

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

FERNANDA GRAVINA

Sistema de respostas não específicas de linhagens de *Escherichia coli* K-12 à
toxicidade induzida pelos herbicidas paraquat, 2,4-D e atrazina

PONTA GROSSA
2015

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

FERNANDA GRAVINA

Sistema de respostas não específicas de linhagens de *Escherichia coli* K-12 à toxicidade induzida pelos herbicidas paraquat, 2,4-D e atrazina

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pileggi

Co-orientadora: Profa. Dra. Jesiane S. S Batista

Ponta Grossa

2015

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

Gravina, Fernanda

G777 Sistema de respostas não específicas de
linhagens de *Escherichia coli* K-12 à
toxicidade induzida pelos herbicidas
paraquat, 2,4-D e atrazina/ Fernanda
Gravina. Ponta Grossa, 2015.
76f.

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pileggi.
Coorientadora: Prof^a Dr^a Jesiane S. S
Batista.

1.Microbiologia ambiental. 2.Estresse
oxidativo. 3.Superóxido dismutase.
4.Peróxido. 5.Malondialdeído.. I.Pileggi,
Marcos. II. Batista, Jesiane S. S. III.
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Universidade Estadual do Centro-Oeste.
Mestrado em Ciências Biológicas. IV. T.

CDD: 575



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva



PARANÁ

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



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 04/2015

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **Fernanda Gravina**.

Aos vinte e cinco dias do mês de fevereiro de dois mil e quinze, no auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Dr. Marcos Pileggi em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Fernanda Gravina**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Marcos Pileggi (Orientador UEPG), Dr. Ricardo Antunes Azevedo (ESALQ) e Dra. Carolina Weigert Galvão (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Sistema de respostas não específicas de linhagens de *Escherichia coli* K 12 à atoxicidade induzida pelos herbicidas paraquat, 2,4-D e atrazina**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de trinta dias; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) até o prazo máximo de 60 dias após a defesa; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☒ não ☐

Novo título:

Sistema de respostas não específicas de linhagens de Escherichia coli K12 à toxicidade induzida pelos herbicidas paraquat, 2,4-D e atrazina

Ponta Grossa, 25 de fevereiro de dois mil e quinze.

Prof. Dr. Marcos Pileggi

Prof. Dr. Ricardo Antunes Azevedo

Profa. Dra. Carolina Weigert Galvão

conferi com a original

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Pós-Graduação em Biologia Evolutiva
Prof.ª Dra. Mara Cristina de Almeida Mattiello
Coordenadora

Agradecimentos

Ao Cnpq e a CAPES pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador Marcos Pileggi, pelo apoio, orientação e paciência para me conduzir no caminho científico me ajudando e me ensinando a consertar os erros cometidos e seguir em frente. Muito obrigada pela oportunidade, por confiar responsabilidades; pelas idéias, críticas e sugestões recebidas durante a execução de todo o trabalho e na redação desta dissertação.

À minha co-orientadora Jesiane Batista por sempre me dar alternativas e não me deixar desistir, por ser uma excelente profissional e acima de tudo, amiga. Sou grata pelas idéias, por sempre me passar segurança e confiança. Agradeço também pelos chocolates, pelas conversas sobre a vida, e pelas caronas.

À professora Sonia Alvim Pileggi obrigada por compartilhar um pouco da sua experiência de vida e do seu conhecimento científico.

À Rosilene Aparecida Prestes por ter dividido os seus conhecimentos comigo, e por ter me ajudado em toda a estatística de lipídios mesmo com a Sofia prestes a nascer, obrigada por ter me recebido em sua casa.

Agradeço à professora Katia Sabrina Paludo, pelos ensinamentos, confiança e ajuda incondicional nos primeiros géis.

À professora Carol Galvão por ser sempre solícita, agradeço às críticas e sugestões recebidas para a redação desta dissertação.

Ao professor Ricardo Antunes de Azevedo por ceder as linhagens utilizadas neste estudo, e por colaborar na redação desta dissertação.

Aos professores e alunos do laboratório de genética pelo empréstimo de equipamentos.

Aos professores do curso de Mestrado em Biologia Evolutiva, pelo conhecimento compartilhado.

A Simone por toda a ajuda nos experimento com o FTIR.

Aos companheiros de laboratório que tornavam os dias mais divertidos, Lilian, Bruno, Priscila, Eliz, Aline, Janinha, Stella, Vanessa, Fabi e Pablo, sem vocês certamente a caminhada seria mais difícil.

Ao grande profissional e querido amigo Ricardo Olchanheski, sua doação incondicional ao trabalho de colegas contribuiu tanto para o meu desenvolvimento profissional quanto pessoal. Obrigada por todo apoio, por me ensinar tudo da melhor forma possível, agradeço a sua generosidade, competência e principalmente agradeço pela amizade e pelos momentos de descontração e bagunça.

Aos colegas de laboratório que se tornaram amigos de coração:

Gessica, creio que nem você esperava que a nossa amizade se tornasse tão grande como aconteceu, obrigada por sempre me escutar, me aconselhar, dividir teus sonhos e teus medos comigo, e não esquece “tu és eternamente responsável por aquilo que cativas”.

Tati, obrigada pelo companheirismo de sempre, pelas conversas e por compartilhar as aflições durante todo o mestrado; dividir comigo o seu conhecimento, sua humildade e principalmente sua história de vida. As longas horas de laboratório se tornaram mais prazerosas.

Leandro, obrigada por toda ajuda no laboratório, pelos momentos de diversão e pelas conversas sem fim. Obrigada por ser o tiozão de sempre, e por não revidar pelas vezes que te preguei peças.

Gabriel, obrigada por ser o mais querido dos co-orientados, por sempre tornar os dias mais divertidos.

Ao meu Pai, obrigada por toda a confiança, por todas as oportunidades para que eu chegasse até aqui, obrigada pela preocupação e participação na realização dos meus sonhos. Obrigada pelo seu apoio incondicional, e por todas as vezes que teve que acordar de madrugada para me levar ao laboratório. Obrigada por todo o carinho, apoio, e conselhos.

À minha mãe, agradeço muito por sua paciência, por suportar minhas tristezas e meu mau-humor doando-me todo o carinho e atenção; respeitando o meu espaço; por incentivar meus sonhos, fazendo-me acreditar que eu poderia realizá-los. Obrigada por ser meu exemplo de força. Amo você!!!

Ao meu irmão por suportar meu mau-humor, pelas caronas todas as manhãs, e por me levar de um bloco ao outro durante meus experimentos. Obrigada por arranjar distrações pros dias serem mais leves.

Ao meu namorado, Rafa, por todo o apoio e por acreditar em mim. Agradeço pelo companheirismo de sempre, por todos os dias e noites de estudo desde a graduação; agradeço pelo imenso incentivo que me deu pra que eu entrasse no mestrado. Obrigada por sempre escutar meus desesperos e ser um porto seguro. Obrigada por compreender minhas ausências. Obrigada por deixar de curtir teus finais de semana para me acompanhar no laboratório. Enfim agradeço por todo o carinho e amor. Te amo!!!

