT AACCTGCCCG TGACTCTGGG ATAAGCGTTG			
AY688357.1	CGGGTGAGTA ACACGTGAGT AACCTGCCCG TGACTCTGGG ATAAGCGTTG			
AY688361.1	CGGGTGAGTA ACACGTGAGT AACCTGCCCG TGACTCTGGG ATAAGCGTTG			
AY864656.1	CGGGTGAGTA ACACGTGAGT AACCTGCCCG TGACTCTGGG ATAAGCGTTG			
EF411134.1	CGGGTGAGTA ACACGTGAGT AACCTGCCCG TGACTCTGGG ATAAGCGTTG			
EF592577.1	CGGGTGAGTA ACACGTGAGT AACCTGCCCG TGACTCTGGG ATAAGCGTTG			
EU373393.1	CGGGTGAGTA ACACGTGAGT AACCTGCCCG TGACTCTGGG ATAAGCGTTG			
FJ876396.1	CGGGTGAGTA ACACGTGAGT AACCTGCCCG TGACTCTGGG ATAAGCGTTG			
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....			
55	65	75	85	95
A1Ab-	GAAACGACGT CTAAT-ACTG GATATGATCA CTGGCCGCAT GGTCTGGTGG			
AY688357.1	GAAACGACGT CTAAT-ACTG GATATGATCA CTGGCCGCAT GGTCTGGTGG			
AY688361.1	GAAACGACGT CTAAT-ACTG GATATGATCA CTGGCCGCAT GGTCTGGTGG			
AY864656.1	GAAACGACGT CTAAT-ACTG GATATGATCA CTGGCCGCAT GGTCTGGTGG			
EF411134.1	GAAACGACGT CTAAT-ACTG GATATGATCA CTGGCCGCAT GGTCTGGTGG			
EF592577.1	GAAACGACGT CTAAT-ACTG GATATGACTA CNGGCCGCAT GGTCTGGTGG			
EU373393.1	GAAACGACGT CTAAT-ACTG GATATGACTG CGGCCGCAT GGTCTGGTGG			
FJ876396.1	GAAACGACGT CTAAT-ACTG GATATGATCA CTGGCCGCAT GGTCTGGTGG			
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....			
105	115	125	135	145
A1Ab-	TGGAAAGATT TTTTGGTTGG GGATGGACTC GCGGCCTATC AGCTTGTG			
AY688357.1	TGGAAAGATT TTTTGGTTGG GGATGGACTC GCGGCCTATC AGCTTGTG			
AY688361.1	TGGAAAGATT TTTTGGTTGG GGATGGACTC GCGGCCTATC AGCTTGTG			
AY864656.1	TGGAAAGATT TTTTGGTTGG GGATGGACTC GCGGCCTATC AGCTTGTG			
EF411134.1	TGGAAAGATT TTTTGGTTGG GGATGGACTC GCGGCCTATC AGCTTGTG			
EF592577.1	TGGAAAGATT TTTTGGTTGG GGATGGACTC GCGGCCTATC AGCTTGTG			
EU373393.1	TGGAAAGATT TTTTGGTTGG GGATGGACTC GCGGCCTATC AGCTTGTG			
FJ876396.1	TGGAAAGATT TTTTGGTTGG GGATGGACTC GCGGCCTATC AGCTTGTG			
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....			
155	165	175	185	195
A1Ab-	TGAGGTAATG GCTCACCAAG GCGACGACGG GTAGCCGCC TGAGA---GG			
AY688357.1	TGAGGTAATG GCTCACCAAG GCGACGACGG GTAGCCGCC TGAGA---GG			
AY688361.1	TGAGGTAATG GCTCACCAAG GCGACGACGG GTAGCCGCC TGAGA---GG			
AY864656.1	TGAGGTAATG GCTCACCAAG GCGACGACGG GTAGCCGCC TGAGA---GG			
EF411134.1	TGAGGTAATG GCTCACCAAG GCGACGACGG GTAGCCGCC TGAGA---GG			
EF592577.1	TGAGGTAATG GCTCACCAAG GCGACGACGG GTAGCCGCC TGAGA---GG			
EU373393.1	TGAGGTAATG GCTCACCAAG GCGACGACGG GTAGCCGCC TGAGA---GG			
FJ876396.1	TGAGGTAATG GCTCACCAAG GCGACGACGG GTAGCCGCC TGAGA---GG			

	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	205	215	225	235	245
A1Ab-	GTGACCGGGCC	ACACTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAGACTCC	TACGGGAGGC	
AY688357.1	GTGACCGGGCC	ACACTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAGACTCC	TACGGGAGGC	
AY688361.1	GTGACCGGGCC	ACACTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAGACTCC	TACGGGAGGC	
AY864656.1	GTGACCGGGCC	ACACTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAGACTCC	TACGGGAGGC	
EF411134.1	GTGACCGGGCC	ACACTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAGACTCC	TACGGGAGGC	
EF592577.1	GTGACCGGGCC	ACACTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAGACTCC	TACGGGAGGC	
EU373393.1	GTGACCGGGCC	ACACTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAGACTCC	TACGGGAGGC	
FJ876396.1	GTGACCGGGCC	ACACTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAGACTCC	TACGGGAGGC	
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	255	265	275	285	295
A1Ab-	AGCAGTGGGG	AATATTGCAC	AATGGGCGAA	AGCCTGATGC	AGCAACGCCG	
AY688357.1	AGCAGTGGGG	AATATTGCAC	AATGGGCGAA	AGCCTGATGC	AGCAACGCCG	
AY688361.1	AGCAGTGGGG	AATATTGCAC	AATGGGCGAA	AGCCTGATGC	AGCAACGCCG	
AY864656.1	AGCAGTGGGG	AATATTGCAC	AATGGGCGAA	AGCCTGATGC	AGCAACGCCG	
EF411134.1	AGCAGTGGGG	AATATTGCAC	AATGGGCGAA	AGCCTGATGC	AGCAACGCCG	
EF592577.1	AGCAGTGGGG	AATATTGCAC	AATGGGCGAA	AGCCTGATGC	AGCAACGCCG	
EU373393.1	AGCAGTGGGG	AATATTGCAC	AATGGGCGAA	AGCCTGATGC	AGCAACGCCG	
FJ876396.1	AGCAGTGGGG	AATATTGCAC	AATGGGCGAA	AGCCTGATGC	AGCAACGCCG	
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	305	315	325	335	345
A1Ab-	CGTGAGGGAT	GACGGCCTT-	CGGGTTGTAA	ACCTCTTTTA	GTAGGGAAAGA	
AY688357.1	CGTGAGGGAT	GACGGCCTT-	CGGGTTGTAA	ACCTCTTTTA	GTAGGGAAAGA	
AY688361.1	CGTGAGGGAT	GACGGCCTT-	CGGGTTGTAA	ACCTCTTTTA	GTAGGGAAAGA	
AY864656.1	CGTGAGGGAT	GACGGCCTT-	CGGGTTGTAA	ACCTCTTTTA	GTAGGGAAAGA	
EF411134.1	CGTGAGGGAT	GACGGCCTT-	CGGGTTGTAA	ACCTCTTTTA	GTAGGGAAAGA	
EF592577.1	CGTGAGGGAT	GACGGCCTT-	CGGGTTGTAA	ACCTCTTTTA	GTAGGGAAAGA	
EU373393.1	CGTGAGGGAT	GACGGCCTT-	CGGGTTGTAA	ACCTCTTTTA	GTAGGGAAAGA	
FJ876396.1	CGTGAGGGAT	GACGGCCTT-	CGGGTTGTAA	ACCTCTTTTA	GTAGGGAAAGA	
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	355	365	375	385	395
A1Ab-	AGCGAAAGTG	ACGGT-----	ACCTGCAGAA	AAAGCACC--	-GGCTAACTA	
AY688357.1	AGCGAAAGTG	ACGGT-----	ACCTGCAGAA	AAAGCACC--	-GGCTAACTA	
AY688361.1	AGCGAAAGTG	ACGGT-----	ACCTGCAGAA	AAAGCACC--	-GGCTAACTA	
AY864656.1	AGCGAGAGTG	ACGGT-----	ACCTGCAGAA	AAAGCACC--	-GGCTAACTA	
EF411134.1	AGCGAAAGTG	ACGGT-----	ACCTGCAGAA	AAAGCACC--	-GGCTAACTA	
EF592577.1	AGCGAAAGTG	ACGGT-----	ACCTGCAGAA	AAAGCACC--	-GGCTAACTA	
EU373393.1	AGCGAAAGTG	ACGGT-----	ACCTGCAGAA	AAAGCACC--	-GGCTAACTA	
FJ876396.1	AGCGAAAGTG	ACGGT-----	ACCTGCAGAA	AAAGCACC--	-GGCTAACTA	
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	405	415	425	435	445
A1Ab-	CGTGCAGCA	GCCGCGGTAA	TACGTAGGG-	--TGCAAGCG	TTGTCCGGAA	
AY688357.1	CGTGCAGCA	GCCGCGGTAA	TACGTAGGG-	--TGCAAGCG	TTGTCCGGAA	

AY688361.1	CGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA	TACGTAGGG-	--TGCAAGCG	TTGTCCGGAA
AY864656.1	CGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA	TACGTAGGG-	--TGCAAGCG	TTGTCCGGAA
EF411134.1	CGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA	TACGTAGGG-	--TGCAAGCG	TTGTCCGGAA
EF592577.1	CGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA	TACGTAGGG-	--TGCAAGCG	TTGTCCGGAA
EU373393.1	CGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA	TACGTAGGG-	--TGCAAGCG	TTGTCCGGAA
FJ876396.1	CGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA	TACGTAGGG-	--TGCAAGCG	TTGTCCGGAA
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	455	465	475	485	495
A1Ab-	TTATTGGCG	TAAAGAGCTC	G-TAGGCGGT	TTGTCGCGTC	TGCTGTGAAA
AY688357.1	TTATTGGCG	TAAAGAGCTC	G-TAGGCGGT	TTGTCGCGTC	TGCTGTGAAA
AY688361.1	TTATTGGCG	TAAAGAGCTC	G-TAGGCGGT	TTGTCGCGTC	TGCTGTGAAA
AY864656.1	TTATTGGCG	TAAAGAGCTC	G-TAGGCGGT	TTGTCGCGTC	TGCTGTGAAA
EF411134.1	TTATTGGCG	TAAAGAGCTC	G-TAGGCGGT	TTGTCGCGTC	TGCTGTGAAA
EF592577.1	TTATTGGCG	TAAAGAGCTC	G-TAGGCGGT	TTGTCGCGTC	TGCTGTGAAA
EU373393.1	TTATTGGCG	TAAAGAGCTC	G-TAGGCGGT	TTGTCGCGTC	TGCTGTGAAA
FJ876396.1	TTATTGGCG	TAAAGAGCTC	G-TAGGCGGT	TTGTCGCGTC	TGCTGTGAAA
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	505	515	525	535	545
A1Ab-	TCCC--GAGG	CTCAACCTCG	GGCTTGCAGT	GGGTACGGGC	AGACTAGAGT
AY688357.1	TCCC--GAGG	CTCAACCTCG	GGCTTGCAGT	GGGTACGGGC	AGACTAGAGT
AY688361.1	TCCC--GAGG	CTCAACCTCG	GGCTTGCAGT	GGGTACGGGC	AGACTAGAGT
AY864656.1	TCCC--GAGG	CTCAACCTCG	GGCTTGCAGT	GGGTACGGGC	AGACTAGAGT
EF411134.1	TCCC--GAGG	CTCAACCTCG	GGCTTGCAGT	GGGTACGGGC	AGACTAGAGT
EF592577.1	TCCC--GAGG	CTCAACCTCG	GGCTTGCAGT	GGGTACGGGC	AGACTAGAGT
EU373393.1	TCCC--GAGG	CTCAACCTCG	GGCTTGCAGT	GGGTACGGGC	AGACTAGAGT
FJ876396.1	TCCC--GAGG	CTCAACCTCG	GGCTTGCAGT	GGGTACGGGC	AGACTAGAGT
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	555	565	575	585	595
A1Ab-	GCGGTTAGGGG	AGAT-TGGAA	TTCCCTGGTGT	AGCGGTGGAA	TGC-GCAGAT
AY688357.1	GCGGTTAGGGG	AGAT-TGGAA	TTCCCTGGTGT	AGCGGTGGAA	TGC-GCAGAT
AY688361.1	GCGGTTAGGGG	AGAT-TGGAA	TTCCCTGGTGT	AGCGGTGGAA	TGC-GCAGAT
AY864656.1	GCGGTTAGGGG	AGAT-TGGAA	TTCCCTGGTGT	AGCGGTGGAA	TGC-GCAGAT
EF411134.1	GCGGTTAGGGG	AGAT-TGGAA	TTCCCTGGTGT	AGCGGTGGAA	TGC-GCAGAT
EF592577.1	GCGGTTAGGGG	AGAT-TGGAA	TTCCCTGGTGT	AGCGGTGGAA	TGC-GCAGAT
EU373393.1	GCGGTTAGGGG	AGAT-TGGAA	TTCCCTGGTGT	AGCGGTGGAA	TGC-GCAGAT
FJ876396.1	GCGGTTAGGGG	AGAT-TGGAA	TTCCCTGGTGT	AGCGGTGGAA	TGC-GCAGAT
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	605	615	625	635	645
A1Ab-	ATCAGGGAGGA	ACACCGATGG	CGAAGGCAGA	TC-TCTGGGC	CGTAACTGAC
AY688357.1	ATCAGGGAGGA	ACACCGATGG	CGAAGGCAGA	TC-TCTGGGC	CGTAACTGAC
AY688361.1	ATCAGGGAGGA	ACACCGATGG	CGAAGGCAGA	TC-TCTGGGC	CGTAACTGAC
AY864656.1	ATCAGGGAGGA	ACACCGATGG	CGAAGGCAGA	TC-TCTGGGC	CGTAACTGAC
EF411134.1	ATCAGGGAGGA	ACACCGATGG	CGAAGGCAGA	TC-TCTGGGC	CGTAACTGAC
EF592577.1	ATCAGGGAGGA	ACACCGATGG	CGAAGGCAGA	TC-TCTGGGC	CGTAACTGAC
EU373393.1	ATCAGGGAGGA	ACACCGATGG	CGAAGGCAGA	TC-TCTGGGC	CGTAACTGAC
FJ876396.1	ATCAGGGAGGA	ACACCGATGG	CGAAGGCAGA	TC-TCTGGGC	CGTAACTGAC

	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	655	665	675	685	695
A1Ab-	GCTGAGGAGC GAAAGCGTGG GGAGCGAAC A GGATTAGATA CCCTGGTAGT					
AY688357.1	GCTGAGGAGC GAAAGCGTGG GGAGCGAAC A GGATTAGATA CCCTGGTAGT					
AY688361.1	GCTGAGGAGC GAAAGCGTGG GGAGCGAAC A GGATTAGATA CCCTGGTAGT					
AY864656.1	GCTGAGGAGC GAAAGCGTGG GGAGCGAAC A GGATTAGATA CCCTGGTAGT					
EF411134.1	GCTGAGGAGC GAAAGCGTGG GGAGCGAAC A GGATTAGATA CCCTGGTAGT					
EF592577.1	GCTGAGGAGC GAAAGCGTGG GGAGCGAAC A GGATTAGATA CCCTGGTAGT					
EU373393.1	GCTGAGGAGC GAAAGCGTGG GGAGCGAAC A GGATTAGATA CCCTGGTAGT					
FJ876396.1	GCTGAGGAGC GAAAGCGTGG GGAGCGAAC A GGATTAGATA CCCTGGTAGT					
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	705	715	725	735	745
A1Ab-	CCACGCCGT A AACGTTGGGC GCTAGATGTA GGGACCTTC CACGGTTCT					
AY688357.1	CCACGCCGT A AACGTTGGGC GCTAGATGTA GGGACCTTC CACGGTTCT					
AY688361.1	CCACGCCGT A AACGTTGGGC GCTAGATGTA GGGACCTTC CACGGTTCT					
AY864656.1	CCACGCCGT A AACGTTGGGC GCTAGATGTA GGGACCTTC CACGGTTCT					
EF411134.1	CCACGCCGT A AACGTTGGGC GCTAGATGTA GGGACCTTC CACGGTTCT					
EF592577.1	CCACGCCGT A AACGTTGGGC GCTAGATGTA GGGACCTTC CACGGTTCT					
EU373393.1	CCACGCCGT A AACGTTGGGC GCTAGATGTA GGGACCTTC CACGGTTCT					
FJ876396.1	CCACGCCGT A AACGTTGGGC GCTAGATGTA GGGACCTTC CACGGTTCT					
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	755	765	775	785	795
A1Ab-	GTGTCGTAGC TAACGCATTA AGCGCCCCGC CTGGGGAGTA CGGCCGCAAG					
AY688357.1	GTGTCGTAGC TAACGCATTA AGCGCCCCGC CTGGGGAGTA CGGCCGCAAG					
AY688361.1	GTGTCGTAGC TAACGCATTA AGCGCCCCGC CTGGGGAGTA CGGCCGCAAG					
AY864656.1	GTGTCGTAGC TAACGCATTA AGCGCCCCGC CTGGGGAGTA CGGCCGCAAG					
EF411134.1	GTGTCGTAGC TAACGCATTA AGCGCCCCGC CTGGGGAGTA CGGCCGCAAG					
EF592577.1	GTGTCGTAGC TAACGCATTA AGCGCCCCGC CTGGGGAGTA CGGCCGCAAG					
EU373393.1	GTGTCGTAGC TAACGCATTA AGCGCCCCGC CTGGGGAGTA CGGCCGCAAG					
FJ876396.1	GTGTCGTAGC TAACGCATTA AGCGCCCCGC CTGGGGAGTA CGGCCGCAAG					
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	805	815	825	835	845
A1Ab-	GCTAAAACTC AAAGGAATTG ACGGGGGCC GCACAAGCGG CGGAGCATGC					
AY688357.1	GCTAAAACTC AAAGGAATTG ACGGGGGCC GCACAAGCGG CGGAGCATGC					
AY688361.1	GCTAAAACTC AAAGGAATTG ACGGGGGCC GCACAAGCGG CGGAGCATGC					
AY864656.1	GCTAAAACTC AAAGGAATTG ACGGGGGCC GCACAAGCGG CGGAGCATGC					
EF411134.1	GCTAAAACTC AAAGGAATTG ACGGGGGCC GCACAAGCGG CGGAGCATGC					
EF592577.1	GCTAAAACTC AAAGGAATTG ACGGGGGCC GCACAAGCGG CGGAGCATGC					
EU373393.1	GCTAAAACTC AAAGGAATTG ACGGGGGCC GCACAAGCGG CGGAGCATGC					
FJ876396.1	GCTAAAACTC AAAGGAATTG ACGGGGGCC GCACAAGCGG CGGAGCATGC					
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	855	865	875	885	895
A1Ab-	GGATTAATTG GATGCAACGC GAAGAACCTT ACCAAGGCTT GACATACACC					
AY688357.1	GGATTAATTG GATGCAACGC GAAGAACCTT ACCAAGGCTT GACATACACC					
AY688361.1	GGATTAATTG GATGCAACGC GAAGAACCTT ACCAAGGCTT GACATACACC					

