

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

BRUNA STECKLING

RESPOSTAS ADAPTATIVAS DE *Bacillus megaterium* Mes13 AO HERBICIDA
CALLISTO: DEGRADAÇÃO, COMETABOLISMO E MODIFICAÇÕES NA
MEMBRANA PLASMÁTICA

Ponta Grossa

2013

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

BRUNA STECKLING

RESPOSTAS ADAPTATIVAS DE *Bacillus megaterium* Mes13 AO HERBICIDA
CALLISTO: DEGRADAÇÃO, COMETABOLISMO E MODIFICAÇÕES NA
MEMBRANA PLASMÁTICA

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pileggi

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

Ponta Grossa

2013

Catálogo na Fonte
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

- S811 Steckling, Bruna
Respostas adaptativas de *Bacillus megaterium* Mes13 ao herbicida
Callisto: degradação, cometabolismo e modificações na membrana plasmática /
Bruna Steckling. Ponta Grossa, 2013.
61f.
- 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
Orientadora: Profª. Dra. Sônia Alvim Veiga Pileggi
- 1.SOD. 2. CAT. 3. Biodegradação de herbicidas. 4. Fonte de nitrogênio.
5. modificações na membrana plasmática I. Pileggi, Marcos. II. Pileggi, Sônia
Alvim Veiga.III Universidade Estadual de Ponta Grossa. Universidade
Estadual do Centro – Oeste. Mestrado em Ciências Biológicas. IV. T.

CDD: 575



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

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



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 12/2013

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 **BRUNA STECKLING**.

Aos treze dias do mês de março de dois mil e treze, 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) **BRUNA STECKLING**, 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^a Sônia Alvim Veiga Pileggi (Co-orientadora UEPG) Dr. Ricardo Antunes de Azevedo (ESALQ USP) e Dr. Ivo Mottin Demiate (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: "**Avaliação do Sistema Anti-oxidativo de linhagem de *Bacillus sp* Degradador do Herbicida Mesotrione**". 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)

Alteração de Título: sim ☒ não ☐

Novo título: Respostas adaptativas de *Bacillus sp.* Mes 13 ao herbicida Callisto: degradação, cometa-bolismo e modificações na membrana plasmática.

Ponta Grossa, 13 de março de dois mil e treze.

Prof. Dr. Marcos Pileggi

Prof^a Dr^a Sônia Alvim Veiga Pileggi

Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo

Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate

Agradecimentos

À CAPES pelo apoio financeiro;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Pileggi, pela oportunidade e confiança, por acreditar que eu poderia adentrar na pesquisa científica, mesmo sem apresentar experiência na área. Agradeço-o pela dedicação e paciência em me conduzir pelos tortuosos caminhos do mundo científico.

Aos meus pais, Bruno e Anastasia, por não medir esforços para me ajudar na realização desse sonho. Por entenderem minha ausência e estarem disponíveis nos momentos em que eu precisava de colo, onde, com amor e carinho, me fortificaram. Por aguentarem minha ansiedade em todas as grandes etapas que o mestrado possui, minha choradeira nos momentos de desespero e compartilharem a alegria por mais uma etapa vencida. Por tudo, eu agradeço.

Ao meu irmão, Lúcio, pela parceria no rock e na vida.

Ao amigo e colega de laboratório Ricardo, pelo grande auxílio durante a realização dos meus experimentos, pela confiança e paciência em transmitir conhecimento, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos do laboratório de Microbiologia, Leandro, Marcella, Henrique, Angeline, Lilian, Janaína e Bruno, por tornar meus dias de trabalho muito mais agradáveis e fazer de nossa convivência diária uma grande festa! Vocês encheram de cores até meus dias mais cinzas e, por isso, sou grata.

À querida Jana, pelos conselhos e a amizade, pelas sugestões e contribuições no trabalho e por todos os momentos divertidos que passamos juntas no laboratório.

À Arlene e ao Sérgio, por me acolherem quando precisei e não medirem esforços para fazer eu me sentir em casa. Principalmente a Arlene, pelos bons momentos de convivência diária, pelos conselhos, pela confiança e por me ensinar a acreditar em mim mesma.

Aos amigos, Alessandra, Luana, Rafael, Alisson, Ithiara, Lis, Máisa e Alexandre, que mesmo distantes me apoiaram e aconselharam. Vocês foram a alegria dos meus feriados e me ajudaram a sair da maçante rotina da pós graduação.

Agradeço também os professores Ricardo Antunes de Azevedo, Sônia Alvim Veiga Pileggi, Ivo Mottin Demiaty, Flávio Luis Beltrame, por me auxiliarem na realização do trabalho.

Aos professores e funcionários do Programa.

Por fim, gostaria de agradecer a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

Resumo

O uso de agroquímicos se faz necessário para aumentar a produtividade e suprir a crescente demanda por alimentos. Entretanto, estes químicos podem persistir no meio ambiente e serem danosos aos organismos não-alvo. O mesotrione é um herbicida seletivo indicado para o controle pré e pós-emergente de plantas daninhas na cultura do milho com alto potencial de lixiviação, que apresenta a capacidade de inibir a atividade da enzima 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenase (HPPD), interferindo na síntese de carotenóides. Neste trabalho analisamos três possíveis estratégias utilizadas pela linhagem *Bacillus megaterium* Mes13 para tolerar o herbicida Callisto e seu princípio ativo, mesotrione: expressão de enzimas antioxidativas, degradação do princípio ativo e modificações na estrutura de lipídeos da célula. Avaliações de atividade e perfil proteico de catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) foram realizadas para avaliar os possíveis danos gerados pelo contato da bactéria com o herbicida. Nenhuma isoforma específica foi observada em resposta aos tratamentos contendo os xenobióticos e a atividade de CAT foi mais baixa no tratamento contendo Callisto indicando outros possíveis mecanismos de defesa celular. Corroborando estes resultados, as análises de peroxidação lipídica (MDA), que dependem do estado de saturação de lipídeos de membrana, mostraram taxas mais baixas no tratamento com Callisto. Modificações na membrana bacteriana foram observadas nos tratamentos contendo Callisto, o que, possivelmente diminuíram as taxas de peroxidação lipídica. Esta linhagem não utiliza mesotrione como fonte de nitrogênio e carbono, contudo, o processo de degradação do herbicida foi mais eficiente na ausência de Nitrato de Sódio em meio de cultura. A degradação provavelmente se dá por uma enzima inespecífica. Na ausência da fonte primária de nitrogênio, esta linhagem degrada o mesotrione por cometabolismo. Provavelmente as modificações na membrana plasmática aliada a degradação da molécula do xenobiótico conferiram a linhagem capacidade de tolerar a presença dos herbicidas nas condições experimentais testadas.

Palavras-chave: SOD, CAT, MDA, Biodegradação de herbicidas, Fonte de nitrogênio, modificações na membrana plasmática.

Abstract

Agrochemicals have become necessary to improve crops yields and provide the increasing demand for foods. Nevertheless, pesticides can persist in the environment and be harmful to non target organisms. Mesotrione, the active ingredient of Callisto, is a selective herbicide recommended for pre and post-emergent weed control in corn culture, with high leaching potential, and it has the ability to inhibit the activity of HPPD enzyme, interfering with the synthesis of carotenoids in target plants. The aim of this work was to evaluate the strategies used by the strain *Bacillus megaterium* Mes13 to avoid toxic effects of Callisto and its active substance, mesotrione, by analyzing the differential expression of antioxidative enzymes, mesotrione degradation, and changes in membrane structure. There were no specific responses from isozymes to herbicides. Catalase activity at Callisto treatment was lower than control, suggesting other mechanisms affecting cellular defense. Lipid peroxidation (MDA), which depends on saturation degree of membrane fatty acids, was lower at Callisto treatment, and changes in bacterial membrane were observed at Callisto treatment, probably protecting membrane against lipid peroxidation. Mesotrione was used neither as C nor N source for growing of *Bacillus megaterium*, although degradation of mesotrione was higher at minimal medium with no N source, suggesting that herbicide degradation occurs as a cometabolism. Probably the membrane modifications and mesotrione degradation made this bacteria able to tolerate the herbicides at experimental conditions.

Key words: SOD, CAT, MDA, herbicides biodegradation, Nitrogen source, membrane modifications.

Lista de abreviaturas e siglas

AMBA - Ácido benzóico 2-amino-4-metilsulfonil

BSA- Albumina de soro bovino (Bovine serum albumin)

CAT - Catalase

DDT- Dicloro-difenil-tricloroetano

DTT - Ditioneitol

EDTA - Ácido etileno diamino tetracético

EROs - Espécies reativas de oxigênio

HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência (High performance liquid chromatograph)

HPPD- 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenase

LB- Caldo Luria (Luria Broth)

MDA- Malondialdeído

MNBA - Ácido 4-metilsulfonil-2-nitrobenzóico

MM - Meio mineral

MMC - Meio Mineral com Callisto

MMM - Meio Mineral com mesotrione

NBT- Nitroazul tetrazólio

PBS- Solução tampão de fosfato (Phosphate buffer solution)

PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida

PVPP – Polivinilpirrolidona

RPM- Rotações por minuto

SOD - Superóxido dismutase

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TBA- Ácido 2-tiobarbitúrico

TCA- Ácido tricloroacético

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 AGROQUÍMICOS	9
1.1.1 <i>Caracterização do herbicida mesotrione</i>	11
1.1.2 <i>Degradação</i>	13
1.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	15
1.2.1 <i>Radical superóxido e superóxido dismutase</i>	16
1.2.1 <i>Peróxido de Hidrogênio e Catalase</i>	18
1.3 ADAPTAÇÕES DA MEMBRANA AO ESTRESSE QUÍMICO	19
2 OBJETIVO.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	22
3.2 METODOLOGIAS.....	22
3.2.1 <i>Químicos utilizados</i>	22
3.2.2 <i>Isolamento de bactérias tolerantes ao herbicida</i>	22
3.2.3 <i>Análise de degradação do herbicida</i>	23
3.2.4. <i>Identificação da linhagem selecionada</i>	23
3.2.4.1 <i>Amplificação do gene 16S</i>	23
3.2.4.2 <i>Sequenciamento</i>	24
3.2.5 <i>Crescimento bacteriano</i>	24
3.2.6 <i>Mesotrione como fonte de nutrientes</i>	24
3.2.7 <i>Peroxidação de lipídios</i>	25
3.2.8 <i>Extração de proteínas</i>	25
3.2.8.1 <i>Quantificação de proteínas</i>	26
3.2.8.2 <i>Variações nos padrões proteicos</i>	26
3.2.8.3 <i>Atividades das enzimas antioxidativas</i>	27
3.2.8.3.1 <i>Atividade da SOD</i>	27
3.2.8.3.1.1 <i>Atividade em PAGE não desnaturante</i>	27
3.2.8.3.1.2 <i>Determinação das isoenzimas de SOD em PAGE não desnaturante</i>	27
3.2.8.3.2 <i>Atividade da CAT</i>	28
3.2.8.3.2.1 <i>Atividade em espectrofotômetro</i>	28
3.2.8.3.2.2 <i>Atividade em PAGE não desnaturante</i>	28
3.2.9 <i>Modificações na membrana bacteriana</i>	29
4 RESULTADOS.....	30
INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAIS E MÉTODOS	33
<i>Químicos utilizados</i>	33
<i>Isolamento de bactérias tolerantes ao herbicida</i>	33
<i>Análise de degradação do herbicida</i>	33
<i>Identificação da linhagem degradadora por sequenciamento do gene 16S</i>	34
<i>Crescimento bacteriano</i>	34
<i>Mesotrione como fonte de nutrientes</i>	35
<i>Peroxidação Lipídica</i>	35
<i>Extração de proteínas</i>	35

<i>Variações nos padrões protéicos</i>	<i>36</i>
<i>Atividades das enzimas antioxidativas</i>	<i>36</i>
<i>Perfil de bandas da superóxido dismutase</i>	<i>36</i>
<i>Atividade da Catalase.....</i>	<i>37</i>
<i>Análise de lipídeos</i>	<i>37</i>
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
<i>Caracterização de linhagem degradadora.....</i>	<i>38</i>
<i>Capacidade de crescimento bacteriano em contato com o herbicida.....</i>	<i>41</i>
<i>Peroxidação Lipídica</i>	<i>41</i>
<i>Perfil Protéico</i>	<i>42</i>
<i>Perfil de bandas de SOD em PAGE não desnaturante.....</i>	<i>43</i>
<i>Atividade de catalase.....</i>	<i>44</i>
CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 AGROQUÍMICOS

A população mundial vem crescendo em ritmo acelerado. De 1950 ao ano 2000 a população mundial dobrou e segundo estimativas do projeto Milênio das Nações Unidas, deve atingir 9,1 bilhões de habitantes até 2050 (Carvalho, 2006). Esse aumento da população gera, conseqüentemente, um aumento na demanda de alimentos. Para suprir essa demanda, a redução das perdas é um dos caminhos e o uso de químicos sintéticos tem cumprido um papel importante na supressão de pragas e aumento da produção agrícola.

Desde os primórdios da humanidade, a presença de pragas nas culturas agrícolas vem sendo danosas ao homem, seja por diminuírem a produtividade das culturas ou transmitindo doenças ao homem e aos animais que o cercam. Segundo Estrada (1998), a história dos pesticidas pode ser dividida em três etapas. A primeira, na qual a ação praguicida de alguns elementos naturais como enxofre, cobre, arsênico e fósforo, foi descoberta acidentalmente. O combate de pragas com a utilização de enxofre pelos gregos e a queima de betume para remover insetos das plantações de uvas pelos Romanos são exemplos antigos. Por volta de 1800, a *London Horticultural Society* recomendava o uso de enxofre para combater os fungos que apareciam nos pessegueiros. Ainda em 1800 foi descoberto, na França, que o uso de uma mistura feita à base de cobre podia destruir fungos de forma muito eficaz. A segunda etapa foi marcada pelo desenvolvimento do primeiro agrotóxico sintético, o dinitro-2-cresilato de potássio, que foi comercializado na Alemanha, e da utilização de diferentes óleos inseticidas. Substâncias inorgânicas foram introduzidas como praguicidas no começo de 1900 e fizeram parte da maioria dos produtos utilizados para combater pragas antes da Segunda Guerra Mundial, sendo que muitos deles continham vários metais pesados, como mercúrio, arsênico e chumbo. Estes agroquímicos são denominados “agrotóxicos de primeira geração” e a maioria desses produtos não é mais utilizada por apresentarem alta toxicidade para humanos e animais e longa permanência no ambiente, podendo contaminar o solo por mais de 100 anos (Estrada, 1998; Alves Filho, 2002). A terceira etapa corresponde ao período da Segunda Guerra Mundial, com o desenvolvimento da indústria de síntese química, ocorrendo à difusão e a larga utilização de biocidas sintéticos (Alves Filho, 2002). Esses produtos são considerados a ‘segunda geração’ de agrotóxicos, incluindo ampla gama de compostos orgânicos sintéticos.

Um marco importante na Era dos químicos sintéticos na defesa do campo teve início por volta de 1939 com a introdução de compostos organoclorados, como o dicloro-difenil-

tricloroetano (DDT) (Delaney et al., 2006). Este composto foi inicialmente desenvolvido para fins bélicos, porém, com a descoberta do químico suíço Paul Muller de que o DDT possuía forte ação pesticida, este foi rapidamente adotado no setor agrícola para controle de pragas devido sua alta eficiência em curto prazo (Cardona, 2004). A eficácia surpreendente deste pesticida levou ao desenvolvimento de uma variedade de hidrocarbonetos clorados, como gama-lindano e toxofeno que foram rapidamente adotados nas práticas agrícolas (Daly et al., 1998). Na década de 1940, a indústria começou a produzir grande quantidade de novos pesticidas sintéticos, como os organofosforados que, apesar da sua alta toxicidade para mamíferos e outras espécies não alvo, apresentaram popularidade por apresentar atividade eficaz com amplo espectro de ação e baixo custo (Casida; Quistade, 1998).

Combinado com o avanço da indústria química, o período posterior à Segunda Guerra Mundial foi marcada por mudanças na agricultura, como a consolidação do modelo agrícola de monocultura, que tem sua base assentada no uso de agroquímicos, mecanização, cultivares de alto potencial de rendimentos e técnicas de irrigação.

O reconhecimento dos efeitos nocivos do uso de agrotóxicos se deu com a obra “Primavera Silenciosa”, publicado pela bióloga Rachel Carson, em 1962, que trouxe à tona os efeitos danosos de agroquímicos sintéticos, em especial do DDT. A obra de Rachel tornou pública a discussão sobre o uso de agroquímicos. Em resposta à pressão e à preocupação do público com os efeitos adversos de compostos como o DDT e similares, uma ‘terceira geração’ de agrotóxicos vem sendo desenvolvida pela indústria química mundial. Essa nova geração de agroquímicos é menos persistente que os organoclorados, porém mais solúvel na água, o que faz com que seja potencialmente mais poluente das águas subterrâneas e superficiais e que tenha um efeito tóxico não só agudo, como crônico no homem. São chamados de carbamatos e componentes organofosforados, ingredientes ativos da maioria dos inseticidas e de alguns herbicidas em uso (Alves Filho, 2002; Cardona, 2004).

