

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA (Associação
ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

BRUNO CÉSAR DO ESPÍRITO SANTO

**RESPOSTA ADAPTATIVA DE LINHAGENS NÃO AMBIENTAIS DE
Escherichia coli FRENTE AO HERBICIDA GLIFOSATO**

Ponta Grossa
2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA (Associação
ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

BRUNO CÉSAR DO ESPÍRITO SANTO

**RESPOSTA ADAPTATIVA DE LINHAGENS NÃO AMBIENTAIS
DE *Escherichia coli* FRENTE AO HERBICIDA GLIFOSATO**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva)

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pileggi.

Co-orientadora: Profa. Dra. Sônia Alvim Veiga Pileggi

Ponta Grossa
2015

E77r Espírito Santo, Bruno César do
Resposta adaptativa de linhagens não ambientais de *Escherichia coli* K-12 frente ao herbicida Glifosato/Bruno César do Espírito Santo. Ponta Grossa, 2015.
51 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva – Área de concentração – Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa. Universidade Estadual do Centro-Oeste.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pileggi
Coorientadora: Profa. Dra. Sonia Alvim Veiga Pileggi

1. *KatE*. 2. *KatG*. 3. Peroxidação lipídica. 4. Estresse oxidativo. I. Pileggi, Marcos. II. Pileggi, Sonia Alvim Veiga. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. IV. Universidade Estadual do Centro-Oeste. Mestrado em Ciências da Saúde. IV. T.

CDD : 575



PARANÁ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta
Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e
Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste
(Departamento de Ciências Biológicas).



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 05/2015

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pelo candidato **Bruno César do Espírito Santo**.

Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro de dois mil e quinze, no auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Dr. Marcos Pileggi em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Bruno César do Espírito Santo**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Marcos Pileggi (Orientador UEPG), Dr. Galdino Andrade Filho (UEL) e Dra. Jesiane Stefania da Silva Batista (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Resposta adaptativa de linhagens não ambientais de *Escherichia coli* frente ao herbicida glifosato**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADO**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de trinta dias; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) até o prazo máximo de 60 dias após a defesa; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário):

Alteração de Título: sim ☐ não ☐

Novo título: _____

Ponta Grossa, 27 de fevereiro de dois mil e quinze.

Prof. Dr. Marcos Pileggi

Prof. Dr. Galdino Andrade Filho

Profa. Dra. Jesiane Stefania da Silva Batista

**“O insucesso é apenas uma oportunidade para recomeçar de novo com
mais inteligência. ”**
Henry Ford

Agradecimentos

- A Deus, pela segunda chance;
- CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelo apoio financeiro e concessão da bolsa;
- Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Pileggi pela amizade, oportunidade e suporte, principalmente na reta final do mestrado. Sem sua confiança e apoio, eu não teria chegado até aqui. Agradeço pelos conselhos tanto na vida profissional como na vida pessoal, vou levá-los pela minha vida. Aprendi muito.
- A minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Sônia Alvim Veiga Pileggi pelo apoio nas horas que precisei, principalmente na reta final do mestrado. Agradeço de coração toda atenção e preocupação.
- A meus pais, Oséias Antônio do Espírito Santo e Olisete Aparecida do Espírito Santo, por todas as orações, preocupação, apoio, carinho e por sempre acreditarem em mim. Vocês sabem como foi penoso chegar aqui. São minha base em todas as situações.
- Ao meu irmão, Lucas do Espírito Santo, por ser sempre meu anjo da guarda e meu melhor amigo. Valeu cara.
- Aos amigos de laboratório que me ajudaram e conviveram comigo neste período de 4 anos. Obrigado por todas as conversas e trocas de experiências, com certeza, isso me fez aprender muito e crescer como pessoa. Luiz Ricardo Olchanheski, Elizângela Paz, Leandro DatolaTullio, Lilian Parra Prione, Bruna Steckling, Janaína Emiliano, Ulisses Albino, Fabiane Paulistch, Vanessa Janoni, Fernanda Gravina, Gessica da Costa, Tatiane Dobrzanski, Pablo Reichert, Maria Janina Pinheiro Diniz, Alyne Fonseca, Stella Marys.
- A Prof. Dr^aJesiane Batista, por sempre tentar me ajudar de todas as formas possíveis na realização deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, pela concessão das linhagens presentes neste estudo;

- Ao amigo Fabio Santos, pela ajuda nos últimos dias antes da defesa. São amizades como a sua que faço questão de cultivar.
- Ao pessoal do laboratório de Genética pelo empréstimo de materiais e equipamentos;
- A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva;
- A todos que de alguma forma, seja ela direta ou indiretamente, auxiliaram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O aumento na produção agrícola deve-se, em boa parte, pelo uso intensivo de agroquímicos, os quais assumem papel relevante. Porém, um dos impactos gerados pelo seu uso é a mudança estrutural e populacional das microbiotas do solo, que precisam de alguma forma tolerar esse xenobióticos para subsistir. São questionados se mecanismos de tolerância são selecionados por pressão seletiva sobre fenótipos específicos ou se existem mecanismos plásticos de adaptação, prescindindo de agentes seletivos específicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os mecanismos de adaptação e respostas celulares, particularmente de isoenzimas de catalase em *Escherichia coli*, ao contato com o herbicida glifosato, sem seleção prévia para esse herbicida. Resultados mostraram que a deleção em *katG* permitiu uma tolerância a doses mais elevadas do herbicida, e que a linhagem *katE* responde melhor as espécies reativas de oxigênio. Taxas de crescimento nos tratamentos com doses elevadas do herbicida se mostraram menores em relação ao controle, mostrando o efeito tóxico sobre as células bacterianas. As taxas de peróxido de hidrogênio foram aumentadas nos tratamentos com herbicidas, o que provavelmente contribuiu para a diminuição no crescimento bacteriano. A linhagem *katE* foi a mais eficiente em responder aos níveis de peróxido de hidrogênio induzidos pelo glifosato. Os níveis de MDA mostraram-se parecidos em tratamentos com 50 x glifosato em *katE* e em *katG*, corroborando a efetividade e especificidade da enzima HPI (*katG*) na fase log. Considerando que a *E. coli* não apresentou um contato prévio com o glifosato, sendo uma linhagem desenvolvida para estudos de laboratório, e não adaptada ao ambiente, o sistema de defesa encontrado nessas linhagens pode ser considerado como modelo para outras bactérias de solo, amplo, não específico para o glifosato. Um sistema de respostas não específicas como esse podem aumentar o valor adaptativo de bactérias em solos agrícolas, nos quais são aplicadas diferentes espécies químicas de herbicidas em um tempo relativamente curto.

Palavras-chave: *katE*, *katG*, peroxidação lipídica, estresse oxidativo.

ABSTRACT

The increase in agricultural production is due, in large part, by the intensive use of agrochemicals, which assume a significant role. However, one of the impacts generated by its use is structural change and population of the microbiota of the soil, they need somehow tolerate this xenobiotics to subsist. They are asked whether tolerance mechanisms are selected by selective pressure on specific phenotypes or if there are plastic coping mechanisms, regardless of specific. The selective agents aim of this study was to evaluate the mechanisms of adaptation and cellular responses, particularly isozymes of catalase in *Escherichia coli* when contact with the herbicide glyphosate, without prior selection for this herbicide. Results showed that deletion in *katG* allowed a tolerance to higher doses of the herbicide, and that *katE* lineage responsive reactive oxygen species. Growth rates in the treatments with high doses of the herbicide were lower compared to the control, showing the toxic effect on cells. As hydrogen peroxide rates were increased in the treatments with herbicides, which probably contributed to the decrease in bacterial growth. The *katE* strain was more efficient to respond to hydrogen peroxide levels induced by glyphosate. MDA levels were shown to be similar in treatments with 50 x glyphosate in *katE* and *katG*, confirming the effectiveness and specificity of the HPI enzyme (*katG*) in log. Considering phase that *E. coli* showed no previous contact with glyphosate, a strain being developed for laboratory studies, and not adapted to the environment, the defense system found that strains can be considered as a model for other soil bacteria, broad, not specific to glyphosate. A system of non-specific responses as this may increase the adaptive value of bacteria in agricultural soils, which are applied in different chemical species of herbicide in a relatively short time.

Keywords: *katG*, *katE*, lipid peroxidation, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural do glifosato	17
Figura 2 - Degradação do glifosato por bactérias do solo, com produção dos metabólitos; ácido aminometilfosfônico (AMPA) e sarcosina (Dick & Quinn, 1995).	18
Figura 3 - Curvas de crescimento de <i>Escherichia coli</i> $\Delta katE$. Leituras em O.D. em 600 nm.	38
Figura 4 - Curvas de crescimento de <i>Escherichia coli</i> $\Delta katG$. Leituras em O.D. em 600 nm.	38
Figura 5 - Quantificação dos níveis de H ₂ O ₂ , em $\mu\text{mol/g}$ de massa fresca, em <i>E. coli</i> K-12, $\Delta katE$ e $\Delta katG$	39
Figura 6 - Quantificação dos níveis de H ₂ O ₂ , em $\mu\text{mol/g}$ de massa fresca em $\Delta katG$	40
Figura 7 - Níveis de MDA, em nmol/g de massa fresca, determinados em <i>Escherichia coli</i> K-12, $\Delta katE$ e $\Delta katG$	42
Figura 8 - Padrões de SOD-PAGE apresentados por <i>E.coli</i> K- 12 em contato com diferentes concentrações de glifosato no tempo de 5 h.	43
Figura 9 - Padrões de CAT-PAGE apresentados por <i>E.coli</i> K- 12 em contato com diferentes concentrações de glifosato no tempo de 5 h.	43

Lista de abreviaturas e siglas

CAT – Catalase

EDTA– Ácido Etileno DiaminoTetracético

EROs– Espécies Reativas de Oxigênio

LA – Ágar Luria

LB– Caldo Luria (Luria Broth)

MDA–Malondialdeído

PBS– Solução tampão de fosfato (Phosphate Buffer Solution)

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SOD – Superóxido Dismutase

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

TBA– Ácido 2-tiobarbitúrico

TCA– Ácido tricloroacético

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 HISTÓRICO E USO DE AGROTÓXICOS	15
1.2 HERBICIDAS E EFEITOS EM ORGANISMOS NÃO ALVO.....	16
1.3 CARACTERIZAÇÃO DO GLIFOSATO.....	17
1.4 DEGRADAÇÃO DE HERBICIDAS	19
1.6 SISTEMA ANTIOXIDANTE DE RESPOSTA.....	20
1.7 ESTRESSE OXIDATIVO	21
1.7.1 <i>ESCHERICHIA COLI</i> E SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 HERBICIDA.....	25
3.2 LINHAGENS BACTERIANAS	25
3.3 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO BACTERIANO	25
3.4 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	26
3.4.2 PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	26
3.5. ENZIMAS	27
3.5.1 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	27
3.5.2 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
RESUMO.....	28
ABSTRACT	29
4.1.1 INTRODUÇÃO	30
4.1.2 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1.2.1 LINHAGENS BACTERIANAS.....	32
4.1.2.2 HERBICIDA	32
4.1.2.3 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO BACTERIANO	32
4.1.2.6 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	34
4.1.2.7 ATIVIDADE DE SOD POR MEIO DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)	34
4.1.2.8 ATIVIDADE DE CAT	35

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.2.1CAPACIDADE DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DE <i>E. COLI</i> EM PRESENÇA DO GLIFOSATO.....	36
4.3 INDICADORES DE TOXICIDADE DO GLIFOSATO EM <i>E. COLI</i>	39
4.4 SISTEMAS DE REPOSTAS À TOXICIDADE DO GLIFOSATO EM <i>E. COLI</i>	42
CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO E USO DE AGROTÓXICOS

O crescimento populacional vem sendo observado ao longo dos anos de forma significativa e estima-se que até 2050 a população mundial atinja 9,1 bilhões de pessoas (CARVALHO, 2006). Para suprir esta demanda é necessário que perdas na agricultura sejam evitadas ao máximo e sua produção seja regular. Uma alternativa para que a produção agrícola se mantenha é o uso de agroquímicos, que ajudam na manutenção de culturas, dizimando pragas indesejáveis, como por exemplo, ervas daninhas. De acordo com Fornaroli (2013), as culturas que maior concentram o interesse em negócios de herbicidas são a soja, cana-de-açúcar, milho e arroz.