E por fim agradeço a uma pessoa maravilhosa, a minha Vó Ida (*in memoriam*), obrigada pelas orações, pela participação em todos os momentos da minha vida, pelos ensinamentos de luta e pelo seu amor incondicional.

“Disse a flor para o pequeno príncipe: - É preciso que eu suporte duas ou três
larvas se quiser conhecer as borboletas.”
Antoine de Saint-Exupéry

Resumo

Microrganismos representam componentes essenciais na manutenção dos ciclos biogeoquímicos e de ecossistemas. Em ambientes agrícolas, o uso contínuo de herbicidas para minimizar a perda na produtividade pode acarretar danos inibindo o crescimento em microrganismos. Uma das causas desta inibição é o aumento da produção de ERO (espécies reativas de oxigênio), como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxila ($OH^{\cdot-}$), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), causando estresse oxidativo. A magnitude deste estresse pode ser condicionada pelo grupo químico e pelo modo de ação do herbicida. As respostas celulares contra ERO envolvem o aumento na expressão de enzimas como superóxido dismutase e catalase, responsáveis pela dismutação de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , respectivamente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre o efeito de herbicidas com diferentes modos de ação e as respostas das isoenzimas de superóxido dismutase (SOD) na bactéria *Escherichia coli* K-12. Assim, foram utilizados os herbicidas 2,4-D, atrazina e paraquat, e linhagens mutantes de *E. coli* K-12 nocauteadas para os genes codificantes das enzimas Mn-SOD (*sodA*) e Fe-SOD (*sodB*). Os herbicidas mostraram-se capazes de promover o desequilíbrio do potencial redox, aumentando a produção de H_2O_2 e malondialdeído (MDA), acima das taxas observadas nos controles e de forma distinta entre as linhagens. Expostas ao paraquat, o qual origina ciclisto redox *in vivo*, as linhagens de *E. coli* *wt* e Δ *sodB* apresentaram aumento na produção de H_2O_2 , além de aumento na atividade de Mn-SOD, provavelmente como consequência da ativação do SoxR, o qual promove a transcrição do gene *sodA*. Em Δ *sodA*, os índices de toxicidade com o paraquat não foram maiores que o controle, indicando uma possível regulação da expressão da enzima Fe-SOD pelo fator transcricional OxyR. Nossos resultados indicaram que a deleção dos genes codificantes para SOD provocaram padrões nas respostas antioxidativas, de acordo com os tempos testados, independentemente dos herbicidas. Para Δ *sodB*, os danos foram menores no tempo de 9h; já em Δ *sodA*, os danos foram menores no tempo de 5h, demonstrando a importância do papel destes genes na defesa contra o estresse oxidativo em diferentes fases de crescimento. As respostas celulares demonstraram que, apesar dos índices de toxicidade observados, as linhagens foram capazes de crescer em taxas próximas às verificadas no controle, incluindo ainda um aumento do valor adaptativo em Δ *sodA*, o que indica uma plasticidade ampla de respostas e um potencial de adaptação rápida. Ampliando esta hipótese, considerando um ambiente contendo uma molécula tóxica, e uma bactéria que possua um sistema polimórfico para SOD, caso ocorra uma mutação no gene para uma de suas isoformas, ela poderá aumentar a viabilidade celular e ainda manter uma enzima antioxidativa funcional. Sugere-se que *E. coli* K-12, uma linhagem desenvolvida em laboratório e provavelmente com baixa capacidade de sobrevivência em ambiente natural, apresenta mecanismos de tolerância *in vitro* a herbicidas, mesmo sem seleção prévia. Tal modelo de plasticidade fenotípica poderia ser encontrado em outras bactérias de solo agrícola com alta rotatividade de culturas e intenso uso de herbicidas, podendo causar um impacto considerável na diversidade e funcionalidade desta microbiota.

Palavras chave: microbiologia ambiental, estresse oxidativo, superóxido dismutase, peróxido, malondialdeído.

Abstract

Microorganisms are essential components in the maintenance of biogeochemical cycles and ecosystems. In agricultural environments, continuous use of herbicides to minimize the loss in productivity could damage growth inhibition of micro-organisms. One cause of this inhibition is increased production of ROS (reactive oxygen species), such as superoxide radicals ($O_2^{\cdot-}$) and hydroxyl ($OH^{\cdot}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2), causing oxidative stress. The magnitude of this stress can be conditioned by the chemical group and mode of action of the herbicide. The cell responses against ROS involve an increase in the expression of enzymes such as superoxide dismutase and catalase, responsible for the dismutation of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 , respectively. The objective of this study was to evaluate the relationship between the effect of herbicides with different modes of action and answers of superoxide dismutase (SOD) isoenzymes in the bacterium *Escherichia coli* K-12 bacteria. For this, 2,4-D, paraquat and atrazine herbicides were used, and knockout strains of *E. coli* K-12 strains carrying mutations in the gene encoding Mn-SOD (*sodA*) and Fe-SOD (*sodB*). Herbicides were shown to be capable of promoting the imbalance of redox potential, increasing the production of H_2O_2 and malondialdehyde (MDA) above the rates observed in controls and differently between strains. Exposed to paraquat, which induces in vivo redox cycling, strains of *E. coli* *wt* and Δ *sodB* showed increased production of H_2O_2 , and increase in the Mn-SOD activity, probably as a result from activation of the SoxR, which promotes the transcription of the gene *sodA*. In Δ *sodA*, the toxicity rates with paraquat were not higher than the control, indicating a possible regulation of the Fe-SOD expression by OxyR transcriptional factor. Our results indicated that deletion of genes encoding SOD enzymes originated patterns of antioxidative responses, according to the tested periods of time, regardless the herbicides. To Δ *sodB*, the damage was minor in time 9pm; but in Δ *sodA*, the damage was minor in time 5pm, demonstrating the important role of these genes in the defense against oxidative stress in different stages of growth. Cellular responses demonstrated despite the observed toxicity indices, the strains were able to grow at rates close to those verified in control, including an increase in the fitness value in Δ *sodA*, which indicates a wide plasticity of responses, and a potential for a quick fitting of *E. coli* K-12. Extending this hypothesis, considering an environment containing a toxic molecule, such as an herbicide, and a bacterium having a polymorphic system for SOD, if a mutation appears in a gene coding for isoforms, it may show an increase in cell viability and still maintain a functional antioxidative enzyme. We suggest that *E. coli* K-12, a strain created in a laboratory, and with probably low survivability in a natural environment, developed mechanisms of *in vitro* herbicide tolerance, even without previous selection. This phenotypic plasticity model might be found in other bacteria of agricultural land, with high turnover of cultures and intense use of herbicides, which could cause a considerable impact on the diversity and functionality of soil microbiota.

Key words: environmental microbiology, oxidative stress, superoxide dismutase, peroxide, malondialdehyde.

