

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO OESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

STELA BECHER

CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS E ATIVIDADE DE ENZIMAS
RELACIONADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO EM LINHAGENS
BACTERIANAS TOLERANTES AO HERBICIDA MESOTRIONE

PONTA GROSSA

2009

STELA BECHER

CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS E ATIVIDADE DE ENZIMAS
RELACIONADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO EM LINHAGENS
BACTERIANAS TOLERANTES AO HERBICIDA MESOTRIONE

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do Paraná, 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-orientador: Prof(a). Dr(a). Sônia A. Veiga Pileggi

PONTA GROSSA

2009

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

B391c Becher, Stela
Caracterização de polimorfismos e atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo em linhagens bacterianas tolerantes ao herbicida mesotrione. / Stela Becher. Ponta Grossa, 2009. 91f.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração : Biologia Evolutiva) - Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do Paraná.
Orientador : Prof. Dr. Marcos Pileggi
Co-orientadora : Profa. Dra. Sônia A. Veiga Pileggi
1. *Acinetobacter*. 2. Mesotrione. 3. Adaptação Microbiana. 4. Estresse Oxidativo. 5. Resistência a Herbicidas.
I. Pileggi, Marcos. II. Pileggi, Sonia A. Veiga. III. 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. 04/2009

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 **STELA BECHER**.

Aos trinta dias do mês de setembro de dois mil e nove, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência da Dr^a Sônia Alvim Veiga Pileggi, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do(a) aluno(a) **STELA BECHER**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr^a Sônia Alvim Veiga Pileggi (Co-orientadora), Dr. Guilherme Schnell e Schühli e Dr. Rafael Bertoni da Silveira. 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: **Caracterização de Polimorfismos e Atividade de Enzimas Relacionadas ao Estresse Oxidativo em Linhagens Tolerantes ao 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 sessenta dias; 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) neste prazo 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.

Ponta Grossa, 30 de setembro de dois mil e nove.

Prof^a Dr^a Sônia Alvim Veiga Pileggi

Prof. Dr. Guilherme Schnell e Schühli

Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira

*Dedico aos meus amados pais, Laertes e Mirna,
ao meu esposo Nilceu, aos meus imperadores,
Augusto e Alexandre e a toda minha família.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me guiado até esta etapa da minha vida.

Ao Senhor Jesus pelo amor, carinho, paciência, persistência, fidelidade e sabedoria.

Aos meus pais pelo apoio, ajuda, paciência, amor e confiança: AMO VOCÊS!!!!

Aos grandes amores da minha vida, Augusto e Alexandre pela paciência e compreensão nos momentos de ausência.

Ao prof. Dr. Marcos Pileggi e a profª Drª. Sônia Alvim Veiga Pileggi pela oportunidade, ajuda, compreensão, orientação e amizade.

À minha amiga Karin pela amizade, companheirismo, ajuda e por todos os momentos de trabalho, descontração, tristezas, desespero e alegrias que passamos juntas!!!

À minha querida Jana pela ajuda, confiança, amizade, conselhos e pelos momentos de descontração.

À Gicka, Paula e Xiua pela ajuda, dedicação, paciência, amizade e colaboração para que este trabalho se concretizasse.

Aos colegas de mestrado Karin, Michelle, Neto, Aline, João Felipe, Helena, Simoni pelos momentos de descontração, união, cooperação, dinamismo e pelas risadas.

Aos amigos do laboratório, Maurício, Luzia, Simone, Carol, Mauro, Lenise, Melina, Paulo, Ricardo, Akimi, Leilane, Eliane, Bruna, Vanessa, Luciano, Mariana e Henrique.

Ao prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni pela oportunidade, dedicação, compreensão e ajuda para a concretização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do programa.

À CAPES e a FINEP pelo apoio financeiro.

À UEPG pelo apoio ao trabalho.

RESUMO

Mesotrione, 2 - (4-metil-2-nitrobenzoil) -1,3-ciclohexanodionas, é um herbicida da classe química tricetona, com alto potencial de lixiviação, inibe competitivamente a 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD), que converte a tirosina em plastoquinona e α -tocoferol, e foi encontrado em plantas, fungos e bactérias, incluindo *Acinetobacter*. O objetivo deste trabalho foi caracterizar modos de adaptação de linhagens brasileiras de *Acinetobacter* ao mesotrione. *Acinetobacter calcoaceticus* e *Acinetobacter* sp. foram selecionadas em até 15.00 mM (resistência) e 0,03 mM (tolerância) de mesotrione e avaliadas para degradação em experimentos de até 60 horas a 35 mM do herbicida em espectrofotometria, mostrando-se incapazes de degradação. Medidas das células bacterianas em computador (ImageJ 1.37V) indicam processo de inanição, provavelmente devido à não utilização de mesotrione como fonte de carbono, e essa característica pode ser considerada como um marcador para a degradação do herbicida. A forte atividade oxidativa do herbicida mesotrione está vinculada ao radical N da molécula, e reforçada pelo radical S. Por este motivo, foi estudado o estresse oxidativo para as enzimas catalase, superóxido dismutase e glutatona redutase, por SDS-PAGE não denaturante, PAGE e espectrofotometria. *Acinetobacter calcoaceticus* mostrou uma maior resposta ao estresse oxidativo do que *Acinetobacter* sp., apresentando mais proteínas solúveis e menor número de isoformas de bandas em eletroforese (12 contra 23), provavelmente devido a suas enzimas terem sido selecionadas para este herbicida e mostraram melhor adaptação que *Acinetobacter* sp.. Estratégias de resistência microbiana ao herbicida e padrões específicos de enzimas anti-oxidativas poderiam dar opções não degradativas aos microorganismos, levando à manutenção de maiores quantidades herbicidas em solos e águas subterrâneas, e por mais tempo.

Palavras-chave: *Acinetobacter*, Mesotrione, Adaptação Microbiana, Estresse Oxidativo, Resistência a Herbicidas

ABSTRACT

Mesotrione, 2-(4-Mesyl-2-nitrobenzoyl)-1,3-cyclohexanedione, is a tricyetone herbicide chemical class, with high leaching potential, and competitively inhibit 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD), that converts tyrosine to plastoquinone and α -tocopherol, and was found in plants, fungus, and bacteria, including *Acinetobacter*. The aim of this work was to characterize pathways of Brazilian strains of *Acinetobacter* facing mesotrione. *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* sp. were selected in up to 15.00 mM (resistance) and 0.03 mM (tolerance) concentrations of mesotrione and tested at 35 mM buffered solution in spectrophotometry until 60 hours, showing to be incapable to degrade mesotrione. Computer bacterial cells measures (ImageJ 1.37v) indicate starvation process, probably due to non use of mesotrione as carbon source, and this characteristic could be consider a marker for herbicide degradation. Mesotrione herbicide activity is major in N, and enhanced by S, and has a strong electron withdrawing. For this reason, we studied antioxidative stress enzymes catalase, superoxide dismutase and glutathione reductase, by SDS-PAGE, non-denaturating PAGE and spectrophotometry. *Acinetobacter calcoaceticus* showed a higher response to oxidative stress than *Acinetobacter* sp., with more soluble proteins and lower number of electrophoresis bands isoforms (12 against 23), because its enzymes were selected for this herbicide and show better adaptation than *Acinetobacter* sp.. A microbial strategy of herbicide resistance/tolerance and specific oxidative stress raised by mesotrione herbicide could give additional non-degradating options to microorganisms, not necessarily leading to fast herbicide degradation, so determining the herbicide fate in soils and groundwater.

Keywords: *Acinetobacter*, Mesotrione, Microbial Adaptation, Oxidative Stress, Herbicide Resistance

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Fórmula estrutural do herbicida mesotrione [2-(4-metil-2-nitrobenzoil) ciclo-hexano-1,3 diona].....	23
FIGURA 2 - Passos da otimização do leptospermone para mesotrione.....	23
FIGURA 3 - Fórmula estrutural dos principais produtos da degradação do herbicida mesotrione.....	24
FIGURA 4 - Decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio pela enzima catalase.....	30
FIGURA 5 - Formação do oxigênio e de peróxido de hidrogênio a partir de dois radicais superóxido pela enzima superóxido dismutase.....	31
FIGURA 6 - Formação da glutathione reduzida a partir de glutathione oxidada pela enzima glutathione redutase.....	32
FIGURA 7 - Mapa da Fazenda-Escola Capão da Onça da Universidade Estadual de Ponta Grossa.....	39
FIGURA 8 - Quantificação de proteínas solúveis (mg/mL) da bactéria <i>A. calcoaceticus</i> – Método de Bradford, 1976.....	61
FIGURA 9 - Quantificação de proteínas solúveis (mg/mL) da bactéria <i>Acinetobacter</i> sp. – Método de Bradford, 1976.....	62
FIGURA 10 - Proteína em gel de SDS-PAGE. Padrão (P) BSA; 1, 2, 3 representam a bactéria <i>A. calcoaceticus</i> nos respectivos tratamentos: controle, 0,03 mM e 15 mM; 4 e 5 representam a bactéria <i>Acinetobacter</i> sp. nos tratamentos controle e 0,03 mM.....	62
FIGURA 11 - Atividade de CAT em espectrofotômetro, para a bactéria <i>A. calcoaceticus</i> submetida a diferentes tratamentos com o herbicida mesotrione.....	64

FIGURA 12 - Atividade de CAT em PAGE não desnaturante. (a) P-Padrão de CAT de fígado bovino; 1, 2 e 3 representam a bactéria *A. calcoaceticus* no controle e tratamentos 0,03 mM e 15 mM, respectivamente; (b) 4 e 5 representam a bactéria *Acinetobacter* sp. no controle e tratamento 0,03 mM.....65

FIGURA 13 - Atividade de CAT em espectrofotômetro, para a bactéria *Acinetobacter* sp. submetida a diferentes tratamentos com o herbicida mesotrione..... 65

FIGURA 14 - Atividade de SOD em PAGE não desnaturante. (a) P-Padrão de SOD de fígado bovino; 1, 2 e 3 representam a bactéria *A.calcoaceticus* no controle e tratamentos 0,03 mM e 15 mM, respectivamente (b) 4 e 5 representam a bactéria *Acinetobacter* sp. no controle e no tratamento 0,03 mM.....67

FIGURA 15 - Atividade de GR em PAGE não desnaturante. P-Padrão de GR; 1, 2 e 3 representam a bactéria *A. calcoaceticus* no controle e nos tratamentos 0,03 mM e 15 mM respectivamente; 4 e 5 representam a bactéria *Acinetobacter* sp. no controle e no tratamento 0,03 mM.....69

FIGURA 16 - Análise da capacidade de degradação e /ou tolerância das linhagens *A. calcoaceticus* e *Acinetobacter* sp. por espectrofotometria.....71

FIGURA 17 - Avaliação do tamanho celular da linhagem *A. calcoaceticus* submetida ao controle e aos tratamentos 0,03 mM e 15 mM de mesotrione.....72

FIGURA 18 - Avaliação do tamanho celular da linhagem *Acinetobacter* sp. submetida ao controle e ao tratamento 0,03 mM de mesotrione.....73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Tipos e estratégias para biorremediação do solo (Fonte: MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).....	26
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D - Ácido 2-4- diclorofenoxilacético

AMBA - Ácido 2-amino-4-metilsulfonil-benzóico

BSA - Bovine Serum Albumin

CAT - Catalase

CP - Catalase peroxidases

Cu/Zn-SODs - Superóxido Dismutase dependente de cobre e zinco

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DPIP- Dicloroindolacético

EAOs - Espécies Ativas de Oxigênio

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPSPS - Enol-pirovil-shikimato-fosfato sintetase

EUA - Estados Unidos da América

FAD - Flavina Adenina Dinucleotídeo

Fe-SODs - Superóxido Dismutase dependente de ferro

GR - Glutathione Redutase

GSH - Glutathione Reduzida

GSSG - Glutathione Oxidada

HPI - Catalase Peroxidase Bifuncional

HPH - Catalase Peroxidase Monofuncional

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

KCN - Cianeto de Potássio

LOG tardia - Fase Logarítmica de Crescimento Bacteriano Tardia

MM - Meio Mineral

MNBA - Ácido 4- metilsulfonil-2-nitrobenzóico

Mn-SODs - Superóxido Dismutase dependente de manganês

MTT - (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-brometo de difeniltetrazol)

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida

NTT - Nitroblue Tetrazolium

OxyR - Ativador Transcricional

PAGE - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

p-HPPD - p-hidroxifenil piruvato dioxigenase

PVPP - Polivinilpirrolidona

rDNA - Ácido Desoxirribonucléico Ribossômico

RNA - Ácido Ribonucléico

RPHPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance de Fase Reversa

SCTM - Solo Com Tratamento de Mesotrione

SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SOD - Superóxido Dismutase

SoxRS - Sistema *regulon*

SSTM - Solo Sem Tratamento de Mesotrione

TEMED - N, N, N', N'-Tetrametiletenodiamina

TRIS - (Hidroximetil)aminometano

U.V - Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Produção agrícola.....	16
1.2	A cultura do milho.....	17
1.3	Solo.....	18
1.4	Herbicidas utilizados na cultura do milho.....	20
1.5	Caracterização do herbicida mesotrione.....	22
1.6	Biorremediação.....	25
1.7	Biorremediação do herbicida mesotrione.....	27
1.8	Sistema antioxidante.....	28
1.9	Polimorfismos.....	33
2	OBJETIVOS.....	34
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1	Material biológico.....	35
3.2	Material químico.....	35
3.3	Meios de cultura.....	35
3.4	Soluções e Tampões.....	36
3.6	METODOLOGIAS.....	39
3.6.1	Coleta das amostras de solo.....	39
3.6.2	Isolamento das linhagens.....	40
3.6.3	Seleção das linhagens tolerantes ao mesotrione.....	40
3.6.7	Estocagem das linhagens.....	40
3.6.7.1	Estoque de réplicas contínuas.....	40
3.6.7.2	Estoque a longo prazo.....	41
3.6.8	Avaliação da temperatura ótima de crescimento das linhagens tolerantes.....	41
3.6.9	Identificação das linhagens tolerantes ao herbicida.....	41
3.7	Sistema antioxidante.....	42

3.7.1	Teste de crescimento com as linhagens tolerantes ao mesotrione..	42
3.7.2	Extração de proteínas.....	42
3.7.2.1	Determinação das proteínas.....	43
3.7.2.2	Variações nos padrões protéicos	43
3.7.3	Atividades das enzimas antioxidantes.....	44
3.7.3.1	Atividade da Catalase – CAT.....	45
3.7.3.1.1	Atividade em espectrofotômetro.....	45
3.7.3.1.2	Atividade em PAGE não desnaturante.....	45
3.7.3.2	Atividade da Superóxido Dismutase –SOD.....	46
3.7.3.2.1	Atividade em PAGE não desnaturante	46
3.7.3.2.2	Determinação das isoformas de SOD.....	46
3.7.3.3	Atividade da Glutathione Redutase –GR.....	47
3.7.4	Medição do tamanho das células das linhagens bacterianas resistente e tolerante.....	47
3.7.5	Análise da capacidade biodegradativa das linhagens bacterianas por espectrofotometria.....	48
4	RESULTADOS.....	49
	RESUMO.....	50
	ABSTRACT.....	51
	INTRODUÇÃO.....	52
	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
	AGRADECIMENTOS.....	75
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
	ANEXOS.....	84

1. INTRODUÇÃO

1.1. PRODUÇÃO AGRÍCOLA

O advento do capitalismo e a Revolução Industrial no século XX desencadearam um processo de profundas modificações na agricultura, inclusive com a posterior separação física das atividades agrícolas e industriais. A vida urbana, além do crescimento demográfico, levou a uma crescente pressão sobre a agricultura no sentido de expandir sua produção, e sua produtividade, incorporando novas técnicas, insumos, máquinas oriundas da indústria, proporcionando modificações na agricultura (ALMEIDA et al., 1984). A partir deste período, a intensidade de produção na agricultura tem aumentado substancialmente (PRETTY, 2007).

A modernização tecnológica da agricultura no Brasil teve o seu apogeu no período de 1968 até 1979, e na década de 70 o processo de concentração e centralização do capital no pólo industrial dos complexos agroindustriais se acelera. Este processo caracterizou-se em especial na região Sul, ela contribuiu com cerca de 50% do produto agrícola total. A expansão de fertilizantes acelerou-se a partir de 1967 com as culturas de soja, trigo, cana-de-açúcar e café, entretanto, foi em 1976 que o consumo de agrotóxicos teve um aumento de 66%. Este aumento no uso de fertilizantes químicos e defensivos acelerou a contaminação e degradação dos solos facilitando a contaminação dos rios e provocando a destruição da flora e fauna aquática. A utilização desses pesticidas provoca a diminuição e o desaparecimento de organismos, como, por exemplo, insetos e aves, controladores naturais de pragas. (MOREIRA, 1999).

Os sistemas agrícolas atualmente são reconhecidos como uma nova origem de dano ao meio ambiente (PRETTY, 2007). O uso de agrotóxicos, fungicidas e herbicidas provoca mudanças no equilíbrio biológico, ocasionando um aumento na incidência de câncer e outras doenças por meio dos resíduos tóxicos presentes nos grãos ou em outras partes comestíveis (KESAVAN; SWAMINATHAN, 2007).

1.2. A CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays*) é a mais importante planta comercial com origem nas Américas. Há indicações de que sua origem tenha sido no México, América Central ou Sudoeste dos Estados Unidos. É uma das culturas mais antigas do mundo, havendo provas por meio de escavações arqueológicas e geológicas e através de medições por desintegração radioativa, de que é cultivado há pelo menos 5.000 anos. Logo depois do descobrimento da América, foi levado para a Europa, onde era cultivado em jardins, até que seu valor alimentício tornou-se conhecido. Passou, então, a ser plantado em escala comercial. A importância econômica do milho é caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, que vai desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia. Na realidade, o uso do milho em grão como alimentação animal representa a maior parte do consumo desse cereal, isto é, cerca de 70% no mundo. Nos Estados Unidos, cerca de 50% é destinado a esse fim, enquanto que no Brasil varia de 60 a 80%, dependendo da fonte da estimativa e de ano para ano. Dentro da evolução mundial de produção de milho, o Brasil tem se destacado como terceiro maior produtor, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e da China (EMBRAPA, 2009).

A produção de milho este ano no Brasil deverá atingir 33,7 milhões de toneladas na primeira safra e 17,6 milhões de toneladas na segunda safra. As quatro maiores regiões produtoras, Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste, são responsáveis por 41,6%, 28,7%, 13,5% e 12,7% de participação na produção nacional, respectivamente. Salienta-se que o Paraná, superou o Mato Grosso na produção de milho e se encontra na posição de maior estado produtor nos últimos anos (IBGE, 2009). Na região dos Campos Gerais, Paraná, a cultura do milho ocupa aproximadamente um terço da área agrícola de verão, participando com a soja (*Glycine max*) e o feijão (*Phaseolus vulgaris*) da rotação de culturas (WEIRICH NETO, 2004).

1.3. SOLO

O solo é a porção superficial da terra que fornece o suporte para a vida. Conhecido por sua função de fornecer nutrientes e água para a sustentação da agricultura e ecossistemas, ele é importante também para a sociedade na recarga de água subterrânea, disposição de resíduos, como fonte de materiais de construção e atividades de manufaturas. É neste meio poroso estruturado e biologicamente ativo que ocorre a maioria das interações químicas e bioquímicas entre a superfície da terra, as águas subterrâneas e a atmosfera (MARTIN NETO et al., 2007).

O solo é um habitat extremamente peculiar com relação a outros habitats terrestres devido à sua natureza heterogênea, complexa e dinâmica. É formado por água, gases, e partículas de silicatos minerais, raízes de plantas, populações de organismos macro e microscópicos vivos com metabolismo ativo ou dormente e matéria orgânica em vários estágios de decomposição (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

1.3.1. COMPOSIÇÃO DO SOLO

O solo é composto por três frações principais, a fração sólida, líquida e gasosa. A fração sólida do solo é formada por matéria mineral e orgânica, sendo que a primeira advém da rocha original de formação deste solo. A fração sólida do solo produtivo típico está formada por aproximadamente 5% de matéria orgânica e 95% de matéria inorgânica. A fração líquida é constituída por uma solução de sais minerais e componentes orgânicos, assim, constitui-se de material dissolvido que tem como origem os processos químicos e bioquímicos no solo e de trocas entre a biosfera e a atmosfera. Este meio transporta as espécies químicas, desde e até as partículas de solo, constituindo-se também, na via fundamental para a troca de nutrientes entre as raízes e o solo sólido. Por fim, a fração gasosa é formada pelo ar com composição um pouco alterada, sendo a quantidade de oxigênio menor que a quantidade de dióxido de carbono. A ocorrência desses fenômenos deve-se às atividades biológicas que ocorrem no solo, determinantes também, da saturação ou

níveis muito próximos a esse estado, no que concerne à umidade relativa em condições naturais. O ar do solo ocupa o espaço poroso não ocupado pela água. O oxigênio é consumido por microorganismos e pelo sistema radicular das plantas superiores, de tal forma que sua concentração é menor do que na atmosfera livre. Ao contrário, o dióxido de carbono é liberado em processos metabólicos que ocorrem no solo e, por isso, seu teor é geralmente mais alto. As atividades biológicas do solo podem alterar a composição dos gases orgânicos e dos inorgânicos (MAZZUCO, 2008)

1.3.2. CONTAMINAÇÃO DO SOLO

Nas últimas décadas a conseqüente síntese e aplicação de produtos químicos e industriais e a interferência humana levou à mobilização maciça dos recursos naturais, resultando em poluição ambiental (SPAIN, 1995). As mudanças na prática agrícola resultaram em um aumento drástico no uso de pesticidas (KONSTANTINOU et al., 2006). Estas substâncias antropogênicas ou xenobióticos, são usadas como biocidas com ação tóxica em plantas, fungos e insetos. No solo, os xenobióticos sofrem inúmeras interações químicas com a fase inerte e com a biota, sofrendo alterações abióticas e bióticas que determinam a persistência e o impacto destes no ecossistema (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Calcula-se que somente 0,1% de uma aplicação de defensivos agrícolas atingem o alvo específico, enquanto os restantes 99,9% têm potencial para se mover em diferentes compartimentos ambientais, tais como o solo e águas residuais e subterrâneas (UETA et al., 2007).