A etimologia da palavra herbicida vem do latim *herba*(planta) e *caedere*(matar) (ZIMDHAL, 1993). São substâncias químicas seletivas, pois são capazes de provocar a morte de certas plantas e de outras não (OLIVEIRA JR., 2011). Devido a perdas constantes na agricultura, a interferência de plantas daninhas e a falta de alternativas de eficiência semelhante, a utilização dos herbicidas ainda é considerada uma prática essencial em culturas agrícolas.

No início do século XX, utilizando sais de cobre com ácido sulfúrico, apareceram as primeiras tentativas para o manejo de pragas em cereais (ZIMDHAL, 1993). Em 1941 foi sintetizado o primeiro composto para controle químico: 2,4-diclorofenoxiacético, ou 2,4-D (POKORNY, 1941). Durante a segunda guerra mundial foram descobertas algumas propriedades de derivados de ácidos fenoxiacéticos e somente após o seu término é que se descobriu que ele ocasionava morte diferenciada em plantas (HAMMER; TUKEY, 1944; MARTH; MITCHELL, 1944). A partir das décadas de 50 e 60, a aplicação de pequenas doses controladas para manejo dessas plantas foi sendo gradualmente aumentada (FORNAROLLI, 2013). Nos Estados Unidos, surgiu a sociedade científica *Weed Science Society of America* em 1956, a qual consolidou o estudo das Plantas Daninhas como ciência, dando origem a grupos semelhantes em outros países. A Sociedade Brasileira de Herbicidas e Ervas Daninhas (SBHED), a atual Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (SBCPD), foi fundada no Brasil em 1963 (OLIVEIRA JR., 2011).

Desde o ano de 1964 o investimento em herbicidas vem aumentando, sendo que, de 1994 a 1998 as vendas cresceram 76,43%. Segundo dados de Cox (1998), desde 1974 foi registrado o uso de 17-21 mil toneladas por ano nos Estados Unidos. Em 2012, foi usado mais de 2.700 toneladas de 2,4-D, quase quatro vezes mais que em 2005, segundo dados do USDA. O uso do herbicida dicamba mais que dobrou no mesmo período, para 39,5 toneladas. (BUNGE, 2014). No Brasil, o uso dessas substâncias iniciou-se na década de 70, sendo que, o composto glifosato foi o mais impactante (FORNAROLLI, 2013).

1.2 HERBICIDAS E EFEITOS EM ORGANISMOS NÃO ALVO

A produção e a disseminação de xenobióticos no ambiente fazem com que principalmente os seres humanos sejam expostos diariamente a muitos desses compostos (FERON et al., 2002). Em humanos, efeitos tóxicos e mutagênicos ocorrem em pequenas doses nas células reprodutivas e embrionárias (MARC et al., 2002) além de atuar em receptores endócrinos (androgênio e estrogênio) influenciando na enzima aromatase que é responsável por reverter a função dos mesmos (SIMPSON et al., 1994). Como consequência, influenciam na diferenciação celular, metabolismo, reprodução, gravidez e desenvolvimento (HODGSON; ROSE, 2007).

Em ambientes aquáticos, a microbiota pode ficar vulnerável ao ser exposta a compostos químicos (HIGGINS E HOHN, 2008). Além disso, em peixes, após exposição, a atividade de enzimas responsáveis pela resposta antioxidativa celular é reduzida, entre elas: superóxido dismutase, catalase e glutathione-S-transferase, além do aumento das células brancas e vermelhas do sangue (MODESTO; MARTINEZ, 2010).

Pesquisas mostram a grande variabilidade de herbicidas aplicadas no solo e sua ação sobre a microbiota em função das doses utilizadas (FERNANDEZ, et. al., 2009). Na produção agrícola, Maltby (2006) descreve que o glifosato inibe o crescimento de *Bradyrhizobium elkanii*, prejudicando a nodulação e fixação do nitrogênio em soja, tanto em solo como em meios de cultura.

O crescimento de *Escherichia coli* é também afetado por diversos outros herbicidas não seletivos, sendo os mais interferentes o gramoxone e o próprio glifosato (BOTELHO, 2012).

A conservação da microbiota e de seu metabolismo é um requisito essencial para a continuidade da qualidade do solo (ALEF; NANNIPIERI, 1995). Pesquisas realizadas mostram diferentes tipos de efeitos de herbicidas em microbiota de solo, modificando-a consideravelmente devido às doses utilizadas e do próprio herbicida (CHILDS, 2007).

Pesquisas relatam tanto uma interação positiva do glifosato com a microbiota, estimulando a atividade microbiana, quanto negativa inibindo a respiração (FERNANDES, 2014). As evidências de que os herbicidas podem influenciar, por exemplo, no crescimento ou no desenvolvimento de diversos fungos fitopatogênicos ou saprófitos do solo foram verificadas por Rosa et al. (2010), onde observa-se forte interferência de glifosato, halosulfuron e sethoxydim sobre isolados de *Rhizoctonia*, *Ceratocystis*, *Cryphonectria*, *Phytophthora*, *Macrophomina*, *Sclerotium*, *Fusarium* e *Mirothecium*.

1.3 CARACTERIZAÇÃO DO GLIFOSATO

O glifosato (N-(fosfonometil) glicina, $C_3H_8NO_5P$) (Fig. 1) é um herbicida pós-emergente, sistêmico, não seletivo, pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas.

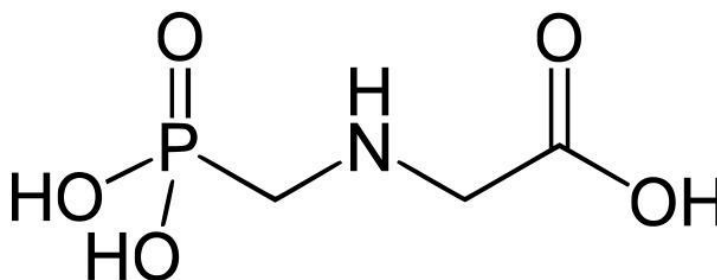


Figura 1 - Fórmula estrutural do glifosato

Seu amplo espectro de ação permite que seja utilizado no controle de plantas infestantes anuais, perenes, de folha estreita e folha larga, além do uso em lavouras transgênicas e controle de plantas aquáticas em reservatórios de

água. É registrado para o uso em várias culturas e como maturador na cana-de-açúcar. As dosagens variam de 1 litro até cerca de 10 litros do produto comercial/ha, podendo ocorrer doses maiores (MONSANTO, 2009). O glifosato foi sintetizado pela primeira vez em 1964 e apresentado como herbicida em 1971(YAMADA; CASTRO, 2007). Os nomes comerciais utilizados para os compostos de glifosato são: Accord, Rodeo e Roundup® (Monsanto Co.) sendo este último o mais comum (COX, 1998).

O registro do glifosato no MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil - apresenta a classificação toxicológica e a classificação potencial de periculosidade ambiental do glifosato e dos adjuvantes das diferentes formulações no mercado. Apesar de ser considerado pouco tóxico, o glifosato apresenta em sua bula uma série de informações médicas para intoxicações descrevendo sintomas digestivos, cutâneos, oculares e respiratórios dos mais simples até o óbito por essas vias de absorção.

No Brasil, é considerado como perigoso ao ambiente (MONSANTO, 2009). Glifosato apresenta como principais metabólitos de biodegradação o ácido aminometilfosfônico (AMPA, em inglês) e a sarcosina (Fig. 2).

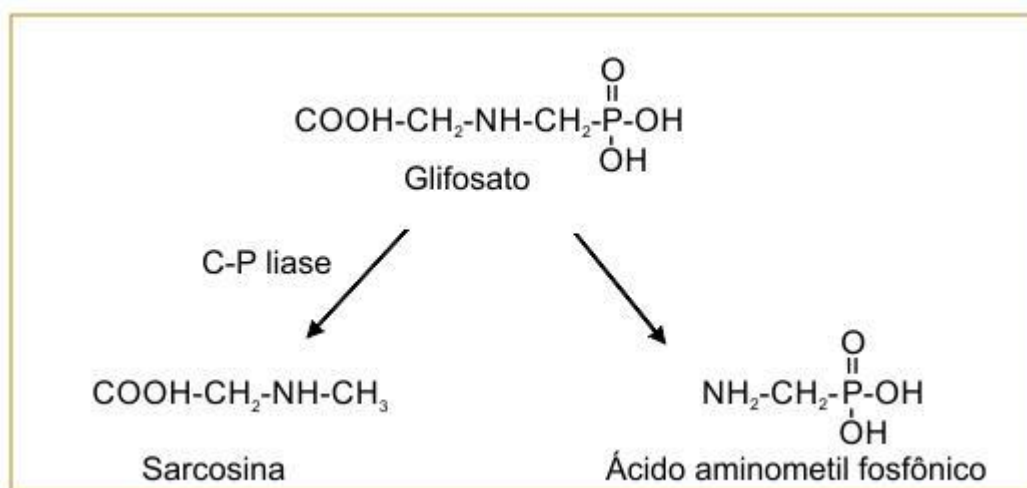


Figura 2 - Degradação do glifosato por bactérias do solo, com produção dos metabólitos; ácido aminometilfosfônico (AMPA) e sarcosina (Dick & Quinn, 1995).

Alguns trabalhos mostram que a toxicidade do AMPA se mostra igual ou até mesmo superior do que o próprio glifosato (WILLIAMS et al, 2000). Concentração mais alta de glifosato, do seu metabólito e de AMPA, tem sido encontrada em folhagens novas. A aplicação de glifosato pode resultar na

presença de resíduos tanto na colheita quanto em animais usados na alimentação humana. No ambiente, as concentrações mais altas de ambos os compostos foram encontradas no solo. A aplicação direta como herbicida em solos próximos a águas superficiais pode ser responsável pela presença de glifosato em água potável (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

Mais especificamente, em plantas, o modo de ação do glifosato é como inibidor da atividade da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase – EPSPS, enzima esta, catalisadora da síntese de aminoácidos aromáticos como a fenilalanina, tirosina e triptofano e controladora de outros processos como a inibição da síntese de clorofila, estimulação da produção de etileno, redução da síntese de proteínas e elevação da concentração de IAA – Ácido Indol Acético (COLE, 1985). As plantas pulverizadas com o glifosato morrem lentamente, em poucos dias ou semanas. Em humanos a ausência da enzima EPSPS reduz a toxicidade da molécula (COUTINHO et al., 2005).

