

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

TATIANE DOBRZANSKI

Sistema de respostas de *Bacillus* sp. à toxicidade induzida pelo herbicida Callisto® e
princípio ativo

PONTA GROSSA
2015

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

TATIANE DOBRZANSKI

Sistema de respostas de *Bacillus* sp. à toxicidade induzida pelo herbicida Callisto® e princípio ativo

Dissertação 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 obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração em Biologia Evolutiva).

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pileggi

Co-orientadora: Prof. Dra. Jesiane Stefania da Silva Batista

PONTA GROSSA
2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Dobrzanski, Tatiane

D632 Sistema de respostas de *Bacillus* sp. à toxicidade induzida pelo herbicida Callisto® e princípio ativo/ Tatiane Dobrzanski. Ponta Grossa, 2015.
74f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Estadual do Centro-Oeste.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pileggi.

Coorientadora: Prof^a Dr^a Jesiane Stefania da Silva Batista.

1.Catalase. 2.Degradação. 3.Estresse oxidativo. 4.Peroxidação lipídica. 5.Peróxido de hidrogênio. I.Pileggi, Marcos. II. Batista, Jesiane Stefania da Silva. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Universidade Estadual do Centro-Oeste. Mestrado em Ciências

CDD: 575



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva



PARANÁ

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. 03/2015

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, pela candidata **Tatiane Dobrzanski**.

Aos vinte e quatro 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) **Tatiane Dobrzanski**, 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. Ricardo Antunes Azevedo (ESALQ) e Dr. Flávio Luís Beltrame (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: "**Sistema de respostas adaptativas de *Bacillus megaterium* à toxicidade induzida pelos herbicidas mesotrione e Callisto®**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. 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):

Retirar "adaptativa" do título, como deve ficar Sistema de respostas de Bacillus sp. à toxicidade induzida pelo herbicida Callisto® e princípios ativos

Alteração de Título: sim ☒ não ☐

Novo título:

Sistema de respostas de Bacillus sp. à toxicidade induzida pelo herbicida Callisto® e princípios ativos

Ponta Grossa, 24 de fevereiro de dois mil e quinze.

Prof. Dr. Marcos Pileggi

Prof. Dr. Ricardo Antunes Azevedo

Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame

[Handwritten signatures of Prof. Dr. Marcos Pileggi, Prof. Dr. Ricardo Antunes Azevedo, and Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame]

AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar o meu caminho e guiar meus passos em todos os momentos.

Ao programa de pós-graduação, pela oportunidade de cursar o mestrado e a CAPES pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, prof. Dr. Marcos Pileggi, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pela dedicação e paciência em me ensinar nas incontáveis dúvidas que surgiram durante a realização deste trabalho.

À minha coorientadora, prof. Dra. Jesiane S. S. Batista, por não negar esforços a sanar as dúvidas de experimentos, contribuir para meu crescimento profissional e por me incentivar a seguir em frente nesta carreira profissional.

À todos os professores que conheci e que de alguma maneira me ajudaram, sendo por meio de correções e/ou empréstimos de materiais, além dos profs., Dra. Sonia Alvim Veiga Pileggi e Dra. Carolina Weigert Galvão.

Ao prof. Dr. Flávio Luís Beltrame por toda a dedicação e confiança depositada em mim, por me ajudar a operar CLAE e a desvendar as rotas de degradação das bactérias deste estudo.

À prof. Dra. Rosilene Aparecida Prestes pela ajuda na análise de extração de lipídios e ao pessoal do laboratório multiusuário, por ensinar a operar os equipamentos.

Aos meus pais e irmãs, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. De modo especial, agradeço minha mãe, Natália, e irmã, Josélia, por me fazerem companhia durante as noites que tive que posar no laboratório fazendo curva de crescimento. Também, a minha irmã Lucineli, e a meu pai, Mieceslau, por me trazerem até o laboratório durante as madrugadas e finais de semana.

A todos os meus amigos do laboratório, aos quais tive a alegria de conviver: Alyne, Gabriel, Géssica, Elizangela, Bruno, Paloma, Vanessa, Janaina, Stella, Pablo, Fabiane, Priscila e principalmente ao Leandro, Ricardo e Fernanda, por toda ajuda, ensinamentos das técnicas de laboratório, discussões sobre o projeto, correções e também pelas risadas, sou muito grata a vocês.

Ao meu namorado Charles, por todo amor e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho. Por estar sempre comigo em todos os momentos.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os
únicos benfeitores do mundo.

(Walter S. Landor)

RESUMO

O uso intenso de herbicidas para controle de ervas daninhas na agricultura provoca uma pressão seletiva na microbiota do solo e de águas próximas à área de aplicação, alterando o equilíbrio ambiental. Alguns microrganismos apresentam vias metabólicas de degradação desses xenobióticos, entretanto, a tolerância e os processos de degradação podem gerar radicais livres capazes de afetar a sobrevivência. Este trabalho teve como objetivo analisar o sistema de respostas de linhagens provenientes de solo e água, e que foram submetidas a pressão seletiva pelo herbicida Callisto[®]. Uma linhagem isolada de cada um destes ambientes, identificadas respectivamente, como *Bacillus* sp. CCT7729 e *Bacillus* sp. CCT7730, apresentaram rotas de degradação diferenciadas, com metabólitos diferentes dos já descritos na literatura. O mesotrione, seus metabólitos, e principalmente o Callisto[®], afetaram a viabilidade celular das linhagens deste estudo e alteraram os lipídios de membrana celular, no entanto, *Bacillus* sp. CCT7729 apresentou um sistema de respostas ao estresse oxidativo mais eficiente. Esta linhagem exibiu uma maior eficiência em degradar o mesotrione, menores taxas de peróxido, menores taxas de MDA, atividade SOD elevada e uma baixa atividade da catalase, ao contrário de *Bacillus* sp. CCT7730. Modificações nos lipídios de membrana podem ser consideradas como uma estratégia de defesa contra estresse oxidativo. Os resultados também indicaram uma diversidade de vias metabólicas nas duas linhagens de *Bacillus* sp. para a degradação do mesotrione. Provavelmente os metabólitos induziram diferentes níveis de toxicidade nas bactérias, sendo que *Bacillus* sp. CCT7730 possivelmente degradou o mesotrione em compostos ainda nocivos, ao contrário da linhagem de água. É possível que essas diferentes respostas estejam relacionadas com os ambientes de origem de cada linhagem, sugerindo uma plasticidade de respostas apresentadas por linhagens *Bacillus* sp. para adaptação a substâncias tóxicas em diferentes contextos ambientais.

Palavras-chave: Catalase. Degradação. Estresse oxidativo. Peroxidação lipídica. Peróxido de hidrogênio. Rotas metabólicas. Superóxido dismutase.

ABSTRACT

Excessive use of herbicides for weed control in agriculture causes a selective pressure on soil microbiota and waters near application area, changing environmental balance. Some microorganisms have developed metabolic pathways for degradation of these xenobiotics, although tolerance and degradation processes can generate free radicals and affect survival. This study aimed to analyze the system of responses from soil and water strains, submitted to selective pressure by the herbicide Callisto®. Strains CCT7729 and CCT7730, isolated from soil and water, respectively, were identified as *Bacillus* sp., and showed different degradation routes, with different metabolites, already described in the literature. Mesotrione and its metabolites, and especially its commercial product Callisto®, affected cell viability and altered cell membrane lipids from the tested strains, however, *Bacillus* sp. CCT7729 presented a more efficient system of responses to oxidative stress. This strain exhibited a greater efficiency to degrade mesotrione, lower rates of peroxide, lower rates of MDA, SOD high activity and low activity of catalase, when compared to *Bacillus* sp. CCT7730. Changes in membrane lipids can be considered as a defense against oxidative stress strategy. These results indicated the existence from a variety of metabolic pathways for mesotrione degradation to *Bacillus* sp. Probably metabolites induce different levels of toxicity in bacteria, and *Bacillus* sp. CCT7730 possibly degraded mesotrione in even harmful compounds, unlike the water line. It is possible that these different responses are related to the home environments of each strain, suggesting plasticity responses of *Bacillus* sp. for adaptation to toxic substances in different environmental contexts.

Keywords: Catalase. Degradation. Oxidative stress. Lipid peroxidation. Hydrogen peroxide. Metabolic pathways. Superoxide dismutase.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHP – Alquil hidroperóxido redutase

AMBA – Ácido 2-amino-4-metilsulfonil benzóico

BSA – Albumina de soro bovino (Bovine serum albumin)

CAT – Catalase

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAD – Detector de arranjo foto-diodo

DDT – *Dicloro-difenil-tricloroetano*

EDTA – Ácido etileno diamino tetracético

ERO – Espécies reativas de oxigênio

GSH – Glutathiona reduzida

GST – Glutathiona-S-transferase

HPPD – 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenase

LA – Ágar Luria Broth

LB – Caldo Luria Broth

LBM – Caldo Luria Broth com mesotrione

LBC – Caldo Luria Broth com Callisto[®]

CL-EM/EM – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas - tandem

MDA – Malondialdeído

MNBA – Ácido 4-metilsulfonil-2-nitrobenzóico

MM – Meio Mineral

MMC – Meio Mineral com Callisto[®]

MMM – Meio Mineral com mesotrione

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS – Solução tampão de fosfato (Phosphate buffer solution)

PVPP – Polivinilpirrolidona

g – Força de gravidade

SOD – Superóxido dismutase

TCA – Ácido tricloroacético

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Molécula de leptospermone e molécula do mesotrione	15
Figura 3: Molécula do mesotrione	24
Figura 4: Molécula do mesotrione	35
Figura 5: Curva de crescimento..	43
Figura 6: Viabilidade celular das linhagens	45
Figura 7: Quantificação de peróxido de hidrogênio.	47
Figura 8: Taxas de malondialdeído.	47
Figura 9: Plotagem de espectros de massas encontrados a partir de ensaios CL-EM/EM.	51
Figura 10: Espectros de massa utilizados para propor a estrutura molecular mais estável de metabólitos da degradação do mesotrione de <i>Bacillus</i> sp. CCT7730.	52
Figura 11: SOD-PAGE de <i>Bacillus</i> sp. CCT7729 e <i>Bacillus</i> sp. CCT7730.....	53
Figura 12: Caracterização das isoformas SOD	54
Figura 13: Atividade de CAT.	55
Figura 14: Perfil do espectro de infravermelho de extrato lipídico de <i>Bacillus</i> sp. CCT7729 e <i>Bacillus</i> sp. CCT7730.....	57
Figura 15: Gráfico de escores apresentando a análise de componentes principais (PCA) da composição lipídica	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quantificação das concentrações de mesotrione por CLAE a partir da degradação pelas linhagens <i>Bacillus</i> sp	49
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Agrotóxicos	13
1.2 Mesotrione	14
1.3 Biodegradação	16
1.4 Sistema de defesa contra estresse oxidativo	18
1.4.1 Superóxido dismutase	19
1.4.2 Catalase	20
1.5 Alterações de lipídios de membrana e peroxidação lipídica	21
2. OBJETIVO	23
2.1 Objetivos específicos:	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Herbicidas	24
3.2 Isolamento de bactérias tolerantes ao mesotrione e Callisto®	24
3.3 Condições de cultura para análises enzimáticas e de degradação	25
3.4 Caracterização da degradação do mesotrione	25
3.5 Identificação dos metabólitos da degradação do mesotrione	26
3.6 Extração de proteínas	26
3.7 Peroxidação Lipídica	27
3.8 Peróxido de hidrogênio	27
3.9 Atividade de SOD em PAGE não desnaturante	27
3.10 Determinação das isoenzimas de SOD	28
3.11 Atividade da Catalase	28
3.12 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA	28
3.13 Curva de crescimento bacteriano	29
3.14 Viabilidade celular	29
3.15 Modificações de lipídios de membrana celular	30
3.16 Análise estatística	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Sistema de respostas de <i>Bacillus</i> sp. à toxicidade induzida pelo herbicida Callisto® e princípio ativo	31
4.2 INTRODUÇÃO	32

4.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.3.1	Herbicidas.....	35
4.3.2	Isolamento de bactérias tolerantes ao mesotrione e Callisto®	35
4.3.3	Condições de cultura para análises enzimáticas e de degradação	36
4.3.4	Caracterização da degradação do mesotrione	36
4.3.5	Identificação dos metabólitos da degradação do mesotrione	37
4.3.6	Extração de proteínas.....	37
4.3.7	Peroxidação Lipídica	38
4.3.8	Peróxido de hidrogênio	38
4.3.9	Atividade de SOD em PAGE não desnaturante.....	38
4.3.10	Determinação das isoenzimas de SOD	39
4.3.11	Atividade da Catalase	39
4.3.12	Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA	39
4.3.13	Curva de crescimento bacteriano	40
4.3.14	Viabilidade celular.....	40
4.3.15	Modificações de lipídios de membrana celular	41
4.3.16	Análise estatística.....	41
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.4.1	Caracterização de linhagens tolerantes ao Callisto® e ao princípio ativo 42	
4.4.2	Estratégia de tolerância das linhagens <i>Bacillus</i> sp. CCT7729 e <i>Bacillus</i> sp. CCT7730 ao Callisto® e ao princípio ativo	42
4.4.3	Toxicidade causada pelos xenobióticos	45
4.4.4	Produção de peróxido de hidrogênio e danos celulares induzidos pelo Callisto® e seu princípio ativo	46
4.4.5	Resposta adaptativa ao mesotrione	48
4.4.6	Metabólitos da degradação do mesotrione por <i>Bacillus</i> sp. CCT7729 e <i>Bacillus</i> sp. CCT7730	50

4.4.7	Atividade de enzimas antioxidativas	53
4.4.7.1	SOD	53
4.4.7.2	CAT	55
4.4.8	Modificações de membrana celular	57
4.4.9	Sistema de respostas e defesa ao estresse oxidativo	59
4.5	CONCLUSÕES	61
4.6	REFERÊNCIAS	62
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1. INTRODUÇÃO

1.1 Agrotóxicos

A agricultura tem se tornado cada vez mais dependente dos agrotóxicos como estratégia de manejo de pragas para garantir uma alta produção e o abastecimento de alimentos a população (CHRISMAN et al., 2009; JARDIM; CALDAS, 2012).

O Brasil, um dos maiores produtores de alimentos agrícolas do mundo, apresentou-se em primeiro lugar no uso de agrotóxicos em 2009, com mais de 673 milhões de toneladas aplicadas por ano (ANDEF, 2009). Cerca de 90% dos agricultores brasileiros os utilizam nas suas lavouras (JARDIM; CALDAS, 2012). Deste modo, os últimos anos da agricultura foram marcados pela ampliação da produção agrícola acrescido de contaminação ambiental devido ao intenso uso dessas substâncias (NITI et al., 2013).

Aproximadamente 90% dos agrotóxicos aplicados em campo não alcançam seus alvos, ao atingirem o solo e água, são conduzidos por uma variedade de processos químicos, físicos e biológicos, incluindo volatilização, sorção-dessorção, degradação química e biológica, absorção pelas plantas, escoamento e lixiviação (ALEKSEEVA et al., 2014). Como resultado desses processos, essas substâncias são frequentemente encontradas nas vias aéreas, superficiais e subterrâneas, sedimentos, solo e até mesmo nos tecidos vegetais e animais, contaminando diversos ecossistemas (RODRIGO et al., 2014).

Uma vez no ambiente, e em contato direto com a biota, os agrotóxicos podem passar para as células e tecidos de organismos e dar origem ao processo de bioacumulação. Esse evento é o resultado do balanço de absorção química (por meio da respiração e dieta alimentar) e eliminação química (por meio das trocas respiratórias, digestão fecal, biotransformação do composto e sua diluição no organismo, devido ao aumento dos níveis do mesmo) (ARNOT; GOBAS, 2006).

Com a bioacumulação gerada pela utilização de agrotóxicos, os organismos pertencentes a níveis tróficos superiores na cadeia alimentar podem apresentar complicações, já que ao se alimentar de outros animais e vegetais contaminados, podem acumular uma maior quantidade de xenobióticos em seu corpo (RODRIGO et al., 2014).

Exemplos da prevalência de agrotóxicos no ambiente tem sido amplamente relatados, como é o caso do agrotóxico DDT (diclorodifeniltricloroetano). Essa substância é uma preocupação ambiental desde 1960 devido à sua alta toxicidade, persistência no ambiente e acumulação nos tecidos animais e vegetais (HUMPHRIES, 2013). No ano 2000, o DDT foi utilizado para a eliminação de *Anopheles funestus* (um transmissor da malária) na África do Sul, entretanto, ainda foram encontradas altas concentrações desse produto em áreas que comprometem toda a biota presente na região (HUMPHRIES, 2013).

O uso intensivo e as aplicações em doses elevadas de defensivos agrícolas também vêm proporcionando uma forte pressão de seleção em microrganismos, alterando a diversidade, riqueza e a sua funcionalidade nos ecossistemas, causando desequilíbrios ambientais (ARAÚJO et al., 2003; MARINOZZI et al., 2013). A microbiota é essencial para manter o fluxo de energia e os processos biogeoquímicos, como a decomposição da matéria orgânica, a ciclagem de nutrientes, fixação de nitrogênio e outros elementos essenciais e a decomposição de xenobióticos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

Dentre os agrotóxicos aplicados na agricultura, 48% são herbicidas (MATTHEWS, BATEMAN, MILLER, 2014). Os herbicidas são tóxicos aos seres humanos, não somente em doses elevadas, que provocam intoxicações agudas, mas, em doses baixas também (TSATSAKIS et al., 2009; ZELIGER, 2011). Exposições a longo prazo podem causar diversos problemas na saúde humana, como câncer e doenças neurodegenerativas, problemas reprodutivos, de desenvolvimento e doenças respiratórias (HANKE; JUREWICZ, 2004; KANAVOURAS et al., 2011; PARRÓN et al., 2011; CHA et al., 2012).

1.2 Mesotrione

Em 1977, cientistas do *Western Research Center* (Califórnia/USA) observaram que poucas plantas conseguiam crescer ao redor da planta *Callistemon citrinus*, conhecida como escova de garrafa (MITCHELL et al., 2001). Foi verificado que ela produz uma fitotoxina, a leptospermone, a partir do qual desenvolveram o mesotrione {2 - (4-metilsulfonil-2-nitrobenzoil) -1,3-ciclohexanodione} pertencente ao grupo das tricetonas (Fig. 1), com potencial tóxico 100 vezes maior que o composto original (HUGIE et al., 2008).

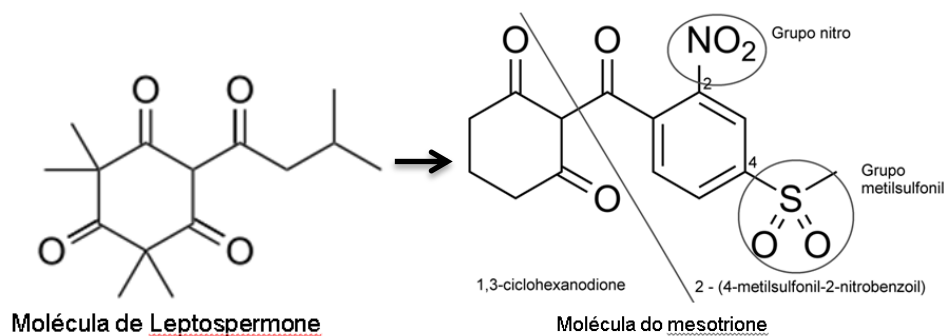


Figura 1: Molécula de leptospermone e molécula do mesotrione. O mesotrione é composto por uma região ciclohexanodione e um grupamento benzil que apresenta os grupos nitro e metilsulfonil.

O Callisto[®] (Syrgenta[®]) é a formulação comercial, composto por 48% do princípio ativo mesotrione e outros solventes, surfactantes e ingredientes adicionados para aumentar a estabilidade, distribuição e eficácia do herbicida (KARAM, CRUZ, 2004). Apenas 3 adjuvantes da composição do Callisto[®] foram divulgados: o poli (oxi-1-2-etanodiol), 1-Octanol e alpha-isodecil-omega-hidroxifosfato (JOLY et al., 2013).

A molécula do mesotrione (Fig.1) é composta por um grupamento benzil e um dione. No grupamento benzil, o grupo nitro, faz com que a molécula apresente atividade herbicida, enquanto que o grupo metilsulfonil aumenta a atividade herbicida e a acidez da molécula. A região do ciclohexanodione bloqueia sítios de metabolismo da molécula pelas plantas, elevando a atividade do herbicida e dificultando a detoxificação da molécula (MITCHELL et al., 2001).

Em ervas daninhas e gramíneas, o mesotrione age bloqueando a atividade da enzima 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenase, a HPPD, presente nos cloroplastos. Essa enzima é essencial para a biossíntese de carotenóides, pois faz parte da rota biossintética que converte a tirosina em plastoquinona e α -tocoferol. A plastoquinona é essencial para a síntese de carotenoides e a sua redução (causada pelo bloqueio da HPPD) leva a diminuição dessas substâncias e perda da fotoproteção. Com isso, em uma ou duas semanas ocorre um branqueamento nas plantas sensíveis, gerada da decomposição da clorofila pela luz, com necrose e morte dos tecidos (KARAM; CRUZ, 2004).