As principais substâncias contaminantes do solo são: metais, componentes inorgânicos, compostos aromáticos e poliaromáticos, hidrocarbonetos clorados e agroquímicos (MAZZUCO, 2008).

1.3.3. DEGRADAÇÃO DO SOLO

O uso excessivo dos fertilizantes minerais provoca a deterioração de algumas propriedades físico-químicas do solo, provocando a erosão e a contaminação dos sistemas agrícolas. A contaminação consiste na forma de maior importância na

degradação dos solos. O solo possui capacidade para reter os elementos contaminantes que lhe são incorporados, manifestando seus efeitos apenas após certo período de tempo. Embora a maioria dos solos utilizados nos processos agrícolas necessite do fornecimento de nitrogênio, fósforo e potássio na forma de fertilizantes minerais, para que sejam supridas suas necessidades, devido à perda destes nutrientes pelas colheitas, o uso de fertilizantes em excesso provoca efeitos regressivos à produção, tanto pela toxicidade, quanto pelo desequilíbrio nutritivo, provocado pela competição entre os elementos constituintes do solo (MAZZUCO, 2008). Além disso, um dos grandes problemas decorrentes do uso de agroquímicos é a lixiviação de suas moléculas originais ou de seus metabólitos para camadas mais profundas no perfil do solo, podendo atingir o lençol freático (PROCÓPIO et al., 2004). A persistência de um pesticida no solo depende de processos de dissipação, como a degradação, que pode estar relacionada com o metabolismo microbiano (NAKAGAWA; ANDRÉA, 2000).

1.4. HERBICIDAS UTILIZADOS NA CULTURA DO MILHO

A redução do rendimento de produção na cultura de milho, devido à competição estabelecida com as plantas daninhas, pode alcançar até 70% da produtividade potencial, variando em função da espécie e do grau de infestação das plantas daninhas, do tipo de solo, das condições climáticas reinantes no período, bem como do espaçamento, e do estágio fenológico da cultura em relação à convivência das plantas daninhas (FANCELLI; DOURADO-NETO, 2000). Portanto, o controle de plantas daninhas é uma necessidade de ordem econômica.

O glifosato é o ingrediente ativo não seletivo do herbicida RoundUp®. É utilizado para manejo da vegetação antes da semeadura da cultura, principalmente nas áreas de plantio direto. Este herbicida é derivado de aminoácidos, e tem como mecanismo de ação a inibição da enzima enol-pirovil-shikimato-fosfato sintetase (EPSPS). A EPSPS é responsável por uma das etapas de síntese dos aminoácidos aromáticos, triptofano, fenilalanina e tirosina. Uma das consequências da inibição da enzima é a elevação dos níveis de amônia fitotóxica, glutamina e glutamato e a inibição de algumas vitaminas e hormônios (NICOLAI, 2004).

Outro herbicida amplamente utilizado e monitorado por várias décadas é o 2,4D (Ácido 2,4- diclorofenoxilacético) (AMARANTE JÚNIOR et al., 2003). É um ácido orgânico com alta solubilidade em água, utilizado para o controle de plantas daninhas de folhas largas nas culturas de arroz, milho, sorgo e cana-de-açúcar (SILVA et al., 2007). Ele interfere diretamente no mecanismo de diferenciação celular, inibindo ou estimulando de forma errática o desenvolvimento nas áreas meristemáticas, e provocando uma diferenciação em tecidos com células já estabilizadas. Este herbicida age da mesma forma que as auxinas naturais das plantas, porém como é aplicado em doses maiores que os reguladores de crescimento, apresentam ação herbicida nas plantas daninhas da classe das dicotiledôneas (NICOLAI, 2004). O herbicida 2,4D é considerado um agente carcinogênico, afetando o fígado, coração e sistema nervoso central. Estudos recentes sobre a biodegradação do 2,4D foram relatadas por Silva et al. (2007), comprovando por análise de HPLC a capacidade biodegradativa das linhagens *Serratia marcescens* e *Penicillium* sp. expostas ao herbicida.

Diuron (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia) é um herbicida pertencente ao grupo químico das feniluréias que pode ser aplicado em pré-emergência para o controle de plantas daninhas. Ele é desprezadamente tóxico para aves e mamíferos e moderadamente tóxico para invertebrados aquáticos, sendo relativamente persistente no solo, ou seja, é pouco lixiviado. Estudos sobre a biorremediação deste herbicida conduzidos por Cullington; Walker (1999) mostraram que a degradação microbiana deste xenobiótico é considerada o primeiro mecanismo para sua dissipação no solo, sendo comprovado pela rápida degradação deste herbicida, realizada por uma bactéria Gram-negativa. Outro estudo sobre a biorremediação de diuron foi conduzido por Batisson et al. (2007) em que duas linhagens bacterianas foram isoladas a partir de amostras de água corrente do Rio Jauron (Puy-de-Dôme, France) e posteriormente analisadas, *Pseudomonas* sp. e *Stenotrophomonas* sp. que durante as primeiras 24h de incubação na presença do herbicida mostraram uma porcentagem de degradação da ordem de 25% a 60% para *Pseudomonas* sp., e de 20% a 65% para *Stenotrophomonas* sp..

O s-metolachlor [2-cloro-N-(2-etil-6-metilfenil)-N-(2-metoxi-metietil)acetamina] é um herbicida representante da classe cloroacetanilida, comercializado como Dual Gold®. É um herbicida utilizado para o controle de plantas daninhas em pré-emergência, com mecanismo de inibição da divisão celular e biossíntese de diversos

componentes tais como lipídios, proteínas, isoprenóides e flavonóides (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005). Este xenobiótico é aplicado nas cultura de cana-de-açúcar, milho e soja, apresentando alta mobilidade, alta toxicidade-classe I, adsorção moderada, possibilidade de sofrer lixiviação e possível carcinogênico humano. O s-metolachlor apresenta degradação essencialmente microbiana, sendo a principal via de dissipação deste no solo (MARTINS, 2007). Martins (2007) analisou a relação entre a toxicidade do herbicida s-metolachlor e a resposta do sistema antioxidante em três bactérias isoladas de solo agrícola, comprovando que este herbicida gerou estresse oxidativo nas espécies não cultivada, *Klebsiella* sp. e *Enterobacter cloacae*, principalmente na maior concentração testada (340mM). Em seguida, todas as bactérias apresentaram indução da atividade das enzimas catalase e superóxido desmutase na concentração de 34mM do herbicida, portanto, a concentração de 340mM de s-metolachlor é tóxica para as três espécies, inibindo a atividade das enzimas antioxidantes.

O herbicida mesotrione pertence ao grupo químico das tricetonas e atua sobre as plantas daninhas inibindo a biossíntese de carotenóides através da interferência da atividade da p-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (p-HPPD) nos cloroplastos, com posterior geração de estresse oxidativo, que destrói as membranas das células, levando a planta à morte. O caroteno é um pigmento das plantas responsável pela proteção da clorofila contra a foto-oxidação; portanto, as plantas suscetíveis têm como sintomatologia o albinismo ou “branqueamento” dos tecidos fotossintéticos. O mesotrione é absorvido pelas folhas e pelas raízes com translocação apossimpática. O milho é tolerante ao mesotrione devido à sua capacidade de metabolizar rapidamente o herbicida, produzindo metabólitos sem atividade, o que não ocorre nas plantas daninhas (MCCURDY et al., 2008).

1.5. CARACTERIZAÇÃO DO HERBICIDA MESOTRIONE

O herbicida mesotrione 2-(4-metil-2-nitrobenzoi) ciclo-hexano-1,3-diona (Figura 1), fabricado pela Syngenta Proteção de Cultivos Ltda, registrado na Europa em 2000 e nos Estados Unidos em 2001, é comercialmente conhecido com o nome de Callisto®. É um herbicida seletivo, pertencente ao grupo químico das tricetonas

com ação sistêmica, indicado para o controle pós-emergente das plantas daninhas nas culturas de milho e cana-de-açúcar (ALFERNES; WIEBE, 2002).

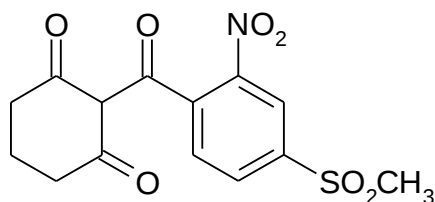


Figura 1: Fórmula estrutural do herbicida mesotrione [2-(4-metil-2-nitrobenzoil) ciclo-hexano-1,3-diona] (Fonte: MITCHELL et al., 2001).

O mesotrione é derivado quimicamente de uma fitotoxina natural produzida pela planta escova-de-garrafa *Callistemon citrinus* (MITCHELL et al., 2001). Do composto natural (leptospermone) foram produzidos análogos, dos quais resultou a molécula do mesotrione (Figura 2), com atividade 100 vezes maior (HUGIE et al., 2008).

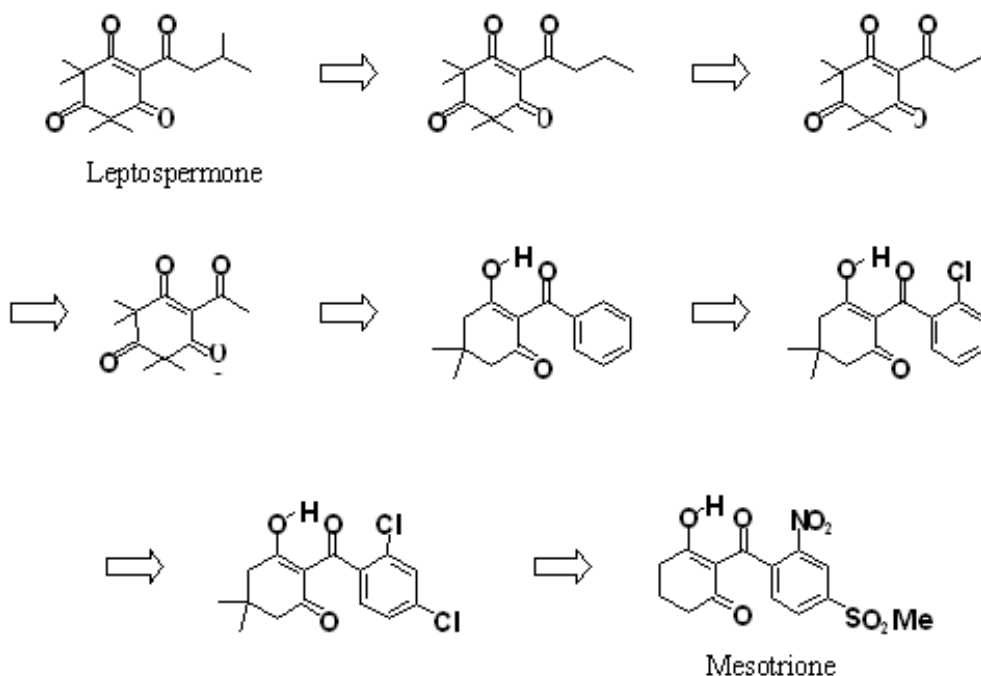
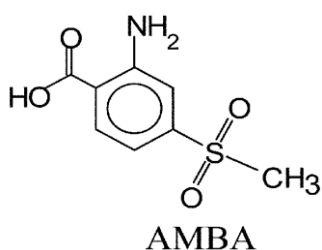


Figura 2: Passos da otimização do leptospermone para mesotrione (Fonte: CORNES, 2005)

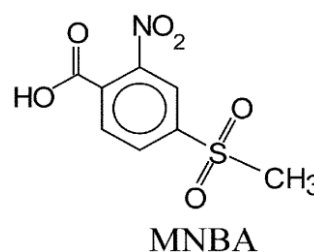
A ação deste herbicida consiste na inibição da biossíntese de carotenóides pela interferência na enzima p-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (p-HPPD). Esta enzima é um componente da via biossintética que converte a tirosina em plastoquinona e α -tocoferol, conseqüentemente, quando a p-HPPD é inibida e deixa de produzir plastoquinona, leva a um esgotamento dos carotenóides, proporcionando um branqueamento das folhas (MITCHELL et al., 2001). Os sintomas fitotóxicos observados envolvem o branqueamento das plantas sensíveis com posterior necrose e morte dos tecidos vegetais em cerca de 1 a 2 semanas (FELIX et al., 2006). Segundo informações do fabricante (SYNGENTA PROTEÇÃO DE CULTIVOS LTDA.), o mesotrione pertence à classe toxicológica III – medianamente tóxico sendo perigoso ao meio ambiente (periculosidade ambiental classe III), altamente móvel, apresentando alto potencial de deslocamento no solo, podendo atingir, principalmente, águas subterrâneas.

1.5.1. METABOLISMO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DO MESOTRIONE

Segundo Rodrigues e Almeida (2005), o herbicida mesotrione é rapidamente degradado pelos microrganismos. Através do estudo de Alferness e Wiebe (2002) foram detectados dois produtos da degradação do herbicida mesotrione no solo e na água, o AMBA (ácidoamino-4-metilsulfonil-benzóico) e o MNBA (ácido 4-metilsulfonil-2-nitrobenzóico) (Figura 3).



(ácido 2-amino-4-metilsulfonil-benzóico)



(ácido 4-metilsulfonil-2-nitrobenzóico)

Figura 3: Fórmula estrutural dos principais produtos da degradação do herbicida mesotrione (Fonte: Alferness e Wiebe, 2002).

O trabalho de Durand et al. (2006) comprovou a biodegradação do herbicida mesotrione realizada pela bactéria *Bacillus* sp. 3B6 com a geração dos metabólitos AMBA e MNBA.

Oxigenação é o mais freqüente passo da biotransformação de pesticidas ou outros xenobióticos orgânicos. Muitas destas reações são mediadas por enzimas oxidativas como citocromo P-450 e peroxidases (EERD et al., 2003).

1.6. BIORREMEDIAÇÃO

Os agrotóxicos são compostos químicos orgânicos, em sua maioria sintéticos, formulados para controlar ou erradicar de maneira geralmente seletiva, plantas, animais e insetos considerados daninhos em uma cultura agrícola ou criação animal. Esses compostos possuem toxicidade seletiva para grupos de organismos específicos, mas também podem ser tóxicos para espécies não-alvo e apresentar efeito acumulativo ao longo da cadeia alimentar. Ao mesmo tempo em que o emprego de agrotóxicos trouxe benefícios para a população, colaborou também para ampliar um problema ambiental, ou seja, a poluição (TOMAZ, 2003).

Recentemente, muitos estudos buscam novas tecnologias e métodos que ao menos removam parcialmente os poluentes ambientais. Dentre estes métodos, os estudos de biodegradação de herbicidas, bem como a posterior aplicação na biorremediação de ambientes contaminados por agroquímicos, constituem-se num dos campos mais promissores da biotecnologia atual (CARVALHO, 2007).

1.6.1. BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS

Segundo Moreira; Siqueira (2002), a biorremediação é fundamentada nos processos de degradação microbiana e reações químicas, combinadas com processos de engenharia, criando condições para maximizar as transformações dos contaminantes orgânicos do solo. As técnicas de biorremediação envolvem variações de tratamentos “*in situ*” (no local) e “*ex situ*” (fora do local) que podem envolver algumas estratégias (Tabela 1).

Tabela 1. Tipos e estratégias para biorremediação do solo (Fonte: MOREIRA; SIQUEIRA, 2002)

<i>Biorremediação</i>	<i>Fundamentos e definições</i>
Passiva	Consiste na degradação intrínseca ou natural pelos microrganismos nativos do solo
Bioestimulada	Consiste na adição de nutrientes, como N e P, para estimular os microrganismos nativos
Bioventilação	É uma forma de bioestimulação por meio da adição de gases estimulantes como O ₂ e CH ₄ para aumentar a atividade microbiana decompositora
Bioaumentação	É a inoculação do local contaminado com microrganismos selecionados para degradação do contaminante
“Landfarming”	É a aplicação de contaminantes ou rejeitos contaminados na superfície do solo não contaminado para degradação. O solo é arado e gradeado para promover a mistura uniforme do contaminante e aeração
Compostagem	É o uso de microrganismos termofílicos aeróbios em pilhas construídas para degradar o contaminante

1.6.1.1. BIOAUMENTAÇÃO

A bioaumentação é a inoculação de um lugar contaminado com microrganismos para facilitar a biodegradação. Bactérias são os organismos comumente usados para esta finalidade. Uma única espécie ou um grupo (consórcio) de microrganismos pode ser responsável pela biodegradação (SYLVIA et al., 2005). Este processo tem sido muito estudado para vários herbicidas, hidrocarbonetos clorados e carbamatos através do emprego de populações nativas aclimatadas, isolados selecionados e até mesmo microrganismos transgênicos contendo plasmídeos degradadores. Para isto, recorre-se a populações aclimatadas através de mutação direta ou transformação genética, para degradação acelerada de determinado composto. A bioaumentação é mais apropriada para tratamentos de contaminantes muito recalcitrantes, em contaminações recentes e onde se pretende aplicar a degradação acelerada (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

1.7. BIORREMEDIAÇÃO DO HERBICIDA MESOTRIONE

A partir da introdução do herbicida Callisto® no mercado, (em 2000 na Europa e em 2001 nos EUA pela Syngenta Proteção de Cultivos Ltda), despertou-se o interesse pela pesquisa, por ser um composto novo no mercado mundial, e por ser um herbicida utilizado na cultura de milho, um dos cereais mais cultivados mundialmente. Estudos sobre o seu modo de ação no ambiente, seus produtos de degradação e linhagens capazes de metabolizar e consequentemente biodegradar o mesotrione foram conduzidos por diversos autores.

O primeiro estudo realizado com o herbicida mesotrione foi conduzido por Mitchell et al. (2001). Neste estudo objetivou-se estudar a origem do mesotrione através da otimização química, relatar os fatores que afetam sua bioeficácia e provar que a tolerância do milho pelo mesotrione é devida à sua capacidade de metabolizar rapidamente o herbicida.

Em seguida, Alferness; Wiebe (2002) desenvolveram métodos de análise com detecção por (RPHPLC) cromatografia líquida de alta performance de fase reversa com detecção de fluorescência, para determinar os níveis de mesotrione e

metabólitos como o AMBA e MNBA, que podem ser encontrados no solo e na água após a utilização deste herbicida nas culturas.

O trabalho de Durand et al. (2006) foi o primeiro registro de estudo sobre a história da biodegradação do herbicida mesotrione. O objetivo principal do seu trabalho foi encontrar e caracterizar fungos ou bactérias isolados de água suja com capacidade de metabolizar, ou seja, biodegradar o herbicida em questão. Neste trabalho, foram isoladas 22 linhagens fúngicas e 40 linhagens bacterianas. Apenas uma linhagem bacteriana mostrou capacidade de biotransformar, ou seja, biodegradar o herbicida. Esta linhagem, identificada por rDNA 16S como sendo do gênero *Bacillus* sp. recebeu o nome de *Bacillus* sp. 3B6. A degradação do herbicida pela bactéria foi monitorada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) onde obteve-se como resultado a biotransformação completa do herbicida mesotrione na concentração de 5 mmol l⁻¹. O AMBA (ácido 2-amino-4-metilsulfonil-benzóico) foi identificado como um dos metabólitos produzidos em maior quantidade.

Outro estudo de grande importância na degradação do mesotrione foi documentado por Batisson et al. (2009). Foram isoladas duas linhagens bacterianas de solo e posteriormente identificadas por análise de rDNA 16S. As regiões analisadas foram em seguida seqüenciadas confirmando se tratarem das espécies *Bacillus* sp. e *Arthrobacter* sp.. As duas linhagens foram analisadas por HPLC, mas apenas a linhagem *Bacillus* sp. mostrou-se capaz de biodegradar rapidamente e totalmente o herbicida. Dentre os vários metabólitos formados, o AMBA foi um deles.

1.8. SISTEMA ANTIOXIDANTE

Os organismos aeróbicos usam oxigênio molecular (O₂) na respiração ou na oxidação de nutrientes para obtenção de energia. Durante os processos metabólicos, o O₂ é reduzido por univalência, através de reações seqüenciais, que podem ocasionar a formação das espécies ativas de oxigênio (EAOs) (CABISCOL et al., 2000).

Os produtos do metabolismo aeróbico são altamente reativos, como Radical Superóxido (O₂^{-•}), Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) e o Radical Hidroxila (OH[•]). O aumento na concentração de EAOs para níveis que excedem a capacidade de

defesa celular caracteriza o estresse oxidativo. Os alvos biológicos da alta reatividade das EAOs são DNA, RNA, proteínas e lipídios (MARTINS, 2007).