AY864656.1	GGATTAATTG	GATGCAACGC	GAAGAACCTT	ACCAAGGCTT	GACATACACC
EF411134.1	GGATTAATTG	GATGCAACGC	GAAGAACCTT	ACCAAGGCTT	GACATACACC
EF592577.1	GGATTAATTG	GATGCAACGC	GAAGAACCTT	ACCAAGGCTT	GACATACACC
EU373393.1	GGATTAATTG	GATGCAACGC	GAAGAACCTT	ACCAAGGCTT	GACATACACC
FJ876396.1	GGATTAATTG	GATGCAACGC	GAAGAACCTT	ACCAAGGCTT	GACATACACC
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	905	915	925	935	945
A1Ab-	GGAAACGGCC	AGAGATGGTC	GCCCCCTTGT	GGTCGGTGTA	CAGGTGGTGC
AY688357.1	GGAAACGGCC	AGAGATGGTC	GCCCCCTTGT	GGTCGGTGTA	CAGGTGGTGC
AY688361.1	GGAAACGGCC	AGAGATGGTC	GCCCCCTTGT	GGTCGGTGTA	CAGGTGGTGC
AY864656.1	GGAAACGGCC	AGAGATGGTC	GCCCCCTTGT	GGTCGGTGTA	CAGGTGGTGC
EF411134.1	GGAAACGGCC	AGAGATGGTC	GCCCCCTTGT	GGTCGGTGTA	CAGGTGGTGC
EF592577.1	GGAAACGGCC	AGAGATGGTC	GCCCCCTTGT	GGTCGGTGTA	CAGGTGGTGC
EU373393.1	GGAAACGGCC	AGAGATGGTC	GCCCCCTTGT	GGTCGGTGTA	CAGGTGGTGC
FJ876396.1	GGAAACGGCC	AGAGATGGTC	GCCCCCTTGT	GGTCGGTGTA	CAGGTGGTGC
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	955	965	975	985	995
A1Ab-	ATGGTTGTCG	TCAGCTCGTG	TCGTGAGATG	TTGGGTTAAG	TCCCGCAACG
AY688357.1	ATGGTTGTCG	TCAGCTCGTG	TCGTGAGATG	TTGGGTTAAG	TCCCGCAACG
AY688361.1	ATGGTTGTCG	TCAGCTCGTG	TCGTGAGATG	TTGGGTTAAG	TCCCGCAACG
AY864656.1	ATGGTTGTCG	TCAGCTCGTG	TCGTGAGATG	TTGGGTTAAG	TCCCGCAACG
EF411134.1	ATGGTTGTCG	TCAGCTCGTG	TCGTGAGATG	TTGGGTTAAG	TCCCGCAACG
EF592577.1	ATGGTTGTCG	TCAGCTCGTG	TCGTGAGATG	TTGGGTTAAG	TCCCGCAACG
EU373393.1	ATGGTTGTCG	TCAGCTCGTG	TCGTGAGATG	TTGGGTTAAG	TCCCGCAACG
FJ876396.1	ATGGTTGTCG	TCAGCTCGTG	TCGTGAGATG	TTGGGTTAAG	TCCCGCAACG
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	1005	1015	1025	1035	1045
A1Ab-	AGCGCAACCC	TCGTTCTATG	TTGCCAGCGC	GTTATGGCGG	GGACTCATAG
AY688357.1	AGCGCAACCC	TCGTTCTATG	TTGCCAGCGC	GTTATGGCGG	GGACTCATAG
AY688361.1	AGCGCAACCC	TCGTTCTATG	TTGCCAGCGC	GTTATGGCGG	GGACTCATAG
AY864656.1	AGCGCAACCC	TCGTTCTATG	TTGCCAGCGC	GTTATGGCGG	GGACTCATAG
EF411134.1	AGCGCAACCC	TCGTTCTATG	TTGCCAGCGC	GTTATGGCGG	GGACTCATAG
EF592577.1	AGCGCAACCC	TCGTTCTATG	TTGCCAGCGC	GTTATGGCGG	GGACTCATAG
EU373393.1	AGCGCAACCC	TCGTTCTATG	TTGCCAGCGC	GTTATGGCGG	GGACTCATAG
FJ876396.1	AGCGCAACCC	TCGTTCTATG	TTGCCAGCGC	GTTATGGCGG	GGACTCATAG
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	1055	1065	1075	1085	1095
A1Ab-	GAGACTGCCG	GGGTCAACTC	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCA-AATCAT
AY688357.1	GAGACTGCCG	GGGTCAACTC	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCA-AATCAT
AY688361.1	GAGACTGCCG	GGGTCAACTC	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCA-AATCAT
AY864656.1	GAGACTGCCG	GGGTCAACTC	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCA-AATCAT
EF411134.1	GAGACTGCCG	GGGTCAACTC	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCA-AATCAT
EF592577.1	GAGACTGCCG	GGGTCAACTC	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCA-AATCAT
EU373393.1	GAGACTGCCG	GGGTCAACTC	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCA-AATCAT
FJ876396.1	GAGACTGCCG	GGGTCAACTC	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCA-AATCAT

	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....										
	1105	1115	1125	1135	1145						
A1Ab-	CATGCCCTT	ATGTCTTGGG	CTTCACGCAT	GCTACA-ATG	GCCGGTACAA						
AY688357.1	CATGCCCTT	ATGTCTTGGG	CTTCACGCAT	GCTACA-ATG	GCCGGTACAA						
AY688361.1	CATGCCCTT	ATGTCTTGGG	CTTCACGCAT	GCTACA-ATG	GCCGGTACAA						
AY864656.1	CATGCCCTT	ATGTCTTGGG	CTTCACGCAT	GCTACA-ATG	GCCGGTACAA						
EF411134.1	CATGCCCTT	ATGTCTTGGG	CTTCACGCAT	GCTACA-ATG	GCCGGTACAA						
EF592577.1	CATGCCCTT	ATGTCTTGGG	CTTCACGCAT	GCTACA-ATG	GCCGGTACAA						
EU373393.1	CATGCCCTT	ATGTCTTGGG	CTTCACGCAT	GCTACA-ATG	GCCGGTACAA						
FJ876396.1	CATGCCCTT	ATGTCTTGGG	CTTCACGCAT	GCTACA-ATG	GCCGGTACAA						
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....										
	1155	1165	1175	1185	1195						
A1Ab-	AGGGCTGCGA	TACCGTAAGG	TGGAGCGAAT	CCCAAAAAGC	CGGTCTCAGT						
AY688357.1	AGGGCTGCGA	TACCGTAAGG	TGGAGCGAAT	CCCAAAAAGC	CGGTCTCAGT						
AY688361.1	AGGGCTGCGA	TACCGTAAGG	TGGAGCGAAT	CCCAAAAAGC	CGGTCTCAGT						
AY864656.1	AGGGCTGCGA	TACCGTAAGG	TGGAGCGAAT	CCCAAAAAGC	CGGTCTCAGT						
EF411134.1	AGGGCTGCGA	TACCGTAAGG	TGGAGCGAAT	CCCAAAAAGC	CGGTCTCAGT						
EF592577.1	AGGGCTGCGA	TACCGTAAGG	TGGAGCGAAT	CCCAAAAAGC	CGGTCTCAGT						
EU373393.1	AGGGCTGCGA	TACCGTAAGG	TGGAGCGAAT	CCCAAAAAGC	CGGTCTCAGT						
FJ876396.1	AGGGCTGCGA	TACCGTAAGG	TGGAGCGAAT	CCCAAAAAGC	CGGTCTCAGT						
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .										
	1205	1215	1225								
A1Ab-	TCGGATTGAG	GTCTGCAACT	CGACCTCATG	A							
AY688357.1	TCGGATTGAG	GTCTGCAACT	CGACCTCATG	A							
AY688361.1	TCGGATTGAG	GTCTGCAACT	CGACCTCATG	A							
AY864656.1	TCGAATTGAG	GTCTGCAACT	CGACCTCATG	A							
EF411134.1	TCGGATTGAG	GTCTGCAACT	CGACCTCATG	A							
EF592577.1	TCGGATTGAG	GTCTGCAACT	CGACCTCATG	A							
EU373393.1	TCGGATTGAG	GTCTGCAACT	CGACCTCATG	A							
FJ876396.1	TCGGATTGAG	GTCTGCAACT	CGACCTCATG	A							

**Apêndice B3** - Alinhamento da seqüência do rDNA 16S das cepas A3/Ska, B1/Sqa e B3/Ata identificadas como *Stenotrophomonas maltophilia* com seqüências disponíveis no banco de dados GenBank.

	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	5	15	25	35	45			
A3/Ska	TGAGGAATAC	ATCGGAATCT	ACTCTGTCGT	GGGGGATAAC	GTAGGGAAAC			
B1/Sqa	TGAGGAATAC	ATCGGAATCT	ACTCTGTCGT	GGGGGATAAC	GTAGGGAAAC			
B3/Ata	TGAGGAATAC	ATCGGAATCT	ACTCTGTCGT	GGGGGATAAC	GTAGGGAAAC			
AJ131907.1	TGAGGAATAC	ATCGGAATCT	ACTCTGTCGT	GGGGGATAAC	GTAGGGAAAC			
EU931549.1	TGAGGAATAC	ATCGGAATCT	ACTCTGTCGT	GGGGGATAAC	GTAGGGAAAC			
FN645734.1	TGAGGAATAC	ATCGGAATCT	ACTCTGTCGT	GGGGGATAAC	GTAGGGAAAC			
GQ381284.1	TGAGGAATAC	ATCGGAATCT	ACTTTTTCGT	GGGGGATAAC	GTAGGGAAAC			
	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	55	65	75	85	95			
A3/Ska	TTACGCTAAT	ACCGCATACG	ACCTACGGGT	GAAAGCAGGG	GATCTTCGGA			
B1/Sqa	TTACGCTAAT	ACCGCATACG	ACCTACGGGT	GAAAGCAGGG	GATCTTCGGA			
B3/Ata	TTACGCTAAT	ACCGCATACG	ACCTACGGGT	GAAAGCAGGG	GATCTTCGGA			
AJ131907.1	TTACGCTAAT	ACCGCATACG	ACCTACGGGT	GAAAGCAGGG	GATCTTCGGA			
EU931549.1	TTACGCTAAT	ACCGCATACG	ACCTACGGGT	GAAAGCAGGG	GATCTTCGGA			
FN645734.1	TTACGCTAAT	ACCGCATACG	ACCTACGGGT	GAAAGCAGGG	GATCTTCGGA			
GQ381284.1	TTACGCTAAT	ACCGCATACG	ACCTACGGGT	GAAAGCAGGG	GATCTTCGGA			
	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	105	115	125	135	145			
A3/Ska	CCTTGCACGA	TTGAATGAGC	CGATGTCGGA	TTAGCTAGTT	GGCGGGGTAA			
B1/Sqa	CCTTGCACGA	TTGAATGAGC	CGATGTCGGA	TTAGCTAGTT	GGCGGGGTAA			
B3/Ata	CCTTGCACGA	TTGAATGAGC	CGATGTCGGA	TTAGCTAGTT	GGCGGGGTAA			
AJ131907.1	CCTTGCACGA	TTGAATGAGC	CGATGTCGGA	TTAGCTAGTT	GGCGGGGTAA			
EU931549.1	CCTTGCACGA	TTGAATGAGC	CGATGTCGGA	TTAGCTAGTT	GGCGGGGTAA			
FN645734.1	CCTTGCACGA	TTGAATGAGC	CGATGTCGGA	TTAGCTAGTT	GGCGGGGTAA			
GQ381284.1	CCTTGCACGA	TTGAATGAGC	CGATGTCGGA	TTAGCTAGTT	GGCGGGGTAA			
	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	155	165	175	185	195			
A3/Ska	AGGCCACCA	AGGCGACGAT	CCGTAGCTGG	TCTGAGAGGA	TGATCAGCCA			
B1/Sqa	AGGCCACCA	AGGCGACGAT	CCGTAGCTGG	TCTGAGAGGA	TGATCAGCCA			
B3/Ata	AGGCCACCA	AGGCGACGAT	CCGTAGCTGG	TCTGAGAGGA	TGATCAGCCA			
AJ131907.1	AGGCCACCA	AGGCGACGAT	CCGTAGCTGG	TCTGAGAGGA	TGATCAGCCA			
EU931549.1	AGGCCACCA	AGGCGACGAT	CCGTAGCTGG	TCTGAGAGGA	TGATCAGCCA			
FN645734.1	AGGCCACCA	AGGCGACGAT	CCGTAGCTGG	TCTGAGAGGA	TGATCAGCCA			
GQ381284.1	AGGCCACCA	AGGCGACGAT	CCGTAGCTGG	TCTGAGAGGA	TGATCAGCCA			
	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	205	215	225	235	245			
A3/Ska	CACTGGAACT	GAGACACGGT	CCAGACTCCT	ACGGGAGGCA	GCAGTGGGGA			

B1/Sqa	CACTGGAAC	T GAGACACGGT	CCAGACTCCT	ACGGGAGGCA	GCAGTGGGA
B3/Ata	CACTGGAAC	T GAGACACGGT	CCAGACTCCT	ACGGGAGGCA	GCAGTGGGA
AJ131907.1	CACTGGAAC	T GAGACACGGT	CCAGACTCCT	ACGGGAGGCA	GCAGTGGGA
EU931549.1	CACTGGAAC	T GAGACACGGT	CCAGACTCCT	ACGGGAGGCA	GCAGTGGGA
FN645734.1	CACTGGAAC	T GAGACACGGT	CCAGACTCCT	ACGGGAGGCA	GCAGTGGGA
GQ381284.1	CACTGGAAC	T GAGACACGGT	CCAGACTCCT	ACGGGAGGCA	GCAGTGGGA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	255	265	275	285	295
A3/Ska	ATATTGGACA	ATGGGCGCAA	GCCTGATCCA	GCCATACCGC	GTGGGTGAAG
B1/Sqa	ATATTGGACA	ATGGGCGCAA	GCCTGATCCA	GCCATACCGC	GTGGGTGAAG
B3/Ata	ATATTGGACA	ATGGGCGCAA	GCCTGATCCA	GCCATACCGC	GTGGGTGAAG
AJ131907.1	ATATTGGACA	ATGGGCGCAA	GCCTGATCCA	GCCATACCGC	GTGGGTGAAG
EU931549.1	ATATTGGACA	ATGGGCGCAA	GCCTGATCCA	GCCATACCGC	GTGGGTGAAG
FN645734.1	ATATTGGACA	ATGGGCGCAA	GCCTGATCCA	GCCATACCGC	GTGGGTGAAG
GQ381284.1	ATATTGGACA	ATGGGCGCAA	GCCTGATCCA	GCCATACCGC	GTGGGTGAAG
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	305	315	325	335	345
A3/Ska	AAGGCCTTCG	GGTTGTAAAG	CCCTTTGTT	GGGAAAGAAA	TCCATCTGGT
B1/Sqa	AAGGCCTTCG	GGTTGTAAAG	CCCTTTGTT	GGGAAAGAAA	TCCATCTGGT
B3/Ata	AAGGCCTTCG	GGTTGTAAAG	CCCTTTGTT	GGGAAAGAAA	TCCATCTGGT
AJ131907.1	AAGGCCTTCG	GGTTGTAAAG	CCCTTTGTT	GGGAAAGAAA	TCCATCTGGT
EU931549.1	AAGGCCTTCG	GGTTGTAAAG	CCCTTTGTT	GGGAAAGAAA	TCCATCTGGC
FN645734.1	AAGGCCTTCG	GGTTGTAAAG	CCCTTTGTT	GGGAAAGAAA	TCCATCTGGT
GQ381284.1	AAGGCCTTCG	GGTTGTAAAG	CCCTTTGTT	GGGAAAGAAA	TCCAGCTGGT
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	355	365	375	385	395
A3/Ska	TAATAACCGG	GTGGGATGAC	GGTACCCAAA	GAATAAGCAC	CGGCTAACCTT
B1/Sqa	TAATAACCGG	GTGGGATGAC	GGTACCCAAA	GAATAAGCAC	CGGCTAACCTT
B3/Ata	TAATAACCGG	GTGGGATGAC	GGTACCCAAA	GAATAAGCAC	CGGCTAACCTT
AJ131907.1	TAATAACCGG	GTGGGATGAC	GGTACCCAAA	GAATAAGCAC	CGGCTAACCTT
EU931549.1	TAATAACCGG	GTGGGATGAC	GGTACCCAAA	GAATAAGCAC	CGGCTAACCTT
FN645734.1	TAATAACCGG	GTGGGATGAC	GGTACCCAAA	GAATAAGCAC	CGGCTAACCTT
GQ381284.1	TAATAACCGG	TTGGGATGAC	GGTACCCAAA	GAATAAGCAC	CGGCTAACCTT
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	405	415	425	435	445
A3/Ska	CGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA	TACGAAGGGT	GCAAGCGTTA	CTCGGAATTA
B1/Sqa	CGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA	TACGAAGGGT	GCAAGCGTTA	CTCGGAATTA
B3/Ata	CGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA	TACGAAGGGT	GCAAGCGTTA	CTCGGAATTA
AJ131907.1	CGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA	TACGAAGGGT	GCAAGCGTTA	CTCGGAATTA
EU931549.1	CGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA	TACGAAGGGT	GCAAGCGTTA	CTCGGAATTA
FN645734.1	CGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA	TACGAAGGGT	GCAAGCGTTA	CTCGGAATTA
GQ381284.1	CGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA	TACGAAGGGT	GCAAGCGTTA	CTCGGAATTA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	455	465	475	485	495
A3/Ska	CTGGGCGTAA	AGCGTGCCTA	GGTGGTCGTT	TAAGTCCGTT	GTGAAAGCCC

