

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

EDUARDO JOSÉ PEDROSO PRITSCH

**EFEITO DE HERBICIDAS SINTÉTICOS SOBRE LEVEDURAS DA MICROBIOTA
DE INSETOS POLINIZADORES**

ERECHIM

2024

EDUARDO JOSÉ PEDROSO PRITSCH

**EFEITO DE HERBICIDAS SINTÉTICOS SOBRE LEVEDURAS DA MICROBIOTA
DE INSETOS POLINIZADORES**

Dissertação de mestrado apresentada ao
programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia Ambiental - PPGCTA da Universidade
Federal da Fronteira Sul - UFFS, *campus* Erechim,
como requisito para obtenção do título de Mestre
em Ciência e Tecnologia Ambiental

Orientadora: Dra. Helen Treichel
Coorientadores: Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior e Dr. Altemir José Mossi

**ERECHIM
2024**

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Pritsch, Eduardo José Pedroso
EFEITO DE HERBICIDAS SINTÉTICOS SOBRE LEVEDURAS DA
MICROBIOTA DE INSETOS POLINIZADORES / Eduardo José
Pedroso Pritsch. -- 2024.
78 f.:il.

Orientadora: Dra. Helen Treichel
Coorientadores: Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior, Dr.
Altemir José Mossi
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia Ambiental, Erechim, RS, 2024.

1. Pesticidas. 2. Glifosato. 3. 2,4-D. 4. Ácido
indol-3-acético. 5. Biorremediação. I. Treichel, Helen,
orient. II. Júnior, Sérgio Luiz Alves, co-orient. III.
Mossi, Altemir José, co-orient. IV. Universidade Federal
da Fronteira Sul. V. Título.

EDUARDO JOSÉ PEDROSO PRITSCH

**EFEITO DE HERBICIDAS SINTÉTICOS SOBRE LEVEDURAS DA MICROBIOTA
DE INSETOS POLINIZADORES**

Dissertação de mestrado apresentada ao
programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia Ambiental - PPGCTA da Universidade
Federal da Fronteira Sul - UFFS, *campus* Erechim,
como requisito para obtenção do título de Mestre
em Ciência e Tecnologia Ambiental

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 26/11/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Helen Treichel – UFFS
Orientadora

Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior – UFFS
Coorientador

Prof. Dr. Altemir José Mossi – UFFS
Coorientador

Prof.^a Dr.^a Gislaine Fongaro – UFSC
Avaliador

Dr.^a Angela Alves dos Santos – UFSC
Avaliador

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão à Universidade Federal da Fronteira Sul, instituição que viabilizou minha trajetória acadêmica, tanto na graduação em Agronomia, no *campus* Chapecó, quanto no mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental, no *campus* Erechim.

Agradeço imensamente aos meus pais, Valdete e Ari, pelo apoio incondicional e pela paciência durante os sete anos em que estive vinculado à universidade. Sou igualmente grato à minha companheira, Patrícia, minha maior incentivadora para ingressar no mestrado e que, ao longo de todo o processo, me apoiou incansavelmente na realização deste trabalho.

Dedico um agradecimento especial aos meus orientadores, por seu apoio, paciência e valiosos ensinamentos, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e para meu crescimento acadêmico e pessoal. Estendo ainda meu reconhecimento às equipes do Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos (LAMIBI), no *campus* Erechim, e do Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), no *campus* Chapecó, especialmente às colegas Aline Frumi Camargo e Camila Girardi de Oliveira, pelo suporte nas rotinas dos respectivos laboratórios.

Aos professores do PPGCTA, por cada ensinamento e experiência compartilhados em suas disciplinas, deixo meu sincero agradecimento. E, finalmente, registro minha gratidão à equipe técnica e administrativa da UFFS, sempre solícita e incansável em auxiliar nas atividades do curso, e a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho, suas contribuições foram essenciais para que este projeto se tornasse possível.

RESUMO

A produção de alimentos é mundialmente baseada na agricultura convencional, e faz uso de quantidades cada vez mais exorbitantes de produtos sintéticos para controlar as pragas presentes no campo, o que gera contaminação de alimentos, exposição do agricultor a produtos tóxicos e impacto à microbiota presente nas áreas agrícolas. Esses microrganismos (incluindo as leveduras, que são fungos unicelulares), além de serem úteis a diversas aplicações biotecnológicas, realizam diversos serviços ecossistêmicos, promovendo crescimento e defesa de organismos vegetais e contribuindo para o equilíbrio ecológico do ambiente. Este trabalho foi desenvolvido em duas partes: no capítulo 1, encontra-se um artigo de revisão que ressalta a importância das leveduras no ambiente, o impacto que produtos sintéticos causam a elas e os mecanismos de resistência desenvolvidos por esses microrganismos. No capítulo 2, são apresentados dados de testes laboratoriais realizados com sete linhagens de leveduras selvagens da coleção do Laboratório de Bioquímica de Leveduras do *Campus* Chapecó da UFFS, previamente isoladas dos insetos *Astylus variegatus*, *Tetragonisca angustula* e *Scaptotrigona postica*. As cepas de leveduras foram inoculadas em meio YPD líquido junto a herbicidas sintéticos com os ingredientes ativos glifosato (nas concentrações de 3,255 g/L, 6,51 g/L, 13,02 g/L, e 26,04 g/L) e 2,4-D (nas concentrações de 1,51 g/L, 3,02 g/L, 6,045 g/L e 12,09 g/L) e mantidas por 48 h a 30 °C em agitador orbital a 145 rpm. Amostras foram retiradas no tempo zero e às 14, 24, 38 e 48 horas de cultivo a fim de determinar o crescimento celular. Em paralelo, foram investigados também os potenciais das leveduras quanto à degradação do herbicida auxínico 2,4-D, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, e à produção de ácido indol-3-acético (AIA), por meio de um método colorimétrico com o reagente de Salkowski em espectrofotômetro a 530 nm. Os resultados obtidos demonstram que o herbicida glifosato impediu o crescimento das leveduras em todas as concentrações testadas dentro das 48 horas de cultivo. Em contrapartida, as leveduras apresentaram maior tolerância ao herbicida 2,4-D. Neste caso, os crescimentos celulares diminuíram e as fases de latência aumentaram proporcionalmente com o aumento de concentração do pesticida no meio de cultivo. Dentre as cepas tolerantes, a CHAP-237 se destacou pela capacidade de reduzir a quantidade do 2,4-D no meio, tanto em baixas como em altas concentrações do herbicida, o que sugere uma possível utilização desta levedura como ferramenta de biorremediação. Na produção de AIA, destacou-se a cepa CHAP-239 ao produzir mais de 3,7 mg/L da auxina, indicando potencial uso dessa linhagem na indução do crescimento de plantas e na germinação de sementes. Os resultados obtidos, portanto, evidenciam diferentes possibilidades de aplicações biotecnológicas de leveduras selvagens. Esses microrganismos podem ser explorados pela ciência a fim de desenvolver alternativas à agricultura e promover crescimento na produtividade vegetal com menores impactos ao ambiente.

Palavras-chave: pesticidas, glifosato, 2,4-D, ácido indol-3-acético, biorremediação.

ABSTRACT

Food production is based worldwide on conventional agriculture and uses increasingly exorbitant amounts of synthetic products to control pests in the field, which leads to food contamination, farmer exposure to toxic products, and impact on the microbiota present in agricultural areas. Besides being useful for various biotechnological applications, these microorganisms (including yeasts, which are unicellular fungi) perform several ecosystem services, promoting the growth and defense of plant organisms and contributing to the ecological balance of the environment. This work was developed in two parts: Chapter 1 contains a review article highlighting the importance of yeasts in the environment, the impact synthetic products have on them, and the resistance mechanisms developed by these microorganisms. Chapter 2 presents data from laboratory tests performed with seven wild yeast strains from the collection of the Laboratory of Yeast Biochemistry of the Campus Chapecó of UFFS, previously isolated from the insects *Astylus variegatus*, *Tetragonisca angustula*, and *Scaptotrigona postica*. The yeast strains were inoculated in liquid YPD medium containing synthetic herbicides with the active ingredients glyphosate (at concentrations of 3.255 g/L, 6.51 g/L, 13.02 g/L, and 26.04 g/L) and 2,4-D (at concentrations of 1.51 g/L, 3.02 g/L, 6.045 g/L, and 12.09 g/L) and maintained for 48 h at 30 °C in an orbital shaker at 145 rpm. Samples were taken at time zero and 14, 24, 38, and 48 h of culture to determine cell growth. In parallel, the potential of yeasts was also investigated for the degradation of the auxinic herbicide 2,4-D, by high-performance liquid chromatography, and for the production of indoleacetic acid (IAA), by a colorimetric method with the Salkowski reagent in a spectrophotometer at 530 nm. The results demonstrate that the herbicide glyphosate prevented the growth of yeasts at all concentrations tested within 48 hours of cultivation. In contrast, yeasts showed enhanced tolerance to the herbicide 2,4-D. In this case, cell growths decreased and latency phases increased proportionally with the increase in pesticide concentration in the culture medium. Among the tolerant strains, CHAP-237 stood out for its ability to reduce the amount of 2,4-D in the medium, both at low and high concentrations of the herbicide, which suggests a possible use of this yeast as a bioremediation tool. In the production of IAA, the strain CHAP-239 stood out, producing over 3.7 mg/L of the auxin, indicating the potential use of this strain in inducing plant growth and seed germination. Therefore, our results highlight different possibilities for biotechnological applications of wild yeasts. These microorganisms can be explored by science in order to develop alternatives to agriculture and promote growth in plant productivity with less impact on the environment.

Keywords: pesticides, glyphosate, 2,4-D, indole-3-acetic acid, bioremediation,

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figure 1.** Examples of ecological services performed by plant-associated yeasts. Abbreviations: VOCs, Volatile organic compounds; SA, Salicylic acid; ET, Ethylene; JA, Jasmonic acid; IAA, Indol-acetic acid; Zn, Zinc; Fe, Iron; N, Nitrogen; P, Phosphorus. 14
- Figure 2.** Metabolic pathways for Indole-Acetic Acid (IAA) production by yeast cells from sugars (glucose and xylose). Glycolysis, Pentose-Phosphate Pathway (PPP), and Shikimate Pathway were almost entirely condensed because they are classic (well-known) metabolic pathways. The enzymes (and their isoenzymes) involved in each reaction are represented by their respective three-letter codes followed by numbers: TRP2 - Anthranilate synthase component 1, TRP4 - Anthranilate phosphoribosyltransferase, TRP1 - N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase, TRP3 - Indole-3-glycerol-phosphate synthase, TRP5 - Tryptophan synthase, ARO8 - Aromatic/amino adipate aminotransferase 1, ARO9 - Aromatic amino acid aminotransferase 2, PDC1 - Pyruvate decarboxylase isozyme 1, PDC5 - Pyruvate decarboxylase isozyme 2, PDC6 - Pyruvate decarboxylase isozyme 3, ALD2 - Aldehyde Dehydrogenase, ALD3 - Aldehyde Dehydrogenase. CdRP stands for 1-(2-carboxyphenylamino)-1-deoxy-D-ribulose 5-phosphate. Sources: [29–34]. 17
- Figure 3.** Examples of the negative impacts of pesticides on yeasts and economic activities that depend on these microorganisms. Pesticides can lead to the death of yeast cells, disrupting flower dynamics and negatively affecting pollinator attraction (a). In the case of 2,4-D molecules, cell death may occur due to cytoplasmic acidification and subsequent oxidative stress (b). Yeast death also alters industrial processes that rely on these microorganisms as part of the natural microbiota of their raw materials, such as the production of naturally leavened breads (c) and wine. In the winery environment, the presence of pesticides on grapes can facilitate the proliferation of *S. cerevisiae* to the detriment of *H. uvarum* (d). Glyphosate, another widely used pesticide, also impairs the metabolism of yeast cells (e), especially by preventing the synthesis of aromatic amino acids (see the text for more details). 24
- Figure 4.** Chemical structures of (a) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D); (b) 2,2-dimethyl-3H-1-benzofuran-7-yl) N-methylcarbamate (Carbofuran); (c) 2-(phosphonomethylamino) acetic acid (Glyphosate); (d) 3,4-dimethyl-2,6-dinitro-N-pentan-3-ylaniline (Pendimethalin); and, (e) 6-chloro-4-N-ethyl-2-N-propan-2-yl-1,3,5-triazine-2,4-diamine (Atrazine). Source: [79]. 26
- Figure 5.** Yeast-cell surface display strategy. Through genetic engineering, heterologous degradation enzymes can be displayed at the yeast cell wall when attached to a carrier protein with a signal peptide and an anchor system (either GPI or Flo1p — see the text for additional details). In this way, pesticides can be transformed into less-toxic compounds outside the yeast cells. 34
- Figure 6.** Scientific production related to yeasts in agriculture in the years 2004-2024. The search terms used were “yeasts AND agriculture AND bioremediation”. 35
- Figura 7.** Curvas de produção de ácido indol-3-acético (em mg/L) pelas cepas selvagens durante as 48 horas de fermentação. 55
- Figura 8.** Curvas de crescimento das leveduras expostas a diferentes concentrações de herbicidas a base de glifosato e 2,4-D. 59
- Figura 9.** Porcentagem de redução de 2,4-D após as 48 horas de fermentação por leveduras. 67

LISTA DE TABELAS

Table 1. Physiological processes through which yeasts promote plant growth.	15
Table 2. Antagonistic activities exerted by yeasts.	18
Table 3. Examples of pesticide-degradation processes performed by yeasts	30
Tabela 4. Quantidade de ácido indol-3-acético (mg/L) produzido pelas cepas após 48 h de cultivo. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de três experimentos independentes.	55

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
1. CAPÍTULO 1 – A TWO-WAY STREET: HOW ARE YEASTS IMPACTED BY PESTICIDES, AND HOW CAN THEY HELP SOLVE AGROCHEMICAL CONTAMINATION PROBLEMS?	12
1.1. INTRODUCTION	12
1.2. THE CONTRIBUTION OF SOIL YEASTS TO PLANT HEALTH	14
1.3. THE ECOLOGICAL IMPORTANCE OF YEASTS BEYOND SOIL	20
1.4. IMPACTS OF PESTICIDES ON YEAST MICROBIOTA	21
1.5. YEASTS AS POTENTIAL BIOREMEDIATORS	24
1.6. ENGINEERING YEASTS FOR PESTICIDE DEGRADATION	31
1.7. YEASTS FOR SUSTAINABLE AGRICULTURE: CHALLENGES AND AVENUES	34
1.8. CONCLUSION	36
1.9. REFERENCES	36
2. CAPÍTULO 2 - EFEITO DE HERBICIDAS SINTÉTICOS SOBRE LEVEDURAS DA MICROBIOTA DE INSETOS POLINIZADORES, PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO E DEGRADAÇÃO DO 2,4-D	45
2.1. INTRODUÇÃO	45
2.1.1. Efeito de herbicidas sobre microrganismos associados a ambientes agrícolas	49
2.2. OBJETIVOS	51
2.2.1. Objetivo Geral	51
2.2.2. Objetivos Específicos	51
2.3. MATERIAL E MÉTODOS	52
2.3.1. Leveduras	52
2.3.2. Cultivos celulares na presença de herbicidas sintéticos	53
2.3.3. Análise da degradação do 2,4-D pelas leveduras	53
2.3.4. Análise de produção do Ácido indol-3-acético	54
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
2.4.1. Produção de Ácido Indol-3-Acético	54
2.4.2. Crescimento das leveduras expostas aos herbicidas comerciais	58
2.4.3. Ingrediente ativo: glifosato	60
2.4.4. Ingrediente ativo: 2,4-D	62
2.4.5. Biorremediação da Molécula de 2,4-D	66
2.5. CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	72

INTRODUÇÃO

O crescimento populacional, a crescente demanda por alimentos e o modelo convencional de produção agrícola, marcado pelo uso intensivo de produtos sintéticos, levantam preocupações sobre os impactos ambientais associados a essas práticas. Os efeitos adversos desses insumos em espécies não-alvo são cada vez mais frequentes e, muitas vezes, passam despercebidos pelos agricultores, resultando em prejuízos diretos ao meio ambiente e à biodiversidade local, além de impactos indiretos nas culturas agrícolas de interesse.

Entre os microrganismos afetados, destacam-se as leveduras, que desempenham papéis fundamentais nos ecossistemas agrícolas. Essas leveduras não apenas contribuem para a reprodução vegetal, ao atrair insetos polinizadores para as flores de espécies angiospermas, como também interagem com a microbiota intestinal desses insetos, estabelecendo um equilíbrio essencial para a manutenção de sistemas ecológicos estáveis.

A exposição dessas leveduras a moléculas pesticidas pode provocar desequilíbrios graves nos ecossistemas agrícolas. Esse impacto inclui a mortalidade de insetos polinizadores, comprometimento da reprodução vegetal e alterações na biodiversidade microbiana local, abrindo espaço para o surgimento de espécies patogênicas, que podem causar danos significativos às culturas de interesse agrícola.

Com o objetivo de aprofundar o entendimento sobre a relevância ecológica dessas leveduras e avaliar os efeitos de pesticidas sobre elas, esta dissertação foi estruturada em dois capítulos.

O primeiro capítulo consiste em um artigo de revisão, que reúne e analisa as contribuições mais recentes da literatura científica sobre o tema. Este artigo foi publicado na revista *Processes* (ISSN: 2227-9717) em 15 de novembro de 2024 e pode ser acessado no link: <https://doi.org/10.3390/pr12112555>.

No segundo capítulo, foram investigadas as capacidades de cepas isoladas de insetos polinizadores para produzir ácido indol-3-acético e degradar o ingrediente ativo do herbicida 2,4-D. Adicionalmente, avaliou-se o impacto de herbicidas à base de glifosato e 2,4-D sobre o crescimento celular dessas cepas selvagens.

1. **CAPÍTULO 1 – A TWO-WAY STREET: HOW ARE YEASTS IMPACTED BY PESTICIDES, AND HOW CAN THEY HELP SOLVE AGROCHEMICAL CONTAMINATION PROBLEMS?**

Abstract: Plant-associated yeasts play significant ecological roles within the microbiomes of soils and pollinating insects. In previous studies, we have shown that yeasts can assist pollinators in locating nectar, which is crucial for their nutrition and for the reproduction of many angiosperms. Additionally, in soil, yeasts can also act as plant-growth promoters. Given the importance of yeasts for plant development, this review first explores the biochemical processes underlying the ecological role of these microorganisms in soil, insects, and in direct association with plants. Based on this premise, we discuss the influence of these relationships on agricultural production, the biological mechanisms through which pesticides negatively affect yeast cells, and how these microorganisms can tolerate widely used agrochemicals. Finally, we address key studies in the literature that support the potential of these microorganisms as bioremediation agents. In this context, we emphasize different experiences with both indigenous and genetically engineered yeasts, which may display enzymes in their surfaces that convert pesticides into less harmful or non-toxic molecules. Our review indicates that yeasts can be effectively harnessed in organic agriculture to promote plant growth and bioremediate contaminated soil or food.

Keywords: soil yeast; bioremediation; organic agriculture; plant-growth promoter, indol-acetic acid, genetic engineering, 2,4-D, glyphosate, whole-cell yeast biocatalysts, *Saccharomyces cerevisiae*.

1.1. INTRODUCTION

As food production rises due to population growth, the use of chemicals in agriculture seems to be an inevitable practice. However, although these agrochemicals enhance crop productivity, they also raise significant environmental concerns, particularly regarding their persistence in the soil and food supply [1].

To determine the destination of the residual load of these compounds, it is essential to consider the soil's nutrient composition and classification. Pesticides can affect the pH, moisture levels, organic matter content, and microbial communities in various environments. On the other hand, the environment microbiota can include bacteria and fungi that are often capable of playing important roles in the biodegradation process of these residues [2].

Yeasts are among the microorganisms associated with plants that can be affected to a greater or lesser extent by the use of pesticides. These unicellular fungi play critical ecological roles, either as natural plant defenders against pathogens, plant growth promoters, or producers of volatile organic compounds (VOCs) that

attract pollinators to flowers. Yeasts also play a prominent role in nutrient cycling (biogeochemical cycles) and contribute significantly to the digestive and immune systems of herbivores, pollinivores, and nectarivores [3,4].

Since the Neolithic Revolution, yeasts have become the most commonly used microorganisms by humans. It is believed that these single-celled fungi played a crucial role in the transition from a nomadic hunting-gathering lifestyle to the establishment of permanent settlements and the development of agriculture. Yeasts gained widespread recognition due to their use in the production of beer, wine, bread, and fuel ethanol. However, their applications in industry extend far beyond these areas. In fact, yeasts contribute to a market valued at over USD 1.3 trillion annually [5].

Additionally, yeasts are easily and thus widely genetically engineered. Successful yeast transformation processes have led to significant advances in biotechnology, including the production of human insulin by yeast cells, which has been happening since the early 1980s [6,7]. Genetically modified yeasts can also be used as bioremediation agents [8], increasing their importance for environmental and agricultural purposes.

If, thousands of years ago, yeasts played a role in the early development of agriculture, recently, studies have indicated that they can enhance organic food production [9]. This is due to their innate capacity to interact with plants, other microorganisms, and various abiotic factors in the environment. Moreover, the literature suggests that yeasts can degrade some pesticides commonly used in traditional agricultural practices over the past few decades. With this in mind, in the following sections we address the biochemical processes involved in the ecological roles of yeasts that benefit plant development, the harmful effects of pesticides on these microorganisms, and how their cells can act as agrochemical degraders.

The literature was reviewed on the basis of our previous studies and experiences over the past few years. The initial searches employed the following terms in the Scopus database: "yeast AND agriculture", "yeast AND pesticide", "yeast AND plant growth", "yeast AND biocontrol", "yeast AND Indole-3-acetic acid OR IAA", and "yeast AND agriculture AND bioremediation" (no additional filters were used in these searches). References were selected for their relevance to the subject of this

study. Additionally, foundational articles were sometimes used as starting points, which led to more recent articles that cited them.

1.2. THE CONTRIBUTION OF SOIL YEASTS TO PLANT HEALTH

For hundreds of millions of years, yeasts have evolved and established their role in the ecological balance, thriving in a wide range of environments [3]. In these habitats, these microorganisms are not merely passive; rather, they actively engage in numerous biological activities and participate in a complex mix of biochemical reactions that have various effects on the environments they colonize [10]. A summary of the ecological services that yeasts provide to plants is illustrated in Figure 1.

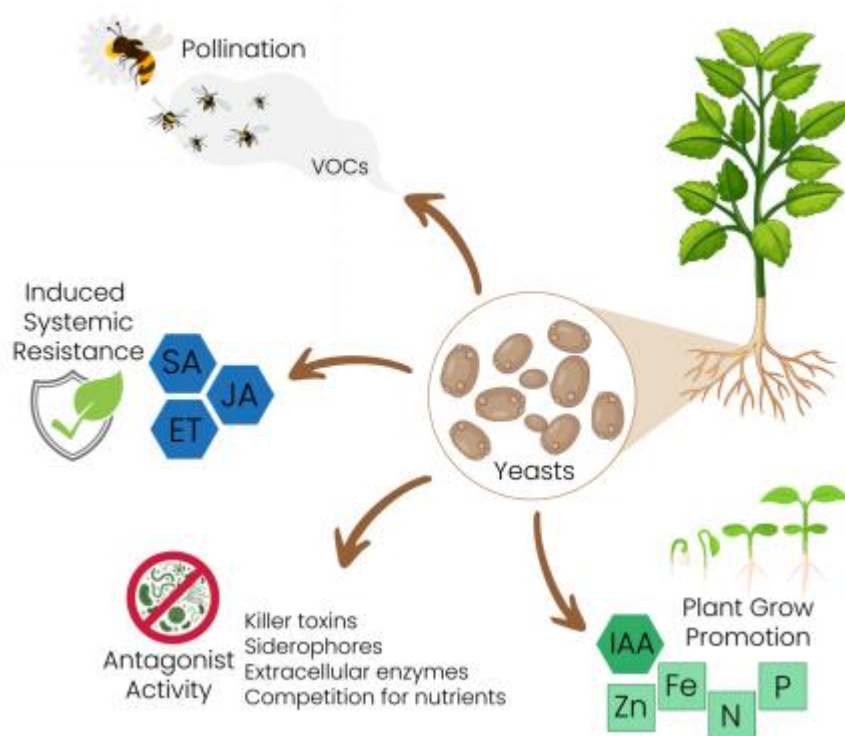


Figure 1. Examples of ecological services performed by plant-associated yeasts. Abbreviations: VOCs, Volatile organic compounds; SA, Salicylic acid; ET, Ethylene; JA, Jasmonic acid; IAA, Indole-3-acetic acid; Zn, Zinc; Fe, Iron; N, Nitrogen; P, Phosphorus.