Para minimizar estes efeitos danosos resultantes da ação dessas espécies, os organismos aeróbios desenvolveram mecanismos capazes de combater a produção de EAOs, denominado de sistema antioxidante de defesa, o qual pode ser dividido em não-enzimático e enzimático. As defesas não-enzimáticas incluem compostos com propriedade intrínseca antioxidante, como o β -caroteno, α -tocoferol (vitamina E), glutathiona reduzida (GSH) e ácido ascórbico, NADPH e NADH, moléculas que ajudam a manter o ambiente redutor. Já os mecanismos enzimáticos envolvem a superóxido dismutase, catalase, peroxidases, glutathiona redutase e outras (CARVALHO, 2007).

1.8.1. SISTEMA ANTIOXIDANTE EM BACTÉRIAS

Em resposta ao contato com herbicidas, os microrganismos podem apresentar uma indução positiva na atividade de algumas enzimas antioxidantes como SOD e CAT, ou mesmo podem apresentar novas isoformas, como em *Escherichia coli*, tratada com o agroquímico quinclorac (LÜ et al., 2004). As bactérias apresentam dois sistemas distintos de resposta ao estresse. A resposta ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é mediada pelo ativador transcricional denominado **OxyR**; já a resposta ao radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é controlada pelo sistema **SoxRS**, também denominado de *regulon*. Ambos os mecanismos estão presentes nestes microrganismos, porém estão inativados em situações “não-estressantes”. O gene *oxyR* controla, entre outros, os genes que codificam para catalase, glutaredoxina e glutathiona redutase. Pode estar na forma reduzida ou oxidada, sendo que somente a forma oxidada ativa a transcrição. O *regulon SoxRS* contém cerca de dez genes, incluindo o gene de Mn-SOD e endonuclease IV, sendo a última, componente do sistema de reparo do DNA. A ativação destes sistemas aumenta a resistência celular aos agentes oxidativos (CABISCOL et al., 2000)

1.8.2. CATALASE (CAT)

A catalase é uma enzima tetramérica que contém grupos heme encontrada em todos os organismos aeróbicos. A catalase está, amplamente, mas não exclusivamente, localizada nos peroxissomos, onde muitas enzimas produtoras de H_2O_2 residem. Devido à sua ampla distribuição, conservação evolutiva, bem como a capacidade de degradar rapidamente o peróxido de hidrogênio, a catalase desempenha um papel importante em sistemas que tenham evoluído para a vida dos organismos vivos em ambientes aeróbios. A CAT é um dos mais ativos catalizadores produzidos pela natureza (SCANDALIOS, 2005).

Catalases-peroxidases (CP) exibem ambas as atividades catalítica e peroxidativa, ou seja, decompõem o H_2O_2 em água e oxigênio, reduzindo o peróxido em água utilizando redutores intracelulares (PAASARDI et al., 2007).

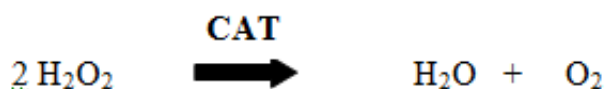


Figura 4: Decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio pela enzima catalase.

Escherichia coli e outras espécies de bactérias expressam uma catalase-peroxidase bifuncional, denominada de hidropoxidase I (**HPI** e *KatG*). A HPI é uma das duas enzimas com atividade catalítica, sendo a segunda (**HPII** e *Kat E*) uma catalase monofuncional (HILLAR et al., 1999).

1.8.3. SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A Superóxido dismutase é uma enzima que está presente em organismos aeróbios e anaeróbios facultativos, atuando na desintoxicação do radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) via reação de dismutação, gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 . É a

primeira enzima que age contra danos provocados por EAOs nas células, tendo sua atividade correlacionada com mecanismos de sobrevivência a herbicidas (MARTINS, 2007).

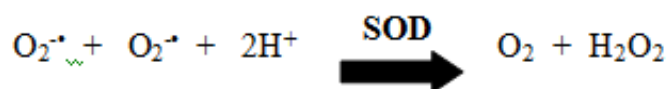


Figura 5: Formação do oxigênio e de peróxido de hidrogênio a partir de dois radicais superóxido pela enzima superóxido dismutase.

As SODs são metaloenzimas multiméricas, e são distinguidas por seu cofator metal e sua localização celular (KEITH; VALVANO, 2007). São classificadas em quatro grupos de acordo com o metal de seu sítio ativo: cobre/zinco (Cu/Zn), manganês (Mn) ou ferro (Fe) e níquel (Ni). Cu/Zn-SODs são geralmente encontradas no citosol de células eucarióticas e em cloroplastos. As Mn-SODs são encontradas em procariotos e mitocôndrias. As Fe-SODs são encontradas em procariotos, em algas, e em cloroplastos de algumas plantas superiores (SCANDALIOS, 2005).

Duas SODs têm sido descritas em *Escherichia coli*: uma Fe-SOD, cuja expressão é modulada por níveis intracelulares de ferro, e a Mn-SOD, enzima predominante durante o crescimento aeróbico, cuja expressão é transcricionalmente regulada por no mínimo seis sistemas de controle. Uma terceira atividade de SOD, com propriedades semelhantes à Cu/Zn-SOD eucariótica, tem sido encontrada no espaço periplasmático desta bactéria (CABISCOL et al., 2000).

A importância biológica do Mn-SOD é demonstrada quando ocorre a inativação de seus genes em *Escherichia coli*, o que acarreta no aumento da frequência de mutações nesses microrganismos sob circunstâncias aeróbicas (MATÉS, 2000).

1.8.4. GLUTATIONA REDUTASE (GR)

A Glutationa reduzida (GSH) é membro da família de flavoproteínas oxiredutases, sua estrutura é constituída por um grupo prostético flavina adenina dinucleotídeo (FAD), transferidor de elétrons que catalisa a redução dependente de NADPH da glutathiona oxidada (GSSG) para glutathiona reduzida (GSH) (CARVALHO, 2007).

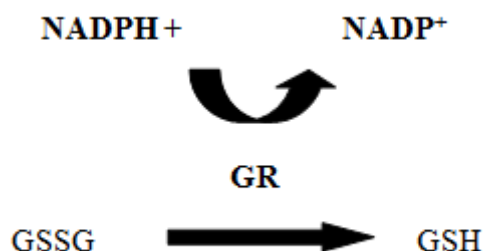


Figura 6: Formação da glutathiona reduzida a partir de glutathiona oxidada pela enzima glutathiona redutase.

A enzima GR é de ocorrência quase universal, sendo amplamente distribuída entre procariotos e eucariotos, desde bactérias heterotróficas e fotossintetizantes até plantas e animais superiores (NOCTOR et al., 2002).

A expressão da glutathiona redutase é feita através do gene *gor*, sendo que a regulação é através do fator transcricional **OxyR** (MASIP et al., 2006). Em *E. coli*, o gene *gor* também está sob controle independente de *oxyR* por uma subunidade alternativa σ de RNA polimerase (RpoS), a qual é regulada por vários agentes estressantes, o que envolve a GR em um circuito regulatório global de adaptação bacteriana a várias condições de estresse (SMIRNOVA; OKITABRSBY, 2005).

Esta enzima catalisa a desintoxicação do metabolismo causado por xenobióticos, drogas, luz U.V., metais pesados e carcinogênicos, protegendo assim as células do estresse oxidativo. Quando estes compostos são metabolizados, ocorre a geração de superóxido e eletrófilos, que se forem acumulados nas células

causam danos no DNA, membrana, mutagenicidade, envelhecimento prematuro e morte (CARVALHO, 2007).

1.9. POLIMORFISMOS

As isoenzimas são variantes moleculares (polimorfismos) da mesma enzima, que podem ocorrer em uma mesma espécie ou gênero, como resultado da ocorrência de diferentes alelos codificando para essa mesma enzima. Estas variantes moleculares da mesma enzima são detectadas pelos seus diferentes padrões de migração em eletroforese em gel de amido.

Grande número de estudos experimentais estão sendo realizados para analisar a evolução dos polimorfismos genéticos em populações bacterianas. Alguns estudos revelaram que a seleção de polimorfismos podem aparecer e estes se manterem presentes em populações bacterianas crescentes em um único recurso (ROZEN; LENSKI, 2000).

Porcher et al. (2001) simularam em seu trabalho a evolução de uma população bacteriana de solo submetidas à poluição, ambiente este caracterizado por um influxo constante de um composto orgânico biodegradável, como por exemplo, um xenobiótico. Eles mostraram que em situações de alta concorrência por nutrientes estas espécies bacterianas apresentaram um polimorfismo enzimático estável. Condições estressantes como baixa concentração de nutrientes induzem microrganismos a expressar novas isoenzimas para minimizar e reparar danos causados por espécies reativas de oxigênio (EAOs). As principais consequências do aumento dos níveis de EAOs nas células bacterianas seria um aumento na produção de cápsulas, ativação de genes de defesa, ativação ou inativação de proteínas, peroxidação lipídica, destruição de proteínas e DNA, e consequentemente indução de morte celular ou mutações benéficas, como genes selecionados com função biodegradadora e bem adaptados a ambientes estressantes.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

1. Isolar, caracterizar, selecionar e comparar microrganismos tolerantes ao mesotrione de solos sem tratamento e previamente tratados com o herbicida mesotrione e húmus com maior potencial de degradação por espectrofotometria.
2. Avaliar a resposta do sistema antioxidativo gerado pela presença do herbicida mesotrione em linhagens bacterianas para as enzimas catalase, superóxido dismutase e glutatona redutase.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Foram selecionadas duas espécies bacterianas Gram-negativas, *Acinetobacter calcoaceticus*, isolada de solo sem tratamento de mesotrione (SSTM), e *Acinetobacter* sp. isolada de solo com tratamento de mesotrione (SCTM), da Fazenda Escola Capão da Onça da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

3.2. MATERIAL QUÍMICO

O herbicida mesotrione foi adquirido pela Fazenda Escola Capão da Onça da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob nome comercial Callisto® (480g/L). A base para sua diluição e concentração em meio de cultura foi realizada de acordo com as especificações do produto para utilização em campo, como preparo da calda (0,15L/99,85L) e volume por hectare (150 mL/ha).

Foram realizados três ensaios: a) meio controle sem herbicida; b) meio com concentração utilizada em campo (0,03mM); e c) meio com concentração 500x superior à de campo (15mM).

3.3. MEIOS DE CULTURA

3.3.1. Meio Mineral (MM)

Segundo RUEGGER e TAUKE-TORNISIELO (2004), com modificações:

Tampão Fosfato (item 3.5.)

3g de NaNO₃

0,5g de MgSO₄

0,5g de KCl

0,01g de FeSO₄

15g de Ágar

O ágar foi acrescentado após verificação do pH, e completado com água destilada para 1000 mL. Ao MM estéril foi acrescentado 0,03 mM (20µL) de mesotrione (primeira concentração).

3.3.2. Caldo Nutriente (Himedia®)

Foi preparado seguindo as especificações do fabricante.

3.3.3. Ágar de Batata e Dextrose (Acumedia®)

Foi preparado seguindo as especificações do fabricante.

3.3.4. Meio Ágar MacConkey (Acumedia®)

Foi preparado seguindo as especificações do fabricante.

3.3.5. Meio Ágar Nutriente (Himedia®)

Foi preparado seguindo as especificações do fabricante.

3.3.6. Meio Ágar Saboraud - 4% Glucose (Merck®)

Foi preparado seguindo as especificações do fabricante.

Obs.: Todos os meios de cultura foram autoclavados antes do uso, a 120°C, 1 atm, por 20 minutos.

3. 4. SOLUÇÕES E TAMPÕES

3.4.1. Solução de Cristal Violeta

Cristal Violeta.....	1 g
Água destilada.....	100 mL

3.4.2. Solução de Lugol

Iodo metálico.....	1 g
Iodeto de potássio.....	2 g
Água destilada.....	300 mL

3.4.3. Solução de Álcool-Acetona

50% de Álcool etílico

50% de Acetona

Para uma solução de 100 mL

3.4.4. Solução de Safranina

Safranina.....0,5 g

Álcool 95%.....10 mL

Água destilada.....100 mL

3.4.5. Solução Acrilamida/bis-acrilamida 40%

Acrilamida.....40 mg

Água Milli-Q100 mL

3.4.6. Solução Salina 0,9%

NaCl.....9g

Água destilada.....p/1000mL

A solução foi autoclavada e estocada a 4°C.

3.4.7. Tampão de Corrida (5x) (pH 8,3)

Tris (25 mM).....15,2g

Glicina (192 mM).....72g

Água Milli-Q1000 mL

Adicionar 1% de SDS 10% ao tampão na hora do uso.

3.4.8. Tampão do Gel Principal (pH 8,9)

Tris (3M).....36,3g

Água Milli-Q.....100 mL

3.4.9. Tampão do Gel de Empacotamento (pH 6,7)

Tris (0,5M).....6g
Água Milli-Q.....100 mL

3.5. Tampão para Meio Mineral (MM)

Tampão fosfato de potássio 1M (pH 7,0):

A - KH_2PO_4 - 27,2g em 1L de água destilada

B - K_2HPO_4 - 45,6g em 1L de água destilada

Utilizar 39 mL da solução A e 61 mL da solução B

3.5.1. Tampão para Extração de Proteínas

Tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5):

1mM de EDTA

3 mM de DTT

4% (p/v) de PVPP

3.6. METODOLOGIAS

3.6.1. COLETA DAS AMOSTRAS DE SOLO

O solo foi coletado na Fazenda-Escola Capão da Onça da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) (Figura 7), enquanto o húmus foi adquirido em casas de comércio.

As amostras foram coletadas de plantações de milho em duas glebas (longitude: 50 ° 03'W, latitude: 25 ° 05'S; altitude média: 1.000 m), uma de solo sem tratamento com mesotrione (SSTM), no dia 13/11/2007 no período da manhã, e a outra amostra de solo com tratamento de mesotrione (SCTM), no dia 19/02/2008, no período da tarde. Em ambas as coletas, foi utilizado o princípio da aleatoriedade, cada amostra sendo composta por 10 sub-amostras localizadas em pontos distintos dentro da gleba, totalizando aproximadamente 10 g de solo coletados por amostra.

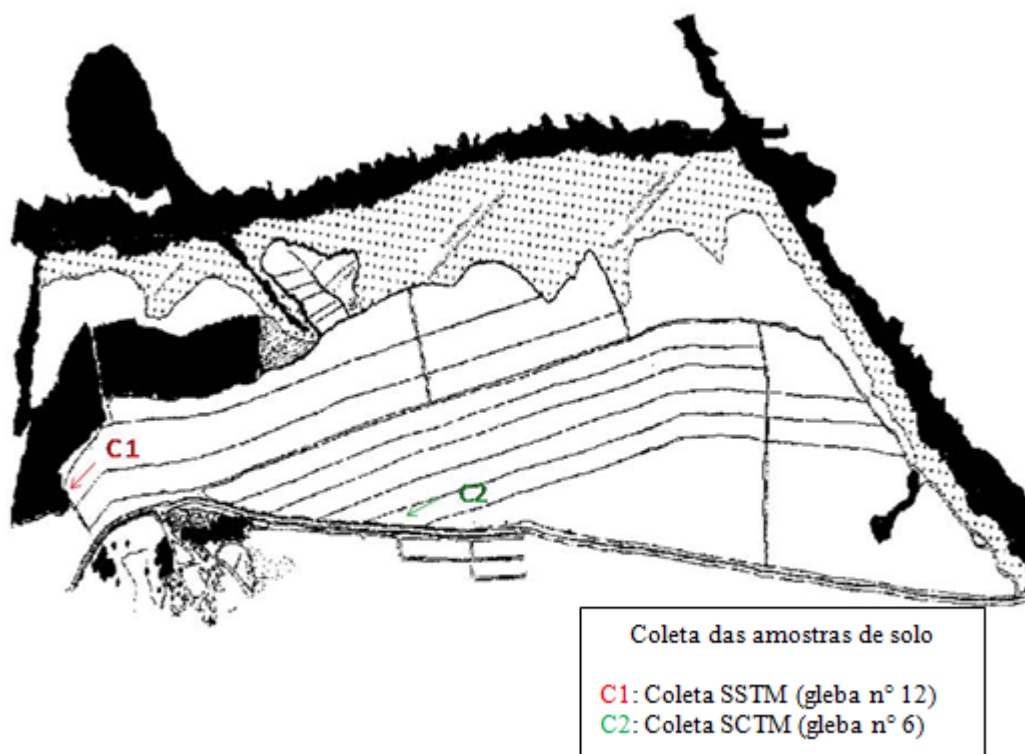


Figura 7: Mapa da Fazenda-Escola Capão da Onça da Universidade Estadual de Ponta Grossa

3.6.2. ISOLAMENTO DAS LINHAGENS

Em laboratório foi realizada a homogeneização das sub-amostras para composição de uma amostra representativa do solo coletado. A partir desta amostra, foi realizada a pesagem asséptica, separando-se 1 g de material, e posteriormente submetido à diluição seriada. Foram semeados 100µL das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} em trélicas em placas de Petri em MM (Meio Mineral) com 0,03 mM de mesotrione e incubadas a 18°C e 28°C. Linhagens isoladas foram estocadas em frascos com meio mineral (MM) (item 3.3.1) sólido contendo 0,03 mM de mesotrione.

3.6.3. SELEÇÃO DAS LINHAGENS TOLERANTES AO MESOTRIONE

A seleção das linhagens tolerantes ao herbicida mesotrione foi realizada utilizando concentrações crescentes do herbicida, sempre selecionando os microrganismos de crescimento mais vigoroso. No teste realizado a partir de húmus, ao MM estéril foi acrescentado para o teste de primeira concentração 0,03 mM de mesotrione. Linhagens isoladas a partir deste meio foram estocadas em frascos com MM sólido mais 0,03 mM de mesotrione. Este processo se repetiu até a concentração máxima (15 mM) de tolerância dos microrganismos ao mesotrione, sempre selecionando as linhagens de crescimento mais vigoroso.

3.6.7. ESTOCAGEM DAS LINHAGENS

3.6.7.1. ESTOQUE DE RÉPLICAS CONTÍNUAS

Durante a realização da avaliação de tolerância, as linhagens foram estocadas em frascos com MM na concentração de 0,03 mM de mesotrione e em frascos com Agar nutriente para as bactérias, e Agar Sabouraud Dextrose e Agar Batata Dextrose para os fungos.

3.6.7.2. ESTOQUE A LONGO PRAZO

Posteriormente à avaliação de tolerância, as linhagens selecionadas foram estocadas em papel de filtro, em trélicas, em duas temperaturas, ao freezer (–20°C e 4°C). Com relação às linhagens fúngicas, foi realizado adicionalmente estoque em tubos com água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1939).

3.6.8. AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS TOLERANTES

Foram realizados testes de temperatura ótima de crescimento com as linhagens que obtiveram os maiores níveis de resistência e ou tolerância ao herbicida. Foram utilizadas as temperaturas de 18°C, 28°C e 37°C. As linhagens foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Ágar nutriente para as bactérias e Ágar Batata Dextrose para os fungos, analisando em qual temperatura as linhagens apresentavam crescimento mais vigoroso.

3.6.9. IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS RESISTENTE E TOLERANTE AO HERBICIDA

As 10 linhagens bacterianas foram identificadas primeiramente pelos métodos da coloração de Gram e coloração de cápsulas; posteriormente, foram utilizados kits para a identificação bioquímica para fermentadores (Laborclin), apenas para as duas linhagens selecionadas para maior estudo, sendo identificadas como *Acinetobacter calcoaceticus* e *Acinetobacter* sp..

As linhagens fúngicas foram identificadas por microcultivo e posteriormente caracterizadas morfológicamente por manual de identificação.

3.7. SISTEMA ANTIOXIDANTE

3.7.1. TESTE DE CRESCIMENTO COM AS LINHAGENS RESISTENTE E TOLERANTE AO MESOTRIONE

O experimento foi composto por três tratamentos para a bactéria *Acinetobacter calcoaceticus*: controle (meio Ágar nutriente, sem herbicida), e meio mineral com tratamento 0,03 mM de mesotrione e com tratamento de 15 mM de mesotrione. Para a análise com a bactéria *Acinetobacter* sp. foram utilizados o controle e o tratamento com 0,03 mM de mesotrione devido a última tolerar apenas a concentração de campo.

Cada tratamento foi composto de quatro parcelas e cada parcela formada por seis placas de Petri, sendo o experimento avaliado através de um delineamento em blocos casualizados.

As linhagens *A. calcoaceticus* e *Acinetobacter* sp. foram inoculadas e posteriormente incubadas em estufa de crescimento a 28°C até atingirem a fase logarítmica de crescimento, (LOG tardia), que para a bactéria *A. calcoaceticus* foi de 16 horas, e para *Acinetobacter* sp. foi de 36 horas.

3.7.2. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

As amostras foram coletadas por meio da raspagem de seis placas (uma parcela) com auxílio de espátulas e colocadas em um mortar, adicionado-se nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram maceradas até formar um pó fino e posteriormente, foi adicionado o tampão de extração (item 3.5.1). O procedimento foi realizado à temperatura de 4°C.

O material foi homogeneizado em tampão de extração (item 3.5.1.) na proporção de 1g de amostra/ 4 mL de tampão, e centrifugado a 12100 g por 30 min. a 4°C. O sobrenadante foi coletado e dividido em alíquotas para serem estocadas em freezer a -80°C até o momento das análises (GOMES JR et al., 2007).

