

---

# IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES AO HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENÓXIACÉTICO (2,4-D) EM SOLOS DE RONDÔNIA, BRASIL

---

Marília Higino Mussy, Gunther Brucha, Mariza Gomes Reis, Priscila Ikeda Ushimaru, Miyuki Yamashita e Wanderley Rodrigues Bastos

## RESUMO

O uso de agrotóxicos tornou-se atualmente muito importante no controle de pragas e outras infestações que atacam as lavouras e pastagens. O estudo destes compostos orgânicos no meio ambiente e principalmente as transformações sofridas por eles durante os seus períodos de incubação nos solos ainda são na maioria das vezes desconhecidas e o mesmo equivale-se a seus efeitos nos organismos vivos. O herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é muito usado para o controle de plantas daninhas de folhas largas que infestam as pastagens e plantações na Região Amazônica e é classificado toxicologicamente como de Classe I, ou seja, altamente tóxicos. Este trabalho teve por objetivo isolar e identificar microrganismos provenientes de solo da Região Amazônica, resistentes a toxicidade do 2,4D. Para isso, alíquotas de solo coletado fo-

ram incubadas em meio mineral, contendo o composto, 2,4 D (200mg·l<sup>-1</sup>) como fonte única de carbono. Após 18 transferências os microrganismos que estavam crescendo no meio foram isolados e identificados filogeneticamente. Os resultados do sequenciamento do fragmento do DNA 16S amplificados das cepas isoladas provenientes de culturas cultivadas em meio mineral contendo o 2,4D como fonte única de carbono sugerem que *Methylobacterium sp.*, *Xanthobacter autotrophicus*, *Burkholderia cenocepacia*, *Aurantimonas sp.*, *Campylobacter jejuni* e *Methylobacterium chloromethanicum*, todas descritas na literatura como potenciais degradadoras de compostos orgânicos estavam presentes no solos do Estado de Rondônia. Esses exemplos microbianos apresentaram resistência a toxicidade ao 2,4-D.

---

## Introdução

No intuito de aumentar a produção, o uso de pesticidas se tornou muito importante no sistema agrícola moderno. Muitos desses produtos têm seus efeitos nocivos ao meio ambiente, podendo causar grandes impactos ambientais (Araújo, 2002). Dentro desse contexto a biodegradação destes compostos no solo torna-se uma das melhores alternativas para minimizar os impactos ambientais, pois a ação dos microrganismos

contribui para a redução da toxicidade dos agrotóxicos.

O composto ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), objeto de estudo deste trabalho, é um dos principais pesticidas da classe dos herbicidas utilizados atualmente na agricultura e pastagem, sendo aplicado principalmente para controle de ervas daninhas de folhas largas em colheitas de cereais, cana-de-açúcar e pastagens. O 2,4-D é encontrado no mercado em diferentes formulações e marcas comerciais, como U46<sup>®</sup>, DMA<sup>®</sup>,

Tordon<sup>®</sup>, Mannejo<sup>®</sup>. Cada formulação pode apresentar características físico-químicas diferentes, conferindo ao produto características diferenciais quanto à seletividade, volatilidade, toxicidade e persistência no ambiente (Silva e Silva, 2007).

Sabe-se que na região amazônica, a utilização do 2,4-D é muito comum tanto na agricultura como na pastagem, geralmente esse herbicida é misturado a outros agrotóxicos para aumentar a sua eficácia, porém, existe

pouco controle sobre a sua utilização e os riscos que este possa vir a causar no meio ambiente. De acordo com Custódio (2009), no ano de 2007, foi comercializado cerca de 233.701 litros de herbicidas que contêm o 2,4-D como princípio ativo no município de Ji-Paraná, estado de Rondônia, correspondendo a 32% do comércio de herbicidas naquela região.

Quanto à classificação toxicológica o composto estudado é considerado classe I – Extremamente tóxico e quan-

---

## PALAVRAS CHAVE / Agrotóxicos / Biodegradação / 2-4-D / Herbicida / Meio Ambiente /

Recebido: 13/10/2011. Aceito: 06/05/2013.