B1/Sqa	CTGGGCGTAA AGCGTGCCTA GGTGGTCGTT TAAGTCCGTT GTGAAAGCCC
B3/Ata	CTGGGCGTAA AGCGTGCCTA GGTGGTCGTT TAAGTCCGTT GTGAAAGCCC
AJ131907.1	CTGGGCGTAA AGCGTGCCTA GGTGGTCGTT TAAGTCCGTT GTGAAAGCCC
EU931549.1	CTGGGCGTAA AGCGTGCCTA GGTGGTCGTT TAAGTCCGTT GTGAAAGCCC
FN645734.1	CTGGGCGTAA AGCGTGCCTA GGTGGTCGTT TAAGTCCGTT GTGAAAGCCC
GQ381284.1	CTGGGCGTAA AGCGTGCCTA GGTGGTCGTT TAAGTCCGTT GTGAAAGCCC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	505 515 525 535 545
A3/Ska	TGGGCTCAAC CTGGGAAC TG CAGTGGATAC TGGGCGACTA GAATGTGGTA
B1/Sqa	TGGGCTCAAC CTGGGAAC TG CAGTGGATAC TGGGCGACTA GAATGTGGTA
B3/Ata	TGGGCTCAAC CTGGGAAC TG CAGTGGATAC TGGGCGACTA GAATGTGGTA
AJ131907.1	TGGGCTCAAC CTGGGAAC TG CAGTGGATAC TGGGCGACTA GAATGTGGTA
EU931549.1	TGGGCTCAAC CTGGGAAC TG CAGTGGATAC TGGGCGACTA GAATGTGGTA
FN645734.1	TGGGCTCAAC CTGGGAAC TG CAGTGGATAC TGGGCGACTA GAATGTGGTA
GQ381284.1	TGGGCTCAAC CTGGGAAC TG CAGTGGATAC TGGGCGACTA GAATGTGGTA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	555 565 575 585 595
A3/Ska	GAGGGTAGCG GAATTCCCTGG TGTAGCAGTG AAATGCGTAG AGATCAGGAG
B1/Sqa	GAGGGTAGCG GAATTCCCTGG TGTAGCAGTG AAATGCGTAG AGATCAGGAG
B3/Ata	GAGGGTAGCG GAATTCCCTGG TGTAGCAGTG AAATGCGTAG AGATCAGGAG
AJ131907.1	GAGGGTAGCG GAATTCCCTGG TGTAGCAGTG AAATGCGTAG AGATCAGGAG
EU931549.1	GAGGGTAGCG GAATTCCCTGG TGTAGCAGTG AAATGCGTAG AGATCAGGAG
FN645734.1	GAGGGTAGCG GAATTCCCTGG TGTAGCAGTG AAATGCGTAG AGATCAGGAG
GQ381284.1	GAGGGTAGCG GAATTCCCTGG TGTAGCAGTG AAATGCGTAG AGATCAGGAG
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	605 615 625 635 645
A3/Ska	GAACATCCAT GGCGAAGGCA GCTACCTGG A CCAACATTGA CACTGAGGCA
B1/Sqa	GAACATCCAT GGCGAAGGCA GCTACCTGG A CCAACATTGA CACTGAGGCA
B3/Ata	GAACATCCAT GGCGAAGGCA GCTACCTGG A CCAACATTGA CACTGAGGCA
AJ131907.1	GAACATCCAT GGCGAAGGCA GCTACCTGG A CCAACATTGA CACTGAGGCA
EU931549.1	GAACATCCAT GGCGAAGGCA GCTACCTGG A CCAACATTGA CACTGAGGCA
FN645734.1	GAACATCCAT GGCGAAGGCA GCTACCTGG A CCAACATTGA CACTGAGGCA
GQ381284.1	GAACATCCAT GGCGAAGGCA GCTACCTGG A CCAACATTGA CACTGAGGCA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	655 665 675 685 695
A3/Ska	CGAAAGCGTG GGGAGCAAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCCT
B1/Sqa	CGAAAGCGTG GGGAGCAAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCCT
B3/Ata	CGAAAGCGTG GGGAGCAAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCCT
AJ131907.1	CGAAAGCGTG GGGAGCAAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCCT
EU931549.1	CGAAAGCGTG GGGAGCAAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCCT
FN645734.1	CGAAAGCGTG GGGAGCAAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCCT
GQ381284.1	CGAAAGCGTG GGGAGCAAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCCT
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	705 715 725 735 745
A3/Ska	AAACGATGCG AACTGGATGT TGGGTGCAAT TTGGCACGCA GTATCGAAC

B1/Sqa	AAACGATGCG	AACTGGATGT	TGGGTGCAAT	TTGGCACGCA	GTATCGAAGC
B3/Ata	AAACGATGCG	AACTGGATGT	TGGGTGCAAT	TTGGCACGCA	GTATCGAAGC
AJ131907.1	AAACGATGCG	AACTGGATGT	TGGGTGCAAT	TTGGCACGCA	GTATCGAAGC
EU931549.1	AAACGATGCG	AACTGGATGT	TGGGTGCAAT	TTGGCACGCA	GTATCGAAGC
FN645734.1	AAACGATGCG	AACTGGATGT	TGGGTGCAAT	TTGGCACGCA	GTATCGAAGC
GQ381284.1	AAACGATGCG	AACTGGATGT	TGGGTGCAAT	TTGGCACGCA	GTATCGAAGC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	755	765	775	785	795
A3/Ska	TAACCGCGTTA	AGTTCGCCGC	CTGGGGAGTA	CGGTCGCAAG	ACTGAAACTC
B1/Sqa	TAACCGCGTTA	AGTTCGCCGC	CTGGGGAGTA	CGGTCGCAAG	ACTGAAACTC
B3/Ata	TAACCGCGTTA	AGTTCGCCGC	CTGGGGAGTA	CGGTCGCAAG	ACTGAAACTC
AJ131907.1	TAACCGCGTTA	AGTTCGCCGC	CTGGGGAGTA	CGGTCGCAAG	ACTGAAACTC
EU931549.1	TAACCGCGTTA	AGTTCGCCGC	CTGGGGAGTA	CGGTCGCAAG	ACTGAAACTC
FN645734.1	TAACCGCGTTA	AGTTCGCCGC	CTGGGGAGTA	CGGTCGCAAG	ACTGAAACTC
GQ381284.1	TAACCGCGTTA	AGTTCGCCGC	CTGGGGAGTA	CGGTCGCAAG	ACTGAAACTC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	805	815	825	835	845
A3/Ska	AAAGGAATTG	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGTATGT	GGTTAAC
B1/Sqa	AAAGGAATTG	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGTATGT	GGTTAAC
B3/Ata	AAAGGAATTG	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGTATGT	GGTTAAC
AJ131907.1	AAAGGAATTG	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGTATGT	GGTTAAC
EU931549.1	AAAGGAATTG	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGTATGT	GGTTAAC
FN645734.1	AAAGGAATTG	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGTATGT	GGTTAAC
GQ381284.1	AAAGGAATTG	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGTATGT	GGTTAAC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	855	865	875	885	895
A3/Ska	GATGCAACGC	GAAGAAC	ACCTGGC	GACATGTC	GAAC
B1/Sqa	GATGCAACGC	GAAGAAC	ACCTGGC	GACATGTC	GAAC
B3/Ata	GATGCAACGC	GAAGAAC	ACCTGGC	GACATGTC	GAAC
AJ131907.1	GATGCAACGC	GAAGAAC	ACCTGGC	GACATGTC	GAAC
EU931549.1	GATGCAACGC	GAAGAAC	ACCTGGC	GACATGTC	GAAC
FN645734.1	GATGCAACGC	GAAGAAC	ACCTGGC	GACATGTC	GAAC
GQ381284.1	GATGCAACGC	GAAGAAC	ACCTGGC	GACATGTC	GAAC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	905	915	925	935	945
A3/Ska	GAGATGGATT	GGTGCCTTCG	GGAACTCGAA	CACAGGTGCT	GCATGGCTGT
B1/Sqa	GAGATGGATT	GGTGCCTTCG	GGAACTCGAA	CACAGGTGCT	GCATGGCTGT
B3/Ata	GAGATGGATT	GGTGCCTTCG	GGAACTCGAA	CACAGGTGCT	GCATGGCTGT
AJ131907.1	GAGATGGATT	GGTGCCTTCG	GGAACTCGAA	CACAGGTGCT	GCATGGCTGT
EU931549.1	GAGATGGATT	GGTGCCTTCG	GGAACTCGAA	CACAGGTGCT	GCATGGCTGT
FN645734.1	GAGATGGATT	GGTGCCTTCG	GGAACTCGAA	CACAGGTGCT	GCATGGCTGT
GQ381284.1	GAGATGGATT	GGTGCCTTCG	GGAACTCGAA	CACAGGTGCT	GCATGGCTGT
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	955	965	975	985	995
A3/Ska	CGTCAGCTCG	TGTCGTGAGA	TGTTGGGTTA	AGTCCCCCAA	CGAGCGAAC

B1/Sqa	CGTCAGCTCG	TGTCGTGAGA	TGTTGGGTTA	AGTCCCGCAA	CGAGCGCAAC
B3/Ata	CGTCAGCTCG	TGTCGTGAGA	TGTTGGGTTA	AGTCCCGCAA	CGAGCGCAAC
AJ131907.1	CGTCAGCTCG	TGTCGTGAGA	TGTTGGGTTA	AGTCCCGCAA	CGAGCGCAAC
EU931549.1	CGTCAGCTCG	TGTCGTGAGA	TGTTGGGTTA	AGTCCCGCAA	CGAGCGCAAC
FN645734.1	CGTCAGCTCG	TGTCGTGAGA	TGTTGGGTTA	AGTCCCGCAA	CGAGCGCAAC
GQ381284.1	CGTCAGCTCG	TGTCGTGAGA	TGTTGGGTTA	AGTCCCGCAA	CGAGCGCAAC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	1005	1015	1025	1035	1045
A3/Ska	CCTTGTCCCTT	AGTTGCCAGC	ACGTAATGGT	GGGAACCTCTA	AGGAGACCAGC
B1/Sqa	CCTTGTCCCTT	AGTTGCCAGC	ACGTAATGGT	GGGAACCTCTA	AGGAGACCAGC
B3/Ata	CCTTGTCCCTT	AGTTGCCAGC	ACGTAATGGT	GGGAACCTCTA	AGGAGACCAGC
AJ131907.1	CCTTGTCCCTT	AGTTGCCAGC	ACGTAATGGT	GGGAACCTCTA	AGGAGACCSC
EU931549.1	CCTTGTCCCTT	AGTTGCCAGC	ACGTAATGGT	GGGAACCTCTA	AGGAGACCAGC
FN645734.1	CCTTGTCCCTT	AGTTGCCAGC	ACGTAATGGT	GGGAACCTCTA	AGGAGACCAGC
GQ381284.1	CCTTGTCCCTT	AGTTGCCAGC	ACGTAATGGT	GGGAACCTCTA	AGGAGACCAGC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	1055	1065	1075	1085	1095
A3/Ska	CGGTGACAAA	CCGGAGGAAG	GTGGGGATGA	CGTCAAGTCA	TCATGGCCCT
B1/Sqa	CGGTGACAAA	CCGGAGGAAG	GTGGGGATGA	CGTCAAGTCA	TCATGGCCCT
B3/Ata	CGGTGACAAA	CCGGAGGAAG	GTGGGGATGA	CGTCAAGTCA	TCATGGCCCT
AJ131907.1	CGGTGACAAA	CCGGAGGAAG	GTGGGGATGA	CGTCAAGTCA	TCATGGCCCT
EU931549.1	CGGTGACAAA	CCGGAGGAAG	GTGGGGATGA	CGTCAAGTCA	TCATGGCCCT
FN645734.1	CGGTGACAAA	CCGGAGGAAG	GTGGGGATGA	CGTCAAGTCA	TCATGGCCCT
GQ381284.1	CGGTGACAAA	CCGGAGGAAG	GTGGGGATGA	CGTCAAGTCA	TCATGGCCCT
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	1105	1115	1125	1135	1145
A3/Ska	TACGGCCAGG	GCTACACACG	TACTACAATG	GTAGGGACAG	AGGGCTGCAA
B1/Sqa	TACGGCCAGG	GCTACACACG	TACTACAATG	GTAGGGACAG	AGGGCTGCAA
B3/Ata	TACGGCCAGG	GCTACACACG	TACTACAATG	GTAGGGACAG	AGGGCTGCAA
AJ131907.1	TACGGCCAGG	GCTACACACG	TACTACAATG	GTAGGGACAG	AGGGCTGCAA
EU931549.1	TACGGCCAGG	GCTACACACG	TACTACAATG	GTAGGGACAG	AGGGCTGCAA
FN645734.1	TACGGCCAGG	GCTACACACG	TACTACAATG	GTAGGGACAG	AGGGCTGCAA
GQ381284.1	TACGGCCAGG	GCTACACACG	TACTACAATG	GTAGGGACAG	AGGGCTGCAA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	1155	1165	1175	1185	1195
A3/Ska	GCCGGCGACG	GTAAGCCAAT	CCCAGAAACC	CTATCTCAGT	CCGGATTGGA
B1/Sqa	GCCGGCGACG	GTAAGCCAAT	CCCAGAAACC	CTATCTCAGT	CCGGATTGGA
B3/Ata	GCCGGCGACG	GTAAGCCAAT	CCCAGAAACC	CTATCTCAGT	CCGGATTGGA
AJ131907.1	GCCGGCGACG	GTAAGCCAAT	CCCAGAAACC	CTATCTCAGT	CCGGATTGGA
EU931549.1	GCCGGCGACG	GTAAGCCAAT	CCCAGAAACC	CTATCTCAGT	CCGGATTGGA
FN645734.1	GCCGGCGACG	GTAAGCCAAT	CCCAGAAACC	CTATCTCAGT	CCGGATTGGA
GQ381284.1	GCCGGCGACG	GTAAGCCAAT	CCCAGAAACC	CTATCTCAGT	CCGGATTGGA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	1205	1215	1225	1235	
A3/Ska	GTCTGCAACT	CGACTCCATG	AAGTCGGAAT	CGCTA	

B1/Sqa	GTCTGCAACT CGACTCCATG AAGTCGGAAT CGCTA
B3/Ata	GTCTGCAACT CGACTCCATG AAGTCGGAAT CGCTA
AJ131907.1	GTCTGCAACT CGACTCCATG AAGTCGGAAT CGCTA
EU931549.1	GTCTGCAACT CGACTCCATG AAGTCGGAAT CGCTA
FN645734.1	GTCTGCAACT CGACTCCATG AAGTCGGAAT CGCTA
GQ381284.1	GTCTGCAACT CGACTCCATG AAGTCGGAAT CGCTA

**Apêndice B4 - Alinhamento da seqüência do rDNA 16S das cepas A3/Ag, B1/Sq, B3/At, A3/Sk, B3/Au, B3/Sw e B3/Sx identificada como *Pseudomonas* sp. com seqüências disponíveis no banco de dados *GenBank*.**

	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	5                15                25                35                45
A3/Ag-	GC GGCGGACG GGTGAGTAAT GCCTAGGAAT CTGCCTGGTA GTGGGGGACA
A3/Sk-	GC GGCGGACG GGTGAGTAAT GCCTAGGAAT CTGCCTGGTA GTGGGGGACA
B1/Sq-	GC GGCGGACG GGTGAGTWAT GCCTAGGAAT CTGCCTGGTA GTGGGGGACA
B3/At-	GC GGCGGACG GGTGAGTAAT GCCTAGGAAT CTGCCTGGTA GTGGGGGACA
B3/Au-	GC GGCGGACG GGTGAGTAAT GCCTAGGAAT CTGCCTGGTA GTGGGGGACA
B3/Sw-	GC GGCGGACG GGTGAGTAAT GCCTAGGAAT CTGCCTGGTA GTGGGGGATA
B3/Sx-	GC GGCGGACG GGTGAGTAAT GCCTAGGAAT CTGCCTGGTA GTGGGGGACA
AF094738.1	GC GGCGGACG GGTGAGTAAT GCCTAGGAAT CTGCCTGGTA GTGGGGGATA
AM410631.1	GC GGCGGACG GGTGAGTAAT GCCTAGGAAT CTGCCTGGTA GTGGGGGACA
AY880843.1	GC GGCGGACG GGTGAGTAAT GCCTAGGAAT CTGCCTGGTA GTGGGGGACA
DQ402053.1	GC GGCGGACG GGTGAGTAAT GCCTAGGAAT CTGCCTGGTA GTGGGGGACA
DQ411818.1	GC GGCGGACG GGTGAGTAAT GCCTAGGAAT CTGCCTGGTA GTGGGGGACA
DQ453823.1	GC GGCGGACG GGTGAGTAAT GCCTAGGAAT CTGCCTGGTA GTGGGGGATA
EF672049.1	GC GGCGGACG GGTGAGTAAT GCCTAGGAAT CTGCCTGGTA GTGGGGGACA
EU680989.1	GC GGCGGACG GGTGAGTAAT GCCTAGGAAT CTGCCTGGTA GTGGGGGACA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	55                65                75                85                95
A3/Ag-	AC GTTTCGAA AGGAACGCTA ATACCGCATA CGTCCTACGG GAGAAAGCAG
A3/Sk-	AC GTTTCGAA AGGAACGCTA ATACCGCATA CGTCCTACGG GAGAAAGCAG
B1/Sq-	AC GTTTCGAA AGGAACGCTA ATACCGCATA CGTCCTACGG GAGAAAGCAG
B3/At-	AC GTTTCGAA AGGAACGCTA ATACCGCATA CGTCCTACGG GAGAAAGCAG
B3/Au-	AC GTTTCGAA AGGAACGCTA ATACCGCATA CGTCCTACGG GAGAAAGCAG
B3/Sw-	AC GTTTCGAA ACGAACGCTA ATACCGCATA CGTCCTACGG GAGAAAGCAG
B3/Sx-	AC GTTTCGAA AGGAACGCTA ATACCGCATA CGTCCTACGG GAGAAAGCAG
AF094738.1	AC GTTTCGAA ACGAACGCTA ATACCGCATA CGTCCTACGG GAGAAAGCAG
AM410631.1	AC GTTTCGAA AGGAACGCTA ATACCGCATA CGTCCTACGG GAGAAAGCAG
AY880843.1	AC GTTTCGAA AGGAACGCTA ATACCGCATA CGTCCTACGG GAGAAAGCAG
DQ402053.1	AC GTTTCGAA AGGAACGCTA ATACCGCATA CGTCCTACGG GAGAAAGCAG
DQ411818.1	AC GTTTCGAA AGGAACGCTA ATACCGCATA CGTCCTACGG GAGAAAGCAG
DQ453823.1	AC GTTTCGAA ACGAACGCTA ATACCGCATA CGTCCTACGG GAGAAAGCAG
EF672049.1	AC GTTTCGAA AGGAACGCTA ATACCGCATA CGTCCTACGG GAGAAAGCAG
EU680989.1	AC GTTTCGAA AGGAACGCTA ATACCGCATA CGTCCTACGG GAGAAAGCAG
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	105                115                125                135                145
A3/Ag-	GGGACCTTCG GGCCTTGCGC TATCAGATGA GCCTAGGTCG GATTAGCTAG
A3/Sk-	GGGACCTTCG GGCCTTGCGC TATCAGATGA GCCTAGGTCG GATTAGCTAG
B1/Sq-	GGGACCTTCG GGCCTTGCGC TATCAGATGA GCCTAGGTCG GATTAGCTAG
B3/At-	GGGACCTTCG GGCCTTGCGC TATCAGATGA GCCTAGGTCG GATTAGCTAG