One of the yeasts' most challenging habitats is the soil, which dwells several microbial species that biochemically interact and alter the environment's physical, chemical, and biological characteristics [11]. Regarding the physical changes, the presence of yeasts contributes to soil aggregate formation and maintenance, which is crucial for enhancing soil aeration, water infiltration, and root penetration (Botha,

2011). Additionally, certain soil yeasts have the ability to form biofilms, which can stabilize soil particles and further improve soil structure (Ramya *et al.*, 2021). However, the chemical and biological changes exerted by yeasts in the soil are even more significant, as explored in greater detail below.

The surface layers of the soil concentrate most of the organic matter and biological activity of this system [12]. Consequently, the greatest diversity of yeast species is found in this environment [13,14]. There, in their quest for survival, these microorganisms provide essential ecological services that support the growth of other living organisms, including their development [15]. In fact, yeasts can act as plant growth promoters (Table 1).

Table 1. Physiological processes through which yeasts promote plant growth.

Yeast Species	Physiological Process	Reference
<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Myriangiales</i> sp., <i>Occultifur brasiliensis</i> , <i>Candida silvae</i> , <i>Cryptococcus podzolicus</i>	Nitrogen and Carbon availability	[16]
<i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Issatchenkia terricola</i>	Phosphorus availability, IAA ¹ production	[17]
<i>Cryptococcus flavus</i> , <i>Candida railenensis</i>	Phosphorus availability	[18]
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> , <i>Candida zemplinina</i> , <i>Candida pimensis</i> , <i>Lachancea lanzarotensis</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	IAA ¹ production	[15]
<i>Kazachstania rupicola</i> , <i>Rhodospiridium</i> <i>diabovatum</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IAA ¹ production	[19]
<i>Hannaella sinensis</i> , <i>Cryptococcus flavus</i> , <i>Rhodospiridium paludigenum</i> , <i>Torulaspora</i> <i>globosa</i>	IAA ¹ , NH ₃ , and siderophore production	[20]
<i>Papiliotrema laurentii</i> , <i>Wickerhamomyces</i> <i>anomalus</i>	IAA ¹ and NH ₃ Production, Calcium and Zinc solubilization	[21]
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	IAA ¹ and siderophore production, Phosphorus solubilization	[22]
<i>Cryptococcus flavus</i> , <i>Hannaella coprosmaensis</i> , <i>Pseudozyma aphidis</i> , <i>Sporisorium reilianum</i> , <i>Ustilago esculenta</i>	IAA ¹ production	[23]
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Cystobasidium</i> <i>sloffiae</i>	IAA ¹ production	[24]
<i>Schwanniomyces occidentalis</i> , <i>Cyberlindnera</i> <i>saturnus</i> , <i>Candida tropicalis</i>	NH ₃ production, Phosphorus and Zinc solubilization	[25]
<i>Cryptococcus</i> sp.	Phosphorus solubilization	[26]
<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Candida</i> sp., <i>Dothideomycetes</i> sp., <i>Galactomyces candidum</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Meyerozyma caribbica</i> , <i>Barnettozyma californica</i> , <i>Pseudozyma aphidis</i>	IAA ¹ and NH ₃ Production, Phosphorus and Zinc solubilization	[27]

¹Indol-acetic acid.

Yeasts play a prominent role in nutrient cycling, by releasing enzymes that catalyze the transformation of molecules, breaking them down into smaller units

(monomers) that can be more easily utilized by other organisms. In this context, it is worth mentioning nitrogen as one of the elements made available in the environment through the action of yeasts [28]. The proteolytic enzymes secreted by yeasts increase the availability of essential elements to other microorganisms and plants. In addition to the source of nitrogen, the availability of carbon is also vital for the growth and development of other species. Enzymes such as xylanases, amylases, pectinases, and cellulases are examples of those that help release more assimilable carbon sources into the environment [16].

Phosphorus-based nutrients are some of the most required by plant species. Their presence in the soil directly impacts plant growth [18]. This nutrient is often found in forms that are not available to plants; however, yeasts such as *Pichia kudriavzevii* and *Issatchenkia terricola* were found to provide this essential element in forms that are better assimilated by plants, generating an increase of 80.31% and 50.90% (respectively, with *P.* and *I. terricola*) in the growth of mung bean roots [17].

An increase in phosphorus solubilization has also been observed from the activity of other yeast species, such as *Cryptococcus flavus* and *Candida railenensis*. When inoculated into the corn rhizosphere, these yeasts induced an increase in root growth of 53% and 34%, respectively. This increase in growth was linked to improved phosphorus absorption by the plants, especially when the yeasts were inoculated in consortia with mycorrhizal fungi. Consequently, a synergistic effect among these species was observed, as the enhanced development of the plant's aerial parts (26% increase) correlated with a 20% to 29% rise in phosphorus absorption [18].

In addition to the greater availability of nutrients, yeasts also promote plant growth by other means, such as the production and release of compounds related to plant growth stimulation, especially indole-3-acetic acid (IAA). Yeasts of the species *Meyerozyma guilliermondii*, *Candida zemplinina*, *Candida pimensis*, *Lachancea lanzarotensis*, *Rhodotorula mucilaginosa* [15], *Pichia kudriavzevii*, *Issatchenkia terricola* [17], *Kazachstania rupicola*, *Rhodospiridium diabovatum*, and *Saccharomyces cerevisiae* [19] have already been reported as good IAA producers. The yeast metabolic pathways involved in the production of this important plant-growth promoter are summarized in Figure 2.

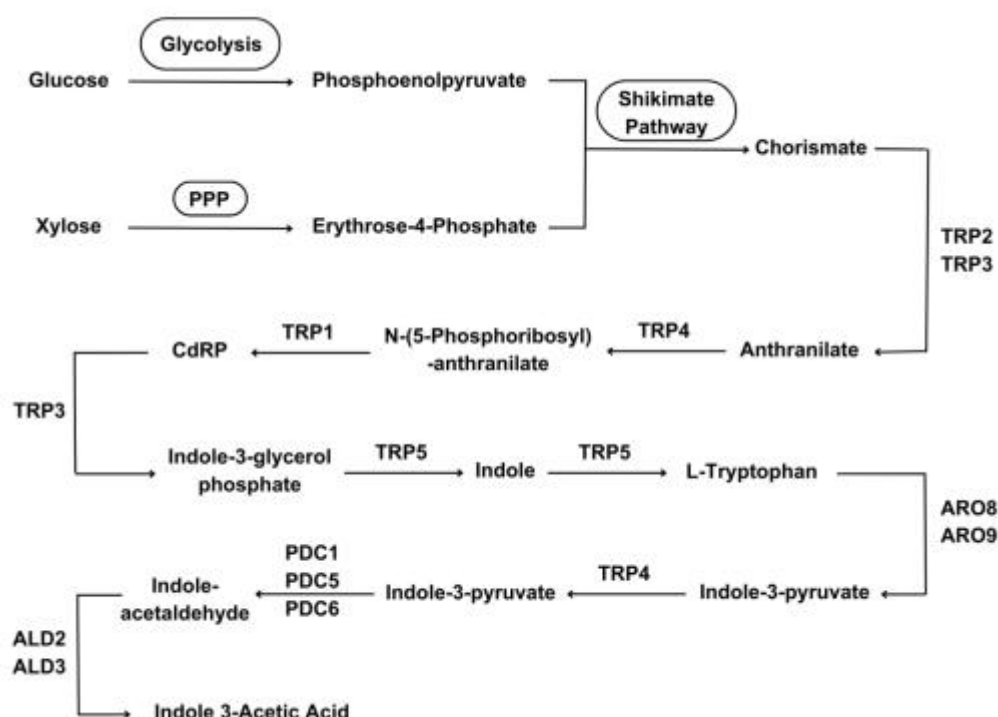


Figure 2. Metabolic pathways for Indole-Acetic Acid (IAA) production by yeast cells from sugars (glucose and xylose). Glycolysis, Pentose-Phosphate Pathway (PPP), and Shikimate Pathway were almost entirely condensed because they are classic (well-known) metabolic pathways. The enzymes (and their isoenzymes) involved in each reaction are represented by their respective three-letter codes followed by numbers: TRP2 - Anthranilate synthase component 1, TRP4 - Anthranilate phosphoribosyltransferase, TRP1 - N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase, TRP3 - Indole-3-glycerol-phosphate synthase, TRP5 - Tryptophan synthase, ARO8 - Aromatic/amino acid aminotransferase 1, ARO9 - Aromatic amino acid aminotransferase 2, PDC1 - Pyruvate decarboxylase isozyme 1, PDC5 - Pyruvate decarboxylase isozyme 2, PDC6 - Pyruvate decarboxylase isozyme 3, ALD2 - Aldehyde Dehydrogenase, ALD3 - Aldehyde Dehydrogenase. CdRP stands for 1-(2-carboxyphenylamino)-1-deoxy-D-ribose 5-phosphate. Sources: [29–34]

IAA is a phytohormone belonging to the auxin class, responsible for stimulating both apical and lateral growth in plants through cell elongation [13]. Its presence in plant roots enhances root development, increasing the area of contact with the soil. This improvement allows plants to more effectively intercept and absorb nutrients in the soil [19], thereby boosting their ability to compete with pathogenic organisms present in the environment [17].

As mentioned, soil is a habitat for several species of microorganisms, especially in its upper layers. While phytopathogenic microorganisms are commonly found in this environment [35], wild yeast strains also play a significant role by competing with these harmful organisms. They exert pressure on the survival and establishment of phytopathogens through several mechanisms [36]. These yeasts compete for physical space [37] and nutrients [17,37,38], and they can also secrete

extracellular enzymes such as β -glucanases and chitinases [36,38]. These enzymes actively contribute to plant protection [17,39], as exemplified in Table 2.

Table 2. Antagonistic activities exerted by yeasts.

Yeast Species	Pathogen	Yeast Antagonist Action	Reference
<i>Papiliotrema laurentii</i>	<i>Pythium ultimum</i>	β -1,3-glucanase production	[40]
<i>Rhodotorula minuta</i> , <i>Candida azyma</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Geotrichum citri-aurantii</i>	Competition for nutrients, β -1,3-glucanase, Chitinase, Killer activity	[41]
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Curvularia lunata</i> , <i>Fusarium moniliforme</i>	Production of VOCs, β -1,3-glucanase, and chitinase	[36]
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Penicillium digitatum</i>	β -glucanase production	[42]
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> , <i>Metschnikowia pulcherrima</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	VOCs production	[43]
<i>Debaryomyces hansenii</i> and <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Monilinia fructigena</i> , <i>Monilinia fructicola</i>	Hydrolytic enzymes, killer toxins and VOCs	[44]
<i>Pichia galeiformis</i>	<i>Penicillium digitatum</i>	Competition for space and nutrients, VOCs production	[37]
<i>Pseudozyma graminicola</i>	<i>Bullera hanna</i> , <i>Cryptococcus nemorosus</i> , <i>Dacrymyces stillatus</i> , <i>Neovossias etariae</i> , <i>Sporobolomyces ingularis</i>	Cellobiose-lipid production	[45]
<i>Candida diversa</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Affect spore germination and germ tube	[46]
<i>Candida intermedia</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	VOCs production	[47]
<i>Candida sake</i>	<i>Penicillium expansum</i>	VOCs production	[48]
<i>Galactomyces candidum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	VOCs production	[49]

Indeed, different yeast species have demonstrated antagonistic activities against phytopathogens. For instance, the species *Papiliotrema* (*Cryptococcus*) *laurentii* has been reported to inhibit the pathogen *Pythium ultimum* in vitro and in vivo. This inhibition was attributed to its high lytic activity, which results from the production of large amounts of β -1,3-glucanase by this strain [40].

Similarly, strains of *Rhodotorula minuta*, *Candida azyma*, and *Aureobasidium pullulans* have shown significant antagonistic effects in vivo against *Geotrichum citri-aurantii*, a fungus responsible for citrus sour rot. These three yeasts employ multiple mechanisms simultaneously to exert their effects, including killer activity, competition for nutrients, and production of extracellular enzymes such as β -1,3-glucanase (from *R. minuta*) and chitinases (from both *R. minuta* and *C. azyma*), which can degrade the cell wall of pathogens [41].

This indicates that yeasts typically do not rely on a single mode of action to oppose to their antagonists; rather, they activate several mechanisms at once, exerting deleterious effects on the pathogens [36,37]. Another yeast, *Pseudozyma graminicola*, has also shown antifungal potential against various pathogens by producing a glycolipid containing cellobiose in its saccharide portion, which acts as a fungicide [45].

Yeasts can also play a beneficial role in a more discreet manner by acting as external sensors for plants and signaling the presence of pathogens. In this context, yeasts release compounds such as salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), and ethylene (ET). These substances prompt the plant to activate its own defense mechanisms, leading to the production of secondary metabolites that help repel or inhibit pathogen attacks (Figure 1). This prevents or reduces damage to the plant. This phenomenon is known as induced systemic resistance (ISR) [45,50].

When challenged by the bacterium *Xanthomonas axonopodis*, cells of *Pseudozyma churashimaensis* inoculated into pepper leaves (*Capsicum annuum*) drove a 4.5-fold increase in the expression of resistance inducers such as SA and JA. At the same time, ET production was found to be 15 times higher in the inoculated plants compared to those that were not treated with the yeast [51]. Moreover, the presence of the yeast *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii* in peach fruits has been shown to enhance the activity of enzymes such as glucanase and polyphenol oxidase. This increase also led to higher SA production, thereby activating plant defenses against pathogens like *Rhizopus stolonifer*, which causes soft rot, and *Penicillium expansum*, responsible for blue mold [52].

Finally, soil composition may also be altered by the presence of yeasts, as they can provide carbohydrates to the environment. Specifically, the yeasts *Rhodotorula glutinis* and *Rhodotorula acheniorum* have been reported to provide mannose, galactose, glucose, and xylose [53,54]. In this way, yeasts also impacts the soil's physical structure, enhancing its stability, maintaining the balance between micro and macropores, and ensuring adequate air spaces and water storage for plants.

1.3. THE ECOLOGICAL IMPORTANCE OF YEASTS BEYOND SOIL

Above ground, yeasts can play several important roles. Among them, perhaps the most important and best known is their role in the pollination process of angiosperms. Present in floral nectaries, yeasts ferment nectar, releasing volatile organic compounds (VOCs) capable of attracting pollinating insects. This creates a beneficial triple symbiosis: (a) the insect is attracted to a food source, (b) the plant benefits from the pollination, continuing its propagation, and (c) the microorganism gains access to new habitats or colonizes the digestive tracts of the insects during periods when there is no flowering [3].

In the gastrointestinal tract of insects, yeasts also play an important ecological role. Once internalized, they interact with the existing microorganisms and act as probiotics. This interaction helps these invertebrates by breaking down complex polymers into simpler monomers, making nutrients more easily absorbable. Additionally, yeasts contribute to their defense by producing antimicrobial substances and/or preventing the growth of pathogenic species in the guts [17,55–57].

Fruit fly larvae (*Drosophila melanogaster*) with their gastric system inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* showed faster growth and better development, resulting in larger insects when compared to non-inoculated ones [58]. Similarly, the presence of the yeast *Yarrowia lipolytica* in the digestive system of beetles from the species *Nicrophorus vespilloides* enhanced the metabolism of proteins and lipids. This improvement was attributed to the secretion of proteases, lipases, and enzymes associated with the β -oxidation of fatty acids by the yeast cells [55].

In plants, yeasts can also develop an endophytic symbiosis, occupying the plant's intercellular spaces. In this relationship, yeasts help the plant absorb essential nutrients such as iron, phosphorus, and zinc [59]. Additionally, yeasts enhance the plant's resistance to pathogens by producing glycosylhydrolases (as already mentioned) and VOCs that act antagonistically against other microorganisms [36]. As an example, in tomato plants, Fernandez-San Millan *et al.* [60] demonstrated that the yeast *Wickerhamomyces anomalus* significantly antagonized pathogenic species such as *Fusarium oxysporum*, which causes fusarium wilt, and *Verticillium dahliae*, responsible for verticillium wilt in tomatoes.

This antagonistic effect is observed not only in endophytic yeasts but also in species that inhabit floral nectaries. These species compete with pathogenic organisms for both physical space and nutrients in this microenvironment [3] . Additionally, they produce and release substances with antimicrobial properties. Notably, this action protects not only the plants but also pollinators, as it prevents the establishment of pathogens that could attack insects visiting the flowers [10].

Therefore, it is possible that these yeasts' presence in agricultural environments can provide various ecological services, benefiting soil, plants, and the insects that pollinate them. This relationship helps maintain a balance between biodiversity and plant production. Changes in the yeast population can result in reduced pollination of plant species and negatively impact insect life [10] . At the same time, a loss of yeast biodiversity may increase the likelihood of plant and invertebrate attacks by pathogenic organisms [57].

The negative effects of pesticides on yeast cells may occur through various mechanisms. The biochemical pathways influenced by these compounds and how yeast may develop resistance are discussed in more detail in the following sections.

1.4. IMPACTS OF PESTICIDES ON YEAST MICROBIOTA

After the Second World War, the use of synthetic molecules in agriculture increased significantly to protect and maintain crop health [61]. However, the action of these pesticides is not restricted to target organisms; they are mostly broad-spectrum products that also impact non-target organisms, thereby harming local biodiversity [62].

Repeated use of products with similar mechanisms of action leads to resistance in target organisms. As a result, these pathogens are no longer affected by the chemicals, rendering them ineffective. This also harms beneficial organisms, leaving crops vulnerable to resistant pathogens [63].

Many pesticides used in agriculture have systemic action, meaning they can penetrate the leaf tissue, passing through the plant's vascular system. This allows them to reach areas of the plants that were not directly exposed to the pesticide, such as the floral nectary [62] . The presence of these molecules in such locations alters the biological dynamics of the yeasts present there, causing indirect problems

related to pollinators' attraction, decreased crop productivity, and reduced food availability [10].

An example of this undesirable effect occurs with fungicides, which are used extensively in conventional agriculture to reduce the population of disease-causing fungi. However, these pesticides also decrease the numbers of non-target organisms [64], many of which are beneficial, particularly during the post-harvest process. The loss of these organisms negatively impacts local biodiversity and disrupts the production chain that relies on their activities [65].

The impacts caused by these practices affect the industry, especially the fermented beverage sector. It is well recognized that molecules such as penconazole, benomyl, and pyrimethanil can persist in grapes, which are the primary raw material for wine production. Once present in grape must, pyrimethanil impairs the fermentation process and alters the pace of beverage production. This molecule inhibits the growth of the wild yeast *Hanseniaspora uvarum*, giving space for greater growth of the yeast *S. cerevisiae*. This shift accelerates the *S. cerevisiae*'s involvement in the anaerobic fermentation of the must, ultimately impacting the organoleptic characteristics of the final product [66].

Similarly, the cell growth of yeasts present in wheat grains is highly affected by the use of fungicides, which disrupts the balance among native microorganisms, such as *Aureobasidium pullulans*, *Candida albicans*, *Candida sake*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida famata*, *Metschnikowia (Candida) pulcherrima*, and *Rhodotorula glutinis*, which are present on the external and internal part of the grains. This compromises the rheological and organoleptic characteristics of bakery products produced from wheat grains containing native yeasts [65].

Besides fungicides, other molecules widely used in the global agricultural environment also impact yeasts, whether they are at recommended concentrations or even in residues below legally permitted levels [67]. In 2022, approximately 2,000 tons of herbicides were applied globally in agricultural settings. Brazil was the leading country in synthetic pesticides usage, consuming nearly 500 tons of herbicides in that year [61].

Products containing the molecule 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) are extremely useful in conventional agriculture as they selectively target dicotyledonous

plants [68]. However, 2,4-D also poses harmful effects beyond the Kingdom Plantae. It readily interacts with cell membranes, allowing it to penetrate yeast cells and render them nonviable [67].

Even at doses recommended for agricultural use, exposure to 2,4-D can acidify the intracellular pH of yeast cells. This acidification also triggers oxidative stress in the cells, which inhibits cell growth and increases their latency period [67,69]. The oxidative stress intensity varies according to the amount of the active ingredient (AI) administered. Yeast cells exposed to increasing doses of AI showed the formation of hydroxyl radicals. During the adaptation period, *S. cerevisiae* exposed to the herbicide showed an increase in the enzymatic activity of cytosolic catalase (Cttp1), CuZn-superoxide (Sod1p), glutathione-dithiols, and glutathione reductoxins (Grx1p and Grx2p), evidencing an increase in the antioxidant defense mechanism in the yeast cells [70].

Glyphosate is another herbicide commonly used in conventional agriculture, and it has a strong inhibitory effect on yeast cell growth [71]. This is because it inhibits the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP synthase), thus disrupting the shikimate pathway [68]. Consequently, shikimate accumulates, preventing the synthesis of the aromatic amino acids tryptophan, phenylalanine, and tyrosine, which are essential precursors for various important compounds in yeast cells [72].

Confronted with the challenges posed by human activities in rural environments, yeasts adapt to coexist with stressors, ultimately developing resistance to certain active ingredients [70]. The repeated and indiscriminate use of these products in agriculture leads to an artificial selection of resistant organisms [72]. This was demonstrated by Barney *et al.* [71], who compared the effects of glyphosate on yeast strains isolated from agricultural environments both before and after the herbicide's commercial launch. Strains that had never been exposed to glyphosate demonstrated greater susceptibility to the product, while those previously exposed exhibited increased resistance.

In addition to the active ingredients, commercial products often contain other substances known as "inerts," which enhance the effectiveness of the AI. However, these inerts are also responsible for negative effects on yeast growth [73]. The

deleterious impact of inerts was demonstrated in an environment where yeasts were not dependent on the shikimate pathway for cellular respiration. However, in this case, the commercial product still inhibited yeast growth to the same degree [74].

The negative impacts of pesticides on yeast cells and the subsequent implications on related economic activities are summarized in Figure 3. It is worth noting, though, that these microorganisms also have a remarkable ability to adapt and mitigate environmental damage. In the following section, we explore the potential of yeasts as bioremediation of contaminated soils.

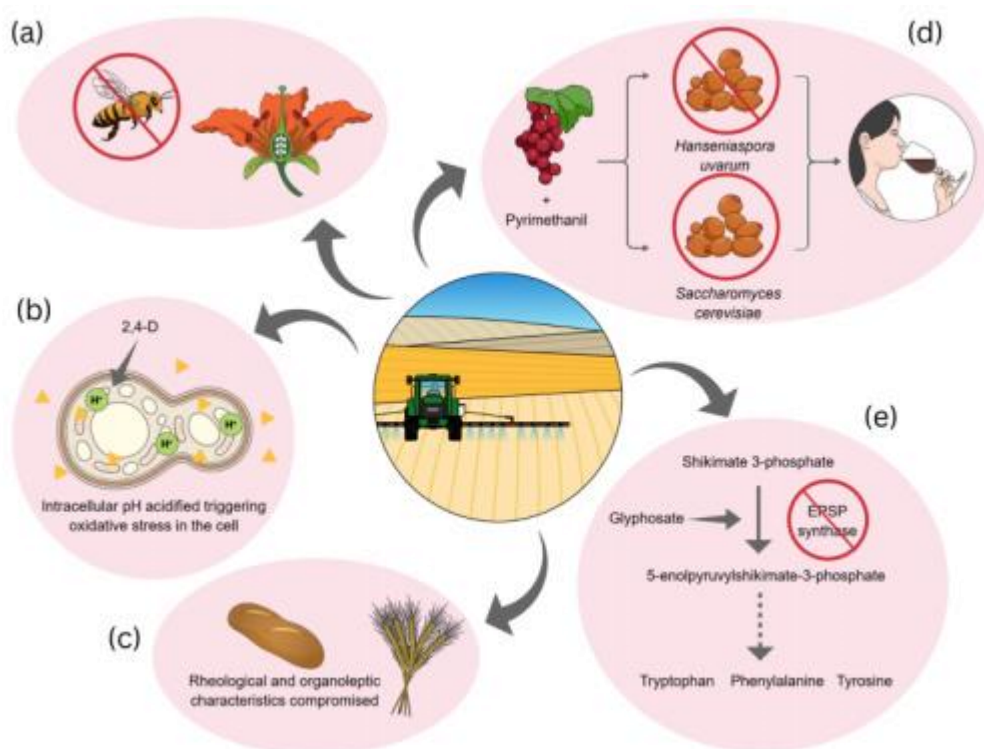


Figure 3. Examples of the negative impacts of pesticides on yeasts and economic activities that depend on these microorganisms. Pesticides can lead to the death of yeast cells, disrupting flower dynamics and negatively affecting pollinator attraction (a). In the case of 2,4-D molecules, cell death may occur due to cytoplasmic acidification and subsequent oxidative stress (b). Yeast death also alters industrial processes that rely on these microorganisms as part of the natural microbiota of their raw materials, such as the production of naturally leavened breads (c) and wine. In the winery environment, the presence of pesticides on grapes can facilitate the proliferation of *S. cerevisiae* to the detriment of *H. uvarum* (d). Glyphosate, another widely used pesticide, also impairs the metabolism of yeast cells (e), especially by preventing the synthesis of aromatic amino acids (see the text for more details).