Este herbicida seletivo é utilizado em culturas de milho para o controle pré e pós-emergente de ervas daninhas anuais de folhas largas e algumas gramíneas (MITCHELL et al., 2001; ALEKSEEVA et al., 2014). As culturas de milho não são sensíveis ao herbicida por apresentarem uma lenta absorção foliar e uma

distribuição dentro da planta limitada pelo rápido metabolismo do herbicida, a partir da hidroxilação do anel do mesotrione catalisada pela atividade do citocromo P450 em plantas (MITCHELL et al., 2001; MA et al., 2013).

Em mamíferos, a HPPD está envolvida na degradação de tirosina (LEWIS; BOTHAM, 2013). Exposições repetidas em baixa dosagem do mesotrione em ratos sensíveis a inibição da HPPD demonstraram diversos efeitos adversos, como a diminuição do peso corporal, opacidades corneanas, alargamento do fígado e rim, aumento da tireóide, desmielinização do nervo ciático e alteração reprodutiva e mudanças no desenvolvimento (LEWIS, BOTHAM, 2013).

Os efeitos citados acima não aparecem nos seres humanos, conforme os estudos apresentados por Lewis e Botham (2013), no entanto, em alguns indivíduos com intensidade elevada do mesotrione, podem apresentar altos níveis de tirosina, porém de forma ou duração improvável de causar problemas de saúde.

Em microrganismos, o mesotrione pode elevar índices de estresse oxidativo (IMLAY, 2013; OLCANHESKI et al., 2014). No entanto, alguns microrganismos mesmo sob condições de estresse, são capazes de biodegradar herbicidas.

1.3 Biodegradação

O processo que envolve a ruptura completa de um composto orgânico nos seus constituintes inorgânicos por microrganismos é denominado biodegradação (ORTIZ-HERNÁNDEZ et al., 2013). Microrganismos capazes de biodegradar os contaminantes e transforma-los em compostos menos danosos ao ambiente ou até mesmo mineralizá-los, são alvos de estudos em sistemas biológicos de descontaminação ambiental em diversos países (MOHAMMED, 2009; RITMANN, JACSON; STORCK, 1988). A inoculação de microrganismos como uma alternativa de remediação biológica no tratamento de áreas contaminadas é denominado biorremediação (NITI et al., 2013).

De maneira geral, agrotóxicos proporcionam fontes adequadas de carbono e doadores de elétrons para determinados microrganismos do solo, e as três principais famílias de enzimas envolvidas na degradação são: esterases, glutathione S-transferases (GSTs) e citocromo P450 (ORTIZ-HERNÁNDEZ et al., 2013). O metabolismo destes microrganismos tem sido bastante estudado (OLCANHESKI et al., 2014; PILEGGI et al., 2012).

Já foi demonstrada a biodegradação do herbicida mesotrione por algumas linhagens bacterianas (BATISSON et al., 2009; PILEGGI et al., 2012; OLCCHANHESKI et al., 2014). Batisson et al. (2009) encontraram duas linhagens tolerantes ao mesotrione, *Bacillus* sp. 3B6 e *Arthrobacter* sp., porém, apenas a *Bacillus* sp. 3B6 conseguiu degradar o mesotrione e utilizar a molécula do herbicida como única fonte de carbono. Os produtos da degradação foram as moléculas de AMBA (ácido 2-amino-4-metil sulfonil benzóico) e MNBA (ácido 4- metil sulfonil - 2-nitrobenzóico) consideradas mais tóxicas que o composto original do mesotrione.

Pileggi et al. (2012) isolaram a bactéria *P. ananatis* CCT 7673 de água próxima a áreas com plantação de milho previamente tratada com Callisto®. Esta bactéria gram-negativa foi capaz de tolerar e degradar o mesotrione em 18 horas. No entanto, não foi capaz de utilizá-lo como fonte de carbono, sendo necessária a adição de glucose durante a degradação. Esta bactéria não conseguiu crescer em altas concentrações de Callisto® provavelmente devido aos efeitos dos adjuvantes presentes neste produto.

Para o mesotrione, ainda não foram relatados genes específicos de degradação, sendo sugerida um possível envolvimento de enzimas oxidativas como o citocromo P-450 e glutathione S-transferase nesse processo (GUENGERICH, 1995; DURAND et al., 2006; PILEGGI et al., 2012). De modo diferente ao observado para o herbicida atrazina, no qual, foram descobertos genes específicos de degradação (REHAN et al., 2014).

Olchanheski et al. (2014) demonstraram que o mesotrione é um agente que causa estresse oxidativo para *Escherichia coli* DH5-A, uma linhagem não ambiental, gram-negativa e que não teve o contato prévio com o herbicida, mas que conseguiu tolerar e degradá-lo em 3 horas de incubação. A enzima glutathione-S-transferase possivelmente foi ativada para metabolização desse herbicida. Houve uma diminuição de células viáveis antes da degradação no tratamento com mesotrione, sugerindo efeitos tóxicos deste herbicida nessa linhagem. Para dificultar a entrada da substância na célula e reduzir os danos causados por ERO, provavelmente houve um aumento na saturação de lipídeos de membrana. Assim, Olchanheski et al. (2014) sugeriu um sistema não específico de adaptação e resistência ao herbicida mesotrione por *E. coli* DH5-A.

1.4 Sistema de defesa contra estresse oxidativo

A cerca de 2,4 bilhões de anos atrás, o aumento da concentração de O_2 na atmosfera terrestre decorrente da fotossíntese de cianobactérias, promoveu alterações em vias metabólicas e/ou de defesa e tolerância ao oxigênio para sobrevivência de organismos (SESSIONS et al., 2009; RAYMOND; SEGRE, 2006). Isto porque o oxigênio molecular (O_2) é uma molécula pequena capaz de se difundir rapidamente pelas membranas biológicas e tornar-se uma molécula altamente reativa (IMLAY, 2013).

As moléculas estruturais, como aminoácidos, carboidratos, lipídios e ácidos nucléicos essencialmente não reagem com o O_2 molecular (IMLAY, 2013). No entanto, os radicais livres, derivados da ativação ou redução do O_2 na célula, chamados de espécies reativas de oxigênio (ERO) podem ocasionar danos oxidativos, capazes de provocar mutações no DNA, inativação de proteínas, diminuição do crescimento e morte celular (SETH et al., 2001; LIN et al., 2009).

Organismos aeróbios expostos ao O_2 geram ERO, no entanto, microrganismos aeróbios condicionados a estresses ambientais podem ter uma superprodução de espécies reativas de oxigênio (KONDA; PÁSZTOR, 2001). Deste modo, bactérias tolerantes ou degradadoras, quando expostas em ambientes com aplicação contínua de agrotóxicos podem gerar continuamente ERO a partir do seu metabolismo aeróbio (LIN et al., 2009).

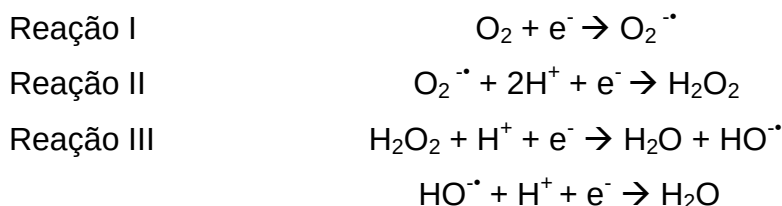
ERO, como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) são altamente reativos e gerados continuamente nas células cultivadas em condições aeróbias (CABISCOL et al., 2000). O desequilíbrio intracelular com o aumento de ERO para níveis que excedem a capacidade de defesa celular é denominado estresse oxidativo (LUSHCHAK, 2011).

Para minimizar o estresse oxidativo, os organismos aeróbios desenvolveram mecanismos capazes de combater a produção de ERO, denominado sistema antioxidante de defesa, o qual pode ser separado em não enzimático e enzimático.

As defesas não enzimáticas incluem compostos com propriedade intrínseca antioxidante, como o β -caroteno, α -tocoferol (vitamina E), glutatona reduzida (GSH) e ácido ascórbico, NADPH e NADH, que são moléculas que ajudam a manter o ambiente redutor. Já os mecanismos enzimáticos envolvem a superóxido dismutase

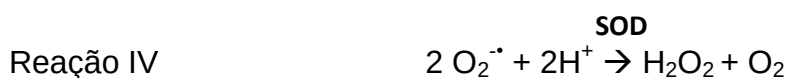
(SOD), catalase (CAT), peroxidases, glutathione redutase (GR), entre outras enzimas (SCANDALIOS, 2005).

Quando O_2 é reduzido em quatro etapas sequenciais de um elétron, os intermediários formados são as três principais ERO, isto é, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e $HO^{\cdot}$, reações I a III respectivamente (SHEN et al., 2014):

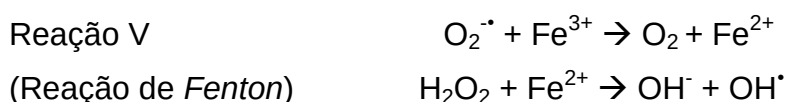


1.4.1 Superóxido dismutase

As enzimas superóxido dismutase (SOD) são metaloenzimas redox-ativas responsáveis pela desintoxicação intracelular do anion $O_2^{\cdot-}$ por meio de reação (Reação IV) de dismutação gerando O_2 e H_2O_2 (SHEN et al., 2014):



Sem a presença de SOD, o radical $O_2^{\cdot-}$ pode reduzir o íon de Fe^{3+} para Fe^{2+} que reage com H_2O_2 para produzir o íon hidróxido (OH^-) e radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), processo conhecido como reação de Fenton (Reação V) (LEMIRE et. al, 2013):



$OH^{\cdot}$ é altamente reativo e pode danificar com maior rapidez proteínas, lipídios, DNA ou polissacarídeos do que outras espécies como $O_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 (STADTMAN; LEVINE, 2003). Desta forma, estudos demonstram que a atividade elevada de SOD é necessária para evitar danos enzimáticos e também garantir o crescimento celular, uma vez que essa enzima é a única capaz de controlar a concentração dos dois substratos para a reação de Fenton (Reação V), que origina o radical $OH^{\cdot}$ (GORT; IMLAY, 1998; RYAN et al., 2010).

Devido a grande importância da SOD, essa enzima já foi encontrada tanto no citoplasma, quanto no espaço periplasmático, e em membranas em diversos organismos (IMLAY, 2013). Podendo ser SOD classificadas de acordo com os

centros metálicos localizados no seu sítio ativo: Manganês (Mn-SOD), Ferro (Fe-SOD), Cobre/Zinco (Cu/Zn-SOD) e Níquel (Ni-SOD).

Em bactérias a Cu/Zn-SOD está localizada no espaço periplasmático de bactérias gram-negativas e é sintetizada geralmente quando as células entram na fase estacionária, sendo responsável pela desintoxicação de peróxido exógeno (BENOV; FRIDOVICH, 1994). As isozimas de Fe-SOD e Mn-SOD, encontradas no citoplasma, são reguladas em resposta a níveis de ferro (IMLAY, 2013).

E. coli e *Mycobacterium tuberculosis* apresentam as três isoenzimas Mn-SOD, Fe-SOD e Cu-Zn/SOD que estão associadas com a desintoxicação de ERO (IMLAY, 2013). A Ni-SOD têm sido encontrada em algumas linhagens de *Streptomyces* sp. (LECLERE, BOIRON, BLONDEAU, 1999). Em *Bacillus cereus* foram encontradas as isoformas Cu-Zn/SOD, Mn-SOD e Fe-SOD, sendo que, a Mn-SOD é essencial para a resistência ao stress oxidativo em células em crescimento e esporulação em *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* (INAOKA et al., 1999; WANG et al., 2011).

1.4.2 Catalase

O principal produto da atividade SOD é a espécie H_2O_2 (Reação IV) que é capaz de se difundir pelas membranas biológicas (IMLAY, 2003). O H_2O_2 também pode reagir e oxidar proteínas que apresentam resíduos de metionina e cisteína, ou grupos tiol muito reativos, transpor membranas e gerar o radical hidroxila, demonstrando toxicidade ao ambiente celular (IMLAY, 2013; BARREIROS et al., 2006; CABISCOL et al., 2000).

O H_2O_2 pode ser removido por peroxidases e pela atividade da enzima catalase (CAT), que converte duas moléculas de H_2O_2 em duas moléculas de H_2O e O_2 , conforme a reação VI (CABISCOL et al., 2000):



A CAT pode atuar como peroxidativas ou catalíticas. Em baixas concentrações, ela atua como peroxidativa, e em altas concentrações atua catalizando a decomposição do H_2O_2 produzindo H_2O e O_2 (SCANDALIOS, 2005). No entanto, geralmente as catalases são induzidas quando os níveis de H_2O_2 estão elevados ou quando as células estão com falta de nutrientes, isso porque

peroxidases, como a alquil hidroperoxido redutase (Ahp), podem degradar o H_2O_2 rapidamente apenas quando há disponibilidade de NADH como o redutor estequiométrico e quando a concentração de H_2O_2 intracelular é menor que $20\mu\text{M}$ (IMLAY, 2013).

Bactérias gram-negativas, como *E. coli* apresentam dois sistemas agrupados em dois regulons: o *SoxRS* e o *OxyR*. O *SoxRS* responde ao estresse induzido pelo ânion superóxido, enquanto que o *OxyR* é induzido por H_2O_2 . Já bactérias gram-positivas, como *Bacillus subtilis*, apresentam um mecanismo análogo à *OxyR*, o regulador de resistência a peróxido (PerR), que é o principal regulador da resposta ao estresse provocado por peróxido de hidrogênio (DUARTE; LATOUR, 2010; FAULKNER, 2012).

Em *Bacillus subtilis*, a proteína PerR foi identificada como Fur (regulador de captura de ferro). A proteína PerR está ativa como um repressor da transcrição quando se liga a um único átomo de ferro. Em exposição ao H_2O_2 , o átomo de ferro é oxidado em uma reação direta de Fenton (Reação V), gerando um radical ferril e/ou radical hidroxila. A oxidação do íon ferro provavelmente facilita a dissociação do metal da proteína. Assim, a metaloproteína Fur sem a ligação ao ferro perde a capacidade de ligação ao DNA, permitindo a indução da expressão dos genes cuja transcrição é normalmente bloqueada. Os genes induzidos codificam proteínas “scavengers” de peróxido de hidrogênio e outras enzimas de defesa em bactérias. Em *B. subtilis*, pode-se ter a codificação de Ahp e diferentes CAT (IMLAY, 2008).

1.5 Alterações de lipídios de membrana e peroxidação lipídica

Os radicais livres provenientes do estresse oxidativo podem atacar diretamente ácidos graxos poliinsaturados nas membranas e iniciar o processo de peroxidação lipídica. Assim, os ácidos graxos são degradados em diversos produtos, como aldeídos, capazes de danificar proteínas. Os indicadores de peroxidação lipídica mais estudados em bactérias e plantas são o malonaldeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (HNE) (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990).

Para se proteger e evitar danos oxidativos causados por ERO, as bactérias podem alterar a saturação e permeabilidade seletiva da membrana celular. O ajuste na composição e estrutura de lipídios de membrana pode diminuir o gasto de

energia e dificultar a entrada de xenobióticos na célula e otimizar o crescimento celular (OLCHANHESKI et al., 2014; ZHANG, ROCK, 2008; BALAGUÉ et al., 2001).

Além disso, bactérias podem modificar a saturação e fluidez da membrana para se adaptar as alterações de fase de crescimento (BAKHOLDINA et al., 2001). Olchaneski et al. (2014) verificaram que a presença de mesotrione induziu modificações de lipídios de membrana em *E. coli* DH5- α . Dados semelhantes foram identificados com outra linhagem de *E. coli* expostas ao herbicida 2,4-diclorofenoxiacético ao reduzirem a fluidez da membrana para suportar danos químicos, pois assim como as interações lípidio-proteína, os processos de transporte de moléculas também podem diminuir (BALAGUE et al., 2001).

2. OBJETIVO

Esse trabalho teve como objetivo analisar o sistema de respostas ao estresse oxidativo decorrente da exposição ao Callisto® e ao seu princípio ativo mesotrione, de linhagens bacterianas provenientes de diferentes ambientes.

2.1 Objetivos específicos:

- Analisar as estratégias de crescimento e tolerância ao Callisto® de linhagens bacterianas isoladas de ambientes diferentes, água e solo;
- Verificar a capacidade de degradação e os metabólitos produzidos a partir do mesotrione pelas linhagens isoladas;
- Identificar a formação de ERO decorrentes da exposição ao Callisto® e mesotrione;
- Analisar o sistema enzimático de respostas das linhagens bacterianas ao estresse oxidativo, por meio da atividade SOD e CAT;
- Verificar modificações de membrana celular das linhagens bacterianas após a exposição ao Callisto® e mesotrione.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Herbicidas

Para ensaios com meio de cultivo, foram utilizado o mesotrione – Fig. 2, e o seu produto comercial Callisto[®], ambos com a concentração do princípio ativo de 0,04 mM, correspondente a dose de aplicação em campo. Este último é composto por 48% de mesotrione e outros adjuvantes, dentre eles, encontram-se o 1-Octanol, o Poli (oxi-1-2-etanodiol) e o Alpha-isodecil-omega-hidroxi-fosfato (JOLY, 2013). O mesotrione foi fornecido pela Syngenta Crop Protection, Greensboro, NC (USA). As análises em CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência) e LC–MS/MS (cromatografia líquida acoplada e espectrometria de massas) foram realizadas utilizando o padrão analítico da Pestanal (Sigma/Aldrich).

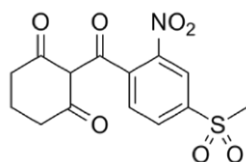


Figura 2: Molécula do mesotrione

3.2 Isolamento de bactérias tolerantes ao mesotrione e Callisto[®]

Um dia antes da coleta de amostras, uma plantação de milho (que tinha vários anos de aplicação de herbicidas) foi pulverizada com Callisto[®]. Amostras de solo dessa plantação de milho e amostras de água de um açude próximo a essa plantação, foram coletadas na fazenda Capão do Cipó (Estação Experimental da Fundação ABC Pesquisa para Assistência e Divulgação Técnica Agropecuária - S-24°51'28".7 O-49°55'57".7), Castro, Paraná, Brasil. Essas amostras foram diluídas em série com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e incubadas a 30°C em Luria Broth (LB- composição em g L⁻¹: 10g de triptona, 5g de extrato de levedura e 10g de NaCl) com ágar (LB com ágar). Os isolados foram avaliados em placa nos seguintes meios: meio mineral com mesotrione (MMM) com 0,04 mM de mesotrione (composto por 10 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,0, e os seguintes elementos, em g L⁻¹: 3 g NaNO₃; 0,5g MgSO₄; 0,5g KCl; 0,01g FeSO₄; 0,04g CaCl₂; 0,001g MnSO₄ e 20g de glucose) e meio mineral com Callisto[®], MMC, com dose equivalente a 0,04 mM de mesotrione). As linhagens que apresentaram uma alta capacidade de

tolerância em MMM e MMC foram selecionadas para análises de degradação em CLAE.

3.3 Condições de cultura para análises enzimáticas e de degradação

Os isolados com alta tolerância ao mesotrione (item 4.3.2) foram crescidos em 1800 mL de LB em shaker a 30 °C e 120 rpm. Após 24h de incubação, as células foram centrifugadas a 10.000 *g* em 4°C por 5 min e lavadas duas vezes com solução tampão de fosfato - PBS (composto em g L⁻¹ por: 8,00 g NaCl; 0,20 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄ e 0,24 g KH₂PO₄). Assim, o precipitado foi ressuspensionado em 9 mL de MM e dividido entre os tratamentos em triplicata: MM, MMM e MMC, sendo submetidos nas mesmas condições de incubação descritas nesta seção.

3.4 Caracterização da degradação do mesotrione

Nos períodos de 0 h, 3 h e 14 h, alíquotas do tratamento MMM foram coletadas e centrifugadas a 13.000 *g* durante 5 min. O sobrenadante foi retirado e filtrado em membranas de 0,22 µm de porosidade, para posteriores análises de degradação do mesotrione em CLAE.

Utilizou-se a coluna Nucleodur C18 Gravity, com diâmetro interno de 4,6 mm X 150 mm de comprimento e 5 µm de tamanho de partícula em CLAE (Waters Alliance e2695) com detector de arranjo foto-diodo (DAD) no comprimento de onda de 254 nm.

A condição de corrida foi realizada conforme Olchanheski et al. (2014), a partir da injeção de 50 µL de amostra a um fluxo de 1 mL/min e temperatura de 20°C. A corrida iniciou-se com 70% de água acidificada contendo 0.1% ácido fórmico (A) e 30% de acetonitrila (B), passando para 30% B em 3 min.; 55% B em 15 min.; 100% B em 17 min.; mantendo-se em 100% B em 18 min.; retornando a 30% B em 19 min e permanecendo a 30% B em 29 min, para condicionar a coluna para nova injeção.

Os dados cromatográficos foram determinados plotando as absorbâncias obtidas para as amostras analisadas na equação de reta $y = 3^{07} * x + 110496$, método validado por Olchanheski (2014) para o herbicida mesotrione, que apresenta coeficientes de variação menores que 5% e exatidão entre 90 e 110% para as

replicatas das amostras, sendo os limites de detecção e quantificação respectivamente igual a 9,825 μM e 0,3 μM .