Lista de abreviaturas e siglas

ATZ - Atrazina

BSA - Albumina de soro bovino (Bovine serum albumin)

CAT - Catalase

DTT - Ditionitrito

EDTA - Ácido etileno diamino tetracético

ERO - Espécies reativas de oxigênio

LB - Caldo Luria (Luria Broth)

MDA - Malondialdeído

2,4-D - Ácido diclorofenóxiacético

NBT - Nitroazul tetrazólio (nitroblue tetrazolium)

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

PVPP - Polivinilpirrolidona

PQ - Paraquat

RPM - Rotações por minuto

SOD - Superóxido dismutase

TBA - Ácido 2-tiobarbitúrico

TCA - Ácido tricloroacético

Lista de Figuras

Figura 1 - Fórmula estrutural da molécula do paraquat.....	28
Figura 2 - Fórmula estrutural da molécula do 2,4-D ácido (2,4-diclorofenoxi) acético.....	29
Figura 3 - Fórmula estrutural da molécula da atrazina.....	30
Figura 1 - Representação da formula molecular dos herbicidas 2,4-D, atrazina e paraquat.....	42
Figura 2 - Quantificação de H ₂ O ₂ em linhagens de <i>E. coli</i> K-12 expostas aos herbicidas 2,4-D, atrazina, paraquat, e em controle, após 5h e 9h de incubação. As médias foram comparadas por ANOVA. Utilizou-se o teste de Duncan com p ≤ 0,05. Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística significativa, sendo letras minúsculas em relação aos tratamentos e letras maiúsculas em relação aos tempos de incubação.....	49
Figura 3 - Representação gráfica da rede de interações dos genes <i>sodA</i> e <i>sodB</i> em <i>E.coli</i> K-12 obtido em STRING 9.1. O cluster 1, na cor amarela, representa a associação do gene <i>sodB</i> com duas peroxidases (<i>ahpF</i> e <i>ahpC</i>) e do fator transcricional das peroxidases (OxyR); o cluster 2, em verde, representa um grupamento de genes, incluindo o <i>sodA</i> , que apresentam interação de regulação; o cluster 3, na cor azul, é referente aos genes envolvidos na biossíntese de grupamentos heme; e o cluster 4, em vermelho, representa a interação entre os genes que codificam para as enzimas citrato cintase (<i>gltA</i>), isocitrato desidrogenase (<i>icd</i>) e aconitase (<i>acnA</i>). 9.1.....	51
Figura 4 - Quantidade de MDA em linhagens de <i>E. coli</i> K-12 expostas aos herbicidas 2,4-D, atrazina, paraquat, e em controle, após 5h e 9h de incubação. As médias foram comparadas por ANOVA. Utilizou-se o teste de Duncan com p ≤ 0,05. Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística significativa, sendo letras minúsculas em relação aos tratamentos e letras maiúsculas em relação aos tempos de incubação.....	52
Figura 5 - <i>Graphical abstract</i> mostrando o padrão de danos causados pelos herbicidas 2,4-D, atrazina e paraquat em <i>E. coli</i> K-12 nos diferentes tempos de incubação de acordo com a isoenzima de SOD nocauteada.....	53
Figura 6 - Viabilidade celular (em U.F.C.) de linhagens de <i>E. coli</i> K-12 expostas aos herbicidas 2,4-D, atrazina, paraquat, e em controle, após 5h e 9h de	

incubação. As médias foram comparadas por ANOVA. Utilizou-se o teste de Duncan com $p \leq 0,05$. Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística significativa, sendo letras minúsculas em relação aos tratamentos e letras maiúsculas em relação aos tempos de incubação.....55

Figura 7 - Espectro de FTIR obtido de uma amostra de ácidos graxos extraídos de *E. coli* K-12.....56

Figura 8 - Análise de lipídios de *E. coli* K-12 *wt* usando FTIR e análise de componentes principais. Controle (■); 2,4-D(●); Atrazina (★); Paraquat (▲), os tempos de incubação estão discriminados na figura.....57

Figura 9 - Análise de lipídios de *E. coli* K-12 Δ *sodA* usando FTIR e análise de componentes principais. (■); 2,4-D(●); Atrazina (★); Paraquat (▲), os tempos de incubação estão discriminados na figura.....58

Figura 10 - Análise de lipídios de *E. coli* K-12 Δ *sodB* usando FTIR e análise de componentes principais. (■); 2,4-D(●); Atrazina (★); Paraquat (▲), os tempos de incubação estão discriminados na figura.....58

Figura 11 - Curvas de crescimento (OD em 600 nm) de linhagens de *E. coli* K-12 expostas aos herbicidas 2,4-D, atrazina, paraquat, e em controle, após 5h e 9h de incubação, sendo A referente a linhagem *wt*, representando Δ *sodA* e C Δ *sodB*. As médias foram comparadas por ANOVA. Utilizou-se o teste de Duncan com $p \leq 0,05$. Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística significativa, sendo letras minúsculas em relação aos tratamentos e letras maiúsculas em relação aos tempos de incubação.....60

Figura 12 - Atividade de SOD-PAGE em linhagens de *E. coli* K-12 controle, paraquat, 2,4-D, atrazina nos tempos de incubação de 5h e 9h.....62

Figura 13 - Atividade de catalase em linhagens de linhagens de *E. coli* K-12 expostas aos herbicidas 2,4-D, atrazina, paraquat, e em controle, após 5h e 9h de incubação. As médias foram comparadas por ANOVA. Utilizou-se o teste de Duncan com $p \leq 0,05$. Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística significativa, sendo letras minúsculas em relação aos tratamentos e letras maiúsculas em relação aos tempos de incubação.....64

Figura 14 - Resumo gráfico mostrando os danos causados pelos herbicidas 2,4-D, atrazina e paraquat e as respostas celulares de *E. coli* K-12, avaliados nesse trabalho.....66

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Importância da microbiota de solo	16
2.2 Herbicidas	17
2.3 Impactos de herbicidas sobre comunidades microbianas.....	18
2.4 Estresse oxidativo e sistemas antioxidativos	19
2.4 Espécies reativas de oxigênio.....	20
2.4.1. Radical Superóxido, Peróxido de Hidrogênio e Radical Hidroxila	20
2.5 Enzimas antioxidativas.....	22
2.5.1 Superóxido dismutase.....	22
2.5.2 Catalase	23
2.6 Regulação Gênica.....	23
2.6.1 Regulon SoxRS.....	24
2.6.2 Regulon OxyR.....	25
2.6.3 Regulon Fur	25
2.7 Modelo de estudo: <i>Escherichia coli</i>	26
2.8 Herbicidas estudados.....	28
2.8.1 Paraquat	28
2.8.2 Ácido (2,4-diclorofenoxi) acético	29
2.8.3 Atrazina	30
3. OBJETIVO GERAL.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Linhagens bacterianas	33
4.2 Herbicidas	33
4.3 Condições de crescimento bacteriano	33
4.5 Quantificação de peróxido de hidrogênio.....	34
4.6 Peroxidação lipídica	35