3.7.2.1. DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Foi utilizado o método de Bradford (1976) para a determinação da concentração de proteínas totais, utilizando-se o BSA ("bovine serum albumin") como padrão.

3.7.2.2. VARIAÇÕES NOS PADRÕES PROTÉICOS

As proteínas das amostras bacterianas foram inicialmente separadas por eletroforese em sistema desnaturante, utilizando o sistema SDS-PAGE (AZEVEDO et al., 1998).

A eletroforese em sistemas SDS-PAGE é empregada em estudos de proteínas, o qual utiliza um agente dissociante para desnaturá-las em subunidades. O agente dissociante comumente utilizado é o detergente iônico dodecil sulfato de sódio (SDS). A mistura de proteína com o tampão da amostra é aquecida para ocorrer a quebra de ligações dissulfeto.

SDS-PAGE – Para confecção dos géis desnaturantes (10% poliacrilamida) foi utilizado o seguinte protocolo:

Primeiro gel (de resolução): 5,0 mL de uma solução 40% de acrilamida/bis-acrilamida (Sigma), 5 mL de Tampão TRIS 2,9 M, pH 8,9, 200 µL de SDS (10%) e 10,0 mL de água Milli-Q. Como catalisadores foram utilizados 38 µL de TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) e 50 µL de persulfato de amônia (1%).

Gel superior (de empilhamento): após a polimerização do gel de resolução, foi adicionada 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, 100 µL de SDS (10%) e 5,5 mL de água destilada. Para a polimerização foram utilizados 20 µL de TEMED e 100 µL de persulfato de amônio (1%).

Após polimerização, foram aplicados aos géis de SDS-PAGE os volumes das amostras correspondentes a concentração de 20 µg de proteína. O volume da amostra foi aplicado juntamente com o tampão de amostra (3,0 mL de H₂O destilada, 1,0 mL de tampão de empacotamento, 1,6 mL de glicerol, 1,6 mL de SDS

(10%), 0,4 mL de solução 0,5% de azul de bromofenol e 0,4 mL de mercaptoetanol), na proporção de 1:1.

As condições gerais de corrida foram definidas nos ensaios preliminares para obtenção de géis com alta resolução. Os géis foram corridos a uma corrente constante de 15 mA por placa, com tampão de eletrodo constituído por TRIS 250 mM, pH 8,3 acrescido de 1,92 M de glicina e 1% de SDS (10%).

Posteriormente, os géis foram corados com Comassie-Blue e fotodocumentados pelo programa Image scanner – (Amershan Bioscience).

3.7.3. ATIVIDADES DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

As enzimas que tiveram a atividade analisada foram catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione redutase (GR). As análises foram realizadas por atividade em géis não desnaturantes e por espectrofotometria, dependendo da enzima e de acordo com sua descrição.

Para confecção dos géis não desnaturantes (12% poliacrilamida) foi utilizado o mesmo protocolo para todas as enzimas (AZEVEDO et al., 1998):

Primeiro gel (de resolução): 6,0 mL de uma solução 40% de acrilamida/bis-acrilamida (Sigma), 5 mL de Tampão TRIS 2,9 M, pH 8,9 e 9,0 mL de água destilada. Como catalisadores foram utilizados 38 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônia (1%).

Gel superior (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 e 5,5 mL de água destilada. Para a polimerização foram utilizados 20 µL de TEMED e 100 µL de persulfato de amônio (1%). O tampão de eletrodo para corrida do gel não desnaturante foi constituído por TRIS 250mM, pH 8,3 acrescido de 1,92 M de glicina.

3.7.3.1. ATIVIDADE DA CATALASE – CAT

A atividade da CAT foi determinada por meio de dois métodos: por espectrofotometria (aparelho Perkin Elmer, Lambda 40) e em PAGE.

3.7.3.1.1. ATIVIDADE EM ESPECTROFOTÔMETRO

A atividade de CAT foi determinada como descrito por Kraus et al. (1995), com modificações conforme Azevedo et al. (1998).

A temperatura de 25°C, a atividade foi determinada utilizando 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%), preparada no momento do ensaio.

A reação foi iniciada com 25 µL de extrato protéico, e a atividade determinada por meio da decomposição de peróxido de hidrogênio, monitorada por 1 min. de acordo com alterações na absorbância a 240 nm. Os resultados foram expressos em µmol/min./mg de proteína para o meio.

3.7.3.1.2. ATIVIDADE EM PAGE NÃO DESNATURANTE

Para a determinação da atividade de CAT em PAGE, as amostras das culturas bacterianas tiveram suas proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%), como já descrito.

A eletroforese foi realizada a 4°C e a corrente constante utilizada por placa foi de 15 mA. Para cada gel foram aplicadas amostras de padrão de CAT de fígado de boi (2 unidades) e 20 µg de proteína dos extratos das amostras.

Revelação: após aproximadamente 9 horas de corrida, foi realizada a lavagem do gel por 45 minutos em água deionizada (3 lavagens de 15 minutos) e incubação do mesmo por 10 minutos em solução de H₂O₂ 0,003%, a temperatura ambiente, com agitação suave e constante. Após este período, o gel foi rapidamente lavado em água deionizada e colocado por 10 minutos em uma solução de FeCl₃ 1% (p/v) e K₂Fe(CN)₆ 1% (p/v) sempre com agitação suave. Em seguida, a solução foi retirada e o gel lavado novamente com água destilada. A

fixação foi realizada com uma solução de ácido acético (7%) por 15 minutos e em seguida os géis foram fotodocumentados.

3.7.3.2. ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE -SOD

3.7.3.2.1. ATIVIDADE EM PAGE NÃO DESNATURANTE

Foi realizada eletroforese em PAGE não desnaturante (também conhecido como nativo) (12%) descrito no item 4.4.5, utilizando como padrão 2 unidades de SOD de fígado de boi (Sigma). Após a separação das proteínas por eletroforese (aproximadamente 3 horas de corrida, com corrente constante de 20 mA/placa), a atividade de SOD foi determinada como descrito por Beauchamp; Fridovic (1971).

Revelação: após corrida, os géis foram enxaguados rapidamente em 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 (ácido etilenodiamino tetra-acético), 0,05 mM riboflavina, 0,1 mM nitroblue tetrazolium (NTT) e 0,3% TEMED.

Ao final de 30 minutos, a mistura de reação foi descartada, os géis foram enxaguados com água deionizada e colocados sob iluminação por alguns minutos até o aparecimento de bandas brancas e coloração do gel.

Esta reação propicia a formação de uma coloração púrpura e as bandas correspondentes à atividade de SOD permanecem sem coloração, promovendo uma revelação negativa. A fotoxidação foi interrompida mergulhando-se o gel em uma solução de ácido acético 7%, para então documentação pela Image scanner- (Amershan Bioscience).

3.7.3.2.2. DETERMINAÇÃO DAS ISOFORMAS DE SOD

O sistema PAGE nativo foi utilizado para identificação das isoformas de SOD. O volume, relativo à concentração de proteína, colocado na única canaleta reservada para a amostra, ficou estabelecido como 100 µg para a bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* e 300 µg para a bactéria *Acinetobacter* sp.

A eletroforese ocorreu nas mesmas condições anteriormente descritas para SOD. Após a corrida, o gel foi dividido verticalmente em três partes. Uma delas foi mantida 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 (Cianeto de Potássio) e a última parte foi imersa em uma solução do referido tampão acrescido de 0,0292 g de EDTA e 70 µL de H₂O₂ a 30%. Estas etapas foram realizadas no escuro para prevenir a fotoxidação.

Os géis permaneceram por 20 minutos nas soluções, sendo em seguida lavados ligeiramente com água destilada e submetidos a revelação com NBT e riboflavina.

3.7.3.3. ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE – GR

A atividade da GR foi determinada pelo método PAGE não-desnaturante.

A revelação para atividade de GR foi determinada como descrito por Lee; Lee (2000), com uma eletroforese em PAGE não-desnaturante (12%) utilizando como padrão uma unidade de GR.

O gel foi lavado em água destilada (2 lavagens de 15 minutos) e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente, em uma solução de 0,25 M de TRIS (pH 7.5); 10mg de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-brometo de difeniltetrazol); 10mg DPIP (dicloroindolacético); 2,4 mM GSSG e 0,5 mM NADPH para um volume final de solução de 50 mL. Depois de descartar esta solução, o gel foi lavado rapidamente em água deionizada e foi feita a fixação em solução de ácido acético 7%.

Após o aparecimento das bandas (coloração positiva) com cor rosada, a solução foi retirada e os géis fotodocumentados.

3.7.4. MEDIÇÃO DO TAMANHO DAS CÉLULAS DAS LINHAGENS BACTERIANAS RESISTENTE E TOLERANTE

A linhagem *A. calcoaceticus* foi cultivada nos tratamentos controle (caldo nutriente), caldo mineral com 0,03 mM de mesotrione e caldo mineral com 15mM de mesotrione, e a linhagem *Acinetobacter* sp. foi cultivada apenas no controle e tratamento 0,03 mM, depois, foi realizada coloração de Gram e posteriormente

submetidas à medição. Foram medidos em computador 50 indivíduos em cada tratamento no microscópio Olympus BX51P com 82 megapixels de resolução pelo Programa ImageJ 1.37v., posteriormente, realizada a análise estatística dos dados obtidos.

3.7.5. ANÁLISE DA CAPACIDADE BIODEGRADATIVA DAS LINHAGENS BACTERIANAS POR ESPECTROFOTOMETRIA

As linhagens *A. calcoaceticus* e *Acinetobacter* sp. foram cultivadas cada uma em 200 mL de caldo nutriente em frascos de 500 mL sob agitação de 70 rpm em temperatura de 28°C por 24 h. Quando as linhagens encontravam-se na fase Mid log foram coletados 150 ml da amostra sendo distribuídos em três tubos de 50 ml cada. Posteriormente as amostras foram centrifugadas em 25 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado primeiramente com 25 mL de solução salina 0,9% e novamente centrifugado. Depois, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com água destilada e centrifugado. Por último, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de cada tubo foi transferido para um frasco de 500 mL contendo 150 ml de água destilada com 0,01 mM de mesotrione, sendo o controle (150 mL de água destilada + 0,01 mM de mesotrione), para a linhagem *A. calcoaceticus*, o precipitado foi transferido para 150 mL de água destilada e 0,01 mM de mesotrione e para a linhagem *Acinetobacter* sp o mesmo procedimento, todos em triplicata. Essas amostras foram incubadas no shaker, sob agitação de 70 rpm à 28°C por 60 horas. Foram coletadas 12 ml de cada amostra de 12 em 12 horas. Em seguida foram centrifugadas por 30 minutos, transferido o sobrenadante para outro tubo, este, centrifugado por mais 30 minutos e transferido para o último tubo e finalmente as amostras foram congeladas em -20°C. Em seguida as amostras foram analisadas pelo espectrofotômetro modelo MULTISPEC-1501 (SHIMADZU®) em um espectro de absorbância de 200 a 800 nm. O herbicida mesotrione apresenta um comprimento de onda de 254 nm, sendo todas as amostras analisadas neste comprimento e posteriormente coletados os valores das absorbâncias.

4. RESULTADOS

Os resultados estão organizados em um capítulo correspondente ao artigo científico.

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS E ATIVIDADE DE ENZIMAS
RELACIONADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO EM LINHAGENS
BACTERIANAS TOLERANTES AO HERBICIDA MESOTRIONE

RESUMO

Mesotrione, 2 - (4-metil-2-nitrobenzoi) -1,3-cicloexanodionas, é um herbicida da classe química tricetona, com alto potencial de lixiviação, inibe competitivamente a 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD), que converte a tirosina em plastoquinona e α -tocoferol, e foi encontrado em plantas, fungos e bactérias, incluindo *Acinetobacter*. O objetivo deste trabalho foi caracterizar modos de adaptação de linhagens brasileiras de *Acinetobacter* ao mesotrione. *Acinetobacter calcoaceticus* e *Acinetobacter* sp. foram selecionadas em até 15.00 mM (resistência) e 0,03 mM (tolerância) de mesotrione e avaliadas para degradação em experimentos de até 60 horas a 35 mM do herbicida em espectrofotometria, mostrando-se incapazes de degradação. Medidas das células bacterianas em computador (ImageJ 1.37V) indicam processo de inanição, provavelmente devido à não utilização de mesotrione como fonte de carbono, e essa característica pode ser considerada como um marcador para a degradação do herbicida. A forte atividade oxidativa do herbicida mesotrione está vinculada ao radical N da molécula, e reforçada pelo radical S. Por este motivo, foi estudado o estresse oxidativo para as enzimas catalase, superóxido dismutase e glutatona redutase, por SDS-PAGE não denaturante, PAGE e espectrofotometria. *Acinetobacter calcoaceticus* mostrou uma maior resposta ao estresse oxidativo do que *Acinetobacter* sp., apresentando mais proteínas solúveis e menor número de isoformas de bandas em eletroforese (12 contra 23), provavelmente devido a suas enzimas terem sido selecionadas para este herbicida e mostraram melhor adaptação que *Acinetobacter* sp.. Estratégias de resistência microbiana ao herbicida e padrões específicos de enzimas anti-oxidativas poderiam dar opções não degradativas aos microorganismos, levando à manutenção de maiores quantidades herbicidas em solos e águas subterrâneas, e por mais tempo.

Palavras-chave: *Acinetobacter*, Mesotrione, Adaptação Microbiana, Estresse Oxidativo, Resistência a Herbicidas.

ABSTRACT

Mesotrione, 2-(4-Mesyl-2-nitrobenzoyl)-1,3-cyclohexanedione, is a tricyetone herbicide chemical class, with high leaching potential, and competitively inhibit 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD), that converts tyrosine to plastoquinone and α -tocopherol, and was found in plants, fungus, and bacteria, including *Acinetobacter*. The aim of this work was to characterize pathways of Brazilian strains of *Acinetobacter* facing mesotrione. *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* sp. were selected in up to 15.00 mM (resistance) and 0.03 mM (tolerance) concentrations of mesotrione and tested at 35 mM buffered solution in spectrophotometry until 60 hours, showing to be incapable to degrade mesotrione. Computer bacterial cells measures (ImageJ 1.37v) indicate starvation process, probably due to non use of mesotrione as carbon source, and this characteristic could be consider a marker for herbicide degradation. Mesotrione herbicide activity is major in N, and enhanced by S, and has a strong electron withdrawing. For this reason, we studied antioxidative stress enzymes catalase, superoxide dismutase and glutathione reductase, by SDS-PAGE, non-denaturating PAGE and spectrophotometry. *Acinetobacter calcoaceticus* showed a higher response to oxidative stress than *Acinetobacter* sp., with more soluble proteins and lower number of electrophoresis bands isoforms (12 against 23), because its enzymes were selected for this herbicide and show better adaptation than *Acinetobacter* sp.. A microbial strategy of herbicide resistance/tolerance and specific oxidative stress raised by mesotrione herbicide could give additional non-degradating options to microorganisms, not necessarily leading to fast herbicide degradation, so determining the herbicide fate in soils and groundwater.

Keywords: *Acinetobacter*, Mesotrione, Microbial Adaptation, Oxidative Stress, Herbicide Resistance

INTRODUÇÃO

O uso de técnicas modernas na agricultura para gerar um aumento progressivo na produtividade tem sido o alvo do desequilíbrio ambiental mundial. A partir dos anos 60 com a modernização da agricultura, ocorreu um aumento de 21% na área agrícola nos países em desenvolvimento como o Brasil. Durante este período, a intensidade de produção na agricultura tem aumentado substancialmente. O número de máquinas agrícolas dobrou e o consumo do uso de fertilizantes quadruplicou (PRETTY, 2007). A contaminação dos alimentos pela aplicação de químicos, como pesticidas, estão causando efeitos variáveis à saúde humana, e impactos ambientais pela geração de uma maior quantidade de resíduos tóxicos no solo e na água (JONGBLOED et al., 2004).

O Mesotrione 2-(4-metil-2-nitrobenzoi) ciclo-hexano-1,3-diona é um herbicida de nome comercial Callisto®, representante do grupo químico tricetona, medianamente tóxico à seres humanos, mas é altamente móvel, ou seja, possui alto potencial de deslocamento no solo, podendo atingir águas subterrâneas, sendo assim classificado como perigoso ao meio ambiente (Classe III) (SYNGENTA, 2009). É um herbicida seletivo pós-emergente para o controle de algumas ervas-daninhas de folhas largas em culturas de milho (ALFERNES; WIEBE, 2002). É quimicamente derivado de uma fitotoxina produzida pela planta *Callistemon citrinus* e age na erva-daninha inibindo a ação da enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD), agindo na biossíntese de carotenóides (MITCHELL et al., 2001).

A biorremediação, área da biotecnologia responsável por estudar a eliminação, atenuação ou transformação de poluentes ou substâncias contaminantes pelo uso de processos biológicos, tem sido uma das alternativas utilizadas para a descontaminação de solos (LYNCH; MOFFAT, 2005). As estratégias efetivas da remediação são avaliadas no desaparecimento da química de interesse (GANEY; BOYD, 2005), ela representa uma arma natural ocorrendo por processos biológicos, um recurso importante porque destrói ou imobiliza contaminantes ao invés de transferi-lo de um nicho ambiental para outro (CHIACCHIERINI et al., 2004). A biorremediação vem sendo desenvolvida com o objetivo de explorar a diversidade genética e a versatilidade metabólica microbiana para a transformação de contaminantes em produtos menos tóxicos que podem ser integrados nos ciclos biogeoquímicos naturais (UETA et al., 2007).

A exposição de microrganismos à agroquímicos, mesmo quando relacionada somente à tolerância, pode levar a uma resposta de indução ao stress oxidativo (KONDA; PÁSZTOR, 2001). Os produtos do metabolismo aeróbico são altamente reativos, como Radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$), Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) e o Radical Hidroxila ($OH^{\cdot}$). O aumento na concentração de EAOs (Espécies Ativas de Oxigênio) para níveis que excedem a capacidade de defesa celular caracteriza o estresse oxidativo. Os alvos biológicos da alta reatividade das EAOs são DNA, RNA, proteínas e lipídios (CABISCOL et al., 2000).

Para minimizar estes efeitos danosos resultantes da ação dessas espécies, os organismos aeróbios desenvolveram mecanismos capazes de combater a produção de EAOs, denominado de sistema antioxidante de defesa, o qual pode ser dividido em não-enzimático e enzimático. As defesas não-enzimáticas incluem compostos com propriedade intrínseca antioxidante, como o β -caroteno, α -tocoferol (vitamina E), glutathiona reduzida (GSH) e ácido ascórbico, NADPH e NADH, moléculas que ajudam a manter o ambiente redutor. Já os mecanismos enzimáticos envolvem a superóxido dismutase, catalase, peroxidases, glutathiona redutase e outras (SCANDALIOS, 2005). O presente trabalho teve como objetivo caracterizar modos de adaptação de linhagens brasileiras de *Acinetobacter* ao herbicida mesotrione.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras de solo e isolamento das linhagens

O solo foi coletado na Fazenda-Escola Capão da Onça da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa-PR, Brasil. As amostras foram coletadas de plantações de milho em duas glebas (longitude: $50^{\circ} 03'W$, latitude: $25^{\circ} 05'S$ e altitude média: cerca de 1.000 m): uma de solo sem tratamento com mesotrione (SSTM) no dia 13/11/2007, e a outra amostra de solo com tratamento de mesotrione (SCTM) no dia 19/02/2008. Em ambas as coletas, foi utilizado o princípio da aleatoriedade, sendo que cada amostra foi composta por 10 sub-amostras localizadas em pontos distintos dentro da gleba, totalizando aproximadamente 10 g de solo coletados por amostra. Em laboratório foi realizada

a homogeneização das sub-amostras para composição de uma amostra representativa do solo coletado. A partir desta amostra, foi realizada a pesagem asséptica, separando-se 1 g de material, e posteriormente submetido a diluição seriada. Diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foram semeadas em tréplicas em placas de Petri em MM (Meio Mineral) com 0,03 mM de mesotrione e incubadas a 18°C e 28°C, para a seleção inicial dos microrganismos. Linhagens isoladas foram estocadas em frascos com meio mineral (MM) sólido contendo 0,03 mM de mesotrione.

Identificação das linhagens resistente e tolerante ao herbicida

Foram utilizados kits para a identificação bioquímica para fermentadores (Laborclin), para as duas linhagens selecionadas, sendo caracterizadas como *Acinetobacter calcoaceticus* e *Acinetobacter* sp..

Teste de crescimento com as linhagens resistente e tolerante ao mesotrione

O experimento foi composto por três tratamentos para a bactéria *Acinetobacter calcoaceticus*: controle (meio Ágar nutriente, sem herbicida), e meio mineral com tratamento 0,03 mM de mesotrione e com tratamento de 15 mM de mesotrione. Para a análise com a bactéria *Acinetobacter* sp. foram utilizados o controle e o tratamento com 0,03 mM de mesotrione.

Cada tratamento foi composto de quatro parcelas e cada parcela formada por seis placas de Petri, sendo o experimento avaliado através de um delineamento em blocos casualizados.

As linhagens *A. calcoaceticus* e *Acinetobacter* sp. foram inoculadas e posteriormente incubadas em estufa de crescimento a 28°C até atingirem a fase logarítmica de crescimento, (LOG tardia), que para a bactéria *A. calcoaceticus* foi de 16 horas, e para *Acinetobacter* sp. foi de 36 horas.