3.5 Identificação dos metabólitos da degradação do mesotrione

Para análises dos metabólitos da degradação do mesotrione por CL-EM/EM, utilizou-se o Esquire 6000 (ESI-Ion Trap MSn System). A condição cromatográfica de corrida foi realizada com ácido fórmico 0,1% (A) e acetonitrila (B), seguindo o gradiente: 0 min – 5%(B); 5 min – 5%(B); 18 min – 26,5%(B), 25min – 65%(B), 25,1 min. – 95%(B); 29 min – 95%(B); 29,1 min – 5%(B); 44 min – 5%(B).

Os extratos das amostras foram tratadas com ácido fórmico e passados através de um cartucho de extração em fase sólida (SPE) HLB da Waters, previamente condicionado. A fragmentação das moléculas ocorreu por meio de um feixe de “*electrospray*” (fonte ESI), conforme as seguintes condições do espectrômetro de massas: modo de varredura de 50 a 400m/z, nebulizador 30 psi, gás 6 L/min. e temperatura da fonte a 300 °C. Os parâmetros de configurações utilizados para detecção dos íons moleculares foram 338 m/z (modo negativo) e 340 m/z (modo positivo).

3.6 Extração de proteínas

Proteínas dos isolados selecionados para estudo foram extraídas no período de crescimento compatível ao início e ao final da degradação do mesotrione.

Assim, as células bactérias crescidas (seção 3.3) após o tempo de incubação de 3 e 14h, foram centrifugadas a 8.000 *g* durante 15 min. O precipitado foi macerado com nitrogênio líquido e homogeneizado na proporção 1:10 m/v com tampão de fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5 (em g L⁻¹: 14,520 K₂HPO₄; 2,260 KH₂PO₄; 0,372 EDTA; 0,462 DL- dithiothreitol e 5% (w/w) polivinil polipirrolidone-PVPP (10:1 volume do tampão:peso da amostra) (GOMES-JUNIOR et al., 2007). As amostras foram mantidas a 4°C e centrifugadas a 10.000 *g* por 30 min., e o sobrenadante armazenado a -80°C. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA (“bovine serum albumin”) como padrão.

3.7 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada em espectrofotômetro a 535 e 600 nm por meio da quantificação da produção de malondialdeído (MDA), um metabólito reativo ao ácido 2-tiobarbitúrico (método adaptado de Heath e Packer, 1968). Assim, 250 μ L de amostra (100 mg de extrato proteico homogeneizadas com 1 mL de TCA 0,1% e centrifugadas a 10.000 g por 15 min a 4°C), juntamente com 200 μ L de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) e 1 mL de TCA 20% + TBA 0,1% foram mantidas por 30 min em banho-maria a 97°C. Posteriormente, as amostras permaneceram por 10 min em gelo antes de serem centrifugadas a 10.000 g por 10 min e, o sobrenadante ser lido em espectrofotômetro.

3.8 Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio foi quantificado em espectrofotômetro a 390 nm por meio da liberação de iodo, proveniente da reação com 200 μ L de amostra (100 mg de extrato proteico (seção 3.6) homogeneizadas com 1 mL de TCA 0,1% e centrifugadas a 10.000 g por 15 min a 4°C), 200 μ L de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) e 800 μ L de Iodeto de potássio 1M, mantida por 1 h em gelo, na ausência de luz.

3.9 Atividade de SOD em PAGE não desnaturante

Para verificar o perfil da atividade SOD e as isoformas SOD, realizou-se a corrida em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE não-desnaturante a 12%), por meio de 20 μ g de extrato proteico (seção 3.6) de cada tratamento dos horários 3 h e 14 h. Durante a corrida a 4°C, uma corrente constante de 15 mA gel^{-1} foi aplicada durante 3 horas. Ao final da corrida, os géis foram lavados com água deionizada e incubados no escuro, na temperatura ambiente, em uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8, 1 mM EDTA, 0,05 mM riboflavina, 0,1 mM nitroazul tetrazólio (NBT) e 0,3% TEMED. Ao final de 30 min, a mistura de reação foi descartada, os géis lavados com água deionizada e colocados sob iluminação até o aparecimento de bandas (CIA et al., 2012).

3.10 Determinação das isoenzimas de SOD

As isoformas SOD foram avaliadas a partir de PAGE não desnaturante (12%). Antes da coloração, o gel foi dividido verticalmente em três partes. A primeira foi mantida em uma solução de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8; a segunda foi colocada em 100 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM contendo KCN 2 mM e EDTA 1 mM; a terceira parte foi imersa em 100 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM com 5 mM de H₂O₂ e EDTA 1 mM. Esses procedimentos foram realizados na ausência de luz.

As isoformas foram classificadas como Mn-SOD, se resistente a ambos inibidores (KCN e H₂O₂); Fe-SOD se resistente ao KCN e inibida por H₂O₂ e Cu/Zn-SOD se inibida por ambos inibidores, conforme Azevedo et al., 1998.

3.11 Atividade da Catalase

A atividade CAT foi avaliada durante 1 min em espectrofotômetro a 240 nm por meio da decomposição de H₂O₂, a qual foi iniciada com 25 µL de extrato proteico (seção 3.6). A solução para decomposição de H₂O₂ foi composta por 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 2,5 µL de solução de peróxido de hidrogênio 25% (Kraus et al., 1995).

3.12 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA

As amostras foram inoculadas em meio líquido LB e incubadas a 30°C graus, sob agitação de 120 rpm até a fase exponencial de crescimento. O cultivo foi utilizado para extração do DNA total, segundo metodologia descrita por Menna et al. (2006).

O DNA de cada estirpe foi utilizado para amplificação do gene 16S rRNA, utilizando os iniciadores universais fD1 e rD1 (Weisburg et al., 1991). A reação consistiu em um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, 93°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos; um ciclo final de extensão por 5 minutos. Os produtos de PCR foram purificados, utilizando o kit MinElute®.

Para a obtenção da sequência do gene 16S rRNA, 4 reações de PCR foram realizadas utilizando os iniciadores Y1 (5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3'), Y2 (5' – CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT – 3'), 362f (5' –

CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG – 3') e 786f (5'-CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG – 3') (Menna et al., 2006). Cada reação consistiu de 80ng do produto de PCR, 1,3 µL de BiyDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems), 2,5 µL de tampão (Applied Biosystems), para um volume final de 20 µL. O mesmo programa foi utilizado para todos os iniciadores, consistindo de ciclo inicial de desnaturação a 96 °C por 1 minuto; 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 15 segundos, anelamento a 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos.

Após amplificação, as amostras foram manualmente purificadas, segundo metodologia descrita por Menna et al. (2006). As amostras foram resuspendidas em 10 µL de formamida, desnaturadas a 95°C por 5 minutos e submetida a sequenciamento em um ABI 3500xl Genetic Analyser (Applied Biosystems).

Sequências parciais do gene 16S rRNA, de alta qualidade, para cada estirpe foram geradas e analisadas utilizando os programas Phred (Ewing et al., 1998a), Phrad (Ewing et al., 1998b) e Consed (Gordon et al., 1998). As sequências foram depositadas no banco de dados Genbank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.13 Curva de crescimento bacteriano

As linhagens selecionadas foram crescidas em LB a 30°C durante 12 h. As células foram centrifugadas a 8.000 g por 5 min. a 4°C e o precipitado foi lavado duas vezes com tampão PBS e inoculadas nos tratamentos em triplicatas: MM (controle), MMM e MMC. Inóculos foram padronizados para iniciar em densidade ótica (DO) de 0,05 de absorbância (abs). O crescimento bacteriano foi monitorado em espectrofotômetro a 600 nm. Para manter a acurácia das leituras, o material foi diluído sempre que a DO ultrapassasse valores de 0,6 de abs. Os valores obtidos foram multiplicados pelos fatores de diluição correspondentes.

3.14 Viabilidade celular

As bactérias em suspensão (sessão 3.13) foram diluídas em solução salina 0,9% e homogeneizadas. A diluição foi de 10⁻⁵ em todos os tratamentos em 3 h e 10⁻¹⁰ para MM e MMM em 14 h. O tratamento MMC foi diluído em 10⁻⁴ e 10⁻⁶ no período de 14 h. Após a diluição, alíquotas de 100 µL foram plaqueadas em triplicata

em LA e incubadas a 30°C por 24 h, realizando-se a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

3.15 Modificações de lipídios de membrana celular

O material, obtido conforme a seção 4.3.3, foi centrifugado por 5 min a 10.000 g a 4 °C e, o precipitado foi congelado a -80 °C. As amostras foram liofilizadas por 15 h e após esse período, foi acrescentado 4 mL de hexano e mantidas por 48 h sob agitação em 60 rpm. A cada 24 horas, retirou-se o sobrenadante e extraiu-se o extrato lipídico por meio da evaporação do hexano. Acrescentou-se novamente 4 mL de hexano nas amostras e deixou-se sob agitação por mais 24 h para obter-se o extrato lipídico total. Ao final de cada 24 h o hexano foi evaporado e o extrato lipídico retirado. Os lipídios de membrana foram analisados em infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), nos comprimentos de onda de 400 a 4000 cm⁻¹, utilizando 100 mg de brometo de potássio (KBr) e 1 mg de extrato lipídico para montagem da pastilha a ser inserida no equipamento.

Os resultados das análises de lipídios foram submetidos à análise multivariada de componentes principais (PCA), utilizando 1 milhão de variáveis no programa Pirouette v. 4.0 (Infometrix, Bothell, WA, EUA), para separar os dados de acordo com o grau de similaridade.

3.16 Análise estatística

Análises estatísticas foram realizadas por meio do software R versão 3.0.1, seguindo o método de Duncan para comparar as variáveis entre os tratamentos no mesmo horário (representados por letras minúsculas) e entre horários em um mesmo tratamento (representados por letras maiúsculas) nos ensaios de curva de crescimento, viabilidade celular, quantificação de peróxido de hidrogênio, MDA e atividade CAT. As estatísticas foram realizadas com três repetições de cada tratamento totalmente aleatórias e o critério de significância utilizado foi $p \geq 0,05$.

Letras diferentes entre tratamentos no mesmo horário ou entre horários em um mesmo tratamento indicam que houve diferenças significativas, sendo o grau de representatividade de uma amostra classificado conforme $A/a > B/b > C/c$. Uma amostra com a letra AB (ab) (ou AC (ac) ou BC (bc)) significa que esta não é diferente entre o tratamento que apresenta letra A nem da que contém a letra B.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sistema de respostas de *Bacillus* sp. à toxicidade induzida pelo herbicida

Callisto® e princípio ativo

Responses system of *Bacillus* sp. to the induced toxicity caused by Callisto® herbicide and its active ingredient

Resumo

O uso intenso de herbicidas para controle de ervas daninhas na agricultura provoca uma pressão seletiva na microbiota do solo e de águas próximas à área de aplicação, alterando o equilíbrio ambiental. Alguns microrganismos apresentam vias metabólicas de degradação desses xenobióticos, entretanto, a tolerância e os processos de degradação podem gerar radicais livres capazes de afetar a sobrevivência. Este trabalho teve como objetivo analisar o sistema de respostas de linhagens provenientes de solo e água, e que foram submetidas a pressão seletiva pelo herbicida Callisto®. Uma linhagem isolada de cada um destes ambientes, identificadas respectivamente, como *Bacillus* sp. CCT7729 e *Bacillus* sp. CCT7730, apresentaram rotas de degradação diferenciadas, com metabólitos diferentes dos já descritos na literatura. O mesotrione, seus metabólitos, e principalmente o Callisto®, afetaram a viabilidade celular das linhagens deste estudo e alteraram os lipídios de membrana celular, no entanto, *Bacillus* sp. CCT7729 apresentou um sistema de respostas ao estresse oxidativo mais eficiente. Esta linhagem exibiu uma maior eficiência em degradar o mesotrione, menores taxas de peróxido, menores taxas de MDA, atividade SOD elevada e uma baixa atividade da catalase, ao contrário de *Bacillus* sp. CCT7730. Modificações nos lipídios de membrana podem ser consideradas como uma estratégia de defesa contra estresse oxidativo. Os resultados também indicaram uma diversidade de vias metabólicas nas duas linhagens de *Bacillus* sp. para a degradação do mesotrione. Provavelmente os metabólitos induziram diferentes níveis de toxicidade nas bactérias, sendo que *Bacillus* sp. CCT7730 possivelmente degradou o mesotrione em compostos ainda nocivos, ao contrário da linhagem de água. É possível que essas diferentes respostas estejam relacionadas com os ambientes de origem de cada linhagem, sugerindo uma plasticidade de respostas apresentadas por linhagens *Bacillus* sp. para adaptação a substâncias tóxicas em diferentes contextos ambientais.

Palavras-chave: Catalase, Degradação, Estresse oxidativo, Peroxidação lipídica, Peróxido de hidrogênio, Rotas metabólicas, Superóxido dismutase.

Abstract

Excessive use of herbicides for weed control in agriculture causes a selective pressure on soil microbiota and waters near application area, changing environmental balance. Some microorganisms have developed metabolic pathways for degradation of these xenobiotics, although tolerance and degradation processes can generate free radicals and affect survival. This study aimed to analyze the system of responses from soil and water strains, submitted to selective pressure by the herbicide Callisto®. Strains CCT7729 and CCT7730, isolated from soil and water, respectively, were identified as *Bacillus* sp., and showed different degradation routes, with different metabolites, already described in the literature. Mesotrione and its metabolites, and especially its commercial product Callisto®, affected cell viability and altered cell membrane lipids from the tested strains, however, *Bacillus* sp. CCT7729 presented a more efficient system of responses to oxidative stress. This strain exhibited a greater efficiency to degrade mesotrione, lower rates of peroxide, lower rates of MDA, SOD high activity and low activity of catalase, when compared to *Bacillus* sp. CCT7730. Changes in membrane lipids can be considered as a defense against oxidative stress strategy. These results indicated the existence from a variety of metabolic pathways for mesotrione degradation to *Bacillus* sp. Probably metabolites induce different levels of toxicity in bacteria, and *Bacillus* sp. CCT7730 possibly degraded mesotrione in even harmful compounds, unlike the water line. It is possible that these different responses are related to the home environments of each strain, suggesting plasticity responses of *Bacillus* sp. for adaptation to toxic substances in different environmental contexts.

Keywords: Catalase, Degradation, Oxidative stress, Lipid peroxidation, Hydrogen peroxide, Metabolic pathways, Superoxide dismutase.

4.2 INTRODUÇÃO

Os últimos anos da agricultura têm sido marcados pela ampliação da produção agrícola acrescido de contaminação ambiental com o intenso uso de agrotóxicos (NITI et al., 2013). Cerca de 90% dos agrotóxicos aplicados em campo não alcançam seus alvos, pelo contrário, são lixiviados e podem permanecer no ar, solo e água, contaminando os ecossistemas (ORTIZ-HERNÁNDEZ et al., 2011). Estima-se que 6,3% do total de emissão volátil no ambiente deve-se ao uso intenso de agrotóxicos (NITI et al., 2013) e 42,48% dos químicos aplicados na agricultura são herbicidas (MATTHEWS; BATEMAN; MILLER, 2014).

Herbicidas, utilizados para o controle de ervas daninhas, causam uma forte pressão de seleção na microbiota do solo e da água, alterando sua diversidade e riqueza (BOTELHO et al., 2012; MARINOZZI et al., 2013), fundamentais para manter o fluxo de energia e os processos biogeoquímicos naturais, como a decomposição

da matéria orgânica, a ciclagem de nutrientes, fixação de nitrogênio e outros elementos essenciais e até mesmo a degradação de xenobióticos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

Em ambientes com aplicação contínua de herbicidas, há relatos sobre microrganismos com capacidade de desenvolver-se rapidamente e biotransformar esses compostos (EL-FANTROUSSI, 2000; ELSAYED, 2014; HOU, 2014). Herbicidas são formados por grupos funcionais que podem servir como fonte de carbono, ou, apresentam grupos capazes de atuarem como doadores de elétrons (ORTIZ-HERNÁNDEZ, et al., 2011), oferecendo alternativas para o tratamento de áreas contaminadas, como a biorremediação (SEEGER et al., 2010; HERNÁNDEZ et al., 2012).

No entanto, os microrganismos tolerantes e/ou degradadores expostos a herbicidas podem apresentar diferentes respostas metabólicas, como o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (MARTINS et al., 2011; PETERS et al., 2014).

As ERO, como o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-), são gerados continuamente nas células cultivadas em condições aeróbias (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000). Em contato com xenobióticos, tais como herbicidas, esses radicais podem desencadear um desequilíbrio redox intracelular com a elevação de ERO para níveis que excedem a capacidade de defesa celular, caracterizando o estresse oxidativo (LUSHCHAK, 2011). Os danos oxidativos podem provocar mutações no DNA, inativação e desnaturação de proteínas, peroxidação lipídica, diminuição do crescimento e morte celular (SETH; BANERJEE; CHAKRAVORTY, 2001; LIN et al., 2009).

Para minimizar os efeitos danosos resultantes da ação dessas espécies reativas, os organismos aeróbios desenvolveram mecanismos capazes de combater a produção de ERO, denominado sistema antioxidante de defesa, comumente separado em não-enzimático e enzimático (SCANDALIOS, 2005).

As defesas não-enzimáticas incluem compostos com propriedade intrínseca antioxidante, como o β -caroteno, α -tocoferol (vitamina E), glutatona reduzida (GSH) e ácido ascórbico, NADPH e NADH, moléculas que ajudam a manter o ambiente redutor. Já os mecanismos enzimáticos envolvem a ação das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidases, glutatona redutase (GR), entre outras (SCANDALIOS, 2005).

Dentre os mecanismos enzimáticos de defesa desenvolvidos pelos organismos aeróbios, a SOD é responsável pela primeira etapa de desintoxicação celular, atuando no processo de dismutação do radical superóxido (O_2^-) e gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (SCANDALIOS, 2005; SHEN et al., 2014). O peróxido de hidrogênio pode se difundir no ambiente celular e causar danos, a redução do H_2O_2 é mediada pela atividade das catalases e peroxidases (tais como alquilo hidroperóxido redutase (Ahp)), a CAT converte o H_2O_2 em O_2 e H_2O (ZAMOCKY; FURTMÜLLER; OBINGER, 2008; IMLAY, 2013). Estas respostas de defesa celular são importantes para a adaptação bacteriana e sobrevivência ao estresse oxidativo causado por herbicidas e outros xenobióticos (BUČKOVÁ et al., 2010).

O mesotrione {2 - (4-metilsulfonil-2-nitrobenzoil) -1,3-ciclohexanodione} pertence ao grupo das tricetonas e é o princípio ativo do herbicida comercial Callisto® (Syngenta®). Este herbicida é utilizado no controle pré e pós-emergente de ervas daninhas de folha larga em culturas de milho. O mecanismo de ação dessa substância ocorre com a inibição da enzima 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenase, a HPPD, envolvida na biossíntese de carotenóides em plantas.

Até o momento, apenas alguns estudos relatam a biodegradação do mesotrione (BATTISSON et al., 2009; PILEGGI et al., 2012) e poucos foram feitos em relação a geração de espécies reativas de oxigênio e os danos causados pelo mesotrione e Callisto® em bactérias (OLCHANESKI et al., 2014). Os metabólitos da degradação do mesotrione por *Bacillus* sp. 3B6, encontrados por Batisson et al. (2009) foram considerados de elevada toxicidade em relação à molécula original. No entanto, essa linhagem degradou esse herbicida para possivelmente utilizá-lo como fonte de carbono. Já em *Pantoea ananatis* CCT 7673, esta utilização não deve ter ocorrido, sendo que a degradação do mesotrione ocorreu como uma estratégia para evitar a inibição da síntese de caroteno (PILEGGI et al., 2012).

Como a aplicação de herbicidas sofre processos de dispersão, e atinge diversos ecossistemas terrestres e aquáticos, a microbiota do solo e água podem sofrer pressão seletiva em contato com esses xenobióticos e gerar ERO (RELYEA, 2005; ORTIZ-HERNÁNDEZ, et al., 2011; BOTELHO et al., 2012; MARINOZZI et al., 2013). A investigação sobre as adaptações e os sistemas de respostas de microrganismos expostos a herbicidas e tentar correlacionar estes processos com a diversidade biológica de microbiotas de solo e água, são passos importantes para se

levantar modelos de estudos em biorremediação como medida mitigadora nos problemas decorrentes do uso irracional de agrotóxicos. Esse trabalho teve como objetivo analisar o sistema de respostas adaptativas ao estresse oxidativo decorrente da exposição ao herbicida Callisto® e ao seu princípio ativo mesotrione, em linhagens filogeneticamente correlacionadas provenientes de solo e água.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Herbicidas

Para ensaios com meio de cultivo, foram utilizado o mesotrione – Fig. 3, e o seu produto comercial Callisto®, ambos com a concentração do princípio ativo de 0,04 mM, correspondente a dose de aplicação em campo. Este último é composto por 48% de mesotrione e outros adjuvantes, dentre eles, encontram-se o 1-Octanol, o Poli (oxi-1-2-etanodiol) e o Alpha-isodecil-omega-hidroxi-fosfato (JOLY, 2013). O mesotrione foi fornecido pela Syngenta Crop Protection, Greensboro, NC (USA). As análises em CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência) e LC–MS/MS (cromatografia líquida acoplada e espectrometria de massas) foram realizadas utilizando o padrão analítico da Pestanal (Sigma/Aldrich).