4.7 Análise do sistema antioxidante	35
4.7.1 Extração de proteínas para análises de estresse oxidativo	35
4.7.2 Atividade de SOD por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	36
4.7.3 Atividade de CAT	36
4.8 Análise de saturação de lipídeos.....	36
4.9 Análise <i>in silico</i>	37
4.10 Análises Estatísticas	37
5. Resultados e Discussão	38
Resumo.....	39
Abstract.....	40
5.1 Introdução	41
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	43
5.2.1 Linhagens bacterianas	43
5.2.2 Herbicidas.....	43
5.2.3 Crescimento bacteriano.....	43
5.2.4 Preparação das amostras para quantificação de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica	44
5.2.5 Quantificação de Peróxido de hidrogênio	44
5.2.6 Peroxidação lipídica	45
5.2.7 Análise do sistema antioxidante	45
5.2.7.1 Extração de proteínas para análises de estresse oxidativo .	45
5.2.7.2 Atividade de SOD por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	46
5.2.7.3 Atividade de CAT	46
5.2.8 Análise de saturação de lipídeos	46
5.2.9 Análise <i>in silico</i>	47
5.2.10 Análise Estatística	47
5.3 Resultados e Discussão.....	48
Caracterização dos herbicidas como agentes estressantes para E.coli K-12	48

<i>Produção de Espécies Reativas de Oxigênio</i>	48
<i>Peroxidação Lipídica</i>	52
<i>Influência dos herbicidas sobre a viabilidade celular</i>	54
<i>Efeito dos herbicidas sobre a saturação de lipídios de membrana</i>	55
<i>Influência dos herbicidas sobre o crescimento bacteriano</i>	59
Respostas enzimáticas ao estresse oxidativo gerado pelos herbicidas	61
<i>Superoxido dismutase: primeira linha de defesa</i>	61
<i>Catalase</i>	63
Sistema de respostas de <i>E. coli</i> K-12 ao estresse causado pelos herbicidas 2,4-D, paraquat e atrazina	65
5.1.4 Conclusão	67
5.1.5 Referências Bibliográficas	68
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	73

1. INTRODUÇÃO

A parte viva e mais ativa da matéria orgânica do solo é constituída, em sua maioria, pelos microrganismos, que são responsáveis pela capacidade produtiva agrícola dos solos e pela manutenção do equilíbrio destes ecossistemas.

Além da microbiota, fazem parte do componente do solo os insumos aplicados para uma maior eficiência na capacidade de produção. As elevadas perdas de produtividade ligadas à interferência de plantas daninhas, assim como a inexistência de alternativas de igual eficácia para a solução deste problema, fazem o uso de herbicidas uma prática essencial e generalizada.

Porém o manejo associado à utilização de herbicidas pode alterar a funcionalidade da microbiota, já que podem permanecer no ambiente e atingir organismos não alvo. Alterações na estrutura química podem interferir no grau de toxicidade dos herbicidas frente a diferentes sistemas metabólicos.

Vias de transdução de sinal que detectam alterações nos níveis de oxidantes evoluíram em bactérias em resposta ao contato com herbicidas e ao consequente estresse oxidativo gerado, de modo a modular a expressão gênica antes que danos extensos ocorram.

Neste cenário, as enzimas antioxidantes são peças chaves, sendo caracterizadas pela especificidade e catálise de reações com reconhecida eficiência.

A *Escherichia coli* é considerada um organismo modelo para vários sistemas genéticos e fisiológicos, e tem sido muito utilizada em estudos para determinar efeitos tóxicos de xenobióticos.

Com o objetivo de melhorar a compreensão de respostas antioxidativas em bactérias, este estudo avaliou os efeitos de herbicidas com diferentes modos de ação, usando como modelo, mutantes deficientes para produção de isoenzimas de SOD em *Escherichia coli* K-12.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância da microbiota de solo

Os microrganismos apresentam uma grande diversidade genética e têm sido cada vez mais associados à qualidade ambiental, tanto por seu papel fundamental na manutenção dos ecossistemas como pela sensibilidade a variações nos fatores que compõem os ambientes (VIBHA E NEELAM, 2012).

No solo, por exemplo, os microrganismos são responsáveis por processos como: ciclagem de nutrientes, decomposição e síntese da matéria orgânica, estruturação do solo, transformações bioquímicas específicas (nitrificação, desnitrificação, oxidação e redução do enxofre), fixação biológica do nitrogênio, ação antagônica aos patógenos, produção de substâncias promotoras ou inibidoras de crescimento, biorremediação de poluentes. Esses organismos podem também apresentar alto valor biotecnológico, participando na produção de fármacos, corantes, enzimas e ácidos orgânicos, entre muitos outros produtos inexplorados (SIQUEIRA et al., 1994).

Em ambientes onde há baixa reposição de resíduos vegetais e baixa disponibilidade de nutrientes, a importância dos microrganismos é destacada, pois há a necessidade de ciclagem dos nutrientes que estão retidos principalmente na serapilheira (VILLELA, 1997). Vários nutrientes, incluindo nitrogênio e fósforo, são frequentemente limitantes do desenvolvimento vegetal (VITOUSEK et al, 2010), o que dá uma dimensão da alta dependência desse ambiente aos processos microbiológicos como, por exemplo, a fixação biológica de nitrogênio e a solubilização de fosfatos.

Bactérias e fungos respondem por cerca de 90% da atividade microbiana do solo. Como a biomassa dos microrganismos é reciclada cerca de 10 vezes mais rápido que o restante da fração orgânica morta do solo, tem-se que a quantidade de nutrientes presentes nas células da microbiota é muito significativa perante a ciclagem de nutrientes em todo o ecossistema (SILVEIRA E FREITAS, 2007).

Em condições ideais, a microbiota do solo permite que os nutrientes sejam gradualmente liberados para a nutrição das plantas, sem perdas por lixiviação. Em ecossistemas clímax, a microbiota encontra-se em equilíbrio com o solo, mantendo assim a sua biodiversidade. Portanto o envolvimento nestes processos vitais do ecossistema edáfico explica a essencialidade da microbiota na determinação da qualidade do solo e, conseqüentemente, na produção agrícola e saúde ambiental.

2.2 Herbicidas

Herbicidas são compostos orgânicos sintetizados utilizados na agricultura para controlar gramíneas, as quais competem com as culturas agrícolas por água, luz e nutrientes, ocasionando perdas de produtividade (JAVARONI et al., 1999; NEGRISOLI et al., 2004). Os primeiros relatos da utilização de substâncias químicas para o manejo de plantas daninhas se deram por volta de 1908, pesquisadores como Bolley, Bonnet e Schulz usaram sais de cobre e depois ácido sulfúrico para o controle de plantas daninhas em cereais (ZIMDHAL, 1993).

O marco do controle químico moderno ocorreu, no entanto, em 1941, com a síntese do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (POKORNY, 1941). Durante a Segunda Guerra Mundial foram descobertas as propriedades dos derivados dos ácidos fenoxiacéticos sobre o crescimento de plantas. Apenas após o fim da guerra foi feito o anúncio público da ação do 2,4-D como herbicida que causava morte diferenciada de plantas (HAMMER E TUKEY, 1944; MARTH E MITCHELL, 1944). Posteriormente, foi descrito o primeiro herbicida (monuron) que não era derivado dos ácidos fenólicos (BUCHA E TODD, 1951). Iniciava-se, então, nas décadas de 50 e 60, as práticas modernas de baixas doses de herbicidas orgânicos sintéticos para o controle seletivo de plantas daninhas.