Extração de proteínas

As amostras foram coletadas por meio da raspagem de seis placas (uma parcela) com auxílio de espátulas e colocadas em um mortar, adicionado-se nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram maceradas até formar um pó fino e posteriormente, foi adicionado o tampão de extração. O procedimento foi realizado à temperatura de 4°C. O material foi homogeneizado em tampão de extração na proporção de 1g de amostra/ 4 mL de tampão, e centrifugado a 12100 g por 30 min. a 4°C. O sobrenadante foi coletado e dividido em alíquotas para serem estocadas em freezer a -80°C até o momento das análises (GOMES JR et al., 2007).

Determinação das proteínas

Foi utilizado o método de Bradford (1976) para a determinação da concentração de proteínas totais, utilizando-se o BSA ("bovine serum albumin") como padrão.

Variações dos padrões protéicos

As proteínas das amostras bacterianas foram inicialmente separadas por eletroforese em sistema desnaturante, utilizando o sistema SDS-PAGE (AZEVEDO et al., 1998).

SDS-PAGE – Para confecção dos géis desnaturantes (10% poliacrilamida) foi utilizado o seguinte protocolo:

Primeiro gel (de resolução): 5,0 mL de uma solução 40% de acrilamida/bis-acrilamida (Sigma), 5 mL de Tampão TRIS 2,9 M, pH 8,9, 200 µL de SDS (10%) e 10,0 mL de água Milli-Q. Como catalisadores foram utilizados 38 µL de TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) e 50 µL de persulfato de amônia (1%).

Gel superior (de empilhamento): após a polimerização do gel de resolução, foi adicionada 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, 100 µL de SDS

(10%) e 5,5 mL de água destilada. Para a polimerização foram utilizados 20 µL de TEMED e 100 µL de persulfato de amônio (1%).

Após polimerização, foram aplicados aos géis de SDS-PAGE os volumes das amostras correspondentes a concentração de 20 µg de proteína. O volume da amostra foi aplicado juntamente com o tampão de amostra (3,0 mL de H₂O destilada, 1,0 mL de tampão de empacotamento, 1,6 mL de glicerol, 1,6 mL de SDS (10%), 0,4 mL de solução 0,5% de azul de bromofenol e 0,4 mL de mercaptoetanol), na proporção de 1:1.

As condições gerais de corrida foram definidas nos ensaios preliminares para obtenção de géis com alta resolução. Os géis foram corridos a uma corrente constante de 15 mA por placa, com tampão de eletrodo constituído por TRIS 250 mM, pH 8,3 acrescido de 1,92 M de glicina e 1% de SDS (10%).

Posteriormente, os géis foram corados com Comassie-Blue e fotodocumentados pelo programa Image scanner – (Amershan Bioscience).

Atividades das enzimas antioxidantes

As enzimas que tiveram a atividade analisada foram catalase, superóxido dismutase e glutathione redutase. As análises foram realizadas por atividade em géis não desnaturantes e por espectrofotometria, dependendo da enzima e de acordo com sua descrição.

Para confecção dos géis não desnaturantes (12% poliacrilamida) foi utilizado o mesmo protocolo para todas as enzimas (AZEVEDO et al., 1998):

Primeiro gel (de resolução): 6,0 mL de uma solução 40% de acrilamida/bis-acrilamida (Sigma), 5 mL de Tampão TRIS 2,9 M, pH 8,9 e 9,0 mL de água destilada. Como catalisadores foram utilizados 38 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônia (1%).

Gel superior (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 e 5,5 mL de água destilada. Para a polimerização foram utilizados 20 µL de TEMED e 100 µL de persulfato de amônio (1%). O tampão de eletrodo para corrida do gel não

desnaturante foi constituído por TRIS 250mM, pH 8,3 acrescido de 1,92 M de glicina.

Atividade da catalase por espectrofotometria e PAGE

A atividade da CAT foi determinada por meio de dois métodos: por espectrofotometria (aparelho Perkin Elmer, Lambda 40) e em PAGE. A atividade de CAT foi determinada como descrito por Kraus et al. (1995), com modificações conforme Azevedo et al. (1998).

A temperatura de 25°C, a atividade foi determinada utilizando 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%), preparada no momento do ensaio.

A reação foi iniciada com 25 µL de extrato protéico, e a atividade determinada por meio da decomposição de peróxido de hidrogênio, monitorada por 1 min. de acordo com alterações na absorbância a 240 nm. Os resultados foram expressos em µmol/min./mg de proteína para o meio.

Para a determinação da atividade de CAT em PAGE, as amostras das culturas bacterianas tiveram suas proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%), como já descrito. A eletroforese foi realizada a 4°C e a corrente constante utilizada por placa foi de 15 mA. Para cada gel foram aplicadas amostras de padrão de CAT de fígado de boi (2 unidades) e 20 µg de proteína dos extratos das amostras.

Revelação: após aproximadamente 9 horas de corrida, foi realizada a lavagem do gel por 45 minutos em água deionizada (3 lavagens de 15 minutos) e incubação do mesmo por 10 minutos em solução de H₂O₂ 0,003%, a temperatura ambiente, com agitação suave e constante. Após este período, o gel foi rapidamente lavado em água deionizada e colocado por 10 minutos em uma solução de FeCl₃ 1% (p/v) e K₂Fe(CN)₆ 1% (p/v) sempre com agitação suave. Em seguida, a solução foi retirada e o gel lavado novamente com água destilada. A fixação foi realizada com uma solução de ácido acético (7%) por 15 minutos e em seguida os géis foram fotodocumentados.

Atividade da superóxido dismutase

Foi realizada eletroforese em PAGE não desnaturante (também conhecido como nativo) (12%), utilizando como padrão 2 unidades de SOD de fígado de boi (Sigma). Após a separação das proteínas por eletroforese (aproximadamente 3 horas de corrida, com corrente constante de 20 mA/placa), a atividade de SOD foi determinada como descrito por Beauchamp; Fridovic (1971).

Revelação: após corrida, os géis foram enxaguados rapidamente em 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 (ácido etilenodiamino tetra-acético), 0,05 mM riboflavina, 0,1 mM nitroblue tetrazolium (NTT) e 0,3% TEMED. Ao final de 30 minutos, a mistura de reação foi descartada, os géis foram enxaguados com água deionizada e colocados sob iluminação por alguns minutos até o aparecimento de bandas brancas e coloração do gel. A fotoxidação foi interrompida mergulhando-se o gel em uma solução de ácido acético 7%, para então documentação pela Image scanner- (Amershan Bioscience).

Determinação das isoformas de SOD

O sistema PAGE nativo foi utilizado para identificação das isoformas de SOD. O volume, relativo à concentração de proteína, colocado na única canaleta reservada para a amostra, ficou estabelecido como 100 µg para a bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* e 300 µg para a bactéria *Acinetobacter* sp.

A eletroforese ocorreu nas mesmas condições anteriormente descritas para SOD. Após a corrida, o gel foi dividido verticalmente em três partes. Uma delas foi mantida 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 (Cianeto de Potássio) e a última parte foi imersa em uma solução do referido tampão acrescido de 0,0292 g de EDTA e 70 µL de H₂O₂ a 30%. Estas etapas foram realizadas no escuro para prevenir a fotoxidação. Os géis permaneceram por 20 minutos nas soluções, sendo em seguida lavados ligeiramente com água destilada e submetidos a revelação com NBT e riboflavina.

Atividade da glutatona redutase – GR

A revelação para atividade de GR foi determinada como descrito por Lee; Lee (2000), com uma eletroforese em PAGE não-desnaturante (12%) utilizando como padrão uma unidade de GR.

O gel foi lavado em água destilada (2 lavagens de 15 minutos) e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente, em uma solução de 0,25 M de TRIS (pH 7.5); 10mg de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-brometo de difeniltetrazol); 10mg DPIP (dicloroindolacético); 2,4 mM GSSG e 0,5 mM NADPH para um volume final de solução de 50 mL. Depois de descartar esta solução, o gel foi lavado rapidamente em água deionizada e foi feita a fixação em solução de ácido acético 7%.

Após o aparecimento das bandas (coloração positiva) com cor rosada, a solução foi retirada e os géis fotodocumentados.

Análise da capacidade biodegradativa das linhagens bacterianas por espectrofotometria

As linhagens *A. calcoaceticus* e *Acinetobacter* sp. foram cultivadas cada uma em 200 mL de caldo nutriente em frascos de 500 mL sob agitação de 70 rpm em temperatura de 28°C por 24 h. no dia seguinte foi coletado 150 ml da amostra sendo distribuídos em três tubos de 50 ml cada. Posteriormente as amostras foram centrifugadas em 25 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado primeiramente com 25 mL de solução salina 0,9% e novamente centrifugado. Depois, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com água destilada e centrifugado. Por último, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de cada tubo foi transferido para um frasco de 500 mL contendo 150 ml de água destilada com 0,01 mM de mesotrione, sendo o controle (150 mL de água destilada com 0,01 mM de mesotrione), para a linhagem *A. calcoaceticus*, o precipitado foi transferido para 150 mL de água destilada com 0,01 mM de mesotrione e para a linhagem *Acinetobacter* sp o mesmo procedimento, todos em triplicata . Essas amostras foram incubadas no shaker, sob agitação de 70 rpm à 28°C por 60 horas. Foram coletadas 12 ml de cada amostra de 12 em 12 horas. Em seguida foram centrifugadas por 30 minutos, transferido o sobrenadante para outro

tubo, este, centrifugado por mais 30 minutos e transferido o sobrenadante sendo finalmente as amostras congeladas em -20°C. Depois, as amostras foram analisadas pelo espectrofotômetro modelo MULTISPEC-1501 (SHIMADZU®) em um espectro de absorvância de 200 a 800 nm. O herbicida mesotrione apresenta um comprimento de onda de 254 nm, sendo todas as amostras analisadas neste comprimento e posteriormente coletados os valores das absorvâncias.

Medição do tamanho das células das linhagens bacterianas tolerantes

A linhagem *A. calcoaceticus* foi cultivada nos tratamentos controle (caldo nutriente), caldo mineral com 0,03 mM de mesotrione e caldo mineral com 15mM de mesotrione, e a linhagem *Acinetobacter* sp. foi cultivada apenas no controle e tratamento 0,03 mM, depois, foi realizada coloração de Gram e posteriormente submetidas à medição. Foram medidos em computador 50 indivíduos em cada tratamento no microscópio Olympus BX51P com 82 megapixels de resolução pelo Programa ImageJ 1.37v., posteriormente, realizada a análise estatística dos dados obtidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento

Foram isoladas no total 777 linhagens em MM com 0,03 mM de mesotrione. Em seguida foram selecionadas 10 linhagens bacterianas tolerantes ao herbicida na concentração de 15 mM. Entre as dez, duas linhagens bacterianas foram selecionadas para maior estudo, devido à alta resistência e tolerância ao herbicida, apresentando bom crescimento em poucas horas de incubação: a linhagem *Acinetobacter calcoaceticus* (resistente) e a linhagem *Acinetobacter* sp. (tolerante). A primeira foi submetida aos testes controle (sem mesotrione), e tratamentos 0,03 mM e 15 mM do herbicida, já a segunda foi submetida apenas os testes controle e tratamento 0,03 mM, por tolerar concentrações menores que a primeira.

Quantificação de proteínas e variação do perfil protéico

A maior concentração de proteínas foi encontrada na bactéria *A. calcoaceticus*, no tratamento com 15 mM de mesotrione (Fig. 8), porém não houve diferença significativa na concentração de proteínas totais para esta linhagem entre os tratamentos.

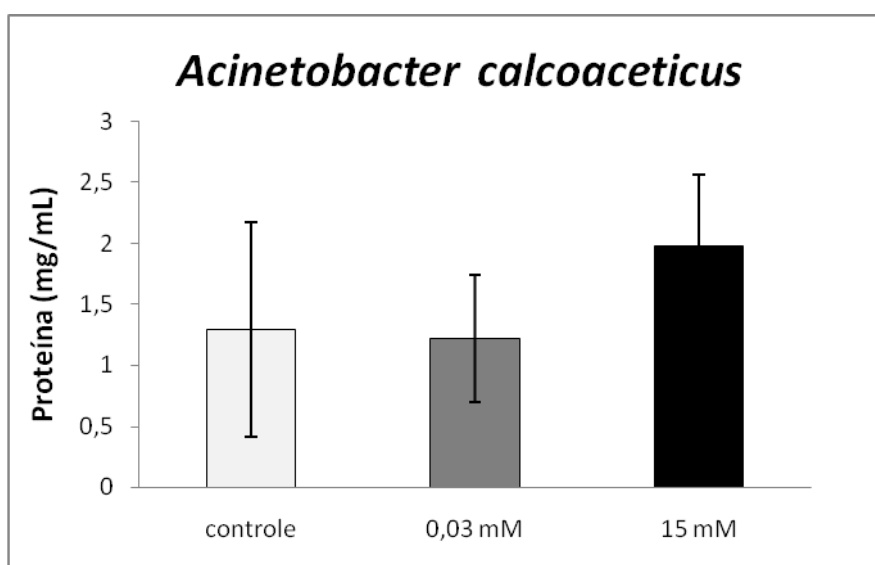


Figura 8: Quantificação de proteínas solúveis (mg/mL) da bactéria *A. calcoaceticus* – Método de Bradford, 1976

Já o comportamento da bactéria *Acinetobacter* sp. (Fig. 9) para a concentração de proteínas em diferentes tratamentos diferiu do comportamento de *A. calcoaceticus*, uma vez que na presença de 0,03 mM de mesotrione houve a diminuição na concentração de proteína quando comparado com o controle

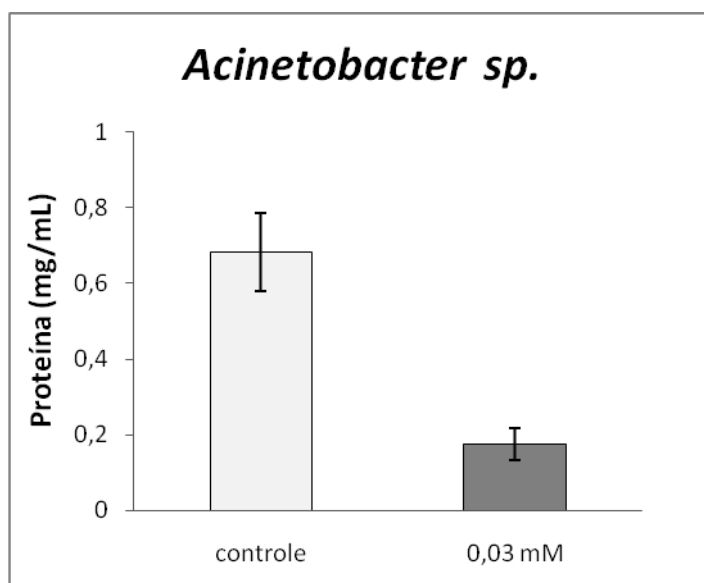


Figura 9: Quantificação de proteínas solúveis (mg/mL) da bactéria *Acinetobacter sp.* – Método de Bradford, 1976

Em análise de SDS-PAGE, as duas linhagens foram caracterizadas por perfis protéicos diferentes (Fig. 10).

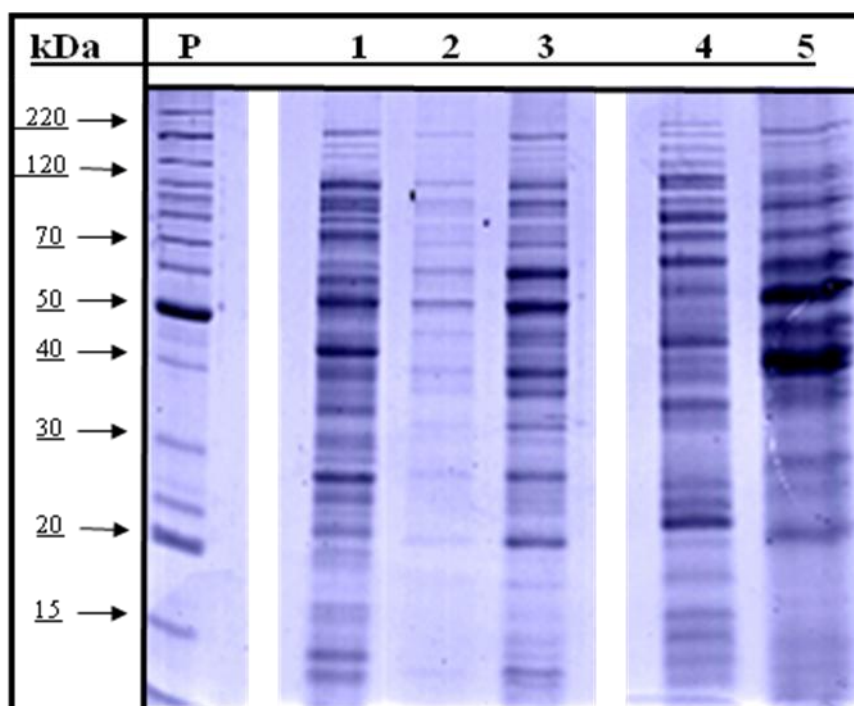


Figura 10: Proteína em gel de SDS-PAGE. Padrão (P) BSA; 1, 2, 3 representam a bactéria *A. calcoaceticus* nos respectivos controle, e tratamentos 0,03 mM e 15 mM; 4 e 5 representam a bactéria *Acinetobacter sp.* no controle e tratamento 0,03 mM.

Vários pesticidas são redox ativos, estes agentes redox-cíclicos são capazes de ser transportados para dentro das células e influenciar a atividade da comunidade bacteriana. Os microrganismos desempenham um papel essencial na desintoxicação de compostos orgânicos. Existem exemplos bem sucedidos de biorremediação *in situ* de resíduos de pesticidas realizada por microrganismos, como é o caso da bactéria *Burkholderia cepacia* WZ1 que degrada o herbicida quinclorac (LI et al., 2008).

A exposição de microrganismos a agroquímicos, mesmo quando relacionada somente à tolerância, pode levar a uma resposta de indução ao estresse oxidativo (KONDA; PÁSZTOR, 2001). Durante a atividade metabólica normal, e como consequência de várias perturbações ambientais como temperaturas extremas, radiação, xenobióticos, toxinas e poluentes do ar, o oxigênio é capaz de dar lugar a estados reativos excitados tais como os radicais livres e derivados (SCANDALIOS, 2005). O aumento na produção de espécies ativas de oxigênio (EAOs) é observado em resposta a uma variedade de agentes estressantes, sejam eles bióticos ou abióticos. Entre os maiores efeitos da presença de EAOs no ambiente intracelular estão interações com proteínas que levam a oxidação da estrutura dos peptídios e resultam em modificações nas cadeias laterais dos aminoácidos, alterando a estrutura das proteínas. A remoção de proteínas danificadas é necessária para prevenir o acúmulo, o qual pode comprometer o metabolismo celular. O sistema antioxidante é uma defesa celular que confere proteção contra os efeitos adversos da formação de EAOs (MARTINS, 2007). Segundo trabalhos de Mitchell et al. (2001), a atuação do mesotrione, por ele conter os grupamentos nitrogênio e enxofre que são eletronegativos, se dá por estresse oxidativo. Neste estudo mostrou-se que a enzima-alvo do mesotrione em plantas é a HPPD e que na bactéria *Pseudomonas fluorescens* a forma ativa desta enzima possui ferro. Assim como nas plantas, o mesotrione atua inibindo a HPPD, nas bactérias ele pode atuar da mesma forma. Portanto as bactérias que são tolerantes ao mesotrione podem estar demonstrando esta capacidade por mudarem a enzima-alvo deste herbicida. Ainda a alta tolerância pode ser devida a mutações que possam ocorrer no gene que codifica para a HPPD, tornando os microrganismos resistentes ao ataque do mesotrione (RUNDGREN, 1983).

A bactéria *Acinetobacter* sp., que é tolerante ao herbicida apenas na concentração 0,03 mM, apresentou comportamento característico, diminuindo a concentração de proteínas na presença do herbicida, em comparação com uma concentração maior de proteínas no controle. Isto pode explicar a resposta desta linhagem à adaptação somente na menor concentração de mesotrione.

Atividade da enzima catalase em espectrofotômetro e PAGE não desnaturante

A bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* apresentou uma diminuição gradual na atividade da enzima CAT quando submetida respectivamente ao controle e tratamentos 0,03 mM e 15 mM (Fig. 11).