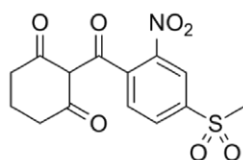


Figura 3: Molécula do mesotrione

4.3.2 Isolamento de bactérias tolerantes ao mesotrione e Callisto®

Um dia antes da coleta de amostras, uma plantação de milho (que tinha vários anos de aplicação de herbicidas) foi pulverizada com Callisto®. Amostras de solo dessa plantação de milho e amostras de água de um açude próximo a essa plantação, foram coletadas na fazenda Capão do Cipó (Estação Experimental da Fundação ABC Pesquisa para Assistência e Divulgação Técnica Agropecuária - S-24°51'28".7 O-49°55'57".7), Castro, Paraná, Brasil. Essas amostras foram diluídas em série com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e incubadas a 30 °C em Luria Broth (LB - composição em g L⁻¹: 10g de triptona, 5g de extrato de levedura e 10g de

NaCl) com ágar (LB com ágar). Os isolados foram avaliados em placa nos seguintes meios: meio mineral com mesotrione, MMM, com 0,04 mM de mesotrione (composto por 10 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,0, e os seguintes elementos, em g L⁻¹: 3 g NaNO₃; 0,5g MgSO₄; 0,5g KCl; 0,01g FeSO₄; 0,04g CaCl₂; 0,001g MnSO₄ e 20g de glucose) e meio mineral com Callisto[®], MMC, com dose equivalente a 0,04 mM de mesotrione). As linhagens que apresentaram uma alta capacidade de tolerância em MMM e MMC foram selecionadas para análises de degradação em CLAE.

4.3.3 Condições de cultura para análises enzimáticas e de degradação

Os isolados com alta tolerância ao mesotrione (item 4.3.2) foram crescidos em 1800 mL de LB em shaker a 30 °C e 120 rpm. Após 24h de incubação, as células foram centrifugadas a 10.000 g em 4 °C por 5 min e lavadas duas vezes com solução tampão de fosfato - PBS (composto em g L⁻¹ por: 8,00g NaCl; 0,20 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄ e 0,24 g KH₂PO₄). Assim, o precipitado foi ressuspensionado em 9 mL de MM e dividido entre os tratamentos em triplicata: MM, MMM e MMC, sendo submetidos nas mesmas condições de incubação descritas nesta seção.

4.3.4 Caracterização da degradação do mesotrione

Nos períodos de 0 h, 3 h e 14 h, alíquotas do tratamento MMM foram coletadas e centrifugadas a 13.000 g durante 5 min. O sobrenadante foi retirado e filtrado em membranas de 0,22 µm de porosidade, para posteriores análises de degradação do mesotrione em CLAE.

Utilizou-se a coluna Nucleodur C18 Gravity, com diâmetro interno de 4,6 mm X 150 mm de comprimento e 5 µm de tamanho de partícula em CLAE (Waters Alliance e2695) com detector de arranjo foto-diodo (DAD) no comprimento de onda de 254 nm.

A condição de corrida foi realizada conforme Olchanheski et al. (2014), a partir da injeção de 50 µL de amostra a um fluxo de 1 mL/min e temperatura de 20°C. A corrida iniciou-se com 70% de água acidificada contendo 0.1% ácido fórmico (A) e 30% de acetonitrila (B), passando para 30% B em 3 min.; 55% B em 15 min.; 100% B em 17 min.; mantendo-se em 100% B em 18 min.; retornando a 30% B em

19 min e permanecendo a 30% B em 29 min, para condicionar a coluna para nova injeção.

Os dados cromatográficos foram determinados plotando as absorbâncias obtidas para as amostras analisadas na equação de reta $y = 3^{07} * x + 110496$, método validado por Olchanheski (2014) para o herbicida mesotrione, que apresenta coeficientes de variação menores que 5% e exatidão entre 90 e 110% para as replicatas das amostras, sendo os limites de detecção e quantificação respectivamente igual a 9,825 µM e 0,3 µM.

4.3.5 Identificação dos metabólitos da degradação do mesotrione

Para análises dos metabólitos da degradação do mesotrione por CL-EM/EM, utilizou-se o Esquire 6000 (ESI-Ion Trap MSⁿ System). A condição cromatográfica de corrida foi realizada com ácido fórmico 0,1% (A) e acetonitrila (B), seguindo o gradiente: 0 min – 5%(B); 5 min – 5%(B); 18 min – 26,5%(B), 25min – 65%(B), 25,1 min. – 95%(B); 29 min – 95%(B); 29,1 min – 5%(B); 44 min – 5%(B).

Os extratos das amostras foram tratados com ácido fórmico e passados através de um cartucho de extração em fase sólida (SPE) HLB da Waters, previamente condicionado. A fragmentação das moléculas ocorreu por meio de um feixe de “*electrospray*” (fonte ESI), conforme as seguintes condições do espectrômetro de massas: modo de varredura de 50 a 400 m/z, nebulizador 30 psi, gás 6 L/min. e temperatura da fonte a 300 °C. Os parâmetros de configurações utilizados para detecção dos íons moleculares foram 338 m/z (modo negativo) e 340 m/z (modo positivo).

4.3.6 Extração de proteínas

Proteínas dos isolados selecionados para estudo foram extraídas no período de crescimento compatível ao início e ao final da degradação do mesotrione.

Assim, as culturas crescidas (seção 4.3.3) após o tempo de incubação de 3 e 14h, foram centrifugadas a 8.000 g durante 15 min. O precipitado foi macerado com nitrogênio líquido e homogeneizado na proporção 1:10 m/v com tampão de fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5 (em g L⁻¹: 14,520 K₂HPO₄; 2,260 KH₂PO₄; 0,372 EDTA; 0,462 DL- dithiothreitol e 5% (w/w) polivinil polipirrolidone-PVPP (10:1 volume do tampão:peso da amostra) (GOMES-JUNIOR et al., 2007). As amostras foram

mantidas a 4°C e centrifugadas a 10.000 *g* por 30 min., e o sobrenadante armazenado a -80°C. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA (“bovine serum albumin”) como padrão.

4.3.7 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada em espectrofotômetro a 535 e 600 nm por meio da quantificação da produção de malondialdeído (MDA), um metabólito reativo ao ácido 2-tiobarbitúrico (método adaptado de Heath e Packer, 1968). Assim, 250 µL de amostra (100mg de extrato proteico homogeneizadas com 1 mL de TCA 0,1% e centrifugadas a 10.000 *g* por 15 min a 4°C), juntamente com 200 µL de tampão fosfato de potássio (pH7,5) e 1 mL de TCA 20% + TBA 0,1% foram mantidas por 30 min em banho-maria a 97°C. Poster

Posteriormente, as amostras permaneceram por 10 min em gelo antes de serem centrifugadas a 10.000 *g* por 10 min e, o sobrenadante ser lido em espectrofotômetro.

4.3.8 Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio foi quantificado em espectrofotômetro a 390 nm por meio da liberação de iodo, proveniente da reação com 200 µL de amostra (100 mg de extrato proteico (seção 4.3.6) homogeneizadas com 1 mL de TCA 0,1% e centrifugadas a 10.000 *g* por 15 min a 4°C), 200 µL de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) e 800 µL de Iodeto de potássio 1M, mantida por 1 h em gelo, na ausência de luz.

4.3.9 Atividade de SOD em PAGE não desnaturante

Para verificar o perfil da atividade SOD e as isoformas SOD, realizou-se a corrida em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE não-desnaturante a 12%), por meio de 20 µg de extrato proteico (seção 4.3.6) de cada tratamento dos horários 3 h e 14 h. Durante a corrida a 4°C, uma corrente constante de 15 mA gel⁻¹ foi aplicada durante 3 horas. Ao final da corrida, os géis foram lavados com água deionizada e incubados no escuro, na temperatura ambiente, em uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8, 1 mM EDTA, 0,05 mM riboflavina, 0,1 mM nitroazul tetrazólio (NBT) e 0,3% TEMED. Ao final de 30 min,

a mistura de reação foi descartada, os géis lavados com água deionizada e colocados sob iluminação até o aparecimento de bandas (CIA et al., 2012).

4.3.10 Determinação das isoenzimas de SOD

As isoformas SOD foram avaliadas a partir de PAGE não desnaturante (12%). Antes da coloração, o gel foi dividido verticalmente em três partes. A primeira foi mantida em uma solução de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8; a segunda foi colocada em 100 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM contendo KCN 2 mM e EDTA 1 mM; a terceira parte foi imersa em 100 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM com 5 mM de H₂O₂ e EDTA 1 mM. Esses procedimentos foram realizados na ausência de luz.

As isoformas foram classificadas como Mn-SOD, se resistente a ambos inibidores (KCN e H₂O₂); Fe-SOD se resistente ao KCN e inibida por H₂O₂ e Cu/Zn-SOD se inibida por ambos inibidores, conforme Azevedo et al., 1998.

4.3.11 Atividade da Catalase

A atividade CAT foi avaliada durante 1 min em espectrofotômetro a 240 nm por meio da decomposição de H₂O₂, a qual foi iniciada com 25 µL de extrato proteico (seção 4.3.6). A solução para decomposição de H₂O₂ foi composta por 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 2,5 µL de solução de peróxido de hidrogênio 25% (Kraus et al., 1995).

4.3.12 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA

As amostras foram inoculadas em meio líquido LB e incubadas a 30°C graus, sob agitação de 120 rpm até a fase exponencial de crescimento. O cultivo foi utilizado para extração do DNA total, segundo metodologia descrita por Menna et al. (2006).

O DNA de cada estirpe foi utilizado para amplificação do gene 16S rRNA, utilizando os iniciadores universais fD1 e rD1 (Weisburg et al., 1991). A reação consistiu em um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, 93°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos; um ciclo final de extensão por 5 minutos. Os produtos de PCR foram purificados, utilizando o kit MinElute®.

Para a obtenção da sequência do gene 16S rRNA, 4 reações de PCR foram realizadas utilizando os iniciadores Y1 (5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3'), Y2 (5' – CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT – 3'), 362f (5' – CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG – 3') e 786f (5' – CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG – 3') (Menna et al., 2006). Cada reação consistiu de 80ng do produto de PCR, 1,3 µL de BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems), 2,5 µL de tampão (Applied Biosystems), para um volume final de 20 µL. O mesmo programa foi utilizado para todos os iniciadores, consistindo de ciclo inicial de desnaturação a 96 °C por 1 minuto; 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 15 segundos, anelamento a 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos.

Após amplificação, as amostras foram manualmente purificadas, segundo metodologia descrita por Menna et al. (2006). As amostras foram resuspendidas em 10 µL de formamida, desnaturadas a 95°C por 5 minutos e submetida a sequenciamento em um ABI 3500xl Genetic Analyser (Applied Biosystems).

Sequências parciais do gene 16S rRNA, de alta qualidade, para cada estirpe foram geradas e analisadas utilizando os programas Phred (Ewing et al., 1998a), Phrad (Ewing et al., 1998b) e Consed (Gordon et al., 1998). As sequências foram depositadas no banco de dados Genbank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

4.3.13 Curva de crescimento bacteriano

As linhagens selecionadas foram crescidas em LB a 30°C durante 12 h. As células foram centrifugadas a 8.000 g por 5 min a 4°C e o precipitado foi lavado duas vezes com tampão PBS e inoculadas nos tratamentos em triplicatas: MM (controle), MMM e MMC. Inóculos foram padronizados para iniciar em densidade ótica (DO) de 0,05 de absorbância (abs). O crescimento bacteriano foi monitorado em espectrofotômetro a 600 nm. Para manter a acurácia das leituras, o material foi diluído sempre que a DO ultrapassasse valores de 0,6 de abs. Os valores obtidos foram multiplicados pelos fatores de diluição correspondentes.

4.3.14 Viabilidade celular

As bactérias em suspensão (sessão 4.3.13) foram diluídas em solução salina 0,9% e homogeneizadas. A diluição foi de 10⁻⁵ em todos os tratamentos em 3 h e

10^{-10} para MM e MMM em 14 h. O tratamento MMC foi diluído em 10^{-4} e 10^{-6} no período de 14 h. Após a diluição, alíquotas de 100 μ L foram plaqueadas em triplicata em LA e incubadas a 30°C por 24 h, realizando-se a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

4.3.15 Modificações de lipídios de membrana celular

O material, obtido conforme a seção 4.3.3, foi centrifugado por 5 min a 10.000 g a 4 °C e, o precipitado foi congelado a -80 °C. As amostras foram liofilizadas por 15 h e após esse período, foi acrescentado 4 mL de hexano e mantidas por 48 h sob agitação em 60 rpm. A cada 24 horas, retirou-se o sobrenadante e extraiu-se o extrato lipídico por meio da evaporação do hexano. Acrescentou-se 4 mL de hexano nas amostras e deixou-se sob agitação por mais 24 h para obter-se o extrato lipídico total. Ao final de cada 24 h o hexano foi evaporado e o extrato lipídico retirado. Os lipídios de membrana foram analisados em infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), nos comprimentos de onda de 400 a 4000 cm^{-1} , utilizando 100 mg de brometo de potássio (KBr) e 1 mg de extrato lipídico para montagem da pastilha, a ser inserida no equipamento.

Os resultados das análises de lipídios foram submetidos à análise multivariada de componentes principais (PCA), utilizando 1 milhão de variáveis no programa Pirouette v. 4.0 (Infometrix, Bothell, WA, EUA), para separar os dados de acordo com o grau de similaridade.

4.3.16 Análise estatística

Análises estatísticas foram realizadas por meio do software R versão 3.0.1, seguindo o método de Duncan para comparar as variáveis entre os tratamentos no mesmo horário (representados por letras minúsculas) e entre horários em um mesmo tratamento (representados por letras maiúsculas) nos ensaios de curva de crescimento, viabilidade celular, quantificação de peróxido de hidrogênio, MDA e atividade CAT. As estatísticas foram realizadas com três repetições de cada tratamento totalmente aleatórias e o critério de significância utilizado foi $p \geq 0,05$.

Letras diferentes entre tratamentos no mesmo horário ou entre horários em um mesmo tratamento indicam que houve diferenças significativas, sendo o grau de representatividade de uma amostra classificado conforme $A/a > B/b > C/c$. Uma

amostra com a letra AB (ab) (ou AC (ac) ou BC (bc)) significa que esta não é diferente entre o tratamento que apresenta letra A nem da que contém a letra B.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Caracterização de linhagens tolerantes ao Callisto® e ao princípio ativo

Os herbicidas aplicados na agricultura causam uma forte pressão seletiva na microbiota tanto do solo, quanto das águas próximas à área de aplicação, uma vez que, esses químicos podem sofrer processos como lixiviação e sorção, e assim contaminar águas superficiais e subterrâneas (RELYEA, 2005; ORTIZ-HERNÁNDEZ et al., 2011). Deste modo, bactérias presentes em açudes podem sofrer uma pressão seletiva, ocasionada por herbicidas, semelhante a bactérias presentes no solo, apesar de estarem em ambientes diferentes.

Foi a partir desses dois ambientes, solo e água (açude), submetidos ao mesmo agente seletivo (herbicida Callisto®), que foram isoladas 250 bactérias (160 de água e 90 de solo), sendo que deste total, 106 isolados de água e 50 isolados de solo apresentaram tolerância ao herbicida Callisto® e seu princípio ativo mesotrione.

Dentre essas bactérias, duas linhagens identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA como linhagens de *Bacillus* sp., uma isolada de água (*Bacillus* sp. CCT7729) e outra isolada de solo (*Bacillus* sp. CCT7730) foram selecionadas por apresentarem uma maior capacidade de tolerância ao mesotrione e Callisto® e serem do gênero bacteriano.

4.4.2 Estratégia de tolerância das linhagens *Bacillus* sp. CCT7729 e *Bacillus* sp. CCT7730 ao Callisto® e ao princípio ativo

Microrganismos expostos a estresses ambientais como, por exemplo, em condições com limitação de nutrientes ou na presença de xenobióticos, exigem alterações rápidas nos processos celulares para adaptar-se e garantir a sobrevivência. Uma dessas táticas para indução de tolerância é a capacidade de crescer e multiplicar-se com maior ou menor intensidade (SCHIMEL et al., 2007, TIRONI et al., 2009).

Essa estratégia foi observada nas linhagens deste estudo por meio de curvas de crescimento bacteriano (Fig. 4). Considerando os tratamentos em meio mineral (utilizados neste estudo para todos os ensaios de estresse oxidativo e degradação) verificou-se que as duas linhagens, no período de 3 h, encontram-se no início da adaptação metabólica as condições do meio de cultura (fase *lag*), enquanto que, em 14 h encontram-se no meio do período de divisão celular e crescimento logarítmico (fase *log*). Por esse motivo, os tempos 3 h e 14 h foram considerados para análises do comportamento de *Bacillus* sp. CCT7729 e *Bacillus* sp. CCT7730 em contato com o mesotrione e Callisto®.

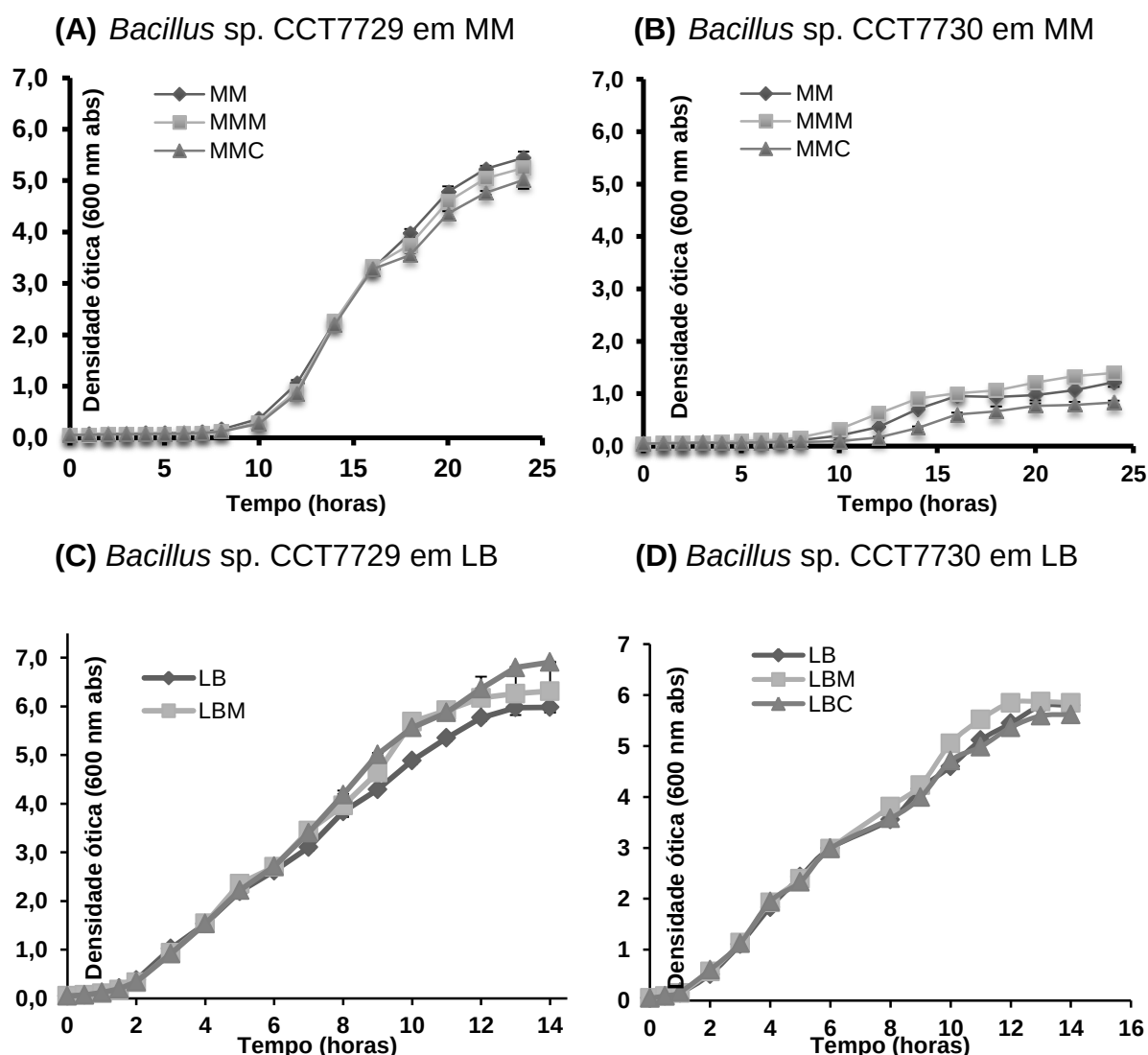


Figura 4: Curva de crescimento das linhagens *Bacillus* sp. CCT7729 e *Bacillus* sp. CCT7730. (A) Curva de crescimento de *Bacillus* sp. CCT7729 em meio mineral; (B) curva de crescimento de *Bacillus* sp. CCT7730 em meio mineral; (C) curva de crescimento de *Bacillus* sp. CCT7729 em luria broth; (D) curva de crescimento de *Bacillus* sp. CCT7730 em luria broth. As siglas MM, MMM, MMC, indicam respectivamente, os tratamentos meio mineral, meio mineral com mesotrione e meio mineral com Callisto®, enquanto que LB, LBM, LBC indicam os tratamentos em luria broth, luria broth com mesotrione e luria broth com Callisto®.