No Brasil, a introdução de agrotóxicos organossintéticos teve início com a chegada das primeiras amostras de DDT em 1943. Nesse período, os agroquímicos eram utilizados em programas de saúde pública no controle de parasitas. Após a década de 60, outros compostos sintéticos foram introduzidos nos cultivos brasileiros. O Aumento do consumo de agroquímicos no Brasil a partir desta década se deu pela criação de uma política de incentivo ao uso de insumos agrícolas, com a isenção de impostos como o Imposto de Circulação de Mercadoria (ICM), Imposto de Produtos Industrializados (IPI), e de impostos sobre a importação de produtos, além da criação do Plano Nacional de Desenvolvimento, em 1975, que iniciou uma política de abertura ao comércio de agroquímicos, proporcionando maior

facilidade na aquisição desses insumos pelos produtores agrícolas e incentivando o pacote tecnológico, que representa a modernidade na agricultura (Bull; Hathaway, 1986 apud Soares, 2010 p.12). Essas medidas de incentivo e a repercussão da ação dos pesticidas no combate às pragas resultaram no aumento do consumo dessas substâncias no país.

O Brasil ocupa posição de destaque entre os consumidores de agrotóxicos. Segundo SINDAG (2012), as vendas de defensivos movimentaram quase US\$ 8,5 bilhões no Brasil em 2011 - o dobro do apurado em 2005, se tornando assim o segundo maior consumidor de agrotóxicos no mundo, atrás apenas dos Estados Unidos.

Apesar da utilização de agrotóxicos aumentar a produtividade de culturas de importância econômica, surgiram algumas preocupações quanto ao efeito negativo dos pesticidas sobre os organismos não alvos, incluindo micro-organismos, plantas, animais e seres humanos (Jiang et al., 2008). Estudos relatam que apenas 0,1% dos pesticidas aplicados nas culturas atingem seus alvos, sendo que os demais 99,9% permanecem no ambiente, solos, águas superficiais/subterrâneas e ar (Sharma et al., 2010). O resultado da caracterização toxicológica, baseada no banco de dados da *Environmental Protection Agency* (EPA), *International Agency of Research on Cancer* (IARC), *World Health Organization* (WHO) e *Pesticide Action Network*, demonstraram que, dos 276 ingredientes ativos legalizados na Europa, 32 de 76 fungicidas, 25 de 87 herbicidas e 24 de 66 inseticidas, estão relacionados com ao menos um dano à saúde humana (carcinogênico, disruptor endócrino, toxicidade reprodutiva e no desenvolvimento) (Karabelas et al., 2009). Além disso, alguns pesticidas podem permanecer longos períodos no ecossistema - inseticidas organoclorados, por exemplo, podem ser detectados em águas superficiais 20 anos após seu uso ter sido banido (Larson et al., 1997), e uma vez que o pesticida resistente entra na cadeia alimentar, ele pode se acumular nos tecidos dos organismos, onde o mesmo pode atingir concentrações muito mais altas do que a do ambiente em sua volta.

1.1.1 Caracterização do herbicida mesotrione

O mesotrione [2-[4-(metilsulfonil)-2-nitrobenzoil]-1,3-ciclohexanediona] é um herbicida do grupo benzoilciclohexeno-1,3-dione, e utilizado em culturas de milho para controle pré e pós-emergente de ervas daninhas de folhas largas. Este herbicida surgiu em 1977, quando cientistas do *Western Research Center* (Califórnia) observaram que

relativamente poucas plantas cresciam sob a planta *Callistemon citrinus* (Mitchell et al., 2001). Do composto natural (leptospermone) foram produzidos análogos, dos quais resultou a molécula da mesotrione, com atividade herbicida 100 vezes maior que o composto natural (Hugie et al., 2008).

A molécula do mesotrione age inibindo a atividade da enzima 4- hidroxifenil-piruvato dioxigenase (HPPD). Em plantas, essa enzima é um componente da rota biossintética que converte tirosina em plastoquinona e α -tocoferol. Plastoquinona é um componente da biossíntese de carotenóides. A diminuição dos níveis de plastoquinona gerada pela inibição da HPPD resulta na diminuição de carotenóides. A inibição da síntese de carotenóides resulta na perda da fotoproteção fornecida pelos mesmos à clorofila o que gera decomposição da clorofila pela luz, levando ao esbranquecimento das folhas das plantas sensíveis, com posterior necrose e morte.

A molécula de mesotrione (Fig. 1) é composta de duas partes, um grupamento benzil e um dione. O grupamento benzil está localizado na posição 2 e é requerido para que a molécula apresente atividade herbicida. O grupamento presente na posição 4 tende a aumentar a acidez da molécula, e também a atividade herbicida. A parte ciclohexanodione é adicionada a molécula para bloquear sítios de metabolismo da molécula pelas plantas, o que resulta em melhor atividade do herbicida, dificultando assim detoxificação da molécula (Mitchell et al., 2001). O herbicida é utilizado em culturas de milho, pois as mesmas não são sensíveis ao herbicida por apresentar uma lenta absorção foliar e uma distribuição dentro da planta limitada pelo rápido metabolismo do herbicida.

A utilização do herbicida em culturas de milho gera a contaminação de áreas próximas ao local de aplicação, afetando a atividade e a diversidade em ecossistemas no solo e na água. Trabalhos vêm demonstrando que o mesotrione apresenta capacidade de retenção moderada em diferentes tipos de solo, e provavelmente é lixiviado para águas superficiais (Batisson et al., 2008).

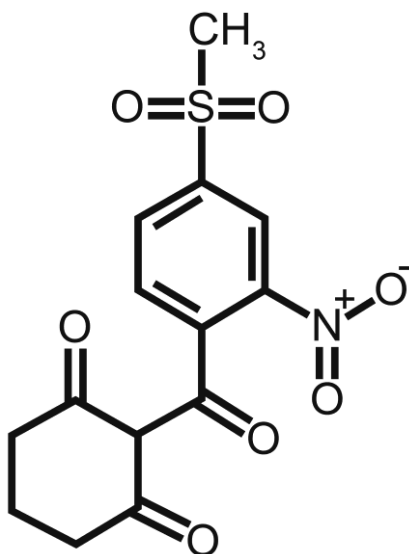


Figura 1. Fórmula estrutural da Molécula de mesotrione.

O herbicida em sua formulação comercial, denominado Callisto, apresenta aproximadamente 48 % do princípio ativo mesotrione, sendo os outros 52 % compostos de ingredientes inertes. Estes compostos são solventes, surfactantes e outros ingredientes adicionados à formulação para aumentar a estabilidade, distribuição e eficácia do mesotrione (Surganet al., 2010).

1.1.2 Degradação

O aumento da contaminação do ambiente por resíduos de compostos antropogênicos induziu o estudo de diversas alternativas de tratamento de poluentes orgânicos. Atualmente, existem diversos processos que visam degradar compostos orgânicos ou oxidá-los a compostos menos tóxicos. Uma das formas de anular os efeitos nocivos de contaminantes como agroquímicos se dá pelo processo de remediação. É um processo lento que visa recompor características químicas, físicas e biológicas permitindo o desenvolvimento de espécies vegetais e da atividade microbiana, tão importante para o estabelecimento e sucessão da microbiota (Mendes Filho, 2010).

Dentre as inúmeras formas de remediação, a biorremediação se destaca por, geralmente, apresentar menor custo e maior eficiência na remoção dos contaminantes do que as técnicas físicas e químicas, sendo utilizada em escala comercial no tratamento de diversos resíduos e na remediação de áreas degradadas (Bamforth; Singleton, 2005). Este processo utiliza organismos vivos, geralmente plantas e micro-organismos, para imobilizar ou reduzir

os contaminantes de águas superficiais e do solo.

Esse processo é governado tanto por fatores abióticos quanto bióticos (o último incluindo catalise enzimática por micro-organismos), e pode seguir vias metabólicas complexas envolvendo uma variedade de interações entre os micro-organismos, constituintes do solo e os pesticidas (Topp et al., 1997). Em micro-organismos, este processo se dá de duas formas. A primeira por meio de reações enzimáticas catabólicas, nas quais o xenobiótico é reduzido a moléculas menores, gerando energia, conseqüentemente, a biomassa microbiana aumenta à custa do substrato que diminui consideravelmente. A segunda é por um processo de cometabolismo, onde o micro-organismo transforma o composto sem dele retirar energia para seu crescimento, necessitando assim outra fonte de nutrientes (Moreira; Siqueira, 2006).

A taxa de degradação do xenobiótico depende de algumas características químicas da molécula, como tamanho, forma, estrutura química, os grupos funcionais e a carga da molécula. Estas características determinam o grau de toxicidade, a rota metabólica, o comportamento no solo e a absorção por micro-organismos (Moreira; Siqueira, 2006).

O primeiro trabalho de biotransformação do mesotrione descreveu como produtos da degradação o ácido 4-metilsulfonil-2-nitrobenzóico (MNBA) e o ácido benzóico 2-amino-4-metilsulfonil (AMBA) (Fig. 2) (Alferness e Weibe, 2002). Dentre os produtos, AMBA tem demonstrado ser mais tóxico que a molécula original (Bonnet et al., 2008; Crouzet et al., 2010). A biodegradação do mesotrione pela bactéria *Bacillus* sp. foi descrita nos trabalhos de Batisson et al. (2008) e Durand et al. (2006) e também apresentou como produto da degradação as moléculas de AMBA e MNBA. O trabalho de Pileggi et al. (2012) descreveu a degradação do mesotrione pela bactéria *Pantoeae ananatis* com rota metabólica diferenciada, não apresentando os produtos da degradação encontrados nos trabalhos citados anteriormente.

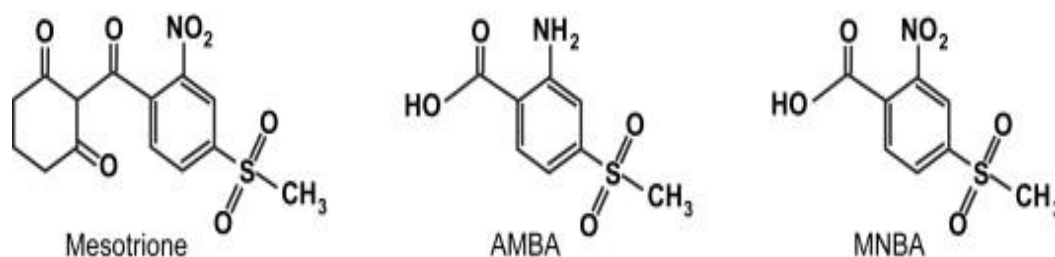


Figura 2. Fórmula estrutural das moléculas de mesotrione e dos principais produtos da degradação AMBA e MNBA.

1.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

O contato entre o herbicida e os micro-organismos pode aumentar significativamente a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo levar a célula ao estresse oxidativo, quadro em que a geração e a degradação dos EROs na célula estão desbalanceadas, quadro que pode gerar danos e rápida morte celular do micro-organismo (Ferguson, 1999; Gratão et al., 2005; Zablutowicks et al., 1995).

Entretanto a produção dessas espécies reativas não se restringe a exposição dos organismos à xenobióticos. O oxigênio é uma molécula necessária para a maioria dos seres vivos e, com exceção de um pequeno grupo de bactérias anaeróbias e aeróbias facultativas, os organismos dependem do mesmo para geração de energia em forma de ATP durante o processo de fosforilação oxidativa. Este processo está associado à redução do O_2 em água e é o principal processo de geração de energia em organismos aeróbios. Além disso, o oxigênio é utilizado como substrato de muitas enzimas, apresentando como produto final a geração de EROs (Lushchak, 2001).

Espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^\cdot$) são formadas durante os processos citados anteriormente, além de outras atividades celulares, como a oxidação de pequenas moléculas pelo citocromo P-450 e b-5, flavina dependente redutase, xantina dehidrogenase, monoamino oxidases e pela perda de elétrons provenientes da cadeia transportadora de elétrons (Lushchack, 2001). Em bactérias, a maioria dessas espécies reativas é derivada da redução sequencial do oxigênio molecular catalisada por enzimas da cadeia transportadora de elétrons associadas à membrana (Cabiscol et al., 2000; Cash et al., 2007).

Por apresentarem elétrons desemparelhados ou instabilidade em sua formulação, as EROs são altamente reativas (Ribeiro et al., 2005) podendo resultar em modificações em aminoácidos residuais, oxidação dos grupos sulfidrilas, quebra de ligações peptídicas, perda de metais em metaloproteínas, despolimerização de ácidos nucleicos, mutações pontuais e oxidação de polissacarídeos e ácidos graxos poliinsaturados (Fridovich, 1995).

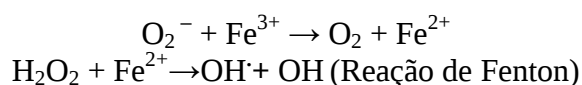
Para minimizar os efeitos danosos dessas espécies os organismos desenvolveram mecanismos capazes de combater as mesmas, denominado de sistema antioxidativo de defesa, que pode ser enzimático ou não enzimático. As defesas não-enzimáticas incluem compostos com propriedade antioxidante, as quais ajudam manter o ambiente redutor (Cabiscol et al., 2000), como o β -caroteno, α -tocoferol (vitamina E), glutatona reduzida (GSH), ácido

ascórbico, NADPH e NADH. Já os mecanismos enzimáticos envolvem a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidases, glutathione redutase (GR), glutathione S-transferase (GST), dentre outras (Gratão et al., 2005).

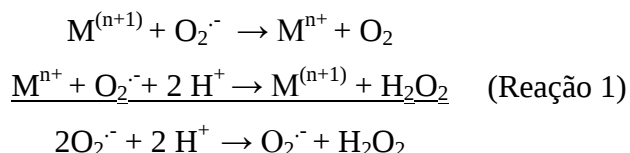
1.2.1 Radical superóxido e superóxido dismutase

O radical superóxido, O_2^- , é um dos radicais mais abundantes produzidos em sistemas biológicos, sendo o primeiro a ser formado pela redução do oxigênio por um único elétron. Em bactérias, as principais fontes do radical superóxido provêm da redução do oxigênio molecular via componentes da cadeia transportadora de elétrons (Imlay e Fridovich, 1991; Fridovich, 1995). Enzimas contendo cofatores redutores (oxiredutase contendo flavina) e compostos capazes de reações de redução univalente e reações fotoquímicas também podem gerar o radical superóxido (De Groot et al., 1997).

Na célula, o radical superóxido pode reagir rapidamente com pequenas moléculas como polifenóis, catecolaminas, α -tocoferol, ascorbato e tiois, contribuindo para a geração dos radicais por meio de reação em cadeia (Fridovich, 1983; Mashino e Fridovich, 1987). O superóxido pode inativar enzimas como a catalase e a glutathione peroxidase, além de reagir com ferro-sulfaproteínas liberando Fe^{2+} , que pode reagir com o radical peróxido por meio da reação de Fenton gerando o radical hidroxila $OH^\bullet$ (Barreiros et al., 2006), radical que apresenta forte potencial oxidante, podendo reagir com praticamente qualquer molécula orgânica (Koltover, 2010).



Para se proteger do radical superóxido e detoxificar a célula antes que o mesmo cause lesões, os organismos apresentam a enzima superóxido dismutase (EC 1.15.1.1). Esta enzima faz parte de um grupo de metaloproteínas que catalisa a dismutação do radical superóxido (O_2^-), compreendendo assim a primeira linha de defesa celular contra as ERO's. As SOD's são classificadas de acordo com o metal presente em seu sítio ativo, podendo ser: Manganês (Mn)-SOD, Ferro (Fe)-SOD, Cobre/Zinco (Cu/Zn)-SOD e Níquel (Ni)-SOD. Durante a catálise, o cofator metal-redox ativa ciclos entre os estados oxidados e reduzidos, que diferem por um elétron, como observado na reação 1.



Em *Escherichia coli*, a enzima Mn-SOD, codificada pelo gene *sodA*, apresenta síntese induzida pela presença do oxigênio, pelo radical superóxido e por mudanças nas fase de crescimento bacteriano (Demple, 1991). Em contraste, a síntese de Fe-SOD, codificada pelo gene *sodB*, não é dependente das condições do crescimento bacteriano, sendo produzida constitutivamente. Estas duas isoenzimas são encontradas no citoplasma bacteriano e aparentam sobreposição de papéis na detoxificação celular (Youn et al., 2006). A inativação dos genes *sodA* e *sodB* em *E. coli* levou a um aumento na suscetibilidade ao estresse oxidativo, aumento na taxa de mutação e crescimento deficiente em meio mínimo, pois o radical superóxido inativa enzimas necessárias para a biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada (Carlioz e Touati, 1986).