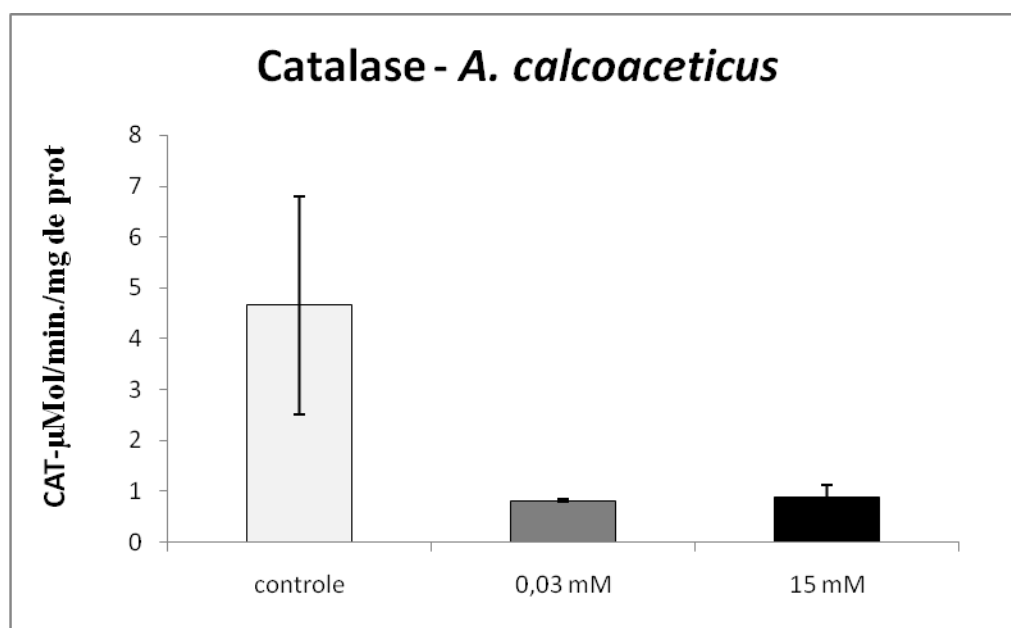


Figura 11: Atividade de CAT em espectrofotômetro, para a bactéria *A. calcoaceticus* submetida a diferentes tratamentos com o herbicida mesotrione

Para esta mesma linhagem, a atividade da CAT em PAGE apresentou quatro isoformas (Fig. 12), sendo que para o controle apresentou três isoformas I, III e IV. Nos tratamentos de 0,03 mM e 15 mM, a bactéria *A. calcoaceticus* apresentou duas isoformas II e III, sendo que uma destas (II) foi característica para a bactéria na presença do herbicida. Pode-se observar também a inibição da isoforma IV e a diminuição da atividade da isoforma I na presença do mesotrione.

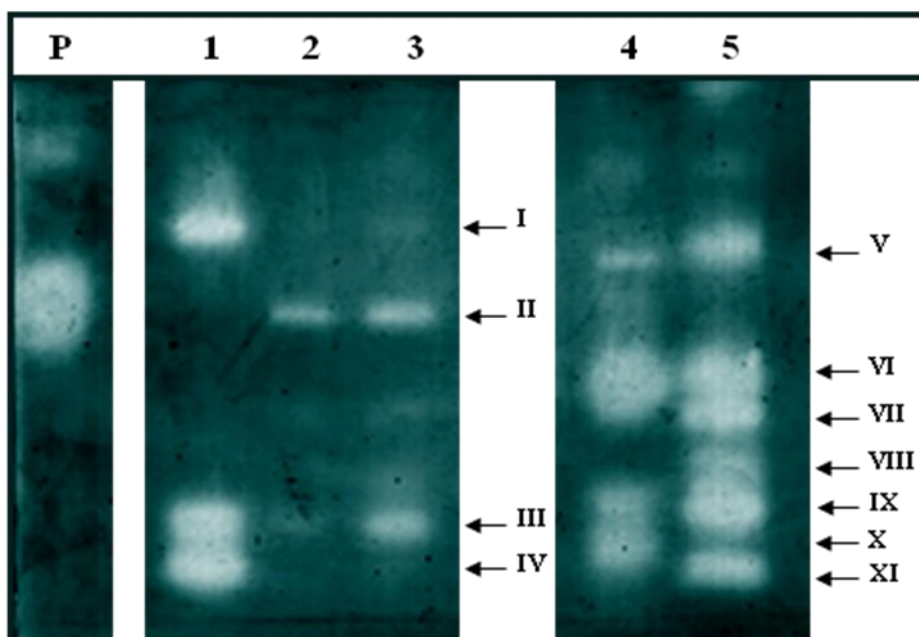


Figura 12: Atividade de CAT em PAGE não desnaturante. (a) P-Padrão de CAT de fígado bovino; 1, 2 e 3 representam a bactéria *A. calcoaceticus* no controle e tratamentos 0,03 mM e 15 mM, respectivamente; (b) 4 e 5 representam a bactéria *Acinetobacter* sp. no controle e tratamento 0,03 mM.

A bactéria *Acinetobacter* sp. apresentou um aumento na atividade da enzima CAT no tratamento 0,03 mM em relação ao controle (Fig.13).

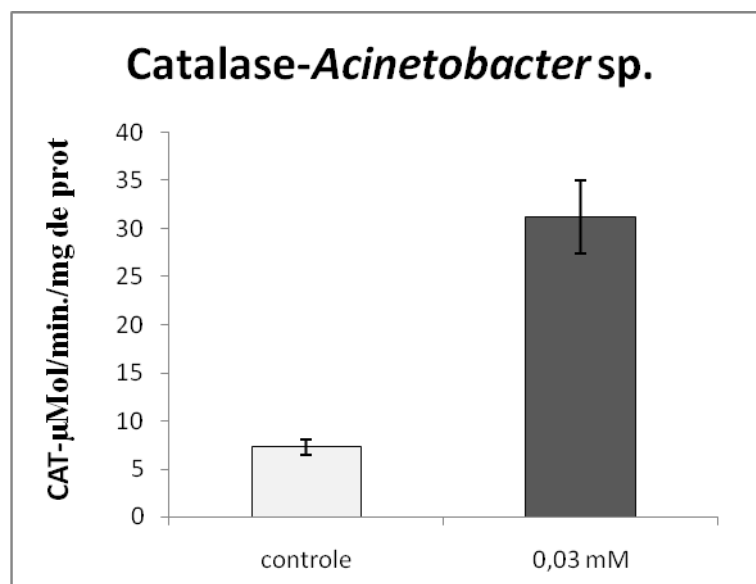


Figura 13. Atividade de CAT em espectrofotômetro, para a bactéria *Acinetobacter* sp. submetida a diferentes tratamentos com o herbicida mesotrione.

O perfil de isoenzimas de CAT no ensaio de atividade em PAGE para esta bactéria apresentou maior variabilidade enzimática, apresentando sete isoformas

(Fig.12). Quatro das isoformas podem ser observadas no tratamento controle: V, VI, IX e X. Quando exposta ao tratamento 0,03 mM, a bactéria *Acinetobacter* sp. apresentou 3 novas isoformas, VII, VIII e XI, sendo que também pode ser observada a inibição da isoforma X.

A enzima CAT está envolvida na proteção de estresse oxidativo causado por H_2O_2 , via proteínas reguladas pelo gene *oxyR*. As catalases bacterianas são classificadas em dois grupos, dependendo de suas propriedades enzimáticas e de homologia entre as sequências de aminoácidos: catalase monofuncionais e catalase-peroxidases (CPs). Ao contrário das catalases monofuncionais que estão presentes em todos os organismos vivos, as CPs têm sido encontradas somente em bactérias e alguns fungos (NADLER et al., 1986).

A atividade da enzima CAT neste estudo foi determinada por espectrofotometria e análise em PAGE não desnaturante. Foi observado na análise de espectrofotometria que ocorreu um comportamento diferencial das linhagens bacterianas entre os tratamentos com o herbicida mesotrione. A bactéria *Acinetobacter* sp. apresentou os maiores valores de atividade de catalase, sendo que para o tratamento com 0,03 mM de mesotrione, sua atividade foi estimulada pelo herbicida.

No controle a bactéria *A. calcoaceticus* apresentou sua atividade máxima, mas nos tratamentos 0,03 mM e 15 mM de mesotrione não houve diferença significativa, porém observou-se queda na atividade, sugerindo que esta enzima seja pouco eficaz no controle antioxidante, nesta linhagem. As respostas das bactérias ao herbicida pode ser caracterizada tanto pela indução de novas isoformas, como pela inibição da atividade de isoformas, antes presentes no controle.

Quanto à análise em PAGE, a bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* apresentou uma nova isoforma (Fig. 12, isoforma II), que pode estar relacionada com a sensibilidade desta linhagem à presença do herbicida mesotrione expressando uma nova isoforma como mecanismo de defesa. No controle apresentou uma isoforma (Fig. 12, isoforma IV), que está ausente nos tratamentos 0,03 mM e 15 mM, sugerindo que nestas concentrações de mesotrione esta isoforma pode estar sendo inibida pelo efeito tóxico causado pelo herbicida, sendo, portanto, pouco eficazes no controle do estresse oxidativo.

A bactéria *Acinetobacter* sp. apresentou sete isoformas, sendo três destas (VII, VIII e XI) específicas para a resposta ao herbicida mesotrione. No controle esta linhagem apresentou quatro isoformas, mas uma delas (figura 12, isoforma X) se mostrou ausente no tratamento 0,03 mM, indicando que esta isoforma não apresenta atividade antioxidativa para combater o estresse causado pelo herbicida.

Atividade de superóxido dismutase (SOD) em PAGE não desnaturante

Os resultados em PAGE da enzima SOD demonstraram variações na atividade da enzima em relação às bactérias e aos tratamentos com mesotrione (Fig. 14).

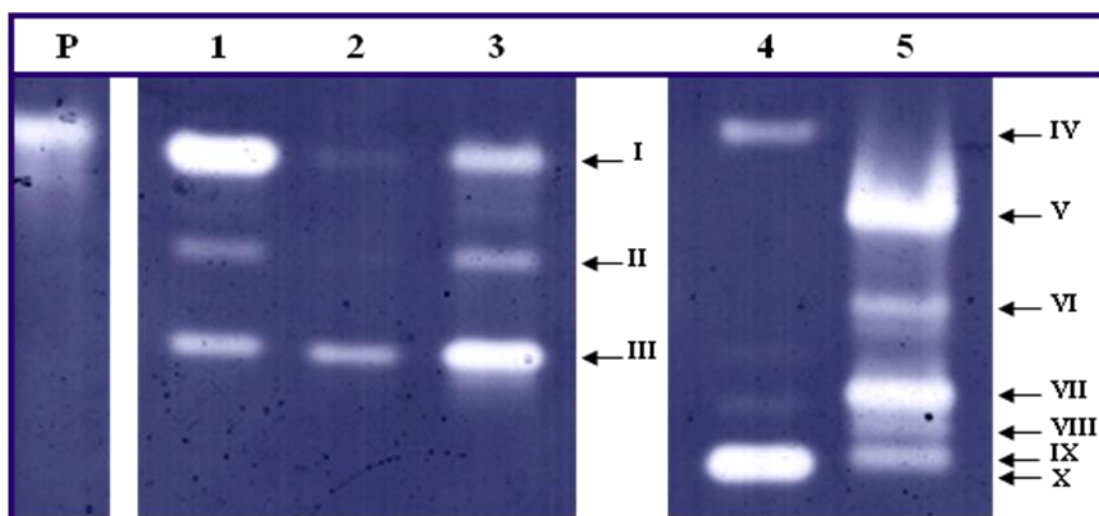


Figura 14: Atividade de SOD em PAGE não desnaturante. (a) P-Padrão de SOD de fígado bovino; 1, 2 e 3 representam a bactéria *A. calcoaceticus* no controle e tratamentos 0,03 mM e 15 mM, respectivamente (b) 4 e 5 representam a bactéria *Acinetobacter* sp. no controle e no tratamento 0,03 mM.

A bactéria *A. calcoaceticus* apresentou três isoformas, sendo que a isoforma I no controle exibiu uma banda com alta atividade enzimática, o que entretanto, não foi observado nos outros tratamentos, uma vez que no tratamento de 15 mM de mesotrione a atividade decresceu, porém não tão significativo como observada para o tratamento de 0,03 mM do herbicida.

A isoenzima II apresentou comportamento semelhante à primeira isoforma, porém a terceira isoforma (III) diferiu quanto à atividade, pois apresentou maior atividade no tratamento com 15 mM de mesotrione.

A bactéria *Acinetobacter* sp. mostrou diferir seu comportamento na presença do herbicida quando comparada com a bactéria *A. calcoaceticus*. Em primeiro lugar, apresentou uma maior quantidade de isoformas, totalizando sete; em segundo lugar, mostrou que três delas foram observadas apenas no tratamento 0,03 mM. As isoformas V, VI e VIII foram características do meio com herbicida, podendo ser utilizado como marcadores ambientais para a presença ou mesmo biotransformação do herbicida.

As SODs são enzimas que contêm metais ligados a sua estrutura e catalisam a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , regulando assim os níveis de oxigênio *singlet* e H_2O_2 , são substratos da reação que origina os radicais ($OH^\cdot$), representando por isso, um papel central no mecanismo de defesa antioxidante (CARVALHO, 2007).

No presente estudo, as bactérias sofreram alterações significativas com relação à atividade de SOD na presença do herbicida mesotrione. Com relação à bactéria *Acinetobacter calcoaceticus*, a isoforma C mostrou ser a mais eficaz para o controle do estresse gerado pelo mesotrione.

Na linhagem *Acinetobacter* sp. a atividade de SOD mostrou-se significativamente alterada para o tratamento 0,03 mM. As isoformas V e VII tiveram grande atividade no tratamento 0,03 mM, mostrando serem mais significativas no combate ao estresse.

Atividade de glutathione redutase (GR) em PAGE não-desnaturante

Na análise de atividade em PAGE, a bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* apresentou um total de cinco isoformas (Fig. 15).

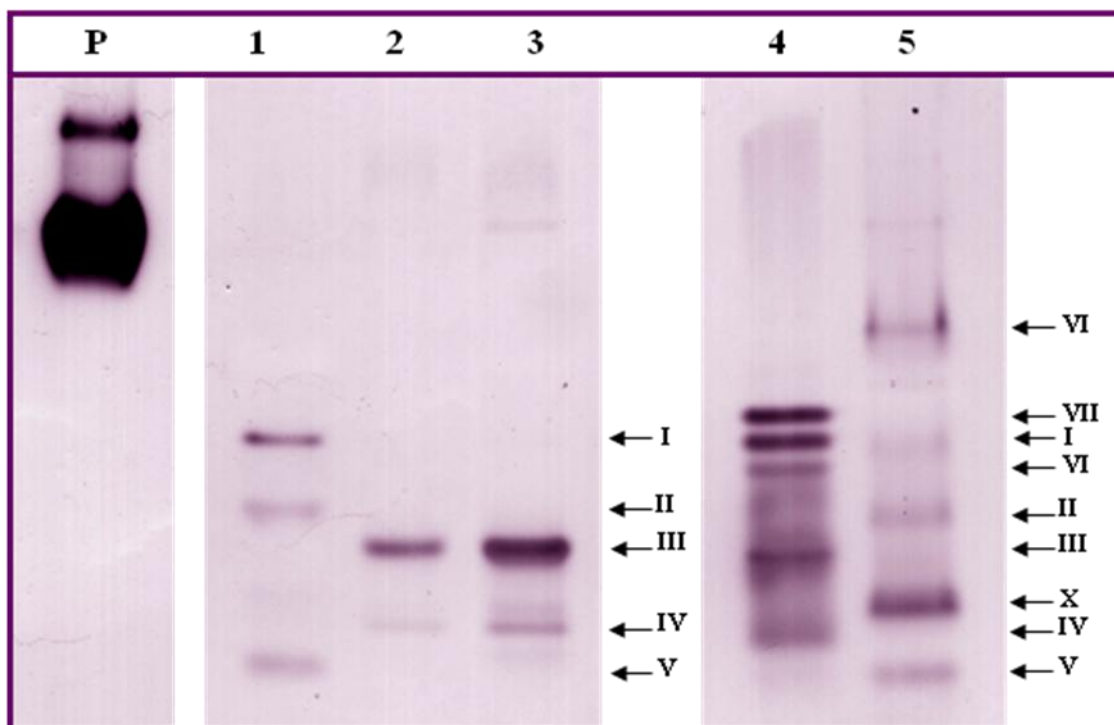


Figura 15: Atividade de GR em PAGE não desnaturante. (a) P-Padrão de GR; 1, 2 e 3 representam a bactéria *A. calcoaceticus* no controle e nos tratamentos 0,03 mM e 15 mM respectivamente; (b) 4 e 5 representam a bactéria *Acinetobacter* sp. no controle e no tratamento 0,03 mM.

Para o controle, apresentou três isoformas, I, II e V, entretanto, não mostrou atividade nos tratamentos 0,03 mM e 15 mM de mesotrione, consequentemente, sua atividade pode ter sido inibida pela presença do herbicida. Para os tratamentos de 0,03 mM e 15mM de mesotrione apenas duas isoformas apresentaram atividade, a isoforma III e isoforma IV; ambas apresentaram um aumento de atividade com o aumento da concentração do herbicida, mas a isoforma III apresentou maior intensidade de bandas, consequentemente, maior atividade em relação à isoforma IV, sugerindo que a isoforma III pode ter maior eficiência na proteção contra o estresse oxidativo causado pelo herbicida.

Na linhagem *Acinetobacter* sp. foram encontradas nove isoformas (Fig. 15). Para o controle foram encontradas cinco isoformas: VII, I, VI, III e IV, e para o tratamento 0,03 mM as isoformas VI, I, II, X e V; a isoforma I está presente nas duas condições, sendo as demais, isoformas novas, que apresentaram atividade apenas na presença do herbicida. Em destaque, a isoforma X foi a que apresentou maior atividade, consequentemente de maior capacidade antioxidativa.

A glutathiona é uma das moléculas mais abundantes entre os tióis em bactérias, a qual tem como função a proteção celular contra a ação de baixo pH, compostos clorados e estresse osmótico e oxidativo. Uma resposta adaptativa a estresse oxidativo ocorre na ativação de OxyR que induz à expressão de numerosos genes, inclusive o da enzima GR. A enzima GR é uma oxiredutase envolvida na proteção de estruturas e biomoléculas celulares contra os danos oxidativos, mantendo equilibrados os níveis de GSH e GSSG, glutathiona reduzida e oxidada respectivamente, utilizando como fonte redutora o NADPH (CARVALHO, 2007).

A glutathiona, além de participar de processos de desintoxicação celular de moléculas reativas formadas pelo processo oxidativo, está envolvida também na desativação de substâncias tóxicas. A GSH pode reagir com uma variedade de componentes eletrofílicos para a produção de conjugados de GSH. A reação de conjugação pode ser espontânea ou ser catalizada pela enzima GST (SMIRNOVA; OKITABRSBY, 2005). Nestes tratamentos realizados com as duas linhagens, observou-se que houve alteração na atividade das enzimas e o aparecimento ou não de novas isoformas na presença do mesotrione. Estas diferenças observadas nas enzimas antioxidantes são adaptações evolutivas destas linhagens às condições adversas do meio, no caso a presença do herbicida mesotrione.

Análise por espectrofotometria da capacidade de degradação ou resistência/tolerância das linhagens bacterianas

A capacidade de degradação ou resistência/tolerância das duas linhagens bacterianas foi avaliada por espectrofotometria das amostras, observando-se a evolução do pico de absorção do mesotrione durante o período de incubação (Fig.16).

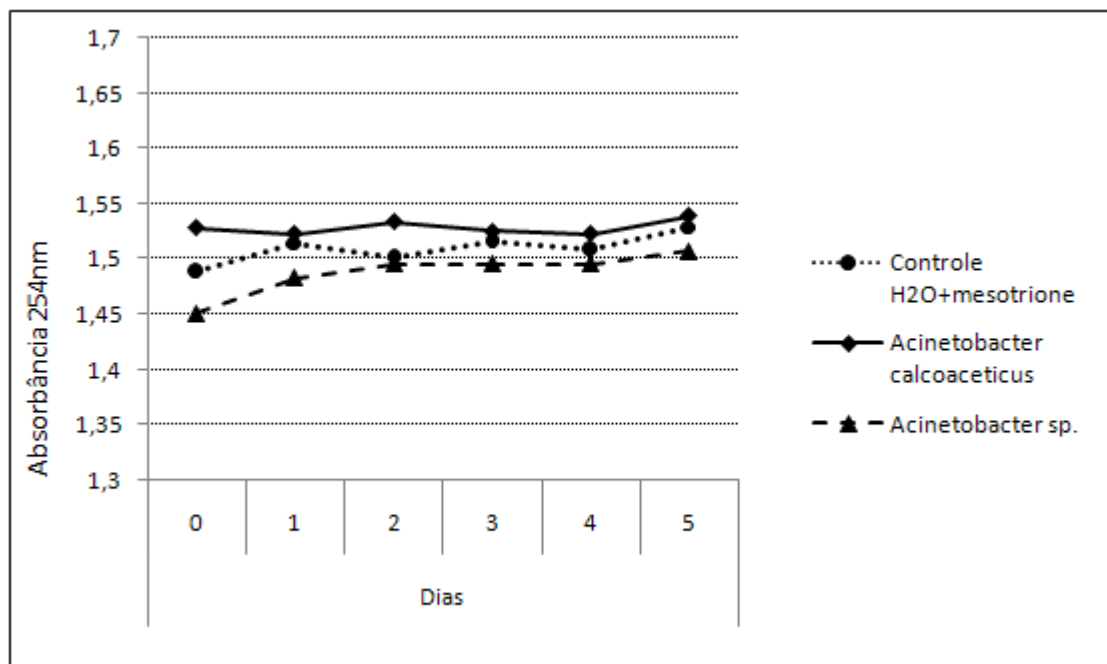


Figura 16: Análise da capacidade de degradação e/ou tolerância das linhagens *A. calcoaceticus* e *Acinetobacter sp.* por espectrofotometria

A análise em espectrofotometria mostrou que a média do controle variou de 1,48 a 1,52 nm de absorbância, já a linhagem *A. calcoaceticus* apresentou valores de 1,52 a 1,53 nm, e a linhagem *Acinetobacter sp.* mostrou uma variação de 1,45 a 1,50 nm de absorbância, todas com desvio padrão igual a 1. Com relação às amostras da linhagem *A. calcoaceticus*, podemos afirmar que esta, apesar de ser uma bactéria resistente ao tratamento de 15 mM de mesotrione, não apresentou um declínio nas concentrações do herbicida, pelo contrário, apresentou valores médios de absorbâncias maiores que o controle de 2,7 a 0,65% a mais. Isso sugere que ela não está utilizando o herbicida como fonte de carbono, ou se está, os seus produtos de degradação podem apresentar o mesmo comprimento de onda do herbicida, interferindo na leitura das amostras.