Os sintomas comuns observados após a aplicação de glifosato são clorose foliar seguida de necrose. Outros sintomas foliares são: enrugamento ou malformações e necrose de meristema e também de rizomas e estolões de plantas perenes. Em contraste com muitos herbicidas de contato, os sintomas fitotóxicos de danos pelo glifosato geralmente desenvolvem-se lentamente, com a morte ocorrendo após vários dias. Devido ao longo tempo requerido, a estabilidade do glifosato é uma importante característica que contribui para seus efeitos fitotóxicos. Nas plantas, o glifosato é muito estável, com pequena degradação detectável ocorrendo em longo período de tempo (GRUYS & SIKORSKI, 1999).

1.4 DEGRADAÇÃO DE HERBICIDAS

A decomposição biológica dos pesticidas é a mais importante e a melhor forma de remoção desses xenobióticos do ambiente (DABROWSKA; KOT-WASIK; NAMIESNIK, 2004). Os microrganismos podem interagir química e fisicamente com essas substâncias, levando a mudanças estruturais ou a degradação da molécula (RAYMOND et al., 2001). Dentro da microbiota, bactérias e fungos são os principais degradantes de pesticidas (DE SCHRIJVER; DE MOT, 1999). A biodegradação normalmente envolve o efeito

interativo das comunidades mistas de microrganismos e conta com a variabilidade metabólica das bactérias e fungos (SILVA, 2004).

Nos solos, os microrganismos podem metabolizar os pesticidas orgânicos de forma aeróbica ou anaeróbica. Na maioria dos casos, as transformações podem acontecer por catabolismo, processo em que os microrganismos degradam as moléculas e as utilizam como fonte de energia e nutrientes, ou por cometabolismo em que são necessárias outras fontes de carbono e de nutrientes para que a ocorra degradação (PENNY; VUILLEUMIER; BRINGEL, 2010). Desta forma, o pesticida não é utilizado como fonte de energia para o crescimento do microrganismo, mas sim metabolizado em conjunto com outros substratos (BRICEÑO et al., 2007).

1.5 TOLERÂNCIA AOS HERBICIDAS

Alguns micro-organismos não degradam herbicidas, mas conseguem tolerá-los. As linhagens tolerantes desenvolvem sistemas para resistir aos xenobióticos, e um deles é aumentar a produção ou atividade de enzimas do sistema antioxidante, ou até mesmo para a degradação do xenobiótico (Li et al., 2009). Já em estudos realizados na década de 80, Rogers mostrou que genes específicos estavam relacionados com a capacidade de *E. coli* tolerar o herbicida glifosato. Nas últimas décadas, a descoberta de genes relacionados à tolerância ao 2,4-D em bactérias encontradas no solo e sua transferência para culturas possibilitaram o desenvolvimento de culturas tolerantes ao produto (GRIFFIN et al., 2013). Santos et al. (2004) observaram respostas diferenciadas no crescimento de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. nativas do Brasil, em razão da aplicação de diferentes formulações comerciais do glifosato, revelando a importância de se considerar os componentes adjuvantes desses herbicidas nessas avaliações de impactos.

1.6 SISTEMA ANTIOXIDANTE DE RESPOSTA

O oxigênio (O₂) apareceu em grandes quantidades significativas na atmosfera terrestre há aproximadamente, mais de 2,2 bilhões de anos, devido à evolução da fotossíntese realizada por cianobactérias (GARG; MANCHANDA, 2009). O acúmulo de O₂ permitiu a evolução de grande

quantidade de organismos que usam o O₂ e proporcionando maior produção energética na respiração, comparando-se ao metabolismo anaeróbico (SCANDALIOS, 2005). A participação do O₂ no metabolismo redox foi possível devido a sua estrutura química, uma vez que oxigênio molecular possui dois pares desemparelhados de elétrons (cada um oriundo de um dos átomos de oxigênio) e isso atribuiu ao O₂ baixa reatividade (HALLIWELL, 2006).

1.7 ESTRESSE OXIDATIVO

Em casos de estresse, um acervo de enzimas específicas é necessário. Entre elas estão a catalase (CAT), ascorbatoperoxidase (APX), dehidroascorbato redutase (DHAR), glutationa redutase (GR) e superóxido dismutase (SOD) (ROSSI, 2012).

A SOD é considerada a primeira defesa em relação as EROs (ALSCHER et al., 2002). As isoformas Cu/Zn-SOD, Mn-SOD e Fe-SOD são encontradas na matriz mitocondrial tanto em células procarióticas como eucarióticas (MALLICK & MOHN, 2000), sendo que em plantas, por exemplo, a APX atua especialmente nos tecidos que realizam fotossíntese, por meio da degradação do H₂O₂ utilizando o ascorbato como substrato para reação. A SOD pode ser encontrada em tecidos que não realizam fotossíntese no intuito de diminuir as EROs (ASADA, 2006).

Segundo Foyer e Noctor (2000), em plantas, os cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos são os locais onde ocorrem as reações que reduzem as EROs. Quando em alta concentração celular, o H₂O₂ inibe a fixação do carbono, uma vez que as enzimas que participam do ciclo de Calvin são extremamente sensíveis a esta ERO (SCANDALIOS, 2000). Essas ações podem ser causadas por inúmeros fatores como radiação UV, seca, ataque de patógenos e herbicidas (MALLICK, MOHN, 2000).

1.7.1 *Escherichia coli* e sistema antioxidante

O estresse oxidativo em bactérias, além de sistemas de respostas desses micro-organismos, têm sido estudados desde a década de 50 e apesar disso, o

papel de enzimas específicas e respostas adaptativas ainda não está claramente definido (MARTINS, 2011).

E. coli é um micro-organismo importante, pois se trata de um dos organismos mais bem caracterizados na Microbiologia (BABA et al, 2006). É considerado um modelo ideal para o estudo de processos evolutivos para inúmeras outras espécies de bactérias (ZIMMER, 2008). *E. coli* K-12 não coloniza o intestino humano comumente e é tida como organismo modelo para estudos na genética e fisiologia microbiana, sendo amplamente estudada. (BACHMANN, 1972). Foi descrita por Theodor Escherich (1885) e foi denominada como *Bacterium coli commune*, posteriormente reclassificada como *Bacillus coli* e novamente, mais tarde, como *Escherichia coli* (CASTELLANI; CHALMERS, 1919). Em 1922, uma linhagem de *E. coli* foi isolada a partir de uma amostra de fezes de um paciente adoecido devido a difteria e recebeu a denominação de K-12 (LUDERBERG, 1951), objeto deste estudo.

Possui a forma de bacilo e pertence à família das Enterobacteriaceae. Podem ser aeróbias e anaeróbias facultativas, possuindo vários flagelos em volta da sua estrutura celular. Podem ser encontradas no lúmen intestinal de seres humanos e de animais de sangue quente. (MURRAY, 2004).

O entendimento de funções gênicas precisas, análises bioquímicas, entre outros, foi evidenciado no estudo de Blattner et al. (1997) onde foi apresentado o seqüenciamento completo do genoma desse organismo.

Dados experimentais indicam que, em *E. coli*, a cadeia respiratória é responsável por cerca de 87% da produção total de H_2O_2 (GONZÁLEZ FLECHA; DEMPLE, 1995). Em células eucariontes, como em plantas, as EROs são produzidas nas mitocôndrias e cloroplastos (BARTOLI et al., 2004) e são controladas por vias metabólicas constitutivas e induzidas, sendo que em situações normais das células o balanço redox é mantido pela ação da via específica (AZEVEDO et al., 2011).

Duas vias de resposta ao estresse oxidativo são conhecidas em *E. coli*. Especificamente, são induzidas duas hidroperoxidases nomeadas de HPI e HPII, que apresentam atuações diferentes (SHELLHORN, 1994). A enzima HPI é codificada pelo gene *katG* que é expressa em presença de doses pequenas de H_2O_2 (TRIGGS-RAINE et al, 1998), sendo o determinante celular mais

importante. A enzima HPII, codificada pelo gene *katE* (Von OSSOWSKI et al., 1991), tem maior expressão quando a bactéria está em fase de crescimento exponencial, mostrando que essa enzima está ligada, principalmente, ao crescimento bacteriano (LOEWEN, 1996). Os genes *katE* e *katG* participam do mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo causado pelo H₂O₂ em *E. coli*. A deleção desses genes pode causar a incapacidade de remoção do H₂O₂ no meio intracelular (JUNG; KIM, 2003).

Dessa forma, os estudos para avaliar o comportamento de micro-organismos com ou sem esses genes e suas isoformas são importantes para entender como eles podem influenciar no combate a agentes estressantes como herbicidas ou outros xenobióticos.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das isoenzimas de catalase, *katE* e *katG*, em resposta ao estresse oxidativo gerado pelo glifosato em *E. coli* K-12.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 HERBICIDA

Foi utilizado o herbicida comercial *RoundupTransorb*, que apresenta sal de potássio de Glifosato 588 g/L / Equivalente ácido de N – (fosfonometil)glicina (Glifosato) 480 g/L e outros adjuvantes 820 g/L (MONSANTO, 2008).

3.2 LINHAGENS BACTERIANAS

A linhagem selvagem K-12 de *E. coli* foi utilizada como controle: F⁻, DE(araD-araB)567, lacZ4787(del):rrnB-3, LAM⁻, rph-1, DE(rhaD-rhaB)568, hsdR514). Mutantes desta linhagem para os genes que codificam as isoformas das enzimas catalase HPI (*katG*) e catalase HPII (*katE*) foram usadas a partir da "KEIO Knockout Collection" (BABA et al., 2006). Essas genes substituídos por um que confere resistência a canamicina por meio do método "Red Swap" (DATSENKO; WANNER, 2000).

3.3 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO BACTERIANO

As linhagens bacterianas foram crescidas em caldo Luria (LB; 10 g L⁻¹ de triptona, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura e 10 g L⁻¹ de NaCl). O pré-inóculo foi obtido por meio do crescimento da linhagem em LB até a fase log de crescimento (7h de incubação). A cultura foi centrifugada durante 5 min. a 9.190 ge as células foram lavadas duas vezes com tampão PBS (Tampão fosfato salino: 8 g L⁻¹ de NaCl; 0,2 g L⁻¹ de KCl; 1,44 g L⁻¹ de Na₂HPO₄; 0,24 g L⁻¹ de KH₂PO₄). Uma alíquota foi transferida para os tratamentos com O.D. inicial de 0,05 a 600 nm, sendo que as amostras foram diluídas a cada vez que as leituras alcançassem valores próximos a O.D de 0,6 para que os erros fossem diminuídos, sendo os valores posteriormente multiplicados pelos fatores de diluição correspondentes.

As células foram coletadas por centrifugação a 9.190 g por 7min, à 4 °C, e mantidas a -80 °C para análises posteriores. O experimento foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de cultura, sendo 3 repetições

biológicas, nas mesmas condições descritas acrescidas com as concentrações do herbicida (0x; 1x :0,035 mM; 40x: 0,134 mM; 50x: 0,167 mM).