1.5. YEASTS AS POTENTIAL BIOREMEDIATORS

As previously mentioned, yeasts not only play several roles in the industry but also serve several essential ecological functions. From this point on, we also emphasize the potential of these microorganisms in bioremediation, an important

process for promoting sustainable agriculture [75] . Bioremediation involves the removal and degradation of chemical contaminants with variable chemical structures, which requires specific biochemical processes for effective degradation [76].

The chemical structures of the compounds discussed below are depicted in Figure 4. Beginning with 2,4-D, it is important to recognize that the continual application of this herbicide generates poses significant toxicological challenges to the environment and contributes to weed resistance. A study revealed that, in addition to resistant plants, yeasts can also adapt to 2,4-D by developing a plasma membrane that is unaffected by the herbicide. The cells of these yeasts are capable of growing in the presence of different concentrations of the herbicide. These adapted yeasts display an increased proportion of saturated and monounsaturated fatty acids in their membranes. They achieve this by downregulating the gene that encodes a fatty acid desaturase. As a result, the herbicide's entry into the cells is impeded, enabling the proper maintenance of cellular functions [67,77]. Additionally, increased expression of other genes associated with cell integrity has also been identified as a tolerance mechanism to 2,4-D in yeast. Specifically, the upregulation of genes such as *MTL1*, *ROM1*, and *MKK2*, which are involved in stress signaling in the cell wall, and genes related to chitin synthesis (a component of the cell wall), such as *SHC1* and *ECM38*, supports the importance of preserving and restoring cell wall integrity for tolerating 2,4-D [78].

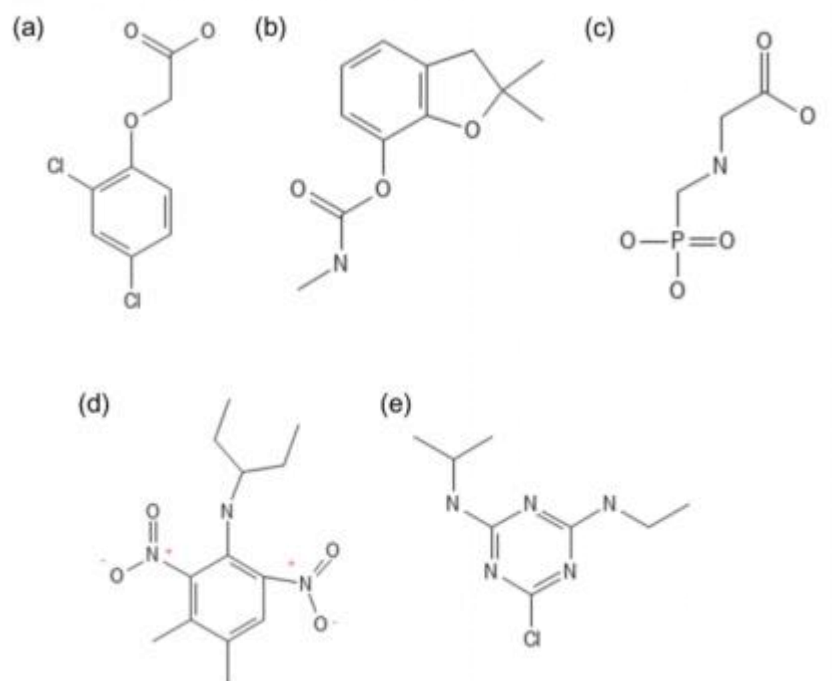


Figure 4. Chemical structures of (a) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D); (b) 2,2-dimethyl-3H-1-benzofuran-7-yl) N-methylcarbamate (Carbofuran); (c) 2-(phosphonomethylamino) acetic acid (Glyphosate); (d) 3,4-dimethyl-2,6-dinitro-N-pentan-3-ylaniline (Pendimethalin); and, (e) 6-chloro-4-N-ethyl-2-N-propan-2-yl-1,3,5-triazine-2,4-diamine (Atrazine). Source: [79].

Different metabolic pathways degrade 2,4-D. Most bacteria start by cleaving the side chain, whereas fungi typically use hydroxylation of the aromatic ring. Monooxygenase enzymes, specifically hydroxylases, introduce hydroxyl groups (–OH) into the aromatic ring, forming metabolites such as 2,4-dichloro-5-hydroxyphenoxyacetic acid and 2,5-dichloro-4-hydroxyphenoxyacetic acid. Furthermore, the hydroxylation of 2-chlorophenoxyacetic acid (2-CPA) generates 2-chloro-4-hydroxyphenoxyacetic and 2-hydroxyphenoxyacetic acids, indicating that dichlorination occurs along with replacement of chlorine by hydroxyl groups. Understanding these enzymatic processes and their metabolites is crucial for optimizing the bioremediation of herbicide-contaminated environments [50,80].

As the most widely used herbicide in conventional agriculture, glyphosate merits careful consideration (refer to its structure in Figure 4). As previously mentioned, glyphosate inhibits the EPSP synthase enzyme, which disrupts the synthesis of amino acids that essential precursors for vital compounds such as alkaloids, flavonoids, and benzoic acids. In the soil, glyphosate can be degraded by microorganisms through two primary pathways. The first pathway involves the conversion of glyphosate into sarcosine, facilitated by the bacteria *Agrobacterium radiobacter* and *Enterobacter aerogenes*, using the enzyme C-P lyase. Then,

sarcosine can be metabolized further by other microorganisms, including yeasts. The second-most common route transforms glyphosate into amino-methyl phosphonic acid (AMPA) [81]. In this case, though, glyoxylate is also produced, making this route the preferred one within the Kingdom Fungi [82].

In addition to herbicides, studies on the biodegradation of other agrochemicals, such as insecticides, are also relevant. One noteworthy example is carbofuran (Figure 4b), a broad-spectrum agrochemical that falls under the carbamate class. It serves as an acaricide, insecticide, and nematicide. Commercially introduced in 1967, its specific use increased rapidly in the following years. The half-life of carbofuran in the soil varies between thirty and one hundred and twenty days, depending on the soil type. In sandy soils, the half-life is approximately thirty days, while in clayey soils it is around forty days. In muddy soils, the half-life extends to about eighty days [83].

These two pesticides (glyphosate and carbofuran) were tested for degradation using yeasts. *Candida tropicalis* and *Trichosporon cutaneum* exhibited good growth in media containing glyphosate as the sole carbon source. *Candida tropicalis* degraded 76% of the initial glyphosate in 192 hours, demonstrating notable biodegradation efficiency. Both yeasts also grew normally in rich medium (YEPD) with carbofuran, but the growth of *T. cutaneum* slowed significantly in synthetic minimal medium (YNB without amino acids) containing carbofuran above 0.3 g/L. Nevertheless, this yeast demonstrated almost complete biodegradation of carbofuran in 192 hours, with the detection of intermediate metabolites such as carbofuran-7-phenol and pyruvate during cultivation [76].

Another widely used herbicide is pendimethalin (Figure 4d). Its unique combination of atoms allows it to be easily adsorbed by the soil but very difficult to desorb. Fortunately, certain fungi can oxidize its amine groups and benzene ring through enzymes such as pendimethalin monooxygenase and pendimethalin peroxidase. These oxidative processes render the molecule nontoxic and enhance its degradation by the soil microbial community. Moreover, microbial esterases, including pendimethalin hydrolase, also play a role in its breakdown [84]. Notably, the yeast *Clavispora lusitaniae* has shown significant efficacy in degrading pendimethalin. Han *et al.* [85] demonstrated that the ability of this yeast's degradation efficiency is inversely related to the pH of the growth medium: as the pH decreases, its ability to degrade pendimethalin improves.

Yeast has also proven effective in degrading the herbicide atrazine (Figure 4e), a member of the triazine class. A *Pichia kudriavzevii* strain was shown to degrade this herbicide in both liquid media and soil. The study demonstrated that the strain Atz-EN-01 was able to completely degrade atrazine within 7 days, exhibiting a degradation rate of 31% per day, following the first-order kinetic model. The half-life of the degradation process was 2.2 days under optimum conditions, which included a pH of 7, a temperature of 30°C, an inoculum size of 3% (v/v), and agitation of 120 rpm. The identified degradation products were hydroxyatrazine, N-isopropylammelide, and cyanic acid, with the enzyme atrazine chlorohydrolase exhibiting maximum activity during the degradation process [86].

It is interesting to note that some yeast species, unlike most living beings, have the ability to switch between respiration and fermentation, regardless of the presence of oxygen. This switch depends on the availability of a carbon source and/or the need imposed by the environment. As a result, yeasts are less susceptible to agrochemicals of the dinitrophenol class, which are recognized as uncoupling agents of oxidative phosphorylation, thus inhibiting the generation of ATP after the respiratory chain. Therefore, the resistance of yeasts to these toxic conditions represents a significant advantage in the biodegradation process of dinitrophenols, as detailed in the study by Marius *et al.* [87]. These researchers analyzed the use of yeasts for biodegradation, specifically in solutions containing dinitrophenol-based agrochemicals. The results indicated a decrease in the toxicity of the remaining solutions after treatment with yeasts, which were subsequently used in wheat seed germination experiments.

When exploring the potential of yeasts as bioremediators, issues surrounding the source of microbial cells and the costs associated with producing enough cells for large-scale contamination treatment may arise. However, an alternative to overcome this potential problem may be found in the study by Szpyrka *et al.* [2]. These authors tested three commercial yeast strains (of the species *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, and *Debaryomyces hansenii*) against four herbicides and demonstrated that they can fulfill additional roles beyond their industrial applications. In their findings, fluazifop-P-butyl was the most effectively degraded herbicide, with up to 71.2% degradation observed after four days. This was followed by metribuzin (20%), propyzamide (13.4%), and pendimethalin (5.3%). Moreover, when shell pea

(*Pisum sativum* L.) seeds were sown in soils treated with the yeasts, there was a notable enhancement in plant development: growth increased by 22%, and seed germination capacity improved by 30%. Therefore, these findings suggest that after their industrial use, yeast cell biomasses could serve an additional role, degrading harmful environmental compounds and stimulating plant growth and germination.

A summary of the degradation processes discussed above is presented in Table 3. In light of this information, it is reasonable to conclude that the scientific community has accumulated sufficient knowledge to implement the use of yeasts as effective pesticide-degradation tools. However, successful bioremediation efforts with yeasts extend beyond the use of wild yeasts. In the following section, we highlight other significant advancements achieved with genetically modified strains.

Table 3. Examples of pesticide-degradation processes performed by yeasts

Agrochemical	Yeast	Degradation	Action mechanism	Degradation conditions	Resulting metabolites	Reference
Glyphosate	<i>Candida tropicalis</i> and <i>Trichosporon cutaneum</i>	76% (<i>C. tropicalis</i>) and 58% (<i>T. Cutaneum</i>) in 192 h	Conversion of glyphosate into methylglycine and glycine	Use of glyphosate as a carbon source	Methylglycine, Glycine	[76]
Carbofuran	<i>C. tropicalis</i> and <i>T. cutaneum</i>	Almost 100% (<i>T. cutaneum</i>) and 23,4% (<i>C. tropicalis</i>) in 192 h	Biotransformation of carbofuran to carbofuran-7-phenol and pyruvate	Normal growth on rich medium; significant reduction on minimal medium	Carbofuran-7-phenol Pyruvic acid	[76]
Pendimethalin	<i>Clavispora lusitanae</i>	74% in 8 days	Oxidation of amine groups	Optimal pH between 4.5 and 5, with maximum degradation at 30°C	1,2-dimethyl-3,5-dinitro-4-N(buta-1,3-dien 2-yl)-dinitrobenzenamine-N-oxide and 1,2-dimethyl-3,5-dinitro-4-N(prop-1-en-2-yl)-dinitrobenzenamine-N oxide	[85]
Atrazine	<i>Pichia kudriavzevii</i>	100% in 7 days	Dechlorination and hydrolysis	pH 7.0, temperature 30°C, inoculum size 3% (v/v) and shaking at 120 rpm	hydroxyatrazine, N-isopropylamylidene, and cyanuric acid	[86]
Dinitrophenol (DNOC, DNG, DNPE, Dinocap)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	In 1 week: partial degradation for DNOC and Dinocap; DNPE completely degraded. Pesticide concentration: 10^{-3} M.	Not specified	Yeast suspensions at 5 g/L for 1 week in a batch system	Not specified	[87]
Fluazifop-P-butyl	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> and <i>Debaryomyces hansenii</i>	Up to 71,2% in 7 days	Not specified	Horticultural soil, temperature at 21°C, and humidity between 70 and 71%.	Not specified	[2]

1.6. ENGINEERING YEASTS FOR PESTICIDE DEGRADATION

The first eukaryote to have its genome sequenced was a yeast — the strain *S. cerevisiae* S288c. This demonstrates the scientific community's interest in these fast-growing microorganisms, which can be cultivated in simple and inexpensive culture media. In fact, yeasts have been successfully used for decades in many molecular studies and as biofactories generated from gene editing techniques [5].

Using genetic engineering tools, yeasts can, therefore, be modified to perform numerous functions, such as removing toxic waste. In this context, they can act as biocatalysts, hosting different degradation enzymes within their cells, or as biosensors to detect the presence of toxic waste in the environment. Although the successful application of yeast genetic engineering has a history spanning over 40 years, the recent advent of CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) has propelled the functional capabilities of yeasts to new heights, further increasing their potential as bioremediators in areas affected by pesticide contamination [88].

Interestingly, the CRISPR-Cas technique is derived from the adaptive immune system of prokaryotes, which consists of a set of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and associated proteins (Cas). In bacteria, transcription of the CRISPR locus generates CRISPR RNA (crRNA), which forms a complex with the Cas nuclease. This complex recognizes specific DNA sequences through complementary base pairing, enabling Cas-mediated cleavage of exogenous DNA, such as that from invading bacteriophages [89]. In adapting the CRISPR-Cas system for genome editing, a single guide RNA (sgRNA) can be designed to be complementary to a target DNA sequence that is to be modified. Within the cellular environment, transcription of the sgRNA, combined with the expression of the Cas nuclease, allows the formation of a complex that precisely directs the nuclease to the target DNA, inducing a double-strand break at the designated site. After this cleavage, natural DNA repair mechanisms allow the insertion or deletion of genetic material, resulting in the desired genomic alteration [90]. The high accuracy of the CRISPR-Cas system in target recognition and cleavage has made it a robust and versatile tool for gene editing in several fields, including agriculture [91,92].

One notable example of yeast genetic engineering for bioremediation purposes involves the CYP72A18 gene, which is present in rice and encodes an

enzyme from the cytochrome P450 superfamily. This enzyme catalyzes the (ω -1)-hydroxylation of the herbicide pelargonic acid, reducing its toxicity in the environment. Through genetic engineering, this gene was heterologously expressed in yeast cells, allowing them to degrade this pesticide [93]. Additionally, even human isoforms of P450 have been tested in yeast with the aim of degrading agrochemicals. In one study, the CYP 1A1 and CYP 1A2 isoforms demonstrated significant effectiveness against the herbicides chlortoluron and atrazine. These enzymes were evaluated both individually and fused to the NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase of the transformed yeast strain. Remarkably, this fusion resulted in an increase in enzymatic activity [94].

Other genes that encode enzymes related to cytochrome P450 have also been expressed in yeast to induce herbicide degradation. Markedly, the monooxygenase CYP71A12 from *Arabidopsis thaliana* has demonstrated potential in metabolizing the herbicide pyrazoxyfen when expressed in yeast. Hayashi *et al.* [95] reported that this enzyme catalyzes the transformation of this agrochemical into less toxic metabolites that are more readily degradable by other microorganisms in the environment. This process involves N-demethylation reactions on the pyrazole ring and hydroxylation on the dichlorobenzene ring of pyrazoxyfen. Specifically, N-demethylation removes a methyl group (CH₃) from the pyrazole ring, while hydroxylation adds a hydroxyl group (OH) to the dichlorobenzene ring.

As observed in the previous cases, it is noteworthy that enzymes from agriculturally significant plants can be expressed in yeast to alleviate the harmful effects of pesticides on the environment. For glyphosate, for example, it was found that the overexpression of two glutathione-S-transferases from a tea plant (*Camellia sinensis*) in *S. cerevisiae* allowed the cells to grow efficiently even at a concentration of 1 g/L of the herbicide [96]. Given the advantages of using yeast as biofactories (as pointed out before), the heterologous production of these enzymes within these microbial cells can substantially increase their use as catalysts for the degradation of agrochemicals.

In the context of engineered yeasts for bioremediation, a successful approach involves the expression of degradation enzymes on the cell surfaces of these microorganisms (Figure 5). This strategy allows yeasts to degrade compounds without needing to internalize them, which is particularly effective for high molecular

weight substances. The so-called whole-cell yeast biocatalysts also prove to be efficient by eliminating the transportation barrier across the plasma membrane and dismissing any enzyme preparation and purification steps, ultimately reducing the cost. Besides, the cell-surface display strategy enhances the potential for biocatalyst recycling in various processes [88,97,98].

The cell-surface strategy has been notably studied for the degradation of organophosphorus pesticides. Takayama *et al.* [99] succeeded in expressing up to 14×10^4 molecules of an organophosphorus hydrolase (OPH) from *Flavobacterium* sp. on the cell surface of *S. cerevisiae*. To anchor this enzyme to the yeast surface, the authors fused an α -agglutinin with a glycosylphosphatidylinositol (GPI) signal sequence to the OPH's C-terminal region, enabling the cells to efficiently hydrolyze paraoxon. The same research group has also expressed this OPH in *S. cerevisiae* through the Flo1p anchor system. In this case, the authors attached the anchor protein to OPH's N-terminal region and achieved eight times higher OPH activity in comparison to the GPI approach [100]. In any case, though, they found significantly higher activities with these yeast-surface display methods than with a similar strategy that employed bacterial cells instead [99,100]. Indeed, as eukaryotes, yeasts harbor more sophisticated pathways for secreting or displaying proteins on their surfaces than bacteria (which are prokaryotes) [98]. Figure 5 depicts how these anchor systems can work in yeasts.

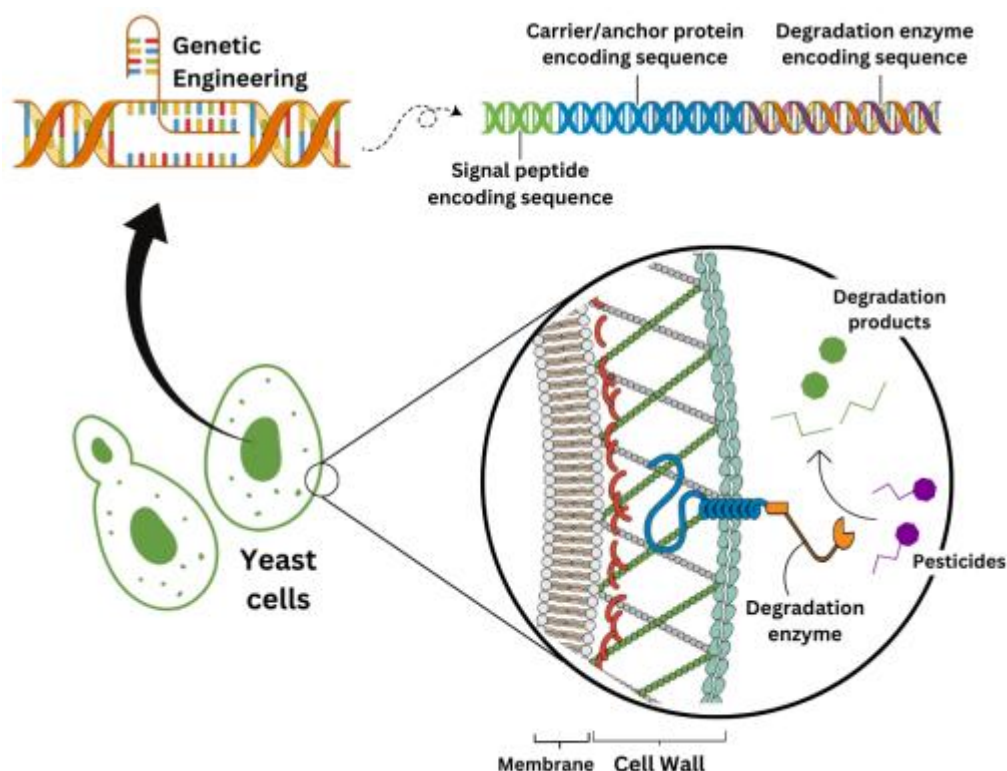


Figure 5. Yeast-cell surface display strategy. Through genetic engineering, heterologous degradation enzymes can be displayed at the yeast cell wall when attached to a carrier protein with a signal peptide and an anchor system (either GPI or Flo1p — see the text for additional details). In this way, pesticides can be transformed into less-toxic compounds outside the yeast cells.

1.7. YEASTS FOR SUSTAINABLE AGRICULTURE: CHALLENGES AND AVENUES

Yeasts have been employed in the production of food and beverages since the Neolithic Revolution, leading to their selection and adaptation within agricultural environments over millennia [5]. Furthermore, as discussed in this review, yeasts can benefit the health and development of plants in several ways, either by protecting them against pathogens or stimulating their growth. Therefore, they may be favored over filamentous fungi or bacteria in organic or agroecological agriculture practices. Additionally, yeasts possess the potential for bioremediation in areas contaminated by conventional pesticides. In this case, they would first help to "clean" the environment and subsequently facilitate the cultivation of new crops from an organic perspective.

Fortunately, this premise has gained considerable traction in recent years. Our bibliometric analysis in the Scopus database revealed a significant increase in studies focusing on the use of yeasts in agriculture, particularly regarding their role in

bioremediation, over the past two decades (Figure 6). This search used the terms “yeast AND agriculture AND bioremediation” to identify articles published between 2004-2024.

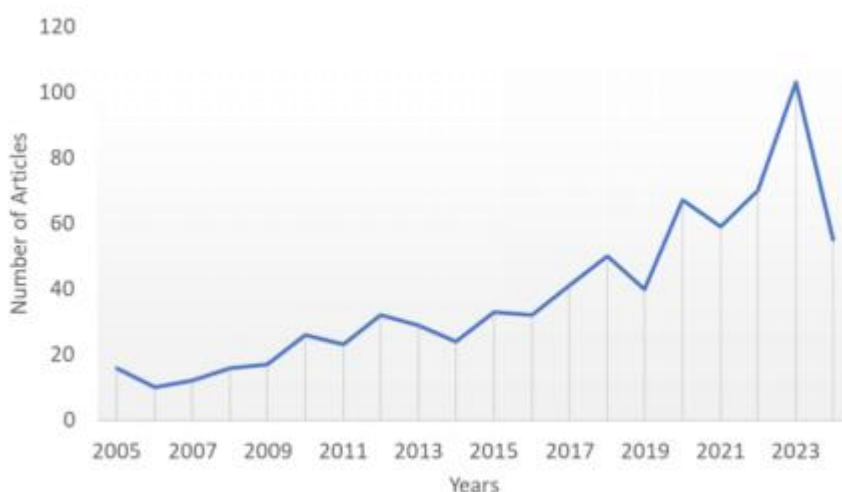


Figure 6. Scientific production related to yeasts in agriculture in the years 2004-2024. The search terms used were “yeasts AND agriculture AND bioremediation”.