As amostras da linhagem *Acinetobacter sp.* tolerante apenas ao tratamento 0,03 mM de mesotrione mostraram que esta apresentou valores médios de absorbância variando de 2 a 1,3% a menos em relação ao controle. Mesmo apresentando valores mais baixos, a degradação não foi constatada, pois não ocorreu uma diferença significativa da área de pico da amostra em relação ao seu controle.

Portanto, na análise por espectrofotometria, nenhuma das linhagens apresentou diminuição no pico de absorção quando em comparação com o controle.

Como esta técnica fornece uma análise qualitativa, esses dados podem indicar que as duas linhagens não estão degradando o herbicida, *Acinetobacter calcoaceticus* resistente e *Acinetobacter* sp. tolerante à presença deste.

O trabalho de Mitchell et al. (2001) mostra que a ação do mesotrione é por estresse oxidativo. Neste estudo, observa-se que na presença do mesotrione as linhagens aumentaram a atividade das enzimas antioxidativas e expressaram novas isoformas, consequentemente estas bactérias estão mudando a rota de degradação para tolerância com a finalidade de se proteger do efeito oxidativo gerado pelo herbicida.

Medição do tamanho das células das linhagens bacterianas resistente e tolerante

A linhagem *A. calcoaceticus* apresentou tamanho médio de 0,94 μm no controle, 0,49 μm no tratamento 0,03 mM de mesotrione e 0,42 μm no tratamento 15 mM de mesotrione (Fig. 17).

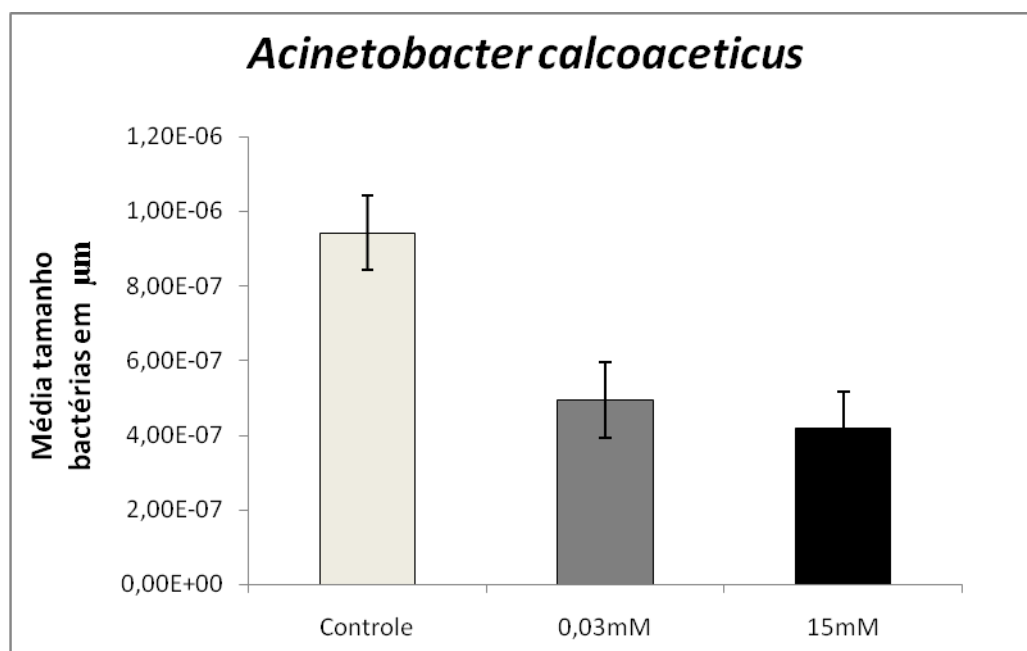


Figura 17: Avaliação do tamanho celular da linhagem *A. calcoaceticus* submetida ao controle, e aos tratamentos 0,03 mM e 15 mM de mesotrione

Esta linhagem apresentou uma diminuição de 47,88% de tamanho do controle para o tratamento 0,03 mM de mesotrione e de 55,32% do controle para o tratamento 15 mM de mesotrione, mostrando mudanças não só no tamanho, como também na forma e comportamento. No controle, as células apresentam forma de bacilo e estão distribuídas uniformemente na lâmina, já nos tratamentos 0,03 mM e 15 mM apresentam forma de coco, distribuídas aleatoriamente e em grupos.

A bactéria *Acinetobacter* sp. apresentou tamanho médio de 0,57 μm no controle e 0,42 μm no tratamento 0,03 mM de mesotrione (Fig. 18).

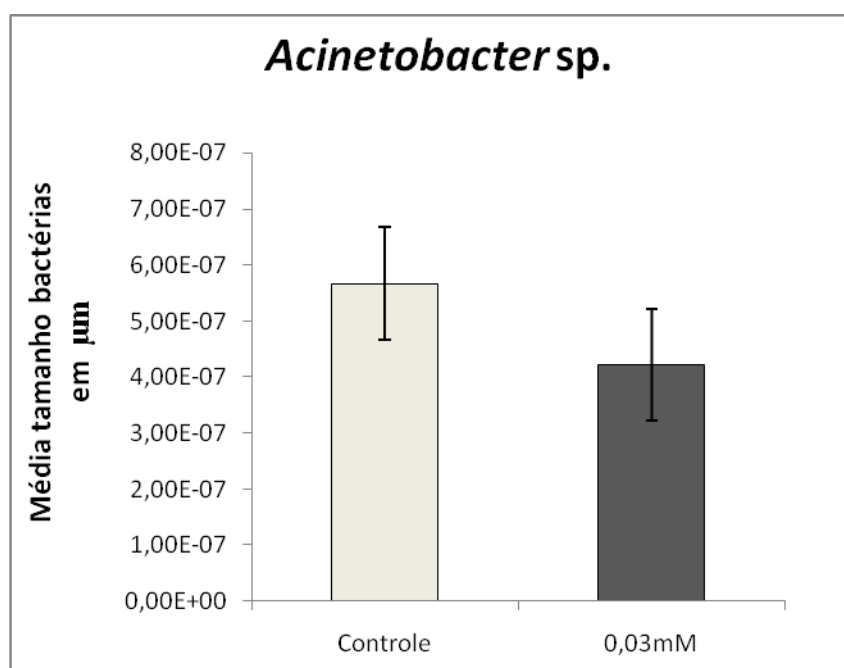


Figura 18: Avaliação do tamanho celular da linhagem *Acinetobacter* sp. submetida ao controle, e ao tratamento 0,03 mM de mesotrione

Esta linhagem apresentou uma diminuição de 26,31% no tamanho, também apresentando mudanças, na forma e comportamento quando foi submetida ao tratamento com o herbicida. No controle apresenta forma de bacilo e está distribuída de maneira uniforme na lâmina, já no tratamento 0,03 mM se encontra na forma de cocobacilo, distribuída aleatoriamente na lâmina e em grupos.

James et al. (1994) comprovaram através de estudos com a bactéria *Acinetobacter* sp. realizado por slide de fluxo contínuo, microscopia de contraste de fase, microscopia eletrônica de varredura a laser confocal e análise de imagem por

computador que quando a linhagem está sendo submetida a dieta de alta quantidade de nutrientes, ela apresenta forma bacilar e um número menor de indivíduos, mas quando submetida ao regime de baixa de nutrientes, apresentou forma cocóide o número de indivíduos aumentou. Analisando estes resultados pode-se sugerir que o herbicida mesotrione causa alterações fisiológicas e morfológicas, resultando em estresse oxidativo, isso sugere, que quando as linhagens *A. calcoaceticus* e *Acinetobacter* sp. estão expostas à ação do herbicida ocorre uma redução do tamanho das células refletindo uma resposta de sobrevivência, aumentando o número de indivíduos e conservando a biomassa. A redução do tamanho das células pode ter importância industrial, melhorando a penetração de inoculantes bacterianos para a biorremediação *in situ*. Quando as linhagens estão submetidas aos tratamentos com o herbicida, à formação de microcolônias, ao contrário do controle que apresenta uma migração uniforme na lâmina.

MacLeod et al. (1988) relata os efeitos da fome sobre a penetração bacteriana através de núcleos de rochas artificiais pela bactéria *Klebsiella pneumoniae*, cultivada previamente em uma solução de sais simples durante quatro semanas. As bactérias em regime de fome foram capazes de penetrar mais profundamente os núcleos. Isso ocorreu devido ao menor tamanho das células e a redução da produção de biofilme.

A espectrofotometria não acusou degradação do mesotrione por estas linhagens, conseqüentemente, elas não devem utilizar este herbicida como fonte de carbono. Como elas sempre foram cultivadas em meio mineral com mesotrione como única fonte de carbono, poderiam estar passando por um estado de fome que resultou na alteração da morfologia. Por meio desta análise foi constatado que as linhagens *A. calcoaceticus* e *Acinetobacter* sp. não estão utilizando o mesotrione como fonte de carbono, mas possivelmente possuem a enzima alvo do herbicida mesotrione alterada, utilizando então uma rota de tolerância menos dispendiosa energeticamente.

A estratégia destas bactérias de tolerarem e não degradarem o mesotrione pode levar a um aumento na concentração do herbicida no solo e águas subterrâneas, podendo se associar com outras substâncias e compostos orgânicos, aumentando o impacto no meio ambiente. Portanto estudos mais aprofundados das

estratégias evolutivas da microbiota local deverão ser conduzidos para analisar o comportamento destes microrganismos na presença do mesotrione.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento e Científico e Tecnológico), pela FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) e SETI (Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- 1- As linhagens *A. calcoaceticus* e *Acinetobacter* sp. não apresentaram a capacidade de biodegradar ou biotransformar o herbicida mesotrione, sendo tolerantes ao mesmo; *A. calcoaceticus* foi tolerante ao mesotrione nas concentrações 0,03 mM e 15 mM e *Acinetobacter* sp. na concentração 0,03 mM.
- 2- As duas linhagens apresentaram uma diminuição na concentração de proteínas quando submetidas ao tratamento 0,03 mM de mesotrione.
- 3- A linhagem *A. calcoaceticus* apresentou baixa atividade enzimática quando comparada com *Acinetobacter* sp. devido a primeira ter uma capacidade de resistência maior ao herbicida do que a segunda.
- 4- *Acinetobacter* sp. apresentou maior atividade enzimática, resultado da alteração de processos fisiológicos, provavelmente por ser uma linhagem pouco tolerante ao mesotrione.
- 5- Quando as linhagens *A. calcoaceticus* e *Acinetobacter* sp. foram submetidas aos tratamentos com o herbicida, apresentaram mudanças na forma, tamanho e comportamento para garantir a sobrevivência da espécie.
- 6- Dados de medição das células das linhagens *A. calcoaceticus* e *Acinetobacter* sp. corroboram nossa hipótese de que estas não estão utilizando o mesotrione como fonte de carbono, mas possivelmente possuem a enzima alvo do herbicida mesotrione alterada, utilizando então uma rota de tolerância menos dispendiosa energeticamente.
- 7- A estratégia proposta nesse trabalho sobre resistência/tolerância e adaptação específica ao estresse oxidativo gerado pelo mesotrione pode ter como conseqüências o aumento do herbicida, não degradado por microbiotas com estes tipos de adaptações, no solo e águas subterrâneas, e assim aumentando o impacto ao meio ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFERNES, 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, Richmond-California, v. 50, p. 3926-3934, Jun 2002.

ALMEIDA, A. L. O.; CÂMARA NETO, A. F.; GOMENSORO, S.; **Biotechnologia e agricultura, perspectivas para o caso brasileiro**, 1. ed. Petrópolis: Vozes, 1984. p. 15-39.

AMARANTE JÚNIOR, O. P.; BRITO, N. M.; SANTOS, T. C. R.; NUNES, G. S.; RIBEIRO, M. L.; **Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its major transformation product in soil samples by liquid chromatographic analysis.** Talanta, São Luiz-MA, v. 60, p. 115-121, Jan 2003.

AZEVEDO, R. A. ALAS, R. M. SMITH, R. J. LEA, P. J. **Response of antioxidant to transfer from elevated carbon dioxide 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, May.1998.

BATISSON, I.; PESCE, S.; BESSE-HOGGAN, P.; SANCELME, M.; BOHATIER, J.; **Isolation and characterization of diuron-degradin bacteria from lotic surface water.** Microbial Ecology, Aubière, v. 54, p. 761-770, Apr 2007.

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, Aubière Cedex, p. 1-7, Jan-2009.

BEUCHAMP, C.; FRIDOVIC, I.; **Superoxide dismutase – Improved assays and assay applicable to acrylamide gels.** Analytical Biochemistry, New York, v. 44, p. 276, Nov. 1971.

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, New York, v. 72, p. 248-259, Jan. 1976.

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

CARVALHO, G.; **Estudo da resposta antioxidativa de linhagens bacterianas na presença do herbicida Acetochlor.** Piracicaba, 2007. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

CASTELLANI, A. **Viability of some pathogenic fungi in distilled water.** Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 42, p. 225-226, 1939.

CHIACCHIERINI, E., RESTUCCIA, D., VINCI, G., **Bioremediation of food industry effluents: recent applications of free and immobilised polyphenoloxidases;** Food Science and Technology International, pg. 374-381, 2004.

CORNES, D. Callisto: A very successful maize herbicide inspired by allelochemistry. Fourth World Congress on Allelopathy, Wagga Wagga, 2005. Disponível em: http://www.regional.org.au/au/allelopathy/2005/2/7/2636_cornesd.htm#TopOfPage. Acesso: 19 maio 2009.

CULLINGTON, J. E.; WALKER, A.; **Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium.** Soil Biology & Biochemistry, Warwick, v. 31, p. 677-686, 1999.

DURAND, S.; LÉGERET, B.; MARTIN, A. S.; SANCELME, M.; DELORT, A. M.; BESSE-HOGGAN, P.; COMBOURIEU, B.; **Biotransformation of the triketone herbicide mesotrione by a Bacillus strain. Metabolite profiling using liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry.** Rapid Communications in Mass Spectrometry, Aubie`re Cedex, v. 20, p. 2603-2613, June 2006.

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

EMBRAPA 2009. < <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/index.htm>> Disponível em: 26 mar.2009 acessado em 16/02/2009.

FANCELLI, A. L.; DOURADO-NETO, D.; **Produção de milho.** Guaíba: Agropecuária, 2000. 360p.

FELIX, J., DOOHAN D. J.; BRUINS D., **Differential vegetable crop responses to mesotrione soil residues a year after application.** Crop Protection, Madison-USA, v. 26, p. 1395-1403, Nov 2006.

GANEY, P. E., BOYD, S. A., **An approach to evaluation of the effect of bioremediation on biological activity of environmental contaminants: Dechlorination of polychlorinated biphenyls;** Environmental Health Perspectives, v.113, n.2, pg. 180-185, 2005.

GOMES JR, R.A. GRATÃO, P. L.; GAZIOLA, S. A.; MAZZAFERA, P. LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A.;. **Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures.** Functional Plant Biology, Victoria, v. 39, p. 449-456, May. 2007.

HILLAR, A.; CAESELEE, L. V.; LOEWEN, P. C.; **Intracellular location of catalase-peroxidase hydroperoxidase I of Escherichia coli.** FEMS Microbiol Letters, Amsterdam, v. 170, p. 307-312, Jan. 1999.

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

IBGE 2009. < <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/> acessado em 10/12/2008.

JAMES, G. A.; KORBER, D. R.; CALDWELL, D. E.; COSTERTON, J.W.; **Digital image analysis of growth and starvation responses of a surface-colonizing *Acinetobacter* sp.** Journal of Bacteriology, Bozeman, v. 177, p. 907-915, Nov. 1994

JONGBLOED, R. H., HULSKOTTE, J. H., KEMPENAAR, C., **Contribution of agricultural and non-agricultural use of pesticides to the environmental impact on aquatic life in regional surface water systems;** Water Science and Technology, v.49, 2004.

KEITH, K. E., VALVANO, M. A., **Characterization of SodC, a periplasmic superoxide dismutase from *Burkholderia cenocepacia*.** Infection and Immunity, Bethesda, v. 75, p. 2451-2460, May. 2007.

KESAVAN, P. C., SWAMINATHAN, M. S., **Strategies and models for agricultural sustainability in developing Asian countries.** Philosophical Transactions of the Royal Society, Taramani, v. 363, p. 877–891, August, 2007.

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

KONSTANTINOOU, I. K.; HELA, D. G.; TRIANTAFYLLOS, A. A.; **The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels.** Environmental Pollution, London, v. 141, p. 555-570, Jun. 2006.

KRAUS, T. E., EVANS, R. C., FLETCHER, R. A., PAUL, S. K. P.; **Paclobutrazol enhances tolerances to increased levels of UV-B radiation in soybean (*Glycine max*) seedlings.** Canadian Journal Botany, Ottawa, v. 73, p. 797-806, Jun. 1995.

LEE, D.H.; LEE, C.B. **Chiling stress induced changes of antioxidants enzymes in the leaves os cucumber. In gel enzyme activity assays.** Plant Science, Limerik, v.159, p. 75-85, Oct. 2000.

LI, Z.; SHAO, T.; MIN, H.; LU, Z.; XU, X.; **Stress response of *Burkholderia cepacia* WZ1 exposed to quinclorac and the biodegradation of quinclorac.** Soil Biology & Biochemistry, Hangzhou, v. 41, p. 984-990, Nov 2008.

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

LYNCH, J.M., MOFFAT, A.J., **Bioremediation-prospects for the future application of innovative applied biological research;** Annals of Applied Biology, v. 146, pg. 217-221, 2005.

MACLEOD, F. A.; LAPPIN-SCOTT, H. M., COSTERTON, J. W.; **Plugging of a model rock system by using starved bacteria.** Applied and Environmental Microbiology, v. 54, p. 1365-1372, Jun. 1988

MARTIN NETO, L.; VAZ, C. M. P.; CRESTANA, S.; **Instrumentação avançada em ciência do solo.** 1. ed. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2007, 438p.

MARTINS, P. F.; **Análise da resposta antioxidativa bacteriana ao herbicida s-metolachlor.** Piracicaba, 2007. Dissertação, (Mestrado em Agronomia)-Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

MASIP, L.; VEERAVALLI, K.; GEORGIU, G. **The many faces of glutathione in bacteria.** Antioxidants & Redox signaling, New Rochelle, v. 8, p. 753-762, May-Jun. 2006.

MATÉS, J. M.; **Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology.** Toxicology, Limerick, v. 153, p. 83-104, Nov. 2000.

MAZZUCO, K. T. M.; **Uso da *Canavalia ensiformis* como Fitorremediador de Solos Contaminados por Chumbo.** Florianópolis, 2008. Tese (Engenharia Química) – departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

MCCURDY, J.D.; MCELROY, J. S.; KOPSELL, D.A.; SAMS, C. E.; SOROCHAN, J.C.; **Effects of mesotrione on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) carotenoid concentrations under varying environmental conditions.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 56, p. 9133-9139, Sept 2008.

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 v. 57, pg. 120-128, 2001.

MOREIRA, R. J.; **Agricultura familiar, processos sociais e competitividade,** 1.ed. Rio de Janeiro: Mauad, 1999. p. 11-64 .

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; **Microbiologia e bioquímica do solo.** 1. ed. Lavras: UFLA, 2002, 626p.

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

NAKAGAWA, L. E., ANDRÉA, M.M. **Degradação e formação de resíduos não-extraíveis ou ligados do herbicida atrazina em solo.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v.35, n.8, p.1509-1515, Aug. 2000.

NICOLAI, M.; **Desempenho da cultura de milho (*Zea mays* L.) submetida a aplicação de herbicidas pós-emergentes, em diferentes situações de manejo.** Piracicaba, 2004. Dissertação, (Mestrado em Fitotecnia) -Departamento de Produção Vegetal, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

NOCTOR, G.; GOMEZ, L.; VANACKER, H.; FOYER, C. H.; **Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling.** Journal of Experimental Botany, Oxford, v. 53, p. 1283-1304, May. 2002

PAASSARDI, F.; ZAMOCKY, M.; FAVET, J.; JAKOPITSCH, C.; PENEL, C.; OBINGER, C.; DUNAND, C.; **Phylogenetic distribution of catalase-peroxidases: Are there patches of order in chaos?** Gene, Amsterdam, v. 397, p. 101-113, Aug. 2007.

PORCHER, E.; TENAILLON, O.; GODELLE, B.; **From metabolism to polymorphism in bacterial populations: A theoretical study evolution.** Orsay cedex, France, v. 55, p. 2181-2193, 2001.

PRETTY, J. N., **Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence.** Philosophical Transactions of the Royal Society, Colchester, v. 363, p. 447-465, July. 2007.

PROCÓPIO, S.O.; SANTOS, J. B.; SILVA, A. A.; PIRES, F. R.; RIBEIRO JÚNIOR, J. I.; SANTOS, E. A.; FERREIRA, L. R., **Plant selection with potential for phytoremediation of soils contaminated with trifloxysulfuron sodium.** Planta Daninha, Viçosa-MG, v.22, n.2, p.315-322, 2004.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S., **Guia de herbicidas.** 5. ed. Londrina: B. N. Rodrigues, 2005. 592 p.