3.4 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

3.4.1. Ácido Malondialdeído

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação da produção do ácido malondialdeído (MDA), um metabólito reativo ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), método adaptado de Health e Packer (1968). As culturas (item 3.5) foram centrifugadas a 10.000g por 5min a 4 °C. O precipitado foi lavado duas vezes com solução salina (9 g L⁻¹ de NaCl). o precipitado foi macerado com nitrogênio líquido; 0,1 g do macerado de cada uma das amostras foi homogeneizado com 1 mL de TCA (ácido tricloroacético) 0,1% e centrifugados a 10.000 g por 5 min. Do sobrenadante, foi retirada uma alíquota de 0,25 mL e transferida para outro tubo com 1 mL de solução TCA 20% e TBA (ácido tiobarbitúrico) 0,5%. A mistura foi colocada em banho-maria por 30min. a 97 °C, com posterior resfriamento em gelo por 10 min. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 11.600 g, e o sobrenadante foi retirado para leitura em espectrofotômetro a 535 e 600 nm. A quantidade de MDA foi expressa em µmol/mg de massa fresca.

3.4.2 Peróxido de Hidrogênio

As células (item 3.3) foram maceradas em nitrogênio líquido, homogeneizadas com TCA 0,1% e centrifugadas a 11.600 g por 15 min a 4 °C. Retirou-se 0,2 mL do sobrenadante e transferido para um tubo contendo 0,2 mL de uma solução 100 mM de tampão fosfato pH 7,5 e 0,8 mL da solução 1M de KI. A solução foi acondicionada no escuro a 4°C por 1h, seguido por 20 min em temperatura ambiente. A absorbância foi medida em espectrofotômetro em 390 nm e os resultados foram expressos em µmol/g de massa fresca (ALEXIEVA et al.,2001)

3.5. ENZIMAS

3.5.1 Extração de Proteínas

Para extração de proteínas, a cultura (item 3.3) foi centrifugada a 10.000g por 10min, e o precipitado macerado com nitrogênio líquido e homogeneizado em 100 mM de tampão de extração (em g/L⁻¹, 14,520 K₂HPO₄; 2,260 KH₂PO₄; 0,372 EDTA; 0,462 g/L⁻¹dithiothreitol. (DTT) e 5 % de polivinilpirrolidona – PVPP [10:1 volume do tampão: peso da amostra]) (AZEVEDO et al., 1998). O material foi centrifugado a 10.000g por 30min., e o sobrenadante foi armazenado em alíquotas a -80 °C.

3.5.2 Quantificação de Proteínas

Para as determinações da concentração de proteínas totais, foi utilizado o método segundo Bradford, 1976, por espectrofotometria com leituras em 595 nm, utilizando-se o BSA (*“bovineserumalbumin”*) como padrão. Os resultados da quantificação foram expressos em mg/mL.

3.5.3. Análise protéica por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

A determinação da atividade da catalase foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 12%, a 4 °C e com corrente constante de 15 mA. O padrão utilizado foi de CAT de fígado de boi (2 unidades). Após o tempo de corrida, o gel foi lavado em água deionizada (3 x 15 min.) e incubado por 10 min. em solução de H₂O₂ 0,003 %, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Após este período, o gel foi lavado em água deionizada e colocado por 10 min. em uma solução de FeCl₃ 1% (m/v) e K₂Fe(CN)₆ 1% (m/v) sob agitação. Em seguida, a solução foi retirada e o gel lavado com água deionizada. A fixação foi realizada com uma solução de ácido acético (7%) por 15 min. e os géis são documentados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Catalase HPI é essencial para a tolerância ao glifosato em *Escherichia coli*.

Catalase HPI is essential for glyphosate tolerance in *E. coli*.

Resumo

. O aumento na produção agrícola deve-se, em boa parte, pelo uso intensivo de agroquímicos, os quais assumem papel relevante. Porém, um dos impactos gerados pelo seu uso é a mudança estrutural e populacional das microbiotas do solo, que precisam de alguma forma tolerar esse xenobióticos para subsistir. São questionados se mecanismos de tolerância são selecionados por pressão seletiva sobre fenótipos específicos ou se existem mecanismos plásticos de adaptação, prescindindo de agentes seletivos específicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os mecanismos de adaptação e respostas celulares, particularmente de isoenzimas de catalase em *Escherichia coli*, ao contato com o herbicida glifosato, sem seleção prévia para esse herbicida. Resultados mostraram que a deleção em *katG* permitiu uma tolerância a doses mais elevadas do herbicida, e que a linhagem *katE* responde melhor as espécies reativas de oxigênio. Taxas de crescimento nos tratamentos com doses elevadas do herbicida se mostraram menores em relação ao controle, mostrando o efeito tóxico sobre as células bacterianas. As taxas de peróxido de hidrogênio foram aumentadas nos tratamentos com herbicidas, o que provavelmente contribuiu para a diminuição no crescimento bacteriano. A linhagem *katE* foi a mais eficiente em responder aos níveis de peróxido de hidrogênio induzidos pelo glifosato. Os níveis de MDA mostraram-se parecidos em tratamentos com 50 x glifosato em *katE* e em *katG*, corroborando a efetividade e especificidade da enzima HPI(*katG*) na fase log. Considerando que a *E. coli* não apresentou um contato prévio com o glifosato, sendo uma linhagem desenvolvida para estudos de laboratório, e não adaptada ao ambiente, o sistema de defesa encontrado nessa linhagens pode ser considerado como modelo para outras bactérias de solo, amplo, não específico para o glifosato. Um sistema de respostas não específicas como esse podem aumentar o valor adaptativo de bactérias em solos agrícolas, nos quais são aplicadas diferentes espécies químicas de herbicidas em um tempo relativamente curto.

Palavras-chave: Sistemas de respostas bacterianos, peroxidação lipídica, estresse oxidativo, promiscuidade enzimática, tolerância a herbicidas.

Abstract

The increase in agricultural production is due, in large part, by the intensive use of agrochemicals, which assume a significant role. However, one of the impacts generated by its use is structural change and population of the microbiota of the soil, they need somehow tolerate this xenobiotics to subsist. Are asked whether tolerance mechanisms are selected by selective pressure on specific phenotypes or if there are plastic coping mechanisms, regardless of specific selective agents. The objective of this study was to evaluate the mechanisms of adaptation and cellular responses, particularly isozymes of catalase in *Escherichia coli*, the contact with the herbicide glyphosate, without prior selection for this herbicide. The results presented in this work showed that the deletion in *katE* allowed a tolerance to higher doses of herbicide and better responses to reactive oxygen species. Except for this strain, growth rates in the treatments with high doses of the herbicide were lower compared to the control, showing the toxic effect on the bacterial cells. Probably this was due to higher peroxide rates observed in the treatments with herbicides, which probably contributed to the decrease in bacterial growth. The *katE* strain was more efficient to respond to hydrogen peroxide levels induced by glyphosate. *E. coli* studied in this work had no previous contact with glyphosate, it is considered a non-environmental lineage, and yet the defense system found for this mutant bacterium was efficient. Therefore, this system responses can be general and can respond to other xenobiotics. It is possible that soil microbiota also present this model isoforms with different regulatory systems, which would allow an increase in the adaptive value of agricultural land, on which are applied different chemical species of herbicides in a relatively short time.

Keywords: Systems of bacterial responses, lipid peroxidation, oxidative stress, enzyme promiscuity, herbicide tolerance

4.1.1 Introdução

O aumento da demanda agrícola está relacionado ao crescimento populacional humano e a necessidade de mudanças no sistema alimentar mundial (TILMAN, 2011; SEUFERT, 2012). Perdas de produtividade devido a plantas daninhas, assim como a inexistência de alternativas de controle, fazem dos herbicidas uma prática essencial e generalizada. O glifosato é o herbicida mais vendido do mundo devido ao seu preço acessível, amplo espectro de ação e por não ser seletivo à cultura da soja. Tem ação pós-emergente, de amplo espectro, interferindo na via biossintética da fenilalanina, tirosina e triptofano, inibindo a enzima 5-enolpiruvato-shikimato-3-fosfatossintetase (EPSPS), que existe em plantas e em alguns microrganismos, mas não em animais (SIHTMÄE, 2013).

Entretanto, os diversos efeitos desses químicos no ambiente geram preocupação, uma vez que os agroquímicos não são degradados com facilidade por todos os microrganismos (COPLEY, 2009). O solo é composto por inúmeras associações microbianas, sendo considerado um sistema vivo, dinâmico, heterogêneo e em transformação. Pequenas mudanças de estrutura e função nestas associações da biomassa microbiana podem ter grande impacto na ciclagem de nutrientes e propriedades físico-químicas de solos (YANG, 2015). A poluição causada por metais pesados e pesticidas, por exemplo, são as maiores. Pesquisas realizadas mostram que pesticidas, como os herbicidas e outros poluentes orgânicos, podem fazer com que o carbono da biomassa microbiana do solo diminua em grande parte (XINGHUA et al., 2009). A contaminação do solo por herbicidas podem atingir lençóis freáticos, e posteriormente rios e lagos. (VOROSMARTY et al., 2010). O glifosato, por exemplo, é citado em estudos de contaminação ambiental (ANNETT et al., 2014).

A degradação biológica de pesticidas pode ser uma estratégia para adaptação de microbiotas a estes xenobióticos e, eventualmente, pode ser utilizada em processos de biorremediação, que é uma das áreas mais promissoras em biotecnologia (MARTINS et al., 2007). Bactérias e fungos são

os principais agentes degradadores desses xenobióticos, podendo agir de forma interativa, contando com sua versatilidade metabólica (SILVA, 2004). A degradação do glifosato por bactérias leva a formação do metabólito 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propanóico (AMPA), o qual pode ser encontrado em solos mesmo depois de muitos anos após a última pulverização. O glifosato livre no solo é degradado a dióxido de carbono e amônia, principalmente por bactérias do gênero *Pseudomonas* (HELANDER & SALONIEMI, 2012).

Outra estratégia que microrganismos podem utilizar para tolerar agroquímicos é a indução da resposta antioxidativa ao estresse. O estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO), de tal forma que a capacidade de defesa da célula não seja mais eficaz (GHELFI et al., 2011). Em bactérias, a maior parte das ERO é resultado da redução da molécula de oxigênio (O_2), catalisado por enzimas da cadeia respiratória associadas a membrana plasmática (LUSHCHAK, 2011). Os produtos do metabolismo aeróbico, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^\cdot$), podem eventualmente causar danos ao DNA, RNA e lipídeos (MONTEIRO, 2011). Enzimas antioxidantes como catalase (CAT), peroxidases e glutathione redutase (GR), estão envolvidas no combate as ERO (OLCHANHESKI, 2014).

Os genes *katE* e *katG*, codificadores de duas isoenzimas de CAT em *Escherichia coli*, participam do mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O gene *katG* codifica para a catalase HPI, sob controle do regulon oxyR, enquanto que o gene *katE*, induzido em condições aeróbicas, codifica para a catalase HP II, independentemente deste controle, agindo de forma mais rápida (BROWN, 2012). A falha na expressão desses genes causa a incapacidade de remoção do H_2O_2 no meio intracelular (CHIANG & SCHELLHORN, 2012).

Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel de diferentes sistemas de respostas apresentados pela bactéria *E. coli*, por meio de linhagens nocauteadas para os genes codificantes das duas principais isoformas da enzima CAT, em diferentes níveis de estresse gerado pelo herbicida glifosato.

4.1.2 Material e Métodos

4.1.2.1 Linhagens bacterianas

Foram utilizadas as linhagens selvagem (wt – linhagem controle) da bactéria *Escherichia coli* BW25133, derivada da linhagem K-12, e as mutantes da mesma, $\Delta katE$ e $\Delta katG$, foram obtidas da “KEIO Knockout Collection” (BABA et al., 2006). O gene *katE* codifica para a isoenzima HP II, e *katG* para HP I. As linhagens mutantes tiveram os respectivos genes substituídos por um que confere resistência à canamicina, por meio do método “Red Swap” (DATSENKO e WANNER, 2000).