B3/Au-	GGGACCTTCG	GGCCTTGC	TATCAGATGA	GCCTAGGTCG	GATTAGCTAG
B3/Sw-	GGGACCTTCG	GGCCTTGC	TATCAGATGA	GCCTAGGTCG	GATTAGCTAG
B3/Sx-	GGGACCTTCG	GGCCTTGC	TATCAGATGA	GCCTAGGTCG	GATTAGCTAG
AF094738.1	GGGACCTTCG	GGCCTTGC	TATCAGATGA	GCCTAGGTCG	GATTAGCTAG
AM410631.1	GGGACCTTCG	GGCCTTGC	TATCAGATGA	GCCTAGGTCG	GATTAGCTAG
AY880843.1	GGGACCTTCG	GGCCTTGC	TATCAGATGA	GCCTAGGTCG	GATTAGCTAG
DQ402053.1	GGGACCTTCG	GGCCTTGC	TATCAGATGA	GCCTAGGTCG	GATTAGCTAG
DQ411818.1	GGGACCTTCG	GGCCTTGC	TATCAGATGA	GCCTAGGTCG	GATTAGCTAG
DQ453823.1	GGGACCTTCG	GGCCTTGC	TATCAGATGA	GCCTAGGTCG	GATTAGCTAG
EF672049.1	GGGACCTTCG	GGCCTTGC	TATCAGATGA	GCCTAGGTCG	GATTAGCTAG
EU680989.1	GGGACCTTCG	GGCCTTGC	TATCAGATGA	GCCTAGGTCG	GATTAGCTAG
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	155	165	175	185	195
A3/Ag-	TTGGTGAGGT	AATGGCTCAC	CAAGGCGACG	ATCCGTAACT	GGTCTGAGAG
A3/Sk-	TTGGTGAGGT	AATGGCTCAC	CAAGGCGACG	ATCCGTAACT	GGTCTGAGAG
B1/Sq-	TTGGTGAGGT	AATGGCTCAC	CAAGGCGACG	ATCCGTAACT	GGTCTGAGAG
B3/At-	TTGGTGRGGT	AATGGCTCAC	CAAGGCGACG	ATCCGTAACT	GGTCTGAGAG
B3/Au-	TTGGTGAGGT	AATGGCTCAC	CAAGGCGACG	ATCCGTAACT	GGTCTGAGAG
B3/Sw-	TTGGTGAGGT	AATGGCTCAC	CAAGGCGACG	ATCCGTAACT	GGTCTGAGAG
B3/Sx-	TTGGTGAGGT	AATGGCTCAC	CAAGGCGACG	ATCCGTAACT	GGTCTGAGAG
AF094738.1	TTGGTGAGGT	AATGGCTCAC	CAAGGCGACG	ATCCGTAACT	GGTCTGAGAG
AM410631.1	TTGGTGAGGT	AATGGCTCAC	CAAGGCGACG	ATCCGTAACT	GGTCTGAGAG
AY880843.1	TTGGTGAGGT	AATGGCTCAC	CAAGGCGACG	ATCCGTAACT	GGTCTGAGAG
DQ402053.1	TTGGTGAGGT	AATGGCTCAC	CAAGGCGACG	ATCCGTAACT	GGTCTGAGAG
DQ411818.1	TTGGTGAGGT	AATGGCTCAC	CAAGGCGACG	ATCCGTAACT	GGTCTGAGAG
DQ453823.1	TTGGTGAGGT	AATGGCTCAC	CAAGGCGACG	ATCCGTAACT	GGTCTGAGAG
EF672049.1	TTGGTGAGGT	AATGGCTCAC	CAAGGCGACG	ATCCGTAACT	GGTCTGAGAG
EU680989.1	TTGGTGAGGT	AATGGCTCAC	CAAGGCGACG	ATCCGTAACT	GGTCTGAGAG
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	205	215	225	235	245
A3/Ag-	GATGATCAGT	CACACTGGAA	CTGAGACACG	GTCCAGACTC	CTACGGGAGG
A3/Sk-	GATGATCAGT	CACACTGGAA	CTGAGACACG	GTCCAGACTC	CTACGGGAGG
B1/Sq-	GATGATCAGT	CACACTGGAA	CTGAGACACG	GTCCAGACTC	CTACGGGAGG
B3/At-	GATGATCAGT	CACACTGGAA	CTGAGACACG	GTCCAGACTC	CTACGGGAGG
B3/Au-	GATGATCAGT	CACACTGGAA	CTGAGACACG	GTCCAGACTC	CTACGGGAGG
B3/Sw-	GATGATCAGT	CACACTGGAA	CTGAGACACG	GTCCAGACTC	CTACGGGAGG
B3/Sx-	GATGATCAGT	CACACTGGAA	CTGAGACACG	GTCCAGACTC	CTACGGGAGG
AF094738.1	GATGATCAGT	CACACTGGAA	CTGAGACACG	GTCCAGACTC	CTACGGGAGG
AM410631.1	GATGATCAGT	CACACTGGAA	CTGAGACACG	GTCCAGACTC	CTACGGGAGG
AY880843.1	GATGATCAGT	CACACTGGAA	CTGAGACACG	GTCCAGACTC	CTACGGGAGG
DQ402053.1	GATGATCAGT	CACACTGGAA	CTGAGACACG	GTCCAGACTC	CTACGGGAGG
DQ411818.1	GATGATCAGT	CACACTGGAA	CTGAGACACG	GTCCAGACTC	CTACGGGAGG
DQ453823.1	GATGATCAGT	CACACTGGAA	CTGAGACACG	GTCCAGACTC	CTACGGGAGG
EF672049.1	GATGATCAGT	CACACTGGAA	CTGAGACACG	GTCCAGACTC	CTACGGGAGG
EU680989.1	GATGATCAGT	CACACTGGAA	CTGAGACACG	GTCCAGACTC	CTACGGGAGG
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	255	265	275	285	295

A3/Ag-	CAGCAGTGGG	GAATATTGGA	CAATGGCGA	AAGCCTGATC	CAGCCATGCC
A3/Sk-	CAGCAGTGGG	GAATATTGGA	CAATGGCGA	AAGCCTGATC	CAGCCATGCC
B1/Sq-	CAGCAGTGGG	GAATATTGGA	CAATGGCGA	AAGCCTGATC	CAGCCATGCC
B3/At-	CAGCAGTGGG	GAATATTGGA	CAATGGCGA	AAGCCTGATC	CAGCCATGCC
B3/Au-	CAGCAGTGGG	GAATATTGGA	CAATGGCGA	AAGCCTGATC	CAGCCATGCC
B3/Sw-	CAGCAGTGGG	GAATATTGGA	CAATGGCGA	AAGCCTGATC	CAGCCATGCC
B3/Sx-	CAGCAGTGGG	GAATATTGGA	CAATGGCGA	AAGCCTGATC	CAGCCATGCC
AF094738.1	CAGCAGTGGG	GAATATTGGA	CAATGGCGA	AAGCCTGATC	CAGCCATGCC
AM410631.1	CAGCAGTGGG	GAATATTGGA	CAATGGCGA	AAGCCTGATC	CAGCCATGCC
AY880843.1	CAGCAGTGGG	GAATATTGGA	CAATGGCGA	AAGCCTGATC	CAGCCATGCC
DQ402053.1	CAGCAGTGGG	GAATATTGGA	CAATGGCGA	AAGCCTGACC	CAGCCATGCC
DQ411818.1	CAGCAGTGGG	GAATATTGGA	CAATGGCGA	AAGCCTGATC	CAGCCATGCC
DQ453823.1	CAGCAGTGGG	GAATATTGGA	CAATGGCGA	AAGCCTGATC	CAGCCATGCC
EF672049.1	CAGCAGTGGG	GAATATTGGA	CAATGGCGA	AAGCCTGATC	CAGCCATGCC
EU680989.1	CAGCAGTGGG	GAATATTGGA	CAATGGCGA	AAGCCTGATC	CAGCCATGCC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	305	315	325	335	345
A3/Ag-	GCGTGTGTGA	AGAAGGTCTT	CGGATTGTAA	AGCACTTTAA	GTTGGGAGGA
A3/Sk-	GCGTGTGTGA	AGAAGGTCTT	CGGATTGTAA	AGCACTTTAA	GTTGGGAGGA
B1/Sq-	GCGTGTGTGA	AGAAGGTCTT	CGGATTGTAA	AGCACTTTAA	GTTGGGAGGA
B3/At-	GCGTGTGTGA	AGAAGGTCTT	CGGATTGTAA	AGCACTTTAA	GTTGGGAGGA
B3/Au-	GCGTGTGTGA	AGAAGGTCTT	CGGATTGTAA	AGCACTTTAA	GTTGGGAGGA
B3/Sw-	GCGTGTGTGA	AGAAGGTCTT	CGGATTGTAA	AGCACTTTAA	GTTGGGAGGA
B3/Sx-	GCGTGTGTGA	AGAAGGTCTT	CGGATTGTAA	AGCACTTTAA	GTTGGGAGGA
AF094738.1	GCGTGTGTGA	AGAAGGTCTT	CGGATTGTAA	AGCACTTTAA	GTTGGGAGGA
AM410631.1	GCGTGTGTGA	AGAAGGTCTT	CGGATTGTAA	AGCACTTTAA	GTTGGGAGGA
AY880843.1	GCGTGTGTGA	AGAAGGTCTT	CGGATTGTAA	AGCACTTTAA	GTTGGGAGGA
DQ402053.1	GCGTGTGTGA	AGAAGGTCTT	CGGATTGTAA	AGCACTTTAA	GTTGGGAGGA
DQ411818.1	GCGTGTGTGA	AGAAGGTCTT	CGGATTGTAA	AGCACTTTAA	GTTGGGAGGA
DQ453823.1	GCGTGTGTGA	AGAAGGTCTT	CGGATTGTAA	AGCACTTTAA	GTTGGGAGGA
EF672049.1	GCGTGTGTGA	AGAAGGTCTT	CGGATTGTAA	AGCACTTTAA	GTTGGGAGGA
EU680989.1	GCGTGTGTGA	AGAAGGTCTT	CGGATTGTAA	AGCACTTTAA	GTTGGGAGGA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	355	365	375	385	395
A3/Ag-	AGGGTTGTAG	ATTAATACTC	TGCAATTTCG	ACGTTACCGA	CAGAATAAGC
A3/Sk-	AGGGTTGTAG	ATTAATACTC	TGCAATTTCG	ACGTTACCGA	CAGAATAAGC
B1/Sq-	AGGGTTGTAG	ATTAATACTC	TGCAATTTCG	ACGTTACCGA	CAGAATAAGC
B3/At-	AGGGTTGTAG	ATTAATACTC	TGCAATTTCG	ACGTTACCGA	CAGAATAAGC
B3/Au-	AGGGTTGTAG	ATTAATACTC	TGCAATTTCG	ACGTTACCGA	CAGAATAAGC
B3/Sw-	AGGGTTGTAG	ATTAATACTC	TGCAATTTCG	ACGTTACCGA	CAGAATAAGC
B3/Sx-	AGGGTTGTAG	ATTAATACTC	TGCAATTTCG	ACGTTACCGA	CAGAATAAGC
AF094738.1	AGGGTTGTAG	ATTAATACTC	TGCAATTTCG	ACGTTACCGA	CAGAATAAGC
AM410631.1	AGGGTTGTAG	ATTAATACTC	TGCAATTTCG	ACGTTACCGA	CAGAATAAGC
AY880843.1	AGGGTTGTAG	ATTA-TACTC	TGCAATTTCG	ACGTTACCGA	CAGAATAAGC
DQ402053.1	AGGGTTGTAG	ATTAATACTC	TGCAATTTCG	ACGTTACCGA	CAGAATAAGC
DQ411818.1	AGGGTTGTAG	ATTAATACTC	TGCAATTTCG	ACGTTACCGA	CAGAATAAGC
DQ453823.1	AGGGTTGTAG	ATTAATACTC	TGCAATTTCG	ACGTTACCGA	CAGAATAAGC
EF672049.1	AGGGTTGTAG	ATTAATACTC	TGCAATTTCG	ACGTTACCGA	CAGAATAAGC

EU680989.1	AGGGTTGTAG ATTAATACTC TGCAATTTG ACGTTACCGA CAGAATAAGC ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....  405 415 425 435 445
A3/Ag-	ACCGGCTAAC TCTGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACAGAGG GTGCAAGCGT
A3/Sk-	ACCGGCTAAC TCTGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACAGAGG GTGCAAGCGT
B1/Sq-	ACCGGCTAAC TCTGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACAGAGG GTGCAAGCGT
B3/At-	ACCGGCTAAC TCTGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACAGAGG GTGCAAGCGT
B3/Au-	ACCGGCTAAC TCTGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACAGAGG GTGCAAGCGT
B3/Sw-	ACCGGCTAAC TCTGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACAGAGG GTGCAAGCGT
B3/Sx-	ACCGGCTAAC TCTGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACAGAGG GTGCAAGCGT
AF094738.1	ACCGGCTAAC TCTGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACAGAGG GTGCAAGCGT
AM410631.1	ACCGGCTAAC TCTGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACAGAGG GTGCAAGCGT
AY880843.1	ACCGGCTAAC TCTGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACAGAGG GTGCAAGCGT
DQ402053.1	ACCGGCTAAC TCTGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACAGAGG GTGCAAGCGT
DQ411818.1	ACCGGCTAAC TCTGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACAGAGG GTGCAAGCGT
DQ453823.1	ACCGGCTAAC TCTGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACAGAGG GTGCAAGCGT
EF672049.1	ACCGGCTAAC TCTGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACAGAGG GTGCAAGCGT
EU680989.1	ACCGGCTAAC TCTGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACAGAGG GTGCAAGCGT ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....  455 465 475 485 495
A3/Ag-	TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGGTTT GTTAAGTTGG
A3/Sk-	TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGGTT TAGGTGGTT TAGGTGGTT GTTAAGTTGR
B1/Sq-	TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGGTT TAGGTGGTT GTTAAGTTGR
B3/At-	TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGGTT TAGGTGGTT GTTAAGTTGG
B3/Au-	TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGGTT TAGGTGGTT GTTAAGTTGG
B3/Sw-	TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGGTT TAGGTGGTT GTTAAGTTGG
B3/Sx-	TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGGTT TAGGTGGTT GTTAAGTTGG
AF094738.1	TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGGTT TAGGTGGTT GTTAAGTTGG
AM410631.1	TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGGTT TAGGTGGTT GTTAAGTTGG
AY880843.1	TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGGTT TAGGTGGTT GTTAAGTTGG
DQ402053.1	TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGGTT TAGGTGGTT GTTAAGTTGG
DQ411818.1	TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGGTT TAGGTGGTT GTTAAGTTGG
DQ453823.1	TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGGTT TAGGTGGTT GTTAAGTTGG
EF672049.1	TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGGTT TAGGTGGTT GTTAAGTTGG
EU680989.1	TAATCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGGTT TAGGTGGTT GTTAAGTTGG ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....  505 515 525 535 545
A3/Ag-	ATGTGAAATC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC TGCAATCCAAA ACTGGCAAGC
A3/Sk-	ATGTGAAATC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC TGCAATCCAAA ACTGGCGAGC
B1/Sq-	ATGTGAAATC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC TGCAATCCAAA ACTGGCGAGC
B3/At-	ATGTGAAATC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC TGCAATCCAAA ACTGGCGAGC
B3/Au-	ATGTGAAATC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC TGCAATCCAAA ACTGGCAAGC
B3/Sw-	ATGTGAAAGC CCCGGGCTTA ACCTGGGAAC TGCAATTCAA ACTGACGAGC
B3/Sx-	ATGTGAAAGC CCCGGGCTTA ACCTGGGAAC TGCAATTCAA ACTGACGAGC
AF094738.1	ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC TGCAATTCAA ACTGACGAGC
AM410631.1	ATGTGAAATC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC TGCAATCCAAA ACTGGCAAGC
AY880843.1	ATGTGAAATC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC TGCAATCCAAA ACTGGCAAGC

DQ402053.1	ATGTGAAATC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC TGCATCCAAA ACTGGCAAGC
DQ411818.1	ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC TGCATTCAAA ACTGACGAGC
DQ453823.1	ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC TGCATTCAAA ACTGTCGAGC
EF672049.1	ATGTGAAATC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC TGCATCCAAA ACTGGCGAGC
EU680989.1	ATGTGAAATC CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC TGCATCCAAA ACTGGCAAGC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	555 565 575 585 595
A3/Ag-	TAGAGTATGG TAGAGGGTGG TGGAATTTC TGTGTAGCGG TGAAATGCGT
A3/Sk-	TAGAGTATGG TAGAGGGTGG TGGAATTTC TGTGTAGCGG TGAAATGCGT
B1/Sq-	TAGAGTATGG TAGAGGGTGG TGGAATTTC TGTGTAGCGG TGAAATGCGT
B3/At-	TAGAGTATGG TAGAGGGTGG TGGAATTTC TGTGTAGCGG TGAAATGCGT
B3/Au-	TAGAGTATGG TAGAGGGTGG TGGAATTTC TGTGTAGCGG TGAAATGCGT
B3/Sw-	TAGAGTATGG TAGAGGGTGG TGGAATTTC TGTGTAGCGG TGAAATGCGT
B3/Sx-	TAGAGTATGG TAGAGGGTGG TGGAATTTC TGTGTAGCGG TGAAATGCGT
AF094738.1	TAGAGTATGG TAGAGGGTGG TGGAATTTC TGTGTAGCGG TGAAATGCGT
AM410631.1	TAGAGTATGG TAGAGGGTGG TGGAATTTC TGTGTAGCGG TGAAATGCGT
AY880843.1	TAGAGTATGG TAGAGGGTGG TGGAATTTC TGTGTAGCGG TGAAATGCGT
DQ402053.1	TAGAGTATGG TAGAGGGTGG TGGAATTTC TGTGTAGCGG TGAAATGCGT
DQ411818.1	TAGAGTATGG TAGAGGGTGG TGGAATTTC TGTGTAGCGG TGAAATGCGT
DQ453823.1	TAGAGTATGG TAGAGGGTGG TGGAATTTC TGTGTAGCGG TGAAATGCGT
EF672049.1	TAGAGTATGG TAGAGGGTGG TGGAATTTC TGTGTAGCGG TGAAATGCGT
EU680989.1	TAGAGTATGG TAGAGGGTGG TGGAATTTC TGTGTAGCGG TGAAATGCGT
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	605 615 625 635 645
A3/Ag-	AGATATAGGA AGGAACACCA GTGGCGAAGG CGACCACCTG GACTGATACT
A3/Sk-	AGATATAGGA AGGAACACCA GTGGCGAAGG CGACCACCTG GACTGATACT
B1/Sq-	AGATATAGGA AGGAACACCA GTGGCGAAGG CGACCACCTG GACTGATACT
B3/At-	AGATATAGGA AGGAACACCA GTGGCGAAGG CGACCACCTG GACTGATACT
B3/Au-	AGATATAGGA AGGAACACCA GTGGCGAAGG CGACCACCTG GACTGATACT
B3/Sw-	AGATATAGGA AGGAACACCA GTGGCGAAGG CGACCACCTG GACTGATACT
B3/Sx-	AGATATAGGA AGGAACACCA GTGGCGAAGG CGACCACCTG GACTGATACT
AF094738.1	AGATATAGGA AGGAACACCA GTGGCGAAGG CGACCACCTG GACTGATACT
AM410631.1	AGATATAGGA AGGAACACCA GTGGCGAAGG CGACCACCTG GACTGATACT
AY880843.1	AGATATAGGA AGGAACACCA GTGGCGAAGG CGACCACCTG GACTGATACT
DQ402053.1	AGATATAGGA AGGAACACCA GTGGCGAAGG CGACCACCTG GACTGATACT
DQ411818.1	AGATATAGGA AGGAACACCA GTGGCGAAGG CGACCACCTG GACTGATACT
DQ453823.1	AGATATAGGA AGGAACACCA GTGGCGAAGG CGACCACCTG GACTGATACT
EF672049.1	AGATATAGGA AGGAACACCA GTGGCGAAGG CGACCACCTG GACTGATACT
EU680989.1	AGATATAGGA AGGAACACCA GTGGCGAAGG CGACCACCTG GACTGATACT
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	655 665 675 685 695
A3/Ag-	GACACTGAGG TGCGAAAGCG TGGGGAGCAA ACAGGATTAG ATACCCTGGT
A3/Sk-	GACACTGAGG TGCGAAAGCG TGGGGAGCAA ACAGGATTAG ATACCCTGGT
B1/Sq-	GACACTGAGG TGCGAAAGCG TGGGGAGCAA ACAGGATTAG ATACCCTGGT
B3/At-	GACACTGAGG TGCGAAAGCG TGGGGAGCAA ACAGGATTAG ATACCCTGGT
B3/Au-	GACACTGAGG TGCGAAAGCG TGGGGAGCAA ACAGGATTAG ATACCCTGGT
B3/Sw-	GACACTGAGG TGCGAAAGCG TGGGGAGCAA ACAGGATTAG ATACCCTGGT