**Marília Higino Mussy.** Bióloga e Maestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Universidade Federal de Rondônia (UNIR), Brasil. Pesquisadora, Laboratório de Biogeoquímica Ambiental Wolfgang C. Pfeiffer, UNIR, Brasil. e-mail: mariliahigino@yahoo.com.br

**Gunther Brucha.** Mestre em Ciências da Engenharia Ambiental, Universidade de São Paulo, Brasil. Doutor em En-

genharia Civil, Escola de Engenharia de São Carlos, Brasil. Professor, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Brasil. Endereço: Instituto de Ciências e Tecnologia, UNIFAL, Rodovia José Aurélio Vilela, Nº 11.999. Cidade Universitária - CEP: 37715-400 Poços de Caldas, MG, Brasil. e-mail: gbrucha@yahoo.com.br

**Mariza Gomes Reis.** Mestre e Doutora em Química, Universidade Estadual de Campinas

(UNICAMP), Brasil. Cientista, AgResearch, Nova Zelândia. e-mail: mariza.gomesreis@agresearch.com.nz

**Priscila Ikeda Ushimaru.** Bolsista de Apoio Técnico a Pesquisa Bióloga, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; Brasil. Bolsista de Apoio Técnico a Pesquisa, CNPq, Brasil. e-mail: priscobain@yahoo.com.br

**Miyuki Yamashita.** Química, Universidade Estadual de Lon-

drina, Brasil. Mestre em Química, Universidade Federal de São Carlos, Brasil. Doutora em Química, UNICAMP, Brasil. Professor, UNIR, Brasil. e-mail: miy\_br@yahoo.com.br

**Wanderley Rodrigues Bastos.** Mestre e Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Professor, UNIR, Brasil. e-mail: wanderbastos@yahoo.com.br

## IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS RESISTANT TO THE HERBICIDE 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID (2,4-D) IN SOILS OF RONDONIA, BRAZIL

Marília Higino Mussy, Gunther Brucha, Mariza Gomes Reis, Priscila Ikeda Ushimaru, Miyuki Yamashita and Wanderley Rodrigues Bastos

### SUMMARY

*Pesticide application has become very important in controlling pests and other infestations that attack crops and pastures. The study of these organic compounds in the environment and especially the changes they undergo during their incubation periods in soils are still largely unknown, as are their equivalent effects on living organisms. The herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is widely used to control broadleaf weeds that infest pastures and plantations in the Amazon region. This herbicide is classified toxicologically as Class I; that is, highly toxic. The aim of this study was to isolate and identify microorganisms from soils of the Amazon region, resistant to the toxicity of 2,4-D. For this, aliquots of soil samples were*

*incubated in a mineral medium containing 200mg·l<sup>-1</sup> of the compound as sole carbon source. After 18 transfers, the organisms growing in the medium were isolated and identified phylogenetically. The results of the 16S DNA sequencing fragment amplified for strains isolated suggest that Methylobacterium sp., Xanthobacter autotrophicus, Burkholderia cenocepacia, Aurantimonas sp., Campylobacter jejuni and Methylobacterium chloromethanicum, all described in the literature as potential degraders of organic compounds, were present in the soils of the state of Rondônia. These samples were resistant to microbial toxicity of 2,4-D.*

## IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS RESISTENTES AL HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) EN SUELOS DE RONDONIA, BRASIL

Marília Higino Mussy, Gunther Brucha, Mariza Gomes Reis, Priscila Ikeda Ushimaru, Miyuki Yamashita y Wanderley Rodrigues Bastos

### RESUMEN

*La aplicación de pesticidas ha adquirido gran importancia para el control de plagas y otras infestaciones que atacan cultivos y pastizales. El estudio de estos compuestos orgánicos en el ambiente y especialmente los cambios que sufren en sus periodos de incubación en el suelo son aun poco conocidos, al igual que sus efectos en organismos vivientes. El herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es ampliamente utilizado para el control de hierbas de hoja grande que infestan pastizales y plantaciones de la región amazónica. La clasificación toxicológica de este herbicida es Clase I, es decir altamente tóxico. El objetivo de este estudio es aislar e identificar microorganismos, de suelos de la región amazónica, resistentes a la toxicidad del 2,4D. Para ello se incubaron muestras de sue-*