However, some questions are yet to be answered. Literature, for example, lacks studies that have tested yeasts in large-scale agricultural experiments — most research has been carried out in greenhouses or laboratory settings. Additionally, few studies have examined how yeast microbiota change over extended periods under the influence of pesticide use. In this regard, it would be valuable to investigate to what extent different seasons or climate zones might affect yeast adaptation. The same holds true for soil types: it is still unclear how (or if) soil features contribute to yeasts to the development of tolerance in yeasts toward agrochemicals. Finally, science would benefit from more studies on yeasts isolated from environments in the vicinity of farms that use agrochemicals. In these areas, the presence of pesticides, although in lower concentration, could drive an artificial selection of microorganisms.

In addition to the need for more studies, it is important to consider the logistical challenges of effectively incorporating yeasts into agricultural systems, especially for large-scale applications. From this perspective, “on-farm” production (producing inputs for personal use on the agricultural property) could be an advantageous solution. However, using yeasts as biocontrol agents, plant-growth promoters, or bioremediators requires careful management of environmental factors (such as temperature, pH, and oxygen levels) to ensure these organisms maintain high

metabolic activity and efficiency in degrading contaminants. In addition, obtaining and multiplying yeast cultures implies significant costs, especially when using genetically modified strains, which require rigorous safety assessments to avoid negative impacts on the agricultural ecosystem [101,102].

1.8. CONCLUSION

The trend observed in Figure 6 underscores the growing concern for sustainability and the pursuit of alternatives that mitigate the negative environmental impacts of conventional agriculture. In this context, yeasts hold significant importance, owing to both the inherent potential of various species in nature and the biotechnological innovations surrounding their genetic engineering. This review aimed to systematically present these potentials to spark interest within the scientific community for developing practical processes based on the ideas discussed. It is imperative to acknowledge the harm that agrochemical usage inflicts on the environmental microbiota and its broader implications for wildlife. Additionally, the microorganisms we aim to preserve may provide solutions to the challenges created by human activities. In this two-way street, further studies on yeast physiological processes are highly desired.

1.9. REFERENCES

1. Silva, V.; Mol, H.G.J.; Zomer, P.; Tienstra, M.; Ritsema, C.J.; Geissen, V. Pesticide Residues in European Agricultural Soils – A Hidden Reality Unfolded. *Science of The Total Environment* **2019**, *653*, 1532–1545, doi:10.1016/j.scitotenv.2018.10.441.
2. Szpyrka, E.; Książek-Trela, P.; Bielak, E.; Słowik-Borowiec, M. The Influence of Commercial Yeast Preparations on the Degradation of Herbicide Mixtures in the Soil and the Effect on the Shell Pea (*Pisum Sativum* L.) Cultivation. *J Soil Sci Plant Nutr* **2024**, *24*, 2509–2519, doi:10.1007/s42729-024-01671-7.
3. Fenner, E.D.; Scapini, T.; da Costa Diniz, M.; Giehl, A.; Treichel, H.; Álvarez-Pérez, S.; Alves, S.L. Nature's Most Fruitful Threesome: The Relationship between Yeasts, Insects, and Angiosperms. *Journal of Fungi* **2022**, *8*, 984, doi:10.3390/jof8100984.
4. Giehl, A.; dos Santos, A.A.; Cadamuro, R.D.; Tadioto, V.; Guterres, I.Z.; Prá Zuchi, I.D.; Minussi, G. do A.; Fongaro, G.; Silva, I.T.; Alves, S.L. Biochemical and Biotechnological Insights into Fungus-Plant Interactions for Enhanced Sustainable Agricultural and Industrial Processes. *Plants* **2023**, *12*, 2688, doi:10.3390/plants12142688.
5. Alves Jr, S.L.; Treichel, H.; Basso, T.O.; Stambuk, B.U. Are Yeasts “Humanity’s Best Friends”? In; 2022; pp. 431–458.

6. Baeshen, N.A.; Baeshen, M.N.; Sheikh, A.; Bora, R.S.; Ahmed, M.M.M.; Ramadan, H.A.I.; Saini, K.S.; Redwan, E.M. Cell Factories for Insulin Production. *Microb Cell Fact* **2014**, *13*, 141, doi:10.1186/s12934-014-0141-0.
7. Stępień, P.P.; Brousseau, R.; Wu, R.; Narang, S.; Thomas, D.Y. Synthesis of a Human Insulin Gene VI. Expression of the Synthetic Proinsulin Gene in Yeast. *Gene* **1983**, *24*, 289–297, doi:10.1016/0378-1119(83)90089-6.
8. De Oliveira, V.H.; Ullah, I.; Dunwell, J.M.; Tibbett, M. Bioremediation Potential of Cd by Transgenic Yeast Expressing a Metallothionein Gene from *Populus Trichocarpa*. *Ecotoxicol Environ Saf* **2020**, *202*, 110917, doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110917.
9. Achilles, K.A.; Camargo, A.F.; Reichert Júnior, F.W.; Lerin, L.; Scapini, T.; Stefanski, F.S.; Dalastra, C.; Treichel, H.; Mossi, A.J. Improvement of Organic Agriculture with Growth-Promoting and Biocontrol Yeasts . In *Yeasts: From Nature to Bioprocesses*; 2022; pp. 378–395.
10. Schaeffer, R.N.; Mei, Y.Z.; Andicoechea, J.; Manson, J.S.; Irwin, R.E. Consequences of a Nectar Yeast for Pollinator Preference and Performance. *Funct Ecol* **2017**, *31*, 613–621, doi:10.1111/1365-2435.12762.
11. Anderson, T.-H. Microbial Eco-Physiological Indicators to Asses Soil Quality. *Agric Ecosyst Environ* **2003**, *98*, 285–293, doi:10.1016/S0167-8809(03)00088-4.
12. Santos, H.G. dos. *Sistema Brasileiro de Classificação de Solos*; Embrapa, 2018; ISBN 9788570358004. Available online: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1094003/sistema-brasileiro-de-classificacao-de-solos> (accessed on 10/09/2024).
13. Moreira, G.A.M. Diversidade e Ecologia de Leveduras em Solos Brasileiros; *Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Biologia Microbiana do Instituto de Ciências Biológicas*, Universidade de Brasília – UnB. 2019.
14. Álvarez-Pérez, S. Ecology: Yeasts on Their Natural Environment. In; 2022; pp. 27–57.
15. Fernandez-San Millan, A.; Farran, I.; Larraya, L.; Ancin, M.; Arregui, L.M.; Veramendi, J. Plant Growth-Promoting Traits of Yeasts Isolated from Spanish Vineyards: Benefits for Seedling Development. *Microbiol Res* **2020**, *237*, 126480, doi:10.1016/j.micres.2020.126480.
16. Gomes, F.C.O.; Safar, S.V.B.; Marques, A.R.; Medeiros, A.O.; Santos, A.R.O.; Carvalho, C.; Lachance, M.-A.; Sampaio, J.P.; Rosa, C.A. The Diversity and Extracellular Enzymatic Activities of Yeasts Isolated from Water Tanks of *Vriesea Minarum*, an Endangered Bromeliad Species in Brazil, and the Description of *Occultifur Brasiliensis* f.a., Sp. Nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2015**, *107*, 597–611, doi:10.1007/s10482-014-0356-4.
17. Bright, J.P.; Karunanadham, K.; Maheshwari, H.S.; Karuppiyah, E.A.A.; Thankappan, S.; Nataraj, R.; Pandian, D.; Ameen, F.; Poczai, P.; Sayyed, R.Z. Seed-Borne Probiotic Yeasts Foster Plant Growth and Elicit Health Protection in Black Gram (*Vigna Mungo* L.). *Sustainability* **2022**, *14*, 4618, doi:10.3390/su14084618.
18. Sarabia, M.; Jakobsen, I.; Grønlund, M.; Carreon-Abud, Y.; Larsen, J. Rhizosphere Yeasts Improve P Uptake of a Maize Arbuscular Mycorrhizal Association. *Applied Soil Ecology* **2018**, *125*, 18–25, doi:10.1016/j.apsoil.2017.12.012.

19. Marques, A.R.; Resende, A.A.; Gomes, F.C.O.; Santos, A.R.O.; Rosa, C.A.; Duarte, A.A.; de Lemos-Filho, J.P.; dos Santos, V.L. Plant Growth–Promoting Traits of Yeasts Isolated from the Tank Bromeliad *Vriesea Minarum* L.B. Smith and the Effectiveness of *Carlosrosaea Vrieseae* for Promoting Bromeliad Growth. *Brazilian Journal of Microbiology* **2021**, *52*, 1417–1429, doi:10.1007/s42770-021-00496-1.
20. Nutaratat, P.; Srisuk, N.; Arunrattiyakorn, P.; Limtong, S. Plant Growth-Promoting Traits of Epiphytic and Endophytic Yeasts Isolated from Rice and Sugar Cane Leaves in Thailand. *Fungal Biol* **2014**, *118*, 683–694, doi:10.1016/j.funbio.2014.04.010.
21. Kumla, J.; Nundaeng, S.; Suwannarach, N.; Lumyong, S. Evaluation of Multifarious Plant Growth Promoting Trials of Yeast Isolated from the Soil of Assam Tea (*Camellia Sinensis* Var. *Assamica*) Plantations in Northern Thailand. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1168, doi:10.3390/microorganisms8081168.
22. Silambarasan, S.; Logeswari, P.; Cornejo, P.; Kannan, V.R. Evaluation of the Production of Exopolysaccharide by Plant Growth Promoting Yeast *Rhodotorula* Sp. Strain CAH2 under Abiotic Stress Conditions. *Int J Biol Macromol* **2019**, *121*, 55–62, doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.10.016.
23. Sun, P.-F.; Fang, W.-T.; Shin, L.-Y.; Wei, J.-Y.; Fu, S.-F.; Chou, J.-Y. Indole-3-Acetic Acid-Producing Yeasts in the Phyllosphere of the Carnivorous Plant *Drosera Indica* L. *PLoS One* **2014**, *9*, e114196, doi:10.1371/journal.pone.0114196.
24. Ramos-Garza, J.; Bustamante-Brito, R.; Ángeles de Paz, G.; Medina-Canales, Ma.G.; Vásquez-Murrieta, M.S.; Wang, E.T.; Rodríguez-Tovar, A.V. Isolation and Characterization of Yeasts Associated with Plants Growing in Heavy-Metal- and Arsenic-Contaminated Soils. *Can J Microbiol* **2016**, *62*, 307–319, doi:10.1139/cjm-2015-0226.
25. Radić, D.; Karličić, V.; Đorđević, J.; Jovičić-Petrović, J.; Kljujev, I.; Lalević, B.; Raičević, V. Soil Yeasts Promoting Plant Growth: Benefits for the Development of Common Wheat and White Mustard. *Zemdirbyste-Agriculture* **2022**, *109*, 27–34, doi:10.13080/z-a.2022.109.004.
26. Liu, W.; Wang, B.; Wang, Q.; Hou, J.; Wu, L.; Wood, J.L.; Luo, Y.; Franks, A.E. Characteristics of Metal-Tolerant Plant Growth-Promoting Yeast (*Cryptococcus* Sp. NSE1) and Its Influence on Cd Hyperaccumulator *Sedum Plumbizincicola*. *Environmental Science and Pollution Research* **2016**, *23*, 18621–18629, doi:10.1007/s11356-016-7041-2.
27. Fu, S.-F.; Sun, P.-F.; Lu, H.-Y.; Wei, J.-Y.; Xiao, H.-S.; Fang, W.-T.; Cheng, B.-Y.; Chou, J.-Y. Plant Growth-Promoting Traits of Yeasts Isolated from the Phyllosphere and Rhizosphere of *Drosera Spatulata* Lab. *Fungal Biol* **2016**, *120*, 433–448, doi:10.1016/j.funbio.2015.12.006.
28. Botha, A. The Importance and Ecology of Yeasts in Soil. *Soil Biol Biochem* **2011**, *43*, 1–8, doi:10.1016/j.soilbio.2010.10.001.
29. Braus, G.H. Aromatic Amino Acid Biosynthesis in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*: A Model System for the Regulation of a Eukaryotic Biosynthetic Pathway. *Microbiol Rev* **1991**, *55*, 349–370, doi:10.1128/mr.55.3.349-370.1991.
30. Gómez-Arreaza, A.; Acosta, H.; Quiñones, W.; Concepción, J.L.; Michels, P.A.M.; Avilán, L. Extracellular Functions of Glycolytic Enzymes of Parasites: Unpredicted

Use of Ancient Proteins. *Mol Biochem Parasitol* **2014**, *193*, 75–81, doi:10.1016/j.molbiopara.2014.02.005.

31. Lee, J.W.; Yook, S.; Koh, H.; Rao, C. V.; Jin, Y.-S. Engineering Xylose Metabolism in Yeasts to Produce Biofuels and Chemicals. *Curr Opin Biotechnol* **2021**, *67*, 15–25, doi:10.1016/j.copbio.2020.10.012.
32. Rao, R.P.; Hunter, A.; Kashpur, O.; Normanly, J. Aberrant Synthesis of Indole-3-Acetic Acid in *Saccharomyces Cerevisiae* Triggers Morphogenic Transition, a Virulence Trait of Pathogenic Fungi. *Genetics* **2010**, *185*, 211–220, doi:10.1534/genetics.109.112854.
33. Toyn, J.H.; Gunyuzlu, P.; White, W.H.; Thompson, L.A.; Hollis, G.F. A Counterselection for the Tryptophan Pathway in Yeast: 5-Fluoroanthranilic Acid Resistance. *Yeast* **2000**, *16*, 553–560, doi:10.1002/(SICI)1097-0061(200004)16:6<553::AID-YEA554>3.0.CO;2-7.
34. Tzin, V.; Galili, G. The Biosynthetic Pathways for Shikimate and Aromatic Amino Acids in *Arabidopsis Thaliana*. *Arabidopsis Book* **2010**, *8*, e0132, doi:10.1199/tab.0132.
35. Mendes, R.; Garbeva, P.; Raaijmakers, J.M. The Rhizosphere Microbiome: Significance of Plant Beneficial, Plant Pathogenic, and Human Pathogenic Microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* **2013**, *37*, 634–663, doi:10.1111/1574-6976.12028.
36. Khunnamwong, P.; Lertwattanasakul, N.; Jindamorakot, S.; Suwannarach, N.; Matsui, K.; Limtong, S. Evaluation of Antagonistic Activity and Mechanisms of Endophytic Yeasts against Pathogenic Fungi Causing Economic Crop Diseases. *Folia Microbiol (Praha)* **2020**, *65*, 573–590, doi:10.1007/s12223-019-00764-6.
37. Chen, O.; Yi, L.; Deng, L.; Ruan, C.; Zeng, K. Screening Antagonistic Yeasts against Citrus Green Mold and the Possible Biocontrol Mechanisms of *Pichia Galeiformis* (*<scp>BAF03</Scp>*). *J Sci Food Agric* **2020**, *100*, 3812–3821, doi:10.1002/jsfa.10407.
38. Cabañas, C.M.; Hernández, A.; Martínez, A.; Tejero, P.; Vázquez-Hernández, M.; Martín, A.; Ruiz-Moyano, S. Control of *Penicillium Glabrum* by Indigenous Antagonistic Yeast from Vineyards. *Foods* **2020**, *9*, 1864, doi:10.3390/foods9121864.
39. Abdel-Kareem, M.Marwa.; Zohri, A.-N.A.; Nasr, S.A.E.E. Novel Marine Yeast Strains as Plant Growth-Promoting Agents Improve Defense in Wheat (*Triticum Aestivum*) against *Fusarium Oxysporum*. *Journal of Plant Diseases and Protection* **2021**, *128*, 973–988, doi:10.1007/s41348-021-00461-y.
40. Lara-Capistran, L.; Zulueta-Rodriguez, R.; Castellanos-Cervantes, T.; Reyes-Perez, J.J.; Preciado-Rangel, P.; Hernandez-Montiel, L.G. Efficiency of Marine Bacteria and Yeasts on the Biocontrol Activity of *Pythium Ultimum* in Ancho-Type Pepper Seedlings. *Agronomy* **2020**, *10*, 408, doi:10.3390/agronomy10030408.
41. Ferraz, L.P.; Cunha, T. da; da Silva, A.C.; Kupper, K.C. Biocontrol Ability and Putative Mode of Action of Yeasts against *Geotrichum Citri-Aurantii* in Citrus Fruit. *Microbiol Res* **2016**, *188–189*, 72–79, doi:10.1016/j.micres.2016.04.012.
42. Kharchoufi, S.; Parafati, L.; Licciardello, F.; Muratore, G.; Hamdi, M.; Cirvilleri, G.; Restuccia, C. Edible Coatings Incorporating Pomegranate Peel Extract and

Biocontrol Yeast to Reduce *Penicillium Digitatum* Postharvest Decay of Oranges. *Food Microbiol* **2018**, *74*, 107–112, doi:10.1016/j.fm.2018.03.011.

43. Oro, L.; Feliziani, E.; Ciani, M.; Romanazzi, G.; Comitini, F. Volatile Organic Compounds from *Wickerhamomyces Anomalus*, *Metschnikowia Pulcherrima* and *Saccharomyces Cerevisiae* Inhibit Growth of Decay Causing Fungi and Control Postharvest Diseases of Strawberries. *Int J Food Microbiol* **2018**, *265*, 18–22, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.027.
44. Grzegorzczak, M.; Żarowska, B.; Restuccia, C.; Cirvilleri, G. Postharvest Biocontrol Ability of Killer Yeasts against *Monilinia Fructigena* and *Monilinia Fructicola* on Stone Fruit. *Food Microbiol* **2017**, *61*, 93–101, doi:10.1016/j.fm.2016.09.005.
45. Golubev, W.I.; Kulakovskaya, T. V.; Shashkov, A.S.; Kulakovskaya, E. V.; Golubev, N. V. Antifungal Cellobiose Lipid Secreted by the Epiphytic Yeast *Pseudozyma Graminicola*. *Microbiology (N Y)* **2008**, *77*, 171–175, doi:10.1134/S0026261708020082.
46. Liu, J.; Li, G.; Sui, Y. Optimization of Culture Medium Enhances Viable Biomass Production and Biocontrol Efficacy of the Antagonistic Yeast, *Candida Diversa*. *Front Microbiol* **2017**, *8*, doi:10.3389/fmicb.2017.02021.
47. Huang, R.; Li, G.Q.; Zhang, J.; Yang, L.; Che, H.J.; Jiang, D.H.; Huang, H.C. Control of Postharvest Botrytis Fruit Rot of Strawberry by Volatile Organic Compounds of *Candida Intermedia*. *Phytopathology* **2011**, *101*, 859–869, doi:10.1094/PHYTO-09-10-0255.
48. Arrarte, E.; Garmendia, G.; Rossini, C.; Wisniewski, M.; Vero, S. Volatile Organic Compounds Produced by Antarctic Strains of *Candida Sake* Play a Role in the Control of Postharvest Pathogens of Apples. *Biological Control* **2017**, *109*, 14–20, doi:10.1016/j.biocontrol.2017.03.002.
49. Chen, P.-H.; Chen, R.-Y.; Chou, J.-Y. Screening and Evaluation of Yeast Antagonists for Biological Control of *Botrytis Cinerea* on Strawberry Fruits. *Mycobiology* **2018**, *46*, 33–46, doi:10.1080/12298093.2018.1454013.
50. Silva, T.M.; Stets, M.I.; Mazzetto, A.M.; Andrade, F.D.; Pileggi, S.A. V.; Fávero, P.R.; Cantú, M.D.; Carrilho, E.; Carneiro, P.I.B.; Pileggi, M. Degradation of 2,4-D Herbicide by Microorganisms Isolated from Brazilian Contaminated Soil. *Brazilian Journal of Microbiology* **2007**, *38*, 522–525, doi:10.1590/S1517-83822007000300026.
51. Lee, G.; Lee, S.-H.; Kim, K.M.; Ryu, C.-M. Foliar Application of the Leaf-Colonizing Yeast *Pseudozyma Churashimaensis* Elicits Systemic Defense of Pepper against Bacterial and Viral Pathogens. *Sci Rep* **2017**, *7*, 39432, doi:10.1038/srep39432.
52. Zhao, Y.; Li, Y.; Zhang, B. Induced Resistance in Peach Fruit as Treated by *Pichia Guilliermondii* and Their Possible Mechanism. *Int J Food Prop* **2020**, *23*, 34–51, doi:10.1080/10942912.2019.1705336.
53. Simova, E.D.; Frengova, G.I.; Beshkova, D.M. Synthesis of Mannose-Rich Exopolysaccharide by *Rhodotorula Glutinis* 16P Co-Cultured with Yeast or Bacteria. *Zeitschrift für Naturforschung C* **2000**, *55*, 540–545, doi:10.1515/znc-2000-7-811.
54. Grigorova, D.; Simova, E.; Pavlova, K.; Frengova, G.; Beshkova, D. Polysaccharides Production by Yeast in Whey Ultrafiltrate. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **1994**, *8*, 31–37, doi:10.1080/13102818.1994.10818804.

55. Vogel, H.; Shukla, S.P.; Engl, T.; Weiss, B.; Fischer, R.; Steiger, S.; Heckel, D.G.; Kaltenpoth, M.; Vilcinskis, A. The Digestive and Defensive Basis of Carcass Utilization by the Burying Beetle and Its Microbiota. *Nat Commun* **2017**, *8*, 15186, doi:10.1038/ncomms15186.
56. Varotto Boccazzi, I.; Ottoboni, M.; Martin, E.; Comandatore, F.; Vallone, L.; Sprangers, T.; Eeckhout, M.; Mereghetti, V.; Pinotti, L.; Epis, S. A Survey of the Mycobiota Associated with Larvae of the Black Soldier Fly (*Hermetia Illucens*) Reared for Feed Production. *PLoS One* **2017**, *12*, e0182533, doi:10.1371/journal.pone.0182533.
57. Al Nagggar, Y.; Singavarapu, B.; Paxton, R.J.; Wubet, T. Bees under Interactive Stressors: The Novel Insecticides Flupyradifurone and Sulfoxaflor along with the Fungicide Azoxystrobin Disrupt the Gut Microbiota of Honey Bees and Increase Opportunistic Bacterial Pathogens. *Science of The Total Environment* **2022**, *849*, 157941, doi:10.1016/j.scitotenv.2022.157941.
58. Qiao, H.; Keeseey, I.W.; Hansson, B.S.; Knaden, M. Gut Microbiota Affects Development and Olfactory Behavior in *Drosophila Melanogaster*. *Journal of Experimental Biology* **2019**, doi:10.1242/jeb.192500.
59. de Lima Targino, H.M.; Silva, V.S.L.; Escobar, I.E.C.; Ribeiro, P.R. de A.; Gava, C.A.T.; Fernandes-Júnior, P.I. Maize-Associated *Meyerozyma* from the Brazilian Semiarid Region Are Effective Plant Growth-Promoting Yeasts. *Rhizosphere* **2022**, *22*, 100538, doi:10.1016/j.rhisph.2022.100538.
60. Fernandez-San Millan, A.; Larraya, L.; Farran, I.; Ancin, M.; Veramendi, J. Successful Biocontrol of Major Postharvest and Soil-Borne Plant Pathogenic Fungi by Antagonistic Yeasts. *Biological Control* **2021**, *160*, 104683, doi:10.1016/j.biocontrol.2021.104683.
61. FAO FAOSAT. Available online: <https://www.fao.org/faostat/en/#home> (accessed on 15/09/2024).
62. Goulart, A.C.P.; Nunes, J.C. da S. Evolução e Cenário Atual Do Tratamento de Sementes de Soja Com Fungicidas No Brasil. *Revista Cultivar:Embrapa* **2021**.
63. International Herbicide-Resistant Weed Database Most Recent Cases of Herbicide Resistant Weeds Entered into the Database.
64. Guo, L.; Li, R.; Chen, W.; Dong, F.; Zheng, Y.; Li, Y. The Interaction Effects of Pesticides with *Saccharomyces Cerevisiae* and Their Fate during Wine-Making Process. *Chemosphere* **2023**, *328*, 138577, doi:10.1016/j.chemosphere.2023.138577.
65. Wachowska, U.; Irzykowski, W.; Jędrzycka, M. Agrochemicals: Effect on Genetic Resistance in Yeasts Colonizing Winter Wheat Kernels. *Ecotoxicol Environ Saf* **2018**, *162*, 77–84, doi:10.1016/j.ecoenv.2018.06.042.
66. Čuš, F.; Raspor, P. The Effect of Pyrimethanil on the Growth of Wine Yeasts. *Lett Appl Microbiol* **2008**, *47*, 54–59, doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02383.x.
67. Viegas, C.A.; Cabral, M.G.; Teixeira, M.C.; Neumann, G.; Heipieper, H.J.; Sá-Correia, I. Yeast Adaptation to 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Involves Increased Membrane Fatty Acid Saturation Degree and Decreased OLE1 Transcription. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, *330*, 271–278, doi:10.1016/j.bbrc.2005.02.158.