B3/Sx-	GACACTGAGG	TGCGAAAGCG	TGGGGAGCAA	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT
AF094738.1	GACACTGAGG	TGCGAAAGCG	TGGGGAGCAA	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT
AM410631.1	GACACTGAGG	TGCGAAAGCG	TGGGGAGCAA	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT
AY880843.1	GACACTGAGG	TGCGAAAGCG	TGGGGAGCAA	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT
DQ402053.1	GACACTGAGG	TGCGAAAGCG	TGGGGAGCAA	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT
DQ411818.1	GACACTGAGG	TGCGAAAGCG	TGGGGAGCAA	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT
DQ453823.1	GACACTGAGG	TGCGAAAGCG	TGGGGAGCAA	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT
EF672049.1	GACACTGAGG	TGCGAAAGCG	TGGGGAGCAA	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT
EU680989.1	GACACTGAGG	TGCGAAAGCG	TGGGGAGCAA	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	705	715	725	735	745
A3/Ag-	AGTCCACGCC	GTAAACGATG	TCAACTAGCC	GTTGGGAGCC	TTGAGCTCTT
A3/Sk-	AGTCCACGCC	GTAAACGATG	TCAACTAGCC	GTTGGGAGCC	TTGAGCTCTT
B1/Sq-	AGTCCACGCC	GTAAACGATG	TCAACTAGCC	GTTGGGAGCC	TTGAGCTCTT
B3/At-	AGTCCACGCC	GTAAACGATG	TCAACTAGCC	GTTGGGAGCC	TTGAGCTCTT
B3/Au-	AGTCCACGCC	GTAAACGATG	TCAACTAGCC	GTTGGGAGCC	TTGAGCTCTT
B3/Sw-	AGTCCACGCC	GTAAACGATG	TCAACTAGCC	GTTGGGAGCC	TTGAGCTCTT
B3/Sx-	AGTCCACGCC	GTAAACGATG	TCAACTAGCC	GTTGGGAGCC	TTGAGCTCTT
AF094738.1	AGTCCACGCC	GTAAACGATG	TCAACTAGCC	GTTGGAATCC	TTGAGATTTT
AM410631.1	AGTCCACGCC	GTAAACGATG	TCAACTAGCC	GTTGGGAGCC	TTGAGCTCTT
AY880843.1	AGTCCACGCC	GTAAACGATG	TCAACTAGCC	GTTGGGAGCC	TTGAGCTCTT
DQ402053.1	AGTCCACGCC	GTAAACGATG	TCAACTAGCC	GTTGGGAGCC	TTGAGCTCTT
DQ411818.1	AGTCCACGCC	GTAAACGATG	TCAACTAGCC	GTTGGGAGCC	TTGAGCTCTT
DQ453823.1	AGTCCACGCC	GTAAACGATG	TCAACTAGCC	GTTGGGAGCC	TTGAGCTCTT
EF672049.1	AGTCCACGCC	GTAAACGATG	TCAACTAGCC	GTTGGGAGCC	TTGAGCTCTT
EU680989.1	AGTCCACGCC	GTAAACGATG	TCAACTAGCC	GTTGGGAGCC	TTGAGCTCTT
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	755	765	775	785	795
A3/Ag-	AGTGGCGCAG	CTAACGCATT	AAGTTGACCG	CCTGGGGAGT	ACGGCCGCAA
A3/Sk-	AGTGGCGCAG	CTAACGCATT	AAGTTGACCG	CCTGGGGAGT	ACGGCCGCAA
B1/Sq-	AGTGGCGCAG	CTAACGCATT	AAGTTGACCG	CCTGGGGAGT	ACGGCCGCAA
B3/At-	AGTGGCGCAG	CTAACGCATT	AAGTTGACCG	CCTGGGGAGT	ACGGCCGCAA
B3/Au-	AGTGGCGCAG	CTAACGCATT	AAGTTGACCG	CCTGGGGAGT	ACGGCCGCAA
B3/Sw-	AGTGGCGCAG	CTAACGCATT	AAGTTGACCG	CCTGGGGAGT	ACGGCCGCAA
B3/Sx-	AGTGGCGCAG	CTAACGCATT	AAGTTGACCG	CCTGGGGAGT	ACGGCCGCAA
AF094738.1	AGTGGCGCAG	CTAACGCATT	AAGTTGACCG	CCTGGGGAGT	ACGGCCGCAA
AM410631.1	AGTGGCGCAG	CTAACGCATT	AAGTTGACCG	CCTGGGGAGT	ACGGCCGCAA
AY880843.1	AGTGGCGCAG	CTAACGCATT	AAGTTGACCG	CCTGGGGAGT	ACGGCCGCAA
DQ402053.1	AGTGGCGCAG	CTAACGCATT	AAGTTGACCG	CCTGGGGAGT	ACGGCCGCAA
DQ411818.1	AGTGGCGCAG	CTAACGCATT	AAGTTGACCG	CCTGGGGAGT	ACGGCCGCAA
DQ453823.1	AGTGGCGCAG	CTAACGCATT	AAGTTGACCG	CCTGGGGAGT	ACGGCCGCAA
EF672049.1	AGTGGCGCAG	CTAACGCATT	AAGTTGACCG	CCTGGGGAGT	ACGGCCGCAA
EU680989.1	AGTGGCGCAG	CTAACGCATT	AAGTTGACCG	CCTGGGGAGT	ACGGCCGCAA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	805	815	825	835	845
A3/Ag-	GGTTAAAAC	CAAATGAATT	GACGGGGGCC	CGCACAAAGCG	GTGGAGCATG
A3/Sk-	GGTTAAAAC	CAAATGAATT	GACGGGGGCC	CGCACAAAGCG	GTGGAGCATG

B1/Sq-	GGTTAAAAC	CAAATGAATT	GACGGGGGCC	CGCACAAAGCG	GTGGAGCATG
B3/At-	GGTTAAAAC	CAAATGAATT	GACGGGGGCC	CGCACAAARCG	GTGGAGCATG
B3/Au-	GGTTAAAAC	CAAATGAATT	GACGGGGGCC	CGCACAAAGCG	GTGGAGCATG
B3/Sw-	GGTTAAAAC	CAAATGAATT	GACGGGGGCC	CGCACAAAGCG	GTGGAGCATG
B3/Sx-	GGTTAAAAC	CAAATGAATT	GACGGGGGCC	CGCACAAAGCG	GTGGAGCATG
AF094738.1	GGTTAAAAC	CAAATGAATT	GACGGGGGCC	CGCACAAAGCG	GTGGAGCATG
AM410631.1	GGTTAAAAC	CAAATGAATT	GACGGGGGCC	CGCACAAAGCG	GTGGAGCATG
AY880843.1	GGTTAAAAC	CAAATGAATT	GACGGGGGCC	CGCACAAAGCG	GTGGAGCATG
DQ402053.1	GGTTAAAAC	CAAATGAATT	GACGGGGGCC	CGCACAAAGCG	GTGGAGCATG
DQ411818.1	GGTTAAAAC	CAAATGAATT	GACGGGGGCC	CGCACAAAGCG	GTGGAGCATG
DQ453823.1	GGTTAAAAC	CAAATGAATT	GACGGGGGCC	CGCACAAAGCG	GTGGAGCATG
EF672049.1	GGTTAAAAC	CAAATGAATT	GACGGGGGCC	CGCACAAAGCG	GTGGAGCATG
EU680989.1	GGTTAAAAC	CAAATGAATT	GACGGGGGCC	CGCACAAAGCG	GTGGAGCATG
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	855	865	875	885	895
A3/Ag-	TGGTTAATT	CGAAGCAACG	CGAAGAACCT	TACCAGGCCT	TGACATCCAA
A3/Sk-	TGGTTAATT	CGAAGCAACG	CGAAGAACCT	TACCAGGCCT	TGACATCCAA
B1/Sq-	TGGTTAATT	CGAAGCAACG	CGAAGAACCT	TACCAGGCCT	TGACATCCAA
B3/At-	TGGTTAATT	CGAAGCAACG	CGAAGAACCT	TACCAGGCCT	TGACATCCAA
B3/Au-	TGGTTAATT	CGAAGCAACG	CGAAGAACCT	TACCAGGCCT	TGACATCCAA
B3/Sw-	TGGTTAATT	CGAAGCAACG	CGAAGAACCT	TACCAGGCCT	TGACATCCAA
B3/Sx-	TGGTTAATT	CGAAGCAACG	CGAAGAACCT	TACCAGGCCT	TGACATCCAA
AF094738.1	TGGTTAATT	CGAAGCAACG	CGAAGAACCT	TACCAGGCCT	TGACATCCAA
AM410631.1	TGGTTAATT	CGAAGCAACG	CGAAGAACCT	TACCAGGCCT	TGACATCCAA
AY880843.1	TGGTTAATT	CGAAGCAACG	CGAAGAACCT	TACCAGGCCT	TGACATCCAA
DQ402053.1	TGGTTAATT	CGAAGCAACG	CGAAGAACCT	TACCAGGCCT	TGACATCCAA
DQ411818.1	TGGTTAATT	CGAAGCAACG	CGAAGAACCT	TACCAGGCCT	TGACATCCAA
DQ453823.1	TGGTTAATT	CGAAGCAACG	CGAAGAACCT	TACCAGGCCT	TGACATCCAA
EF672049.1	TGGTTAATT	CGAAGCAACG	CGAAGAACCT	TACCAGGCCT	TGACATCCAA
EU680989.1	TGGTTAATT	CGAAGCAACG	CGAAGAACCT	TACCAGGCCT	TGACATCCAA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	905	915	925	935	945
A3/Ag-	TGAACTTTCC	AGAGATGGAT	TGGTGCCTTC	GGGAACATTG	AGACAGGTGC
A3/Sk-	TGAACTTTCC	AGAGATGGAT	TGGTGCCTTC	GGGAACATTG	AGACAGGTGC
B1/Sq-	TGAACTTTCC	AGAGATGGAT	TGGTGCCTTC	GGGAACATTG	AGACAGGTGC
B3/At-	TGAACTTTCC	AGAGATGGAT	TGGTGCCTTC	GGGAACATTG	AGACAGGTGC
B3/Au-	TGAACTTTCC	AGAGATGGAT	TGGTGCCTTC	GGGAACATTG	AGACAGGTGC
B3/Sw-	TGAACTTTCC	AGAGATGGAT	TGGTGCCTTC	GGGAGCATTG	AGACAGGTGC
B3/Sx-	TGAACTTTCC	AGAGATGGAT	TGGTGCCTTC	GGGAACATTG	AGACAGGTGC
AF094738.1	TGAACTTTCC	AGAGATGGAT	TGGTGCCTTC	GGGAGCATTG	AGACAGGTGC
AM410631.1	TGAACTTTCC	AGAGATGGAT	TGGTGCCTTC	GGGAACATTG	AGACAGGTGC
AY880843.1	TGAACTTTCC	AGAGATGGAT	TGGTGCCTTC	GGGAACATTG	AGACAGGTGC
DQ402053.1	TGAACTTTCC	AGAGATGGAT	TGGTGCCTTC	GGGAACATTG	AGACAGGTGC
DQ411818.1	TGAACTTTCC	AGAGATGGAT	TGGTGCCTTC	GGGAGCATTG	AGACAGGTGC
DQ453823.1	TGAACTTTCC	AGAGATGGAT	TGGTGCCTTC	GGGAACATTG	AGACAGGTGC
EF672049.1	TGAACTTTCC	AGAGATGGAT	TGGTGCCTTC	GGGAACATTG	AGACAGGTGC
EU680989.1	TGAACTTTCC	AGAGATGGAT	TGGTGCCTTC	GGGAACATTG	AGACAGGTGC

	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	955	965	975	985	995
A3/Ag-	TGCATGGCTG TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGTA					
A3/Sk-	TGCATGGCTG TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGTA					
B1/Sq-	TGCATGGCTG TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGTA					
B3/At-	TGCATGGCTG TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGTA					
B3/Au-	TGCATGGCTG TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGTA					
B3/Sw-	TGCATGGCTG TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGTA					
B3/Sx-	TGCATGGCTG TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGTA					
AF094738.1	TGCATGGCTG TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGTA					
AM410631.1	TGCATGGCTG TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGTA					
AY880843.1	TGCATGGCTG TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGTA					
DQ402053.1	TGCATGGCTG TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGTA					
DQ411818.1	TGCATGGCTG TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGTA					
DQ453823.1	TGCATGGCTG TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGTA					
EF672049.1	TGCATGGCTG TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGTA					
EU680989.1	TGCATGGCTG TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGTA					
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	1005	1015	1025	1035	1045
A3/Ag-	ACGAGCGCAA CCCTTGTCT TAGTTACCAG CACGTTATGG TGGGCACTCT					
A3/Sk-	ACGAGCGCAA CCCTTGTCT TAGTTACCAG CACGTTATGG TGGGCACTCT					
B1/Sq-	ACGAGCGCAA CCCTTGTCT TAGTTACCAG CACGTTATGG TGGGCACTCT					
B3/At-	ACGAGCGCAA CCCTTGTCT TAGTTACCAG CACGTTATGG TGGGCACTCT					
B3/Au-	ACGAGCGCAA CCCTTGTCT TAGTTACCAG CACGTTATGG TGGGCACTCT					
B3/Sw-	ACGAGCGCAA CCCTTGTCT TAGTTACCAG CACGTTAAGG TGGGCACTCT					
B3/Sx-	ACGAGCGCAA CCCTTGTCT TAGTTACCAG CACGTTATGG TGGGCACTCT					
AF094738.1	ACGAGCGCAA CCCTTGTCT TAGTTACCAG CACGTTATGG TGGGCACTCT					
AM410631.1	ACGAGCGCAA CCCTTGTCT TAGTTACCAG CACGTTATGG TGGGCACTCT					
AY880843.1	ACGAGCGCAA CCCTTGTCT TAGTTACCAG CACGTTATGG TGGGCACTCT					
DQ402053.1	ACGAGCGCAA CCCTTGTCT TAGTTACCAG CACGTTATGG TGGGCACTCT					
DQ411818.1	ACGAGCGCAA CCCTTGTCT TAGTTACCAG CACGTAATGG TGGGCACTCT					
DQ453823.1	ACGAGCGCAA CCCTTGTCT TAGTTACCAG CACGTTATGG TGGGCACTCT					
EF672049.1	ACGAGCGCAA CCCTTGTCT TAGTTACCAG CACGTTATGG TGGGCACTCT					
EU680989.1	ACGAGCGCAA CCCTTGTCT TAGTTACCAG CACGTTATGG TGGGCACTCT					
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	1055	1065	1075	1085	1095
A3/Ag-	AAGGAGACTG CCGGTGACAA ACCGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAGTC					
A3/Sk-	AAGGAGACTG CCGGTGACAA ACCGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAGTC					
B1/Sq-	AAGGAGACTG CCGGTGACAA ACCGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAGTC					
B3/At-	AAGGAGACTG CCGGTGACAA ACCGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAGTC					
B3/Au-	AAGGAGACTG CCGGTGACAA ACCGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAGTC					
B3/Sw-	AAGGAGACTG CCGGTGACAA ACCGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAGTC					
B3/Sx-	AAGGAGACTG CCGGTGACAA ACCGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAGTC					
AF094738.1	AAGGAGACTG CCGGTGACAA ACCGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAGTC					
AM410631.1	AAGGAGACTG CCGGTGACAA ACCGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAGTC					
AY880843.1	AAGGAGACTG CCGGTGACAA ACCGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAGTC					
DQ402053.1	AAGGAGACTG CCGGTGACAA ACCGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAGTC					
DQ411818.1	AAGGAGACTG CCGGTGACAA ACCGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAGTC					

DQ453823.1	AAGGAGACTG	CCGGTGACAA	ACCGGAGGAA	GGTGGGGATG	ACGTCAAGTC
EF672049.1	AAGGAGACTG	CCGGTGACAA	ACCGGAGGAA	GGTGGGGATG	ACGTCAAGTC
EU680989.1	AAGGAGACTG	CCGGTGACAA	ACCGGAGGAA	GGTGGGGATG	ACGTCAAGTC
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	1105	1115	1125	1135	1145
A3/Ag-	ATCATGGCCC	TTACGGCCTG	GGCTACACAC	GTGCTACAAT	GGTCGGTACA
A3/Sk-	ATCATGGCCC	TTACGGCCTG	GGCTACACAC	GTGCTACAAT	GGTCGGTACA
B1/Sq-	ATCATGGCCC	TTACGGCCTG	GGCTACACAC	GTGCTACAAT	GGTCGGTACA
B3/At-	ATCATGGCCC	TTACGGCCTG	GGCTACACAC	GTGCTACAAT	GGTCGGTACA
B3/Au-	ATCATGGCCC	TTACGGCCTG	GGCTACACAC	GTGCTACAAT	GGTCGGTACA
B3/Sw-	ATCATGGCCC	TTACGGCCTG	GGCTACACAC	GTGCTACAAT	GGTCGGTACA
B3/Sx-	ATCATGGCCC	TTACGGCCTG	GGCTACACAC	GTGCTACAAT	GGTCGGTACA
AF094738.1	ATCATGGCCC	TTACGGCCTG	GGCTACACAC	GTGCTACAAT	GGTCGGTACA
AM410631.1	ATCATGGCCC	TTACGGCCTG	GGCTACACAC	GTGCTACAAT	GGTCGGTACA
AY880843.1	ATCATGGCCC	TTACGGCCTG	GGCTACACAC	GTGCTACAAT	GGTCGGTACA
DQ402053.1	ATCATGGCCC	TTACGGCCTG	GGCTACACAC	GTGCTACAAT	GGTCGGTACA
DQ411818.1	ATCATGGCCC	TTACGGCCTG	GGCTACACAC	GTGCTACAAT	GGTCGGTACA
DQ453823.1	ATCATGGCCC	TTACGGCCTG	GGCTACACAC	GTGCTACAAT	GGTCGGTACA
EF672049.1	ATCATGGCCC	TTACGGCCTG	GGCTACACAC	GTGCTACAAT	GGTCGGTACA
EU680989.1	ATCATGGCCC	TTACGGCCTG	GGCTACACAC	GTGCTACAAT	GGTCGGTACA
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	1155	1165	1175	1185	
A3/Ag-	GAGGGTTGCC	AAGCCGCGAG	GTGGAGCTAA	TC-CCACAAA	ACCG
A3/Sk-	AAGGGTTGCC	AAGCCGCRAG	GTGGAGCTAA	TC-CCATAAA	ACCG
B1/Sq-	AAGGGTTGCC	AAGCCGCRAG	GTGGAGCTAA	TC-CCATAAA	ACCG
B3/At-	AAGGGTTGCC	AAGCCGCRAG	GTGGAGCTAA	TC-CCATAAA	ACCG
B3/Au-	GAGGGTTGCC	AAGCCGCGAG	GTGGAGCTAA	TC-CCACAAA	ACCG
B3/Sw-	GAGGGTTGCC	AAGCCGCGAG	GTGGAGCTAA	TC-CCATAAA	ACCG
B3/Sx-	AAGGGTTGCC	AAGCCGCRAG	GTGGAGCTAA	TC-CCATAAA	ACCG
AF094738.1	AAGGGTTGCC	AAGCCGCGAG	GTGGAGCTAA	TC-CCATAAA	ACCG
AM410631.1	GAGGGTTGCC	AAGCCGCGAG	GTGGAGCTAA	TC-CCACAAA	ACCG
AY880843.1	AAGGGTTGCC	AAGCCGCGAG	GTGGAGCTAA	TC-CCATAAA	ACCG
DQ402053.1	GAGGGTTGCC	AAGCCGCGAG	GTGGAGCTAA	TC-CCATAAA	ACCG
DQ411818.1	GAGGGTTGCC	AAGCCGCGAG	GTGGAGCTAA	TC-CCATAAA	ACCG
DQ453823.1	GAGGGTTGCC	AAGCCGCGAG	GTGGAGCTAA	TC-CCATAAA	ACCG
EF672049.1	AAGGGTTGCC	AAGCCGCGAG	GTGGAGCTAA	TC-CCATAAA	ACCG
EU680989.1	GAGGGTTGCC	AAGCCGCGAG	GTGGAGCTAA	TC-CCACAAA	ACCG