4.1.2.2 Herbicida

Foi utilizado o herbicida comercial Roundup, que contém o sal de potássio de Glifosato 588 g/L [(Equivalente ácido de N – (fosfonometil)glicina (Glifosato) 480 g/L] (Fig. 1), e outros ingredientes 820 g/L (MONSANTO, 2008).

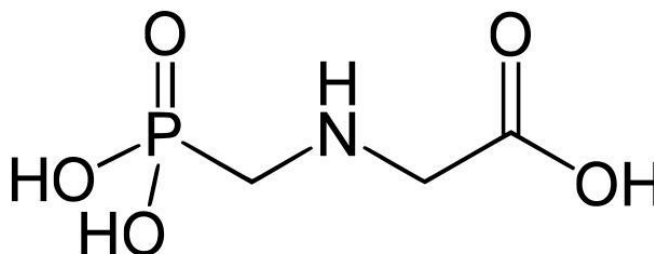


Figura 1: Estrutura química do glifosato

4.1.2.3 Condições de crescimento bacteriano

As linhagens foram crescidas em 800 mL de Caldo Luria (LB: 10 g L⁻¹ de triptona, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura e 10 g L⁻¹ de NaCl) a 37 °C, durante a noite. Após o período de crescimento, as amostras foram centrifugadas a 8.000g por 5min a 4 °C. O precipitado foi lavado duas vezes com solução

salina (NaCl 0,9%) e inoculado nos meios em triplicata com diferentes concentrações de herbicida: 0x (controle), 1x (dose de campo), 40x e 50x. Foram realizadas duas leituras a cada 30min e depois, após a cada 1 h. O crescimento bacteriano foi acompanhado por espectrofotômetro a 600 nm, sendo que a alíquota foi diluída sempre que a D.O. ultrapassasse valores de 0,6 para manter a precisão das leituras. Nesse caso, os valores foram multiplicados pelos fatores de diluição correspondentes.

O meio utilizado como controle foi o LB. Os ensaios foram realizados em frascos de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura LB1 (LB com 0,00335 mM de glifosato, o que equivale à 1x), LB40 (0,134 mM de glifosato); e LB50 (0,168 mM). As condições de crescimento foram a 37 °C em mesa agitadora orbital a 200 rpm.

Para as análises de viabilidade, foram utilizados cultivos em meio sólido, LA (LB + ágar 15 g L⁻¹). Foram retiradas alíquotas de 100 µL dos meios citados no parágrafo anterior, no tempo de 5h (fim da fase log), as quais foram diluídas até 10⁻⁷ e 10⁻⁸ e plaqueadas em LA e incubadas à 37 °C. A contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada em 12h de incubação.

4.1.2.4 Quantificação de Peróxido de hidrogênio

O H₂O₂ foi quantificado por meio da liberação de iodo da amostra protéica em um sistema de reação. A amostra consistiu de 100 mg de extrato celular bacteriano homogeneizado com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% e centrifugado a 10.000 g por 15 min a 4 °C. Foram adicionados a 200 µL da amostra 0,2 mL de tampão fosfato de potássio (14,52 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 2,26 g L⁻¹ de KH₂PO₄, pH 7,5) e 0,8 mL de iodeto de potássio 1M. O sistema de reação foi mantido por 1h em gelo, no escuro. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 390nm. Os resultados foram expressos em µmol/g de massa fresca.

4.1.2.5 Extração de Proteínas

A linhagem bacteriana foi crescida em 800mL de LB, incubada a 37 °C e 200 rpm, durante a noite. As amostras foram centrifugadas a 8.000 g por 5 min a 4 °C. O precipitado foi lavado duas vezes em solução salina. As culturas

foram incubadas nos tratamentos com concentrações de: 0 x, 1 x, 40 x e 50 x, em triplicatas a 37 °C e 200 rpm por 5h. As culturas foram centrifugadas a 8.000 g por 5 min, a 4 °C, e o precipitado foi macerado com nitrogênio líquido. O extrato foi homogeneizado em tampão de extração: 14,520 g L⁻¹K₂HPO₄; 2,260 g L⁻¹KH₂PO₄; 0,372g L⁻¹ EDTA; 0,462 g L⁻¹DL- dithiothreitol. (DTT) e 5 % (w/w) de polivinilpirrolidona (PVPP). Foi utilizada uma proporção de volume do tampão: peso da amostra de 10:1 (CIA et al.,2012). O material foi centrifugado a 10.000 g por 30min, e o sobrenadante foi armazenado em alíquotas a -80 °C.

4.1.2.6 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação da produção de malonaldeído (MDA), um metabólito reativo ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), método adaptado de Heath e Packer (1968). De cada amostra, 0,1 g foi homogeneizado com 1 mL de TCA 0,1% e centrifugados a 10.000g por 5min. Do sobrenadante, foi retirada uma alíquota de 0,25 mL e transferida para um tubo com 1 mL de solução de TCA 20% mais TBA 0,5%. A mistura foi colocada em banho-seco por 30min a 95 °C, e resfriada em gelo por 10min. As amostras foram centrifugadas por 10min a 10.000g. As concentrações de MDA foram monitoradas a 535 nm (todos os lipídeos) e 600 nm (todos lipídeos menos o MDA) e as suas concentrações foram calculadas utilizando um coeficiente de extinção de 155 mMcm⁻¹. A quantidade de MDA foi expressa em µmol/g de massa fresca.

4.1.2.7 Atividade de SOD por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

A eletroforese foi realizada em géis contendo 12% de poliacrilamida com 4% de gel de empilhamento. Foram aplicadas 20 µg de proteína, com corrente de 15 mA gel⁻¹ durante 3h, a 4 °C.

A atividade de SOD-PAGE foi realizada de acordo com Azevedo et al. (1998), no qual os géis foram lavados em água destilada e incubados no escuro, durante 30min, em 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,8)

contendo 1 mM EDTA, 0,005 mM de riboflavina, 0,1 mM de nitroazul tetrazólio e 0,03 mM de TEMED (N,N,N',N' - tetrametiletilenodiamina). Os géis foram expostos à luz branca e imersos em água até a revelação das bandas de SOD.

4.1.2.8 Atividade de CAT

A atividade de CAT foi determinada de acordo com Kraus et al. (1995). A reação foi iniciada com a adição de 25 µL do extrato proteico (já descrito) em uma solução contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 2,5 µL peróxido de hidrogênio(H₂O₂) (solução 30%).A atividade foi determinada seguindo a decomposição de H₂O₂, e quantificada em espectrofotômetro a 240 nm durante 1min a 25°C. Os resultados foram expressos em µmol/min/mg de proteína.

4.2 Resultados e Discussão

4.2.1 Capacidade de crescimento das linhagens de *E. coli* em presença do glifosato

Neste trabalho, foram estudadas linhagens de *E. coli* K-12, selvagem e nocauteadas para genes codificantes de isoformas de CAT, em relação a diferentes concentrações do herbicida glifosato. As linhagens nocauteadas foram para os genes *katG*, que codifica para a catalase HPI, e *katE*, a qual codifica para a catalase HP II. Nas Fig. 2 a 4 estão demonstradas as capacidades de crescimento das linhagens estudadas em diferentes concentrações do herbicida. Não houve diferenças significativas nas taxas de crescimento em 0 e 1 x glifosato, enquanto que a concentração de 50 x (6,7 µM) foi considerada como a máxima a ainda permitir crescimento mensurável na linhagem controle, devido à toxicidade do herbicida (Fig. 2). Pileggi (2012) demonstrou em estudos realizados com *Pantoea ananatis* que o herbicida Callisto[®] apresentou toxicidade em altas concentrações do herbicida (100 x acima da dose de campo), inibindo o crescimento bacteriano. Estudos com altas concentrações de herbicidas, presumivelmente não encontradas no ambiente, são interessantes para um melhor entendimento do sistema de respostas de tolerância. O herbicida paraquat, por exemplo, é um dos únicos herbicidas que causa um efeito bacteriostático em *E. coli*, sendo o glifosato o segundo mais tóxico, (BOTELHO, 2012).

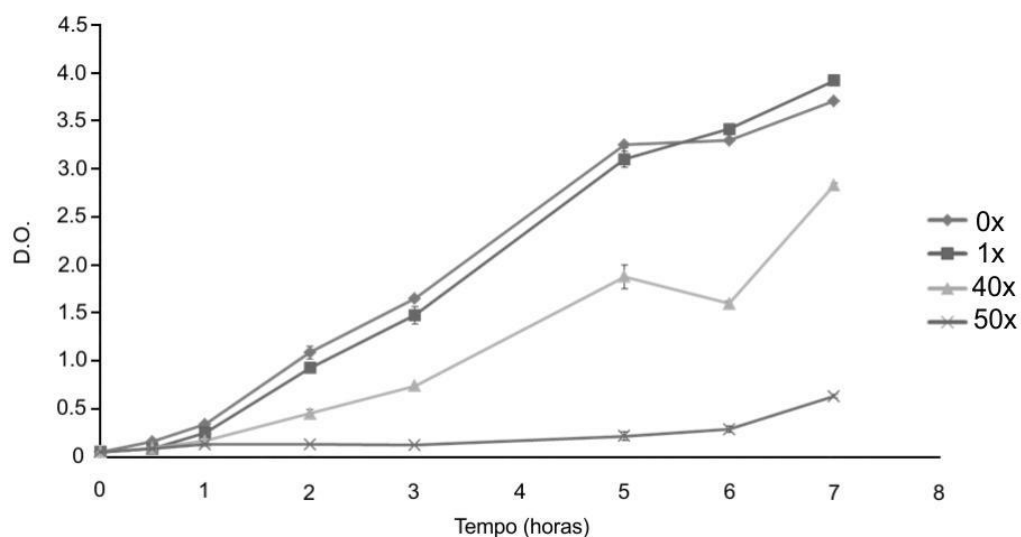


Figura 2 - Curvas de crescimento de *Escherichia coli* K-12 em diferentes concentrações de glifosato. Leituras em O.D. em 600 nm.

A linhagem $\Delta katE$, nocauteada para o gene da catalase HP11, não apresentou redução nas taxas de crescimento, mesmo na concentração mais alta de glifosato utilizada nesse trabalho (Fig. 3). Nenhuma das outras linhagens, mesmo em outros artigos (IMLAY, 2013; LOEWEN, 1985), apresentou esse comportamento. Os níveis de HP11 que foram inicialmente menores que os níveis de HP1, não se alteraram durante o crescimento logarítmico, mas na fase estacionária, houve aumento de dez vezes durante o crescimento. Neste caso, o gene *katE* é constitutivamente induzido em condições aeróbicas e atua sobre o H_2O_2 de uma forma rápida (GORDON, 2011).