*lo en un medio mineral que contenía 200mg·l<sup>-1</sup> del compuesto como única fuente de carbono. Luego de 18 transferencias los organismos que crecían en el medio fueron aislados e identificados filogenéticamente. Los resultados de la secuenciación de los fragmentos de DNA 16S amplificados de las cepas aisladas sugieren que Methylobacterium sp., Xanthobacter autotrophicus, Burkholderia cenocepacia, Aurantimonas sp., Campylobacter jejuni y Methylobacterium chloromethanicum, todas especies descritas en la literatura como degradadoras de compuestos orgánicos, estuvieron presentes en los suelos del estado brasileiro de Rondônia. Las muestras fueron resistentes a la toxicidad microbiana del 2,4D.*

to ao potencial de periculosidade ambiental é considerado classe III – produto perigoso ao meio ambiente. Acredita-se que este herbicida possa ser cancerígeno acarretando danos ao fígado e ao coração. Pode atacar o sistema nervoso central provocando convulsões. Sua dose letal (DL50) oral é de 370mg·kg<sup>-1</sup> em coelhos e por via derme é de 1400mg·kg<sup>-1</sup> em camundongos (Vieira *et al.*, 1998).

Quando se trata de diversidade de organismos na região amazônica, cerca de 40.000 espécies de plantas vasculares, 5500 de vertebrados, 100.000 de invertebrados têm

sido cientificamente classificados na região (Da Silva *et al.*, 2005; Lewinsohn e Prado 2005). Entretanto, pouco se sabe sobre a diversidade microbiana na região amazônica. Atualmente existem somente três estudos publicados sobre a diversidade microbiana na floresta amazônica (Boreman e Tipllett, 1997; Fierer *et al.*, 2007; Kin *et al.*, 2007). Precisa-se conhecer os microrganismos presentes nos diversos biomas brasileiros e quais têm potencialidade para aplicação tecnológica necessária para remediar áreas contaminadas com poluentes ambientais.

Objetivou-se neste trabalho a obtenção de consórcios microbianos resistentes a toxicidade do 2,4-D, oriundos de solos do município de Porto Velho (RO), com histórico de uso deste herbicida, isolamento dos microrganismos resistentes ao herbicida e posterior identificação molecular.

### Materiais e Métodos

Foram selecionados no formato de transectos 18 pontos para a coleta dos solos (Figura 1) em uma fazenda na Rodovia BR-319, no município de Porto Velho, Rondônia,

Brasil. Os transectos distavam em ~100m entre eles, todos marcados com GPS nos modelos: GPS GARMIN'S® 48 (diferencial) e GPS GARMIN'S® 12XL Personal navigation™.

Para obtenção dos consórcios microbianos, 1g da mistura de solos coletados foi diluído em 10ml de água estéril. Após este procedimento foi realizado diluição seriada e alíquotas de 1ml da diluição 10<sup>-3</sup> foi utilizada como inóculo no ensaio de enriquecimento, contendo o composto, 2,4-D, como única fonte de carbono. Para isso, frascos erlenmeyer contendo 200ml

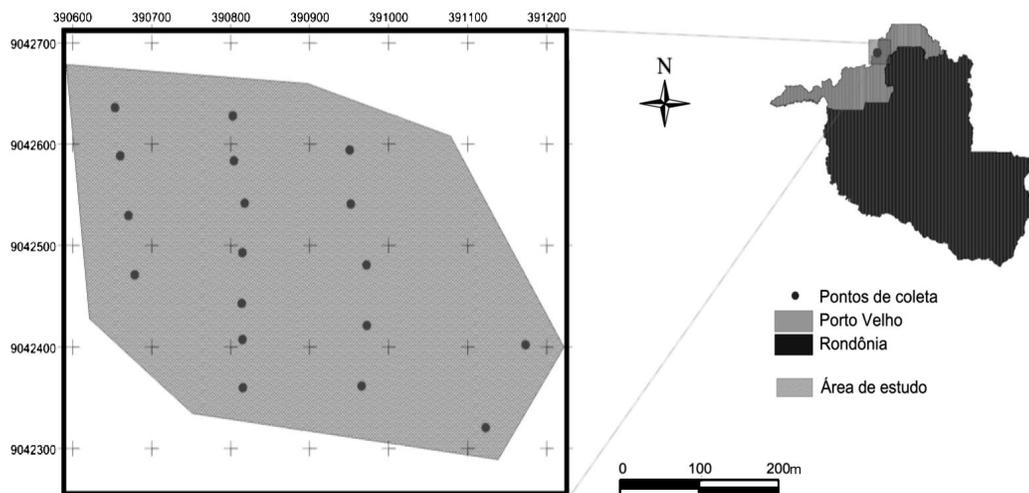


Figura 1. Localização da área de estudo e desenho amostral.