## APÊNDICE C – Identificação Bacteriana Através da Análise de Ácidos graxos

### Apêndice C1 - Identificação de ácidos graxos da cepa A1/Ab

Volume: DATA1 File: E059223.94A Seq Counter: 13 ID Number: 2417

Type: Samp Bottle: 5 Method: TSBA50

Created: 22/09/2005 14:20:15

Created By: itamar

Sample ID: Ita/Karina A1/Ab

Profile:

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1,708	3,316E+8	0,028	----	7,028	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
6,768	424	0,034	0,992	13,618	14:0 ISO	0,76	ECL deviates -0,001	Reference -0,003
7,290	1667	0,036	0,980	14,001	14:0	2,93	ECL deviates 0,001	Reference -0,002
8,247	1345	0,040	0,963	14,624	15:0 ISO	2,33	ECL deviates 0,001	Reference -0,001
8,386	23386	0,041	0,960	14,714	15:0 ANTEISO	40,33	ECL deviates 0,001	Reference -0,001
9,870	5253	0,043	0,941	15,627	16:0 ISO	8,88	ECL deviates 0,000	Reference -0,001
10,487	9058	0,042	0,935	15,998	16:0	15,21	ECL deviates -0,002	Reference -0,004
11,580	666	0,044	0,927	16,630	17:0 ISO	1,11	ECL deviates 0,000	Reference -0,001
11,744	17129	0,044	0,926	16,724	17:0 ANTEISO	28,46	ECL deviates 0,001	Reference 0,000

ECL Deviation: 0,001

Reference ECL Shift: 0,002

Number Reference Peaks: 8

Total Response: 58928

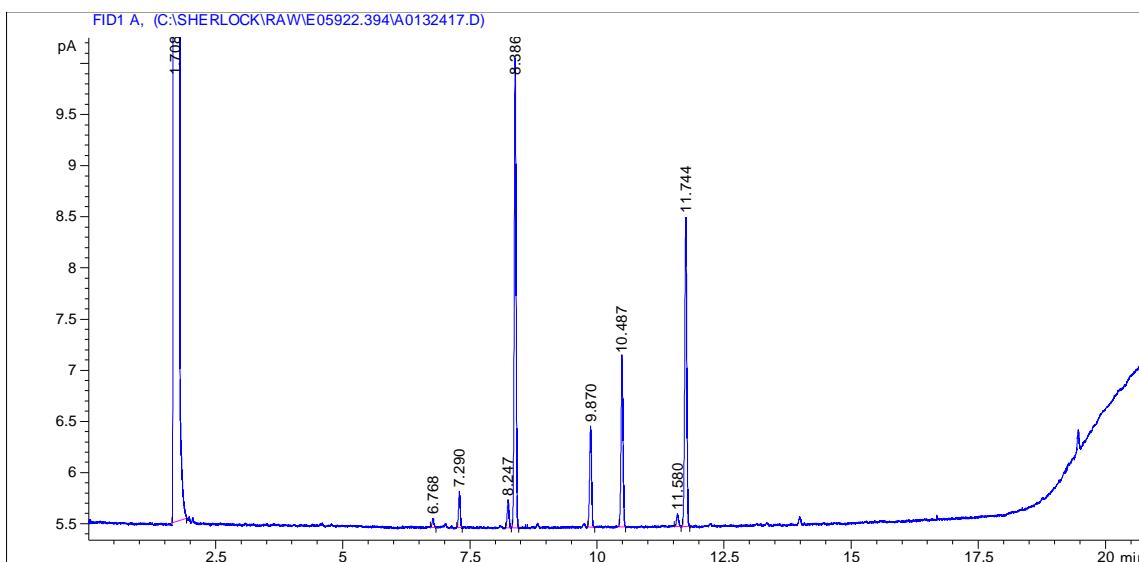
Total Named: 58928

Percent Named: 100,00%

Total Amount: 55698

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0,355	Bacillus-coagulans
	0,338	Clavibacter-michiganensis-michiganensis/C. sepedonicum
	0,318	Microbacterium-halophilum/thalassium
	0,270	Microbacterium-imperiale



### Apêndice C2 - Identificação de ácidos graxos da cepa A1/Aba

Volume: DATA File: E10B264.95A Samp Ctr: 5 ID Number: 1698

Type: Samp Bottle: 4 Method: TSBA6

Created: 11/26/2010 1:28:30 PM  
 Sample ID: ISM Rene Diana A1-Ab LMA023-10  
 Profile:

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.726	3.338E+8	0.027	----	7.021	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.948	238	0.020	----	7.469		----	< min rt	
1.993	----	---	----	7.561		----	< min rt	
3.827	1292	0.028	1.123	10.922	Sum In Feature 2	0.47	ECL deviates -0.006	unknown 10.928
4.788	4571	0.031	1.065	12.000	12:0	1.59	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
6.167	1438	0.035	1.014	13.177	12:0 2OH	0.48	ECL deviates 0.000	
7.284	22492	0.042	0.984	14.000	14:0	7.25	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
8.056	1784	0.040	----	14.503	unknown 14.502	----	ECL deviates 0.001	
8.818	596	0.042	----	15.000	15:0	----	ECL deviates 0.000	
9.155	5960	0.047	0.950	15.203	14:0 2OH	1.85	ECL deviates 0.000	
9.628	25648	0.046	0.944	15.488	Sum In Feature 2	7.92	ECL deviates 0.000	14:0 3OH/16:1 iso I
10.178	72303	0.043	0.937	15.820	Sum In Feature 3	22.17	ECL deviates -0.002	16:1 w7c/16:1 w6c
10.477	106855	0.045	0.933	15.999	16:0	32.64	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
12.017	23101	0.045	0.919	16.891	17:0 cyclo	6.95	ECL deviates 0.003	
12.209	547	0.041	0.918	17.002	17:0	0.16	ECL deviates 0.002	Reference -0.001
13.658	59116	0.049	0.909	17.823	Sum In Feature 8	17.60	ECL deviates 0.000	18:1 w7c
13.968	1456	0.050	0.908	17.999	18:0	0.43	ECL deviates -0.001	Reference -0.005
15.553	1602	0.046	0.904	18.906	19:0 cyclo w8c	0.47	ECL deviates 0.004	
----	26940	---	----	----	Summed Feature 2	8.40	12:0 aldehyde ?	unknown 10.928
----	-----	---	----	----	----	----	16:1 iso I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 iso I
----	72303	---	----	----	Summed Feature 3	22.17	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c
----	59116	---	----	----	Summed Feature 8	17.60	18:1 w7c	18:1 w6c

ECL Deviation: 0.002

Reference ECL Shift: 0.003

Number Reference Peaks: 5

Total Response: 326379

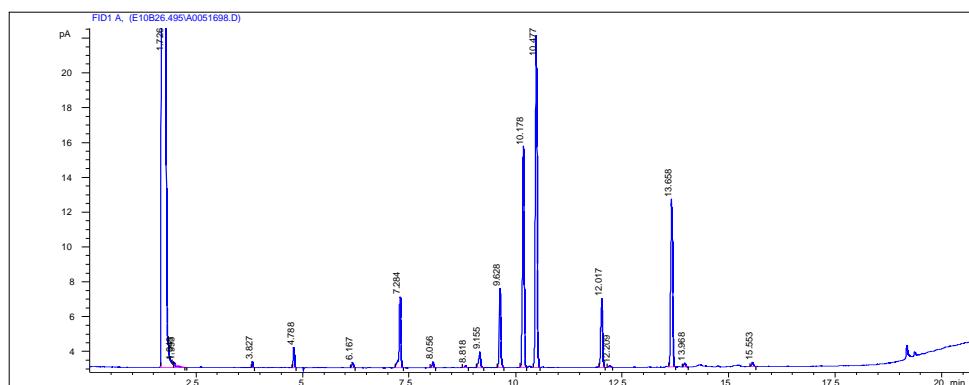
Total Named: 326379

Percent Named: 100.00%

Total Amount: 305539

## Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA6 6.10	0.787	Enterobacter-pyrinus
	0.692	Serratia-marcescens-GC subgroup B
	0.691	Cedecea-davisae
	0.684	Kluyvera-cryocrescens-GC subgroup B
	0.658	Proteus-vulgaris
	0.652	Klebsiella-pneumoniae-pneumoniae-GC subgroup A
	0.609	Serratia-odorifera
	0.578	Kluyvera-ascorbata-GC subgroup A
	0.543	Morganella-morganii
	0.543	Photorhabdus-luminescens-luminescens (Xenorhabdus)



## Apêndice C3 - Identificação de ácidos graxos da cepa B1/Sq

Volume: DATA1  
 Type: Samp

File: E059223.94A  
 Bottle: 4

Seq Counter: 12  
 Method: TSBA50

ID Number: 2416

Created: 22/09/2005 13:55:59

Created By: itamar

Sample ID: Ita/Karina B1/Sq

Profile:

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1,707	3,312E+8	0,028	----	7,023	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
4,260	4416	0,030	1,093	11,424	10:0 3OH	3,17	ECL deviates 0,002	
4,786	5159	0,032	1,061	12,000	12:0	3,60	ECL deviates 0,000	Reference -0,002
6,171	5996	0,036	1,008	13,178	12:0 2OH	3,97	ECL deviates 0,001	
6,549	7350	0,037	0,998	13,456	12:0 3OH	4,82	ECL deviates 0,002	
7,288	739	0,036	0,980	13,999	14:0	0,48	ECL deviates -0,001	Reference -0,003
10,188	52119	0,043	0,938	15,818	Sum In Feature 3	32,15	ECL deviates -0,004	16:1 w7c/15 iso 2OH
10,489	51720	0,045	0,935	15,999	16:0	31,81	ECL deviates -0,001	Reference -0,002
12,031	7744	0,047	0,924	16,891	17:0 CYCLO	4,70	ECL deviates 0,003	Reference 0,001
13,674	24305	0,048	0,915	17,825	18:1 w7c	14,62	ECL deviates 0,002	
13,980	1122	0,042	0,913	17,999	18:0	0,67	ECL deviates -0,001	Reference -0,003
----	52119	---	----	----	Summed Feature 3	32,15	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0,002

Reference ECL Shift: 0,002

Number Reference Peaks: 5

Total Response: 160669

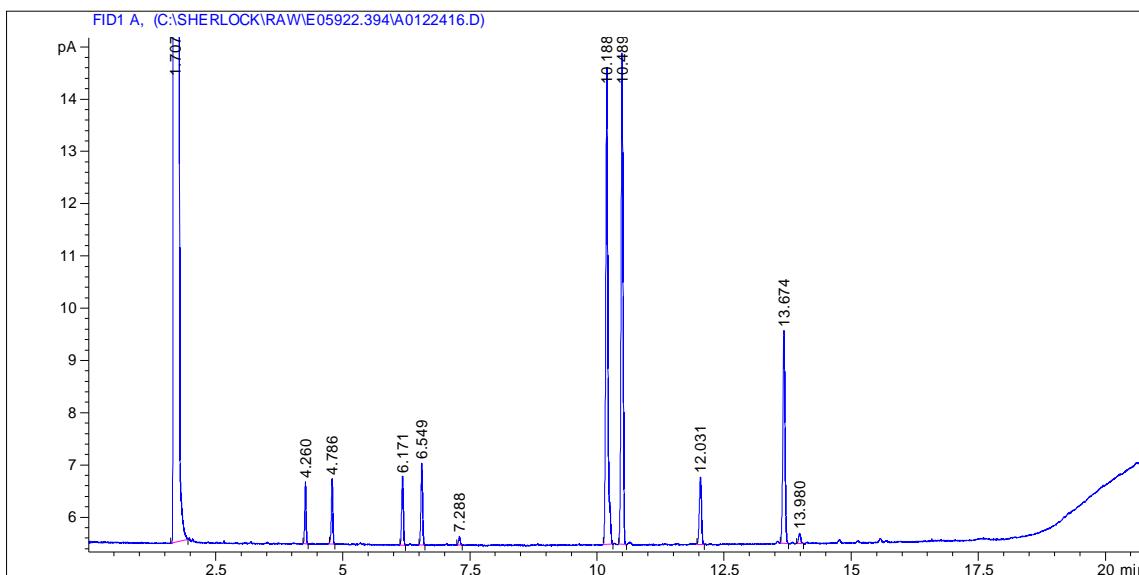
Total Named: 160669

Percent Named: 100,00%

Total Amount: 152079

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0,936	Pseudomonas-putida-biotype B
	0,824	Pseudomonas-fluorescens-biotype G/taetrolens
	0,777	Pseudomonas-fluorescens-biotype B
	0,739	Pseudomonas-vancouverensis
	0,652	Pseudomonas-putida-biotype A
	0,651	Pseudomonas-fluorescens-biotype A
	0,598	Pseudomonas-savastanoi-fraxinus
	0,582	Pseudomonas-fluorescens-biotype C/P. mandelii
	0,577	Pseudomonas-syringae-phaseolicola



#### Apêndice C4 - Identificação de ácidos graxos da cepa B1/Sqa

Volume: DATA

File: E10B264.95A

Samp Ctr: 6

ID Number: 1699

Type: Samp

Bottle: 5

Method: TSBA6

Created: 11/26/2010 1:52:49 PM  
 Sample ID: ISM Rene Diana B1-S9 LMA023-10

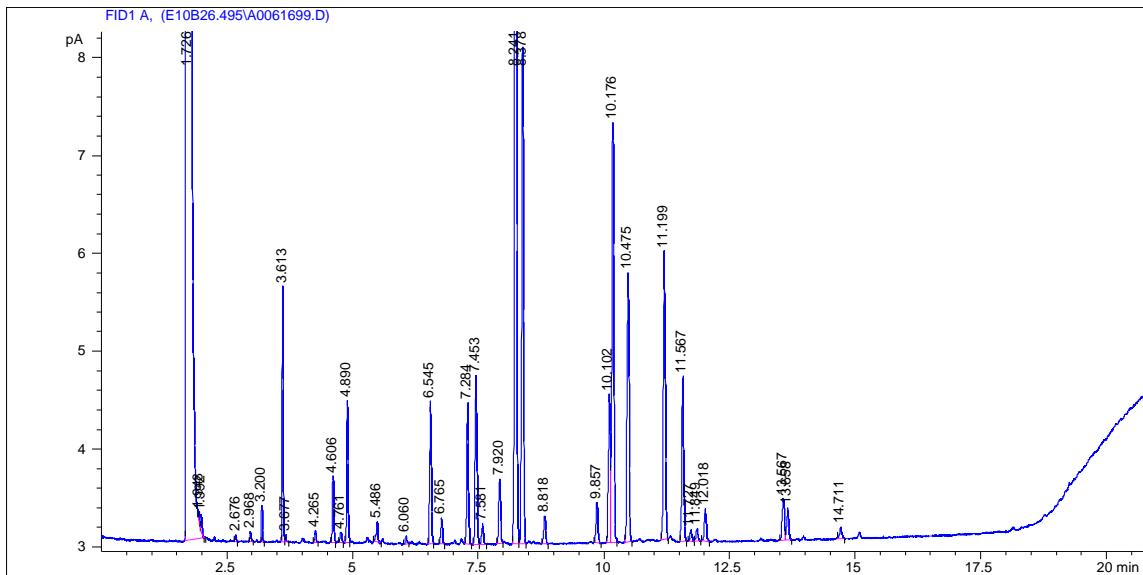
RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.726	3.31E+8	0.027	----	7.019	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.948	235	0.019	----	7.467		----	< min rt	
1.992	534	0.023	----	7.558		----	< min rt	
2.676	201	0.022	----	8.939		----	< min rt	
2.968	338	0.026	----	9.530	unknown 9.531	----	ECL deviates -0.001	
3.200	1142	0.024	1.181	9.999	10:0	0.55	ECL deviates -0.001	Reference -0.002
3.613	8855	0.027	1.142	10.605	11:0 isso	4.14	ECL deviates -0.001	Reference -0.001
3.677	259	0.028	1.136	10.698	11:0 anteiso	0.12	ECL deviates 0.003	Reference 0.002
4.265	444	0.031	1.095	11.422	10:0 3OH	0.20	ECL deviates 0.000	
4.606	2701	0.031	----	11.798	unknown 11.799	----	ECL deviates -0.001	
4.761	498	0.038	----	11.969		----		
4.890	5837	0.031	1.061	12.089	11:0 iso 3OH	2.54	ECL deviates 0.000	
5.486	1017	0.038	1.037	12.612	13:0 isso	0.43	ECL deviates -0.002	Reference -0.004
6.060	403	0.036	1.017	13.099	12:0 iso 3OH	0.17	ECL deviates 0.001	
6.545	6845	0.036	1.003	13.456	12:0 3OH	2.81	ECL deviates 0.002	
6.765	1277	0.038	0.997	13.618	14:0 isso	0.52	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
7.284	6897	0.039	0.984	14.000	14:0	2.78	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
7.453	8820	0.039	0.981	14.111	13:0 iso 3OH	3.55	ECL deviates 0.002	
7.581	1110	0.043	0.978	14.194	13:0 2OH	0.45	ECL deviates 0.000	
7.920	3504	0.041	0.972	14.416	15:1 iso F	1.39	ECL deviates 0.001	
8.241	97398	0.040	0.966	14.624	15:0 isso	38.54	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
8.378	25367	0.039	0.963	14.714	15:0 anteiso	10.01	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
8.818	1464	0.039	----	15.001	15:0	----	ECL deviates 0.001	
9.857	2235	0.044	0.941	15.627	16:0 isso	0.86	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
10.102	7900	0.039	0.938	15.774	16:1 w9c	3.04	ECL deviates 0.000	
10.176	24357	0.044	0.937	15.819	Sum In Feature 3	9.35	ECL deviates -0.003	16:1 w7c/16:1 w6c
10.475	15274	0.044	0.933	15.999	16:0	5.84	ECL deviates -0.001	Reference -0.004
11.199	16692	0.044	0.926	16.418	Sum In Feature 9	6.34	ECL deviates 0.002	17:1 iso w9c
11.567	9193	0.044	0.923	16.631	17:0 isso	3.48	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
11.727	577	0.040	0.922	16.723	17:0 anteiso	0.22	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
11.849	648	0.041	0.921	16.793	17:1 w8c	0.24	ECL deviates 0.001	
12.018	1954	0.046	0.919	16.891	17:0 cyclo	0.74	ECL deviates 0.003	
13.567	2619	0.047	0.910	17.770	18:1 w9c	0.98	ECL deviates 0.001	
13.658	1914	0.044	0.909	17.822	Sum In Feature 8	0.71	ECL deviates -0.001	18:1 w7c
14.711	785	0.049	----	18.423		----		
----	24357	---	----	----	Summed Feature 3	9.35	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c
----	1914	---	----	----	Summed Feature 8	0.71	18:1 w7c	18:1 w6c
----	16692	---	----	----	Summed Feature 9	6.34	17:1 iso w9c	16:0 10-methyl