Os pesticidas surgiram como uma solução para o aumento da produtividade agrícola, porém seu uso contínuo, e muitas vezes irregular, levou a contaminação de alimentos e ambientes naturais de forma persistente (FLORES et al., 2004; ANNIBELLI, 2004). Herbicidas possuem certo grau de toxicidade para o homem e para outras espécies de plantas e animais (WILHELMS et al., 2006; CHEVRIER et al., 2011; CRAGIN et al., 2011). Problemas associados ao

comportamento ambiental desses compostos também existem. Embora nenhum herbicida permaneça indefinidamente no ambiente, em alguns casos eles podem apresentar persistência por um período de tempo suficiente para limitar ou injuriar o desenvolvimento de espécies cultivadas em rotação (KRAEMER et al., 2009).

Estima-se que apenas 0,1% de pesticidas atinjam o alvo; o restante fica no ambiente, podendo causar a contaminação de solo e cursos d'água, ar e desequilíbrios biológicos e ecológicos (SHARMA et al., 2010; JARDIM et al., 2009). Atualmente, sabe-se que a magnitude da toxicidade dos xenobióticos pode estar relacionada à constituição química, além disto, a falta de especificidade destes compostos caracteriza um risco para os organismos não alvos, os quais sofrem as consequências da exposição contínua.

2.3 Impactos de herbicidas sobre comunidades microbianas

Além da contaminação ambiental, herbicidas podem provocar alterações nos nutrientes presentes no solo, consequentemente alterando o metabolismo e a diversidade genética de comunidades microbianas (SANINO E GIANFREDA, 2001). Isso pode ocorrer porque alguns microrganismos podem ser reprimidos enquanto outros podem proliferar nos nichos ecológicos tornados vagos pela ação dos herbicidas. Por sua vez, sucessões nas comunidades microbianas vão ocorrer e, consequentemente, as atividades também serão alteradas.

Toda e qualquer interferência do homem sobre o ecossistema, sobretudo tendo em vista a adição de xenobióticos, resulta na quebra do equilíbrio e importantes alterações na microbiota podem ocorrer, tanto em nível de comunidade como em nível de indivíduo.

Os efeitos de herbicidas sobre os microrganismos do solo têm sido geralmente relatados como temporários, especialmente em relação à biomassa microbiana do solo (WARDLE E PARKINSON, 1990) ou ao cultivo em laboratório (WACHOWSKA E BANASZKIEWICZ, 1999). No entanto, o uso de técnicas baseadas na extração direta e análise de ácidos nucléicos provenientes de amostras ambientais, têm demonstrado que o impacto sobre a comunidade microbiana pode ser expressivo. Em um trabalho de El Fantroussi e colaboradores, (2000) por meio de DGGE, os efeitos deletérios após 10 anos de

aplicação de herbicida do grupo fenil-uréia (linuron) sobre os microrganismos de solo, foram demonstrados. Estes autores concluíram que o efeito negativo da aplicação de linuron se deu mais intensamente sobre bactérias não cultiváveis, agrupadas em uma divisão chamada Acidobacterium. Esta divisão é formada por bactérias versáteis na transformação e utilização de substratos orgânicos (SMIT et al., 2001).

O uso repetido de herbicidas do mesmo grupo químico por extensos períodos, sem considerar os intervalos requeridos para a devida recuperação da funcionalidade da microbiota do solo, pode desencadear alterações de difícil reversibilidade (WARDLE et al., 1994). Estudos “in vitro” revelam que a maioria dos herbicidas, quando utilizados em altas concentrações, são potencialmente tóxicos para os microrganismos (HUNGRIA et al., 1997). Uma das alterações citadas é o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e o consequente estresse oxidativo gerado nos microrganismos (LÜ et al., 2004; OLCZHANESKI et al., 2014; PETERS et al., 2014 ; MARTINS et al., 2011a). Estas considerações enfatizam a necessidade de gerar informação específica para os distintos herbicidas.

2.4 Estresse oxidativo e sistemas antioxidativos

Na formação da atmosfera terrestre o acúmulo de oxigênio molecular proporcionou a evolução de organismos aeróbios. Estes utilizam o O_2 como aceptor final de elétrons, pois permite elevada produção de energia na respiração, em consequência de seu alto potencial eletroquímico (ANBAR, 2008). Entretanto, devido a sua configuração eletrônica, o oxigênio pode sofrer reduções parciais e levar à formação de radicais livres, os quais são denominados (ERO).

ERO é um termo bastante amplo que abrange não somente radicais de oxigênio como radical hidroxila ($OH\cdot$), óxido nítrico ($NO\cdot$) e radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), mas também derivados do oxigênio que não são radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), ozônio (O_3) e oxigênio singleto (1O_2) (IMLAY, 2013).

Em geral, deve-se notar que a geração intracelular de ERO, em níveis compatíveis com um estado fisiológico considerado normal, tem um papel vital,

uma vez que essas espécies atuam na regulação da sinalização celular e na expressão gênica (BERRA et al., 2006).

Evolutivamente, foram selecionadas várias estratégias antioxidantes para as células combaterem a toxicidade das ERO. Os agentes considerados como antioxidantes compreendem: enzimas que removem radicais e espécies reativas, como por ex., as enzimas superóxido dismutase, glutathione redutase, peroxidases e catalases; proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes, tais como íons ferro e íons cobre, como por ex., as transferrinas, ferritinas e metalotioneínas; moléculas de baixo peso molecular que possuem a capacidade de captar ERO via auto-oxidação, como por ex., glutathione e aquelas que possuem grupo tiol (SH), ou vitaminas como α -tocoferol, ácido ascórbico e β -caroteno (IMLAY, 2013).

Apesar da existência desses agentes e mecanismos antioxidantes, quando a formação de ERO excede a capacidade antioxidante celular, pode haver a geração de uma condição conhecida como estresse oxidativo, cujos resultados podem ser bastante danosos às células (MAHALINGAM E FEDEROFF, 2003; IMLAY, 2013).

Essa condição pode variar bastante entre organismos, uma vez que a capacidade antioxidante das células pode ser bastante diversificada. Os danos celulares envolvem o comprometimento de biomoléculas como proteínas, lipídios de membrana e o DNA (NETZER et al., 2009; VEAU E DAY, 2011; GRANT, 2011).

2.4 Espécies reativas de oxigênio

2.4.1. Radical Superóxido, Peróxido de Hidrogênio e Radical Hidroxila

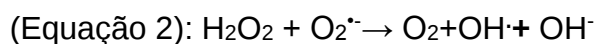
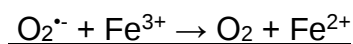
O $O_2^{\cdot-}$, o H_2O_2 e o $OH^{\cdot}$ são reconhecidos como elementos centrais na caracterização do estado de estresse oxidativo causado por herbicidas.

O $O_2^{\cdot-}$ é formado pela redução da molécula de oxigênio, por um único elétron: $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$. Em organismos que fazem respiração aeróbia, o O_2 age como molécula aceitadora de elétrons, sendo reduzido a H_2O . No entanto, sob determinadas condições, o O_2 aceita apenas um elétron, formando o $O_2^{\cdot-}$ (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2007).