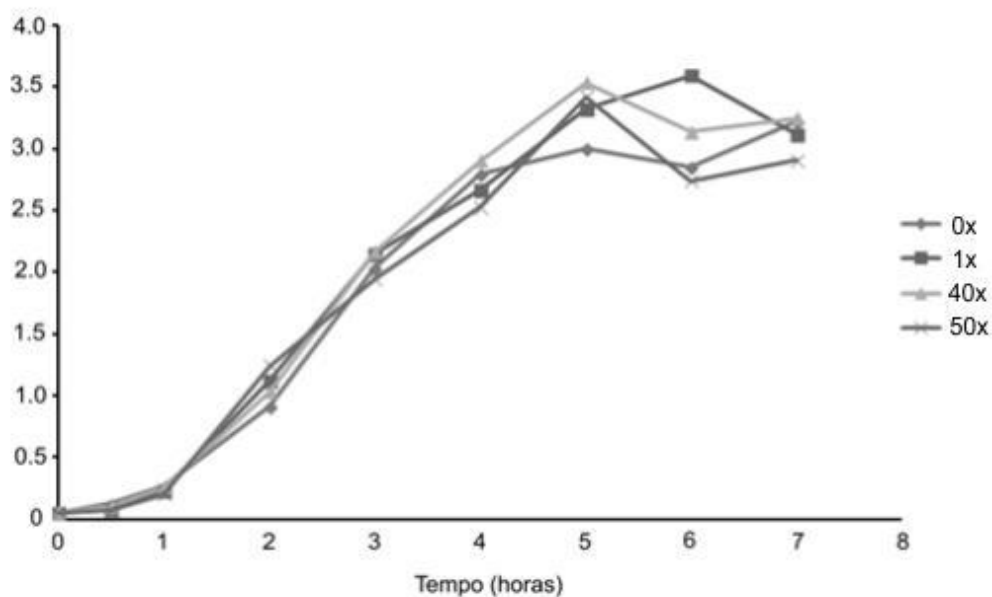


Figura 3 - Curvas de crescimento de *Escherichia coli* $\Delta katE$. Leituras em O.D. em 600 nm.

A linhagem $\Delta katG$, nocauteada para o gene da catalase HPI, apresentou taxas de crescimento compatíveis com a linhagem controle apenas em 0 e 1 x a concentração de glifosato, sendo que em 40 e 50 x, o crescimento foi indetectável (Fig. 2 e 4).

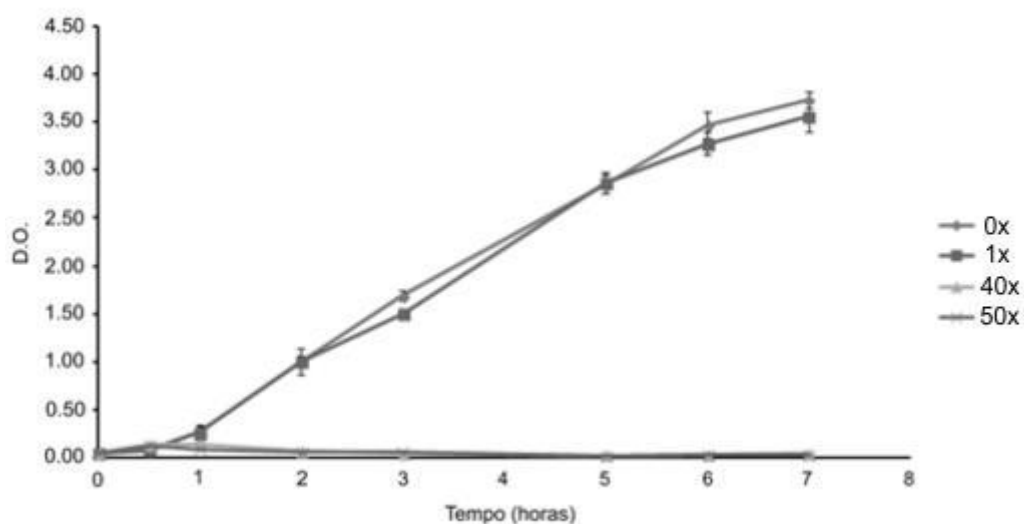


Figura 4 - Curvas de crescimento de *Escherichia coli* $\Delta katG$. Leituras em O.D. em 600 nm.

4.3 Indicadores de toxicidade do glifosato em *E. coli*

Os níveis de H_2O_2 em *E. coli* K-12 foram consideradas como indicadores de toxicidade induzida pelo herbicida glifosato. A linhagem selvagem conseguiu reduzir consideravelmente os níveis H_2O_2 até a concentração de 40 x, mas em 50 x foram observados os níveis mais altos, mostrando que nessa concentração a bactéria perde a eficiência no controle dessas ERO (Fig. 5).

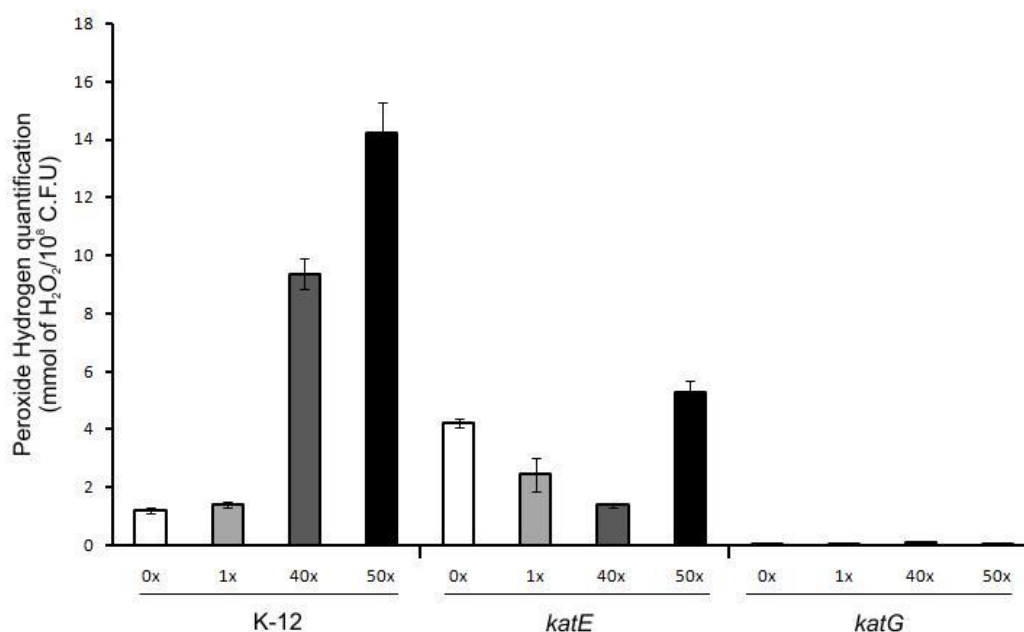


Figura 5 - Quantificação dos níveis de H_2O_2 , em $\mu\text{mol/g}$ de massa fresca, em *E. coli* K-12, $\Delta katE$ e $\Delta katG$

O H_2O_2 é um metabólito extremamente deletério, pois participa da reação de produção do radical $OH^\cdot$, que é considerada a espécie mais reativa em sistemas vivos, sendo altamente tóxico para as células. Bactérias possuem enzimas para manter sua concentração intracelular a níveis nanomolares. Mutantes para genes codificantes de enzimas antioxidativas crescem mal, sofrem altos índices de mutagênese, e podem morrer. (MISHRA; IMLAY, 2012). Entretanto, das três linhagens avaliadas nesse trabalho, a linhagem mutante *katG* foi a que apresentou os menores índices de produção de H_2O_2 , seguida da linhagem controle, e finalmente pela *katE*, (Fig. 5). Quanto maiores os índices de H_2O_2 , gerados, menores as taxas de crescimento observado nas linhagens bacterianas, exceto na linhagem *katG* (Fig. 2 a 5).

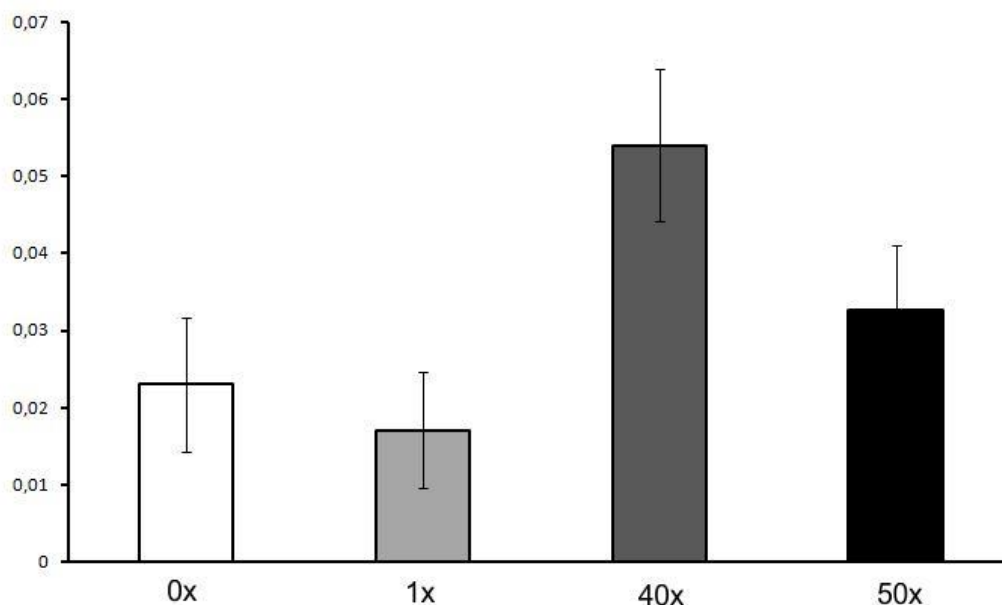


Figura 6 - Quantificação dos níveis de H₂O₂, em μmol/g de massa fresca em $\Delta katG$.

Embora a linhagem *katG* tenha crescido de forma parecida com o controle (Fig.4), houve peroxidação em níveis baixos, mas nas concentrações mais altas de herbicida, a bactéria não conseguiu crescer. A desintoxicação enzimática do H₂O₂ em bactérias é realizada principalmente por catalases, das quais três classes já foram descritas: as catalases monofuncionais, as catalases-peroxidases, as quais pertencem a HPI e a HP II, e as catalases de manganês (pseudocatalases). A maioria das catalases-peroxidases são encontradas em bactérias e algumas encontradas em fungos e alguns organismos eucarióticos (ITALIANI et al, 2011). Existe uma regulação independente de cada peroxidase (HOERTER et al., 2005).

A enzima HPI, codificada pelo gene *katG*, é encontrada no espaço periplasmático de *E. coli* e sua expressão é controlada pelo regulador positivo OxyR em resposta ao H₂O₂, e por RpoS, de uma forma independente de OxyR. A HP II, expressa constitutivamente por *katE*, apresenta atividade no citosol da célula e na fase estacionária, e é regulada pelo regulon RpoS (IMLAY, 2008; ITALIANI, 2011). É uma enzima que apresenta uma atuação mais direta na degradação de H₂O₂. A linhagem *katG*, a qual possui o gene *katE* e a enzima HPI funcionais, apresentou os dados mais eficientes de controle de H₂O₂ (Fig. 5) e de taxas de crescimento em meio de cultura com até 50 x a concentração de glifosato (Fig. 3). Por outro lado, os dados obtidos sobre

a linhagem *katG* demonstraram que a isoenzima HP II não é eficiente na redução de estresse oxidativo gerado pelo glifosato em *E. coli*.