Analisando-se as curvas de crescimento bacteriano (Fig. 4), verificou-se que as duas linhagens apresentaram uma inibição no tratamento MMC, provavelmente devido a maior toxicidade do Callisto®. Este herbicida é composto por 48% de mesotrione e outros adjuvantes como o poli (oxi-1-2-etanodiol), 1-Octanol e alpha-isodecil-omega-hidroxi-fosfato que aumentam a estabilidade e potencializam seu efeito (JOLY et al., 2013). Esses adjuvantes podem ter efeitos diretos sobre bactérias e fungos, afetar a solubilidade e sorção no solo e, conseqüentemente, a biodisponibilidade na degradação do agrotóxico por microrganismos (CROUZET et al., 2010).

O Callisto® inibiu a colonização de algumas comunidades microbianas fototróficas (JOLY et al., 2013), e causou impactos negativos sobre as concentrações de clorofila do solo, estrutura genética e diversidade de cianobactérias (CROUZET et al., 2013). A toxicidade de Callisto® também foi observada em *P. ananatis* CCT 7673 que não conseguiu crescer em altas concentrações do herbicida (acima de 100 x a dose de campo) (PILEGGI et al., 2012).

Ao comparar a densidade ótica nas curvas de crescimento na condição de cultivo em meio mineral, entre as duas linhagens deste estudo, observou-se que *Bacillus* sp. CCT7730 apresentou uma densidade ótica menor. Entretanto, essa diferença não existiu nas curvas de crescimento em LB entre *Bacillus* sp. CCT7729 e CCT7730. Neste caso, nota-se a influência dos nutrientes no cultivo de bactérias isoladas de ambientes diferentes.

Uma estratégia utilizada por microrganismos para favorecer o crescimento conforme a disponibilidade de nutrientes é a habilidade de serem especialistas ou generalistas. Quando o meio ambiente está em constante mudança e a disponibilidade de elementos é variável, a abordagem generalista é mais vantajosa, em condições homegêneas a abordagem especialista aumenta a chance de crescimento e sobrevivência (TAMAMES et al., 2010; LENNON et al., 2012; MERCHANT; HELMANN, 2012). Deste modo, linhagens generalistas tendem a se adaptar mais facilmente em outros ambientes que linhagens especialistas.

Essa tática evolutiva pode ter influenciado as taxas de crescimento mostradas na Fig. 4, na qual, a linhagem *Bacillus* sp. CCT7730 apresentou uma densidade ótica menor que *Bacillus* sp. CCT7729 em meio mineral. Provavelmente a bactéria

de água é generalista e a de solo é especialista, uma vez que *Bacillus* sp. CCT7730 apresentou uma taxa de crescimento maior apenas em meio rico - LB (Fig. 4).

4.4.3 Toxicidade causada pelos xenobióticos

Muitas vezes, bactérias podem apresentar seu crescimento limitado em meio de cultivo líquido e o estado celular pode não ser identificado (STRÄUBER; SUSANN, 2010). Análises de viabilidade celular mostram a quantidade de células viáveis presentes em um determinado momento, células que mantêm as condições biológicas essenciais para o crescimento e divisão celular.

Comparando os dados das curvas de crescimento bacteriano (realizados por espectrofotometria – Fig. 4) e células viáveis (Fig. 5), observou-se que em 14 h, a viabilidade celular das duas estirpes de *Bacillus* sp. diminuiu nos tratamentos MMM e principalmente em MMC.

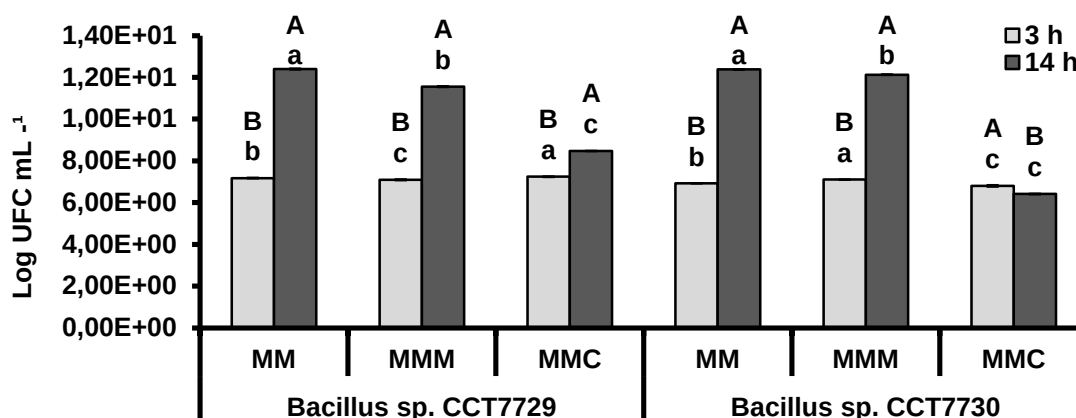


Figura 5: Viabilidade celular das linhagens *Bacillus* sp. CCT7729 e *Bacillus* sp. CCT7730 após 3 h e 14 h de exposição nos tratamentos MM, MMM e MMC.

Essa diminuição de células viáveis nos tratamentos MMC pode estar relacionada à maior toxicidade do Callisto[®] devido à presença dos adjuvantes. Já, em MMM o número de células viáveis pode ter sido menor porque esses isolados convivem com o herbicida no meio de cultivo por um longo período e, principalmente após as 14 h (meio da fase *log*), há a influência de diversos agentes causadores de estresse que interferem na sobrevivência das células, dentre eles encontra-se: (i) à presença do próprio herbicida; (ii) possivelmente diferentes metabólitos celulares e até mesmo metabólitos da degradação do mesotrione; e, (iii) pode estar ocorrendo o início da deficiência de recursos nutricionais presentes no meio mineral.

Esses resultados são diferentes dos encontrados por Olchanheski et al. (2014) com a linhagem degradadora do mesotrione, *Escherichia coli* DH5- α , que teve a viabilidade afetada antes de ocorrer a degradação deste herbicida. Esta linhagem degradou completamente o mesotrione em apenas 3 horas, justificando a diminuição da viabilidade celular antes da degradação provavelmente devido a essa rápida metabolização do herbicida, e consequentemente (sem a presença deste agente estressante no meio) a utilização dos recursos do meio de cultura como o suporte nutricional nas fases posteriores de crescimento.

Portanto, contatou-se neste estudo que o mesotrione e principalmente o Callisto[®] são tóxicos e, prejudicam a adaptabilidade das células bacterianas das duas linhagens *Bacillus* sp. CCT7729 e CCT7730 em regular as vias metabólicas para obtenção de energia e manutenção das funções biológicas necessárias para o crescimento celular.

4.4.4 Produção de peróxido de hidrogênio e danos celulares induzidos pelo Callisto[®] e seu princípio ativo

Bactérias do gênero *Bacillus* sp. têm sido relatadas por tolerar altos índices de estresse oxidativo ocasionados por efeito direto de xenobióticos e/ou por intermediários gerados durante a biodegradação (ZHANG, 2012; LIU et al., 2009).

Uma consequência do estresse oxidativo é o aumento nos níveis de H₂O₂ e outros radicais livres, frequentemente encontrados em organismos expostos a contaminantes ambientais e principalmente em espécies com rotas de degradação, pois estas geralmente envolvem reações de oxigenação intermediadas por enzimas oxidativas, que durante os processos de oxi-redução de xenobióticos geram ERO (NARHI; FULCO, 1986; BERNHARDT, 2006; COLAS et al., 2012; MISHRA; IMLAY, 2012; IMLAY, 2013; ORTIZ-HERNÁNDEZ, 2013).

Os radicais livres e as ERO, assim como o H₂O₂, reagem com os ácidos graxos insaturados na membrana celular, provocando danos e liberando produtos tóxicos como aldeídos. Um indicador da peroxidação lipídica em estudos que envolvem estresse oxidativo é o MDA (malondialdeído) (RIO, STEWART, PELLEGRINI, 2005; IŞIK et al., 2007; ZHANG et al., 2012). Işik et al. (2009) verificaram em *Streptomyces* sp. M3004, que o aumento dos níveis de MDA está relacionado ao cultivo dessa bactéria na presença de H₂O₂ e do herbicida paraquat.

Uma relação direta entre taxas de H_2O_2 e os níveis de MDA podem indicar os danos celulares provenientes do estresse oxidativo causados por H_2O_2 (IŞIK et al., 2007). A quantificação de H_2O_2 e as taxas de MDA para as duas linhagens deste estudo são apresentadas, respectivamente, nas Fig. 6 e 7.

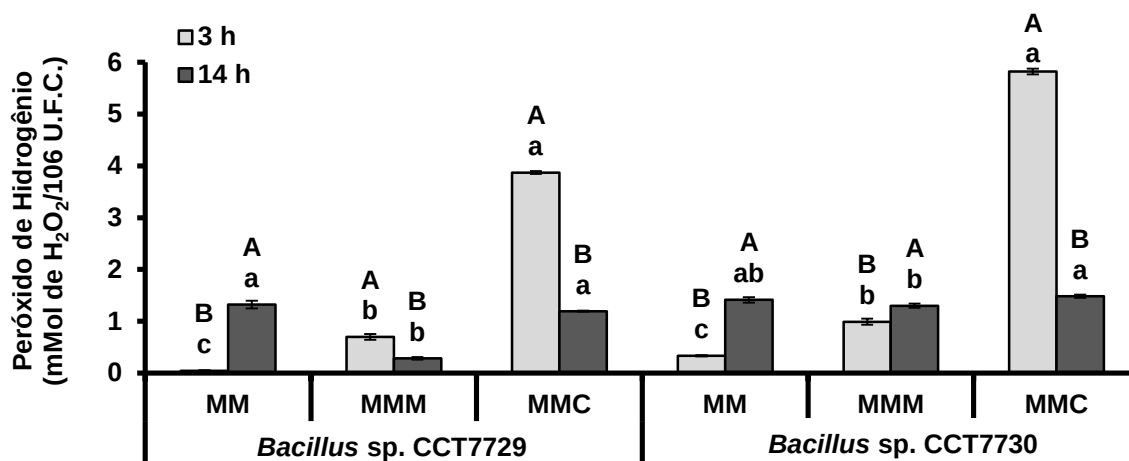


Figura 6: Quantificação de peróxido de hidrogênio das linhagens *Bacillus* sp. CCT7729 e *Bacillus* sp. CCT7730 após 3 h e 14 h de exposição nos tratamentos MM, MMM e MMC.

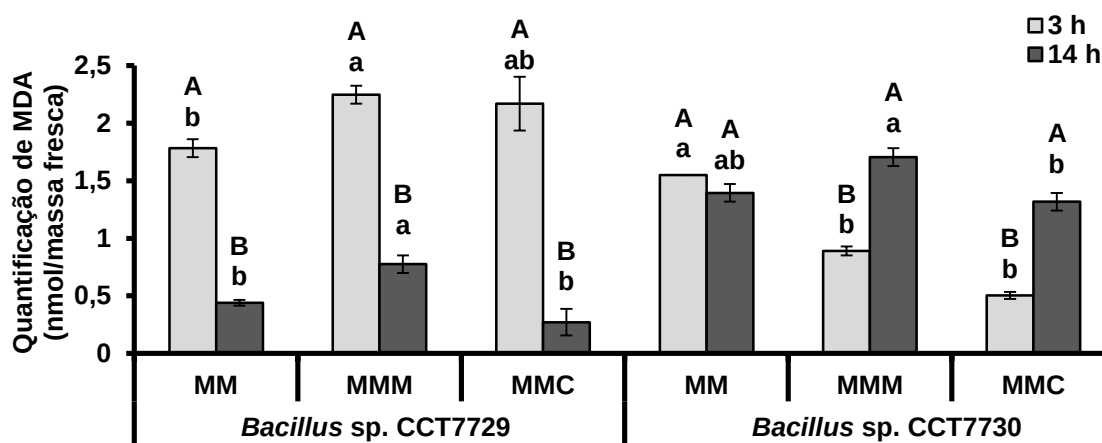


Figura 7: Taxas de malondialdeído (MDA) das linhagens *Bacillus* sp. CCT7729 e *Bacillus* sp. CCT7730 após 3 h e 14 h de exposição nos tratamentos MM, MMM e MMC.

Ao comparar as taxas de H_2O_2 (Fig. 6) e os níveis de MDA (Fig. 7), uma relação direta é estabelecida nos tratamentos MMM e MMC para a linhagem *Bacillus* sp. CCT7729 e em MMM para a linhagem *Bacillus* sp. CCT7730 e, deste modo, os danos de membrana celular nessas linhagens podem ter sido causados devido à espécie reativa H_2O_2 .

O peróxido de hidrogênio não é a única ERO responsável pela peroxidação lipídica em membranas, o radical superóxido e principalmente a hidroxila podem causar um dano celular maior e mais rápido (HALLIWELL; CHIRICO, 1993). Deste modo, possivelmente os tratamentos que não apresentaram uma relação direta

entre H_2O_2 e MDA (MM em *Bacillus* sp. CCT7729; MM e MMC em *Bacillus* sp. CCT7730), radicais como o superóxido, hidroxila, dentre outros, podem ter influenciado as taxas de MDA apresentadas. No entanto, mudanças na composição lipídica de bactérias podem alterar as taxas de MDA, uma vez que este aldeído é produzido por meio de reações com ERO e ácidos graxos insaturados na membrana celular, e deste modo, uma maior instauração nos lipídios de membrana, pode elevar as taxas de MDA e, uma saturação causa uma diminuição nos níveis de MDA.

Ainda, a partir dos dados de MDA e H_2O_2 , observou-se que tanto o mesotrione, quanto o Callisto[®], em 3 h, induziram a elevação de H_2O_2 (Fig. 6) nas duas linhagens deste estudo. No entanto, o Callisto[®] provavelmente gerou um estresse maior que o mesotrione devido a sua toxicidade gerada pelos efeitos sinérgicos dos adjuvantes.

Uma diminuição dos níveis de peroxidação lipídica foram observados no trabalho de Martins *et al.* (2011), na qual duas linhagens filogeneticamente relacionadas, *Enterobacter asburiae* SD1 e *Enterobacter amnigenus* KD, após o tratamento com 34 mM s-metolaclo e 62 mM de acetocloro, indicando que ambas as bactérias foram capazes de adaptar-se a um aumento na produção de ROS.

Além disso, *Bacillus* sp. CCT7730 possivelmente sofre mais danos com ERO, quando exposta aos herbicidas, que *Bacillus* sp. CCT7729, uma vez que, em 14 h, esta linhagem ainda apresenta uma concentração de H_2O_2 maior em MMC e MMM comparado ao tratamento controle e, as taxas de MDA são maiores neste período. Já, *Bacillus* sp. CCT7729 pode tolerar mais os efeitos dos herbicidas e seus metabólitos, pois em 14 h, não houve diferença de H_2O_2 entre os tratamentos MM e MMC e, no tratamento com mesotrione, essa linhagem apresentou uma quantidade menor de H_2O_2 que no controle. Além disso, *Bacillus* sp. CCT7729 teve taxas menores de MDA em 14 h, indicando menos danos decorrentes de peroxidação lipídica.

4.4.5 Resposta adaptativa ao mesotrione

Uma das respostas adaptativas a herbicidas encontradas por alguns microrganismos tolerantes é a capacidade de metabolizar esses xenobióticos,

mecanismo impulsionado por necessidade de obtenção de energia, desintoxicação celular ou por processos de co-metabolismo (ORTIZ-HERNÁNDEZ et al., 2013).

Neste estudo, a degradação do mesotrione foi exibida pelas duas linhagens *Bacillus* sp. e pode ser considerada uma adaptação metabólica a este xenobiótico (Tab. 1).

Tabela 1: Quantificação das concentrações de mesotrione por CLAE a partir da degradação pelas linhagens *Bacillus* sp. CCT7729 e *Bacillus* sp. CCT7730 nos períodos de 3 h e 14 h.

Linhagem	Horário	Área	Concentração (mM)	Exatidão (%)	Degradação (%)
<i>Bacillus</i> sp. CCT7729	0 h	1312715	0,036	99,2	
	3 h	657268	0,016	90,6	50,3
	14 h	227848	0,003	51,2	90,6
<i>Bacillus</i> sp. CCT7730	3 h	842190	0,022	94,5	37,5
	14 h	309005	0,006	66,3	84,8

Apesar de serem identificadas como sendo do mesmo gênero, pela metodologia de sequenciamento do gene 16S rRNA, essas linhagens apresentaram uma capacidade metabólica de degradação diferenciada. A linhagem *Bacillus* sp. CCT7729 conseguiu metabolizar o mesotrione com maior eficiência que *Bacillus* sp. CCT7730.

No entanto, a concentração de mesotrione encontrada para essas duas linhagens a partir de 14 h, ficaram abaixo do limite de quantificação (9,825 µM), determinado para o método cromatográfico empregado (Olchanheski, 2014), nos permitindo inferir que apesar de determinar a qualificação de mesotrione na amostra, sua quantificação não pode ser feita com precisão e exatidão.

Bactérias do gênero *Bacillus* sp., têm se destacado pela alta atividade na degradação de diferentes herbicidas utilizando-os como fonte de carbono e/ou nitrogênio promovendo a mineralização desses compostos e caracterizando-se candidatos potenciais no processo de biorremediação de locais contaminados (CAI et al., 2013; Zhang et al., 2014, Wang et al., 2014).

A degradação do herbicida mesotrione foi relatada apenas por algumas linhagens, como *Escherichia coli* DH5-α, *P. ananatis* CCT 7673 e *Bacillus* sp. 3B6, capazes de metabolizar totalmente o herbicida, respectivamente, após 3, 18 e 25 horas de contato ao xenobiótico (DURAND et al., 2006; PILEGGI et al., 2012; OLCHANHESKI et al., 2014). Ao contrário destas estirpes, as linhagens deste

estudo não foram capazes de metabolizar a concentração total de mesotrione presente em meio de cultura (Tab. 1).

Estudos demonstram que a adição de elementos orgânicos e nutrientes no cultivo de bactérias degradadoras pode afetar a taxa de biodegradação de agrotóxicos (MOHAMED et al., 2011; TAO, YANG, 2011). Isso porque, no ambiente, o processo de degradação pode ocorrer para desintoxicação celular ou por necessidade de obtenção de energia, e como as concentrações desses xenobióticos variam muito ao longo do tempo, a matéria orgânica dissolvida fornece a mais importante fonte de carbono e energia para as bactérias heterotróficas.

Assim, se alterasse a composição do meio de cultivo para as análises da degradação neste estudo, como por exemplo, diminuindo a quantidade de glucose no meio mineral (caso as bactérias deste estudo utilizassem o mesotrione como fonte de carbono alternativa), possivelmente teria-se um aumento na porcentagem de degradação do mesotrione.

4.4.6 Metabólitos da degradação do mesotrione por *Bacillus* sp. CCT7729 e *Bacillus* sp. CCT7730

Até o momento, não foram encontrados genes específicos envolvidos na metabolização do mesotrione por bactérias (DURAND et al., 2006; PILEGGI et al., 2012). No entanto, os produtos da degradação do mesotrione de duas linhagens já foram identificados.

Batissou et al. (2009) trabalhando com *Bacillus* sp. 3B6, identificaram as moléculas AMBA (ácido 2-amino-4-metil sulfonil benzóico) e MNBA (ácido 4- metil sulfonil-2-nitrobenzóico), metabólitos considerados de maior toxicidade que a molécula original do mesotrione (MITCHELL et al., 2001; Bonnet et al., 2008; Crouzet et al., 2010). Já, Pileggi et al. (2012) apresentaram subprodutos diferentes de AMBA e MNBA por meio da degradação por *P. ananatis* CCT 7673.

Apesar disso, os principais produtos de degradação do mesotrione encontrados em solos foram as moléculas de MNBA e AMBA (Alferness e Wiebe, 2002, Bonnet et al., 2008 e Batissou et al., 2009).

Neste estudo, por meio de ensaios de CL-EM/EM foram registrados espectros cujas massas/cargas são diferentes para as duas linhagens de *Bacillus* sp. (Fig. 8),

isso sugere novas rotas metabólicas com metabólitos diferentes daqueles apresentados por Durand et al. (2006) e Pileggi et al. (2012).