O $O_2^{\cdot-}$ é mais polar que o O_2 , não atravessando membranas facilmente. Em bactérias, ocorre a formação de $O_2^{\cdot-}$ em pequenas quantidades, proveniente principalmente da cadeia transportadora de elétrons (IMLAY, 2008). Os principais danos causados pelo $O_2^{\cdot-}$ em sistemas biológicos são a destruição de centros metálicos de proteínas, como a catalase e a glutathione peroxidase; oxidação de cadeias laterais de aminoácidos; e a formação de outras espécies oxidativas, como o $OH^{\cdot}$ (DUBBS E MONGKOLSUK, 2007). Esta molécula pode participar de reações na célula, formando outros radicais; bem como, ser convertida enzimaticamente a H_2O_2 .

O H_2O_2 é uma molécula relativamente apolar, podendo atravessar membranas por difusão simples. Esta ERO não é por si só, muito reativa, e também participa como precursor direto do radical hidroxila, pois reage localmente com íons metálicos como o ferro (II) e o cobre (I) através da reação de Fenton (Equação 1) (MESSNER E IMLAY, 1999). O principal problema da presença do H_2O_2 é a capacidade de oxidar proteínas que apresentam resíduos de metionina e cisteína, ou grupos tiol muito reativos.

Na reação de Fenton (Equação 1) o H_2O_2 sofre fissão eletrolítica com a aquisição de um elétron do Fe^{2+} , que é oxidado a Fe^{3+} , enquanto a H_2O_2 é reduzido gerando um ânion hidroxil e um radical hidroxila. Na etapa seguinte, Fe^{3+} é reduzido a Fe^{2+} por aceitar elétrons do ânion $O_2^{\cdot-}$, sendo oxidado para O_2 . A reação do ciclo de Haber-Weiss (Equação 1) é a união da reação de Fenton (Equação 1) com a reação entre superóxido e um Fe^{3+} . Quando essas duas reações estão acopladas forma-se um ciclo (CORNELIS et al., 2011).



Os metais de transição mais importantes para a ocorrência dessa reação são Cu^{1+} e Fe^{2+} . Nesse sistema, a importância do ferro é mais pronunciada devido a sua maior biodisponibilidade e na maior parte do tempo ele encontra-se complexado com proteínas de transporte (ex. transferrina), e armazenamento (ex. ferritina e hemosiderina) (CORNELIS et al., 2011).

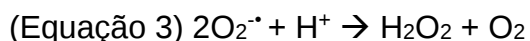
O produto final desta reação, o OH⁻ é, dentre as espécies reativas a que possui maior capacidade de causar danos, por exemplo, se a hidroxila for produzida próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, a hidroxila pode inativar várias proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (FERREIRA E MATSUBARA, 1997).

2.5 Enzimas antioxidativas

2.5.1 Superóxido dismutase

A enzima superóxido dismutase (SOD) é considerada a primeira linha de defesa contra as ERO, por ser responsável pela catalise da dismutação do O₂^{•-}, que é a primeira espécie a ser formada pela redução do O₂ por um único elétron, e também a mais abundante em sistemas aeróbicos.

É responsável pela conversão do O₂^{•-} em H₂O₂ e oxigênio molecular (Equação 3).



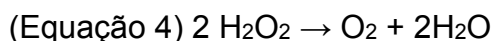
A principal importância da SOD se dá por ser considerada a única enzima cuja atividade controla a concentração de O₂^{•-} e H₂O₂, os dois substratos da reação de Haber-Weiss e Fenton (Equação 1) que origina os radicais OH⁻ e provavelmente por isso, as SOD representam o mecanismo de defesa central dos organismos vivos (RYAN et al., 2010).

A produção de O₂^{•-} endógeno depende de mudanças no metabolismo geral e do ambiente. Esta enzima foi descoberta acidentalmente (MCCORD et al., 1971), e por um período a sua função foi controversa. No entanto, Hassan e Fridovich determinaram que a isoenzima Mn-SOD de *E. coli* foi fortemente induzida quando as células foram expostas a drogas que provocam ciclo redox

em meio aeróbio, uma combinação que gera $O_2^{\cdot-}$ dentro das células (HASSAN E FRIDOVICH, 1978).

2.5.2 Catalase

A dismutação do $O_2^{\cdot-}$, feita pela SOD, dá origem a espécie reativa H_2O_2 . A função mais importante da catalase (CAT) é impedir a formação do radical hidroxila, e devido à ampla distribuição e capacidade de degradar rapidamente o H_2O_2 , foi levantada a importância desta enzima para a sobrevivência de organismos aeróbicos (IMLAY, 2008). Ela converte duas moléculas de H_2O_2 em O_2 e duas moléculas de água, pela transferência de dois elétrons (Equação 4).



Porém, o modo de ação das CAT depende da concentração de H_2O_2 , podendo ser peroxidativas e catalíticas. Em baixas concentrações ($< 1 \mu M$) a CAT atua com ações peroxidativas, e em elevadas concentrações, atua rapidamente de forma catalítica, formando H_2O e O_2 (Equação 4) (SCANDALIOS, 2005).

A formação do H_2O_2 desencadeia a segunda resposta adaptativa do sistema antioxidante, que é controlada pelo fator transcricional OxyR. Este, ativa proteínas relacionadas às mais diversas funções como manutenção da homeostase redox (glutathiona-redutase), proteção ao DNA (Dps: *DNA-binding protein*) e defesa ao estresse oxidativo, ativando uma CAT, a enzima hidropoxidase (HPII) (IMLAY, 2013).

2.6 Regulação Gênica

Para a modulação das respostas antioxidativas enzimáticas de SOD e CAT existem fatores transcricionais que reconhecem o estresse e modulam a expressão gênica nestas situações. Os seus principais sistemas de regulação são os regulons SoxRS, OxyR e Fur.

2.6.1 Regulon SoxRS

SoxR e SoxS constituem um sistema de respostas de sinal intracelular que rapidamente detecta alterações nos níveis de $O_2^{\cdot-}$ e modula a expressão de genes. Pensava-se que a ativação do regulon SoxRS formava uma defesa contra $O_2^{\cdot-}$. No entanto, atualmente, sabe-se que a função crítica da SoxRS é na proteção contra agentes redox-ciclismo (DIETRICH E KILEY, 2011).

Estes compostos são libertados por plantas e bactérias como dispositivos para inibir o crescimento de outros organismos (PAIVA et al., 2003; INBARAJ E CHIGNELL, 2004). Por exemplo, plumbagina, uma naftoquinona, foi originalmente isolada a partir da planta *Plumbago* (VAN DER VIJVER, 1972). Este composto é um herbicida eficaz que permite à planta-mãe dominar um habitat. Fenazinas são excretadas por bactérias, incluindo *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Pantoea agglomerans*. Elas exercem efeitos tóxicos em outras bactérias. Além disso, viológenos feitos pelo homem, como o paraquat, também são compostos redox-ciclismo, usados como herbicidas (DIETRICH E KILEY, 2011).