A enzima Cu/Zn-SOD, codificada pelo gene *sodC*, localiza-se na região periplasmática da célula. Devido a sua carga negativa, o radical superóxido é incapaz de penetrar membranas; as SOD's periplasmáticas e associadas à membrana tem sido propostas como prováveis defensoras da célula contra $O_2^{\cdot-}$ de origem exógena (Steinman, 1993). Este sistema de detoxificação se mostra vantajoso para patógenos intracelulares, já que células fagocitárias produzem uma gama de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Diferentemente das outras isoformas de SOD citadas, a enzima Cu/Zn-SOD não se faz necessária para o crescimento bacteriano em condições de laboratório e aparentemente não desempenha papel na detoxificação de $O_2^{\cdot-}$ endógeno (Sansone et al., 2002; Carlioz e Touati, 1986). Trabalhos demonstram diminuição na virulência de *sodC* mutantes negativos de organismos patógenos em animais modelos, corroborando com a hipótese do papel da Cu/Zn-SOD na patogenicidade (Ammendola et al., 2005; De Groote et al., 1997; Fang et al., 1999; Farrant et al., 1997; Gee et al., 2005; Sansone et al., 2002).

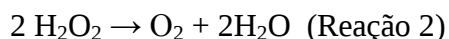
Em bactérias, a forma Ni-SOD é menos significativa, encontrada porções citosólicas de *Streptomyces* sp. (Youn et al., 1996).

1.2.1 Peróxido de Hidrogênio e Catalase

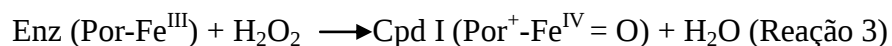
A eliminação do radical superóxido pela enzima SOD acaba gerando outras espécies reativas de oxigênio, sendo o principal destes o peróxido de hidrogênio (Gonzalez-Flecha e Demple, 1995).

A molécula de peróxido de hidrogênio é pouco reativa frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição, podendo oxidar proteínas que apresentam resíduos de metionina e cisteína ou grupos tiol muito reativos. No entanto, o peróxido de hidrogênio exerce um papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor membranas e gerar o radical hidroxila (Imlay, 2003; Barreiros et al., 2006).

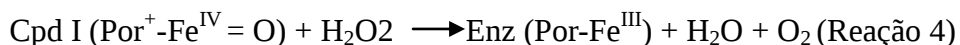
A catalase (EC 1.11.1.6) é uma proteína tetrâmera que exerce papel central na defesa celular, impedindo a formação do radical hidroxil. Estas enzimas convertem duas moléculas de H_2O_2 em O_2 e duas moléculas de água, pela transferência de dois elétrons, conforme reação 2:



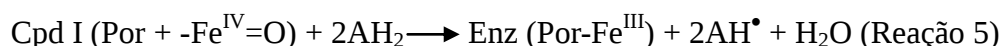
A maioria das catalases pode ser classificada em três grupos, devido as suas propriedades enzimáticas. As mais abundantes são proteínas tetrâmeras possuidoras de um grupo heme, comumente divididas em dois grupos principais, a catalase típica ou monofuncional (E.C. 1.11.1.6) e catalase-peroxidase. Os dois tipos de heme enzimas apresentam diferenças significativas, como a ausência de similaridade entre as sequências de aminoácidos e diferenças no sítio-ativo (Zamocky et al., 2008). Apesar dessas diferenças, a reação global de dismutação do peróxido de hidrogênio ocorre de forma semelhante. No primeiro passo uma molécula de H_2O_2 oxida o grupo heme, formando espécies oxiferril ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$); essa oxidação equivale na remoção do ferro e de um anel de porfirina, gerando um radical porfirina (Por^+) (Vlasits et al., 2010), conforme a reação 3.



No segundo passo, a molécula de H_2O_2 é utilizada como um redutor do composto I, regenerando o estado inicial da enzima e desta forma resultando na produção O_2 e H_2O (reação 4).



Entretanto, as catalase-peroxidases apresentam outro nível de complexidade que envolve o uso de doadores orgânicos de elétrons (por exemplo, etanol, ácido ascórbico) para a redução do composto I e para restaurar o estado inicial da enzima pela transferência de um elétron (reação 5). Essas enzimas geralmente atuam em baixas concentrações (<1μM) de H₂O₂ (Vlasits et al., 2010).



Um terceiro grupo, menos significativo que os dois primeiros, é composto por não-heme catalases, que possuem uma molécula de manganês em sua composição. Este grupo de catalases só é encontrado em bactérias. Esta enzima apresenta baixa especificidade com o substrato quando comparado com as outras catalases.

1.3 ADAPTAÇÕES DA MEMBRANA AO ESTRESSE QUÍMICO

Micro-organismos isolados do ambiente frequentemente interagem com substâncias químicas tóxicas, cujo alvo principal é a membrana citoplasmática. Para suportar os danos causados por contaminantes, como hidrocarbonetos, por exemplo, bactérias degradadoras de poluentes apresentam respostas adaptativas à toxicidade destes compostos (Sikkema, 1995). Uma delas é a capacidade de modificar a composição dos ácidos graxos e/ou do grau de saturação dos mesmos, por um processo conhecido como “homeoviscous adaptation”, largamente descrito em bactérias Gram-negativas (Petersen et al., 1994; Heipeiper et al., 1994; Heipeiper; De Bont, 1994). Um estudo com *Escherichia coli*, exposta ao herbicida 2,4-D, demonstrou que a mesma diminui a fluidez da membrana para combater danos causados pela presença do herbicida no meio (Balagué et al., 2001). Bactérias Gram-positivas, entretanto, apresentam uma resposta fisiológica diversa à presença de compostos tóxicos. Em *Staphylococcus haemolyticus*, cultivado na presença de tolueno, benzeno ou ciclohexeno, houve um aumento na fluidez da membrana por meio da mudança na composição dos ácidos graxos da mesma (Nielsen et al., 2005). Entretanto, em *Bacillus* sp. ORAs2, cultivado na presença de tolueno, e em *Rhodococcus erythropolis* DCL14, cultivado na presença de alcanos, alcenos e terpenos, houve um aumento no grau de saturação dos lipídeos da membrana, como descrito normalmente em bactérias Gram-negativas (De Carvalho; Da

Fonseca, 2005; Pepi et al., 2008). Como as EROs tem a capacidade de reagir com ácidos graxos insaturados (Lima; Abdala, 2001), uma mudança na saturação dos lipídeos da membrana seria uma forma de evitar os danos gerados pela peroxidação dos lipídeos de membrana.

2 OBJETIVO

Analisar três possíveis estratégias utilizadas pela linhagem *Bacillus megaterium* Mes13 para tolerar o herbicida Callisto e seu princípio ativo, mesotrione: enzimas antioxidativas, degradação do princípio ativo e modificações na estrutura de lipídeos da célula.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Membros do gênero *Bacillus* são bactérias com formato de bastonetes Gram-positivos, aeróbicos, característicos pela formação de endósporo (Chantawannakul et al., 2002; Lee et al., 2007). Este gênero foi primeiramente classificado por Ferdinand Cohn (1872) e *Bacillus subtilis* foi determinada como espécie tipo (Soule, 1932). O gênero apresenta cerca de 60 espécies, com grande diversidade genética. Devido a sua capacidade de formar endósporos e sua versatilidade metabólica, bactérias desse gênero apresentam a capacidade de sobreviver e crescer em diferentes ambientes como solo, ambientes aquáticos, ar, poeira, rizosfera e trato intestinal de diferentes insetos e animais. Bactérias do gênero *Bacillus*, juntamente com membros dos gêneros *Arthobacter*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium* e *Pseudomonas*, se destacam pela alta atividade em degradação de pesticidas (Feakin et al. 1995; Kucharski et al., 2009; Omaret al., 2001; Rousseaux et al., 2001).

3.2 METODOLOGIAS

3.2.1 Químicos utilizados

Foram utilizados o herbicida comercial Callisto, que apresenta 48 % de mesotrione em sua composição, e outros adjuvantes [1,2-benzisotiazolin-3-one; 1-Octanol; poli(oxi-1,2-etanediil), alfa-isodecil-omega-hidroxi-fosfato; - (<http://www.syngenta-crop.co.uk/>)], e o princípio ativo mesotrione utilizado em meio de cultura foi fornecido por Syngenta Crop Protection, enquanto que o padrão analítico foi obtido da Sigma/Pestanal.

3.2.2 Isolamento de bactérias tolerantes ao herbicida

Amostras de água foram coletadas em um açude localizado na fazenda Capão do Cipó (estação experimental da Fundação ABC Pesquisa para Assistência e Divulgação Técnica Agropecuária), Castro, Paraná, Brasil (S-24°51'28".7 O-49°55'57".7).

As linhagens bacterianas presentes na amostra de água foram isoladas em Agar Luria (LA) cuja composição em g L⁻¹ é: 10 triptona, 5 extrato de levedura, 10 NaCl e 15 Agar, por meio de diluição em série, em solução 0,9 % de NaCl. As Placas foram incubadas a 30 °C. As linhagens crescidas foram inoculadas em Meio Mineral contendo mesotrione (MMM) e

tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, e os seguintes ingredientes, em g L⁻¹: 3,000 NaNO₃; 0,500 MgSO₄; 0,500 KCl; 0,010 FeSO₄; 0,040 CaCl₂; 0,001 MnSO₄; 0,200 glucose; 15,000 agar; 0,04 mM de mesotrione (1x concentração de campo). Linhagens com alta tolerância ao herbicida foram isoladas e estocadas em glicerol 50 % a -80 °C.

3.2.3 Análise de degradação do herbicida

Para determinar a capacidade de degradação do herbicida, os isolados selecionados foram crescidos em 75 mL de Caldo Luria - LB (LA sem Agar.) em frascos de 250 mL e incubados por 24 h a 30 °C. As células foram então centrifugadas a 8.000 g, por 5 min. a 4 °C. O precipitado foi lavado duas vezes com tampão PBS com os componentes a seguir em g L⁻¹: 8,00 NaCl; 0,20 KCl; 1,44 Na₂HPO₄; 0,24 KH₂PO₄. As células foram ressuspensas em 50 mL de MM contendo 0,04 mM de mesotrione (MMM), e incubadas a 30° C a 200 rpm. Nos períodos de 0 h e 24 h, alíquotas de 1 mL foram coletadas e centrifugadas a 13.000 g durante 5 min., sendo congelado o sobrenadante para posteriores análises em HPLC. As análises foram realizadas em HPLC (Waters Alliance e2695), complementado pelo detector fotodiodo. Foi utilizada a coluna Eclipse XDB-C18, com dimensões de 4,6 mm X 150 a 3,5 µm, para separação, sendo submetida a uma temperatura de 20 °C. O gradiente da fase móvel iniciou com 70 % água (0,1 % ácido fórmico) (A) : 30 % Acetonitrila (B); 30 % B em 3 min.; 55 % B em 15 min.; 100 % B em 17 min.; 100 % B em 18 min.; 30 % B em 19 min. e 30 % B em 29 min. O volume de corrida foi de 1 mL/min⁻¹. O volume de injeção das amostras foi de 50 µL.

3.2.4. Identificação da linhagem selecionada

3.2.4.1 Amplificação do gene 16S

A linhagem bacteriana foi crescida em placa contendo LA por 24 h a 30 °C. Após o período de crescimento, foi retirada uma colônia e adicionada a uma solução de 25 µL contendo 1x tampão da reação, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,5 µM de primer 8F (5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'), 0,5 µM de primer 1492R (5' - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3'), 0,02 µM Taq polimerase. Além da amostra, foi incluído um controle negativo (branco – solução de amplificação sem amostra de DNA) no experimento.

As condições de termociclagem foram: um ciclo inicial a 94 °C por 10 min. seguidos de 30 ciclos a 94 °C por 1 min., 53,5 °C por 1 min., 72 °C por 1 min. e 50 s, seguidos por um ciclo de uma extensão final a 72 °C por 7 min. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1 % com volume aplicado de 5 µL da mistura da reação de PCR e as bandas foram marcadas com Syber Red e visualizadas com luz ultravioleta.

3.2.4.2 Sequenciamento

A purificação do produto de PCR foi feita utilizando Kit de purificação de PCR MinElute®.

Foram adicionados 40 ng da amostra amplificada e purificada em um tubo de 0,5 mL com 4,5 pmol do *forward* e *reverse* primers (cada um em um tubo separado) em um volume final de 6 µL. As amostras foram sequenciadas no ACTGenes análises moleculares LTDA.

3.2.5 Crescimento bacteriano

A linhagem foi crescida em 700 mL de LB a 30 °C durante 24 h. Após o período de crescimento, as amostras foram centrifugadas a 8.000 *g* por 5 min. a 4 °C. O precipitado foi lavado duas vezes com tampão PBS e inoculado nos meios em triplicata: a) Meio Mineral sem mesotrione (MM); b) MMM; c) Meio Mineral com Callisto (MMC), contendo o herbicida formulado com o equivalente a 0,04 mM de mesotrione. A cada duas horas o crescimento bacteriano foi monitorado por espectrofotômetro a 600 nm, sendo que o material foi diluído sempre que a DO ultrapassasse valores de 0,6, para manter a acurácia das leituras. Aliquotas para HPLC foram retiradas nos períodos de 0, 12 e 24 horas.

3.2.6 Mesotrione como fonte de nutrientes

Para determinar se a linhagem bacteriana selecionada utilizaria o herbicida como fonte de carbono ou nitrogênio, a linhagem bacteriana foi crescida em 10 mL de LB em frascos de 50 mL e incubada a 30 °C e 200 rpm. Após 24 h de crescimento, as amostras foram adicionadas aos seguintes meios: a) MMM; b) MMM sem nitrogênio (NaNO₃ substituído por NaCl); c) MMM sem carbono (glucose). As amostras foram incubadas em triplicata a 30 °C e 200 rpm tendo como densidade óptica inicial 0,05. O crescimento bacteriano foi medido em

espectrofotômetro a 600 nm nos períodos de 0 e 24 horas e foram retiradas amostras para análise em HPLC.

3.2.7 Peroxidação de lipídios

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação da produção de malonaldeído (MDA), um metabólito reativo ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), método adaptado de Health & Packer (1968). As culturas foram crescidas em 2 L de LB, incubadas a 30 °C e 200 rpm. Em 24 h de incubação, as amostras foram centrifugadas a 8.000 *g* por 7 min. a 4 °C. O precipitado foi lavado duas vezes com tampão PBS. As culturas foram incubadas nos seguintes meios: a) MM; b) MMM; c) MMC. A incubação ocorreu em triplicatas a 30 °C a 200 rpm. As culturas foram centrifugadas em 30 min., 12 e 24 h de incubação a 5.000 *g* por 10 min. a 4 °C, e o precipitado foi macerado com nitrogênio líquido; 0,1 g do macerado de cada uma das amostras foi homogeneizado com 1 mL de TCA (ácido tricloroacético) 0,1 % e centrifugados a 12.000 *g* por 5 min. Do sobrenadante, foi retirada uma alíquota de 0,25 mL e transferida para outro tubo juntamente com 1 mL de solução contendo TCA 20 % e TBA (ácido tiobarbitúrico) 0,5 %. A mistura foi colocada em banho-seco por 30 min. a 95 °C, e resfriada em gelo por 10 min. As amostras foram centrifugadas por 10 min. a 12.000 *g*, e o sobrenadante foi retirado para leitura em espectrofotômetro a 535 e 600 nm. A quantidade de MDA foi expressa em mmol/mg de massa fresca.

3.2.8 Extração de proteínas

A linhagem bacteriana foi crescida em 2 L de (LB), incubada a 30 °C e 200 rpm. Em 24 h de incubação, as amostras foram centrifugadas a 8.000 *g* por 7 min. a 4 °C. O precipitado foi lavado duas vezes com tampão PBS. As culturas foram incubadas nos seguintes meios: a) MM; b) MMM; c) MMC, em triplicatas a 30 °C e 200 rpm. As culturas foram centrifugadas em 30 min., 12 e 24 h de incubação a 5.000 *g* por 7 min. a 4 °C, e o precipitado foi macerado com nitrogênio líquido. O extrato foi homogeneizado em tampão de extração com os componentes a seguir, em g L⁻¹: 14,520 K₂HPO₄; 2,260 KH₂PO₄; 0,372 EDTA; 0,462 DL-dithiothreitol. (DTT) e 5 % (w/w) polivinil polipirrolidona (PVPP) (Gratão et al., 1998). O material foi então centrifugado a 5.000 *g* por 30 min., e o sobrenadante foi armazenado em alíquotas a -80 °C.

3.2.8.1 Quantificação de proteínas

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

3.2.8.2 Variações nos padrões proteicos

As proteínas das amostras bacterianas foram separadas por eletroforese em sistema de SDS-PAGE que utiliza um agente dissociante para desnaturar as proteínas em subunidades. O agente dissociante comumente utilizado é o detergente iônico dodecil sulfato de sódio (SDS) (Gratão et al., 1998).