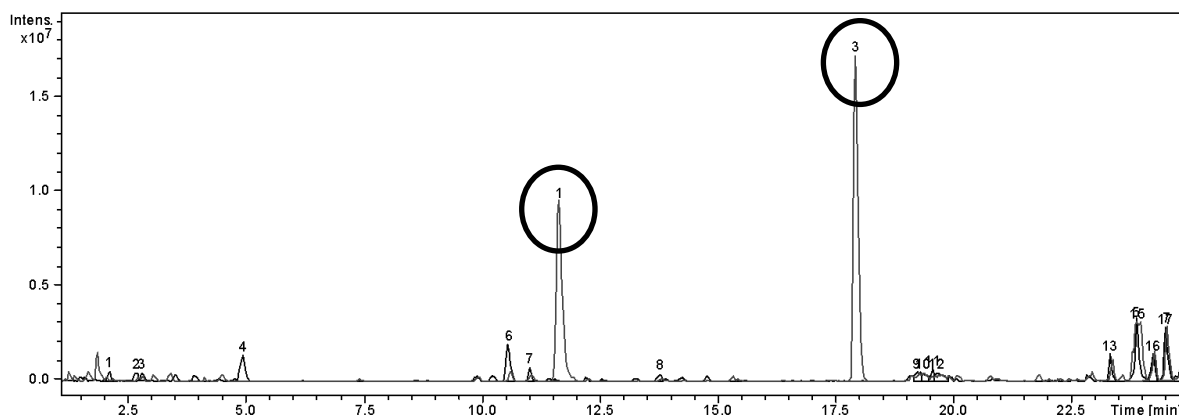
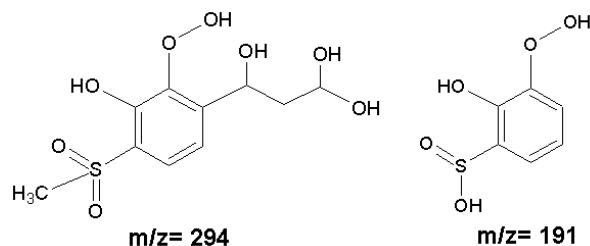


Figura 8: Plotagem de espectros de massas encontrados a partir de ensaios CL-EM/EM de amostras retiradas após 24 h de crescimento das linhagens *Bacillus* sp. CCT7729 e *Bacillus* sp. CCT7730 em MMM, para verificar os metabólitos da degradação do mesotrione. Os picos marcados com círculos representam picos de massas/cargas da degradação de *Bacillus* sp. CCT7730, enquanto que os picos sem marcação representam os produtos da degradação de *Bacillus* sp. CCT7729.

A molécula do mesotrione (Fig. 3) é considerada tóxica devido ao forte potencial elétrico causado pelos grupos nitro e metilsulfonil nas posições 2 e 4 do benzoilo (MITCHELL et al., 2000) e, por ser mais estável em água e mais resistente a fotólise que o sulcotriona, outro herbicida tricetona (Chaabane et al., 2007). Os grupos nitro e metilsulfonil que produzem um forte efeito na remoção de elétrons (MITCHELL et al., 2001) são os prováveis responsáveis pelo estresse oxidativo observado em *P. ananatis* CCT 7673, antes desta linhagem metabolizar o mesotrione, uma vez que, os metabólitos da sua degradação foram considerados menos tóxicos que a molécula original, e apresentam os grupos nitro e metilsulfonil removidos ou modificados (PILEGGI et al., 2012). Já, os metabólitos do mesotrione identificados a partir da degradação de *Bacillus* sp. 3B6, as moléculas de AMBA e MNBA, consideradas mais tóxicas que o mesotrione, ainda apresentam esses grupos (BATISSON et al., 2009).

Neste trabalho, foram propostos metabólitos da degradação do mesotrione para *Bacillus* sp. CCT7730 (Fig. 9) sem o grupo funcional nitro.

(A)



(B)

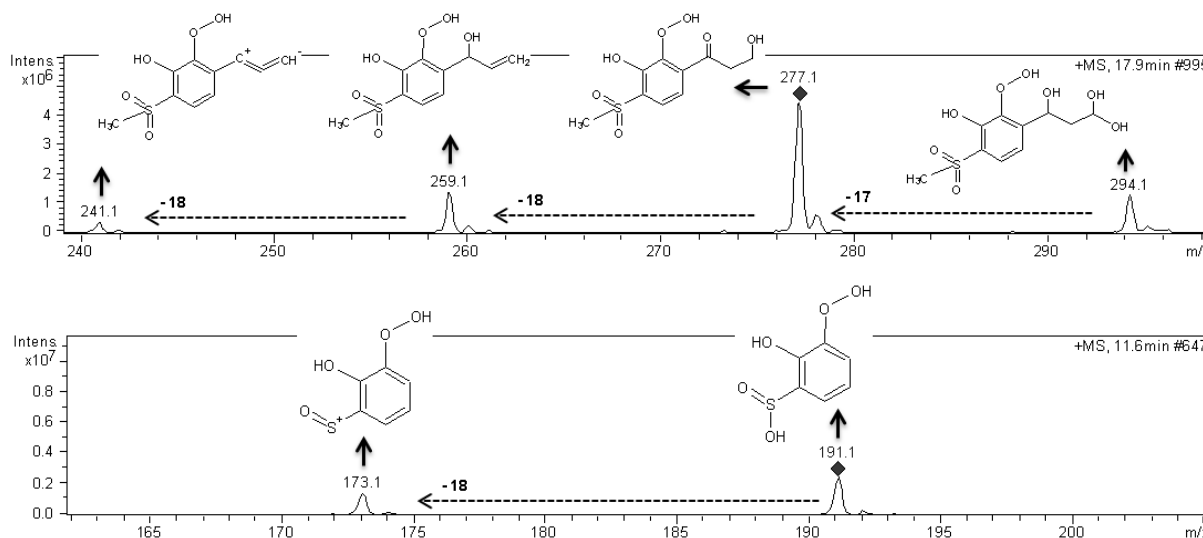


Figura 9: Espectros de massa utilizados para propor a estrutura molecular mais estável de metabólitos da degradação do mesotrione de *Bacillus* sp. CCT7730. (A) Os metabólitos da degradação do mesotrione por *Bacillus* sp. CCT7730 apresentam massa/carga de 294 e 191. (B) Espectros MS2 com a confirmação dos metabólitos da degradação.

No entanto, apesar de não apresentar o grupo nitro, sugere-se que *Bacillus* sp. CCT7730 ainda degrade este herbicida em metabólitos mais tóxicos que a própria molécula do mesotrione gerando maiores danos oxidativos nesta linhagem, uma vez que, os metabólitos possuem regiões bastante eletronegativas e esta linhagem apresentou taxas de MDA maiores em 14 h (período em que se tem maior concentração de metabólitos de degradação – Fig. 7), teve sua viabilidade diminuída (Fig. 5) e a quantidade H_2O_2 (Fig. 6) foi indiferente ao controle neste tempo. Ao contrário de *Bacillus* sp. CCT7729 que apesar de apresentar a viabilidade diminuída (Fig. 5), teve taxas de H_2O_2 menores em MMM do que nos tratamentos MM e MMC (Fig. 6) e exibiu níveis menores de MDA em 14 h (Fig. 7). Deste modo, propõe-se que *Bacillus* sp. CCT7729 degrade o mesotrione em metabólitos menos nocivos, ao contrário de *Bacillus* sp. CCT7730.

Assim, os resultados deste trabalho indicam uma maior diversidade de vias metabólicas de *Bacillus* sp. para degradação do mesotrione.

4.4.7 Atividade de enzimas antioxidativas

4.4.7.1 SOD

Bactérias degradadoras de poluentes podem enfrentar o estresse oxidativo, tanto decorrentes do efeito direto de poluentes, quanto de intermediários gerados durante os processos de biodegradação (PARK et al., 2004). Para manter o ambiente celular estável e evitar danos de estresse oxidativo, há um aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante de defesa (LIN et al., 2009; MISHRA; IMLAY, 2012; MA et al., 2013).

Dentre as enzimas, a SOD é considerada a primeira linha de defesa contra ERO (Scandalios et al., 2005). Pertencente a uma família com quatro tipos de metaloenzimas dependentes de um cofator de metal, incluindo Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD e Ni-SOD, as SOD são capazes de desintoxicar radicais de oxigênio por conversão do radical $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 .

A atividade de SOD, determinada por meio de PAGE, revelou respostas diferentes entre as bactérias deste estudo (Fig. 10).

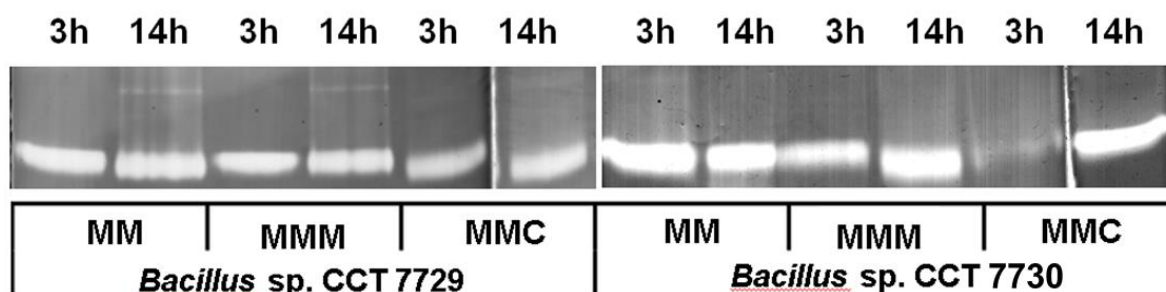


Figura 10: SOD-PAGE de *Bacillus* sp. CCT7729 e *Bacillus* sp. CCT7730 após 3 h e 14 h de exposição nos tratamentos MM, MMM e MMC.

As SOD foram classificadas com base em suas sensibilidades aos inibidores KCN e H_2O_2 (AZEVEDO et al., 1998). Observou-se duas isoformas caracterizadas como Mn-SOD (Fig. 11) na linhagem *Bacillus* sp. CCT7729 e uma Mn-SOD em *Bacillus* sp. CCT7730. Não foi observada a presença de Fe-SOD ou Cu/Zn-SOD nessas linhagens.

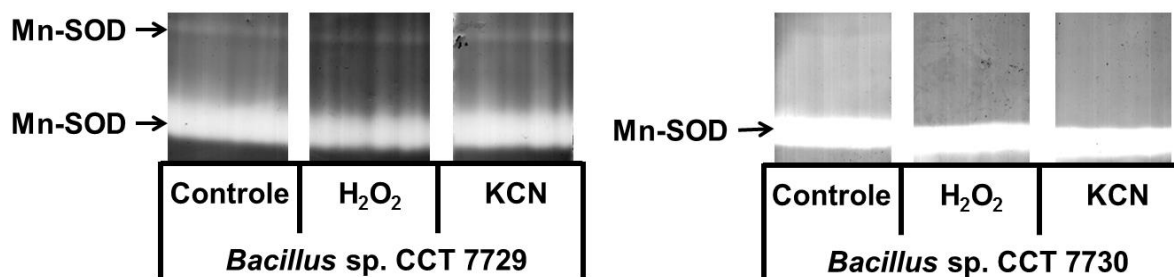


Figura 11: Caracterização das isoformas SOD de *Bacillus sp. CCT7729* e *Bacillus sp. CCT7730*.

Estudos sobre a isoenzima Mn-SOD demonstram que sua atividade é modulada conforme o estresse oxidativo e está relacionada ao processo desintoxicação de herbicidas em vários organismos (MARGINO; MARTANI; MAGDALENA, 2007; LI et al., 2009). Em *Burkholderia cepacia* WZ1, a presença do herbicida quinclorac causou uma expressão elevada de Fe-SOD e a indução de Mn-SOD (Li et al, 2009). A Mn-SOD, assim como a Fe-SOD, que são encontradas no citoplasma, são reguladas em resposta a níveis de ferro (IMLAY, 2013). Em condições de cultura as isoenzimas Cu/Zn-SOD não apresentaram um papel importante no catabolismo de ânions superóxido (WUERGES et al., 2004; RODRIGUES et al., 2010)

Com os dados apresentados neste trabalho, verificou-se que a Mn-SOD não apresentou grandes mudanças na atividade total SOD após o tratamento com os herbicidas para *Bacillus sp. CCT7729*. Em MMM, a atividade das isoformas Mn-SOD é equivalente ao controle, enquanto que em MMC, o desaparecimento de uma isoforma Mn-SOD é compensado pela atividade maior da outra Mn-SOD, presente nesta bactéria.

Na linhagem *Bacillus sp. CCT7730* observou-se que em 14h, a Mn-SOD aumentou sua atividade nos tratamentos MMM e MMC, e assim, apresentou um papel importante para essa linhagem contra o estresse oxidativo (Fig. 10). No entanto, comparando a expressão da SOD em 3 h entre os tratamentos, verificou-se que há uma menor expressão da SOD em MMM e principalmente em MMC.

Estudos demonstram a atividade elevada da SOD é necessária para evitar danos enzimáticos e garantir o crescimento celular, uma vez que essa enzima é a única capaz de controlar a concentração dos dois substratos para a reação de Haber-Weiss, que originam o radical $\text{OH}^\bullet$ (GORT; IMLAY, 1998; RYAN et al., 2010). Isso pode não estar ocorrendo em *Bacillus sp. CCT7730* em 3h, uma vez que, neste

período, há um aumento de H_2O_2 e a diminuição da atividade SOD nos tratamentos MMM e MMC, sendo que em MM há atividade da SOD.

4.4.7.2 CAT

O H_2O_2 possui uma capacidade de se difundir pelas membranas e oxidar proteínas que apresentam resíduos de metionina e cisteína, ou grupos tiol muito reativos, transpor membranas e gerar o radical hidroxila (IMLAY, 2013; BARREIROS et al., 2006; CABISCOL et al., 2000). No entanto, esta espécie reativa pode ser removida por peroxidases e pela atividade da enzima CAT, que converte duas moléculas de H_2O_2 em duas moléculas de H_2O e O_2 (CABISCOL et al., 2000).

Neste trabalho, verificou-se a atividade da enzima antioxidante CAT (Fig. 12) com o intuito de analisar como as linhagens em estudo respondem ao aumento de peróxido de hidrogênio. Os resultados da atividade CAT apresentaram diferenças de resposta do sistema antioxidante de defesa entre as duas linhagens.

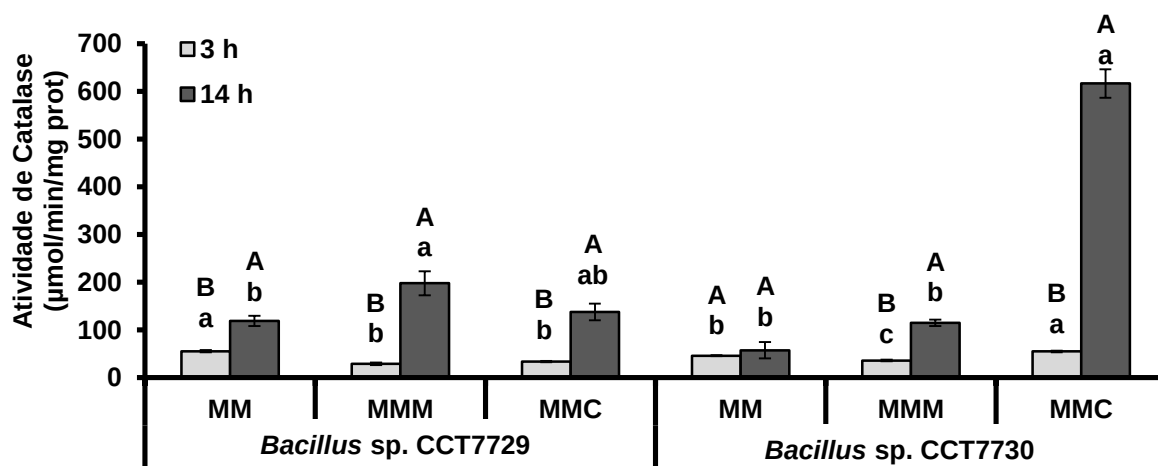


Figura 12: Atividade de CAT das linhagens *Bacillus sp. CCT7729* e *Bacillus sp. CCT7730* após 3 h e 14 h de exposição nos tratamentos MM, MMM e MMC.

Comparando o aumento de peróxido de hidrogênio (Fig. 6) e da atividade CAT (Fig. 12), provavelmente esta enzima é a responsável pelo processo de desintoxicação de H_2O_2 em *Bacillus sp. CCT7730*, uma vez que, sua atividade é alta em 14 h enquanto que, a taxa de H_2O_2 diminui neste período em MMM e MMC. Diferentemente, *Bacillus sp. CCT7729* não apresenta diferença de atividade CAT em MMC comparado com MM e MMM.

Trabalhos relatam que a CAT não é a primeira linha de defesa contra essa espécie reativa. Peroxidases, como a Ahp, atuam quando os níveis de H_2O_2 são

baixos, e as catalases quando os níveis de H_2O_2 são elevados, ou quando as células estão com falta de nutrientes (IMLAY, 2013). Peroxidasas foram importantes para *Pseudomonas putida* SL1 e *Bacillus megaterium* SL1 quando alterações metabólicas levaram a diminuição de xenobióticos em meio de cultura, enquanto que o aumento da atividade da CAT em *Achromobacter xylosoxidans* SL1 foi uma forma de defesa contra o estresse oxidativo (BUCKOVÁ, 2010). A AhpC, uma enzima com atividade redox, responsável pela remoção de peróxidos em células bacterianas também foi induzido juntamente com CAT após a exposição ao paraquat e ao peróxido de hidrogênio em *Pseudomonas aeruginosa* (Hare et al. 2011). Lin et al. (2009) observaram que na concentração de 20 mg L^{-1} do herbicida bensulfuron metil, a linhagem degradadora *B. megaterium* teve uma elevação da atividade CAT para remover o H_2O_2 , já em concentrações superiores houve a inibição da atividade CAT, provavelmente excedeu a capacidade adaptável do sistema antioxidante da bactéria houve uma premonição de intoxicação. No trabalho de Martins et al. (2011), o isolado *E. asburiae* SD1 e as estirpes *E. amnigenus* KD e K9 aumentaram a atividade de CAT na presença de metolaclo e acetocloro, provavelmente a CAT juntamente com a GR estão envolvidas no mecanismo de tolerância a herbicidas.

Deste modo, a linhagem *Bacillus* sp. CCT7729, possivelmente possui outro mecanismo de retirada de H_2O_2 , como a atividade de peroxidasas e a CAT pode estar presente em níveis basais em MMC e MM, pois em 14 h, este isolado pode não produzir quantidades de H_2O_2 (Fig. 6) no tratamento com Callisto® em uma concentração que aumente a atividade CAT (Fig. 12). No entanto, a CAT pode estar atuando com uma atividade maior, em 14 h nesta linhagem em MMM para retirar o H_2O_2 gerado possivelmente devido ao processo de degradação (que causa a elevação de ERO) e a presença dos metabólitos do mesotrione.

Zhang et al. (2012) observaram uma elevação muito rápida da atividade CAT em bactérias degradadoras da atrazina, assim como, Lin et al. (2009) que demonstraram a atividade CAT de *B. megaterium* L1 cerca de 10 vezes maior em resposta a degradação do herbicida Bensulfuron-methyl (BSM), ao contrário da linhagem não degradadora *B. subtilis* B19. Esse aumento da CAT foi atribuído à atividade de degradação, tolerância e a algum mecanismo antioxidante desconhecido associado à degradação deste agrotóxico.

4.4.8 Modificações de membrana celular

Diversos fatores externos tais como temperatura, pressão, nutrientes, ações de enzimas, fase de crescimento, íons e xenobióticos, podem alterar as concentrações de ERO e, essas espécies reativas, podem interferir nas propriedades físico-químicas e no funcionamento da membrana celular em bactérias (CABISCOL, 2000; BAKHOLDINA et al., 2001).

A alteração na fluidez da membrana é um efeito primário observado em bactérias tolerantes a herbicidas, causado pela peroxidação lipídica (CABISCOL, 2000). Esse ajuste na composição e estrutura de lipídios de membrana pode reduzir danos causados por ERO, diminuir o gasto de energia, dificultar a entrada de xenobióticos na célula e otimizar o crescimento celular (OLCHANHESKI et al., 2014; ZHANG; ROCK, 2008; BALAGUÉ et al., 2001).

Alterações na composição de lipídios de membrana das duas linhagens *Bacillus* sp. CCT7729 e *Bacillus* sp. CCT7730 (Fig. 13) na presença do Callisto® e mesotrione foram verificadas a partir da análise de FTIR (varredura de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1}). Os espectros apresentam bandas características (Fig. 13): uma tipicamente associada à alcanos, referentes ao estiramento C-H (2.955 cm^{-1}), ligações C-H₂ e C-H₃ (2.915 e 2.840 cm^{-1}); e outra banda de estiramento C=O (1.740 cm^{-1}), característico de ésteres (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1998).

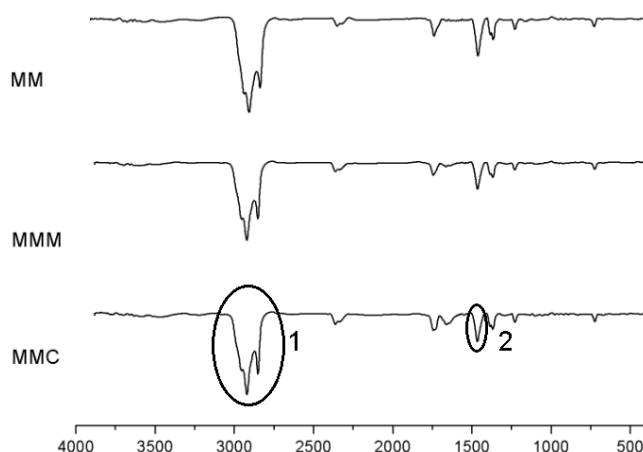


Figura 13: Perfil do espectro de infravermelho de extrato lipídico de *Bacillus* sp. CCT7729 e *Bacillus* sp. CCT7730 em MM, MMM e MMC (análise de FTIR - varredura de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1}). Banda 1: Estiramento =C-H (2.955 cm^{-1}), ligações C-H₂ e C-H₃ (2.915 e 2.840 cm^{-1}), tipicamente associadas à alcanos. Banda 2: Estiramento C=O (1.740 cm^{-1}), característico de ésteres (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1998).