68. Marchi, G.; Carvalho, E.; Tadeu, S.M.; Guimarães, G. Documentos 227 Herbicidas: Mecanismos de Ação e Uso Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Cerrados Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **2008**.
69. Cabral, M.G.; Viegas, C.A.; Teixeira, M.C.; Sá-Correia, I. Toxicity of Chlorinated Phenoxyacetic Acid Herbicides in the Experimental Eukaryotic Model *Saccharomyces Cerevisiae*: Role of PH and of Growth Phase and Size of the Yeast Cell Population. *Chemosphere* **2003**, *51*, 47–54, doi:10.1016/S0045-6535(02)00614-8.
70. Teixeira, M.C.; Telo, J.P.; Duarte, N.F.; Sá-Correia, I. The Herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Induces the Generation of Free-Radicals and Associated Oxidative Stress Responses in Yeast. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**, *324*, 1101–1107, doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.158.
71. Barney, J.B.; Winans, M.J.; Blackwood, C.B.; Pupo, A.; Gallagher, J.E.G. The Yeast Atlas of Appalachia: Species and Phenotypic Diversity of Herbicide Resistance in Wild Yeast. *Diversity (Basel)* **2020**, *12*, 139, doi:10.3390/d12040139.
72. Van Bruggen, A.H.C.; He, M.M.; Shin, K.; Mai, V.; Jeong, K.C.; Finckh, M.R.; Morris, J.G. Environmental and Health Effects of the Herbicide Glyphosate. *Science of The Total Environment* **2018**, *616–617*, 255–268, doi:10.1016/j.scitotenv.2017.10.309.
73. Braconi, D.; Possenti, S.; Laschi, M.; Geminiani, M.; Lusini, P.; Bernardini, G.; Santucci, A. Oxidative Damage Mediated by Herbicides on Yeast Cells. *J Agric Food Chem* **2008**, *56*, 3836–3845, doi:10.1021/jf800074p.
74. Ravishankar, A.; Cumming, J.R.; Gallagher, J.E.G. Mitochondrial Metabolism Is Central for Response and Resistance of *Saccharomyces Cerevisiae* to Exposure to a Glyphosate-Based Herbicide. *Environmental Pollution* **2020**, *262*, 114359, doi:10.1016/j.envpol.2020.114359.
75. Lescano, M.; Fussoni, N.; Vidal, E.; Zalazar, C. Biodegradation of Pesticide-Contaminated Wastewaters from a Formulation Plant Employing a Pilot Scale Biobed. *Science of The Total Environment* **2022**, *807*, 150758, doi:10.1016/j.scitotenv.2021.150758.
76. Stoyanova, K.; Gerginova, M.; Peneva, N.; Dincheva, I.; Alexieva, Z. Biodegradation and Utilization of the Pesticides Glyphosate and Carbofuran by Two Yeast Strains. *Processes* **2023**, *11*, 3343, doi:10.3390/pr11123343.
77. Gil, F.N.; Gonçalves, A.C.; Becker, J.D.; Viegas, C.A. Comparative Analysis of Transcriptomic Responses to Sub-Lethal Levels of Six Environmentally Relevant Pesticides in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Ecotoxicology* **2018**, *27*, 871–889, doi:10.1007/s10646-018-1929-1.
78. Teixeira, M.C.; Fernandes, A.R.; Mira, N.P.; Becker, J.D.; Sá-Correia, I. Early Transcriptional Response of *Saccharomyces Cerevisiae* to Stress Imposed by the Herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. *FEMS Yeast Res* **2006**, *6*, 230–248, doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00041.x.
79. National Library of Medicine Pub Chem: Explore Chemistry.
80. Kumar, A.; Trefault, N.; Olaniran, A.O. Microbial Degradation of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid: Insight into the Enzymes and Catabolic Genes Involved,

Their Regulation and Biotechnological Implications. *Crit Rev Microbiol* **2014**, 1–15, doi:10.3109/1040841X.2014.917068.

81. Patriarcheas, D.; Momtareen, T.; Gallagher, J.E.G. Yeast of Eden: Microbial Resistance to Glyphosate from a Yeast Perspective. *Curr Genet* **2023**, 69, 203–212, doi:10.1007/s00294-023-01272-4.
82. Chen, Y.; Chen, W.-J.; Huang, Y.; Li, J.; Zhong, J.; Zhang, W.; Zou, Y.; Mishra, S.; Bhatt, P.; Chen, S. Insights into the Microbial Degradation and Resistance Mechanisms of Glyphosate. *Environ Res* **2022**, 215, 114153, doi:10.1016/j.envres.2022.114153.
83. Ariffin, F.; Rahman, S.A. Biodegradation of Carbofuran; A Review. *Journal of Environmental Microbiology and Toxicology* **2020**, 8, 50–57, doi:10.54987/jemat.v8i1.523.
84. Kocárek, M.; Artikov, H.; Vorisek, K.; Boruvka, L. Pendimethalin Degradation in Soil and Its Interaction with Soil Microorganisms. *Soil and Water Research* **2016**, 11, 213–219, doi:10.17221/226/2015-SWR.
85. Han, Y.; Tang, Z.; Bao, H.; Wu, D.; Deng, X.; Guo, G.; Ye, B.-C.; Dai, B. Degradation of Pendimethalin by the Yeast YC2 and Determination of Its Two Main Metabolites. *RSC Adv* **2019**, 9, 491–497, doi:10.1039/C8RA07872F.
86. Abigail, E.A.; Abdul Salam, J.; Das, N. Atrazine Degradation in Liquid Culture and Soil by a Novel Yeast *Pichia kudriavzevii* Strain Atz-EN-01 and Its Potential Application for Bioremediation. *J Appl Pharm Sci* **2013**, 3, 35–43, doi:10.7324/JAPS.2013.3606.
87. Zaharia, M.; Jurcoane, S.; Maftei, D.; Pui, A.; Dumitras-Hutanu, C.A.; Gradinaru, R. Yeast Biodegradation of Some Pesticide Dinitrophenols. *Rom Biotechnol Lett* **2013**, 18, 8151.
88. Bobate, S.; Bokade, P.; Bajaj, A. Engineered Yeasts as Biocatalysts for Pesticide Degradation. In *Advances in Yeast Biotechnology for Biofuels and Sustainability*; Elsevier, 2023; pp. 449–474.
89. Marraffini, L.A. CRISPR-Cas Immunity in Prokaryotes. *Nature* **2015**, 526, 55–61, doi:10.1038/nature15386.
90. Nambiar, T.S.; Baudrier, L.; Billon, P.; Ciccía, A. CRISPR-Based Genome Editing through the Lens of DNA Repair. *Mol Cell* **2022**, 82, 348–388, doi:10.1016/j.molcel.2021.12.026.
91. Xia, Y.; Li, Y.; Shen, W.; Yang, H.; Chen, X. CRISPR-Cas Technology for Bioengineering Conventional and Non-Conventional Yeasts: Progress and New Challenges. *Int J Mol Sci* **2023**, 24, 15310, doi:10.3390/ijms242015310.
92. Pacesa, M.; Pelea, O.; Jinek, M. Past, Present, and Future of CRISPR Genome Editing Technologies. *Cell* **2024**, 187, 1076–1100, doi:10.1016/j.cell.2024.01.042.
93. Imaishi, H.; Matumoto, S. Isolation and Functional Characterization in Yeast of CYP72A18, a Rice Cytochrome P450 That Catalyzes (ω -1)-Hydroxylation of the Herbicide Pelargonic Acid. *Pestic Biochem Physiol* **2007**, 88, 71–77, doi:10.1016/j.pestbp.2006.09.003.
94. Shiota, N.; Kodama, S.; Inui, H.; Ohkawa, H. Expression of Human Cytochromes P450 1A1 and P450 1A2 as Fused Enzymes with Yeast NADPH-Cytochrome P450

Oxidoreductase in Transgenic Tobacco Plants. *Biosci Biotechnol Biochem* **2000**, *64*, 2025–2033, doi:10.1271/bbb.64.2025.

95. Hayashi, E.; Fuzimoto, K.; Imaishi, H. Expression of Arabidopsis Thaliana Cytochrome P450 Monooxygenase, CYP71A12, in Yeast Catalyzes the Metabolism of Herbicide Pyrazoxyfen. *Plant Biotechnology* **2007**, *24*, 393–396, doi:10.5511/plantbiotechnology.24.393.
96. Mi, H.; Zhou, Q.; Li, G.; Tao, Y.; Wang, A.; Wang, P.; Yang, T.; Zhu, J.; Li, Y.; Wei, C.; *et al.* Molecular Responses Reveal That Two Glutathione S-Transferase CsGSTU8s Contribute to Detoxification of Glyphosate in Tea Plants (*Camellia Sinensis*). *Int J Biol Macromol* **2024**, *277*, 134304, doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.134304.
97. Kuroda, K.; Ueda, M. Cell Surface Engineering of Yeast for Applications in White Biotechnology. *Biotechnol Lett* **2011**, *33*, 1–9, doi:10.1007/s10529-010-0403-9.
98. Ye, M.; Ye, Y.; Du, Z.; Chen, G. Cell-Surface Engineering of Yeasts for Whole-Cell Biocatalysts. *Bioprocess Biosyst Eng* **2021**, *44*, 1003–1019, doi:10.1007/s00449-020-02484-5.
99. Takayama, K.; Suye, S. -i.; Kuroda, K.; Ueda, M.; Kitaguchi, T.; Tsuchiyama, K.; Fukuda, T.; Chen, W.; Mulchandani, A. Surface Display of Organophosphorus Hydrolase on *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biotechnol Prog* **2006**, *22*, 939–943, doi:10.1021/bp060107b.
100. Fukuda, T.; Tsuchiyama, K.; Makishima, H.; Takayama, K.; Mulchandani, A.; Kuroda, K.; Ueda, M.; Suye, S. Improvement in Organophosphorus Hydrolase Activity of Cell Surface-Engineered Yeast Strain Using Flo1p Anchor System. *Biotechnol Lett* **2010**, *32*, 655–659, doi:10.1007/s10529-010-0204-1.
101. Rezende, C.C.; Silva, M.A.; Frasca, L.L. de M.; Faria, D.R.; Filippi, M.C.C. de; Lanna, A.C.; Nascente, A.S. Microrganismos Multifuncionais: Utilização Na Agricultura. *Research, Society and Development* **2021**, *10*, e50810212725, doi:10.33448/rsd-v10i2.12725.
102. Gabardo, G.; Da Silva, H.L.; Clock, D.C. “On Farm” Production of Microorganisms in Brazil. *Scientia Agraria Paranaensis* **2021**, 312–318, doi:10.18188/sap.v20i4.28587.

2. **CAPÍTULO 2 – DEGRADAÇÃO DE 2,4-D E PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO POR LEVEDURAS ISOLADAS DA MICROBIOTA DE INSETOS POLINIZADORES**

2.1. INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial previsto para os próximos anos gerará a necessidade de maior disponibilidade de alimentos. Atualmente, os números obtidos pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) mostram que a fome e a insegurança alimentar acometeu grande porcentagem da população mundial (FAO, 2022).

A solução para esse problema não consiste apenas no aumento da produção de alimentos através do aumento da área plantada, mas sim por alteração no modo de se produzir, no desenvolvimento e aplicação de políticas públicas e incentivos à produção de alimentos de maneira sustentável (FAO, 2022). Nesse sentido, há a necessidade de explorar outros aspectos envolvidos na produção agrícola.

Ao longo dos anos, diversas foram as intervenções genéticas realizadas em espécies cultivadas. Muitas delas contribuíram para o aumento de produtividade e para uma melhor adaptação edafoclimática dessas espécies, tornando possível a produção em novas regiões antes não exploradas (SILVA *et al.*, 2021). Outras viabilizaram o uso de agrotóxicos sobre as culturas de interesse sem que essas fossem atingidas pelo produto químico, fato que auxilia o produtor no manejo, porém, incorre no uso de maior quantidade de produtos químicos no ciclo de cultivo (MONQUERO, 2016).

Com maior carga desses agrotóxicos aplicados no ambiente rural, há maior número de intoxicações tanto aos aplicadores quanto aos consumidores dos produtos tratados, visto que alguns alimentos apresentam resíduos de produtos químicos utilizados no ambiente agrícola. Há também desequilíbrios ambientais causados por essas substâncias, o que gera a necessidade da redução do uso desses produtos sintéticos e a substituição por uso de ferramentas menos agressivas, para proteção do ambiente, das pessoas e dos animais nele inseridos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2023).

Cabe destacar que esse impacto negativo pode se dar por meio do efeito desses compostos sintéticos sobre a microbiota do ambiente agrícola. A literatura está repleta de exemplos do efeito nocivo dos agrotóxicos sobre os microrganismos do solo e, conseqüentemente, sobre a produção de alimentos (DHULDHAJG *et al.*, 2023; JEYASEELAN *et al.*, 2024; SHARMA *et al.*, 2023). Contudo, os agrotóxicos podem afetar também outros microrganismos do ambiente, como aqueles que se estabelecem como um elo entre plantas e insetos polinizadores, causando prejuízos à reprodução de algumas espécies vegetais (FENNER *et al.*, 2022). Ademais, é reconhecido também que esses microrganismos cumprem outros papéis na associação com plantas, na proteção destas frente ao ataque de patógenos, na supressão do crescimento de plantas competidoras ou no estímulo do crescimento das plantas de interesse econômico (GIEHL *et al.*, 2023; TADIOTO *et al.*, 2023). Desse modo, é importante avaliar o efeito desses compostos sintéticos sobre os microrganismos associados ao ambiente agrícola, em especial aqueles que compõem o microbioma de insetos polinizadores.

Entre tantas funções biológicas, os microrganismos, como as leveduras, também são fonte de biotecnologias que podem ser utilizadas pela indústria para os mais diversos usos (NGUYEN *et al.* 2024, PEÑA, *et al.*, 2018). Deste modo, esses seres unicelulares compõem um rol de ferramentas com impacto ambiental inferior aos produtos sintéticos hoje empregados na agricultura. Ademais, leveduras têm a capacidade de produzir ácido indol-3-acético (AIA), que é uma auxina, hormônio vegetal ligado ao crescimento apical, radicular e lateral das plantas (TAIZ *et al.*, 2017). A presença desse composto no ambiente causa melhor desenvolvimento das culturas por causar incremento significativo em aspectos como a massa radicular e aérea, o que indica sua atuação na promoção de crescimento vegetal, mesmo sem a adição do triptofano no meio, substância precursora do AIA (FERNANDEZ-SAN MILLAN *et al.*, 2020).

Além do uso das leveduras como promotoras de crescimento, o emprego desses organismos na biorremediação traz benefícios ao ambiente de produção, uma vez que estes podem atuar na degradação de moléculas sintéticas presentes em ambientes agrícolas (STOYANOVA *et al.*, 2023; HAN, ZHAO e LI, 2015), o que reduz danos à microbiota presente. Esses microrganismos unicelulares também

podem contribuir em processos industriais de degradação de pesticidas em produtos de origem agrícola (ČUŠ e RASPOR, 2008), contribuindo para a manutenção da segurança de produtos para consumo humano e animal, facilitando o acesso à segurança alimentar almejada pela FAO (MASSOUD *et al.*, 2019). Além disso, promovem benefícios econômicos e ambientais, o que é amplamente aceito e desejado mundialmente (AL-TOHAMY *et al.*, 2022).

Os herbicidas sintéticos são largamente utilizados nos campos de produção agrícola convencionais com a finalidade de controlar as plantas invasoras. Dentre esses herbicidas, destacam-se aqueles baseados nos Ingredientes Ativos (IA) glifosato, pertencente ao grupo Derivados de Glicina, e o 2,4-D, pertencente ao grupo Fenóxi (MARCHI; MARCHI; GUIMARÃES, 2008). Esses dois IA são os mais amplamente comercializados no país (BRASIL, 2024a).

Os herbicidas que contam com o IA glifosato têm sua atividade diretamente relacionada à via metabólica do chiquimato. Nessa via, a enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (EPSPs), em situações normais, une-se ao seu substrato natural, o fosfoenolpiruvato (PEP). Contudo, a enzima EPSPs possui uma afinidade de 39,9 a 87,5 vezes maior pela molécula do glifosato do que pelo PEP (CHEN *et al.*, 2023). Desse modo, assim que a molécula sintética acessa o interior da célula, ela acaba por se ligar à enzima, o que impede a conexão desta com o seu substrato natural.

Essa atuação impede a continuidade da via metabólica ao impossibilitar a formação de três metabólitos primários essenciais: os aminoácidos aromáticos Tirosina, Triptofano e Fenilalanina. Esses aminoácidos possuem funções importantes para a manutenção da vida de plantas e microrganismos, sobretudo, das leveduras (LEE e WENDISCH, 2017), o que impacta negativamente no desenvolvimento de espécies microbianas sensíveis a esse IA (DUKE, 2018).

Nas plantas, esses aminoácidos aromáticos assumem papéis importantes na síntese de metabólitos secundários como flavonoides, compostos fenólicos e alcaloides, que estão ligados à defesa da planta, à resposta a estresses ambientais, à ação contra patógenos e à própria estrutura dos vegetais. O triptofano, além das outras funções, ainda atua como precursor de fitormônios auxinas, dentre eles, o ácido indol-3-acético (AIA) (TAIZ *et al.*, 2017).

Esses mesmos três aminoácidos desempenham papéis imprescindíveis também à sobrevivência das leveduras. Além de serem necessários à síntese de proteínas, cada um deles desempenha algumas funções específicas. A tirosina auxilia na síntese de metabólitos secundários com papel fundamental na defesa celular e resposta a estresses ambientais, como alcaloides (DELOACHE *et al.*, 2015) e quinonas (PALSDOTTIR *et al.*, 2003). Outro composto produzido a partir da tirosina é a melanina, com importante função de proteger a célula em casos de estresse oxidativo (ZAJC *et al.*, 2019; ALMEIDA-PAES *et al.*, 2012). O triptofano, por sua vez, é precursor de outras moléculas bioativas como melatonina, serotonina (TAN *et al.*, 2016; SPRENGER *et al.*, 1999) e ácido quinolínico (YILMAZ e GÖKMEN, 2018), também ligadas à resposta das células ao estresse oxidativo. Por fim, a fenilalanina participa de rotas regulatórias e de sinalização, da síntese de metabólitos secundários relacionados à defesa celular e de respostas a estresses ambientais (KRIVORUCHKO e NIELSEN, 2015). Este aminoácido é importante também para a formação de compostos aromáticos, incorporando características organolépticas a bebidas fermentadas (HERNÁNDEZ-ORTE, CACHO e FERREIRA, 2002). Desse modo, ao atingir as células de leveduras, o glifosato impacta diretamente a síntese desses três importantes aminoácidos, o que inviabiliza o crescimento celular, além de comprometer outros processos relativos à defesa e manutenção da vida das leveduras.

No Brasil, atualmente, segundo o banco de informações sobre produtos agroquímicos e afins do Ministério da Agricultura e Pecuária - MAPA (AGROFIT), encontram-se registrados 150 produtos formulados que têm como ingrediente ativo o glifosato (BRASIL, 2024b). Essa variedade de opções possibilitou a comercialização de cerca de 266.088,12 toneladas do ingrediente ativo apenas no ano de 2022 em todo território nacional, segundo relatório do IBAMA (BRASIL, 2024a). O grande número de produtos formulados baseados nesse IA se deve a sua eficiência e facilidade de uso.

Já os herbicidas que possuem como IA o ácido 2,4-diclorofenoxiacético, também chamados de mimetizadores de auxinas, ou, simplesmente 2,4-D, são substâncias similares a fitormônios da classe das auxinas, presentes naturalmente nas plantas em baixas concentrações. No entanto, quando a concentração de auxinas, ou similares, é alta, as atividades de alongação e divisão celular e

diferenciação de tecidos são desreguladas, o que causa o crescimento desordenado dos tecidos e torna inviável a manutenção da vida da planta. Dessa forma, esse fitormônio atua como um herbicida.

As plantas gramíneas são menos suscetíveis a essa molécula, pois transportam as auxinas de maneira diferenciada em seu sistema, além de degradarem a molécula de 2,4-D, que então se torna ineficaz para esse tipo de planta. Devido a isso, os herbicidas 2,4-D são muito usados no controle de plantas dicotiledôneas ou de folhas largas, sobretudo em culturas como milho, arroz e trigo (MARCHI; MARCHI; GUIMARÃES, 2008).

No Brasil, no ano de 2022, foram comercializados um total de 65.356,52 ton do IA 2,4-D, o que corresponde ao segundo maior número de vendas no país, perdendo apenas para o glifosato (BRASIL, 2024a), distribuídos entre 103 produtos formulados registrados no MAPA (BRASIL, 2024b).

Dentro da proteção de cultivos, os herbicidas mimetizadores de auxinas apresentam problemas ao atingirem organismos vegetais não-alvo, fenômeno conhecido como deriva. Isso ocorre quando o produto aplicado em área convencional volatiliza e acaba por ser carregado pelo ar até atingir espécies vegetais suscetíveis a seus efeitos deletérios, o que dá origem à fitotoxicidade em diversos graus, que pode levar à morte de parte da área produtiva atingida (MARCHI; MARCHI; GUIMARÃES, 2008).

O ingrediente ativo 2,4-D tem grande importância histórica por ser o primeiro composto a ser utilizado como herbicida, e também por ser um dos dois ingredientes do produto conhecido como Agente Laranja, utilizado na guerra do Vietnã entre os anos de 1962 e 1975 pelos Estados Unidos para destruir a vegetação onde os soldados inimigos se mantinham camuflados. Os efeitos do uso dessas substâncias estão presentes na região até os dias atuais (USA, 2011).

2.1.1. Efeito de herbicidas sobre microrganismos associados a ambientes agrícolas

O prejuízo causado por herbicidas convencionais ao meio ambiente decorre, dentre outras razões, do efeito nocivo desses compostos sobre a vida microbiana. Dados da literatura demonstram que esses compostos reduzem significativamente a

biodiversidade de microrganismos do solo e de ambientes aquáticos (BADANI *et al.*, 2023), o que impede que as funções ecossistêmicas desempenhadas por bactérias e fungos ocorram nos ambientes impactados (RAINIO *et al.*, 2021).

Há também evidências de que a presença de glifosato no ambiente pode aumentar a população de microrganismos patogênicos em detrimento daqueles que são benéficos às plantas e animais. Ademais, dados sugerem que esse composto pode aumentar a suscetibilidade de organismos superiores a processos infecciosos (VAN BRUGGEN *et al.*, 2021).

Esse aumento de suscetibilidade a doenças decorre da perda da sua microbiota normal e da inibição da síntese de aminoácidos aromáticos, o que prejudica a síntese de proteínas (BADANI *et al.*, 2023). Prejuízos semelhantes já foram também observados diante do herbicida 2,4-D, com acentuado prejuízo a indicadores do solo, como diversidade e biomassa microbiana, respiração basal e respiração induzida por substrato (KELARLOU *et al.*, 2023).