ROZEN, D. E.; LENSKI, R. E.; **Long term experimental evolution in *Escherichia coli*. VIII. Dynamics of a balanced polymorphism.** Nature, Am., v. 155, p. 24-35, 2000.

RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; **Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil.** Revista Brasil. Bot., São Paulo, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

RUNDGREN M. **Some kinetic properties of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain PJ 874.** European Journal of Biochemistry. v. 133, p. 657 – 663, 1983.

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

SILVA, T. M.; STETS, M. I.; MAZZETTO, A. M.; ANDRADE, F. D.; PILEGGI, S. A. V.; FÁVERO, P. R.; CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; CARNEIRO, P. I. B.; PILEGGI, M., **Degradation of 2,4-D herbicide by microorganisms isolated from Brazilian contaminated soil.** Brazilian Journal of Microbiology, Ponta Grossa-PR, v. 38, p. 522-525, Jul 2007.

SMIRNOVA, G. V.; OKITABRSBY, O. N.; **Glutathione in bacteria.** Biochemistry, New York, v. 70, p.1459-1473, Nov. 2005.

SPAIN, J. C., **Biodegradation of nitroaromatic compounds.** Annual Review of Microbiology 49, 523–555, 1995.

SYLVIA, D. M., HARTEL, P. G., FUHRMANN, J. J., ZUBERER, D. A.; **Principles and Applications of Soil Microbiology.** 2. ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2005, 640p.

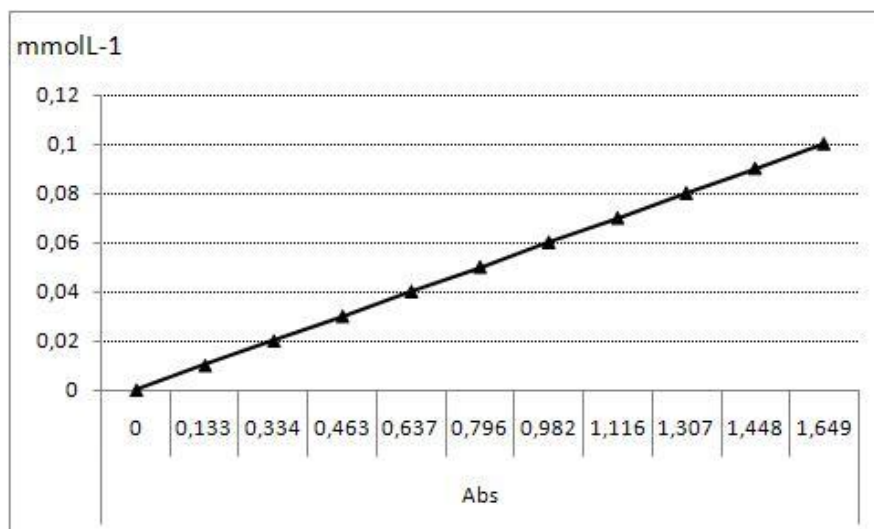
SYNGENTA. Disponível em: <http://www.syngenta.com.br/website/produtos-e-marcas/protecao-de-cultivos/produtos/produto/especificacoes-tecnicas.aspx?IdProduto=2244>. Acesso em: 5 abr. 2008.

TOMAZ, R. M. A. G., **Avaliação de fungos com potencial de degradação de diuron e pyriithobac-sodium.** Campinas, 2003. Tese de Doutorado, (Doutorado em Processos Químicos) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade de Campinas.

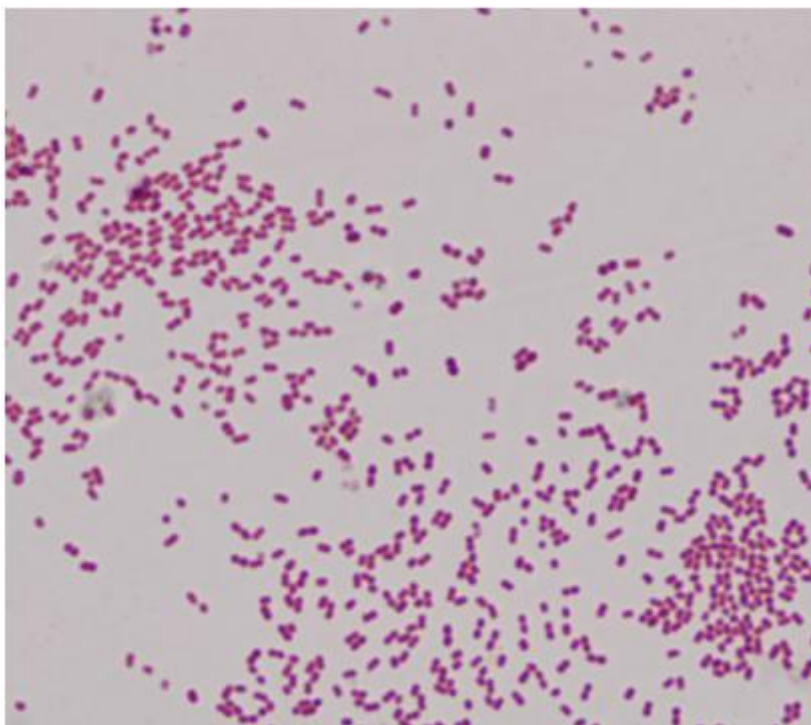
UETA, J., PEREIRA, N. L., SHUUANA, I. K., CERDEIRA, A. L. **Biodegradação de herbicidas e biorremediação: microrganismos degradadores do herbicida atrazina.**[online]Disponívelem:<http://www.biotecnologia.com.br/bio/10_i.html> Acesso em: 06 junho 2007.

WEIRICH NETO, P. H.; **Importância de atributos agronômicos para qualificação da semeadura do milho (*Zea mays* L.) no sistema plantio direto na região dos Campos Gerais – PR.** Campinas, 2004. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004

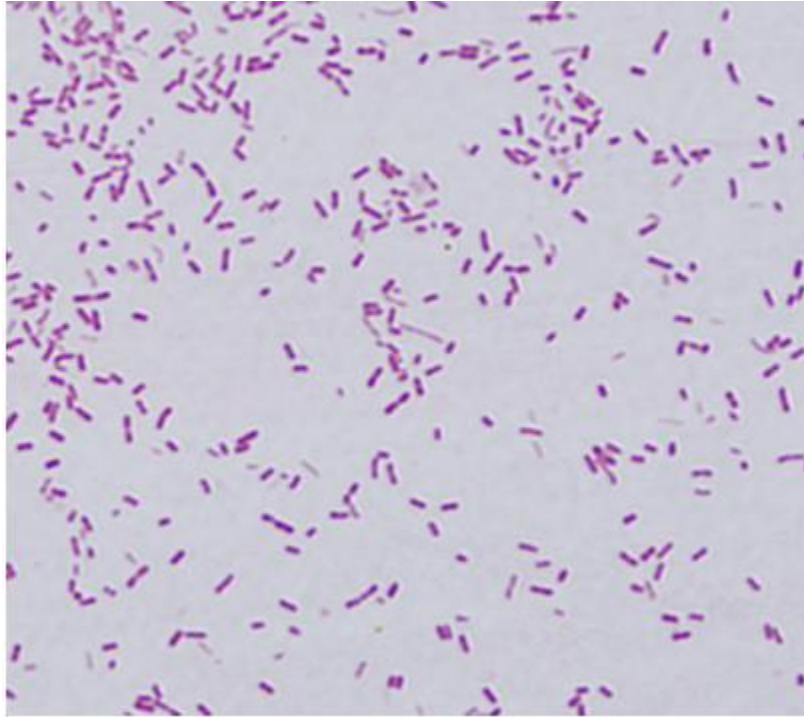
ANEXOS

ANEXO A - Curva de calibração do herbicida mesotrione, em mmol.L⁻¹

ANEXO B - Identificação das linhagens bacterianas pelo Método de Coloração de Gram.

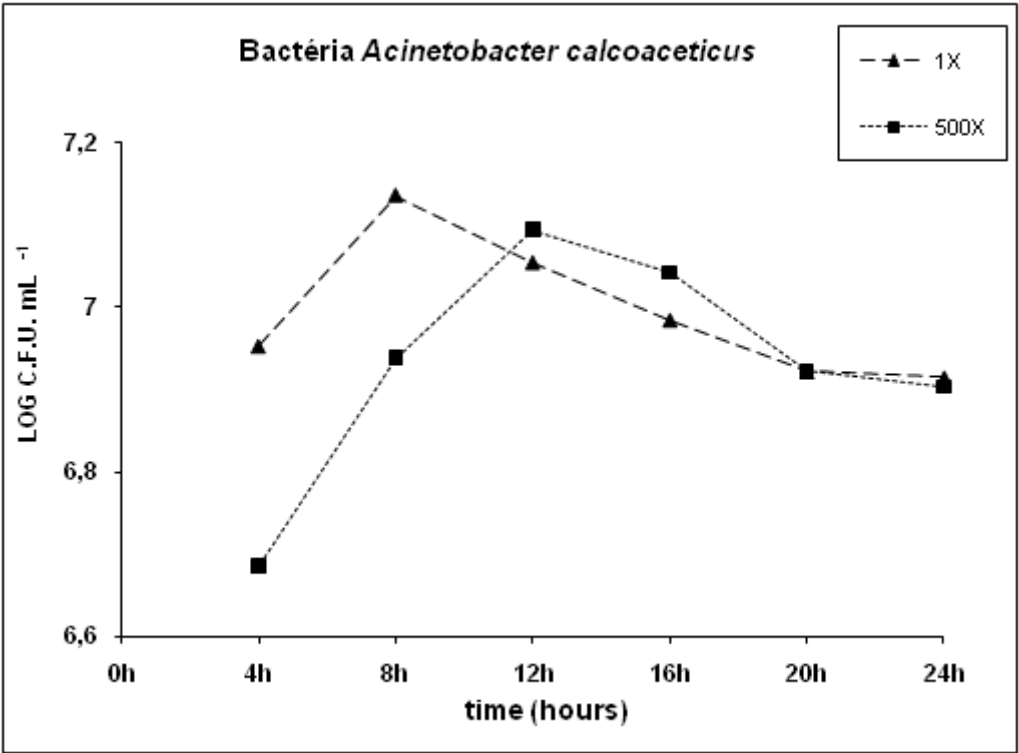
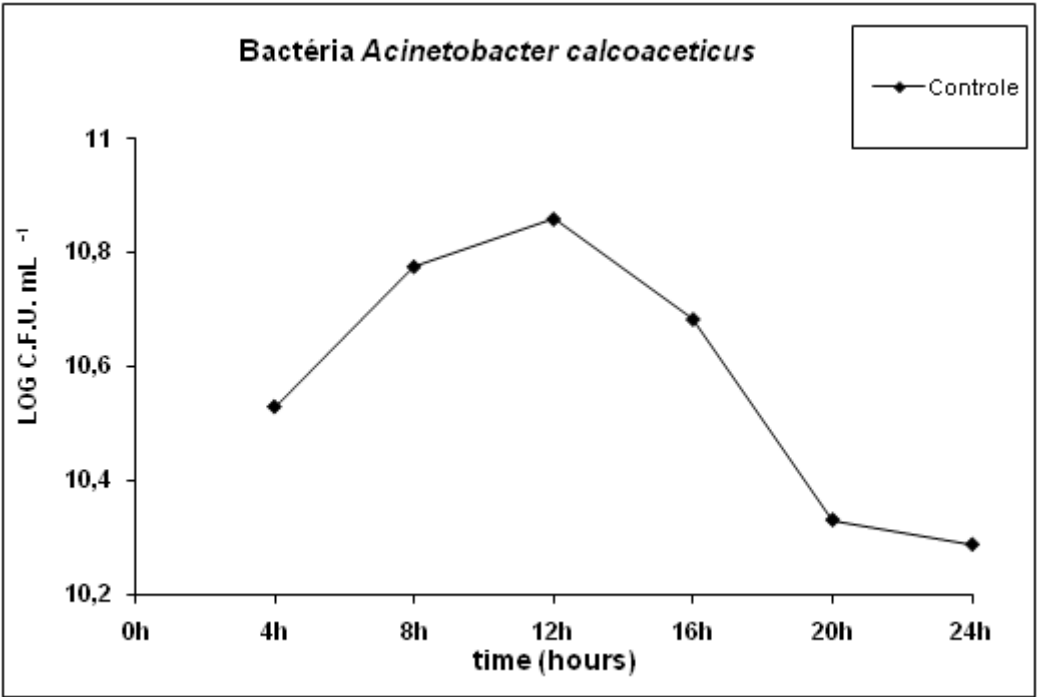


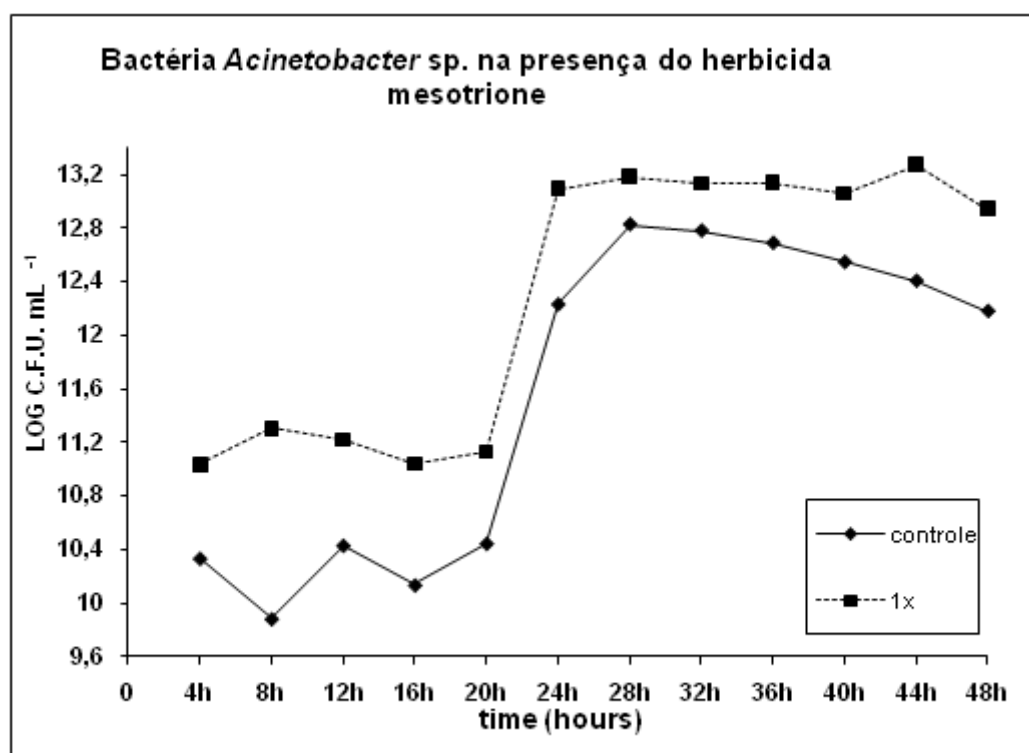
Acinetobacter calcoaceticus



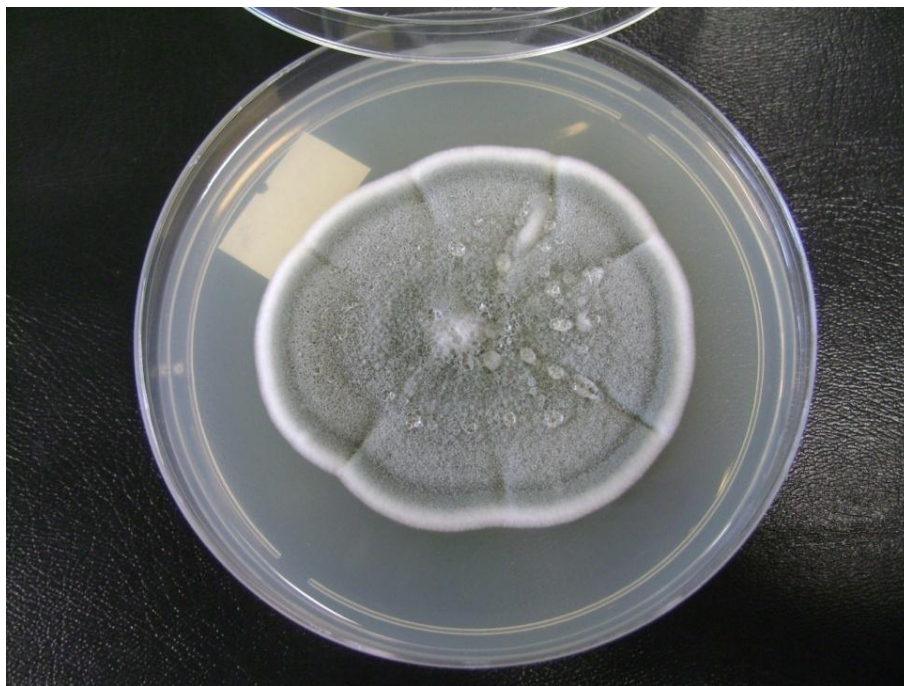
Acinetobacter sp.

ANEXO C – Curva de crescimento das linhagens bacterianas

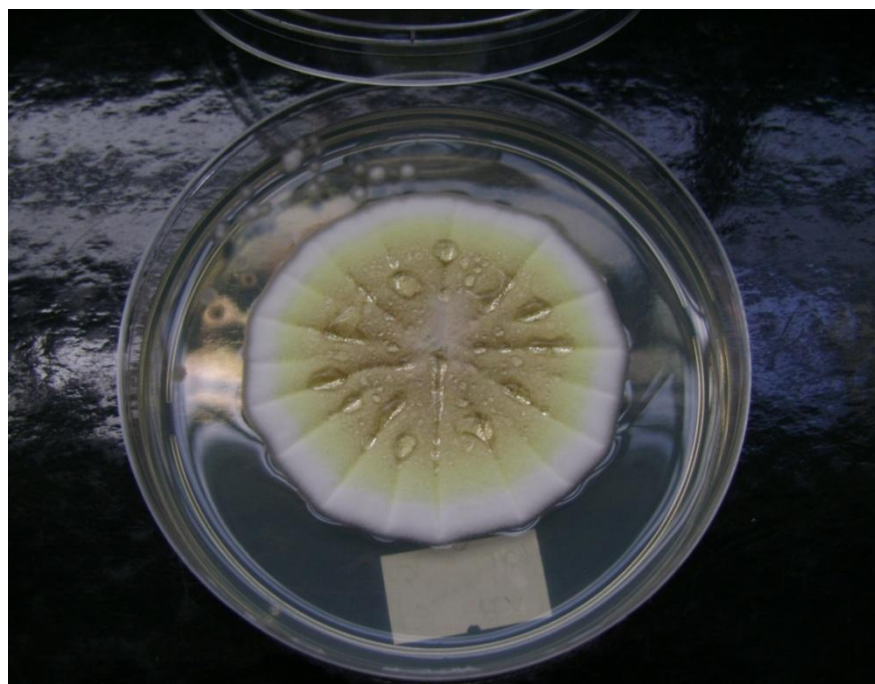




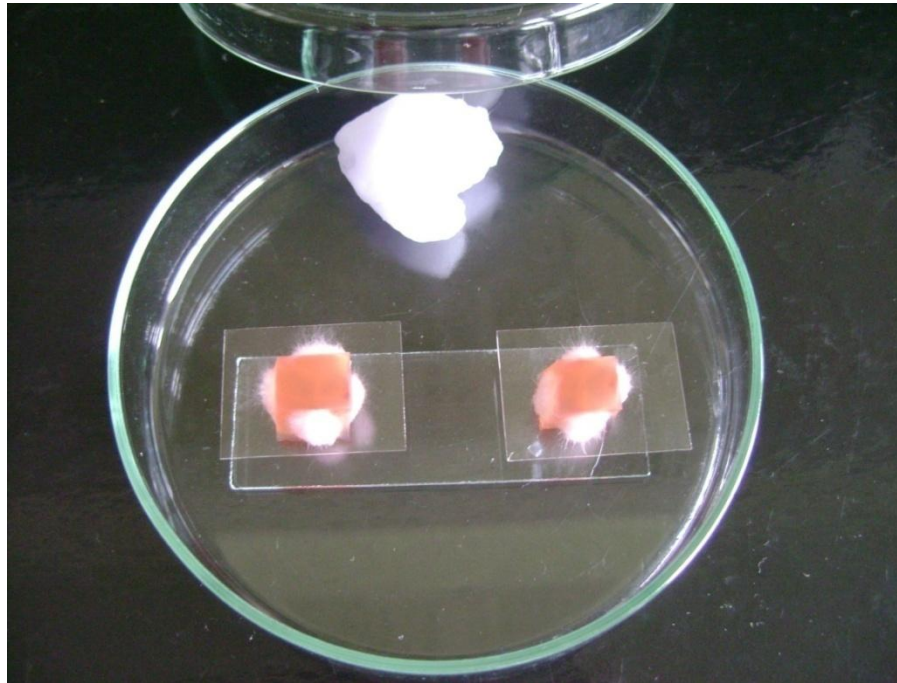
ANEXO D – Identificação das linhagens fúngicas por caracterização morfológica.



Penicillium sp.



Não foi identificado



Técnica de microcultivo utilizada para a identificação de fungos.