ECL Deviation: 0.001  
 Total Response: 253820  
 Percent Named: 99.49%

Reference ECL Shift: 0.003  
 Total Named: 252537  
 Total Amount: 244020

Matches:

Library      Sim Index      Entry Name  
 TSBA6 6.10      0.910      Stenotrophomonas-maltophilia (Xanthomonas, Pseudomonas)



### Apêndice C5 - Identificação de ácidos graxos da cepa B3/At

Volume: DATA1      File: E059223.94A      Seq Counter: 5      ID Number: 2409  
 Type: Samp      Bottle: 4      Method: TSBA50

Created: 22/09/2005 11:05:53

Created By: itamar

Sample ID: Ita/Karina B3/At

Profile:

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1,707	3,325E+8	0,028	----	7,026	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
4,261	4855	0,030	1,093	11,424	10:0 3OH	3,06	ECL deviates 0,002	
4,786	4016	0,033	1,061	12,000	12:0	2,46	ECL deviates 0,000	Reference -0,002
6,171	8220	0,035	1,008	13,179	12:0 2OH	4,79	ECL deviates 0,002	
6,550	8301	0,037	0,998	13,457	12:0 3OH	4,78	ECL deviates 0,003	
7,290	735	0,037	0,980	14,000	14:0	0,42	ECL deviates 0,000	Reference -0,002
10,190	53748	0,045	0,938	15,818	Sum In Feature 3	29,13	ECL deviates -0,004	16:1 w7c/15 iso 2OH
10,491	57721	0,042	0,935	15,999	16:0	31,19	ECL deviates -0,001	Reference -0,002
11,328	872	0,047	0,928	16,483	Sum In Feature 4	0,47	ECL deviates -0,003	17:1 ANTEISO B/i I
12,032	12677	0,046	0,924	16,890	17:0 CYCLO	6,76	ECL deviates 0,002	Reference 0,002
13,675	29406	0,046	0,915	17,823	18:1 w7c	15,54	ECL deviates 0,000	
13,986	1839	0,046	0,913	17,999	18:0	0,97	ECL deviates -0,001	Reference 0,000
15,573	833	0,040	0,907	18,902	19:0 CYCLO w8c	0,44	ECL deviates 0,000	Reference 0,002
----	53748	---	----	----	Summed Feature 3	29,13	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c
----	872	---	----	----	Summed Feature 4	0,47	17:1 ISO 1/ANTEI B	17:1 ANTEISO B/i 1

ECL Deviation: 0,002

Reference ECL Shift: 0,002

Number Reference Peaks: 6

Total Response: 183221

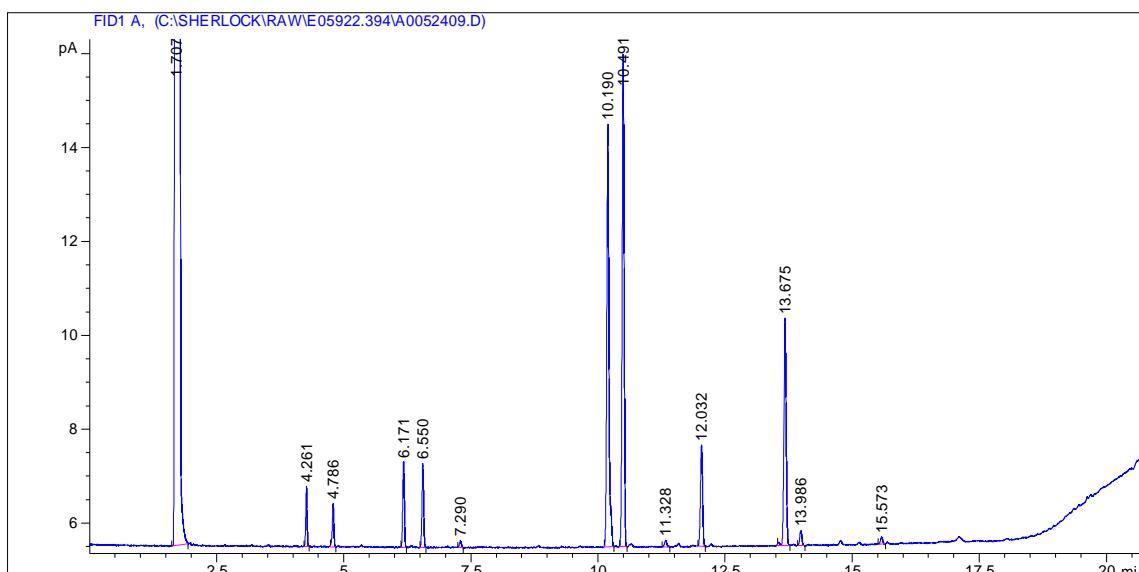
Total Named: 183221

Percent Named: 100,00%

Total Amount: 173116

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0,871	Pseudomonas-putida-biotype B
	0,833	Pseudomonas-vancouverensis
	0,828	Pseudomonas-putida-biotype A
	0,594	Pseudomonas-fluorescens-biotype B
	0,580	Pseudomonas-veronii
	0,560	Pseudomonas-fluorescens-biotype G/taetrolens



## Apêndice C6 - Identificação de ácidos graxos da cepa B3/Ata

Volume: DATA File: E10B264.95A Samp Ctr: 7 ID Number: 1700  
 Type: Samp Bottle: 6 Method: TSBA6  
 Created: 11/26/2010 2:17:07 PM  
 Sample ID: ISM Rene Diana B3-At LMA023-10

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.726	3.242E+8	0.027	----	7.019	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.948	248	0.020	----	7.467		----	< min rt	
1.993	507	0.024	----	7.557		----	< min rt	
2.968	326	0.028	----	9.530	unknown 9.531	----	ECL deviates -0.001	
3.201	1140	0.025	1.181	10.000	10:0	0.48	ECL deviates 0.000	Reference 0.001
3.615	9444	0.027	1.142	10.606	11:0 isso	3.89	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
3.675	278	0.027	1.136	10.695	11:0 anteiso	0.11	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
4.265	407	0.030	1.095	11.421	10:0 3OH	0.16	ECL deviates -0.001	
4.607	2763	0.031	----	11.798	unknown 11.799	----	ECL deviates -0.001	
4.764	531	0.037	----	11.972		----		
4.891	6034	0.032	1.061	12.089	11:0 iso 3OH	2.31	ECL deviates 0.000	
5.289	229	0.031	1.045	12.439	11:0 3OH	0.09	ECL deviates 0.001	
5.487	1421	0.040	1.037	12.613	13:0 isso	0.53	ECL deviates -0.001	Reference -0.002
5.589	294	0.038	1.033	12.702	13:0 anteiso	0.11	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
6.064	445	0.037	1.017	13.100	12:0 iso 3OH	0.16	ECL deviates 0.002	
6.546	7497	0.037	1.003	13.456	12:0 3OH	2.71	ECL deviates 0.002	
6.768	1642	0.038	0.997	13.619	14:0 isso	0.59	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
7.285	8075	0.038	0.984	14.000	14:0	2.86	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
7.454	9939	0.040	0.981	14.110	13:0 iso 3OH	3.51	ECL deviates 0.001	
7.584	1191	0.040	0.978	14.195	13:0 2OH	0.42	ECL deviates 0.001	
7.922	3768	0.041	0.972	14.415	15:1 iso F	1.32	ECL deviates 0.000	
8.242	113199	0.038	0.966	14.624	15:0 isso	39.38	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
8.380	29721	0.041	0.963	14.714	15:0 anteiso	10.31	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
8.820	1891	0.040	----	15.001	15:0	----	ECL deviates 0.001	
9.859	2717	0.042	0.941	15.627	16:0 isso	0.92	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
10.104	8300	0.042	0.938	15.775	16:1 w9c	2.80	ECL deviates 0.001	
10.177	26202	0.044	0.937	15.818	Sum In Feature 3	8.84	ECL deviates -0.004	16:1 w7c/16:1 w6c
10.479	18028	0.044	0.933	16.000	16:0	6.06	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
11.202	17982	0.043	0.926	16.418	Sum In Feature 9	6.00	ECL deviates 0.002	17:1 iso w9c
11.569	10999	0.044	0.923	16.630	17:0 isso	3.66	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
11.728	689	0.039	0.922	16.722	17:0 anteiso	0.23	ECL deviates -0.001	Reference -0.002
11.848	753	0.043	0.921	16.792	17:1 w8c	0.25	ECL deviates 0.000	
12.017	2217	0.046	0.919	16.889	17:0 cyclo	0.73	ECL deviates 0.001	
13.567	2763	0.049	0.910	17.769	18:1 w9c	0.91	ECL deviates 0.000	
13.660	1938	0.045	0.909	17.822	Sum In Feature 8	0.64	ECL deviates -0.001	18:1 w7c
14.714	851	0.049	----	18.423		----		
----	26202	---	----	Summed Feature 3		8.84	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c
----	1938	---	----	Summed Feature 8		0.64	18:1 w7c	18:1 w6c
----	17982	---	----	Summed Feature 9		6.00	17:1 iso w9c	16:0 10-methyl

ECL Deviation: 0.001

Reference ECL Shift: 0.001

Number Reference Peaks: 13

Total Response: 288695

Total Named: 287313

Percent Named: 99.52%

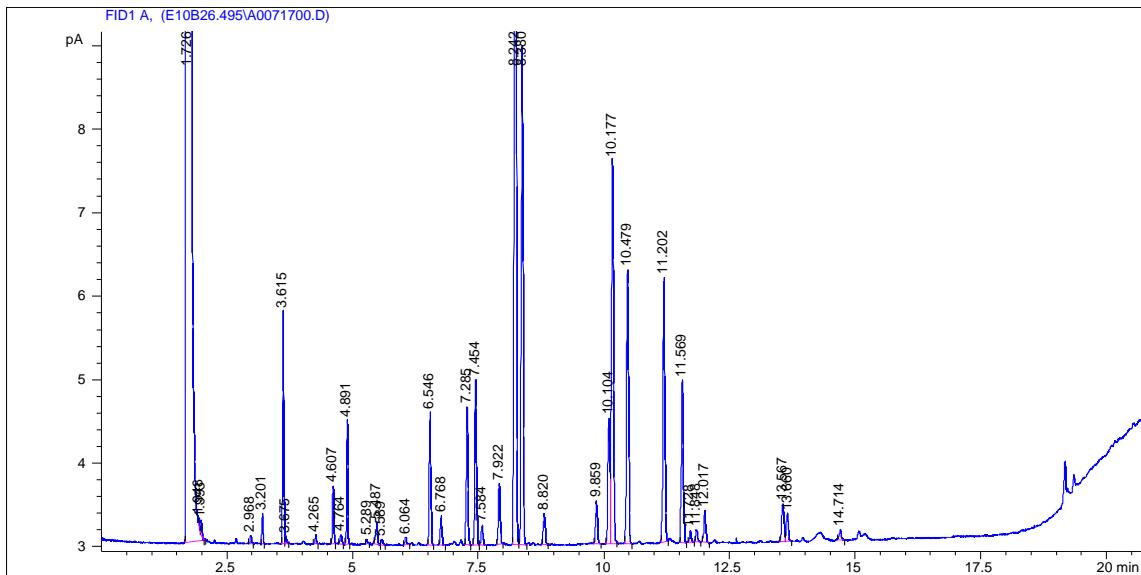
Total Amount: 277531

Matches:

Library  
TSBA6 6.10

Sim Index  
0.912

Entry Name  
Stenotrophomonas-maltophilia (Xanthomonas, Pseudomonas)



### Apêndice C7 - Identificação de ácidos graxos da cepa A3/Sk

Volume: DATA1 File: E059223.94A Seq Counter: 10 ID Number: 2414  
 Type: Samp Bottle: 2 Method: TSBA50

Created: 22/09/2005 13:07:12

Created By: itamar

Sample ID: Ita/Karina A3/Sk

Profile:

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1,707	3,3E+8	0,028	----	7,024	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
4,261	4769	0,030	1,093	11,423	10:0 3OH	3,16	ECL deviates 0,001	
4,786	4397	0,034	1,061	12,000	12:0	2,82	ECL deviates 0,000	Reference -0,001
6,170	7343	0,037	1,008	13,178	12:0 2OH	4,48	ECL deviates 0,001	
6,549	8086	0,036	0,998	13,456	12:0 3OH	4,88	ECL deviates 0,002	
7,290	722	0,036	0,980	14,000	14:0	0,43	ECL deviates 0,000	Reference -0,002
10,188	56924	0,047	0,938	15,818	Sum In Feature 3	32,33	ECL deviates -0,004	16:1 w7c/15 iso 2OH
10,491	54653	0,042	0,935	16,000	16:0	30,95	ECL deviates 0,000	Reference -0,002
11,578	395	0,035	0,927	16,628	17:0 ISSO	0,22	ECL deviates -0,002	Reference -0,003
12,032	6275	0,046	0,924	16,891	17:0 CYCLO	3,51	ECL deviates 0,003	Reference 0,002
12,220	434	0,042	0,922	17,000	17:0	0,24	ECL deviates 0,000	Reference -0,001
13,677	29069	0,046	0,915	17,825	18:1 w7c	16,10	ECL deviates 0,002	
13,985	1600	0,045	0,913	18,000	18:0	0,88	ECL deviates 0,000	Reference -0,001
----	56924	---	----	----	Summed Feature 3	32,33	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0,002

Reference ECL Shift: 0,002

Number Reference Peaks: 7

Total Response: 174667

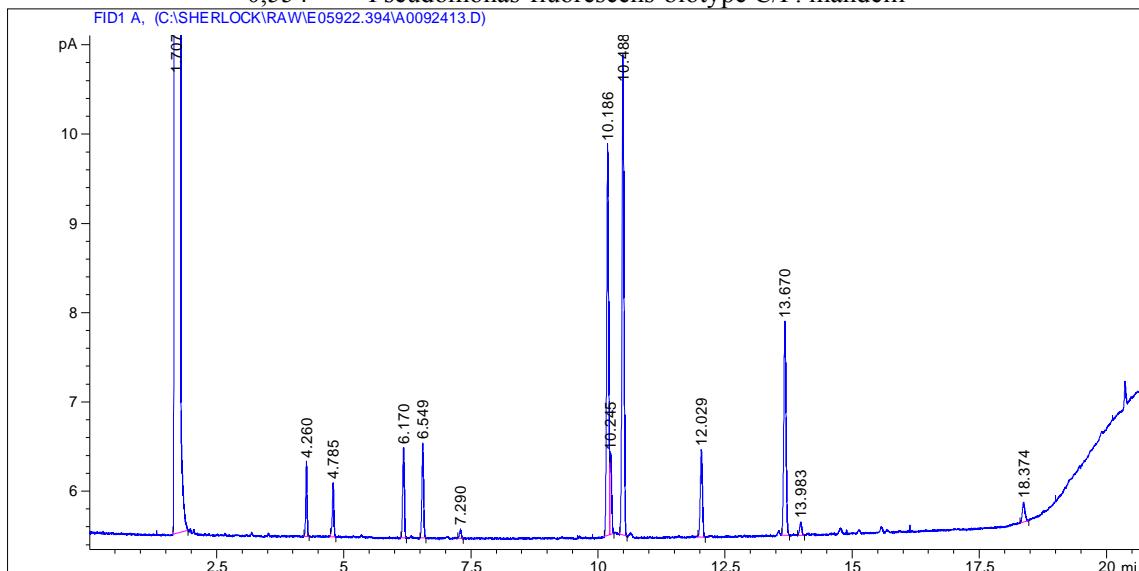
Total Named: 174667

Percent Named: 100,00%

Total Amount: 165189

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0,894	Pseudomonas-fluorescens-biotype B
	0,870	Pseudomonas-fluorescens-biotype G/taetrolens
	0,869	Pseudomonas-putida-biotype B
	0,802	Pseudomonas-fluorescens-biotype A
	0,758	Pseudomonas-putida-biotype A
	0,662	Pseudomonas-vancouverensis
	0,644	Pseudomonas-syringae-glycinea
	0,608	Pseudomonas-syringae-phaseolicola
	0,554	Pseudomonas-fluorescens-biotype C/P. mandelii



### Apêndice C8 - Identificação de ácidos graxos da cepa A3/Ska

Volume: DATA File: E10B264.95A Samp Ctr: 4 ID Number: 1697  
 Type: Samp Bottle: 3 Method: TSBA6  
 Created: 11/26/2010 1:04:06 PM  
 Sample ID: ISM Rene Diana A3-SK LMA023-10

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.726	3.307E+8	0.027	----	7.019	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.947	267	0.021	----	7.467		----	< min rt	
1.993	397	0.022	----	7.559		----	< min rt	
2.676	293	0.024	----	8.940		----	< min rt	
2.968	456	0.026	----	9.532	unknown 9.531	----	ECL deviates 0.001	
3.201	1666	0.025	1.181	10.001	10:0	0.55	ECL deviates 0.001	Reference 0.000
3.614	10509	0.027	1.142	10.606	11:0 isso	3.38	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
3.674	235	0.029	1.136	10.693	11:0 anteiso	0.08	ECL deviates -0.002	Reference -0.002
4.266	503	0.030	1.095	11.422	10:0 3OH	0.16	ECL deviates 0.000	
4.607	4372	0.031	----	11.799	unknown 11.799	----	ECL deviates 0.000	
4.762	595	0.037	----	11.970		----		
4.891	6620	0.032	1.061	12.089	11:0 iso 3OH	1.98	ECL deviates 0.000	
5.488	1753	0.037	1.037	12.614	13:0 isso	0.51	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
6.061	377	0.034	1.017	13.098	12:0 iso 3OH	0.11	ECL deviates 0.000	
6.545	9358	0.037	1.003	13.455	12:0 3OH	2.64	ECL deviates 0.001	
6.767	1746	0.038	0.997	13.618	14:0 isso	0.49	ECL deviates -0.001	Reference -0.002
7.161	365	0.043	0.988	13.909	14:1 w5c	0.10	ECL deviates 0.008	
7.285	12502	0.037	0.984	14.000	14:0	3.47	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
7.454	10621	0.039	0.981	14.110	13:0 iso 3OH	2.93	ECL deviates 0.001	
7.585	940	0.038	0.978	14.196	13:0 2OH	0.26	ECL deviates 0.002	
7.921	5566	0.041	0.972	14.415	15:1 iso F	1.52	ECL deviates 0.000	
8.242	144870	0.041	0.966	14.625	15:0 isso	39.39	ECL deviates 0.002	Reference 0.000
8.379	29495	0.040	0.963	14.714	15:0 anteiso	8.00	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
8.819	1944	0.040	----	15.001	15:0	----	ECL deviates 0.001	
9.859	3046	0.043	0.941	15.627	16:0 isso	0.81	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
10.104	13661	0.042	0.938	15.775	16:1 w9c	3.61	ECL deviates 0.001	
10.177	41673	0.046	0.937	15.819	Sum In Feature 3	10.99	ECL deviates -0.003	16:1 w7c/16:1 w6c
10.477	23575	0.043	0.933	15.999	16:0	6.20	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
11.203	23688	0.046	0.926	16.420	Sum In Feature 9	6.18	ECL deviates 0.004	17:1 iso w9c
11.566	13292	0.044	0.923	16.630	17:0 isso	3.45	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
11.725	696	0.039	0.922	16.722	17:0 anteiso	0.18	ECL deviates -0.001	Reference -0.004
11.849	814	0.038	0.921	16.793	17:1 w8c	0.21	ECL deviates 0.001	
12.018	3016	0.046	0.919	16.891	17:0 cyclo	0.78	ECL deviates 0.003	
13.565	4225	0.048	0.910	17.770	18:1 w9c	1.08	ECL deviates 0.001	
13.656	3068	0.044	0.909	17.822	Sum In Feature 8	0.79	ECL deviates -0.001	18:1 w7c
14.710	1177	0.050	----	18.422		----		
15.081	582	0.043	0.905	18.635	19:0 isso	0.15	ECL deviates 0.001	Reference -0.003
----	41673	---	----	----	Summed Feature 3	10.99	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c
----	3068	---	----	----	Summed Feature 8	0.79	18:1 w7c	18:1 w6c
----	23688	---	----	----	Summed Feature 9	6.18	17:1 iso w9c	16:0 10-methyl