Embora os microrganismos de solo sejam os mais evidentemente afetados pelo uso de herbicidas, é preciso considerar também o impacto dessas substâncias sobre as comunidades microbianas de outros microambientes. Nesse contexto, por exemplo, se inserem as microbiotas de insetos polinizadores — imprescindíveis para a reprodução de muitas espécies vegetais de interesse comercial (MITCHEL *et al.*, 2009). Por extensão, portanto, considerando a relação de interdependência que esses invertebrados estabelecem com os microrganismos que o habitam, o prejuízo à sua microbiota pode resultar na morte do animal e, conseqüentemente, inviabilizar a reprodução vegetal.

É importante destacar também que muitos dos microrganismos que habitam os corpos de insetos transitam entre eles e as flores de angiospermas, como é o caso das leveduras. De fato, a atração exercida pelas flores decorre especialmente de processos fermentativos conduzidos por células microbianas nos nectários florais. Como resultado dessas fermentações, são gerados compostos orgânicos voláteis (VOCs, na sigla em inglês) que atraem os insetos até as flores. Com isso, esses invertebrados se alimentam, as plantas se reproduzem, e as leveduras conseguem viajar entre flores ou simplesmente acessar o trato gastrointestinal dos animais, que

se apresenta como um ambiente adequado para a reprodução sexuada desses fungos unicelulares (revisto por FENNER *et al.*, 2022).

Enquanto habitam as plantas, muitas dessas leveduras fazem muito mais do que apenas fermentar o néctar das flores para atrair polinizadores. Alguns dos VOCs por elas produzidos, por exemplo, podem repelir insetos praga. Adicionalmente, as leveduras podem também proteger as plantas de microrganismos patogênicos e até mesmo estimular o crescimento vegetal (GIEHL *et al.*, 2023). A literatura relata ainda ensaios exitosos de leveduras empregadas como estratégia de conservação de frutos pós-colheita, graças a sua capacidade de produção de compostos bioativos (TADIOTO *et al.*, 2023).

Desse modo, estudos relacionados ao efeito de herbicidas sintéticos sobre células de leveduras são extremamente desejáveis. Ademais, tendo em vista o potencial biotecnológico desses que são os microrganismos mais amplamente empregados em bioprocessos (ALVES *et al.*, 2022), a seleção de linhagens com capacidade realizar a biorremediação ou produzir compostos capazes de promover o crescimento de vegetais pode resultar em alternativas sustentáveis para a produção de alimentos.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivo Geral

Avaliar a potencial contribuição de leveduras selvagens para a produção orgânica de alimentos, tanto por meio da degradação de pesticidas quanto pela capacidade de produção de ácido indol-3-acético.

2.2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de glifosato e 2,4-D (nas concentrações de 25%, 50%, 100% e 200% da dose recomendada na bula dos produtos) sobre o crescimento celular de leveduras isoladas dos insetos polinizadores: besouro *Astylus variegatus* e abelhas *Tetragonisca angustula* e *Scaptotrigona postica*;
- Avaliar a capacidade de degradação de 2,4-D pelas leveduras isoladas de insetos;

- Avaliar a produção de ácido indol-3-acético pelas referidas leveduras.

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1. Leveduras

As cepas de leveduras selvagens utilizadas no experimento são provenientes da coleção do Laboratório de Bioquímica de Leveduras do *Campus* Chapecó da UFFS (Portaria nº 207/PROPEPG/UFFS/2023¹) que foram previamente isoladas do besouro *Astylus variegatus* e das abelhas nativas *Tetragonisca angustula* e *Scaptotrigona postica* e posteriormente armazenadas no laboratório.

No processo de isolamento das cepas selvagens, as abelhas e besouros foram coletados e inoculados em frascos com meio líquido YNB (6,7 g/L base nitrogenada de levedura) com 10 g/L de xilose e 0,2 g/L de cloranfenicol. Após turvamento do meio, 10 µL da solução foram estriadas por esgotamento sobre meio sólido de mesma composição, acrescidos de 20 g/L de ágar. Após o crescimento, as cepas foram separadas conforme as características morfológicas das colônias. As cepas CHAP-223, CHAP-224, CHAP-237 e CHAP-239 foram isoladas do besouro *Astylus variegatus*, as cepas CHAP-242 e 248 foram isoladas da abelha *Scaptotrigona postica*, e a cepa CHAP-245, da abelha *Tetragonisca angustula*.

A identificação taxonômica das leveduras foi realizada pelo sequenciamento das regiões ITS1-5.8S-ITS2 e LSU do genoma das leveduras conforme descrito por Tadioto *et al.* (2022). Após identificadas, as regiões ITS das cepas CHAP-223, CHAP-237, CHAP-242 e CHAP-245 foram depositadas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) onde receberam os seguintes números: PP554891, PP554956, PP554968 e PP554987, respectivamente. As sequências LSU de três das cepas também foram depositadas no NCBI sob os números: PQ111512 (CHAP-223), PQ108907 (CHAP-237) e PQ112667 (CHAP-242).

¹ <https://www.uffs.edu.br/atos-normativos/portaria/propepg/2023-0207>

2.3.2. Cultivos celulares na presença de herbicidas sintéticos

Os herbicidas comerciais Zapp QI 620®, que tem como ingrediente ativo o glifosato potássico, e o Aminol 806®, composto pelo ingrediente ativo 2,4-D, foram escolhidos pela magnitude de seu uso na agricultura convencional no Brasil. Esses dois produtos foram utilizados para os testes em quatro concentrações distintas: 25%, 50%, 100% e 200% da dose indicada na bula de cada produto comercial. Mantendo essas proporções, as concentrações de ingrediente ativo utilizadas nos experimentos foram: 3,255 g/L, 6,51 g/L, 13,02 g/L, e 26,04 g/L de ingrediente ativo de glifosato e 1,51 g/L, 3,02 g/L, 6,045 g/L e 12,09 g/L do IA 2,4-D. Como controle, foi utilizado meio de cultura sem adição desses herbicidas.

As cepas de leveduras foram pré-crescidas em tubos de ensaio contendo meio YPD sólido (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% de ágar) durante 48 horas a 30°C. Após o pré-cultivo, 1 µL de células de leveduras foi inoculado em frascos Erlenmeyer com 1/5 da sua capacidade útil preenchida com YPD líquido acrescido das diferentes concentrações de herbicidas citadas acima. Os cultivos foram mantidos sob agitação em agitador orbital a 145 rpm por outras 48 h a 30°C.

A inoculação das cepas aos meios foi considerada o tempo “0” e, a partir deste momento, foram retiradas amostras às 14, 24, 38 e 48 horas de cultivo. Uma parte dessas amostras foi utilizada para a determinação do crescimento celular, por densidade óptica a 570 nm, enquanto outra foi submetida a centrifugação (9000 rpm, 3 min). Os sobrenadantes resultantes foram armazenados a -20 °C para análises posteriores, conforme descrito a seguir (ALBARELLO *et al.*, 2023).

2.3.3. Análise da degradação do 2,4-D pelas leveduras

As amostras retiradas no tempo zero e às 48 horas de fermentação, após submetidas à centrifugação, foram diluídas 15000 vezes para análise por cromatografia líquida de alta eficiência (LCMS-2020, Shimadzu), em coluna capilar C₁₈, nas seguintes condições: temperatura da fonte de ionização de 250°C, tempo de corrida de 26 minutos, fase móvel com água ultrapura e metanol e ácido fórmico como modificadores. Os resultados expressos no detector de massas determinaram a quantidade de 2,4-D na amostra em mg/L.

2.3.4. Análise de produção do Ácido indol-3-acético

A produção de AIA foi quantificada a partir de cultivos protegidos da luz em meio líquido YPD sem herbicidas a 30°C e 145 rpm. Sobrenadantes dos cultivos foram coletados em triplicata durante os crescimentos celulares, conforme descrito acima. A quantificação ocorreu por método colorimétrico com reagente de Salkowski (2 mL de Cloreto Férrico III 0,5 M e 98 mL de Ácido Perclórico a 35%), seguindo protocolo adaptado de Fu *et al.* (2016). Para isso, inicialmente, foi elaborada uma curva padrão com cinco concentrações distintas de AIA. Em cada análise, 500 µL de reagente de Salkowski foi misturado a 500 µL de amostra. A reação ocorreu durante 30 minutos, a temperatura ambiente, protegida da luz. Na sequência, as amostras foram submetidas a um espectrofotômetro e a absorbância foi registrada a 530 nm.

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1. Produção de Ácido Indol-3-Acético

A prospecção de microrganismos capazes de promover o crescimento de plantas é um tema amplamente explorado na literatura, e englobam rizobactérias, fungos filamentosos e leveduras que produzem compostos benéficos para o desenvolvimento vegetal. Essas espécies de microrganismos têm diversas aplicações agrícolas que servem como base para produtos comerciais voltados ao biocontrole de pragas e doenças vegetais, além de atuarem como biofertilizantes.

Neste estudo, foi avaliada a capacidade das cepas de leveduras em produzir ácido indol-3-acético (AIA). Ao fim dos cultivos as cepas apresentaram diferentes níveis de produção de AIA (Figura 7).

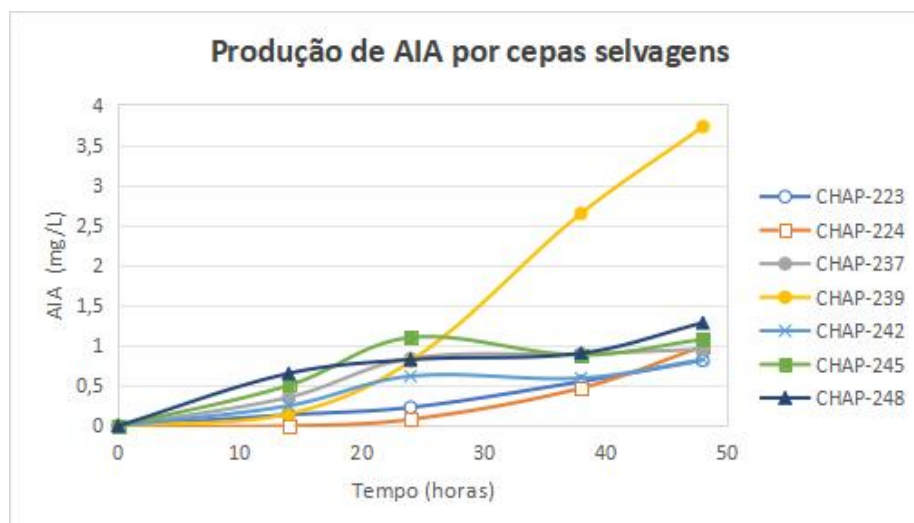


Figura 7 Curvas de produção de ácido indol-3-acético (em mg/L) pelas cepas selvagens durante as 48 horas de fermentação.

Em geral, quatro das cepas (CHAP-223, CHAP-224, CHAP-237 e CHAP-242) produziram menos de 1 mg/L de AIA, conforme apresentado na Tabela 4. As cepas CHAP-245 e CHAP-248 apresentaram valores superiores a 1 mg/L. O destaque nesse teste foi a cepa CHAP-239, que alcançou uma produção de 3,724 mg/L de AIA dentro das 48 horas de fermentação (Tabela 4).

Tabela 4. Quantidade de ácido indol-3-acético (mg/L) produzido pelas cepas após 48 h de cultivo. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de três experimentos independentes.

CEPA	Produção de AIA (mg/L)
CHAP-223	0,816 ± 0,039
CHAP-224	0,988 ± 0,091
CHAP-237	0,954 ± 0,071
CHAP-239	3,724 ± 0,053
CHAP-242	0,825 ± 0,086
CHAP-245	1,077 ± 0,040
CHAP-248	1,283 ± 0,072

A curva de produção de AIA das leveduras também revela como a produção da auxina se comportou em relação ao tempo de fermentação. Através dessa análise, observou-se que quatro das cepas atingiram o valor máximo de produção às 24 horas de fermentação, após o que não houve aumento na concentração de AIA (Figura 7).

Duas cepas, CHAP-223 e CHAP-224, apresentaram um padrão de produção de AIA notável, sendo que ambas iniciaram a produção após decorridas 24 horas de fermentação. O atraso na produção de AIA pode ser atribuído ao perfil de crescimento celular dessas cepas. As curvas de crescimento em meio YPD indicaram que ambas permaneceram na fase estacionária por 15 e 24 horas, respectivamente, justificando o início tardio da produção.

Até 14 horas de cultivo, a cepa CHAP-239 apresentou uma produção de auxina de apenas 0,149 mg/L, semelhante a outras cepas que também começaram a produção tardiamente. Contudo, a produção de AIA nesta cepa ganhou velocidade rapidamente e alcançou 0,805 mg/L às 24 horas de fermentação. Após 38 horas, a produção já havia dobrado, atingindo 2,644 mg/L, e, às 48 horas, chegou a 3,724 mg/L, sem sinais de desaceleração na curva de produção até o término da fermentação. O início da fase exponencial de produção da cepa CHAP-239 coincide com o momento em que se inicia seu crescimento celular exponencial, o que legitima o aumento na produção de AIA.

As cepas CHAP-242 e CHAP-245, ambas da espécie *Meyerozyma caribbica*, exibiram curvas de produção semelhantes: ambas iniciaram rapidamente a produção da auxina e estabilizaram a produção às 24 horas de fermentação — esse nível foi mantido até o final do experimento. As duas cepas apresentaram produções semelhantes, de 0,825 e 1,077 mg/L, respectivamente. No estudo de Fernández-San Millán *et al.*, cepas da mesma espécie mostraram produções de AIA de 2,08 e 1,06 mg/L, respectivamente, sem a adição de triptofano. Quando esse precursor foi incluído, a produção aumentou para 4,11 e 2,22 mg/L, respectivamente, em um período de 7 dias de fermentação (FERNANDEZ-SAN MILLAN *et al.*, 2020).

A produção de AIA pela levedura endofítica *Williopsis saturnus* alcançou 9,67 mg/L sem a adição de seu precursor, o triptofano. No entanto, com a inclusão desse precursor, a produção saltou para 22,51 mg/L, o que representa um incremento de 232% em relação à situação anterior. Além dos dados expressivos obtidos *in vitro*, a inoculação desta cepa nas raízes de milho resultou em um aumento significativo tanto no comprimento quanto na massa seca das raízes e da parte aérea. Esses resultados sugerem que, mesmo na ausência de suplementação externa de triptofano, a levedura estabeleceu uma simbiose com o milho, capturou o triptofano

fornecido pela planta e o utilizou para a produção de AIA, que quando disponibilizada à planta, promoveu o crescimento vegetal (NASSAR *et al.*, 2005)

A levedura de solo *Candida tropicalis* HY, conforme avaliado no estudo de Amprayn *et al.* (2012), apresentou uma produção de 2,6 mg/L de auxina com a adição de 0,1% de triptofano. Em ensaio *in vivo*, a levedura influenciou positivamente aspectos como o vigor da planta, pois o crescimento inicial das raízes e da parte aérea foram potencializados (AMPRAYN *et al.*, 2012). Isso resulta em um efeito benéfico direto em culturas de interesse e possibilita seu desenvolvimento inicial mais acelerado.

Duas cepas selvagens de *Rhodotorula mucilaginosa* e uma cepa de *Rhodotorula graminis* necessitaram da adição de triptofano ao meio para a produção de AIA, uma vez que não conseguiram produzir esse precursor de forma autônoma. Após 7 dias de inoculação, *R. graminis* apresentou uma produção de 40 mg por g de células secas de AIA. Em contrapartida, as cepas de *R. mucilaginosa* geraram concentrações inferiores a 20 mg/g e aproximadamente 9 mg/g do mesmo composto no mesmo período. Esses resultados destacam a levedura endofítica *R. graminis* pelo seu potencial em promover o crescimento de espécies vegetais e ressaltam sua aplicabilidade em biotecnologia e agricultura sustentável (XIN *et al.*, 2009).

Neste trabalho, todas as cepas apresentaram capacidade de produção de AIA, mesmo sem a adição do seu precursor, o triptofano. Com base em outros trabalhos, podemos sugerir que a adição desse composto aumentaria a capacidade de produção dessas cepas. Na relação planta-levedura, o triptofano pode ser fornecido ao microrganismo pela planta, já essa é beneficiada pela produção do AIA por parte da levedura, formando assim uma simbiose entre as duas espécies.

A análise da produção de AIA por leveduras evidencia a relevância desses organismos na promoção do crescimento vegetal e na sustentabilidade agrícola. As cepas estudadas demonstraram potencial para aplicações como organismos promotores de crescimento vegetal. A identificação e caracterização de cepas com essa capacidade podem contribuir significativamente para práticas agrícolas mais sustentáveis e promover a saúde do solo e das plantas, ao mesmo tempo em que minimizam os impactos ambientais dos pesticidas.

2.4.2. Crescimento das leveduras expostas aos herbicidas comerciais

A presença de herbicidas sintéticos no meio de cultivo teve impacto negativo no crescimento de todas as leveduras testadas, com variações na intensidade das alterações conforme a linhagem, ingrediente ativo e concentração do produto químico adicionado (Figura 8). Todas as cepas apresentaram dificuldade em seu desenvolvimento. Algumas delas não conseguiram superar o estresse causado pelos herbicidas, apresentando crescimento insignificante ao longo das 48 horas do experimento. Contudo, algumas cepas se sobressaíram e superaram o desafio, fato visualizado pela presença de crescimento celular. Esses resultados evidenciam o efeito das moléculas sobre os processos metabólicos das leveduras expostas às moléculas sintéticas.

Conforme pode ser verificado na Figura 8, duas linhagens (CHAP-223 e CHAP-224) não toleraram nenhuma das concentrações testadas dos herbicidas e uma (CHAP-239) resistiu apenas à concentração mais baixa de 2,4-D. As quatro leveduras que em maior ou menor medida cresceram diante das diferentes concentrações deste herbicida foram então identificadas taxonomicamente: a cepa CHAP-223 foi então identificada como *Papiliotrema rajasthanensis*, a CHAP-237, como *Kurtzmaniella quercitrusa*, e as cepas CHAP-242 e CHAP-245, como *Meyerozyma caribbica*.

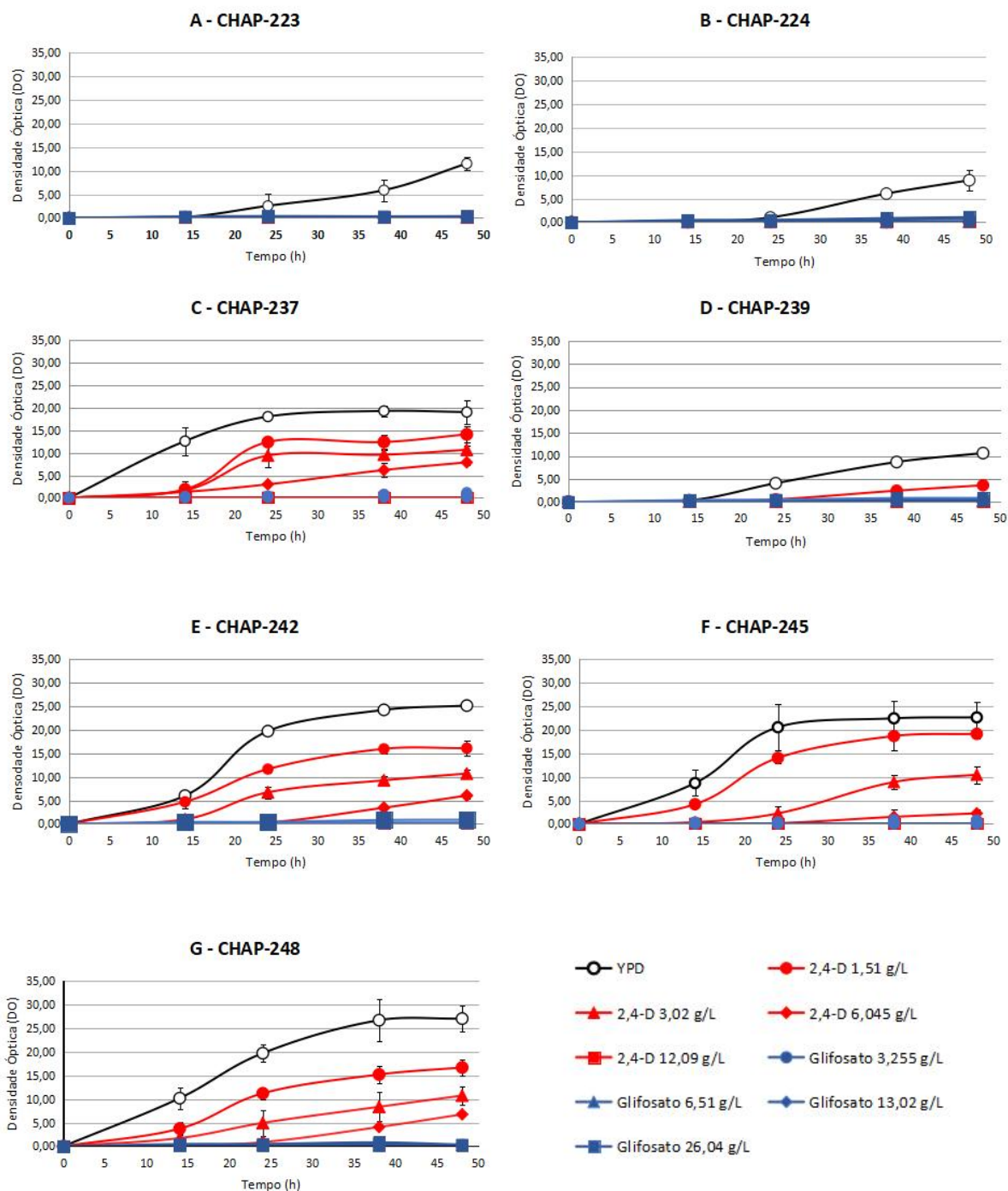


Figura 8 Curvas de crescimento das leveduras expostas a diferentes concentrações de herbicidas a base de glifosato e 2,4-D.

2.4.3. Ingrediente ativo: glifosato

Quando o N-(fosfonometil)glicina (glifosato) foi adicionado ao meio de cultivo, todas as sete cepas apresentaram comportamento semelhante, sem crescimento celular significativo. Apenas a cepa CHAP-224 mostrou um leve aumento na população de células vivas em comparação as demais (1,09 OD) quando desafiada pelo herbicida. Essa cepa foi a única das sete a sofrer inibição abaixo dos 90%, demonstrando o forte efeito inibitório causado pelo produto comercial no desenvolvimento regular das leveduras selvagens testadas.

Os dados obtidos indicam que nenhuma das sete linhagens alcançou a fase de crescimento exponencial, já que o crescimento final foi insignificante em comparação ao observado em meio YPD sem a presença do herbicida. Esses resultados sugerem que as cepas não conseguiram superar o estresse causado pelo herbicida e, neste contexto, precisariam de mais de 48 horas para uma possível adaptação ao meio de cultivo.

A inibição do crescimento celular é explicada pela ação do glifosato na via metabólica do chiquimato, presente tanto em plantas quanto em leveduras. Ao bloquear a atuação da enzima fosfoenolpiruvato sintase, o glifosato impede a síntese de aminoácidos essenciais, como tirosina, fenilalanina e triptofano. A ausência desses aminoácidos compromete funções vitais que dependem deles, o que culmina na inibição de processos fundamentais, como o crescimento celular.

Nossos resultados corroboram os dados de Stoyanova *et al.* (2023), que demonstraram que cepas de *Trichosporon cutaneum* e *Candida tropicalis* expostas a 0,3 g/L de glifosato apresentaram um aumento no período de latência. Nessas condições, o crescimento exponencial foi observado apenas a partir da 50ª hora para *T. cutaneum* e da 100ª hora para *C. tropicalis*, fato que evidencia o comportamento similar ao observado no presente estudo (STOYANOVA *et al.*, 2023). Esse ingrediente ativo também prejudicou o crescimento de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* em concentrações de 0,1% a 1,5% no meio de cultura (BARNEY *et al.*, 2020; RAVISHANKAR, CUMMING e GALLAGHER, 2020), ratificando o impacto negativo da molécula tanto em leveduras comerciais quanto selvagens.