Para confecção dos géis desnaturantes (10 % poliacrilamida) foi utilizado o seguinte protocolo: Primeiro gel (de resolução): 5 mL de uma solução 40 % de acrilamida/bis-acrilamida da Sigma, 5 mL de Tampão TRIS 2,9 M, pH 8,9, 200 µL de SDS (10 %) e 10 mL de água. Como catalisadores foram utilizados 35 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônia (1 %). Para confecção do gel superior (de empilhamento), adicionado após a polimerização do gel de resolução, foi utilizado 1,0 mL da solução 40 % de acrilamida/bis-acrilamida (Sigma), 2,5 mL de Tampão TRIS 500 mM, pH 6,8, 100 µL de SDS (10 %) e 5,5 mL de água. Para a polimerização foram utilizados 20 µL de TEMED e 100 µL de persulfato de amônio (1 %). Após a polimerização, 20 µg de proteína das amostras foram aplicadas no gel.

Após a eletroforese o gel foi incubado por aproximadamente 12 horas em solução fixadora contendo etanol 40 % e ácido acético 10 %. O gel foi então transferido para 50 mL de solução contendo acetato de sódio 0,5 M, etanol 30 %, tiosulfato de sódio 20 mM e 260 µL de glutaraldeído 25 %, por 15 minutos. Em seguida foram realizadas três lavagens, de 15 minutos cada, em água destilada e adicionou-se 50 mL de solução contendo nitrato de prata 6 mM e 10 µL de formaldeído 37 %. O gel permaneceu nesta solução por 15 minutos e em seguida foi incubado em 50 mL de solução reveladora contendo carbonato de sódio 0,25 M e 5 µL de formaldeído 37 % até aparecerem as bandas. Visando parar a reação foi adicionada uma solução contendo EDTA 50 mM.

3.2.8.3 Atividades das enzimas antioxidativas

As enzimas antioxidativas analisadas foram catalase e a superóxido dismutase. As análises foram realizadas por atividade em géis não desnaturantes e por espectrofotometria.

Para confecção dos géis não desnaturantes (12 % poliacrilamida) foi utilizado o mesmo protocolo para todas as enzimas (Azevedo et al., 1998): Gel de resolução: 6 mL de uma solução 40 % de acrilamida/bis-acrilamida, 5 mL de Tampão TRIS 2,9 M, (pH 8,9), 9 mL de água, 38 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônia (1 %). Gel de empilhamento: após a polimerização do gel de resolução, foi adicionado uma solução composta por 1 mL da solução 40 % de acrilamida/bis-acrilamida (Sigma), 2,5 mL de Tampão TRIS 500 mM, (pH 6,8), 5,5 mL de água, 20 µL de TEMED e 100 µL de persulfato de amônio (1 %). O tampão de eletrodo para corrida do gel foi composto por TRIS 250 mM, pH 8,3 acrescido de 1,92 M de glicina.

3.2.8.3.1 Atividade da SOD

3.2.8.3.1.1 Atividade em PAGE não desnaturante

A atividade de SOD foi medida em PAGE e também realizada a determinação das isoformas da enzima. Na eletroforese em PAGE não-desnaturante (12 %) foi utilizado como padrão 2 unidades de SOD de fígado de boi (Sigma). Após a separação das proteínas por eletroforese, a atividade de SOD foi determinada como descrito por Beuchamp e Fridovich (1971).

Ao final do tempo de corrida, os géis foram lavados com água deionizada e incubados no escuro, a 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 brancas e coloração do gel.

3.2.8.3.1.2 Determinação das isoenzimas de SOD em PAGE não desnaturante

Para determinação das isoformas, após a corrida, o gel foi dividido verticalmente em

três partes. Uma delas permaneceu em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8. A segunda parte foi tratada com 100 mL do tampão fosfato de potássio contendo 0,0292 g de EDTA e 0,0130 g de KCN e a última parte foi imersa em uma solução deste tampão acrescido de 0,0292 g de EDTA e 70 µL de H₂O₂ a 30 %. Os géis permaneceram imersos nas respectivas soluções de revelação por 20 min.; em seguida foram lavados com H₂O destilada e submetidos à revelação com Nitroazul tetrazólio (NBT) e riboflavina como descrito anteriormente. Ao final da revelação, as bandas foram analisadas quanto à presença e ausência, conforme o fator inibidor presente nas soluções de tratamento. As isoformas foram classificadas como descrito por Guelfi et al., 2003: Cu/Zn-SOD quando inativada na presença de KCN e H₂O₂, Fe-SOD se a banda foi inativada somente na presença de H₂O₂, sendo resistente ao KCN e Mn-SOD se a isoforma era resistente aos dois tratamentos (Azevedo et al. 1998).

3.2.8.3.2 Atividade da CAT

3.2.8.3.2.1 Atividade em espectrofotômetro

A atividade de catalase foi determinada como descrito por Kraus et al. (1995), com modificações (Gratão et al., 1998). Em temperatura de 25 °C, a atividade foi determinada em uma solução de reação formada por 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 0,025 mL de peróxido de hidrogênio (25 %), solução preparada no momento do ensaio. A reação foi iniciada com 25 µL de extrato proteico, sendo a atividade determinada por meio da decomposição de peróxido de hidrogênio, monitorada por 1 min. através de alterações na absorbância a 240 nm. Os resultados foram expressos em µmol/min./mg de proteína para o meio.

3.2.8.3.2.2 Atividade em PAGE não desnaturante

A determinação da atividade de CAT foi realizada em PAGE 12 %, a 4 °C e com corrente constante de 15 mA. O padrão utilizado foi de CAT de fígado de boi (2 unidades). Após o tempo de corrida, o gel foi lavado em água deionizada (3 x 15 min.) e incubado por 10 min. em solução de H₂O₂ 0,003 %, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Após este

período, o gel foi lavado em água deionizada e colocado por 10 min. em uma solução de FeCl_3 1 % (m/v) e $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN}_6)$ 1 % (m/v) sob agitação. Em seguida, a solução foi retirada e o gel lavado com água deionizada. A fixação foi realizada com uma solução de ácido acético (7%) por 15 min. e os géis foram documentados.

3.2.9 Modificações na membrana bacteriana

A linhagem bacteriana foi crescida em 700 mL de LB em frasco de 1.000 mL, incubada a 30 °C e 200 rpm por 24 h. Após este período as amostras foram centrifugadas a 8.000 *g* por 7 min. a 4 °C. O precipitado foi lavado duas vezes com tampão PBS. As culturas foram incubadas nos seguintes meios: a)MM; b)MMM; c)MMC, em triplicatas a 30 °C e 200 rpm. As culturas foram centrifugadas após 12 h de incubação a 5.000 *g* por 7 min. a 4 °C, e o precipitado foi congelado. O material foi liofilizado por 15 h e foi adicionada uma solução de clorofórmio, metanol e água na proporção de 1: 2: 0,8. O material foi mantido sob agitação em shaker a 180 rpm por 18 h. após 24 horas foi adicionado clorofórmio e água até uma proporção de 1:1:0,9 de clorofórmio, metanol e água. A fase com o clorofórmio foi coletada. Foram realizadas leituras dos lipídeos em espectroscopia de infravermelho em transmitância, de 400 a 4000 nm. Análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA), implementado no Pirouette v 4,0 software (Infometrix, Bothell, WA, EUA), foram os métodos quimiométricos utilizados para analisar os resultados.

4 RESULTADOS

RESPOSTAS ADAPTATIVAS DE *Bacillus megaterium* Mes13 AO HERBICIDA CALLISTO

Resumo

O mesotrione é um herbicida seletivo com alto potencial de lixiviação, que apresenta a capacidade de inibir a atividade da enzima 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenase (HPPD), interferindo na síntese de carotenóides. Neste trabalho analisamos três possíveis estratégias utilizadas pela linhagem *Bacillus megaterium* Mes13 para tolerar o herbicida Callisto e seu princípio ativo, mesotrione: enzimas antioxidativas [superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT)], degradação do princípio ativo e modificações na estrutura de lipídeos da bactéria. Nenhuma isoforma específica foi observada em resposta aos tratamentos contendo os xenobióticos e a atividade de CAT foi mais baixa no tratamento contendo Callisto indicando outros possíveis mecanismos de defesa celular. Corroborando estes resultados, as análises de peroxidação lipídica (MDA), que dependem do estado de saturação de lipídeos de membrana, mostraram taxas mais baixas no tratamento com Callisto. Modificações na membrana bacteriana foram observadas nos tratamentos contendo Callisto, o que, possivelmente diminuíram as taxas de peroxidação lipídica. Nossos dados indicam que esta linhagem não utiliza mesotrione como fonte de nitrogênio e carbono, contudo, o processo de degradação do herbicida foi mais eficiente na ausência de Nitrato de Sódio em meio de cultura. É possível que a degradação ocorra, então, por meio de uma enzima inespecífica que, na ausência da fonte primária de nitrogênio, seja induzida pelo mesotrione. Nossos dados sugerem que as modificações na membrana plasmática, aliada a degradação da molécula do xenobiótico, conferiram a linhagem capacidade de tolerar a presença do mesotrione e de sua formulação comercial, Callisto nas condições experimentais testadas.

Palavras-chave: SOD, CAT, MDA, Biodegradação de herbicidas, Fonte de nitrogênio, modificações na membrana plasmática.

INTRODUÇÃO

O crescente aumento da população tem gerado um aumento na demanda de alimentos e matéria prima e, para suprir essa demanda, a redução das perdas é um dos caminhos e o uso de químicos sintéticos tem cumprido um papel importante na supressão de pestes e aumento da produção agrícola.

Apesar dos benefícios do uso de agroquímicos, há uma crescente preocupação em relação aos danos que os mesmos possam causar ao ambiente e a organismos não alvo, pois apenas 0,1 % dos agroquímicos aplicados em cultivares agrícolas atingem seu alvo, sendo que a grande maioria permanece no ambiente, contaminando significativamente os ecossistemas (Sharma et al., 2010).

O mesotrione [2-[4-(metilsulfonil)-2-nitrobenzoi]-1,3-ciclohexanediona], princípio ativo do herbicida comercial Callisto, é utilizado no controle pré e pós-emergente de plantas daninhas de folha larga em culturas de milho. Atua inibindo a enzima 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenase (HPPD), impossibilitando a biossíntese de carotenóides nos cloroplastos, que levam ao branqueamento das plantas sensíveis, necrose e morte dos tecidos vegetais (Soltani et al., 2011). Apresenta capacidade moderada de retenção em diferentes tipos de solo. Entretanto, pode ser lixiviado, contaminando assim águas superficiais. É considerado moderadamente tóxico para humanos (Beaudegnies et al., 2009), e classificado como perigoso ao meio ambiente (Batisson et al., 2009; Chaabane et al., 2007).

Dentre as inúmeras formas de descontaminação de ambientes, a biorremediação se destaca por, em geral, apresentar menor custo e maior eficiência na remoção dos contaminantes do que as técnicas físicas e químicas, sendo utilizada em escala comercial no tratamento de diversos resíduos e na remediação de áreas degradadas (Bamforth; Singleton, 2005). O gênero *Bacillus* é constituído por bastonetes Gram-positivos, aeróbicos, característico pela formação de endósporo (Chantawannakul et al., 2002; Lee et al., 2007), e juntamente com membros dos gêneros *Arthobacter*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium* e *Pseudomonas*, se destaca pela alta atividade em degradação de pesticidas (Feakin et al. 1995; Kucharski et al., 2009; Omar et al., 2001; Rousseaux et al., 2001). A biodegradação do mesotrione pelas linhagens bacterianas *Bacillus* sp. Mes11 e *Bacillus* sp. 3B6 foi descrita por Batisson et al. (2008) e Durand et al. (2006) e apresentou como principais produtos da degradação as moléculas de AMBA (Ácido 2-amino-4-metilsulfonil benzóico) e MNBA (4-

metilsulfonil-2-nitrobenzóico), sendo que esses produtos foram caracterizados como mais tóxicos que a molécula original. A degradação do mesotrione pela bactéria *P. ananatis* foi descrito por Pileggi et al., 2012 e, diferente da degradação descrita por Batisson et al. (2008) e Durand et al. (2006), AMBA e MNBA não foram encontrados como produtos da degradação.

Em contato com herbicidas, os micro-organismos podem apresentar um aumento na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), podendo levar a célula ao estresse oxidativo, quadro em que a geração e a degradação das EROs na célula estão desbalanceadas, e pode gerar danos e rápida morte celular do micro-organismo (Ferguson, 1999).

Entretanto a produção de EROs não se restringe a exposição dos organismos à xenobióticos. Os organismos aeróbicos usam oxigênio molecular (O_2) na respiração ou na oxidação de nutrientes para obtenção de energia. Durante os processos metabólicos, o O_2 é reduzido por univalência, por meio de reações sequenciais, que podem ocasionar a formação das espécies ativas (Cabiscol et al., 2000). Para minimizar os efeitos danosos das espécies reativas, os organismos desenvolveram mecanismos capazes de combater as mesmas, denominado de sistema antioxidativo de defesa, que pode ser enzimático ou não enzimático. A superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1.) é a primeira enzima de defesa contra danos provocados por EROs nas células (Scandalios, 2005). Está presente em organismos aeróbios e anaeróbios facultativos, atuando na desintoxicação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) via reação de dismutação, gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 (Mccorde, 1969), tendo sua atividade correlacionada com mecanismos de sobrevivência a herbicidas. A Catalase (CAT, EC 1.11.1.6.) tem um papel crucial na remoção do peróxido de hidrogênio gerado como produto da respiração aeróbica celular (Zamocky et al., 2008).

A maior parte do conhecimento sobre enzimas antioxidativas em bactérias é baseada em análises genômicas. Há, porém, a necessidade de discriminar e determinar a função destas enzimas em nível bioquímico, principalmente quando estão relacionados ao metabolismo de tolerância e desintoxicação de herbicidas (Martins et al., 2011).

Neste trabalho visamos analisar três possíveis estratégias utilizadas pela linhagem *B. megaterium* Mes13 para evitar o efeito tóxico do herbicida Callisto e seu princípio ativo, mesotrione: enzimas antioxidativas, degradação do princípio ativo e modificações na estrutura dos lipídeos de membrana citoplasmática.

MATERIAIS E MÉTODOS

Químicos utilizados

Foi utilizado o herbicida comercial Callisto, que apresenta 48 % de mesotrione em sua composição, e outros adjuvantes [1,2-benzisotiazolin-3-one; 1-Octanol; Poli(oxi-1,2-etanediil), alfa-isodecil-omega-hidroxi-fosfato; - (<http://www.syngenta-crop.co.uk/>). Foi utilizado em meios de cultura o princípio ativo mesotrione, foi fornecido por Syngenta Crop Protection, enquanto que o padrão analítico para as análises em HPLC foi obtido da Sigma/Pestanal.

Isolamento de bactérias tolerantes ao herbicida

Amostras de água foram coletadas em um açude (S-24°51'28".7 O-49°55'57".7) localizado na fazenda Capão do Cipó (estação experimental da Fundação ABC Pesquisa para Assistência e Divulgação Técnica Agropecuária), Castro, Paraná, Brasil.

As linhagens bacterianas presentes na amostra de água foram isoladas em Agar Luria (LA) (composição em g L⁻¹ é: 10 de tripton, 5 de extrato de levedura, 10 de NaCl e 15 de Agar) por meio de diluição em série, em solução 0,9 % de NaCl. As Placas foram incubadas a 30 °C. As linhagens crescidas foram inoculadas em Meio Mineral contendo mesotrione (MMM), contendo tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, e os seguintes ingredientes, em g L⁻¹: 3,000 NaNO₃; 0,500 MgSO₄; 0,500 KCl; 0,010 FeSO₄; 0,040 CaCl₂; 0,001 MnSO₄; 0,040 glicose; 15,000 agar; 0,04 mM de mesotrione (1x concentração utilizada em campo). Linhagens com alta tolerância ao herbicida foram isoladas e estocadas em glicerol 50 % a -80 °C.

Análise de degradação do herbicida

Para determinar a capacidade de degradação do herbicida pelo isolado bacteriano selecionado, o mesmo foi crescido em 75 mL de Caldo Luria (LA sem Agar), em frascos de 250 mL e incubado por 24 h a 30 °C. As células foram então centrifugadas a 8.000 g, por 5 min. a 4 °C. O precipitado foi lavado duas vezes com tampão PBS (composição em g L⁻¹: 8,00 NaCl; 0,20 KCl; 1,44 Na₂HPO₄; 0,24 KH₂PO₄). As células foram ressuspensas em 50

mL de MMM, e incubadas a 30° C a 200 rpm. Nos períodos de 0 h e 24 h, alíquotas de 1 mL foram coletadas e centrifugadas a 13.000 g durante 5 min., sendo congelado o sobrenadante. As análises foram realizadas em HPLC (Waters Alliance e2695), com detector foto-diodo. Foi utilizada a coluna Eclipse XDB-C18 para caracterização do mesotrione, com dimensões de 4,6 mm X 150 a 3,5 µm de porosidade, sendo submetida a uma temperatura de 20 °C. O gradiente da fase móvel iniciou com 70 % água (0,1 % ácido fórmico) (A) : 30 % Acetonitrila (B); 30 % B em 3 min.; 55 % B em 15 min.; 100 % B em 17 min.; 100 % B em 18 min.; 30 % B em 19 min. e 30 % B em 29 min. O volume de corrida foi de 1 mL min⁻¹. O volume de injeção das amostras foi de 50 µL.