de meio mineral inorgânico (Montiel *et al.*, 2006) e  $200\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  do composto 2,4-D, como fonte única de carbono foram incubados a  $28^\circ\text{C}$  e agitação constante de 150rpm. Foram realizadas 18 transferências de alíquotas de microrganismos para frascos contendo meios de cultura e o composto 2,4-D na mesma concentração inicial, a fim de evitar a inibição do crescimento microbiano por falta de nutrientes, o acúmulo de possíveis intermediários e como um modo de selecionar os mais resistentes à toxicidade do 2,4-D. As transferências eram realizadas a cada 48h.

O crescimento dos microrganismos nesta fase foram acompanhados por medidas de turbidez. Finalizada esta etapa, deu-se início ao isolamento das colônias em placas de Petri. As colônias foram colocadas para crescer em meio mineral Montiel *et al.* (2006), acrescido de agar ( $1,5\%$ ) e  $133\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  do composto 2,4-D, a uma temperatura de  $35^\circ\text{C}$ . As colônias foram isoladas através do método de esgotamento por estrias. Os isolados microbianos foram selecionadas para identificação por coloração de Gram, cápsulas e teste bioquímico da catalase, todos seguindo a metodologia descrita por Coelho *et al.* (2006).

Também foram realizadas a identificação molecular bacteriana dos grupos isolados. Para isso fez-se extração do DNA microbiano seguindo-se o método de Wilson (1987) e medidas da concentração do DNA extraído através da espectrofotometria. Em seguida, realizou-se amplificação do gene rRNA 16S, utilizando-se primers 27F (5'-AGAGTTT-GATCMTGGCTCAG3') e 1401R (5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3') referentes ao gene 16S, que é comumente usado para a identificação bacteriana. As amplificações realizadas foram feitas com o uso de um termociclador Gene Amp PCR System 2400® (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CO, EEUU). A reação foi iniciada por 5min de desnaturação a  $94^\circ\text{C}$ , seguido de 30 ciclos com desnaturação a  $94^\circ\text{C}$  por 30s, anelamento a  $55^\circ\text{C}$  por 30s, extensão a  $72^\circ\text{C}$  por 1min e 30s, e extensão final a  $72^\circ\text{C}$  por 7min. O controle positivo utilizado foi o DNA da *Escherichia coli*. Os produtos do PCR purificados foram sequenciados pelo sequenciador Megabace® 1000 da GE Healthcare. As análises foram feitas pelo Software Sequence Analyser 3.0 com basecaller Cimerron 3.12. Os resultados foram analisados no programa

DNASTart e comparação no Blast-NCBI.

## Resultados e Discussão

Os resultados das medidas de turbidez indicaram um ligeiro crescimento dos mi-

obtidos amostrados não apresentaram cápsula e foram positivos ao teste da catalase.

De acordo com os resultados das análises para gene rRNA 16S, as sequências dos isolados obtidos foram relacionadas com sete representantes cultivados, cujas sequências foram depositadas no banco de dados NCBI (Tabela II).

Os isolados MM 3 e MM 14 apresentaram similaridade com *Burkholderia cenocepacia*, 96 e 94% respectivamente. Segundo Madeu (2007), o gênero *Burkholderia* foi descrito como pertencente à classe das proteobactérias, Gram-negativos, aeróbicos e móveis. São microrganismos com amplo potencial agrícola e biotecnológico, portadores de uma infinidade de características benéficas do ponto de vista ecológico e econômico, como por exemplo: são pro-