ECL Deviation: 0.002

Reference ECL Shift: 0.002 Number Reference Peaks: 13

Total Response: 370237

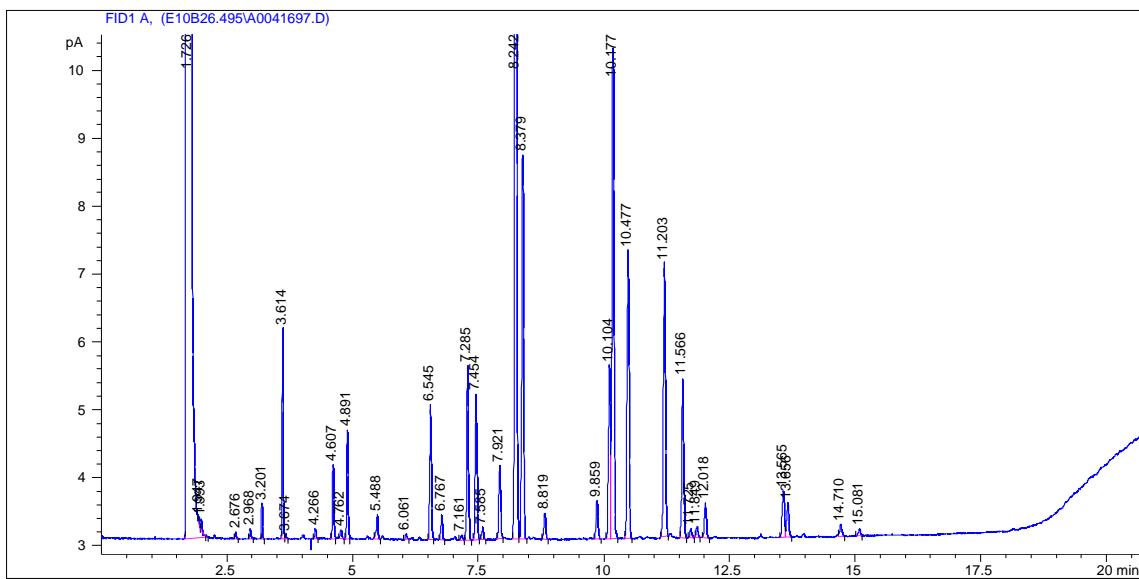
Total Named: 368465

Percent Named: 99.52%

Total Amount: 355093

Matches:

Library TSBA6 6.10	Sim Index 0.926	Entry Name Stenotrophomonas-maltophilia (Xanthomonas, Pseudomonas)
-----------------------	--------------------	---



### Apêndice C9 - Identificação de ácidos graxos da cepa B3/Au

Volume: DATA1      File: E059223.94A      Seq Counter: 15      ID Number: 2418  
 Type: Samp      Bottle: 6      Method: TSBA50

Created: 22/09/2005 15:08:57

Created By: itamar

Sample ID: Ita/Karina B3/Au

Profile:

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1,706	3,341E+8	0,028	----	7,018	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
4,259	3196	0,030	1,101	11,425	10:0 3OH	3,81	ECL deviates 0,003	
4,784	2433	0,034	1,069	12,001	12:0	2,81	ECL deviates 0,001	Reference -0,002
6,168	4908	0,035	1,014	13,177	12:0 2OH	5,39	ECL deviates 0,000	
6,547	5144	0,039	1,004	13,455	12:0 3OH	5,59	ECL deviates 0,001	
7,288	531	0,039	0,985	13,998	14:0	0,57	ECL deviates -0,002	Reference -0,003
10,187	24641	0,042	0,938	15,819	Sum In Feature 3	25,02	ECL deviates -0,003	16:1 w7c/15 iso 2OH
10,242	3762	0,033	0,938	15,852	Sum In Feature 3	3,82	ECL deviates 0,000	15:0 ISO 2OH/16:1w7c
10,488	30756	0,041	0,935	16,000	16:0	31,12	ECL deviates 0,000	Reference -0,001
12,032	6557	0,046	0,921	16,891	17:0 CYCLO	6,53	ECL deviates 0,003	Reference 0,001
13,673	14695	0,048	0,909	17,824	18:1 w7c	14,46	ECL deviates 0,001	
13,979	906	0,043	0,908	17,998	18:0	0,89	ECL deviates -0,002	Reference -0,006
----	28403	---	----	----	Summed Feature 3	28,84	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0,002

Reference ECL Shift: 0,003

Number Reference Peaks: 5

Total Response: 97529

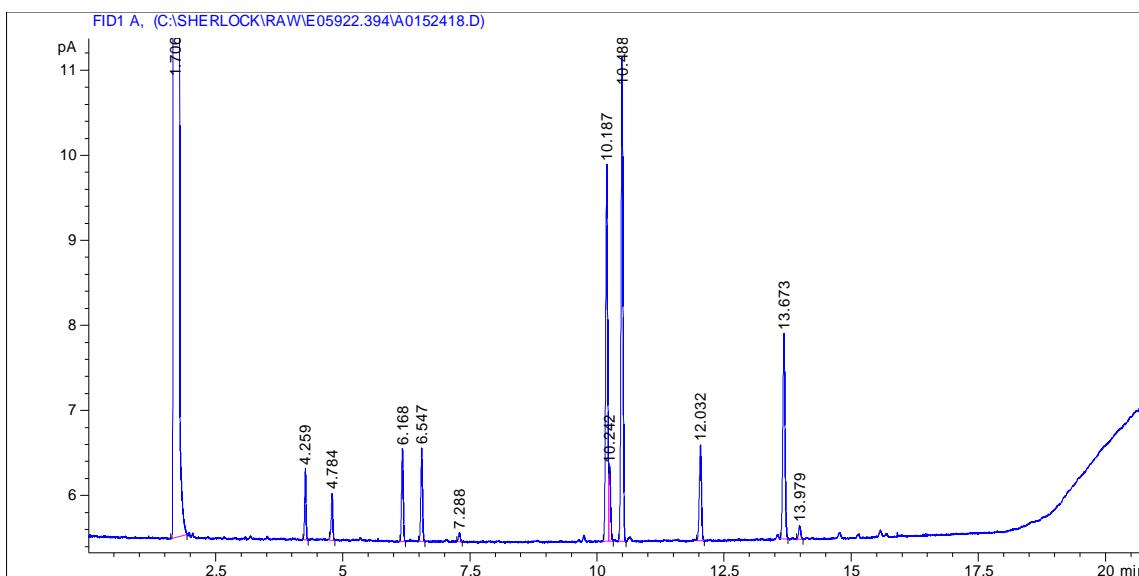
Total Named: 97529

Percent Named: 100,00%

Total Amount: 92413

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0,878	Pseudomonas-putida-biotype B
	0,776	Pseudomonas-vancouverensis
	0,772	Pseudomonas-putida-biotype A
	0,555	Pseudomonas-chlororaphis/aureofaciens/aurantiaca



## Apêndice C10 - Identificação de ácidos graxos da cepa B3/Sw

Volume: DATA1 File: E059223.94A Seq Counter: 6 ID Number: 2410

Type: Samp Bottle: 5 Method: TSBA50

Created: 22/09/2005 11:30:05

Created By: itamar

Sample ID: Ita/Karina B3/Sw

Profile:

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1,706	3,325E+8	0,028	----	7,027	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
2,348	277	0,025	----	8,318		----	< min rt	
2,507	394	0,023	----	8,637		----	< min rt	
3,186	472	0,030	1,192	9,999	10:0	0,25	ECL deviates -0,001	Reference -0,007
3,512	470	0,031	----	10,475		----		
4,260	7284	0,030	1,093	11,425	10:0 3OH	3,49	ECL deviates 0,003	
4,786	9280	0,031	1,061	12,002	12:0	4,32	ECL deviates 0,002	Reference -0,001
6,171	6671	0,036	1,008	13,179	12:0 2OH	2,95	ECL deviates 0,002	
6,325	417	0,036	1,004	13,292	12:1 3OH	0,18	ECL deviates 0,004	
6,549	10420	0,036	0,998	13,457	12:0 3OH	4,56	ECL deviates 0,003	
7,288	449	0,038	0,980	13,999	14:0	0,19	ECL deviates -0,001	Reference -0,003
10,189	71647	0,047	0,938	15,818	Sum In Feature 3	29,47	ECL deviates -0,004	16:1 w7c/15 iso 2OH
10,490	63691	0,044	0,935	15,999	16:0	26,12	ECL deviates -0,001	Reference -0,002
12,030	3814	0,046	0,924	16,890	17:0 CYCLO	1,54	ECL deviates 0,002	Reference 0,001
13,678	64088	0,049	0,915	17,826	18:1 w7c	25,70	ECL deviates 0,003	
13,983	2545	0,048	0,913	17,999	18:0	1,02	ECL deviates -0,001	Reference -0,002
15,568	546	0,039	0,907	18,903	19:0 CYCLO w8c	0,22	ECL deviates 0,001	Reference 0,000
----	71647	---	----	----	Summed Feature 3	29,47	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0,002

Reference ECL Shift: 0,003

Number Reference Peaks: 7

Total Response: 241794

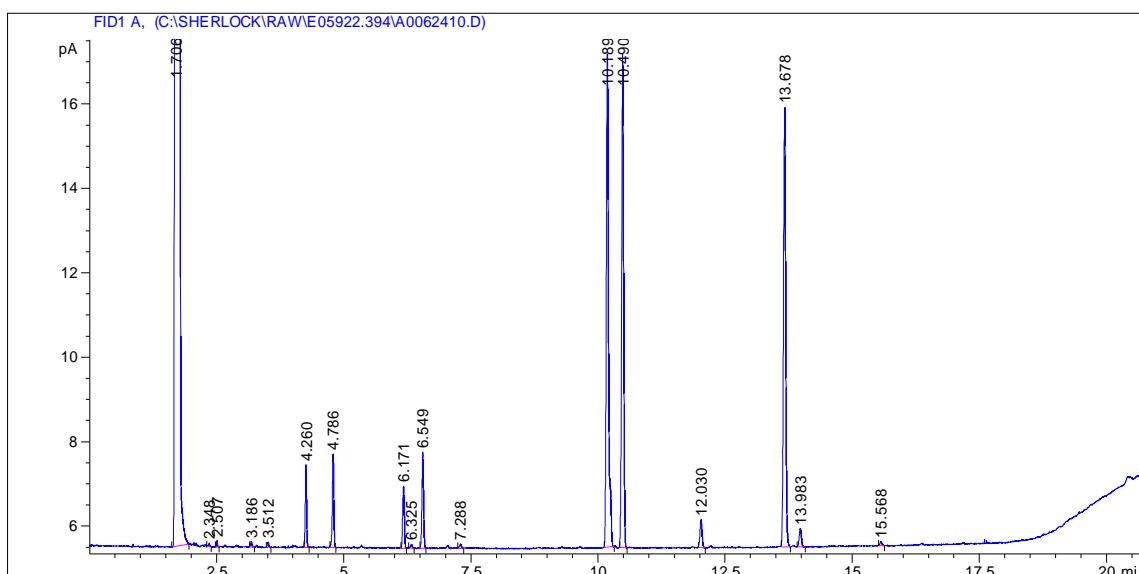
Total Named: 241324

Percent Named: 99,81%

Total Amount: 228102

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0,858	Pseudomonas-savastanoi-nerium
	0,746	Pseudomonas-mucidolens
	0,628	Pseudomonas-savastanoi-oleae
	0,568	Pseudomonas-putida-biotype A



### Apêndice C11 - Identificação de ácidos graxos da cepa B3/Sx

Volume: DATA1 File: E059223.94A Seq Counter: 8 ID Number: 2412

Type: Samp Bottle: 7 Method: TSBA50

Created: 22/09/2005 12:18:46

Created By: itamar

Sample ID: Ita/Karina B3/Sx

Profile:

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1,706	3,342E+8	0,028	----	7,027	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
2,348	214	0,023	----	8,318		----	< min rt	
2,506	367	0,024	----	8,636		----	< min rt	
2,886	174	0,024	1,244	9,398	8:0 3OH	0,13	ECL deviates 0,006	
3,186	412	0,027	1,192	9,999	10:0	0,29	ECL deviates -0,001	Reference -0,007
3,512	403	0,028	----	10,475		----		
4,260	6353	0,030	1,093	11,426	10:0 3OH	4,08	ECL deviates 0,004	
4,785	8404	0,032	1,061	12,002	12:0	5,24	ECL deviates 0,002	Reference -0,002
6,171	5246	0,035	1,008	13,179	12:0 2OH	3,11	ECL deviates 0,002	
6,324	573	0,042	1,004	13,292	12:1 3OH	0,34	ECL deviates 0,004	
6,549	9094	0,037	0,998	13,457	12:0 3OH	5,33	ECL deviates 0,003	
7,289	360	0,034	0,980	14,000	14:0	0,21	ECL deviates 0,000	Reference -0,002
10,190	41554	0,046	0,938	15,818	Sum In Feature 3	22,90	ECL deviates -0,004	16:1 w7c/15 iso 2OH
10,246	8348	0,035	0,938	15,852	Sum In Feature 3	4,60	ECL deviates 0,000	15:0 ISO 2OH/16:1w7c
10,489	45500	0,045	0,935	15,998	16:0	25,00	ECL deviates -0,002	Reference -0,003
11,373	492	0,033	0,928	16,509	15:0 3OH	0,27	ECL deviates 0,006	
12,030	3095	0,043	0,924	16,889	17:0 CYCLO	1,68	ECL deviates 0,001	Reference 0,001
13,676	46835	0,047	0,915	17,824	18:1 w7c	25,17	ECL deviates 0,001	
13,986	2593	0,055	0,913	18,000	18:0	1,39	ECL deviates 0,000	Reference 0,000
15,570	515	0,043	0,907	18,903	19:0 CYCLO w8c	0,27	ECL deviates 0,001	Reference 0,001
16,594	1041	0,043	----	19,490		----		
----	49902	---	----	Summed Feature 3		27,50	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0,003

Reference ECL Shift: 0,003

Number Reference Peaks: 7

Total Response: 180991

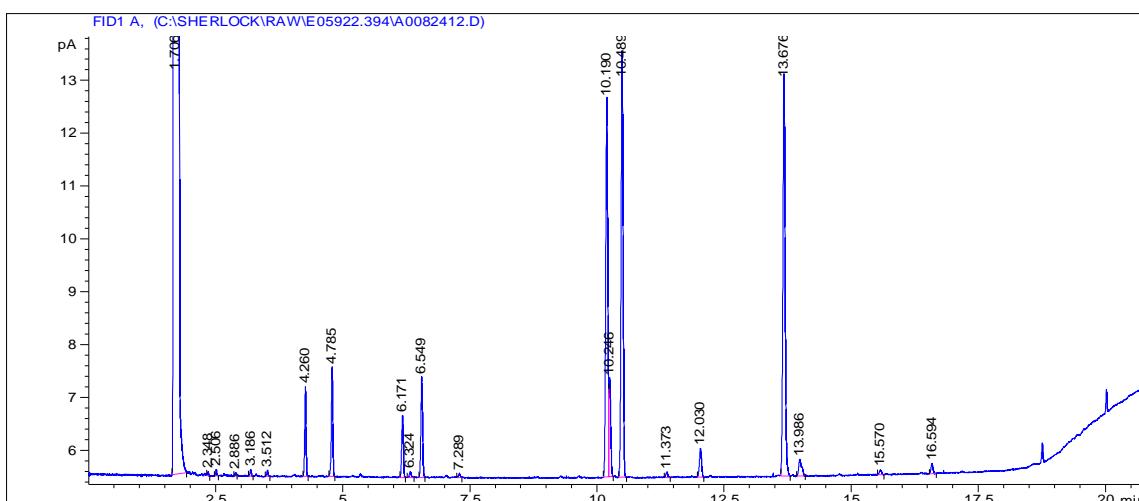
Total Named: 179547

Percent Named: 99,20%

Total Amount: 170216

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0,783	Pseudomonas-savastanoi-nerium
	0,607	Pseudomonas-mucidolens
	0,503	Pseudomonas-putida-biotype A
	0,502	Pseudomonas-savastanoi-oleae



## Apêndice C12 - Identificação de ácidos graxos da cepa A3/Ag

Volume: DATA1 File: E059223.94A Seq Counter: 9 ID Number: 2413

Type: Samp Bottle: 8 Method: TSBA50

Created: 22/09/2005 12:42:57

Created By: itamar

Sample ID: Ita/Karina A3/Ag

Profile:

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1,707	3,341E+8	0,028	----	7,024	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
4,260	3162	0,030	1,093	11,423	10:0 3OH	3,84	ECL deviates 0,001	
4,785	2556	0,033	1,061	12,000	12:0	3,01	ECL deviates 0,000	Reference -0,002
6,170	4630	0,036	1,008	13,178	12:0 2OH	5,18	ECL deviates 0,001	
6,549	4990	0,037	0,998	13,456	12:0 3OH	5,53	ECL deviates 0,002	
7,290	486	0,035	0,980	14,001	14:0	0,53	ECL deviates 0,001	Reference -0,001
10,186	24417	0,042	0,938	15,817	Sum In Feature 3	25,44	ECL deviates -0,005	16:1 w7c/15 iso 2OH
10,245	3871	0,034	0,938	15,853	Sum In Feature 3	4,03	ECL deviates 0,001	15:0 ISO 2OH/16:1w7c
10,488	29568	0,043	0,935	15,998	16:0	30,71	ECL deviates -0,002	Reference -0,003
12,029	5724	0,045	0,924	16,890	17:0 CYCLO	5,87	ECL deviates 0,002	Reference 0,000
13,670	14743	0,047	0,915	17,822	18:1 w7c	14,98	ECL deviates -0,001	
13,983	872	0,041	0,913	18,000	18:0	0,88	ECL deviates 0,000	Reference -0,002
18,374	1565	0,052	----	20,515		----	> max rt	
----	28288	---	----	----	Summed Feature 3	29,47	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0,002

Reference ECL Shift: 0,002

Number Reference Peaks: 5

Total Response: 95020

Total Named: 95020

Percent Named: 100,00%

Total Amount: 90051

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0,895	Pseudomonas-putida-biotype B
	0,795	Pseudomonas-putida-biotype A
	0,792	Pseudomonas-vancouverensis
	0,621	Pseudomonas-fluorescens-biotype B
	0,577	Pseudomonas-fluorescens-biotype G/taetrolens