Identificação da linhagem degradadora por sequenciamento do gene 16S

A linhagem bacteriana foi crescida em placa contendo LA. Após 24 h de crescimento, foi retirada uma colônia para identificação molecular. Para amplificação do gene 16S foram usados os primers 8F 5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3', e 1492R 5' - GGTTACCTTGTTCGACTT - 3' (LANE, 1991).

Para purificação do produto do PCR foi utilizado o Kit de purificação de PCR MinElute® e as amostras foram sequenciadas no ACTGenes análises moleculares LTDA. As sequências foram comparadas com o banco de dados com seqüências de ribossomos bacterianos, Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu>), para a identificação da espécie ao nível molecular.

Crescimento bacteriano

A linhagem foi crescida em 700 mL de LB a 30 °C durante 24 h. Após o período de crescimento, as amostras foram centrifugadas a 8.000 g por 5 min. a 4 °C. O precipitado foi lavado duas vezes com tampão PBS e inoculado nos meios em triplicata: a) MM; b) MMM; c) MMC (MM contendo Callisto com o equivalente de 0,04 mM de mesotrione). A cada duas horas o crescimento bacteriano foi monitorado por espectrofotômetro a 600 nm, sendo que o material foi diluído sempre que a DO ultrapassasse valores de 0,6, para manter a acurácia das leituras. Alíquotas para HPLC foram retiradas nos períodos de 0, 12 e 24 horas.

Mesotrione como fonte de nutrientes

Para determinar se a linhagem bacteriana selecionada utiliza o herbicida como fonte de carbono ou nitrogênio, a linhagem bacteriana foi crescida em 10 mL de LB em frascos de 50 mL e incubada a 30 °C e 200 rpm. Após 24 h de crescimento, 1,5 mL de LB contendo a linhagem bacteriana foi adicionada aos diferentes meios para que os mesmos apresentassem como densidade óptica inicial 0,05: a) Meio Mineral contendo Mesotrione sem nitrogênio (MMM s/N); b) Meio Mineral contendo Mesotrione sem glucose (MMM s/C); c) MMM. As amostras foram incubadas em triplicata a 30 °C e 200 rpm. Para avaliar o crescimento bacteriano nos diferentes meios de cultura, a densidade óptica foi medida em espectrofotômetro a 600 nm nos períodos de 0 e 24 horas, sendo diluído sempre que a DO ultrapassasse o valor de 0,6. Alíquotas de 1 mL foram retiradas para análise em HPLC.

Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação da produção de malonaldeído (MDA), um metabólito reativo a ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), método adaptado de Heath e Packer (1968). A concentração de MDA foi monitorada em espectrofotômetro a 535 e 600 nm. A quantidade de MDA foi expressa em mmol/mg de massa fresca.

Extração de proteínas

A linhagem foi crescida em 2 L de LB, os quais foram incubados a 30 °C e 200 rpm. Após 24 h, as amostras foram centrifugadas a 8.000 *g* por 5 min. a 4 °C. O precipitado foi lavado duas vezes com tampão PBS e dividido em frascos contendo 50 mL dos seguintes meios: a) MM; b) MMM; c) MMC, em triplicatas e as culturas foram incubadas a 30 °C a 200 rpm. As extrações foram realizadas nos tempos de 30 min., 12 e 24 h de incubação. As células foram coletadas e o precipitado foi macerado com nitrogênio líquido. O extrato foi homogeneizado em tampão de extração de proteínas, contendo os seguintes componentes 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) (Azevedo et al., 1998). O material foi então centrifugado a 5.000 *g* por 30 min., e o sobrenadante armazenado

em alíquotas de 1 mL a -80 °C. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford, 1976, utilizando o BSA (“bovine serum albumin”) como padrão.

Variações nos padrões protéicos

As proteínas das amostras bacterianas foram separadas por PAGE desnaturante contendo 10 % de poliacrilamida como descrito por Gratão et al. (2008). Após a eletroforese o gel foi incubado por aproximadamente 12 horas em solução fixadora contendo etanol 40 % e ácido acético 10 %. O gel foi então transferido para 50 mL de uma solução contendo acetato de sódio 0,5 M, etanol 30 %, tiosulfato de sódio 20 mM e 260 µL de glutaraldeído 25 %, por 15 min. Em seguida foram realizadas três lavagens, de 15 min. cada, em água destilada, e adicionou-se 50 mL de solução contendo nitrato de prata 6 mM e 10 µL de formaldeído 37 %, por 15 min. O gel permaneceu nesta solução por 15 min. e em seguida foi incubado em 50 mL de solução reveladora contendo carbonato de sódio 0,25 M e 5 µL de formaldeído 37 % até aparecerem as bandas. Para interromper a reação foi adicionada uma solução contendo EDTA 50 mM.

Atividades das enzimas antioxidativas

Perfil de bandas da superóxido dismutase

O perfil de bandas de SOD foi medida em PAGE e também realizada a determinação das isoformas da enzima. A eletroforese em PAGE não-desnaturante (12 %) foi realizada como descrita por Medici et al. (2004). Ao final do tempo de corrida os géis foram lavados com água deionizada e incubados no escuro, a 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 brancas e coloração do gel.

Para determinação das isoformas de SOD, as amostras protéicas foram submetidas a PAGE não-desnaturante e as bandas de SOD foram classificadas como descrito por Guelfi et al., 2003, sendo distinguidas pela sensibilidade a 2 mM cianeto de potássio (KCN) e 5 mM de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As isoformas foram classificadas como: Cu/Zn-SOD quando inativada na presença de KCN e H_2O_2 ; Fe-SOD se a banda foi inativada somente na presença

de H_2O_2 , sendo resistente ao KCN; e Mn-SOD se a isoforma era resistente aos dois tratamentos.

Atividade da Catalase

A atividade de CAT em espectrofotômetro foi determinada como descrito por Kraus et al. (1995), com modificações (Gratão et al., 2008). O ensaio foi realizado à 25 °C, sendo a atividade determinada em uma solução de reação formada por 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 0,025 mL de peróxido de hidrogênio (25 %), solução preparada no momento do ensaio. A reação foi iniciada com 25 µL de extrato proteico, sendo a atividade determinada por meio da decomposição de peróxido de hidrogênio, monitorada por 1 min. através por meio de alterações na absorbância a 240 nm. Os resultados foram expressos em µmol/min./mg de proteína.

A atividade de CAT em PAGE não-desnaturante foi realizada como descrito por Ferreira et al. (2002). Após o tempo de corrida, o gel foi lavado em água deionizada (3 x 15 min.) e incubado por 10 min. em solução de H_2O_2 0,003 %, à temperatura ambiente, com agitação constante. Após este período, o gel foi lavado em água deionizada e colocado por 10 min. em uma solução de FeCl_3 1 % (m/v) e $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN}_6)$ 1 % (m/v) sob agitação. Em seguida, a solução foi retirada e o gel lavado com água deionizada. A fixação foi realizada com uma solução de ácido acético (7 %) por 15 min. e os géis foram documentados.

Análise de lipídeos

A análise de lipídeos foi realizada como descrito por Bligh e Dyer (1959), com modificações. Os lipídeos de membrana foram analisados por espectroscopia de infravermelho de transmitância, de 400 a 4000 nm e análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA), implementado no Pirouette v 4,0 software (Infometrix, Bothell, WA, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização de linhagem degradadora

Dentre os 106 isolados bacterianos tolerantes ao mesotrione, a linhagem *B. megaterium* Mes13 identificada por sequenciamento do gene ribossomal 16S, foi selecionado por apresentar alta taxa de crescimento e degradação do herbicida, quando comparado com os demais.

Análises em HPLC demonstraram que a linhagem bacteriana *B. megaterium* Mes13 degrada aproximadamente 79 % do mesotrione presente no Meio Mineral após um período de 12 h de incubação. A porcentagem de degradação aumenta para 89 % em 24 h (Fig. 1). Bactérias do gênero *Bacillus*, juntamente com membros dos gêneros *Arthobacter*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium* e *Pseudomonas*, se destacam pela alta atividade em degradação de pesticidas (Feakin et al. 1995; Kucharski et al., 2009; Omar et al., 2001; Rousseaux et al., 2001).

A degradação do mesotrione por diferentes linhagens de *Bacillus* sp. foi descrita por Durand et al. (2006) e Batisson et al. (2009), no qual a degradação completa do mesotrione foi descrita ocorrendo após 24 h de incubação, e as moléculas de MNBA e AMBA foram caracterizadas como sendo os principais produtos da metabolização. A molécula de AMBA foi descrita por apresentar maior toxicidade que a molécula original (Mitchell et al., 2001).

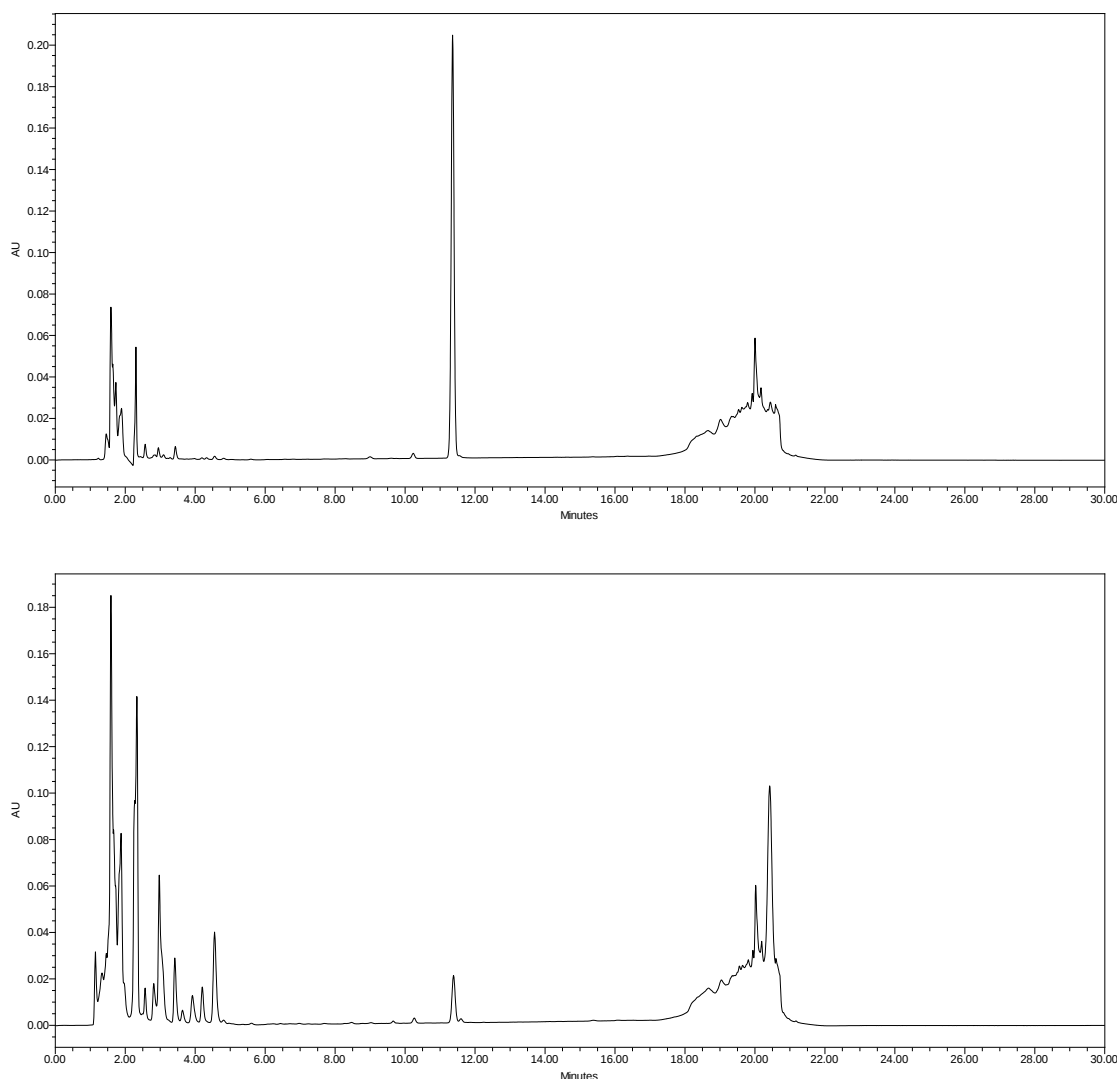


Figura 1. Cromatogramas da degradação do mesotrione por *B. megaterium* Mes13, Painel superior: Pico do mesotrione em 0 h de incubação em MMM onde a molécula o Mesotrione se encontra íntegra. Painel inferior: Pico do mesotrione após 24 h de incubação em MMM, correspondente a 11 % do pico do mesotrione no período de 0 h (Tempo de retenção do mesotrione = 11,4 min.).

Mesotrione como fonte de nutrientes

A análise da degradação do herbicida mesotrione em diferentes meios de cultura demonstrou que a bactéria *B. megaterium* Mes13 degradou 100 % do herbicida contido no Meio Mineral sem nitrogênio após 24 h de incubação, enquanto no mesmo período a degradação em MMM foi de 35 % e em MMM sem carbono foi de 18 % (Fig. 2). Apesar da alta degradação do herbicida no MMM sem nitrogênio, o crescimento neste tratamento é mais baixo que no tratamento contendo MMM e semelhante ao tratamento contendo MM sem nitrogênio (dado não mostrado), demonstrando que o micro-organismo não está utilizando o herbicida como fonte de nitrogênio.

A presença do nitrato de sódio como fonte de nitrogênio no tratamento controle gerou uma inibição na taxa de degradação do herbicida se comparada ao tratamento sem essa fonte de nitrogênio. Uma das hipóteses seria a de que a degradação do mesotrione é realizada por uma enzima inespecífica que estaria envolvida na assimilação do nitrogênio pela célula bacteriana e que, na ausência da fonte primária de nitrogênio, a mesma degrada o mesotrione por cometabolismo. Neste mecanismo de degradação o herbicida é identificado como substrato de enzimas não específicas do metabolismo celular, capaz de modificar substâncias que não são seus substratos naturais, havendo necessidade de suplementação do meio com outras fontes de nutrientes para que a bactéria cresça e a degradação ocorra (Silva et al., 2003). Assim como observado em nosso trabalho, em Entry (1999) houve uma diferença na mineralização dos herbicidas atrazina e 2,4-D, que diminuiu com o aumento da quantidade de nitrogênio no solo.

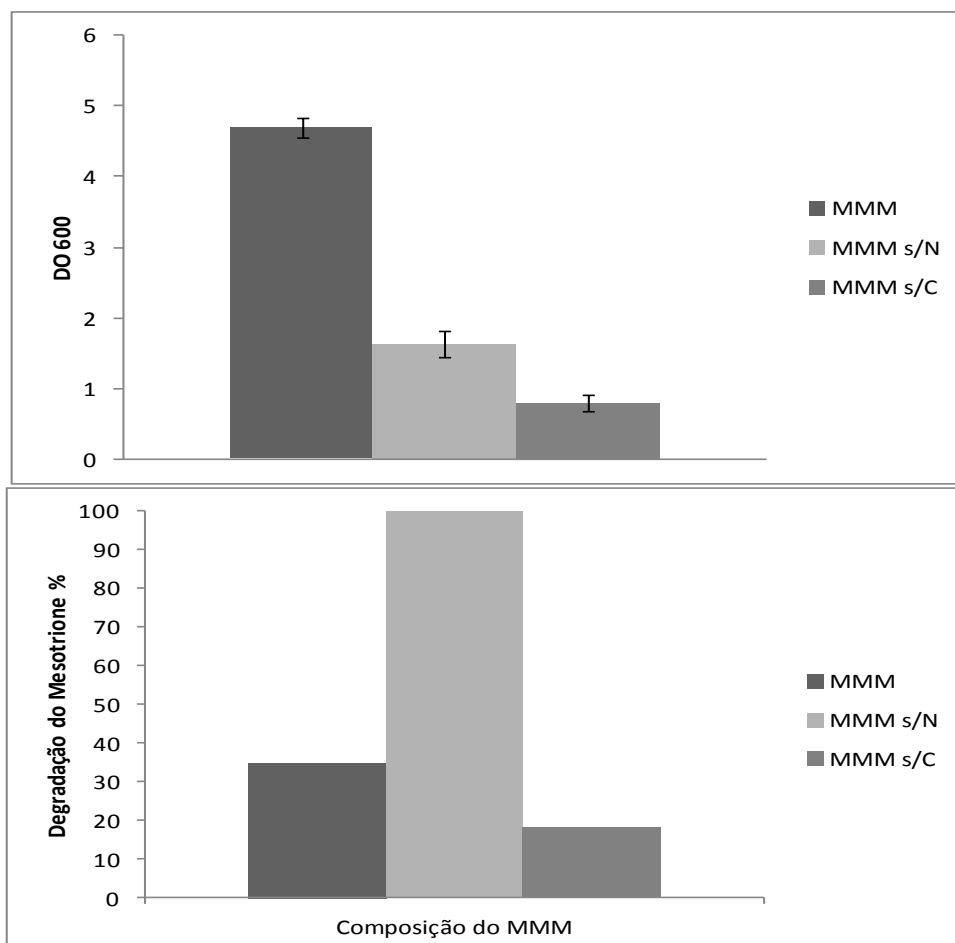


Figura 2. Painel superior: Crescimento de *B. megaterium* Mes13 em MMM, MMM sem Nitrogênio e MMM sem carbono, após 24 h de incubação. Painel inferior: degradação do mesotrione em MMM, MMM sem Nitrogênio e MMM sem carbono, após 24 h de incubação.