Outro dado interessante é que a linhagem selvagem não apresenta a mesma eficiência na redução de H_2O_2 (Fig. 5) e nas taxas de crescimento (Fig. 2) em relação à linhagem *katG* (Fig. 3), mesmo tendo a enzima funcional HPI, considerada a mais eficiente na diminuição dos efeitos tóxicos induzidos pelo glifosato. Acreditamos que o sistema de regulação dos genes *katG* e *katE*, sendo comum a ambos, possa originar um sistema de interferência metabólica (GRAVINA, 2015, em preparação). Hui et al., (2014), descreveram que as linhagens de *E. coli* K-12 *katE* apresentam uma maior expressão da enzima *katG* quando expostas a níveis de 2% de peróxido, indicando que é necessário um limiar de concentração desta molécula para a expressão de *katG*. Neste caso, o contato com o glifosato estaria aumentando os níveis de peróxido dentro da célula, e conseqüentemente a expressão da catalase HPI.

Dessa maneira, a linhagem selvagem estaria com os reguladores atuando sobre ambos os genes de CAT, em interferência metabólica, enquanto que a linhagem *katG*, apenas o gene *katE* estaria funcional e sendo regulado.

O MDA é outro indicador citotóxico (ZHANG et al. 2012), pois representa a peroxidação de lipídeos poli-insaturados em membrana celulares. É um produto secundário no processo de peroxidação, sendo o metabólito mais mutagênico desse processo, além de amplamente conhecido e confiável em estudos de estresse oxidativo (AYALA, 2014). Os dados obtidos para as linhagens selvagens e nocauteadas de *E. coli*, em controle e em tratamento com o glifosato, não demonstraram diferenças significativas (Fig. 7).

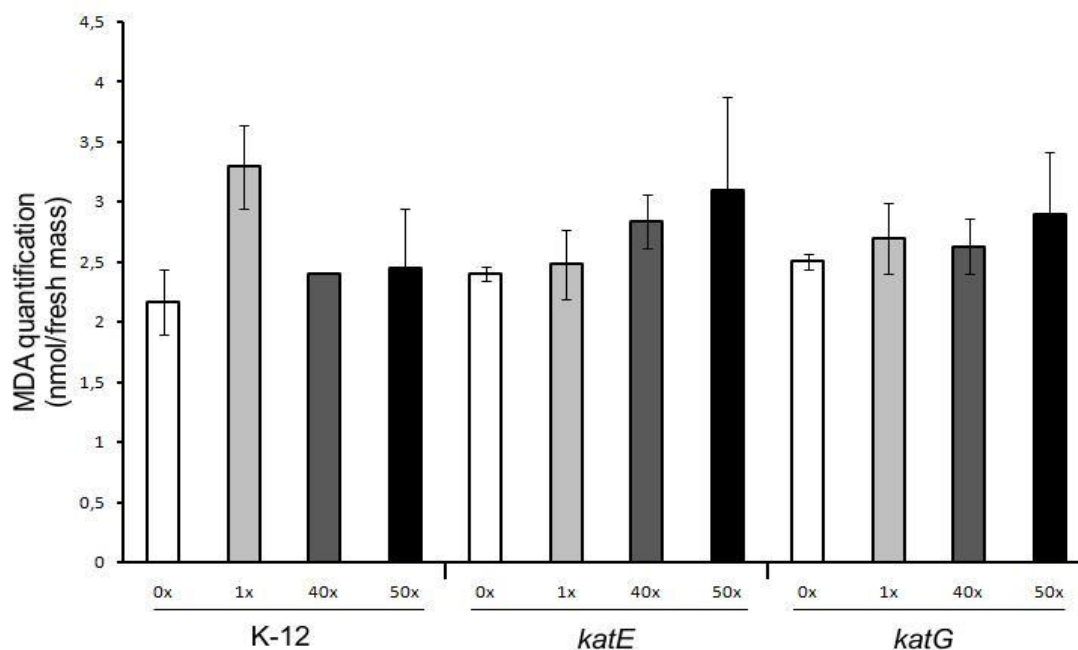


Figura 7 - Níveis de MDA, em nmol/g de massa fresca, determinados em *Escherichia coli* K-12, $\Delta katE$ e $\Delta katG$.

4.4 Sistemas de repostas à toxicidade do glifosato em *E. coli*

As vias envolvidas na resposta ao estresse oxidativo e manutenção do estado redox celular em bactérias estão sob controle de fatores transcricionais chamados Regulons (IMLAY, 2008). Muitas enzimas nessas vias, como as peroxidases, podem apresentar isoenzimas, com respostas específicas independentes e diferentes sistemas regulatórios (SEAVER; IMLAY, 2001). Sistemas bacterianos com isoenzimas, com diferentes reguladores, possivelmente podem estar ligadas ao metabolismo de adaptação a diferentes condições de estresses ambientais, incluindo presença de xenobióticos.

No gel mostrado na Fig. 8, observa-se que a linhagem $\Delta katE$ exibe um aumento de atividade de isoenzimas de SOD em relação ao controle, mas principalmente em relação à linhagem $\Delta katG$, apresentando ainda uma banda intermediária não encontrada nas outras linhagens. A SOD transforma o superóxido em H_2O_2 . O gene de resposta regulatória para o estresse causado por superóxido e peróxido é mediado amplamente por meio da indução de catalase (CHIANG, 2012).

Provavelmente, o aparecimento da banda deve-se ao nocaute realizado no gene *katE*, responsável pela codificação da enzima HP11, a qual tem maior atividade na fase log-estacionária. Estudos mostram que as ERO atingem primeiramente enzimas antioxidantes de ferro e que as células ajustam o seu uso de metal para compensar tal processo (IMLAY, 2014).

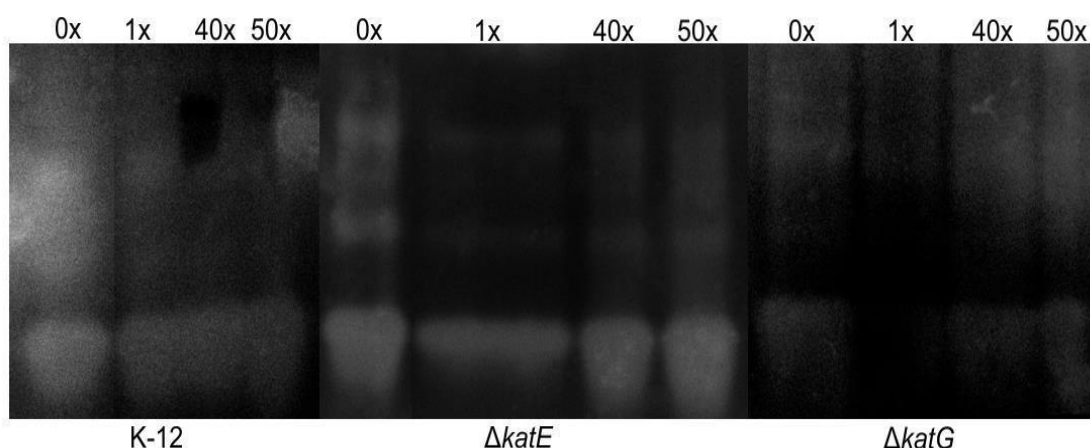


Figura 8 - Padrões de SOD-PAGE apresentados por *E. coli* K-12 em contato com diferentes concentrações de glifosato no tempo de 5 h.

Não houve um aumento de atividade de CAT de acordo com o tempo de exposição nos meios de cultura com a presença de glifosato (Fig. 8), provavelmente pela adaptação e crescimento da linhagem ao glifosato, porém sem diferenças significativas. Em linhagens de *E. coli*, de acordo com a fase de crescimento, diferentes isoformas podem atuar, as quais apresentam vias de regulação ativadas independentemente (JUNG e KIM, 2003).

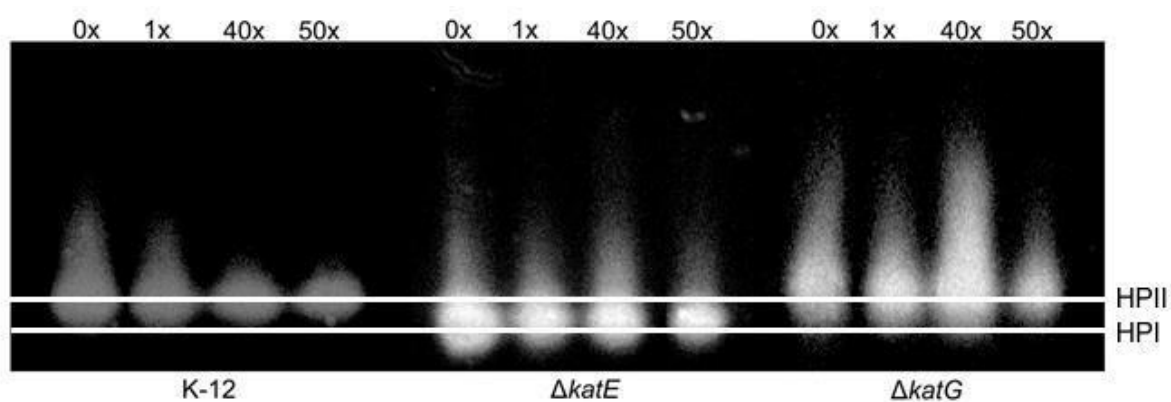


Figura 9 - Padrões de CAT-PAGE apresentados por *E. coli* K-12 em contato com diferentes concentrações de glifosato no tempo de 5 h.

As linhagens estudadas nesse trabalho, mesmo as mutantes para genes importantes no sistema de combate ao estresse oxidativo, apresentaram taxas de crescimento próximas, em glifosato 1 x (Fig. 2 a 4). Esta concentração é esperada de ser encontrada no ambiente agrícola. Entretanto, a linhagem *E. coli* K-12 não é ambiental. Ela foi desenvolvida em laboratório para ser utilizada em experimentos de tecnologia do DNA recombinante, e portanto ela não possui um ambiente natural no qual foi obtida. Devido às modificações que sofreu, não consegue colonizar o intestino de mamíferos e tem baixa capacidade de crescimento no ambiente (FUX, et al, 2005).

Esses dados sugerem uma melhor eficiência da HPI, em relação a HP II, na diminuição de danos advindos pelo contato com altas concentrações de glifosato.

Entretanto, a mutação apresentada pela linhagem *katG* permitiu a sobrevivência em condições que dificilmente poderão ser encontradas no ambiente (Fig. 3). Uma quantidade específica de H₂O₂ é necessária para ativar o gene *katG*. Caso contrário, outros genes, como *katE* e *ahpCF* tomam parte na metabolização do H₂O₂ (GORDON, 2011). Consideramos que um sistema não específico de respostas, baseado na promiscuidade enzimática das catalases e no sistema de isoenzimas, pode permitir adaptações a substâncias químicas e concentrações inéditas às bactérias, mesmo em um ambiente que não seja o seu habitat natural (TAWFIK, 2010).