A figura 12 apresenta a análise de componentes principais (PCA) do perfil lipídico de *Bacillus* sp. CCT7729 e *Bacillus* sp. CCT7730. O PCA agrupa os dados conforme

o grau de similaridade, deste modo, os perfis lipídicos mais semelhantes encontram-se agrupados no mesmo quadrante.

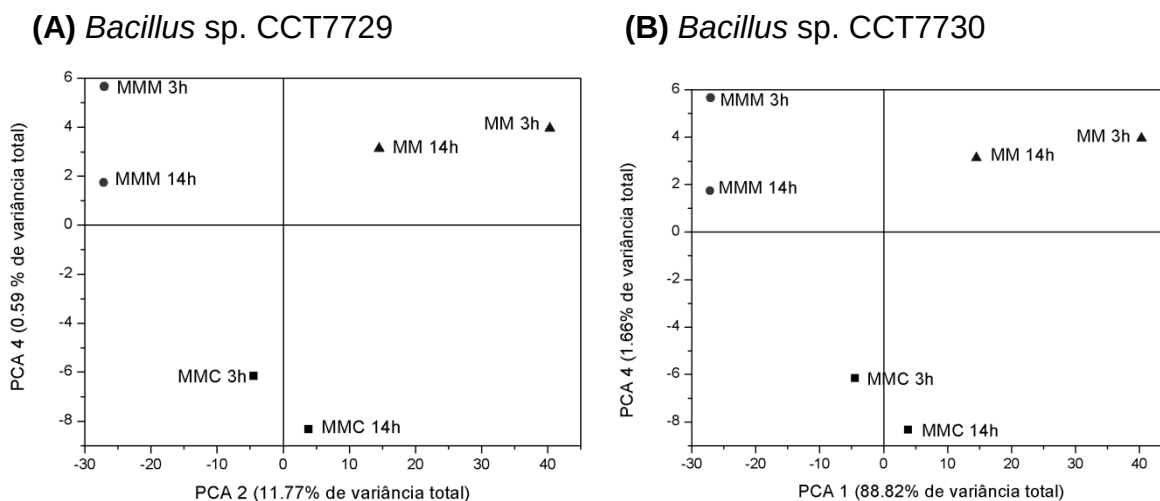


Figura 14: Gráfico de escores apresentando a análise de componentes principais (PCA) da composição lipídica de *Bacillus* sp. 7729 (A) e *Bacillus* sp. 7730 (B), a partir de 1 milhão de variáveis. O PCA agrupa os dados de acordo com o grau de similaridade. Amostras com maior semelhança encontram-se agrupadas no mesmo quadrante.

Comparando o tratamento controle (MM) com o MMM e MMC observou-se que houve mudança na saturação dos lipídios de membrana nas duas linhagens deste estudo (Fig. 14). *Bacillus* sp. CCT7729 apresentou diferença de saturação entre os tratamentos, no entanto, só houve diferença entre os horários 3 e 14h no tratamento com Callisto®.

Bacillus sp. CCT7730 também apresentou alteração na composição lipídica entre os tratamentos, tendo alteração entre horários apenas no tratamento com o mesotrione. Essa diferença do perfil lipídico entre horários em MMM provavelmente deve ser devido aos metabólitos da degradação do mesotrione.

O mesotrione já alterou a saturação de lipídios em algumas linhagens. O trabalho de Olchaneski et al. (2014) relata que a presença de mesotrione induziu uma saturação de lipídios de membrana em *E. coli* DH5- α . Dados semelhantes foram encontrados com outra linhagem de *Escherichia coli* exposta ao herbicida 2,4-diclorofenoxiacético, que reduziu a fluidez da membrana para suportar danos químicos, pois o transporte de moléculas para dentro da célula pode diminuir, e com isso, pode-se evitar a entrada de xenobióticos no interior celular (BALAGUE et al., 2001).

Compostos aromáticos ou substâncias como álcoois alifáticos de cadeia curta e principalmente álcoois de cadeia longa interferem na fluidez da membrana celular, deixando-a mais permeável a entrada de substâncias tóxicas. O butanol aumentou a fluidez de membrana e inibiu vários sistemas de transporte de membrana e enzimas em *Clostridium acetobutylicum* (VOLLHERBST-SCHNECK; SANDS; MONTENECOURT, 1984; KEWELOHET et al., 1991). Em *E. coli*, a diminuição da proporção de lipídios de membrana pode ser uma vantagem seletiva durante o crescimento na presença de etanol, diminuindo a quantidade de lípidos na membrana, menor é a área disponível para o processo passivo de difusão de íons durante o crescimento de *E. coli* na presença de etanol (DOMBEK; INGRAM, 1984).

Os adjuvantes presentes no Callisto[®] também são formados por grupos de álcool (1,2-benzisotiazolin-3-one; 1-Octanol; Poli(oxi-1,2-etanedil), alfa-isodecil-omega-hidroxi-fosfato). Dentre os adjuvantes que compõem o Callisto[®], foi comprovado que o 1-octanol alterou os lipídios de membrana de *Pseudomonas oleovorans* (CHEN; JANSSEN; WITHOLT, 1995). Assim, as moléculas desses adjuvantes podem estar influenciando na alteração lipídica observada nos tratamentos com MMC nas duas bactérias deste estudo, mas principalmente em *Bacillus* sp. CCT7729, que apresentou diferença de lipídios em MMC entre os horários (3 e 14 h – Fig. 14).

Mudanças na estrutura da membrana celular também interferem nas taxas de MDA, menores concentrações desse indicador pode sugerir uma saturação de membrana, diminuindo a proporção de ácidos graxos insaturados, a célula torna-se menos susceptível ao ataque de ERO.

Assim, uma possível causa das taxas de MDA (Fig. 7) terem diminuído em 14h nos tratamentos MMM e MMC na linhagem *Bacillus* sp. CCT7729 e em MMM e MMC em 3 horas na linhagem *Bacillus* sp. CCT7730 pode ser devido a algum processo de saturação de lipídios, pois essas bactérias podem ter reduzido a fluidez de membrana e saturado seus lipídios, como uma estratégia de defesa contra a entrada do herbicida e dos metabólitos da degradação e consequentemente a geração de ERO no interior celular.

4.4.9 Sistema de respostas e defesa ao estresse oxidativo

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que as linhagens *Bacillus* sp. CCT7729 e CCT7730, apesar de pertencerem ao mesmo gênero, apresentaram

diferentes sistemas de respostas ao estresse oxidativo gerado por Callisto® e mesotrione.

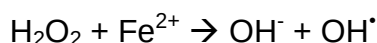
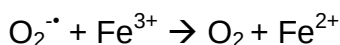
De modo geral, o $O_2^{\cdot-}$ é o primeiro radical formado na célula, por meio da redução do oxigênio molecular. Assim, a SOD é a primeira enzima a ter atividade aumentada para eliminação de $O_2^{\cdot-}$ via reação de dismutação, na qual gera O_2 e H_2O_2 (SHEN et al., 2014).

O H_2O_2 (principal produto da atividade SOD) pode ser removido por peroxidases e/ou pela CAT. Esta última converte duas moléculas de H_2O_2 em duas moléculas de H_2O e uma molécula de O_2 (CABISCOL et al., 2000).

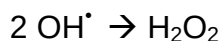
Deste modo, geralmente deve haver a atividade da SOD para então a CAT iniciar sua função. Ao observar os resultados encontrados neste estudo, verificou-se que *Bacillus* sp. CCT7729 teve sua atividade SOD aumentada em 14 h (fase *log*) e também CAT. Esses dados indicam o funcionamento clássico dessas enzimas, com aumento de atividades alternado e sequencial de SOD e CAT em resposta as ERO. No entanto, esse padrão de atividade enzimática não foi observado em *Bacillus* sp. CCT7730, particularmente, esta linhagem em 3 h (fase *lag*) apresentou a atividade da SOD menor (Fig. 10), enquanto que a CAT (Fig. 12) manteve níveis basais, apresentando a atividade SOD (Fig. 10) elevada nos tratamentos MMM e MMC apenas em 14h, período em que houve o aumento da atividade CAT (Fig. 12).

Estudos demonstram que a atividade elevada de SOD é necessária para evitar danos enzimáticos e também garantir o crescimento celular, uma vez que, essa enzima é a única capaz de controlar a concentração dos dois substratos para a reação de Haber-Weiss, o $O_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 , que originam o radical $OH^{\cdot}$ (GORT; IMLAY, 1998; RYAN et al., 2010).

Como a SOD é a única enzima responsável pela desintoxicação intracelular do anion $O_2^{\cdot-}$, sem a sua presença (como nos tratamentos MMM e MMC de 3 h, em *Bacillus* sp. CCT7730), pode ocorrer a reação de Fenton, que produz o íon hidróxido (OH^-) e radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) (LEMIRE et. al, 2013):



Na qual, a dimerização do $OH^{\cdot}$ origina o H_2O_2 :



Isso pode ser um dos motivos de *Bacillus* sp. CCT7730 apresentar a atividade CAT aumentada em MMM e MMC às 14 h (Fig. 12).

Observando a mudança na composição da membrana (Fig. 14) e os resultados de peroxidação lipídica (Fig. 7), pode-se sugerir que *Bacillus* sp. CCT7730 possivelmente saturou seus lipídios de membrana.

O MDA é um produto da ação de radicais livres que atacam diretamente ácidos graxos poliinsaturados nas membranas, quanto maior o grau de instauração na membrana, maiores serão as taxas MDA.

Deste modo, como houve mudança na composição de lipídios (Fig. 14) e uma diminuição nas taxas de MDA (Fig. 7) em 3 h, sugere-se que *Bacillus* sp. CCT7730 provavelmente saturou seus lipídios, diminuído a fluidez da membrana na fase *lag* com a exposição aos herbicidas Callisto® e mesotrione, provavelmente como mecanismo para evitar a entrada dos herbicidas na célula.

Diferentemente, *Bacillus* sp. CCT7729 possivelmente apresentou uma membrana mais fluida na fase *lag*, já que apresentou alteração de membrana (Fig. 14) e taxas elevadas de MDA (Fig. 7) em 3 h. Essa estratégia pode ter possibilitado um reconhecimento mais rápido da molécula do mesotrione e uma metabolização mais efetiva desse xenobiótico (Tabela 1).

As espécies reativas podem reagir constantemente com moléculas, inclusive exógenas, como é o caso do mesotrione. Como o balanço final de ERO produzidas em ambas linhagens (*Bacillus* sp. CCT7729 e *Bacillus* sp. CCT7730) é diferente, devido às questões de diferenciação de lipídeos de membrana e atividades de SOD e CAT, isso pode ter interferido nas diferentes rotas metabólicas e capacidade de degradação das linhagens.

Assim, nas condições avaliadas neste trabalho, a estratégia adaptativa e o sistema de respostas de *Bacillus* sp. CCT7729 acarretou em maiores vantagens adaptativas. Esses mecanismos de defesa devem ter evoluído conforme as condições ambientais impostas do ambiente de onde foram isoladas (solo e água).

4.5 CONCLUSÕES

Duas linhagens isoladas de água e solo, ambientes contaminados com o herbicida Callisto®, e identificadas como *Bacillus* sp., foram estudadas neste trabalho. Apesar de pertencerem ao mesmo gênero, estas linhagens apresentaram diferentes rotas de degradação do mesotrione, com metabólitos ainda não descritos em literatura. Além disso, as bactérias exibiram respostas diferentes ao estresse

gerado por Callisto[®], por seu princípio ativo, e pelos metabólitos da degradação. A linhagem *Bacillus* sp. CCT7729, isolada de água, apresentou maior eficiência na degradação do mesotrione, taxas de peróxido menores, atividade da catalase mais baixa e menores índices de MDA, em comparação com *Bacillus* sp. CCT7730, isolada de solo. Provavelmente os metabólitos induziram diferentes níveis de toxicidade nas bactérias, sendo que *Bacillus* sp. CCT7730 possivelmente degradou o mesotrione em compostos ainda nocivos, ao contrário da linhagem de água. Para as duas linhagens, os resultados de viabilidade celular, as quantificações de taxas de peróxido e MDA corroboraram a hipótese da maior toxicidade de Callisto[®] devido à presença de adjuvantes. O sistema de respostas de *Bacillus* sp. CCT7729 foi mais eficiente em manter a homeostase entre produção e retirada de peróxido, cuja concentração de peróxido foi aumentada nos tratamentos com Callisto[®] para ambas linhagens. Nesta mesma linha de raciocínio, *Bacillus* sp. CCT7730 apresentou a SOD aumentada e uma maior taxa de peroxidação lipídica ao final da degradação. Mesmo com a atividade CAT mais elevada, esta linhagem sofreu um maior nível de danos decorridos pela peroxidação lipídica. No entanto, as duas linhagens apresentaram a viabilidade afetada na presença dos herbicidas e alteração na composição de lipídios de membrana. Assim, apesar das duas bactérias serem filogeneticamente correlacionadas, estas linhagens apresentaram diferentes sistemas de respostas que permitiram suas adaptações ao estresse oxidativo gerado por Callisto[®] e mesotrione, em ambientes terrestres e aquáticos. Além disso, este estudo indica uma diversidade adaptativa de vias metabólicas do gênero *Bacillus* sp. para degradação do mesotrione.

4.6 REFERÊNCIAS

- BAKHOLDINA, S. I.; KRASIKOVA, I. N.; BUZOLEVA, L. S.; SHUBIN, F. N.; SOLOV'eva, T. F. Effects of culture method and growth phase on free lipid composition of *Yersinia pseudotuberculosis*. **Biochemistry (Moscow)**, v. 66, n. 4, p. 415-421, 2001.
- BALAGUE, C.; STÜRTZ, N.; DUFFARD, R.; de DUFFARD, E.; MARÍA, A. Effect of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide on *Escherichia coli* growth, chemical composition, and cellular envelope. **Environmental toxicology**, v. 16, n. 1, p. 43-53, 2001.

BATISSON, I.; CROUZET, O.; BESSE-HOGGAN, P.; SANCELME, M.; MANGOT, J. F.; MALLET, C.; BOHATIER, J. Isolation and characterization of mesotrione-degrading *Bacillus* sp. from soil. **Environmental pollution**, v. 157, n. 4, p. 1195-1201, 2009.

BERNHARDT, R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. **Journal of Biotechnology**, v. 124, n. 1, p. 128-145, 2006.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BOTELHO, R. G.; FROES, C. M.; SANTOS, J. B. Toxicity of herbicides on *Escherichia coli* growth. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 1, p. 141-146, 2012.

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

BUČKOVÁ, M.; GODOČÍKOVÁ, J.; ZÁMOCKÝ, M.; POLEK, B. Screening of bacterial isolates from polluted soils exhibiting catalase and peroxidase activity and diversity of their responses to oxidative stress. **Current microbiology**, v. 61, n. 4, p. 241-247, 2010.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **Int Microbiol**, v. 3, p. 3-8, 2000.

CAI, Z.; SHI, S.; LI, S.; YANG, B.; CHEN, Q.; ZHAO, X. Microbial degradation characteristics and kinetics of novel pyrimidinyloxybenzoic herbicide ZJ0273 by a newly isolated *Bacillus* sp. CY. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 12, p. 8831-8838, 2013.

CHEN, Q.; JANSSEN, D. B.; WITHOLT, B. Growth on octane alters the membrane lipid fatty acids of *Pseudomonas oleovorans* due to the induction of *alkB* and synthesis of octanol. **Journal of bacteriology**, v. 177, n. 23, p. 6894-6901, 1995.

CIA, M. C.; GUIMARÃES, A. C. R.; MEDICI, L. O.; CHABREGAS, S. M.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and-sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biology**, v. 161, n. 3, p. 313-324, 2012.

COLAS, H.; EWEN, K. M.; HANNEMANN, F.; BISTOLAS, N.; WOLLENBERGER, U.; BERNHARDT, R.; de OLIVEIRA, P. Direct and mediated electrochemical response of the cytochrome P450 106A2 from *Bacillus megaterium* ATCC 13368. **Bioelectrochemistry**, v. 87, p. 71-77, 2012.

CROUZET, O.; BATISSON, I.; BESSE-HOGGAN, P.; BONNEMOY, F.; BARDOT, C.; POLY, F.; MALLET, C. Response of soil microbial communities to the herbicide mesotrione: a dose-effect microcosm approach. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 193-202, 2010.

DELAWARE, M.; OHTSUBO, Y.; OHTA, A. The dual functions of biphenyl-degrading ability of *Pseudomonas* sp. KKS102: energy acquisition and substrate detoxification. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 67, n. 9, p. 1970-1975, 2003.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 4, p. 316-328, 2005.

DOMBEK, K. M.; INGRAM, L. O. Effects of ethanol on the *Escherichia coli* plasma membrane. **Journal of bacteriology**, v. 157, n. 1, p. 233-239, 1984.

DURAND, S.; AMATO, P.; SANCELME, M.; DELORT, A. M.; COMBOURIEU, B.; BESSE-HOGGAN, P. First isolation and characterization of a bacterial strain that biotransforms the herbicide mesotrione. **Letters in applied microbiology**, v. 43, n. 2, p. 222-228, 2006.

EL-FANTROUSSI, S. Enrichment and molecular characterization of a bacterial culture that degrades methoxy-methyl urea herbicides and their aniline derivatives. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5110-5115, 2000.

ELSAIED, O. F.; MAILLARD, E.; VUILLEUMIER, S.; IMFELD, G. Bacterial communities in batch and continuous-flow wetlands treating the herbicide S-metolachlor. **Science of The Total Environment**, v. 499, p. 327-335, 2014.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, 186-194, 1998a.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, 175-185, 1998b.

GOMES-JUNIOR, R. A.; GRATÃO, P. L.; GAZIOLA, S. A.; MAZZAFERA, P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. **Functional Plant Biology**, v. 34, n. 5, p. 449-456, 2007.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, 8, 195-202, 1998.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **The American journal of clinical nutrition**, v. 57, n. 5, p. 715S-724S, 1993.

HARE, N. J.; SCOTT, N. E.; SHIN, E. H. H.; CONNOLLY, A. M.; LARSEN, M. R.; PALMISANO, G.; CORDWELL, S. J. Proteomics of the oxidative stress response induced by hydrogen peroxide and paraquat reveals a novel AhpC-like protein in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proteomics**, v. 11, n. 15, p. 3056-3069, 2011.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 125, n. 1, p. 189-198, 1968.

HERNÁNDEZ, M.; MORGANTE, V.; VILLALOBOS, P.; FLORES, C.; GONZÁLEZ, M.; SEEGER, M. **S-triazine-herbicide-degrading bacteria, product for the bioremediation and method of bioremediation**. U.S. Patent n. 8,263,385, 11 set. 2012.

HOU, Y.; DONG, W.; WANG, F.; Li, J.; SHEN, W.; LI, Y.; CUI, Z. Degradation of acetochlor by a bacterial consortium of *Rhodococcus* sp. T3-1, *Delftia* sp. T3-6 and *Sphingobium* sp. MEA3-1. **Letters in applied microbiology**, 2014.

IMLAY, J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 443-454, 2013.

IŞIK, K.; AYAR KAYALI, H.; ŞAHİN, N.; ÖZTÜRK GÜNDOĞDU, E.; TARHAN, L. Antioxidant response of a novel *Streptomyces* sp. M3004 isolated from legume rhizosphere to H₂O₂ and paraquat. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 235-243, 2007.

JOLY, P.; BONNEMOY, F.; CHARVY, J. C.; BOHATIER, J.; MALLET, C. Toxicity assessment of the maize herbicides S-metolachlor, benoxacor, mesotrione and nicosulfuron, and their corresponding commercial formulations, alone and in mixtures, using the Microtox® test. **Chemosphere**, v. 93, n. 10, p. 2444-2450, 2013.

KEHRES, D. G.; JANAKIRAMAN, A.; SLAUCH, J. M.; MAGUIRE, M. E. Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mntH transcription by H₂O₂, Fe²⁺, and Mn²⁺. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 12, p. 3151-3158, 2002.

KRAUS, T. E.; MCKERSIE, B. D.; FLETCHER, R. A. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, v. 145, n. 4, p. 570-576, 1995.

LENNON, J. T.; AANDERUD, Z. T.; LEHMKUHL, B. K.; SCHOOLMASTER JR, D. R. Mapping the niche space of soil microorganisms using taxonomy and traits. **Ecology**, v. 93, n. 8, p. 1867-1879, 2012.

LEWIS, R. W.; BOTHAM, J. W. A review of the mode of toxicity and relevance to humans of the triketone herbicide 2-(4-methylsulfonyl-2-nitrobenzoyl)-1, 3-cyclohexanedione. **Crit Ver Toxicol**, 43, 185-99, 2013.

LIN, X.; XU, X.; YANG, C.; ZHAO, Y.; FENG, Z.; DONG, Y. Activities of antioxidant enzymes in three bacteria exposed to bensulfuron-methyl. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 7, p.1899-1904, 2009.

LI, Z.; SHAO, T.; MIN, H.; LU, Z.; XU, X. Stress response of *Burkholderia cepacia* WZ1 exposed to quinclorac and the biodegradation of quinclorac. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 984-990, 2009.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13-30, 2011.

MARINOZZI, M.; COPPOLA, L.; MONACI, E.; KARPOUZAS, D. G.; PAPADOPOULOU, E.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U.; VISCHETTI, C. The dissipation of three fungicides in a biobed organic substrate and their impact on the structure and activity of the microbial community. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 4, p. 2546-2555, 2013.