Capacidade de crescimento bacteriano em contato com o herbicida

Inferimos, pelos resultados obtidos (Fig. 3) que não há diferenças no crescimento bacteriano entre os tratamentos com a presença dos xenobióticos e o controle, demonstrando que a bactéria apresenta tolerância aos efeitos tóxicos dos herbicidas.

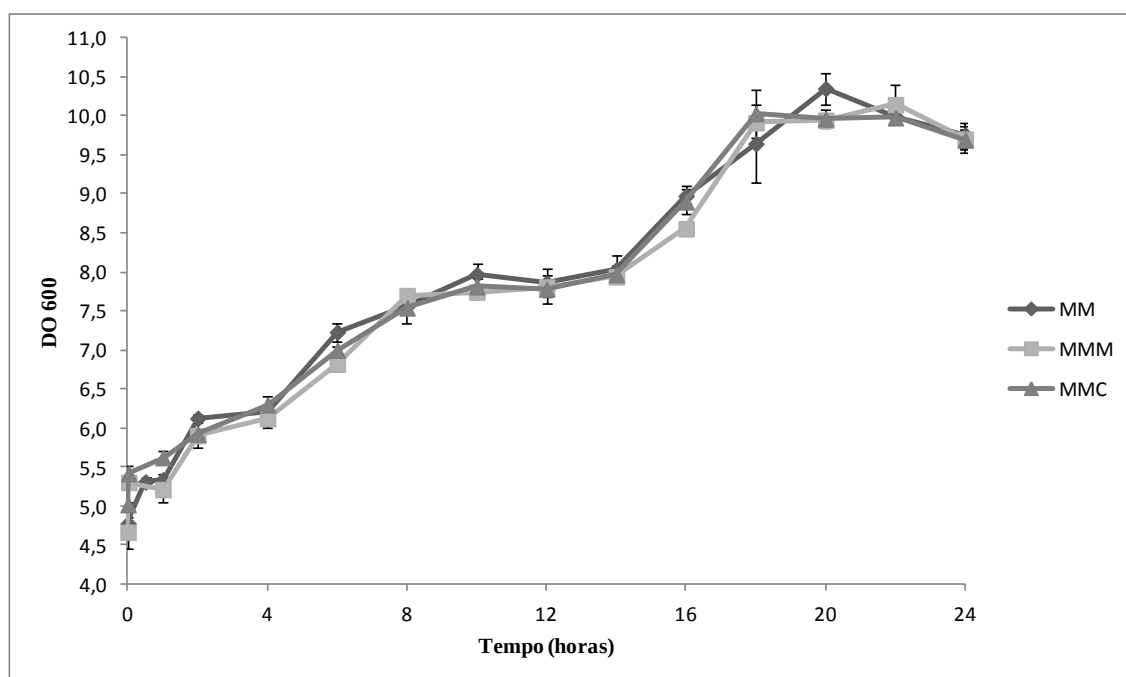


Figura 3. Crescimento de *B. megaterium* Mes13 a 30 °C em MM, MMM e MMC.

Peroxidação Lipídica

As taxas de Malondialdeído (MDA) são frequentemente utilizadas como indicador de peroxidação lipídica. Estas taxas demonstram os danos que as espécies ativas de oxigênio podem ter causado nas membranas bacterianas, seja por efeito direto, ou por um sistema enzimático antioxidativo não eficiente (Gratão et al., 2005; Imlay, 2008; Martins et al., 2011; Shao et al., 2010;). As taxas de MDA em *B. megaterium* Mes13 foram avaliadas para determinar a toxicidade do Callisto e do seu princípio ativo (Fig. 4), e as mesmas se mostraram mais baixas no tratamento contendo o herbicida em sua formulação comercial, do que no controle e no tratamento com mesotrione, demonstrando que esta linhagem foi eficiente em combater a peroxidação lipídica, seja por resposta antioxidativa eficiente ou por apresentar modificações na membrana plasmática, como mudança na saturação de lipídeos, que preveniria a peroxidação lipídica, pois a mesma só ocorre quando os lipídeos estão na

forma polinsaturada (Lima; Abdala, 2001).

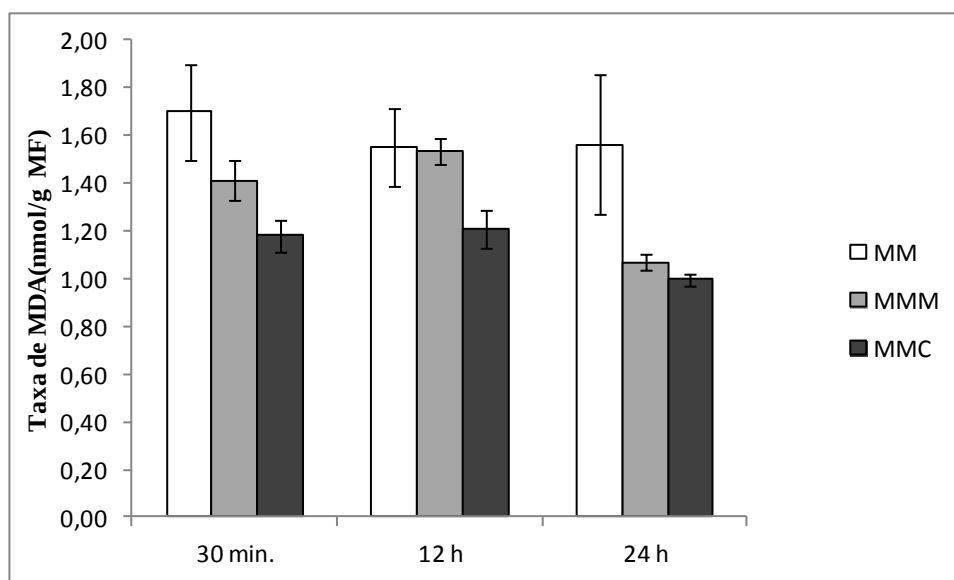


Figura 4. Quantificação de MDA (nmol/g massa fresca) em *B. megaterium* Mes13 incubado durante 30 min., 12 h e 24 h em contato com o herbicida mesotrione e sua formulação comercial, Callisto, além do controle, sem a presença dos xenobióticos.

Perfil Protéico

O perfil protéico visualizado em SDS PAGE desnaturante (Fig. 5) não apresentou variações com relação à presença de bandas entre os diferentes tratamentos, e sim quanto aos diferentes períodos em que foi analisado, o que indica que não houve modificações específicas no metabolismo bacteriano em resposta à presença do herbicida no meio.

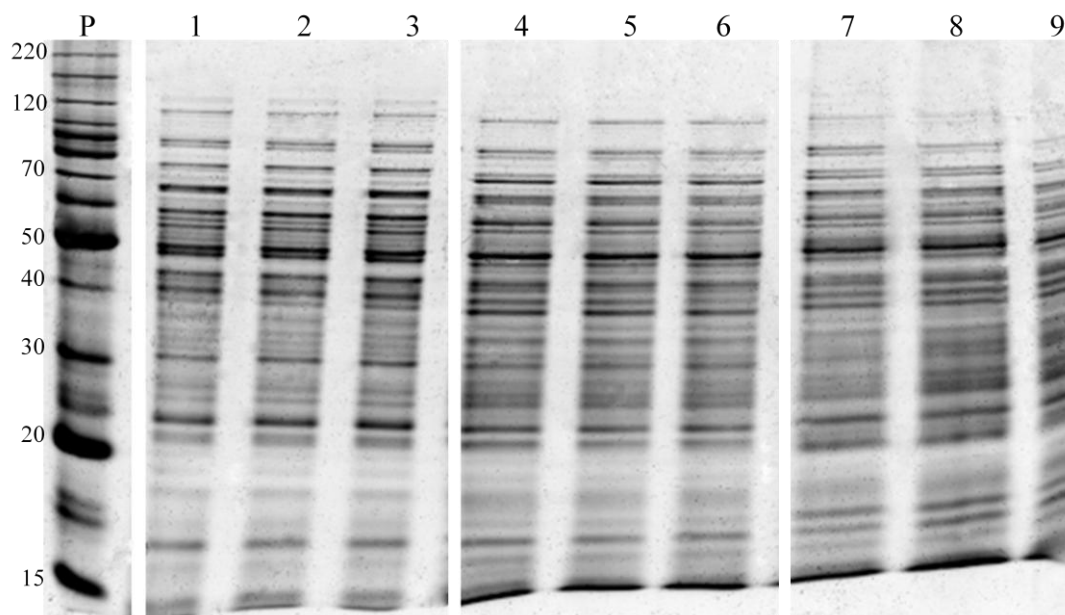


Figura 5. Perfil proteico de extratos de cultura bacteriana em gel SDS-PAGE desnaturante. Padrão de massa molecular com os pesos em KDa (P) Poços 1, 2 e 3, representam extratos proteicos de *B. megaterium* Mes13 incubado por 30 min., 4, 5 e 6 incubado por 12 h e 7, 8 e 9 incubado por 24 h no controle e nos tratamentos mesotrione e Callisto, respectivamente.

Perfil de bandas de SOD em PAGE não desnaturante

O padrão de bandas da enzima SOD demonstrou não haver presença de isoformas específicas para responder ao contato com o herbicida comercial e seu princípio ativo (Fig. 6). A presença da banda I se mostrou mais intensa nos tratamentos incubados por 30 min. e sua intensidade diminui progressivamente nos períodos de 12 e 24 h em todos os tratamentos. Provavelmente esta banda foi expressa para a adaptação fisiológica das células bacterianas às modificações no meio de cultura ao qual a bactéria foi transferida.

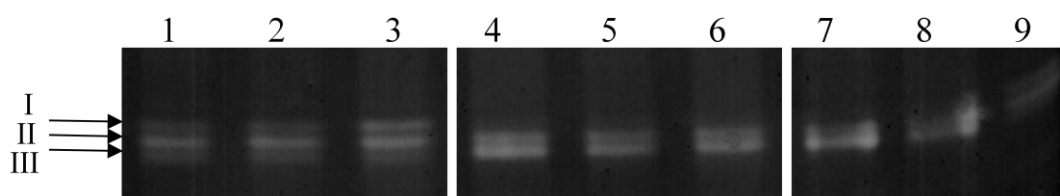


Figura 6. Atividade de SOD em PAGE não-desnaturante de extratos de cultura bacteriana. Poços 1, 2 e 3, representam extratos proteicos de *B. megaterium* Mes13 incubado por 30 min., 4, 5 e 6 incubado por 12 h e 7, 8 e 9 incubado por 24 h no controle, e nos tratamentos mesotrione e Callisto, respectivamente.

A enzima superóxido dismutase pode ser classificada de acordo com o seu cofator metálico, podendo ser Mn-SOD, Fe-SOD, Cu/Zn-SOD e Ni-SOD, sendo esta última menos

significativa em bactérias, encontrada apenas em porções citosólicas de *Streptomyces* sp. (Demple, 1991; Youn et al., 1996). No gel de isoformas de SOD (Fig. 7), foi possível visualizar três bandas caracterizadas como sendo Mn-SOD. Em bactérias, esta isoenzima é encontrada na porção citoplasmática e apresenta papel chave na defesa celular contra o radical superóxido (Imlay, 2008), sendo a primeira isoforma com produção induzida pela exposição ao oxigênio, ao radical superóxido ou a mudanças na taxa do crescimento (Demple, 1991). A isoforma Mn-SOD foi descrita por Casillas-Martinez e Setlow (1997) como sendo a isoforma predominante, se não a única, presente em *Bacillus subtilis*. Esta isoforma apresentou a expressão diferenciada durante os diferentes tempos de tratamento (Fig. 6), indicando seu envolvimento com as modificações nas taxas de crescimento da bactéria.

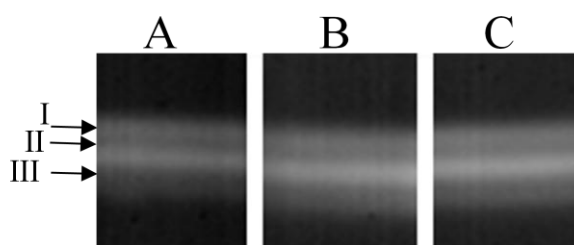


Figura 7. Caracterização das isoformas de SOD em PAGE, A: controle, B: presença de KCN, C: presença de H₂O₂.

Atividade de catalase

A atividade de catalase aumentou nos períodos de 12 h e 24 h de incubação se comparada ao período de 30 min. (Fig. 8). No período de 12 horas o tratamento controle apresenta maior atividade que os tratamentos contendo xenobiótico. Já no período de 24 h, o tratamento com mesotrione apresentou um aumento na atividade de catalase. Apesar da baixa atividade da catalase nos tratamentos contendo os xenobióticos, não é possível afirmar que a presença dos herbicidas no meio não tenha estimulado a geração de peróxido de hidrogênio, pois a catalase não é a única enzima a fazer a retirada do mesmo da célula. Enzimas como a tiorredoxina tiol-peroxidase e alquil hidroperóxido redutase e outras peroxidases também são responsáveis pela detoxificação celular do peróxido de hidrogênio e a catalase apresenta maior importância na degradação do peróxido de hidrogênio quando este está presente em altas concentrações dentro da célula, momento em que outras enzimas peroxidases têm sua atividade saturada devido à lenta transferência de elétrons e/ou inativação das mesmas por excesso de oxidação (Mishra et al., 2012; Mols et al., 2011; Mongkolsuk et al., 2005; Wood et

al., 2003).

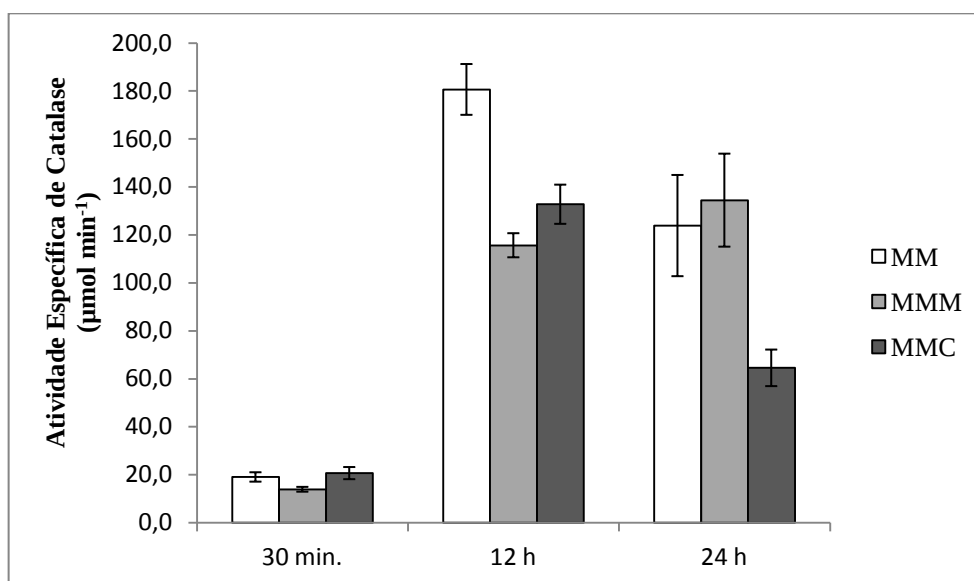


Figura 8. Atividade específica de catalase ($\mu\text{mol min}^{-1}$) de *B. megaterium* Mes13 incubado por 30 min., 12 h e 24 h em contato com o herbicida mesotrione e sua formulação comercial, Callisto, além do controle.