TABELA I  
DESCRIÇÃO ESTATÍSTICA DOS DADOS REFERENTE ÀS MEDIDAS DE TURBIDEZ AVALIADAS EM UM PERÍODO DE 22 DIAS

Tratamentos	Descrição estatística		
	Nº de amostras	Média $\pm$ desvio padrão	Variância
Controle	21	0,79 $\pm$ 0,43 NTU	0,19 NTU
Culturas com 2,4-D	21	1,02 $\pm$ 0,38 NTU	0,14 NTU

crorganismos, após as transferências, quando comparado com o controle, como pode ser visualizado na Tabela I. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente, como um modo de avaliar este desenvolvimento. Este baixo crescimento indica a dificuldade que os microrganismos provenientes da amostra de solo tiveram de crescer em meio mineral contendo altas concentrações de 2,4-D ( $200\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) como fonte única de carbono.

Dentre os 19 isolados bacterianos obtidos que apresentaram crescimento no meio sólido, seis foram classificadas como Gram-positivas e 13 como bacilo Gram-negativo. Todos os isolados

motoras de crescimento em plantas com a fixação biológica do nitrogênio, produtoras de fitormônios, supressoras de algumas doenças, biorremediadoras, agentes de biocontrole e produtoras de biopolímeros. Estudos sobre a diversidade de comunidades bacterianas do solo contaminados com o herbicida 2,4-D identificaram que o gênero *Burkholderia* era prevalente e estavam envolvidas na degradação do herbicida (Tiedje *et al.*, 1999).

O isolado MM 8 apresentou similaridade de 91% com *Aurantimonas* sp. A família Aurantimonadaceae é constituída por bactérias Gram-negativas e todos os

TABELA II  
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS CULTURAS ISOLADAS

Amostras	GenBank	Espécies	Similaridade %	Referência
MM 3	NC_010515.1	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	96	Copeland <i>et al.</i> , 2008
MM 8	NZ_AAPJ01000003.1	<i>Aurantimonas</i> sp.	91	Dick <i>et al.</i> , 2008
MM 9	NC_010511.1	<i>Methylobacterium</i> sp.	81	Copeland <i>et al.</i> , 2008
MM 10	NC_010511.1	<i>Methylobacterium</i> sp.	97	Copeland <i>et al.</i> , 2008
MM 11.1	NC_009720.1	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	86	Copeland <i>et al.</i> , 2007
MM 11.2	NC_009720.1	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	86	Copeland <i>et al.</i> , 2007
MM 12	NZ_ABEX01000007.1	<i>Methylobacterium chloromethanicum</i>	93	Copeland <i>et al.</i> , 2007
MM 14	NC_010515.1	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	94	Copeland <i>et al.</i> , 2008
MM 16	NZ_AASL01000001.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	85	Hofreuter <i>et al.</i> , 2006
MM 18	NZ_ABEX01000017.1	<i>Methylobacterium chloromethanicum</i>	87	Copeland <i>et al.</i> , 2007

representantes são exclusivamente marinhos. Porém, um estudo realizado por Jurado *et al.* (2006) com o gênero *Aurantimonas* em Cantabria, Espanha, identificou o primeiro membro desta família isolada de ambiente terrestre. Dessa forma, pode-se sugerir que os isolados obtidos das amostras de solo de Rondônia, podem ser novos representantes bacterianos deste grupo taxonômico encontrados em ecossistemas terrestres.

Os isolados MM 9 e MM 10 apresentaram similaridade com *Methylobacterium* sp. de 81 e 97%, respectivamente. Segundo um estudo desenvolvido por Omi *et al.* (2007), no Japão, a bactéria *Methylobacterium* sp. foi descrita como produtora de enzimas denominadas de dehalogenase, que no ambiente promovem a degradação de compostos como pesticidas, herbicidas e solventes. Representantes do gênero *Methylobacterium*, cuja similaridade foi de 97%, foram encontrados nos solos de Rondônia.

Os isolados MM 12 e 18 tiveram suas seqüências similares com *Methylobacterium chloromethanicum*, com 93 e 87%, respectivamente. Este microrganismo é descrito na literatura como uma espécie distinta das demais do gênero, devido a sua capacidade de crescer com clorometano como única fonte de carbono e energia. Estudos fisiológicos e genéticos já demonstraram que os genes

*cmuA* e *cmuB*, presentes em *Methylobacterium chloromethanicum* são essenciais para o crescimento deste microrganismo em meio contendo o composto clorometano e estes genes codificam as proteínas responsáveis pela desalogenização deste composto (Studer *et al.*, 2002).