MARGINO, S.; MARTANI, E.; MAGDALENA, M. Superoxide dismutase of *Micrococcus* sp. S2 and its involve in Paraquat detoxification. **Indonesian Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 1, 2011.

MA, R.; KAUNDUN, S. S.; TRANEL, P. J.; RIGGINS, C. W.; MCGINNESS, D. L.; HAGER, A. G.; ... & RIECHERS, D. E. Distinct detoxification mechanisms confer resistance to mesotrione and atrazine in a population of waterhemp. **Plant physiology**, v. 163, n. 1, p. 363-377, 2013.

MARTINS, P. F.; CARVALHO, G.; GRATAO, P. L.; DOURADO, M. N.; PILEGGI, M.; ARAUJO, W. L.; AZEVEDO, R. A. Effects of the herbicides acetochlor and metolachlor on antioxidant enzymes in soil bacteria. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1186-1195, 2011.

MATTHEWS, G.; BATEMAN, R.; MILLER, P. **Pesticide application methods**. John Wiley & Sons, 2014.

MENNA, P., HUNGRIA, M., BARCELLOS, F.G., BANGEL, E.V., HESS, P.N., MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, 315-332, 2006.

MERCHANT, S. S.; HELMANN, J. D. Elemental economy: microbial strategies for optimizing growth in the face of nutrient limitation. **Advances in microbial physiology**, v. 60, p. 91, 2012.

MISHRA, S.; IMLAY, J. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide?. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 525, n. 2, p. 145-160, 2012.

MITCHELL, G.; BARTLETT, D. W.; FRASER, T. E. M.; HAWKES, T. R.; HOLT, D. C.; TOWNSON, J. K.; WICHERT, R. A. Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. **Pest management science**, v. 57, n. 2, p. 120-128, 2001.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUIERA, J. O. **Xenobióticos no Solo**. Microbiologia e Bioquímica do Solo. Lavras: Editora UFLA, 2002. p. 243-284.

NARHI, L. O.; FULCO, A. J. Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 16, p. 7160-7169, 1986.

NITI, C.; SUNITA, S.; KAMLESH, K.; RAKESH, K. Bioremediation: An emerging technology for remediation of pesticides. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 17, p. 4, 2013.

OLCHANHESKI, L. R. Estratégias adaptativas da linhagem não ambiental *Escherichia coli* DH5- α ao herbicida mesotrione. 2014. 71 f. Dissertação – Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, Paraná, 2014.

OLCHANHESKI, L. R.; DOURADO, M. N.; BELTRAME, F. L.; ZIELINSKI, A. A.; DEMIATE, I. M.; PILEGGI, S. A.; PILEGGI, M. Mechanisms of Tolerance and High Degradation Capacity of the Herbicide Mesotrione by *Escherichia coli* Strain DH5- α . **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e99960, 2014.

ORTIZ-HERNÁNDEZ, M. L.; SÁNCHEZ-SALINAS, E.; DANTÁN-GONZÁLEZ, E.; CASTREJÓN-GODÍNEZ, M. L. **Pesticide Biodegradation: Mechanisms, Genetics and Strategies to Enhance the Process**, 2013.

PARK, W.; JEON, C. O.; CADILLO, H.; DERITO, C.; MADSEN, E. L. Survival of naphthalene-degrading *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 in naphthalene-amended soils: toxicity of naphthalene and its metabolites. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, n. 3, p. 429-435, 2004.

PETERS, L. P.; CARVALHO, G.; MARTINS, P. F.; DOURADO, M. N.; VILHENA, M. B.; PILEGGI, M.; AZEVEDO, R. A. Differential Responses of the Antioxidant System of Ametryn and Clomazone Tolerant Bacteria. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e112271, 2014.

PILEGGI, M.; PILEGGI, S. A. V.; OLCHANHESKI, L. R.; DA SILVA, P. A. G.; MUNOZ GONZALEZ, A. M.; KOSKINEN, W. C.; SADOWSKY, M. J. Isolation of mesotrione-degrading bacteria from aquatic environments in Brazil. **Chemosphere**, v. 86, n. 11, p. 1127-1132, 2012.

READ, T. D.; PETERSON, S. N.; TOURASSE, N.; BAILLIE, L. W.; PAULSEN, I. T.; NELSON, K. E.; ... & HANNA, P. C. The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. **Nature**, v. 423, n. 6935, p. 81-86, 2003.

RELYEA, R. A. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. **Ecological applications**, v. 15, n. 2, p. 618-627, 2005.

RODRIGUES, V.D.; MARTINS, P.F.; GAZIOLA, S.A.; AZEVEDO, R.A.; OTTOBONI, L.M.M. Antioxidant enzyme activity in *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR maintained in contact with chalcopirite. **Process Biochem**, v. 45, p. 914–918, 2010.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SCHIMEL, J.; BALSER, T. C.; WALLENSTEIN, M. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. **Ecology**, v. 88, n. 6, p. 1386-1394, 2007.

SEEGER, M.; HERNÁNDEZ, M.; MÉNDEZ, V.; PONCE, B.; CÓRDOVA, M.; GONZÁLEZ, M. Bacterial degradation and bioremediation of chlorinated herbicides and biphenyls. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 10, n. 3, p. 320-332, 2010.

SETH, V.; BANERJEE, B. D.; CHAKRAVORTY, A. K. Lipid peroxidation, free radical scavenging enzymes, and glutathione redox system in blood of rats exposed to propoxur. **Pesticide Biochemistry and physiology**, v. 71, n. 3, p. 133-139, 2001.

SHEN, D. S.; TAO, X. Q.; SHEN, C. C.; SHENTU, J. L.; WANG, M. Z. Antioxidant Defense Enzymes Response Following Polychlorinated Biphenyls Exposure to *Eisenia fetida* in Actual Polluted Soil. In: **Advanced Materials Research**. 2014. p. 142-146.

STRÄUBER, H.; MÜLLER, S. Viability states of bacteria - specific mechanisms of selected probes. **Cytometry Part A**, v. 77, n. 7, p. 623-634, 2010.

TAMAMES, J.; ABELLÁN, J. J.; PIGNATELLI, M.; CAMACHO, A.; MOYA, A. Environmental distribution of prokaryotic taxa. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 85, 2010.

TIRONI, S. P.; BELO, A. F.; FIALHO, C. M. T.; GALON, L.; FERREIRA, E. A.; SILVA, A. A.; COSTA, M. D.; BARBOSA, M. H. P. Efeito de herbicidas na atividade microbiana do solo. **Planta Daninha**, v. 27, p. 995-1004, 2009.

ZAMOCKY, M.; FURTMÜLLER, P. G.; OBINGER, C. Evolution of catalases from bacteria to humans. **Antioxidants & redox signaling**, v. 10, n. 9, p. 1527-1548, 2008.

ZHANG, Y.; MENG, D.; WANG, Z.; GUO, H.; WANG, Y.; WANG, X.; DONG, X. Oxidative stress response in atrazine-degrading bacteria exposed to atrazine. **Journal of hazardous materials**, v. 229, p. 434-438, 2012.

ZHANG, H.; ZHANG, Y.; HOU, Z.; WU, X.; GAO, H.; SUN, F.; PAN, H. Biodegradation of triazine herbicide metribuzin by the strain *Bacillus* sp. N1. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 49, n. 2, p. 79-86, 2014.

ZHANG, T.; KIM, B.; LEVARD, C.; REINSCH, B. C.; LOWRY, G. V.; DESHUSSES, M. A.; Hsu-Kim, H. Methylation of mercury by bacteria exposed to dissolved, nanoparticulate, and microparticulate mercuric sulfides. **Environmental science & technology**, v. 46, n. 13, p. 6950-6958, 2012.

ZHANG, Yong-Mei; ROCK, C. O. Membrane lipid homeostasis in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 222-233, 2008.

WANG, J.; ZHU, L.; WANG, Q.; WANG, J.; XIE, H. Isolation and Characterization of Atrazine Mineralizing *Bacillus subtilis* Strain HB-6. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e107270, 2014.

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

WUERGES, J.; LEE, J.W.; YIM, Y.I.; YIM, H.S.; KANG, S.O.; CARUGO, K.D. Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, p. 8569–8574, 2004.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEKSEEVA, T.; KOLYAGIN, Y.; SANCELME, M.; BESSE-HOGGAN, P. Effect of soil properties on pure and formulated mesotrione adsorption onto vertisol (Limagne plane, Puy-de-Dôme, France). **Chemosphere**, v. 111, p. 177-183, 2014.

ANDEF (**Associação Nacional de Defesa Vegetal**). **Tecnologia em primeiro lugar**. Defesa Vegetal, 2009.

ARAÚJO, ASF de; MONTEIRO, R. T. R.; ABARKELI, R. B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. **Chemosphere**, v. 52, n. 5, p. 799-804, 2003.

ARNOT, J. A.; GOBAS, F. A. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. **Environmental Reviews**, v. 14, n. 4, p. 257-297, 2006.

BALAGUE, C.; STÜRTZ, N.; DUFFARD, R.; de DUFFARD, E.; MARÍA, A. Effect of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide on *Escherichia coli* growth, chemical composition, and cellular envelope. **Environmental toxicology**, v. 16, n. 1, p. 43-53, 2001.

BAKHOLDINA, S. I.; KRASIKOVA, I. N.; BUZOLEVA, L. S.; SHUBIN, F. N.; SOLOV'eva, T. F. Effects of culture method and growth phase on free lipid composition of *Yersinia pseudotuberculosis*. **Biochemistry (Moscow)**, v. 66, n. 4, p. 415-421, 2001.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, Juceni P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 113, 2006.

KONDA, L. N.; PÁSZTOR, Z. Environmental distribution of acetochlor, atrazine, chlorpyrifos, and propisochlor under field conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 3859-3863, 2001.

BENOV, L. T.; FRIDOVICH, I. Escherichia coli expresses a copper-and zinc-containing superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 41, p. 25310-25314, 1994.

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

BATISSON, I.; CROUZET, O.; BESSE-HOGGAN, P.; SANCELME, M.; MANGOT, J. F.; MALLET, C.; BOHATIER, J. Isolation and characterization of mesotrione-degrading *Bacillus* sp. from soil. **Environmental pollution**, v. 157, n. 4, p. 1195-1201, 2009.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **Int Microbiol**, v. 3, p. 3-8, 2000.

DUARTE, V.; LATOUR, Jean-Marc. PerR vs OhrR: selective peroxide sensing in *Bacillus subtilis*. **Molecular BioSystems**, v. 6, n. 2, p. 316-323, 2010.

CHA, E. S.; LEE, Y. K.; MOON, E. K.; KIM, Y. B.; LEE, Y. J.; JEONG, W. C.; LEE, W. J. Paraquat application and respiratory health effects among South Korean farmers. **Occupational and environmental medicine**, v. 69, n. 6, p. 398-403, 2012.

CHRISMAN, J. D. R.; KOIFMAN, S. de N. S. P.; MOREIRA, J. C.; KOIFMAN, R. J.; MEYER, A. Pesticide sales and adult male cancer mortality in Brazil. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 212, n. 3, p. 310-321, 2009.

DURAND, S.; AMATO, P.; SANCELME, M.; DELORT, A. M.; COMBOURIEU, B.; BESSE-HOGGAN, P. First isolation and characterization of a bacterial strain that biotransforms the herbicide mesotrione. **Letters in applied microbiology**, v. 43, n. 2, p. 222-228, 2006.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-194, 1998a.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998b.

FAULKNER, M. J.; MA, Z.; FUANGTHONG, M.; HELMANN, J. D. Derepression of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide stress response leads to iron deficiency. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 5, p. 1226-1235, 2012.

GUENGERICH, F. P. Human cytochrome P450 enzymes. In: **Cytochrome P450**. Springer US, 1995. p. 473-535.

GOMES-JUNIOR, R. A.; GRATÃO, P. L.; GAZIOLA, S. A.; MAZZAFERA, P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. **Functional Plant Biology**, v. 34, n. 5, p. 449-456, 2007.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, p. 195-202, 1998.

GORT, A. S.; IMLAY, J. A. Balance between endogenous superoxide stress and antioxidant defenses. **J. Bacteriol**, v. 180, 1402–1410, 1998.

HANKE, W.; JUREWICZ, J. The risk of adverse reproductive and developmental disorders due to occupational pesticide exposure: an overview of current epidemiological evidence. **International journal of occupational medicine and environmental health**, v. 17, n. 2, p. 223-243, 2004.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 125, n. 1, p. 189-198, 1968.

HERNÁNDEZ, A. F.; PARRÓN, T.; TSATSAKIS, A. M.; REQUENA, M.; ALARCÓN, R.; LÓPEZ-GUARNIDO, O. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their relevance to human health. **Toxicology**, v. 307, p. 136-145, 2013.

HUGIE, J. A.; BOLLERO, G. A.; TRANEL, P. J.; RIECHERS, D. E. Defining the rate requirements for synergism between mesotrione and atrazine in redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*). **Weed science**, v. 56, n. 2, p. 265-270, 2008.

HUMPHRIES, M. S. DDT residue contamination in sediments from Lake Sibaya in northern KwaZulu-Natal, South Africa: Implications for conservation in a World Heritage Site. **Chemosphere**, v. 93, n. 8, p. 1494-1499, 2013.

IMLAY, J. A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. **Annual review of biochemistry**, v. 77, p. 755, 2008.

IMLAY, J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 443-454, 2013.

INAOKA, T.; MATSUMURA, Y.; TSUCHIDO, T. SodA and Manganese Are Essential for Resistance to Oxidative Stress in Growing and Sporulating Cells of *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 6, p. 1939-1943, 1999.

JARDIM, A. N.; CALDAS, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food—Results from 2001 to 2010. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 607-616, 2012.

JOLY, P.; BONNEMOY, F.; CHARVY, J. C.; BOHATIER, J.; MALLET, C. Toxicity assessment of the maize herbicides S-metolachlor, benoxacor, mesotrione and nicosulfuron, and their corresponding commercial formulations, alone and in mixtures, using the Microtox® test. **Chemosphere**, v. 93, n. 10, p. 2444-2450, 2013.

KANAVOURAS, K.; TZATZARAKIS, M. N.; MASTORODEMOS, V.; PLAITAKIS, A.; TSATSAKIS, A. M. A case report of motor neuron disease in a patient showing significant level of DDTs, HCHs and organophosphate metabolites in hair as well as levels of hexane and toluene in blood. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 256, n. 3, p. 399-404, 2011.

KARAM, D.; CRUZ, M. B. **Características do herbicida mesotrione na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. 4p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 52).

KRAUS, T. E.; MCKERSIE, B. D.; FLETCHER, R. A. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, v. 145, n. 4, p. 570-576, 1995.

LECLERE, V.; BOIRON, P.; BLONDEAU, R. Diversity of superoxide-dismutases among clinical and soil isolates of *Streptomyces* species. **Current microbiology**, v. 39, n. 6, p. 365-368, 1999.

LEMIRE, J. A.; JOE, J. H.; RAYMOND J. T. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 371-384, 2013.

LEWIS, R. W.; BOTHAM, J. W. A review of the mode of toxicity and relevance to humans of the triketone herbicide 2-(4-methylsulfonyl-2-nitrobenzoyl)-1, 3-cyclohexanedione. **Crit Ver Toxicol**, 43, 185-99, 2013.

LIN, X.; XU, X.; YANG, C.; ZHAO, Y.; FENG, Z.; DONG, Y. Activities of antioxidant enzymes in three bacteria exposed to bensulfuron-methyl. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 7, p.1899-1904, 2009.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13-30, 2011.

MARINOZZI, M.; COPPOLA, L.; MONACI, E.; KARPOUZAS, D. G.; PAPADOPOULOU, E.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U.; VISCHETTI, C. The dissipation of three fungicides in a biobed organic substrate and their impact on the structure and activity of the microbial community. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 4, p. 2546-2555, 2013.

MA, R.; KAUNDUN, S. S.; TRANEL, P. J.; RIGGINS, C. W.; MCGINNESS, D. L.; HAGER, A. G.; RIECHERS, D. E. Distinct Detoxification Mechanisms Confer Resistance to Mesotrione and Atrazine in a Population of Waterhemp. **Plant physiology**, v. 163, n. 1, p. 363-377, 2013.

MATTHEWS, G.; BATEMAN, R.; MILLER, P. **Pesticide application methods**. John Wiley & Sons, 2014.

MENNA, P., HUNGRIA, M., BARCELLOS, F.G., BANGEL, E.V., HESS, P.N., MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite

rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, 315-332, 2006.

MITCHELL, G.; BARTLETT, D. W.; FRASER, T. E. M.; HAWKES, T. R.; HOLT, D. C.; TOWNSON, J. K.; WICHERT, R. A. Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. **Pest management science**, v. 57, n. 2, p. 120-128, 2001.

MOHAMMED, M. S. Degradation of methomyl by the novel bacterial strain *Stenotrophomonas maltophilia* M1, **Euro. J. biotechnol.**, 12, 1-6, 2009.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUIERA, J. O. **Xenobióticos no Solo**. Microbiologia e Bioquímica do Solo. Lavras: Editora UFLA, 2002. p. 243-284.

NITI, C.; SUNITA, S.; KAMLESH, K.; RAKESH, K. Bioremediation: An emerging technology for remediation of pesticides. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 17, p. 4, 2013.

OLCHANHESKI, L. R.; DOURADO, M. N.; BELTRAME, F. L.; ZIELINSKI, A. A.; DEMIATE, I. M.; PILEGGI, S. A.; PILEGGI, M. Mechanisms of Tolerance and High Degradation Capacity of the Herbicide Mesotrione by *Escherichia coli* Strain DH5- α . **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e99960, 2014.

OLCHANHESKI, L. R. Estratégias adaptativas da linhagem não ambiental *Escherichia coli* DH5- α ao herbicida mesotrione. 2014. 71 f. Dissertação – Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, Paraná, 2014.

ORTIZ-HERNÁNDEZ, M. L.; SÁNCHEZ-SALINAS, E.; DANTÁN-GONZÁLEZ, E.; CASTREJÓN-GODÍNEZ, M. L. **Pesticide Biodegradation: Mechanisms, Genetics and Strategies to Enhance the Process**, 2013.

PARRÓN, T.; REQUENA, M.; HERNÁNDEZ, A. F.; ALARCÓN, R. Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 256, n. 3, p. 379-385, 2011.

PILEGGI, M.; PILEGGI, S. A. V.; OLCHANHESKI, L. R.; SILVA, P. A. G.; MUNOZ GONZALEZ, A. M.; KOSKINEN, W. C.; SADOWSKY, M. J. Isolation of mesotrione-degrading bacteria from aquatic environments in Brazil. **Chemosphere**, v. 86, n. 11, p. 1127-1132, 2012.

RAYMOND, J.; SEGRÈ, D. The effect of oxygen on biochemical networks and the evolution of complex life. **Science**, v. 311, n. 5768, p. 1764-1767, 2006.

RITMANN, B. E.; JACSON, D. E.; STORCK, S. L. Potential for treatment of hazardous organic chemicals with biological process, **Biotreat. Sys.**, 3, 15-64, 1988.

REHAN, M.; KLUGE, M.; FRÄNZLE, S.; KELLNER, H.; ULLRICH, R.; HOFRICHTER, M. Degradation of atrazine by *Frankia alni* ACN14a: gene regulation, dealkylation, and dechlorination. **Applied microbiology and biotechnology**, p. 1-11, 2014.

RELYEA, R. A. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. **Ecological applications**, v. 15, n. 2, p. 618-627, 2005.

RYAN, K. C.; JOHNSON, O. E.; CABELLI, D. E.; BRUNOLD, T. C.; MARONEY, M. J. Nickel superoxide dismutase: structural and functional roles of Cys2 and Cys6. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 795-807, 2010.

RODRIGO, M. A.; OTURAN, N.; OTURAN, M. A. Electrochemically Assisted Remediation of Pesticides in Soils and Water: A Review. **Chemical reviews**, v. 114, n. 17, p. 8720-8745, 2014.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SESSIONS, A. L.; DOUGHTY, D. M.; WELANDER, P. V.; SUMMONS, R. E.; NEWMAN, D. K. The continuing puzzle of the great oxidation event. **Current Biology**, v. 19, n. 14, p. R567-R574, 2009.

SHEN, D. S.; TAO, X. Q.; SHEN, C. C.; SHENTU, J. L.; WANG, M. Z. Antioxidant Defense Enzymes Response Following Polychlorinated Biphenyls Exposure to *Eisenia fetida* in Actual Polluted Soil. In: **Advanced Materials Research**. 2014. p. 142-146.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**, v. 25, p. 207-218, 2003.

TSATSAKIS, A. M.; ZAFIROPOULOS, A.; TZATZARAKIS, M. N.; TZANAKAKIS, G. N.; KAFATOS, A. Relation of PON1 and CYP1A1 genetic polymorphisms to clinical findings in a cross-sectional study of a Greek rural population professionally exposed to pesticides. **Toxicology letters**, v. 186, n. 1, p. 66-72, 2009.

ZHANG, Yong-Mei; ROCK, C. O. Membrane lipid homeostasis in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 222-233, 2008.

ZELIGER, H. **Human toxicology of chemical mixtures**: toxic consequences beyond the impact of one-component product and environmental exposures. William Andrew, 2008.

WANG, Y.; MO, X.; ZHANG, L.; WANG, Q. Four superoxide dismutase (isozymes) genes of *Bacillus cereus*. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 355-360, 2011.

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