O perfil de isoformas de CAT (Fig. 9) demonstrou não haver variação na expressão de bandas entre os tratamentos contendo os xenobióticos e o controle. A ausência de isoformas de SOD e CAT específicas para responder ao contato com herbicidas também foi citado em trabalho com *P. ananatis* (artigo em preparação) em contato com o herbicida mesotrione e sua formulação comercial, Callisto e em estudo com *Escherichia coli* K12 na presença dos herbicidas quinclorac e bensulfuron metil (Lü et al., 2009).

Nos tratamentos controle, mesotrione e Callisto em 30 min. de incubação observou-se a presença de duas isoformas ativas (III, IV), enquanto nos períodos de 12 h e 24 h houve a ativação de três novas isoformas nesse período (I, II e V), sendo a isoforma V presente apenas no período de 12 h.

O perfil de bandas em PAGE não-desnaturante corrobora com a atividade determinada em espectrofotômetro, apresentando uma menor atividade em 30 min. (Fig. 8) e a expressão de duas isoformas (Fig. 9), enquanto 12 h e 24 h apresentaram uma maior atividade de catalase e um maior número de isoformas.

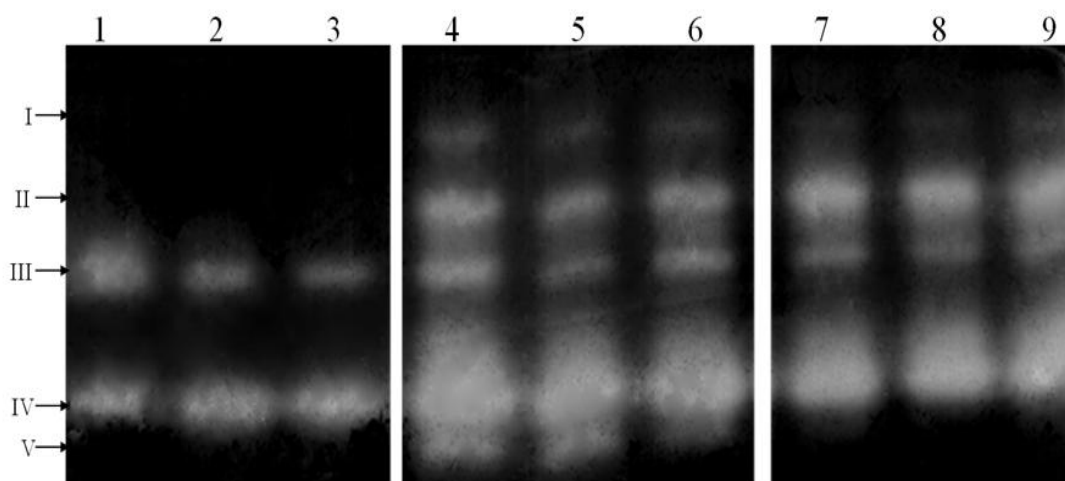


Figura 9. Atividade de CAT em PAGE não-desnaturante de extratos de cultura bacteriana. Poços 1, 2 e 3, representam *B. megaterium* Mes13 incubado por 30 min., 4, 5 e 6 incubado por 12 h e 7, 8 e 9 incubado por 24 h no controle e nos tratamentos mesotrione e Callisto, respectivamente.

Provavelmente a atividade de catalase diferiu entre os períodos devido à mudança nas fases de crescimento. No período de 12 h há um aumento tanto a atividade total (Fig. 8) quanto no número de isoformas (Fig. 9) em 12 h devido à bactéria estar em fase exponencial de crescimento, o que comumente induz a produção de catalase (Mishra; Imlay, 2012). Em 24 h houve uma diminuição na atividade (Fig. 8) e no número de isoformas (Fig. 9) devido à entrada da bactéria em fase estacionária de crescimento em 24 h. Segundo Steinman (1997) as atividade da *katE* catalase e *katG* catalase-peroxidase em *E. coli* são induzidas de 15 a 20 vezes durante a fase exponencial de crescimento e cai pela metade durante a fase estacionária de crescimento. Segundo Bandyopadhyay e Steinman (2000) os níveis de catalase-peroxidase *katA* e *katB* em *Legionella pneumophila* aumentam durante a fase exponencial de crescimento.

O tratamento contendo o herbicida em sua formulação comercial Callisto apresentou uma menor atividade de catalase se comparado ao controle e ao com mesotrione. Como não houve diferenças no crescimento bacteriano nos três tratamentos, e a taxa de peroxidação lipídica foi mais baixa no tratamento com Callisto, é possível que outra enzima esteja agindo na retirada do peróxido de hidrogênio da célula. Estudo de Lü et al. (2009), com *Stenotrophomonas maltophilia* WZ2 e *E. coli* K12 em contato com quinclorac e bensulfuron-metil, demonstrou que a catalase apresenta papel minoritário na defesa celular contra estresse oxidativo induzido por herbicidas.

A análise de componente principal (PCA) foi aplicado a fim de avaliar os dados de espectros de Infravermelho. Foi demonstrado que o contato entre o herbicida em sua formulação comercial e a bactéria induziu modificações na estrutura de lipídeos de membrana

(Fig. 10). O estudo de Balagué et al. (2001) demonstra que o contato entre *E. coli* e o herbicida 2,4-D induziu uma redução na fluidez da membrana por meio da diminuição da taxa de lipídeos insaturados para prevenir a célula dos efeitos tóxicos desse químico. Modificações na estrutura de membrana bacteriana em contato com o herbicida comercial também podem ser indicadoras de adaptações da linhagem ao herbicida, pois a mudanças no grau de saturação ou na composição dos lipídeos de membrana pode impedir que a mesma sofra os efeitos danosos do contato com o herbicida. Como as espécies reativas de oxigênio tem a capacidade de reagir com ácidos graxos poliinsaturados (Lima; Abdalla, 2001; Bielski et al., 1983), sugerimos que uma mudança na saturação dos lipídeos da membrana diminuiria a peroxidação dos lipídeos, consequentemente diminuindo o MDA.

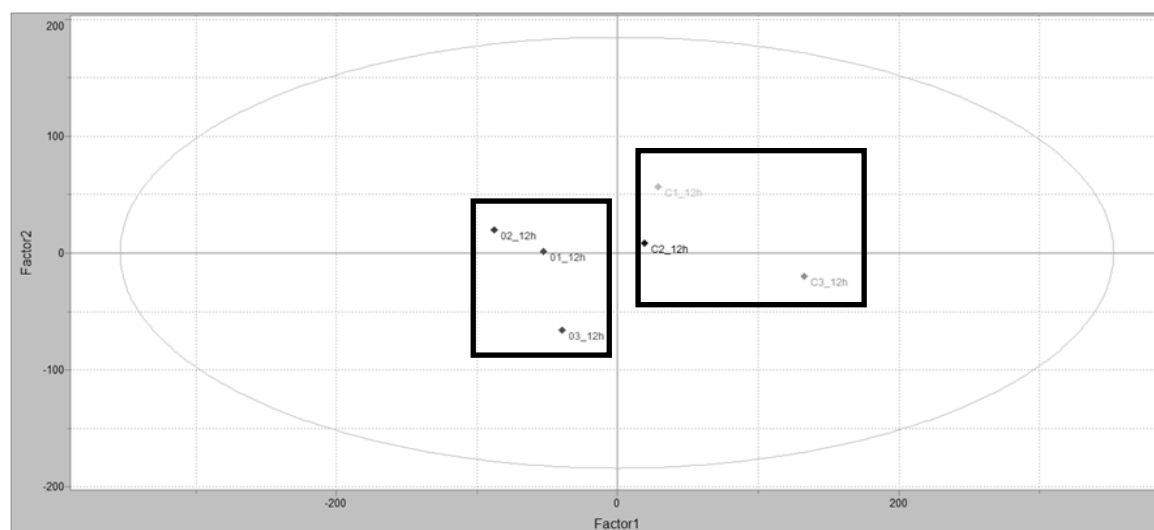


Figura 10. Análise quimiométrica de lipídeos em infravermelho. C1, C2 e C3 representando réplicas da análise dos lipídeos de *B. megaterium* Mes13 em MMC e O1, O2, O3 representando réplicas do da análise dos lipídeos de *B. megaterium* Mes13 em MM incubados por 12 h.

Conclusões

Não foram constatadas diferenças no crescimento bacteriano em contato com o herbicida comercial, seu princípio ativo o mesotrione e o controle, demonstrando tolerância de *Bacillus megaterium* Mes13 à toxicidade dos xenobióticos. A atividade das enzimas antioxidativas (SOD e CAT) não foi induzida em resposta ao contato da linhagem bacteriana com o herbicida Callisto e seu princípio ativo mesotrione, demonstrando que a via clássica de degradação de espécies reativas em situações de estresse oxidativo não estaria envolvida na tolerância da linhagem bacteriana ao herbicida comercial Callisto e seu princípio ativo. A

degradação do princípio ativo mesotrione se mostrou mais eficiente na ausência de Nitrato de Sódio em meio de cultura, apesar da bactéria não utilizar o mesotrione como fonte de nitrogênio. Acreditamos que a degradação do mesotrione seja realizada por uma enzima inespecífica que, na ausência da fonte primária de nitrogênio, a mesma reconhece e degrada o mesotrione por cometabolismo. Provavelmente a degradação do herbicida é comandada por um processo de repressão catabólica, onde subprodutos podem inibir o processo de degradação. Modificações na estrutura de membrana bacteriana em contato com o herbicida comercial podem ser indicadas como adaptações da linhagem ao herbicida. Como as espécies reativas de oxigênio tem a capacidade de reagir com ácidos graxos insaturados, uma mudança na saturação dos lipídeos da membrana diminuiria a peroxidação dos lipídeos, o que explicaria a menor taxa de MDA no tratamento contendo o Callisto. Provavelmente as modificações na membrana plasmática aliadas a decomposição da molécula do mesotrione conferiram a linhagem capacidade de tolerar a presença dos xenobióticos nas condições experimentais testadas.

Referências Bibliográficas

AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, p. 280-292, 1998.

ALSCHER, R. G.; DONAHUE, J. L.; CRAMER, C. L. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 224-233, 1997.

BALAGUE, C.; STURTZ, N.; DUFFARD, R.; DE DUFFARD, A. M. E. Effect of 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid herbicide on *Escherichia coli* growth, chemical composition and cellular envelope. **Environmental Toxicology**, v.16, p. 43p. , 2001.

BANDYOPADHYAY, P.; STEINMAN, H. M. Catalase-Peroxidases of *Legionella pneumophila*: Cloning of the *katA* Gene and Studies of KatA Function. **Journal Of Bacteriology**, v. 182, n. 23, p. 6679–6686, 2000.

BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, n. 7, p. 723-736, 2005.

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

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improve assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.

BEAUDEGNIES, R.; EDMUNDS, A. J. F.; FRASER, T. E. M.; HALL, R. G.; HAWKES, T. R.; MITCHELL, G.; SCHAETZER, J.; WENDEBORN, S.; WIBLEY, J. Herbicidal 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors-A review of the triketone chemistry story from a Syngenta perspective. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 4134-4152, 2009.

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

BIELSKI, B. H. J.; RAVINDRA, A. L.; SUTHERLAND, M. W. A study of the reactivity of $\text{HO}_2^- / \text{O}_2^{\cdot -}$ with unsaturated fatty acids. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 8, p. 4759-4761, 1983.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-259, 1976.

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

CASILLAS-MARTINEZ, L.; SETLOW, P. Alkyl hydroperoxide reductase, catalase, MrgA, and superoxide dismutase are not involved in resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat or oxidizing agents. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 23, p. 7420-7425, 1997.

CHAABANE, H.; VUILLET, E.; JOUX, F.; LANTOINE, F.; CONAN, P.; COOPER, J.-F.; COSTE, C.-M. . Photodegradation of sulcotrione in various aquatic environments and toxicity of its photoproducts for some marine micro-organisms. **Water Research**, v. 41, p. 1781-1789, 2007.

CHANTAWANNAKUL, P.; ONCHAROEN, A.; KLANBUT, K.; CHUKEATIROTE, E.; LUMYONG, S. Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand, **Science Asia**, v. 28, p. 241-245, 2002.

DEMPLE, B. Regulation of bacterial oxidative stress genes. **Annual Review of Genetics**, v. 25, p. 315-337, 1991.

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, p. 222-228, 2006.

ENTRY, J. A. Influence of nitrogen on atrazine and 2, 4 dichlorophenoxyacetic acid mineralization in blackwater and redwater forested wetland soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, p. 348-353, 1999.

FEAKIN, S. J.; BLACKBURN, E.; BURNS, R. G. Inoculation of granular activated carbon in a fixed bed with s-triazine degrading bacteria as a water treatment process. **Water Research**, v. 29, n.3, p. 819-825, 1995.

FERGUSON, G. P. Protective mechanisms against toxic electrophiles in *Escherischia coli*. **Trends microbial**, v. 7, n. 6, p. 242-247, 1999.

FERREIRA, R. R.; FORNAZIER, R. F.; VITORIA, A. P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. **Journal of Plant Nutrition**, v. 25, p. 327-342, 2002.

GRATÃO, P. L. ; POLLE, A.; LEA, P. J. ; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, p. 481. , 2005.

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

GUELF, A.; AZEVEDO, R. A.; LEA, P. J.; MOLINA, S. M. G. Growth inhibition of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* by cadmium: an antioxidant enzyme approach. **Journal of General Applied Microbiology**, v. 49, p. 63-73, 2003.

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

IMLAY, J. A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. **Annual Review of Biochemistry**; v. 77, p. 755-776, 2008.

KUCHARSKI, J.; BAĆMAGA, M.; WYSZKOWSKA, J. Effect of soil contamination with herbicides on the nitrification process. **Ecological Chemistry and Engineering A**, v. 16, n. 8, p. 947-952, 2009.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**, 1991.

LÜ, Z.; SANG, L.; LI, Z.; MIN, H. Catalase and superoxide dismutase activities in a *Stenotrophomonas maltophilia* WZ2 resistant to herbicide pollution. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 136-143, 2009.

LÜ, Z.; MIN, H.; XIA, Y. The response of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Burkholderiacepacia* WZ1 to oxidative stress of exposure to quinclorac. **Journal of Environmental Health Science**, v. 39, p. 431-441, 2004.

LEE, L.; TIN, S.; KELLEY, S. T. Culture-independent analysis of bacterial diversity in a child-care facility. **Biomedical central**, v. 7, n. 27, p. 1-13, 2007.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, 2001.

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

McCORDE, J M; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases: an enzymatic function for erythrocyt (emocuprien). **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MEDICI, L. O.; AZEVEDO, R. A.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. The influence of nitrogen supply on antioxidant enzymes in plant roots. **Functional Plant Biology**, v. 31, p. 1–9, 2004.

MISHRA, S; IMLAY, J. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 525, 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, p. 120-128, 2001.

MOLS, M; ABBE, T. Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus emi*. **Environmental Microbiology**, v. 13, p. 1387–1394, 2011.

MONGKOLSUK, S.; DUBBS, J. M.; VATTANAVIBOON, P. Chemical modulation of physiological adaptation and cross-protective responses against oxidative stress in soil bacterium and phytopathogen *Xanthomonas*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 687-690, 2005.

NADLER, V.; GOLDBERG, I.; HOCHMAN, A. Comparative study of bacterial catalases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 882, p. 234-241, 1986.

OMAR, S. A.; ABDEL-SATER, M. A. Microbial populations and enzyme activities in soil treated with pesticides. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 127, p. 49–63, 2001.

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

PIMENTEL, D.; LEVITAN, L. Pesticides: Amounts Applied and Amounts Reaching Pests. **BioScience**, v. 36, n. 2, p. 86-91, 1986.

ROUSSEAU, S.; HARTMANN, A.; SOULAS, G. Isolation and characterization of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 36, p. 211–222, 2001.

SILVA, C. M. M. S; FAY, E. F. Impacto Ambiental do Regulador de Crescimento Vegetal Paclobutrazol. **EMBRAPA**, v. 30, 2003.

SHAO, T. J.; YANG, G. Q.; WANG, M. Z.; LU, Z. M.; MIN, H.; ZHAO, L. Reduction of oxidative stress by bioaugmented strain *Pseudomonas* sp HF-1 and selection of potential biomarkers in sequencing batch reactor treating tobacco wastewater. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 6, p. 1117-1123, 2010.

SHARMA, D.; NAGPAL, A.; PAKADE, Y. B.; KATNORIA, J. K. Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: A review. **Talanta**, London, v. 82, n. 4, p. 1077-1089, 2010.

SOLTANI, N.; SHROPSHIRE, C.; SIKKEMA, P. H. Response of spring planted barley (*Hordeum vulgare* L.), oats (*Avena sativa* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) to mesotrione. **Crop Protection**, v. 30, p. 849-853, 2011.

STEINMAN, H. M.; FAREED, F.; WEINSTEIN, L. Catalase-peroxidase of *Caulobacter crescentus*: function and role in stationary-phase survival. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 21, p. 6831-6836, 1997.

VAN EERD, L. L.; HOAGLAND, R. E.; ZABLOTOWICZ, R. M.; HALL, J. C. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. **Weed Science**, v. 51, p. 472-495, 2003.