Estes compostos oxidam diretamente o cluster [2Fe-2S] de SoxR; quando substratos respiratórios estão presentes, os fármacos diminuem então a transferência de elétrons para as quinonas da cadeia respiratória. Há então, a reciclagem das drogas, permitindo-lhes continuar a oxidar tanto SoxR e outras enzimas alvo na célula. Este comportamento pode elevar a formação de $O_2^{\cdot-}$ intracelular por ordens de grandeza acima da taxa normal (GU E IMLAY, 2011). A ativação de SoxR estimula fortemente a transcrição de um único gene, *soxS*. SoxS é, então produzido em grandes quantidades e, por sua vez, ativa transcrição dos genes do regulon *soxRS*. Além disto, a ligação de SoxS com o DNA ou com a RNA polimerase protege-os da degradação.

Quando o estresse oxidativo diminui, o SoxR oxidado é devolvido ao seu estado reduzido por meio de sistemas de redução codificados por *rseC* e *rsxABCDGE*, os produtos do gene *rsx* e *rseC* constituem os sistemas redutores primários para SoxR em *E. coli* (KOO et al., 2003). A proteólise degrada rapidamente a proteína SoxS existente, acabando com esta resposta (GRIFFITH et al., 2004). O regulon SoxRS consiste de pelo menos 14 genes envolvidos em funções que eliminam a causa do estresse oxidativo (GU E IMLAY, 2011).

2.6.2 Regulon OxyR

OxyR é um regulador transcricional sensível a H_2O_2 (KULLIK et al., 1995). Esta proteína atua, principalmente, sob condições oxidantes por meio da interação direta da subunidade alfa da RNA polimerase (MONGKOLSUK, 2012). O gene *oxyR* codifica uma proteína com dupla função, que age como sensor de estresse causado por peróxidos e como ativador de transcrição do regulon OxyR.

Sua ativação inicia-se, na presença de H_2O_2 , com a oxidação do resíduo (SH) da cisteína sensora a ácido sulfênico (-SOH), em seguida ocorre uma rápida formação da ponte dissulfeto intramolecular com a cisteína de resolução (SH). Isso resulta numa mudança na sua conformação, o que permite a interação de OxyR com a RNA polimerase. O regulador OxyR oxidado volta a sua forma reduzida por intermédio de um doador de elétrons, como a glutatona redutase. (ZHENG, 2000; MONGKOLSUK, 2012).

O regulon OxyR, em *E. coli*, inclui genes envolvidos no metabolismo e proteção contra peróxidos (*katG*, *ahpC*, *ahpF*, *dps*), no balanço redox (*gor*, *grxA*, *trxC*) e reguladores importantes como o *fur*. A hidroperoxidase codificada por *katG* e as duas subunidades da alquil-peróxido redutase (codificadas pelo operon *ahpCF*) protegem contra os efeitos tóxicos do H_2O_2 , por meio da eliminação direta deste oxidante. A indução da glutatona redutase (*gorA*), da glutarredoxina (*grxA*), e da tiorredoxina (*trxC*), ajuda na manutenção do balanço celular de tiol-dissulfeto. A proteína Dps, que se liga ao DNA de maneira não específica, protege contra o dano ao DNA e mutação.

2.6.3 Regulon Fur

A homeostase de ferro e a resposta ao estresse oxidativo são conectadas por meio de interações regulatórias. Em *E. coli*, o controle do metabolismo de ferro é parte integrante da resposta de defesa a antioxidante, e o gene *fur* (*ferric uptake regulator*) é regulado tanto por OxyR como por SoxRS (ZHENG et al., 1999).

O ferro é um elemento essencial para o desenvolvimento celular, mas que também pode ser tóxico já que o ferro intracelular é oxidado por H_2O_2 gerando

radical hidroxila por meio da reação de Fenton (Equação 1). Por isso, o controle homeostático dos níveis de ferro livre é importante para se diminuir o estresse oxidativo (CORNELIS et al., 2011).

A proteína Fur age como um repressor da transcrição de mais de 90 genes envolvidos, em sua maioria, na homeostase do ferro. Fur atua como um repressor ativo na presença de íons ferrosos (Fe^{2+}), o Fe^{2+} se liga à proteína Fur. Esta interação conduz a uma modificação estrutural permitindo que este complexo se ligue ao DNA inibindo a transcrição do mRNA. (CHEN et al., 2007; BERTRAND, 2014).

Fur é encontrada em um nível de 5.000 cópias em *E. coli* durante o crescimento exponencial e pode chegar a até 10.000 cópias na fase estacionária. Este número elevado de proteína Fur é essencial para a *E. coli* durante o seu desenvolvimento. Fur pode estar envolvido em uma regulação positiva de vários genes de *E. coli* (*fntA*, *bfr*, *acnA*, *fumA*, *sdh*, *sodB*). *E. coli* utiliza um sistema inversor mediado por um pequeno RNA denominado RhyB. RhyB é um sRNA de 90 nucleotídeos de comprimento que é regulada pelo fator de transcrição Fur, então é expresso em baixa concentração de ferro (BERTRAND, 2014).

Na deficiência de ferro, Fur- Fe^{2+} não pode ser formada e a transcrição de RyhB é desreprimida. RyhB é expresso no ambiente intracelular e pode se ligar ao mRNA de *sodB* que contém uma sequência alvo do RyhB. Uma vez que RyhB se liga ao RNAm de *sodB*, enzimas degradadoras, tais como RNaseE e RNase III, são recrutadas e o novo complexo formado é metabolizado. Para que isto ocorra a proteína Hfq é essencial, intermediando a interação entre RyhB e RNase. No entanto, se a concentração de ferro é elevada o suficiente, o complexo Fur- Fe^{2+} é formado, o que pode inibir a transcrição RyhB. O gene *sodB* não é reprimido e pode ser sintetizado (OGLESBY-SHERROUSE E MURPHY, 2013).

2.7 Modelo de estudo: *Escherichia coli*

Organismos modelo possuem o genoma sequenciado e muitos genes conhecidos. Linhagens de *E. coli* são utilizadas em estudos de transmissibilidade de genes em tecnologias do DNA recombinante (WILLIAMS et al., 2009). Têm sido muito utilizadas para determinar os efeitos tóxicos de xenobióticos

(BOTELHO et al., 2012), e são um modelo importante no estudo de enzimas do sistema antioxidante.

Durante estresse oxidativo, a bactéria *E. coli* apresenta duas vias de respostas bem caracterizadas, sendo uma em combate ao $O_2^{\cdot-}$, e outra induzida na presença de H_2O_2 (LUSHCHAK, 2011). Em ambos os casos, é possível reconhecer enzimas chaves dos processos.

A regulação dos níveis de $O_2^{\cdot-}$ intracelular é realizado pela enzima SOD, que pode ser encontrada na forma de 3 isoenzimas, as quais são diferenciadas pelo cofator e localização celular. Duas destas isoenzimas tem atividade no citosol e são elas a Mn-SOD, codificada pelo gene *sodA* e sob controle principalmente de SoxR, sua síntese portanto; e a Fe-SOD, codificada pelo gene *sodB*, controlada pela proteína Fur, esta isoenzima não depende das condições do crescimento bacteriano sendo produzida constitutivamente de forma basal (TOUATI, 2000). A terceira isoenzima tem atividade no periplasma da célula e é denominada Cu/Zn-SOD, expressa pelo gene *sodC*, o qual é regulado pelo regulon RpoS. Devido a sua carga negativa, o $O_2^{\cdot-}$ é incapaz de penetrar membranas, a SOD periplasmática associada à membrana tem sido proposta como provável defensora da célula contra $O_2^{\cdot-}$ de origem exógena (KEITH E VALVANO, 2007).