É importante observar também que, quando o composto adicionado ao meio é um produto comercial — isto é, o ingrediente ativo combinado com substâncias inertes —, o impacto observado não se deve apenas à interferência na via do chiquimato, mas também à ação em outras vias metabólicas. Isso é evidenciado pelo fato de que cepas expostas a um produto comercial (IA + inertes) sofreram impactos superiores aos causados pelo ingrediente ativo sem as substâncias 'inertes' em seu crescimento celular (RAVISHANKAR, CUMMING e GALLAGHER, 2020; STOYANOVA *et al.*, 2023).

Também foi sugerido que a capacidade de *S. cerevisiae* de superar o impacto causado pela molécula sintética está relacionada ao aumento da atividade dos genes *AAC3* e *HFA1*, responsáveis pelo transporte de energia e pela biossíntese de ácidos graxos. Esse aumento na expressão gênica contribui para a manutenção da homeostase celular e favorece o desenvolvimento de resistência ao estresse induzido pelo glifosato (RAVISHANKAR, CUMMING e GALLAGHER, 2020).

A pré-exposição ao herbicida também é um fator determinante para superar os efeitos negativos quando as células são novamente desafiadas pelo mesmo ingrediente ativo. Nesses casos, a adaptação ao meio ocorre mais rapidamente, além de as cepas atingirem maiores taxas de crescimento celular (BARNEY *et al.*, 2020). Esse fato torna o contato das leveduras com o ingrediente ativo ainda mais preocupante, uma vez que elas levam mais tempo para se adaptar e retomar o crescimento. Enquanto isso, organismos previamente expostos, especialmente aqueles patogênicos em ambientes agrícolas, prosperam com maior facilidade e suprimem a população de leveduras benéficas ao ambiente, incluindo aquelas importantes para a polinização de insetos.

Esse fenômeno não se restringe ao ambiente agrícola. A supressão de organismos benéficos e o crescimento facilitado de patógenos também ocorrem em mamíferos expostos a resíduos de glifosato. Estudos em ratos alimentados com ração aditivada com glifosato mostraram um aumento no desenvolvimento de microrganismos patogênicos, incluindo leveduras do gênero *Candida* (BILAN *et al.*, 2019). Isso revela o desequilíbrio causado entre as espécies presentes no trato gastrointestinal, o que caracteriza uma seleção artificial de microrganismos que favorece o crescimento de patógenos.

Conforme discutido no Capítulo 1, as leveduras desempenham várias funções importantes no ambiente em que estão inseridas, uma das mais importantes é a biorremediação, processo que envolve a remoção, degradação ou neutralização de contaminantes em um ambiente ou produto, utilizando os serviços ecológicos prestados por organismos vivos, como as leveduras.

Diversas cepas de leveduras já demonstraram potencial para a biorremediação, especialmente na degradação do glifosato. Em alguns casos, essas leveduras atuam dentro de sistemas animais, como a levedura de selênio, que contribui para a redução do estresse oxidativo celular, diminui a mortalidade e aumenta a produção de carne em peixes quando suplementada na alimentação (HASSAN *et al.*, 2022). Além disso, algumas cepas são capazes de utilizar o glifosato como fonte de carbono, o que força a quebra da molécula e, consequentemente, sua degradação (STOYANOVA *et al.*, 2023).

No processo de panificação, *S. cerevisiae* também demonstrou potencial para biorremediação. Low, Shaw e Gerrard (2005) apresentaram dados onde a levedura foi capaz de degradar altas concentrações de glifosato presentes na massa durante a produção de pão. Isso sugere que o fermento pode degradar o ingrediente ativo ao longo do processo de fermentação, que contribui para a redução de resíduos da molécula química no produto final, e favorece o desenvolvimento de um alimento mais seguro para o consumo (LOW, SHAW E GERRARD, 2005).

2.4.4. Ingrediente ativo: 2,4-D

O ingrediente ativo 2,4-D também afetou o crescimento celular quando adicionado ao meio de cultura. As leveduras, contudo, exibiram respostas variadas: algumas cepas conseguiram se adaptar à presença do herbicida, enquanto outras não foram capazes de superar as adversidades impostas pelo composto.

Das sete cepas testadas, as cepas CHP-223 (Figura 8.A), CHAP-224 (Figura 8.B) e CHAP-239 (Figura 8.D) não conseguiram superar as adversidades impostas pelo 2,4-D na maioria das concentrações avaliadas. A única exceção ocorreu quando a cepa CHAP-239 foi exposta a uma concentração de 1,51 g/L de 2,4-D, onde houve um início de crescimento, embora a inibição tenha sido de 66% em comparação ao meio isento do herbicida. Nas demais situações, a inibição do

crescimento celular para essas cepas foi, em média, de 99,03%, o que evidencia a alta sensibilidade dessas linhagens ao produto comercial.

Outro ponto a ser destacado é o período de latência observado na curva de crescimento dessas três leveduras, que foi mais longo em comparação às demais cepas, mesmo na ausência dos herbicidas. Para as cepas CHAP-223 e CHAP-239, esse período de latência foi superado após 15 horas de cultivo. No entanto, a cepa CHAP-224 apresentou crescimento exponencial apenas após 24 horas de cultivo.

As outras quatro cepas testadas demonstraram diferentes níveis de tolerância ao herbicida, conforme mostrado na Figura 8. O crescimento dessas cepas variou em função da concentração do produto no meio de cultura. De maneira geral, a porcentagem de inibição do crescimento esteve diretamente relacionada à concentração do ingrediente ativo presente no sistema; ou seja, à medida que a dose do IA aumentou, a inibição do crescimento também se intensificou.

Em meio de cultura que contém o herbicida na concentração de 12,09 g/L, ou seja, duas vezes a dose recomendada na bula, todas as quatro leveduras foram fortemente afetadas. A carga de IA presente na solução dificultou a adaptação das células ao meio, o que impossibilitou o crescimento dentro das 48 horas de teste. Quando a concentração do ingrediente ativo foi reduzida para a dose recomendada na bula, ou 6,045 g/L, o herbicida hormonal ainda impactou as leveduras, embora com menor intensidade. As cepas conseguiram superar o desafio e iniciar a fase de crescimento exponencial, mas essa fase se apresentou de forma pouco definida e mais prolongada durante o tempo de avaliação. Ao final do experimento, a porcentagem de inibição do crescimento celular foi de 90,08% para a cepa CHAP-245, 76,05% para a CHAP-242, 75,00% para a CHAP-248 e 58,59% para a CHAP-237.

Similar ao cenário anterior, as quatro cepas apresentaram uma fase de latência prolongada, que persistiu até as 24 horas de cultivo. Após esse período, o crescimento exponencial tornou-se mais evidente. A exceção foi a cepa CHAP-237, que apresentou um comportamento linear em sua curva de crescimento (Figura 8.C).

Sob uma concentração de 3,02 g/L, as linhagens mostraram um crescimento celular superior ao da situação anterior, o que representa evidência da relação dose-

dependente dos efeitos do produto agrotóxico sobre a multiplicação das células. Nessa concentração, foi possível identificar com maior clareza as fases de crescimento dos microrganismos, incluindo a fase de latência, a fase exponencial e a fase estacionária, esta última observada apenas em duas das cepas nessa concentração de herbicida.

Com uma carga de IA menor a ser superada, a fase de latência no crescimento celular durou um período mais curto. O momento em que essa fase se encerrou e a fase exponencial se iniciou ocorreu após 14 horas de fermentação para as quatro leveduras, a partir do qual o crescimento acelerado foi observado.

Duas das leveduras atingiram a estabilização populacional, caracterizada pela presença da fase estacionária. As cepas CHAP-237 e CHAP-245 mantiveram crescimento exponencial entre 14 e 24 horas de fermentação, e, após esse período, o crescimento celular se estabilizou, o que caracteriza a fase estacionária. A inibição do crescimento ao final do experimento foi de 44,00% para a CHAP-237 (Figura 8.C) e 53,80% para a CHAP-245 (Figura 8.F).

Outro indicativo da relação dose-dependente da inibição do crescimento celular foi observado no meio YPD com a adição de 1,51 g/L de IA, equivalente a $\frac{1}{4}$ da dose recomendada na bula, que exerceu um impacto ainda menor nas quatro cepas analisadas. Ao fim das 48 horas, a inibição foi de 25,99% para a CHAP-237, 35,96% para a CHAP-242, 15,49% para a CHAP-245 e 38,27% para a CHAP-248.

A duração da fase de latência, assim como o parâmetro de inibição, também demonstrou ser dependente da concentração de ingrediente ativo durante a fermentação. Sob a influência da menor concentração de 2,4-D, essa fase foi superada logo após 10 horas de cultivo nas cepas CHAP-242 (Figura 8.E), CHAP-245 (Figura 8.F) e CHAP-248 (Figura 8.G). Em contraste, a cepa CHAP-237 permaneceu na fase de latência até 14 horas de fermentação (Figura 8.C).

A cepa CHAP-237 também se destacou pelo crescimento exponencial em um período mais curto, pois, esta cepa atingiu a estabilidade do crescimento a partir das 24 horas de cultivo. Já os crescimentos das leveduras CHAP-242, CHAP-245 e CHAP-248 atingiram a fase estacionária próximo às 35 horas de cultivo e mantiveram-se estáveis até o final do experimento. A depender do processo em que

será utilizada, essa cepa pode proporcionar um crescimento mais rápido, e impactar positivamente a eficiência e a produtividade.

Leveduras, quando expostas a fontes de estresse, ativam diferentes mecanismos de defesa simultaneamente, nesse período o crescimento celular permanece estagnado enquanto as células buscam a adaptação às adversidades. A produção de proteínas, expressão de genes e enzimas é alterada com vistas à superação do desafio (GUTIN *et al.*, 2019).

O comportamento dose-dependente observado nas leveduras selvagens é consistente com o relatado por Viegas *et al.* (2005) para *S. cerevisiae*, em que se verificou um prolongamento da fase de latência à medida que se aumentava a dose de herbicida. Esse prolongamento é explicado pela necessidade de adaptação das cepas, que, ao serem expostas ao composto sintético, ativam o gene *OLE1*, o que promove o aumento na taxa de lipídeos nas paredes celulares e dificulta a entrada do herbicida no interior das células (VIEGAS *et al.*, 2005).

Outro gene relacionado à modificação na parede celular da levedura é o *SPI1*. Embora sua função ainda não seja totalmente compreendida, ele desempenha um papel importante na adaptação das células ao 2,4-D, ao ser rapidamente ativado assim que a molécula sintética entra em contato com as células. Essa ativação impede a entrada da substância na célula, o que evita a redução do pH intracelular e a consequente inviabilização da levedura (SIMÕES *et al.*, 2003).

Durante a fase de adaptação, outro desafio enfrentado pelas células é o estresse oxidativo causado pelo 2,4-D. Esse fenômeno foi comprovado por Teixeira *et al.* (2004), que identificaram uma alta atividade de genes associados à síntese de compostos com propriedades antioxidantes logo após o contato das células com o herbicida, o que indica o estresse oxidativo induzido pelo 2,4-D (TEIXEIRA *et al.*, 2004). O estresse oxidativo também afetou severamente o crescimento celular de *S. cerevisiae* quando exposta por 90 minutos ao 2,4-D. A viabilidade das células também sofreu grande impacto no tempo em que o experimento ocorreu (TAVARES *et al.*, 2022). A inibição no crescimento relatada na literatura, portanto, vai ao encontro dos dados que obtivemos, que ratificam a necessidade de maior tempo

para que haja a adaptação das células resistentes e a retomada do crescimento da população de leveduras.

Para agilizar o processo de adaptação, garantir o crescimento celular e a degradação de pesticidas, a engenharia genética aplicada a leveduras permite a inserção de genes específicos envolvidos na degradação de moléculas sintéticas em determinadas cepas. Essas modificações capacitam as leveduras a crescerem na tanto na presença de herbicidas (SU *et al.*, 2019, LU *et al.*, 2016) como inseticidas (BAI *et al.*, 2017). Isso é particularmente interessante como estratégia de biorremediação, especialmente considerando que diversos resíduos de pesticidas permanecem no ambiente após atividade humana. Westlund e Yargeau (2017) encontraram a presença de 751 ng/L de 2,4-D em águas residuais, quantidade 17,5 vezes maior que a concentração letal mediana (42,9 ng/L).

2.4.5. Biorremediação da Molécula de 2,4-D

Devido seu amplo uso em ambientes agrícolas, esse herbicida sistêmico provoca sérios problemas ambientais como a fitotoxicidade em espécies vegetais não-alvo e danos causados a microrganismos benéficos presentes tanto no ambiente agrícola quanto em ecossistemas adjacentes. Embora métodos químicos e físicos sejam eficazes na degradação do ingrediente ativo, eles tendem a ser dispendiosos e podem causar impactos ambientais significativos, semelhantes aos da própria molécula, e assim, tornam-se opções pouco eficientes do ponto de vista da sustentabilidade (revisado por MAGNOLI *et al.*, 2020).

Em contrapartida, métodos de biorremediação biológica apresentam-se como alternativas de menor impacto por manter a eficiência na inativação do 2,4-D no ambiente. Por essa razão, o desenvolvimento de tecnologias de biorremediação é crucial para recuperar ambientes degradados pelo uso de pesticidas e assegurar a segurança alimentar de consumidores de alimentos com resíduos de substâncias sintéticas.

Ao considerar que algumas das cepas testadas demonstraram taxas de crescimento celular mesmo em altas concentrações do herbicida, foram realizados testes adicionais para avaliar a possível atividade de biorremediação dessas cepas

sob as mesmas condições de concentração utilizadas nas avaliações de crescimento celular.

A concentração do ingrediente ativo no meio mostrou-se novamente determinante para a capacidade das células de realizar a biorremediação do produto. Com uma concentração de 1,51 g/L (Figura 9.A), a maioria das cepas apresentou capacidade significativa de redução do herbicida. A cepa CHAP-223 foi a única que não demonstrou redução expressiva na concentração do 2,4-D. Por outro lado, destacaram-se as cepas CHAP-237, CHAP-239 e CHAP-242, que reduziram a concentração de 2,4-D em 61,37%, 64,12% e 61,76%, respectivamente.

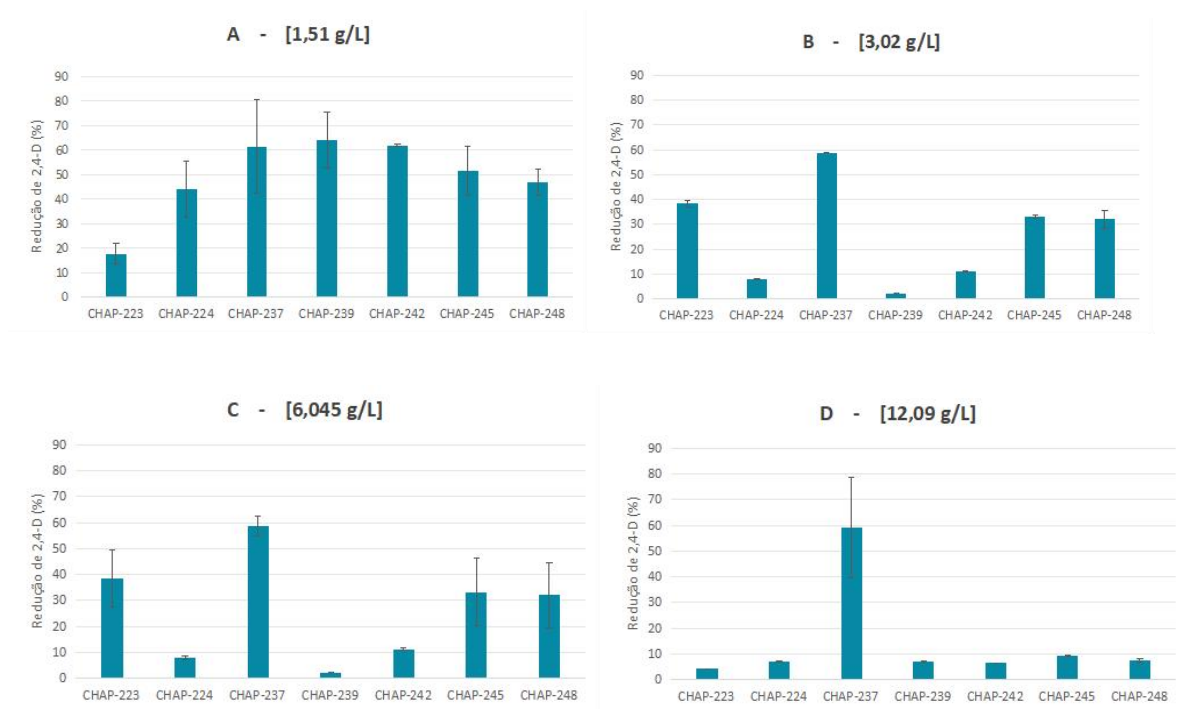


Figura 9 Porcentagem de redução de 2,4-D após as 48 horas de fermentação por leveduras.

Entretanto, quando a concentração inicial de 2,4-D foi elevada para 3,02 g/L, apenas a CHAP-248 não apresentou redução significativa do ingrediente ativo. As outras seis cepas demonstraram capacidade de biorremediação, mas com intensidade inferior à observada na situação anterior. Nesse novo cenário,

destacaram-se as cepas CHAP-223, CHAP-242 e CHAP-245, que reduziram a quantidade de IA em 22,22%, 21,81% e 21,54%, respectivamente (Figura 9.B).

Ao serem desafiadas com a concentração recomendada na bula, ou seja, 6,045 g/L de IA (Figura 9.C), as leveduras apresentaram respostas distintas. Quatro das sete cepas mostraram diferentes capacidades de realizar a biorremediação: a CHAP-223 reduziu a concentração em 38,31%, a CHAP-245 em 32,96%, a CHAP-248 em 31,86%, e a cepa CHAP-237 destacou-se ao apresentar uma redução de 58,75% na concentração do IA no meio.

Com a concentração de 2,4-D elevada para 12,09 g/L, o dobro da dose recomendada, a maioria das cepas não foi capaz de reduzir a quantidade do herbicida (Figura 9.D). Todavia, mesmo sob essa condição extrema, a cepa CHAP-237 foi capaz de reduzir a quantidade de ingrediente ativo em 59,08%, e se apresenta como possível fonte de biotecnologias relacionadas a remediação desse composto.

Tal biorremediação do 2,4-D é altamente desejável, uma vez que seus impactos negativos no meio ambiente, especialmente em relação a outros organismos, são significativamente menores quando esses microrganismos são utilizados. Bactérias e fungos são os microrganismos mais frequentemente reportados como capazes de degradar ou realizar a biorremediação dessa molécula (MAGNOLI *et al.*, 2020).

Bactérias como *Cupriavidus campinensis* demonstram alta eficácia na degradação do 2,4-D *in situ*. Esses organismos alcançaram reduções superiores a 90% após 14 horas de inoculação, o que a torna uma excelente opção para uso em ambientes agrícolas (HAN, ZHAO e LI, 2015). Cepas do gênero *Burkholderia* também mostraram resistência a doses crescentes de 2,4-D no solo, além da capacidade de degradar o herbicida ao atingir redução de 90% do ingrediente ativo no meio de cultura (MACUR *et al.*, 2007). A degradação total foi possível com três cepas do gênero *Bradyrhizobium*, que conseguiram eliminar o IA após 24 horas de exposição (HAYASHI *et al.*, 2021), o que realça a importância da busca por espécies selvagens com essa capacidade.

Os fungos também apresentam alta capacidade de degradar esse ingrediente ativo. *Mortierella* sp. foi responsável por reduzir a concentração de 2,4-D em 55% durante 48 horas de exposição ao herbicida (NAKAGAWA *et al.*, 2006). Já *Penicillium chrysogenum*, além de demonstrar crescimento sob 100 mg/L de 2,4-D, conseguiu degradar cerca de 20% da concentração do herbicida em um meio com outros substratos, como o α -cetoglutarato, sob a presença de 2% de NaCl (FERREIRA-GUEDES *et al.*, 2012).

Assim como fungos e bactérias, as leveduras desempenham um papel importante na biorremediação de poluentes exógenos. Leveduras que expressam a enzima CYP71A12 já demonstraram capacidade de hidroxilação ao adicionar um grupo hidroxila a um anel de diclorobenzeno (HAYASHI *et al.*, 2007). O anel de diclorobenzeno está também presente no 2,4-D, o que sugere que o uso de leveduras que expressam essa enzima pode ser uma via promissora para a degradação desse pesticida.

A inserção de genes em leveduras, com o objetivo de facilitar a atividade enzimática fora da célula, viabiliza a atuação desses organismos unicelulares na degradação de pesticidas (TAKAYAMA *et al.*, 2006). Essa abordagem proporciona biorremediação com menor custo energético e protege as células de efeitos deletérios causados pelas moléculas tóxicas.

O uso de leveduras como biocatalizadores em reações é uma alternativa promissora, tanto do ponto de vista ambiental quanto econômico, para a degradação de pesticidas (YE *et al.*, 2021). A prospecção de cepas de leveduras com essa capacidade de realizar serviços ecológicos é de grande interesse biotecnológico.

Nesse contexto, a cepa *K. quercitrusa* CHAP-237 se destaca entre as sete avaliadas por demonstrar notável tolerância ao 2,4-D. Essa resistência é evidenciada pela adaptação observada durante seu crescimento celular sob a influência do herbicida, além de sua capacidade de reduzir a concentração da molécula no meio em que estava inserida. Essas características ressaltam o potencial da espécie *K. quercitrusa* para ser utilizada em processos de biorremediação e contribuir para a mitigação dos impactos ambientais causados por pesticidas.

Outros destaques ficaram com as cepas CHAP-245 e CHAP-248, pois ambas apresentaram tolerância ao 2,4-D, tendo apresentado crescimento celular

substancial (Figura 8.F e 8.G). Por outro lado, essas cepas não demonstraram alta capacidade de degradar a molécula do 2,4-D (Figura 9), o que sugere que essas leveduras podem atuar, desenvolvendo diversas funções, em ambientes que contenham esse herbicida sem degradá-lo, ou seja, sem impedir sua atuação contra as plantas daninhas.

2.5. CONCLUSÃO

A investigação dos efeitos dos herbicidas sobre as cepas de leveduras analisadas revelou um impacto significativo em seu desenvolvimento, trouxe dificuldades e até impediu o crescimento celular. Os resultados evidenciaram o forte efeito inibitório do glifosato, que comprometeu o crescimento das cepas testadas de maneira substancial. A importância da via do chiquimato na síntese de aminoácidos essenciais para o crescimento celular ficou clara pela limitação que o herbicida impôs ao metabolismo das cepas selvagens, o que gera preocupações sobre a sobrevivência de organismos benéficos em ambientes agrícolas.

Em relação ao 2,4-D, os dados mostraram um efeito de dose-dependência, onde o aumento da concentração do herbicida estava diretamente relacionado à intensificação do impacto no crescimento celular. O mesmo efeito foi observado no período de latência da curva de crescimento, o que demonstrou que as células precisaram de mais tempo para se adaptar ao estresse causado pelas concentrações crescentes do herbicida. As respostas variadas das leveduras ao 2,4-D também são motivo de apreensão em termos ecológicos, pois três cepas foram tão afetadas quanto pelo glifosato.

Por outro lado, a resposta rápida de algumas cepas ao ambiente adverso sugere um potencial biotecnológico promissor em espécies selvagens. As leveduras *Kurtzmaniella quercitrusa* (CHAP-237) e *Meyerozyma caribbica* (CHAP-242 e 245) se destacaram por sua rápida adaptação ao 2,4-D e menor impacto sofrido em seu crescimento celular. A capacidade dessas cepas de superar os desafios impostos pelo 2,4-D e sobreviver em um ambiente hostil sugere a adaptação das células devido a expressão de mecanismo de defesa, que pode ser futuramente melhor compreendido e utilizado em processos de biorremediação.

Sob baixas quantidades de 2,4-D, as sete cepas foram capazes de reduzir a concentração do herbicida no meio. Contudo, com o incremento da concentração inicial, a atividade biorremediadora foi interrompida devido à inibição do crescimento e à prolongação da fase de latência. A cepa CHAP-237 (*Kurtzmaniella quercitrusa*) se destacou por sua resistência ao herbicida e significativa capacidade de biorremediação, mesmo em altas concentrações de 2,4-D.