Os isolados MM 11.1 e 11.2 apresentaram 86% de similaridade com *Xanthobacter autotrophicus*, que são caracterizadas por serem bactérias Gram-negativas fixadoras de nitrogênio. Estudos realizados por Jansen *et al.* (1985), relataram que esta espécie é capaz de degradar haloalcanos, compostos presentes em pesticidas e que causam sérias poluições ambientais, como é o caso dos clorofluorcarbonos (CFCs) um haloalcano que ganhou certo destaque na imprensa em virtude de seu impacto negativo sobre o ambiente.

O isolado MM 16 apresentou similaridade de 85% com *Campylobacter jejuni*. Este microrganismo possui resistência a contaminação por cádmio, e possuem habilidades em utilizar como fonte de energia compostos orgânicos (Nadeem *et al.*, 2008).

Todos os isolados bacterianos obtidos possuem capacidade para degradar compostos orgânicos poluentes ao meio ambiente, e levando em consideração que estes microrganismos foram provenientes de solo com histórico de uso do

herbicida 2,4-D, os resultados obtidos indicam que as bactérias presentes no solo foram aptas a crescer em meio mineral contendo 2,4-D como fonte única de carbono, resistindo a sua toxicidade até concentração de 200mg.l<sup>-1</sup>. Desta forma, pode-se considerar estes microrganismos como potenciais degradadores deste composto.

### Conclusões

Para o consórcio de microrganismo, as medidas de turbidez mostraram que ocorreu um baixo crescimento de bactérias no meio mineral onde eles se encontravam. No que diz respeito ao isolamento por esgotamento de estrias o material microbiano mostrou um crescimento acelerado. E, portanto pode-se assim selecionar as colônias puras e submetê-las a identificação de Gram e cápsula, onde se obteve 19 isolados bacterianos, sendo que 13 são linhagens bacterianas do tipo bacilos Gram-negativos e sem cápsula e 6 linhagens bacterianas do tipo Gram-positivo e sem cápsula. Os resultados do sequenciamento do gene rRNA 16S dos isolados obtidos das culturas cultivadas em meio mineral contendo o 2,4-D como fonte única de carbono identificou representantes bacterianos de *Methylobacterium* sp., *Xanthobacter autotrophicus*, *Burkholderia cenocepacia*, *Aurantimonas* sp., *Campylobacter Jejuni*, *Methylobacte-*

*rium chloromethanicum* que foram encontrados em amostras de solo do Estado de Rondônia e apresentaram resistência a toxicidade do 2,4-D.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Vivian H. Pellizari e Cristine Barreto, do Instituto Oceanográfico (Universidade São Paulo) e da Universidade Católica de Brasília (UCB), pelo suporte nas análises de biologia molecular. Ao CNPq-CT-Biotecnologia, processo número 553269/2005-4, pela bolsa concedida.

### REFERÊNCIAS

- APHA (1995) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19ª ed. APHA, WWA, WPCR. Washington, DC, EEUU.
- Araújo ASF (2002) *Biodegradation, Extraction and Analysis of Glyphosate in Two Different Soil Types*. Tese. Universidade de São Paulo. Piracicaba, Brasil. 72 pp.
- Borneman J, Triplett EW (1997) Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl. Env. Microbiol.* 63: 2647-2653.
- Coelho RRR, Pereira AF, Souto-Padron T, Vermelho AB (2006) *Practical Microbiology*. 1ª ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, Brasil. 239 pp.
- Copeland A, Lucas S, Lapidus A, Barry K, Glavina Del Rio T, Dalin E, Tice H, Bruce D, Pitluck S, Richardson P (2007) Sequencing of the draft genome and assembly of *Methylobacterium chloromethanicum* CM4. US DOE Joint Genome Institute (JGI-PGF).
- Copeland A, Lucas S, Lapidus A, Glavina Del Rio T, Dalin E, Tice H, Bruce D, Goodwin L, Pitluck S, Chertkov O, Brettin T, Detter JC, Han C, Kuske CR, Schmutz J, Larimer F, Land M, Hauser L, Kyrpidis N, Ivanova N, Marx CJ, Richardson P (2008) Complete sequence of chromosome of *Methylobacterium* sp. CONSRTM US DOE Joint Genome Institute.4-46.
- Custódio FA (2007) *Main Pesticides Commercialized in the*