Conclusões

A participação da isoenzima de CAT, a HPI, que é codificada pelo gene *katG*, foi considerada essencial para a tolerância apresentada pela bactéria *E. coli* K-12 a altas concentrações do herbicida glifosato, *in vitro*. Diferentemente da enzima HPI, codificada pelo gene *katG*, a HP II proporcionou um melhor controle nas taxas de peróxido de hidrogênio, aumentadas pelo glifosato, permitindo o crescimento bacteriano em altas concentrações deste herbicida. Concentrações que a linhagem selvagem, com ambas as enzimas ativas, não pôde suportar. Assim, consideramos que existe uma interferência metabólica no sistema regulatório de ambas enzimas. É possível que a falta de competição

por estes fatores regulatórios, em *katE*, permitiu que esta linhagem fosse mais eficiente no controle de taxas de peróxido e no crescimento celular. Este sistema de respostas, baseado em promiscuidade da enzimas CAT e presença de isoenzimas com diferentes condições de atuação, permitem que a *E. coli*, considerada uma linhagem não ambiental, possa sobreviver a substâncias químicas e em concentrações inéditas ao seu habitat. Este sistema, sendo encontrado em outras bactérias, como as pertencentes a microbiotas de solo agrícola, podem propiciar capacidades adaptativas a situações de alto estresse oxidativo, e em curtos períodos de tempo, como é o caso do manejo agrícola, que se utiliza de diferentes substâncias químicas em sistema de rotação de culturas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, A. S. F. de. Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos. 2002. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-05092002-161341/>>. Acesso em: 2015-02-15.
- ALMEIDA, F.S. Guia de herbicidas: recomendações para o uso adequado em plantio direto e convencional. Londrina: IAPAR, 1985. 482p.
- ANNETT, R., HAMID R. HABIBI, ALICE H. "Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment." *Journal of Applied Toxicology* 34.5: 458-479, 2014.
- AYALA, A., MUÑOZ, M., F., ARGUELLES, S., "Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **Hindawi Publishing Corporation**, vol. 2014.
- BERNER, R. A., A model for atmospheric CO₂ over Phanerozoic time: *American Journal of Science*, v. 291, p. 339–376, 1991.

BÖGER P., MATTHES B., SCHMALFUB J.; Towards the primary target of chloroacetamides - new findings pave the way. **PestManagSci** 56: 497–508, 2000.

FERREIRA A.L.A, MATSUBARA L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, 1997.

FUX, C. A., et al. "Can laboratory reference strains mirror 'real-world' pathogenesis?." **Trends in microbiology** 13.2 (2005): 58-63.

HEAP, I. M. International survey of herbicide-resistant weeds. In: **Western Society of Weed Science (USA)**. 1997.

HOERTER, J. D. et al. Effects of sublethal UVA irradiation on activity levels of oxidative defense enzymes and protein oxidation in *Escherichia coli*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 81, n. 3, p. 171-180, 2005.

IMLAY, J. Cellular defense against superoxide and hydrogen peroxide. **The Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 77, p. 755-776, 2008.

KIRKWOOD, R. C.; MCKAY, I. Accumulation and elimination of herbicides in selected crop and weed species. **Pesticide science**, 1994.

LÜ, Z.; MIN, H.; XIA, Y. The response of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *BurkholderiacepaciaWZ1* to oxidative stress of exposure to quinclorac. **Journal of Environmental Health Science**, New York, v. 39, p. 431-441, 2004.

MALKONES, H. P. Comparison of the effects of differently formulated herbicides on soil microbial activities — a review. **J. Plant Dis. Protect.**, v. 8, p. 781-789, 2000.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2.ed. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2006. 729p.

SANNINO, F.; GIANFREDA, L.; Pesticide influence on soil enzymatic activities. **Chemosphere**, v. 45, n. 4, p. 417-425, 2001.

SEAVER, L.C.; IMLAY, J.A. Alkyl hydroperoxidase reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, p. 7173-7181, 2001.

SILVA, T.M.; STETS, M.I.; MAZZETTO, A.M.; ANDRADE, F.D.; PILEGGI, S.A.V.; FÁVERO, P.R. et al. Degradation of 2,4-D herbicide by microorganisms isolated from Brazilian contaminated soil. **Brazilian Journal of Microbiology** v. 38, p. 522-525, 2007.

TAWFIK, O., KHERSONSKY S. Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective. **Annual review of biochemistry**, v. 79, p. 471-505, 2010.

VÖRÖSMARTY, C. J. et al.; Global threats to human water security and river biodiversity. **Nature**, v. 467, n. 7315, p. 555-561, 2010.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ASADAK.; Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant physiology**, v. 141, n. 2, p. 391-396, 2006.

ALEF K.; NANNIPIERI P. (Ed.). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic, 1995. 576 p.

ALSCHER R.G., ERTURK N., HEATH L. S.; Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, 53:1331–1341, 2002.

BABA T., ARA T., HASEGAWA M., TAKAI Y., OKUMURA Y., BABA M., DATSENKO K. A., TOMITA M., B. L. WANNER , HIROTADA M. Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection., **Molecular Systems Biology**, 2006.

BACHMANN, B. J. Pedigrees of some mutant strains of Escherichia coli K-12. **Bacteriological Reviews**, v. 36, n. 4, p. 525-557, 1972.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BLATTNER F. R., PLUNKETT III G., BLOCH C. A, PERNA N. T., BURLAND V., RILEY M., COLLADO-VIDES J., GLASNER J. D., RODE C. K., MAYHEW G. F., GREGOR J., DAVIS N. W., KIRKPATRICK H. A., GOEDEN M. A., ROSE D. J.,

MAU B., SHAO Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science** 277: 1453–1462, 2007.

BOTELHO, R.G.; FROES, C.M.; SANTOS, J.B. Toxicity of herbicides on *Escherichia coli* growth. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 72, n. 1, Feb. 2012 .

CARVALHO F. Agriculture, pesticides, food security and food safety. **Environmental science& policy**, v. 9, p. 685-692, 2006.

CASTELLANI A.; CHALMERS A. J.: Manual of Tropical Medicine. **Williams Wood and Company**, 3º ed. New York, 1919.

COLE, D. J. Mode of action of glyphosate- a literature analysis, In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. The herbicide glyphosate, p. 49-54, London: **Butterworths**, 1985.

COX C. Glyphosate (Roundup). **Journal of Pesticide Reform/Fall**, v. 18, n. 3, 1998.

CHILDS, G.M.F. **Efeitos de herbicidas na microbiota do solo em sistema fechado**. 2007. 60 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade De Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho”, Jaboticabal, São Paulo. 2007.

COX C. Glyphosate Factsheet. **Journal os Pesticide Reform**, v.108, n. 3, 2000.

DATSENKO, K.A.; WANNER, B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington,v. 97, p. 6640-6645, 2000.

FERON, V.J., CASSEE, F.R., GROTEN, J.P., VAN VLIET, P.W., VAN ZORGE, J.A., International issues on human health effects of exposure to chemical mixtures.**Environ. Health Perspect.** 110, 893–899, 2002.

FERNANDEZ, G.; PITELLI, R.A.; CADENAZZI, M. **Planta Daninha**, v. 27, n. 3, p. 601-608, 2009

FORNAROLLI D. Uma breve história dos herbicidas no Brasil. **Arysta Life Science**, 2013.

FOYER, C. H.; NOCTOR G.; "Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria." **Physiologia Plantarum** 119.3, p. 355-364 (2003).

GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; ANTUNES, A. M.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, R. A. Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. micro-tom) plants to cadmium-induced stress. **Annals of Applied Biology**, v. 153, p. 321–333, 2008.

GRUYS, K.J.; SIKORSKI, A. Inhibitors of tryptophan, phenylalanine, and tyrosine biosynthesis as herbicides. In: SINGH, B.K. (Ed.). **Plant amino acids - biochemistry and biotechnology**. New York: Marcel Dekker, Inc., p. 357-365 1999.

HAMMER, C.L.; TUKEY, H.B. The herbicidal action of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5- Trichlorophenoxyacetic acid on bindweed. **Science**, v.100, p. 154-155, 1944.

HEALTH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, p. 189-198, 1968.

HERSHKO C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Seminars in Hematology*, v. 26, n. 4, p. 277-285, 1989.

HIGGINS, J., HOHN, C. Effects of prevalent freshwater chemical contaminants on in vitro growth of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Environ Pollut**, v.152, p. 259-266, 2008.

HUI, D., KHAIAT, S., UY, T., XU, H., Partial confirmation of single *katG* and *katE* knockouts and double *katG/katE* knockouts created from isogenic background of *Escherichia coli* K-12 strains. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology(JEMI)**, Vol. 18, p.139-145., 2014.

JUNG L. I.; KIM I. G. Transcription of *ahpC*, *katG*, and *katE* genes in *Escherichia coli* is regulated by polyamine-deficient mutant sensitive to H₂O₂ induced oxidative damage., *Biological and Biophysical Research Communications*, n. 301, p. 915-922, **Elsevier**, 2003.

LOEWEN, P. Probing the structure of catalase HP II of *Escherichia coli* – a review. **Gene**, Amsterdam, v. 179, p. 39-44, 1996.

LUKJANCENKO O., WASSENAAR T. M., USSERY D. W. Comparison os 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. **Microbial Ecology**, v. 60, p. 708-720, 2010.

MALLICK N., MOHN F. H.; Reactive oxygen species: response of alga cells. *Journal of Plant Physiology*, 157:183-193, 2000.

MALTY J. S.; SIQUEIRA J. O.; MOREIRA F. M. S.; Efeitos do glifosato sobre microorganismos simbiotróficos de soja, em meio de cultura e casa de vegetação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Vol 41, Iss 2, Pp 285-291 (2006)

MARTINS, P.F.; CARVALHO, G.; DOURADO, M.N.; GRATAO, P.L.; PILEGGI, M.; AZEVEDO, R.A. Effect of chloroacetanilide herbicides on antioxidant enzymes of soil isolated bacteria. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 46, p. 1186-1195, 2011.

MAYES P. A., Biologic oxidation. In MURRAY R. K., GRANNER D. K., MAYES P. A., RODWELL V. W., (eds): **Harper's biochemistry**. San Mateo, Appleton & Lange, 105-11, 1990.

MODESTO K. A.; MARTINEZ C. B. R. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere**, v. 81, p. 781-787, 2010.

MONSANTO DO BRASIL LTDA. **FISPQ - Ficha de informações de Segurança de Produtos Químicos**. ROUNDUP TRANSORB R., 2008.

MURRAY PATRICK R.; Microbiologia Médica. 4ª. ed. [S.I.]: **Elsevier**, 2004.

OLIVEIRA JR. Biologia e Manejo de Plantas Daninhas. **Omnipax**, ed. 1, 348 p. 2011.

POKORNY, R.; New Compounds. Some Chlorophenoxyacetic Acids **Journal of the American Chemical Society**. v.63, p.1768, 1941.

ROSSI, V. S.; Mecanismo antioxidante em plantas. **10º Mostra acadêmica UNIMEP**, 2012

SCANDALIOS J. G., ACEVEDO A., RUZSA S.; Catalase gene expression in response to chronic high temperature stress in maize. **Plant Science**, 156:103-110, 2000.

SCHELLHORN, H.E. Regulation of hydroperoxidase (catalase) expression in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 131, p. 113-119, 1994.

TRIGGS-RAINE, B.; DOBLE, B.W.; MULVEY, M.R.; SORBY, P.A.; LOEWEN, P.C. Nucleotide sequence of *katG*, encoding catalase HPI of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, 4415-4419, 1988.

Von OSSOWSKI, I. Nucleotide sequence of *Escherichia coli katE*, which encodes catalase HP II. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 514-520, 1991.

YAMADA T.; CASTRO P. R. C. Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agrônômicas. **International Plant Nutrition Institute**, n. 119, 2007.

ZIMDHAL, R.L. Fundamentals of weed science. San Diego, CA: **Academic Press**, Inc. 450 p .1993.

ZIMMER C. Microcosm: *E. coli* and the new science of life. **Pantheon books**, New York, 256p., 2008.