WOOD, Z. A.; SCHRODER, E.; ROBIN HARRIS, J.; POOLE, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, p. 32–40, 2003.

YOUN, H. D.; KIM, E. J.; ROE, J. H.; HAH, Y. H.; KANG, S. O. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. **Biochemistry Journal**, v. 318, p. 889-896, 1996.

ZABLOTOWICZ, R. M.; LOCKE, M. A.; HOAGLAND, R. E.; KNIGHT, S. S.; CASH, B. Fluorescent *pseudomonas* isolates from Mississippi Delta oxbow lakes: In vitro herbicide biotransformations. **Environmental Toxicology**, v. 16, n. 1, p. 9 - 19, 2001.

ZAMOCKY, M.; FURTMULLER, P. G.; OBINGER, C. Evolution of catalases from bacteria to human. **Antioxid Redox Signal.** v. 10, n. 9, p. 1527–1548, 2008.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ALFERNESS, P.; WIEBE, L. Determination of mesotrione residues and metabolites in crops, soil and water by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3926-3934, 2002.

ALVES FILHO, J. P. Uso de Agrotóxicos no Brasil: Controle Social e Interesses Corporativos. **Annablume/Fapesp**, São Paulo, 2002.

AMMENDOLA, S.; AJELLO, M.; PASQUALI, P.; KROLL, J. S.; LANGFORD, P. R.; ROTILIO, G.; VALENTI, P.; BATTISTONI, A. Differential contribution of sodc1 and sodc2 to intracellular survival and pathogenicity of *salmonella enterica* serovar choleraesuis. **Microbes and infection** v. 7, p. 698-707, 2005.

AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 280-292, 1998.

BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, n. 7, p. 723-736, 2005.

BARREIROS, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

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, p. 1195-1201, 2009.

BEAUDEGNIES, R.; EDMUNDS, A. J. F.; FRASER, T. E. M.; HALL, R. G.; HAWKES, T. R.; MITCHELL, G.; SCHAEZTER, J.; WENDEBORN, S.; WIBLEY, J. Herbicidal 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors--A review of the triketone chemistry story from a Syngenta perspective. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 4134-4152, 2009.

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, p. 248-259, 1976.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improve assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.

BONNET, J. L.; BONNEMOY, F.; DUSSER, M.; BOHATIER, J. Toxicity Assessment of the Herbicides Sulcotrione and mesotrione Toward Two Reference Environmental Micro-organisms: *Tetrahymena pyriformis* and *Vibrio fischeri*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 55, p. 576-583, 2008.

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

CARDONA, M. C. G., **Linguagem dos riscos e sujeitos posicionados: o uso de agrotóxicos no Vale de Quíbor, Venezuela**. 250 f., tese de doutorado, Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, 2004.

CARLIOZ, A.; TOUATI, D. Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? The **EMBO Journal**, v. 5, p. 623-630, 1986.

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

CASH, T. P.; PAN, Y.; SIMON, C. Reative oxygen species and cellular oxygen sensing. **Free radical biology & medicine**, v. 43, p. 1219-1225, 2007.

CASIDA, J. E.; QUISTADE, G. B. Golden age of insecticide research: past, present or future? **Annual Review of Entomology**, v.43, p. 1-16, 1998.

CHAABANE, H.; VUILLET, E.; JOUX, F.; LANTOINE, F.; CONAN, P.; COOPER, J.-F.; COSTE, C.-M. . Photodegradation of sulcotrione in various aquatic environments and toxicity of its photoproducts for some marine micro-organisms. **Water Research**, v. 41, p. 1781-1789, 2007.

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

DALY, H.; DOYEN J. T.; PORCELL III, A. H. **In introduction to insect biology and diversity**. 2. ed. New York: Oxford University Press p. 279-300, Cap. 14, 1998.

DE BONT, J. Solvent tolerant bacteria in biocatalysis. **Trends of Biotechnology**, v. 16, p. 493-499, 1998.

DE CARVALHO, C. C. C. R.; DA FONSECA, M. M. R. Degradation of hydrocarbons and alcohols at different temperatures and salinities by *Rhodococcus erythropolis* DCL14. **FEMS Microbiol Ecology**, v. 51, p. 389-399, 2005.

DE GROOT, H.; LITTAUER, A. Hypoxia, reactive oxygen, and cell injury. **Free Radical Biology and Medicine** v. 6, n. 5, p. 541-551, 1989.

DE GROOTE, M. A.; OCHSNER, U. A.; SHILOH, M. U.; NATHAN, C.; MCCORD, J. M. ; DINAUER, M. C.; LIBBY, S. J.; VAZQUEZ-TORRES, A.; XU, Y.; FANG, F. C. Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 94, p. 13997-14001, 1997.

DELANEY, J.; CLARKE, E.; HUGHES, D.; RICE, M. Modern agrochemical research: a missed opportunity for drug discovery? **Drug Discovery Today**, v. 11, p. 839-845, 2006.

DEMPLE, B. Regulation of bacterial oxidative stress genes. **Annual Review of Genetics**, v. 25, p. 315-337, 1991.

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, p. 222-228, 2006.

ENTRY, J. A. Influence of nitrogen on atrazine and 2, 4 dichlorophenoxyacetic acid mineralization in blackwater and redwater forested wetland soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, p. 348-353, 1999.

ESTRADA, Manuel. (1998). *Uso Moderado de Plaguicidas en México*. Memorias, Ciclo de Conferencias "Hacia una renovación ambiental en México". Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

FANG, F. C.; DEGROOTE, M. A.; FOSTER, J. H.; BAUMLER, A. J.; OCHSNER, U.; TESTERMAN, T.; BEARSON, S.; GIARD, J. C.; XU, Y.; CAMPBELL, G.; LAESSIG, T. Virulent *Salmonella typhimurium* has two periplasmic Cu,Zn-superoxide dismutases. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** v. 96: p. 7502-7507, 1999.

FARRANT, J. L.; SANSONE, A.; CANVIN, J. R.; PALLAN, M. J.; LANGFORD, P. R.; WALLIS, T. S.; DOUGAN, G.; KROLL, J. S. Bacterial copper- and zinc-cofactored superoxide dismutase contributes to the pathogenesis of systemic salmonellosis. **Molecular Microbiology**, v. 25, p. 785-796, 1997.

FEAKIN, S. J.; BLACKBURN, E.; BURNS, R. G. Inoculation of granular activated carbon in a fixed bed with s-triazine degrading bacteria as a water treatment process. **Water Research**, v. 29, n. 3, p. 819-825, 1995.

FERGUSON, G. P. Protective mechanisms against toxic electrophiles in *Escherichia coli*. **Trends microbial**, v. 7, n. 6, p. 242-247, 1999.

FERREIRA, R. R.; FORNAZIER, R. F.; VITORIA, A. P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. **Journal of Plant Nutrition**, v. 25, p. 327-342, 2002.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutase. **Annual Review Biochemistry**, v. 64, p. 97-112, 1995.

GEE, J. M.; VALDERAS, M. W.; KOVACH, M. E.; GRIPPE, V. K.; ROBERTSON, G. T.; NG, W. L.; RICHARDSON, J. M.; WINKLER, M. E.; ROOP II, D. R. M. The *Brucella abortus* Cu,Zn superoxide dismutase is required for optimal resistance to oxidative killing by murine macrophages and wild-type virulence in experimentally infected mice. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 2873-2880, 2005.

GUELFY, A.; AZEVEDO, R. A.; LEA, P. J.; MOLINA, S. M. G. Growth inhibition of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* by cadmium: an antioxidant enzyme approach. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 49, p. 63p. , 2003.

GONZÁLEZ-FLECHA, B.; DEMPSEY, B. Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 23, p. 13681-13687, 1995.

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

HEIPIEPER, H. J.; DE BONT, J. A. M. Adaptation of *Pseudomonas putida* S 12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 4440-4444, 1994.

HEIPIEPER, H. J.; WEBER, F. J.; SIKKEMA, J.; KEWELOH, H.; DE BONT, J. A. M. Mechanisms behind resistance of whole cells to toxic organic solvents. **Trends Biotechnology** , v. 12, p. 409-415, 1994.

IMLAY, J. A.; FRIDOVICH, I. Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 11, p. 6957-6965, 1991.

IMLAY, J. A. Pathways of oxidative damage. **Annual Review Microbiology**, v. 57, p. 395-418, 2003.

IMLAY, J.A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, p. 755-776, 2008.

JIANG, L.; ZHENG, P. Y.; YANG, H. Mobility of prometryne in soil as affected by dissolved organic matter. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 24, p. 11933-11940, 2008.

KARABELAS, A. J.; PLAKAS, K. V.; SOLOMOU, E. S.; DROSSOU, V.; SARIGIANNIS, D. A. Impact of European legislation on marketed pesticides — A view from the standpoint of health impact assessment studies. **Environmental Internationall**, v. 35, p. 1096-1107, 2009.

KOLTOVER, V. K. Antioxidant biomedicine: from free radical chemistry to systems biology mechanisms. **Russian Chemical Bulletin, International Edition**, v. 59, n. 1, p. 37-42, 2010.

KUO, C. F.; MASHINO, T.; FRIDOVICH, I. Alpha, beta-Dihydroxyisovalerate dehydratase. A superoxide-sensitive enzyme. **Journal of Biology Chemistry**., v. 262, p. 4724-4727, 1987.

KUCHARSKI, J.; BAĆMAGA, M.; WYSZKOWSKA, J. Effect of soil contamination with herbicides on the nitrification process. **Ecological Chemistry and Engineering** , v. 16, n. 8, p. 947-952, 2009.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, 2001.

LOPEZ-PEREZ, G. C.; ARIAS-ESTÉVEZ, M.; LÓPEZ-PERIAGO, E.; SOTO-GONZÁLEZ, B.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GÁNDARA, J. Dynamics of pesticides in potato crops. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1797-1803, 2006.

LÜ, Z.; SANG, L.; LI, Z.; MIN, H. Catalase and superoxide dismutase activities in a *Stenotrophomonas maltophilia* WZ2 resistant to herbicide pollution. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 136-143, 2009.

LÜ, Z.; MIN, H.; XIA, Y. The response of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Burkholderiacepacia* WZ1 to oxidative stress of exposure to quinclorac. **Journal of Environmental Health Science**, v. 39, p. 431-441, 2004.

LUSHCHAK, V. I. Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. **Biochemistry-Moscow**, v. 66, p. 476-489, 2001.

MEDICI, L. O.; AZEVEDO, R. A.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. The influence of nitrogen supply on antioxidant enzymes in plant roots. **Functional Plant Biology**, v. 31, p. 1-9, 2004.

MENDES FILHO, P. F.; VASCONCELLOS, R. L. F.; PAULA, A. M.; CARDOSO, E. J. B. N. Evaluating the potential of forest species under microbial management of the restoration of degraded mining areas. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 208, n. 1/4, p. 79-89, 2010.

McCORDE, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases: an enzymatic function for erythrocytes (emocuprien). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MISHRA, S.; IMLAY, J. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 525, 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, p. 120-128, 2001.

MOLS, M.; ABBE, T. Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. **Environmental Microbiology**, v. 13, p. 1387-1394, 2011.

MONGKOLSUK, S.; DUBBS, J. M.; VATTANAVIBOON, P. Chemical modulation of physiological adaptation and cross-protective responses against oxidative stress in soil bacterium and phytopathogen *Xanthomonas*. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 32, p. 687-690, 2005.

MOREIRA F. M. S.; SIQUEIRA J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras: Editora UFLA, 2006.

NADLER, V.; GOLDBERG, I.; HOCHMAN, A. Comparative study of bacterial catalases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 882, p. 234-241, 1986.

NIELSEN, L.E.; KADAVY, D. R.; RAJAGOPAL, S.; DRIJBER, R.; NICKERSON, K. W. Survey of extreme solvent tolerance in Gram-positive cocci: membrane fatty acid changes in *Staphylococcus haemolyticus* grown in toluene. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5171-5176, 2005.

OMAR, S. A.; ABDEL-SATER, M. A. Microbial populations and enzyme activities in soil treated with pesticides. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 127, p. 49-63, 2001.

PEPI, M.; HEIPIEPER, H. J.; FISCHER, J.; RUTA, M.; VOLTERRANI, M.; FOCARDI, S. E. Membrane fatty acids adaptive profile in the simultaneous presence of arsenic and toluene in *Bacillus* sp. ORAs2 and *Pseudomonas* sp. ORAs5 strains. **Extremophiles**, v. 12, p. 343-349, 2008.

PETERSEN, S. O.; KLUG, M. J. Effects of Sieving, Storage, and Incubation Temperature on the Phospholipid Fatty Acid Profile of a Soil Microbial Community **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2421-2430, 1994.

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

PIMENTEL, D.; LEVITAN, L. Pesticides: Amounts applied and amounts reaching pests. **BioScience**, v. 36, n. 2, p. 86-91, 1986.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

ROUSSEAU, S.; HARTMANN, A.; SOULAS, G. Isolation and characterization of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 36, p. 211-222, 2001.

SANSONE, A.; WATSON, P. R.; WALLIS, T. S.; LANGFORD, P. R.; KROLL, J. S. The role of two periplasmic copper- and zinc-cofactored superoxide dismutases in the virulence of *Salmonella choleraesuis*. **Microbiology**, v. 148, p. 719-726, 2002.

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.

SHAO, T. J.; YANG, G. Q.; WANG, M. Z.; LU, Z. M.; MIN, H.; ZHAO, L. Reduction of oxidative stress by bioaugmented strain *Pseudomonas* sp HF-1 and selection of potential biomarkers in sequencing batch reactor treating tobacco wastewater. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 6, p. 1117-1123, 2010.

SHARMA, D.; NAGPAL, A.; PAKADE, Y. B.; KATNORIA, J. K. Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: A review. **Talanta**, v. 82, n. 4, p. 1077-1089, 2010.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.; POOLMAN, B. Mechanisms of solvent toxicity of hydrocarbons. **Microbiol Review**, v. 59, p. 201-222, 1998.

SOARES, WAGNER LOPES. **Uso dos agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a agricultura**. 2010, 150f. Tese (Doutorado em saúde pública e meio ambiente)- Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2010.

SOLTANI, N.; SHROPSHIRE, C.; SIKKEMA, P. H. Response of spring planted barley (*Hordeum vulgare* L.), oats (*Avena sativa* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) to mesotrione. **Crop Protection**, v. 30, p. 849-853, 2011.

SOULE, M. Identity of *Bacillus subtilis*, Cohn 1872. The **Journal of Infectious Diseases**, v. 51, p. 191-215, 1932.

SURGAN, M.; CONDON, M.; COX, C. Pesticide risk indicators: unidentified inert ingredients compromise their integrity and utility. **Environmental Management**, v. 45, p. 834-841, 2010.

STEINMAN, H. M. Function of periplasmic copper-zinc superoxide dismutase in *Caulobacter crescentus*. **Journal Bacteriol.**, v. 175, p. 1198-1202, 1993.

TOPP, E.; VALLAEYS, T.; SOULAS, G. Pesticides Microbial Degradation and Effects on Microorganisms. **Modern Soil Microbiology**, Van Elsas, J.D., J.T. Trevors and E.M.H. Wellington (Eds.). Mercel Dekker, Inc., New York, USA, p. 547-575, 1997.

VAN EERD, L. L.; HOAGLAND, R. E.; ZABLOTOWICZ, R. M.; HALL, J. C. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. **Weed Science**, v. 51, p. 472-495, 2003.

VLASITS, J.; JAKOPITSCH, C.; BERNROITNER, M.; ZAMOCKY, M.; FURTMÜLLER, P. G.; OBINGER, C. Mechanisms of catalase activity of heme peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, p. 74-81, 2010.

YOUN, H. D.; KIM, E. J.; ROE, J. H.; HAH, Y. H.; KANG, S. O. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces spp.* **Biochemistry Journal**, v. 318, p. 889-896, 1996.

ZABLOTOWICZ, R. M.; LOCKE, M. A.; HOAGLAND, R. E.; KNIGHT, S. S.; CASH, B. Fluorescent *pseudomonas* isolates from Mississippi Delta oxbow lakes: In vitro herbicide biotransformations. **Environmental Toxicology**, v. 16, n. 1, p. 9 - 19, 2001.

ZABLOTOWICZ, R.M.; HOAGLAND, M.A.; HICKEY, W.J. Glutathione-S-transferase activity and metabolism of glutathione conjugates by rhizosphere bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1054-1060, 1995.

ZAMOCKY, M.; GODOCIKOVA, J.; KOLLER, F.; POLEK, B. Potential application of catalase-peroxidase from *Comamonas terrigena* N3H in the biodegradation of phenolic compounds. Antonie Van Leeuwenhoek International **Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 109-117, 2001.

ZAMOCKY, M.; FURTMULLER, P. G.; OBINGER, C. Evolution of catalases from bacteria to human. **Antioxid Redox Signal**. v. 10, n. 9, p. 1527–1548, 2008.