- City of Ji-Paraná/RO in 2007 that Offer Risk of Contamination to the Environment*. Monografia de Especialização em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Rondônia. Brasil. 32 pp.
- Da Silva JMC, Rylands AB, Da Fonseca GAB (2005) The fate of the Amazonian areas of endemism. *Cons. Biol.* 19: 689-694.
- Dick GJ, Podell S, Johnson HA, Rivera-Espinoza Y, Bernier-Latmani R, Mccarthy JK, Torpey JW, Clement BG (2008) Genomic insights into Mn (II) oxidation by the marine alphaproteobacterium *Aurantimonas* sp. strain SI85-9A1. *J. Appl. Env. Microbiol.* 74: 2646-2658.
- Fierer N, Bradford MA, Jackson RB (2007) Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88: 1354-1364.
- Janssen DB, Scheper A, Dijkhuizen L, Witholt B (1985) Degradation of halogenated aliphatic compounds by *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *Appl. Env. Microbiol.* 49: 673-677.
- Jurado V, Gonzalez JM, Laiz L, Saiz-Jimenez C (2006) *Aurantimonas altamirensis* sp. nov., a member of the order Rhizobiales isolated from Altamira Cave. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 56: 2583-2585.
- Kim JS, Sparovek G, Longo RM, De Melo WJ, Crowley D (2007) Bacterial diversity of terra preta and pristine forest soil from the Western Amazon. *Soil Biol. Biochem.* 39: 684-690.
- Lewinsohn TM, Prado PI (2005) How many species are there in Brazil? *Cons. Biol.* 19: 619-626.
- Madeu R (2007) *The Bacterial Diversity of Burkholderia in Archeological Black Earth Determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and DNA Sequencing*. Tese. Universidade de São Paulo. Piracicaba, Brasil. 71 pp.
- Montiel EM, Ordaz NR, Granados CR, Ramirez CJ, Mayer CJG (2006) 2,4-D-degrading bacterial consortium isolation, kinetic characterization in batch and continuous culture and application for bioaugmenting an activated sludge microbial community. *Proc. Biochem.* 41: 1521-1528.
- Nadeem O, Kaakoush MR, Mendz GL (2008) Molecular responses of *Campylobacter jejuni* to cadmium stress. *FEBS J.* 275: 5021-5033.
- Omi R, Jitsumori K, Yamauchi T, Ichiyama S, Kurihara T, Esaki N, Kamiya N, Hirotsu K, Miyahara I (2007) Expression, purification and preliminary X-ray characterization of DL-2-haloacid dehalogenase from *Methylobacterium* sp. CPA1. *Acta Cryst Jap.* 67: 586-589.
- Santos DF (2007) Microbiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolated in the hospital environment of patients with nosocomial infection. Tese. Viçosa: UFV. *Dissertação de mestrado apresentado a Universidade Católica de Goiás*. Brasil. 65 pp.
- Silva AA, Silva JF (2007) *Topics in Weed Management*. Universidade Federal de Viçosa. Brasil. 150 pp.
- Studer A, Mcanulla C, Büchele R, Leisinger T, Vuilleumier S (2002) Chloromethane-Induced genes define a third C<sub>1</sub> utilization pathway in *Methylobacterium chloromethanicum* CM4. *J. Bacteriol.* 184:3476-3484.
- Tiedje JM, Asuming-Brempong S, Nusslein K, Marsh TL, Flynn SJ (1999) Opening the black box of soil microbial diversity: *Appl. Soil Ecol.* 13: 109-122.
- Vieira EM, Prado AGS, Landgraf MD, Rezende MOO (1998) Study of adsorption/desorption of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in soil in the absence and presence of organic matter. *Quím. Nova* 22: 305-308.
- Wilson K (1987) Preparation of genômica DNA from bacteria. Em Ausubel FM, Brent R, Kingston R, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (Eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley. Nova Iorque, EEUU. pp. 241-245.