Além disso, as leveduras testadas demonstraram potencial na promoção do crescimento de plantas, uma vez que todas elas produziram ácido indol-3-acético (AIA) em diferentes níveis. A cepa CHAP-239 se sobressaiu ao produzir mais do que o dobro de AIA em comparação com as outras, mesmo na ausência do precursor triptofano. A adição desse precursor poderia aumentar ainda mais a produção de auxina e tornar essa cepa uma alternativa viável para a produção industrial de AIA.

A prospecção de microrganismos benéficos que apresentem tolerância a herbicidas sintéticos, realizem biorremediação dessas substâncias em ambientes agrícolas ou atuem como promotores do crescimento vegetal representa um campo promissor para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas e a recuperação de ambientes degradados. Essas descobertas destacam a importância das leveduras na agricultura. A identificação e caracterização de cepas eficazes e eficientes em processos biológicos abre possibilidades para o desenvolvimento de produtos sustentáveis que reduzam a dependência de insumos químicos.

Testes suplementares relacionados aos impactos dos pesticidas sobre organismos não alvo, como as leveduras, são desejáveis, sobretudo, utilizando organismos selvagens, que podem conter características de alto valor tecnológico tanto para o ambiente agrícola como para a indústria. Cepas capazes de realizar serviços ecossistêmicos e gerar menores impactos ao ambiente são de grande importância para esses setores.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos PARA**: relatório dos resultados das análises de amostras monitoradas nos ciclos 2018 - 2019 e 2022. Brasília: Anvisa, 2023. 191 p. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/relatorio-2018-2019-2022>. Acesso em: 03 jan. 2024.
- ALBARELLO, M. L. R.; GIEHL, A.; TADIOTO, V.; SANTOS, A. A. d.; MILANI, L. M.; BRISTOT, J.C. S.; TRAMONTIN, M. A.; TREICHEL, H. ; BERNARDI, O. ; STAMBUK, B. U.. Analysis of the Holocellulolytic and Fermentative Potentials of Yeasts Isolated from the Gut of *Spodoptera frugiperda* Larvae. **Bioenergy Research**, v. 16, n. 4, p. 2046-2057, 2 jun. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-023-10616-4>. Acesso em: 07 jan. 2024.
- ALMEIDA-PAES R.; FRASES S.; ARAÚJO G.; DE OLIVEIRA M.; GERFEN G.; NOSANCHUK J.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA R. Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the *sporothrix* complex in the presence of L-Tyrosine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8623–8630, dez. 2012. Disponível em: doi.org/10.1128/AEM.02414-12. Acesso em: 27 jun. 2024.
- ALVES, S. L.; TREICHEL, H.; BASSO, T. O.; STAMBUK, B. U.. Are Yeasts “Humanity’s Best Friends”. In: ALVES, S. L.; TREICHEL, H. ; BASSO, T. O.; STAMBUK, B. U. (ed.). **Yeasts**: from nature to bioprocesses. [S.L]: Bentham Science Publishers, 2022. p. 431-458. Disponível em: [10.2174/9789815051063122020017](https://doi.org/10.1016/j.bep.2022.100017). Acesso em: 13 dez. 2024.
- AL-TOHAMY R.; ALI S.; LI F.; OKASHA K.; MAHMOUD Y.; ELSAMAHY T.; JIAO H.; FU Y.; SUN J. A critical review on the treatment of dye-containing wastewater: Ecotoxicological and health concerns of textile dyes and possible remediation approaches for environmental safety. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 231. Academic Press, fev. 2022. Disponível em: doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113160. Acesso em: 15 ago. 2024.
- AMPRAYN K.; ROSE M.; KECSKÉS M.; EREG L.; NGUYEN H.; KENNEDY I. Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 295–299, out. 2012. Disponível em: doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.11.009. Acesso em: 12 ago. 2024.
- BADANI, H.; DJADOUNI, F.; HADDAD, F. Z. Effects of the herbicide glyphosate [n-(phosphonomethyl) glycine] on biodiversity and organisms in the soil. **European Journal Of Environmental Sciences**, v. 13, n. 1, p. 5-14, 30 jun. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.14712/23361964.2023.1>. Acesso em: 23 jan. 2024.
- BAI Y.; LUO X.; ZHAO Y.; LI C.; XU D.; XU J. Efficient Degradation of Malathion in the Presence of Detergents Using an Engineered Organophosphorus Hydrolase Highly Expressed by *Pichia pastoris* without Methanol Induction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 41, p. 9094–9100, 18 out. 2017. Disponível em: doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03405. Acesso em: 15 ago. 2024.

Barney J.; Winans M.; Blackwood C.; Pupo A.; Gallagher J. The Yeast Atlas of Appalachia: Species and phenotypic diversity of herbicide resistance in wild Yeast. **Diversity**, v. 12, n. 4, 1 abr. 2020. Disponível em: doi.org/10.3390/D12040139. Acesso em: 12 jul. 2024.

BILAN M.; LIESHCHOVA M.; TISHKINA N.; BRYGADYRENKO V. Combined effect of glyphosate, saccharin and sodium benzoate on the gut microbiota of rats. **Regulatory Mechanisms in Biosystems**, v. 10, n. 2, p. 228–232, 2019. Disponível em: doi.org/10.15421/021934. Acesso em: 23 set. 2024.

BRASIL. IBAMA. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. 2024a. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>. Acesso em: 07 jan. 2024.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários: AGROFIT**. 2024b. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 04 jan. 2024.

CHEN J.; CUI H.; LI Z.; YU H.; HOU Q.; LI X. Potential Role of EPSPS Mutations in the Resistance of *Eleusine indica* to Glyphosate. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 9, 1 maio 2023. Disponível em: doi.org/10.3390/ijms24098250. Acesso em: 15 jul. 2024.

ČUŠ, F.; RASPOR, P. The Effect of Pyrimethanil on the Growth of Wine Yeasts. **Lett Appl Microbiol**, v. 47, n. 1, p. 54–59, 2008. Disponível em: doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02383.x. Acesso em: 18 jul. 2024.

DELOACHE W.; RUSS Z.; NARCROSS L.; GONZALES A.; MARTIN V.; DUEBER J. An enzyme-coupled biosensor enables (S)-reticuline production in yeast from glucose. **Nature Chemical Biology**, v. 11, n. 7, p. 465–471, 20 jul. 2015. Disponível em: doi.org/10.1038/nchembio.1816. Acesso em: 12 ago. 2024.

DHULDHAJ, U. P.; SINGH, R.; SINGH, V. K. Pesticide contamination in agro-ecosystems: toxicity, impacts, and bio-based management strategies. **Environmental Science And Pollution Research**, v. 30, n. 4, p. 9243–9270, 2 dez. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24381-y>. Acesso em: 18 jan. 2024.

DUKE, S. O. Interaction of Chemical Pesticides and Their Formulation Ingredients with Microbes Associated with Plants and Plant Pests. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 29, p. 7553–7561, 25 jul. 2018. Disponível em: doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02316. Acesso em: 21 jun. 2024.

FAO. **Suite of Food Security Indicators**. 2022. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/FS>. Acesso em: 25 nov. 2022.

FENNER, E. D.; SCAPINI, T.; DINIZ, M. da C.; GIEHL, A.; TREICHEL, H.; ÁLVAREZ-PÉREZ, S.; ALVES, S. L. Nature's Most Fruitful Threesome: the relationship between yeasts, insects, and angiosperms. **Journal Of Fungi**, v. 8, n. 10, p. 984–1000, 20 set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof8100984>. Acesso em: 15 jan. 2024.

FERNANDEZ-SAN MILLAN A.; FARRAN I.; LARRAYA L.; ANCIN M.; ARREGUI L.; VERAMENDI J. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from Spanish vineyards: benefits for seedling development. **Microbiological research**, v. 237, p. 126480, 1 ago. 2020. Disponível em: doi.org/10.1016/j.micres.2020.126480. Acesso em: 16 ago. 2024.

FERREIRA-GUEDES, S.; MENDES, B.; LEITÃO, A. L. Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by a halotolerant strain of *Penicillium chrysogenum*: antibiotic production. **Environmental technology**, v. 33, n. 4–6, p. 677–86, 9 mar. 2012. Disponível em: doi.org/10.1080/09593330.2011.588251. Acesso em: 18 jul. 2024.

FU S.; SUN P.; LU H.; WEI J.; XIAO H.; FANG W.; CHENG B.; CHOU J. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera spatulata* Lab. **Fungal biology**, v. 120, n. 3, p. 433–48, 1 mar. 2016. Disponível em: doi.org/10.1016/j.funbio.2015.12.006. Acesso em: 25 set. 2024.

GIEHL, A. ; SANTOS, A. A. dos; CADAMURO, R. D.; TADIOTO, V.; GUTERRES, I. Z.; ZUCHI, I. D. P.; MINUSSI, G. do A.; FONGARO, G. ; SILVA, I. T.; ALVES, S. L. Biochemical and Biotechnological Insights into Fungus-Plant Interactions for Enhanced Sustainable Agricultural and Industrial Processes. **Plants**, v. 12, n. 14, p. 2688-2708, 19 jul. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants12142688>. Acesso em: 20 jan. 2024.

GUTIN J.; JOSEPH-STRAUSS D.; SADEH A.; SHALOM E.; FRIEDMAN N Genetic screen of the yeast environmental stress response dynamics uncovers distinct regulatory phases. **Molecular Systems Biology**, v. 15, n. 8, ago. 2019. Disponível em: doi.org/10.15252/msb.20198939. Acesso em: 12 ago. 2024.

HAN, L.; ZHAO, D.; LI, C. Isolation and 2,4-D-degrading characteristics of *Cupriavidus campinensis* BJ71. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 433–441, 26 jun. 2015. Disponível em: doi.org/10.1590/S1517-838246220140211. Acesso em: 11 jul. 2024.

HAYASHI, E.; FUZIMOTO, K.; IMAISHI, H. Expression of *Arabidopsis thaliana* cytochrome P450 monooxygenase, CYP71A12, in yeast catalyzes the metabolism of herbicide pyrazoxyfen. **Plant Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 393–396, 2007. Disponível em: doi.org/10.5511/plantbiotechnology.24.393. Acesso em: 28 ago. 2024.

HAYASHI S.; TANAKA S.; TAKAO S.; KOBAYASHI S.; SUYAMA K.; ITOH K. Multiple Gene Clusters and Their Role in the Degradation of Chlorophenoxyacetic Acids in *Bradyrhizobium* sp. RD5-C2 Isolated from Non-Contaminated Soil. **MICROBES AND ENVIRONMENTS**, v. 36, n. 3, [S. P.], 2021. Disponível em: doi.org/10.1264/jsme2.ME21016. Acesso em: 14 ago. 2024.

HERNÁNDEZ-ORTE, P.; CACHO, J. F.; FERREIRA, V. Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 10, p. 2891–2899, 8 maio 2002. Disponível em: doi.org/10.1021/jf011395o. Acesso em: 15 jul. 2024.

JEYASEELAN, A.; MURUGESAN, K.; THAYANITHI, S.; PALANISAMY, S. B. A review of the impact of herbicides and insecticides on the microbial communities.

Environmental Research, v. 245, p. 118020-18021, mar. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.118020>. Acesso em: 20 jan. 2024.

KELARLOU, T. R.; GOLCHIN, A.; TOOLAROOD, A-A. S. Evaluation of the Impacts of Clopyralid and Butisanstar Herbicides on Selected Soil Microbial Indicators. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 234, n. 9, p. 572-573, 19 ago. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11270-023-06597-x>. Acesso em: 20 dez. 2023.

KRIVORUCHKO, A.; NIELSEN, J. Production of natural products through metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current opinion in biotechnology*, v. 35, p. 7–15, 1 dez. 2015. Disponível em: doi.org/10.1016/j.copbio.2014.12.004. Acesso em: 05 set. 2024.

LEE, J. H.; WENDISCH, V. F. Biotechnological production of aromatic compounds of the extended shikimate pathway from renewable biomass. **Journal of Biotechnology**, v. 257, p. 211–221, 10 set. 2017. Disponível em: doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.11.016. Acesso em: 24 ago. 2024.

LOW, F. L.; SHAW, I. C.; GERRARD, J. A. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* on the stability of the herbicide glyphosate during bread leavening. **Letters in applied microbiology**, v. 40, n. 2, p. 133–7, fev. 2005. Disponível em: doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01633.x. Acesso em: 28 jul. 2024.

LU Y.; LUO F.; PU Z.; ZHANG S.; HUANG M.; YANG H. Enhanced detoxification and degradation of herbicide atrazine by a group of O-methyltransferases in rice. **Chemosphere**, v. 165, p. 487–496, 1 dez. 2016. Disponível em: doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.025. Acesso em: 23 out. 2024.

MACUR R.; WHEELER J.; BURR M.; INSKEEP W. Impacts of 2,4-D application on soil microbial community structure and on populations associated with 2,4-D degradation. **Microbiological research**, v. 162, n. 1, p. 37–45, 29 jan. 2007. Disponível em: doi.org/10.1016/j.micres.2006.05.007. Acesso em: 15 ago. 2024.

MAGNOLI K.; CARRANZA C.; ALUFFI M.; MAGNOLI C.; BARBERIS C. Herbicides based on 2,4-D: its behavior in agricultural environments and microbial biodegradation aspects. A review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 31, p. 38501–38512, 8 nov. 2020. Disponível em: doi.org/10.1007/s11356-020-10370-6. Acesso em: 27 set. 2024.

MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S.; GUIMARAES, T. G. **Herbicidas: mecanismos de ação e uso**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. Documentos, 227. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/571939/herbicidas-mecanismos-de-acao-e-uso>. Acesso em: 04 jan. 2024.

MASSOUD R.; HADIANI M.; HAMZEHLU P.; KHOSRAVI-DARANI K. Bioremediation of heavy metals in food industry: Application of *Saccharomyces cerevisiae*. *Electronic Journal of Biotechnology*. **Pontificia Universidad Catolica de Valparaiso**, v. 37, p. 56-60, jan. 2019. Disponível em: doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.11.003. Acesso em: 25 set. 2024.

MITCHELL, R. J.; IRWIN, R. E.; FLANAGAN, R. J.; KARRON, J. D.. Ecology and evolution of plant–pollinator interactions. **Annals Of Botany**, v. 103, n. 9, p. 1355-1363, jun. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/aob/mcp122>. Acesso em: 23 jan. 2024.

MONQUERO, P. A. (Org). **Experimentação com herbicidas**. São Carlos, SP: RiMa, 2016. 179 p.

NAKAGAWA A.; OSAWA S.; HIRATA T.; YAMAGISHI Y.; HOSODA J.; HORIKOSHI T. 2,4-Dichlorophenol Degradation by the Soil Fungus *Mortierella* sp. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 70, n. 2, p. 525–527, 1 jan. 2006. Disponível em: doi.org/10.1271/BBB.70.525. Acesso em: 16 set. 2024.

NASSAR, A. H.; EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils*, v. 42, n. 2, p. 97–108, nov. 2005. Disponível em: doi.org/10.1007/s00374-005-0008-y. Acesso em: 16 set. 2024.

NGUYEN L.; SCHMELZER B.; WILKINSON S.; MATTANOVICH D. From natural to synthetic: Promoter engineering in yeast expression systems. *Biotechnology Advances*. **Elsevier Inc.**, v. 77, 1 dez. 2024. Disponível em: doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108446. Acesso em: 28 out. 2024.

PALSDOTTIR H.; LOJERO C.; TRUMPOWER B.; HUNTE C. Structure of the Yeast Cytochrome bc 1 Complex with a Hydroxyquinone Anion Qo Site Inhibitor Bound. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 33, p. 31303–31311, ago. 2003. Disponível em: doi.org/10.1074/jbc.M302195200. Acesso em 14 jul. 2024.

PEÑA D.; GASSER B.; ZANGHELLINI J.; STEIGER M.; MATTANOVICH D. Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metabolic Engineering*, v. 50, p. 2-15. nov. 2018. Disponível em: doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.017. Acesso em: 26 set. 2024.

RAINIO, M. J.; RUUSKANEN, S.; HELANDER, M.; SAIKKONEN, K.; SALONIEMI, I.; PUIGBÒ, P. Adaptation of bacteria to glyphosate: a microevolutionary perspective of the enzyme 5 : enolpyruvylshikimate : 3 : phosphate synthase. *Environmental Microbiology Reports*, [S.L.], v. 13, n. 3, p. 309-316, 2 fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12931>. Acesso em: 24 jan. 2024.

RAVISHANKAR, A.; CUMMING, J. R.; GALLAGHER, J. E. G. Mitochondrial metabolism is central for response and resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to exposure to a glyphosate-based herbicide. *Environmental Pollution*, v. 262, p. 114359, jul. 2020. Disponível em: doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114359. Acesso em: 25 out. 2024.

SHARMA, R.; WALIA, A.; PUTATUNDA, C.; SOLANKI, P. Impact of pesticides on microbial diversity. *Current Developments In Biotechnology And Bioengineering*, [S.L.], p. 427-458, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91900-5.00001-1>. Acesso em: 12 jan. 2024.

SIMÕES, T.; TEIXEIRA, M.; FERNANDES, A.; SÁ-CORREIA, I. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, mediated by Msn2p- and Msn4p-regulated genes: Important role of SPI1. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 7, p. 4019–4028, 1 jul. 2003. Disponível em: doi.org/10.1128/AEM.69.7.4019-4028.2003. Acesso em 25 set. 2024.

SPRENGER, J.; HARDELAND. R.; FUHRBERG, B.; HAN, S. Melatonin and Other 5-Methoxylated Indoles in Yeast: Presence in High Concentrations and Dependence

on Tryptophan Availability. **CYTOLOGIA**, v. 64, n. 2, p. 209–213, 1999. Disponível em: doi.org/10.1508/cytologia.64.209. Acesso em: 17 set. 2024.

Stoyanova, K.; Gerginova, M.; Peneva, N.; Dincheva, I.; Alexieva, Z. Biodegradation and Utilization of the Pesticides Glyphosate and Carbofuran by Two Yeast Strains. **Processes**, v. 11, n. 12, p. 3343, dez. 2023. Disponível em: doi.org/10.3390/PR11123343/S1. Acesso em: 14 set. 2024.

SU, X.; ZHANG, J.; LIU, J.; ZHANG, N.; MA, L.; LU, F.; CHEN, Z.; SHI, Z.; SI, W.; LIU, C.; YANG, H. Biodegrading Two Pesticide Residues in Paddy Plants and the Environment by a Genetically Engineered Approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 17, p. 4947–4957, maio 2019. Disponível em: doi.org/10.1021/acs.jafc.8b07251. Acesso em 17 out. 2024.

TADIOTO, V.; MILANI, L. M.; BARRILLI, É. T.; BAPTISTA, C. W.; BOHN, L.; DRESCH, A.; HARAKAVA, R.; FOGOLARI, O.; MIBIELLI, G. M.; BENDER, J. P.; TREICHEL, H.; STAMBUK, B. U.; MÜLLER, C.; ALVES, S. L. Analysis of glucose and xylose metabolism in new indigenous *Meyerozyma caribbica* strains isolated from corn residues. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 35, 6 jan. 2022. Disponível em: doi.org/10.1007/s11274-021-03221-0. Acesso em 03 out. 2024.

TADIOTO, V.; GIEHL, A.; CADAMURO, R. D.; GUTERRES, I. Z.; SANTOS, A. A. dos; BRESSAN, S. K.; WERLANG, L.; STAMBUK, B. U.; FONGARO, G.; SILVA, I. T.; ALVES, S. L. Bioactive Compounds from and against Yeasts in the One Health Context: a comprehensive review. **Fermentation**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 363-384, 7 abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation9040363>. Acesso em: 24 jan. 2024.

TAIZ, L.; ZEIGER, E; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal** - 6a Edição. Porto Alegre: Artmed, p. 858, 2017.

TAKAYAMA, K.; SUYE, S.; KURODA, K.; UEDA, M.; KITAGUCHI, T.; TSUCHIYAMA, K.; FUKUDA, T.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. Surface display of organophosphorus hydrolase on *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Progress**, v. 22, p. 939-943, jul. 2006. Disponível em: doi.org/10.1021/bp060107b. Acesso em: 20 out. 2024.

TAN, D.; HARDELAND, R.; BACK, K.; MANCHESTER, L.; ALATORRE-JIMENEZ, M.; REITER, R. On the significance of an alternate pathway of melatonin synthesis via 5-methoxytryptamine: comparisons across species. **Journal of Pineal Research**, v. 61, p. 27-40, ago. 2016. Disponível em: doi.org/10.1111/jpi.12336. Acesso em: 28 set. 2024.

TAVARES, D.; MUELLER, L.; SANTOS, M.; BATISTOTE, M. The Toxicological Profile of the Agrotoxic Acid 2,4 Dichlorophenoxyacetic in Fleischmann® Yeast. **Fronteiras**, v. 11, n. 2, p. 141–149, 2022. Disponível em: doi.org/10.21664/2238-8869.2022v11i2.p141-149. Acesso em 14 out. 2024.

TEIXEIRA, M.; TELO, J.; DUARTE, N.; SÁ-CORREIA, I. The herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces the generation of free-radicals and associated oxidative stress responses in yeast. **Biochemical and Biophysical Research**

Communications, v. 324, n. 3, p. 1101–1107, 19 nov. 2004. Disponível em: doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.158. Acesso em: 14 jun. 2024.

USA. INSTITUTE OF MEDICINE. Blue Water Navy Vietnam Veterans and Agent Orange Exposure. Washington (DC): **National Academies Press**, 2011. 141 p. Disponível em: <https://www.ncbi-nlm-nih.ez372.periodicos.capes.gov.br/books/NBK209599/>. Acesso em: 15 dez. 2023.

VAN BRUGGEN, A. H. C.; FINCKH, M. R.; HE, M.; RITSEMA, C. J.; HARKES, P.; KNUTH, D.; GEISSEN, V. Indirect Effects of the Herbicide Glyphosate on Plant, Animal and Human Health Through its Effects on Microbial Communities. **Frontiers in Environmental Science**, v. 9, 18 out. 2021. Disponível em: doi.org/10.3389/fenvs.2021.763917. Acesso em: 22 jun. 2024.

VIEGAS, C. A.; CABRAL, M. G.; TEIXEIRA, M. C.; NEUMANN, G.; HEIPIEPER, H. J.; SÁ-CORREIA, I. Yeast adaptation to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid involves increased membrane fatty acid saturation degree and decreased OLE1 transcription. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 330, n. 1, p. 271–278, 29 abr. 2005. Disponível em: doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.02.158. Acesso em: 16 jun. 2024.

WESTLUND, P.; YARGEAU, V. Investigation of the presence and endocrine activities of pesticides found in wastewater effluent using yeast-based bioassays. **Science of the Total Environment**, v. 607–608, p. 744–751, 31 dez. 2017. Disponível em: doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.032. Acesso em: 23 out. 2024.

XIN, G.; GLAWE, D.; DOTY, S. L. Characterization of three endophytic, indole-3-acetic acid-producing yeasts occurring in Populus trees. *Mycological Research*, v. 113, n. 9, p. 973–980, 1 set. 2009. Disponível em: doi.org/10.1016/J.MYCRES.2009.06.001. Acesso em: 12 out. 2024.

YE, M.; YE, Y.; DU, Z.; CHEN, G. Cell-surface engineering of yeasts for whole-cell biocatalysts. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, n. 6, p. 1003–1019, jun. 2021. Disponível em: doi.org/10.1007/s00449-020-02484-5. Acesso em: 20 out. 2024.

YILMAZ, C.; GÖKMEN, V. Determination of tryptophan derivatives in kynurenine pathway in fermented foods using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food chemistry*, v. 243, p. 420–427, 15 mar. 2018. Disponível em: doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.004. Acesso em: 16 out. 2024.

ZAJC, J.; GOSTINČAR, C.; ČERNOŠA, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Stress-Tolerant Yeasts: Opportunistic Pathogenicity Versus Biocontrol Potential. **Genes**, v. 10, n. 1, p. 42, 14 jan. 2019. Disponível em: doi.org/10.3390/genes10010042. Acesso em 27 jul. 2024.