A produção de cada uma das isoenzimas é acoplada por meio de reguladores de transcrição globais, já descritos, para a expressão de uma série de genes relacionados às condições ambientais específicas. Assim, qualquer alteração no ambiente é refletida por uma mudança nesta defesa básica contra o estresse.

A regulação do produto gerado pela SOD é controlada em *E. coli* por dois grupos, sendo as catalases-peroxidases, compostas pelas hidroperoxidases (HP) e as peroxidases, as quais são dependentes de um cofator para degradação do H_2O_2 , representadas pela alquil-peroxidase (*ahpC*). A HPI, codificada pelo gene *katG*, é expressa sob condições aeróbicas e anaeróbicas, está sob regulação do fator transcricional OxyR e sua síntese é induzida quando as células são expostas a concentrações subletais de H_2O_2 (TRIGGS-RAINE et al., 1988).

Já a HPII apresenta maior atividade durante a fase estacionária e em culturas aeróbicas (LOEWEN et al., 1996), pois seu controle é realizado pelo fator sigma *rpoS* (IVANOVA et al., 1994).

2.8 Herbicidas estudados

2.8.1 Paraquat

O paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto) pertence ao grupo químico dos bipyridílios. Sua fórmula molecular é $C_{12}H_{14}N_2Cl_2$. E sua fórmula estrutural é exposta na Fig. 1. É um dos herbicidas mais amplamente utilizados e sua aplicação foi aprovada pelas autoridades de cerca de 90 países. O principal fabricante do paraquat é a Syngenta que desenvolveu esse ingrediente ativo no início da década de 1960, com o nome comercial de Gramoxone 200.

Paraquat é um herbicida não seletivo de amplo espectro, sendo mais utilizado para dessecação pré-colheita. A aplicação é realizada na pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de abacaxi, algodão, arroz, banana, batata, café, cana-de-açúcar, citros, couve, feijão, maçã, milho, seringueira, soja, trigo e uva e como dessecante da cultura de algodão, arroz, batata, cana-de-açúcar, milho e soja (CATUNDA et al., 2005).

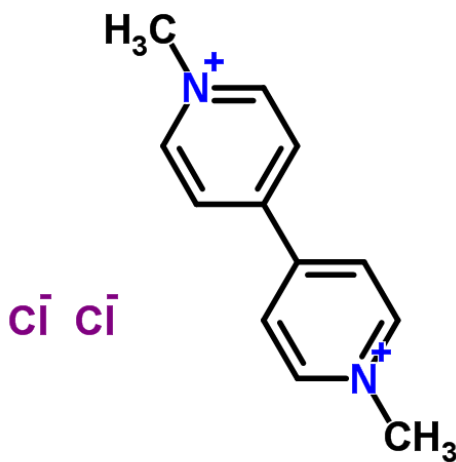


Figura 1: Fórmula estrutural da molécula do Paraquat

Em plantas seu sítio de ação (captura de elétrons) está próximo da ferredoxina no fotossistema I. Devido ao alto potencial redutor, este herbicida possui a capacidade de captar elétrons provenientes do fotossistema I, não havendo produção de $NADPH^+$. Os elétrons livres do fotossistema I reagem com

o paraquat resultando em uma forma de radical livre. O oxigênio rapidamente reconverte esse radical a forma original de paraquat, e nesse processo produz $O_2^{\cdot-}$, altamente reativo, que ataca os ácidos graxos insaturados das membranas, rapidamente abrindo e desidratando as membranas e tecidos das células. Assim sendo, na presença de oxigênio e de fornecimento contínuo de elétrons, haverá um ciclo de oxidações e reduções, com produção contínua de $O_2^{\cdot-}$, até que o suprimento de elétrons livres cesse (FUKUSHIMA et al., 2002).

Poucas horas após a aplicação desses herbicidas, na presença de luz, verifica-se severa injúria nas folhas das plantas tratadas (necrose do limbo foliar), o uso do herbicida proporciona quantidades de clorofila e carotenóides menores que aqueles das plantas controle, sendo visíveis os sintomas de clorose intensa e necrose dos tecidos ainda nos primeiros dias após a aplicação (CATUNDA et al., 2005).

2.8.2 Ácido (2,4-diclorofenoxi) acético

O herbicida 2,4-D [ácido (2,4-diclorofenoxi) acético] (Fig. 2) foi o primeiro produto seletivo a gramíneas sintetizado pela indústria para controle de plantas daninhas (OLIVEIRA JÚNIOR, 2001). É recomendado para pastagens, gramados e culturas gramíneas (arroz, cana-de-açúcar, milho, trigo, etc.). É um herbicida auxínico, que induz mudanças metabólicas e bioquímicas em plantas dicotiledôneas sensíveis, podendo levá-las à morte.

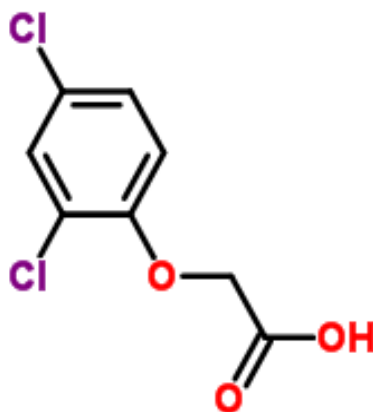


Figura 2: Fórmula estrutural da molécula do 2,4-D ácido (2,4-diclorofenoxi) acético.

Sua atividade fitotóxica decorre do desequilíbrio hormonal que promove nas células e o consequente crescimento desordenado do tecido (URSIN E BRADFORD, 1989; AHRENS, 1994), pois atua de forma semelhante a auxinas, como IAA (ácido indolacético).

O metabolismo de ácidos nucléicos e os aspectos metabólicos da plasticidade da parede celular são seriamente afetados. Também provoca mutações, induz a formação de radicais livres e apoptose. Além disso, causa desdiferenciação das atividades meristemáticas de células maduras e inibição da divisão celular de células jovens (THILL, 2003). Tais anomalias alteram o ritmo normal de crescimento da plântula, provocando sua morte (NASCIMENTO E YAMASHITA, 2009).

2.8.3 Atrazina

O herbicida atrazina (Fig. 3) amplamente utilizado no controle de ervas-daninhas nas culturas de milho, cana de açúcar e sorgo, pertence ao grupo químico das clorotriazinas.

Seu mecanismo de ação é a inibição da fotossíntese através do bloqueio de fluxo de elétrons no fotossistema II (FSII) entre as quinonas Qa e Qb. Muitos herbicidas inibidores do fotossistema II (derivados das triazinas e das uréias substituídas) se ligam à proteína D-1 no sítio onde se prende a plastoquinona Qb.

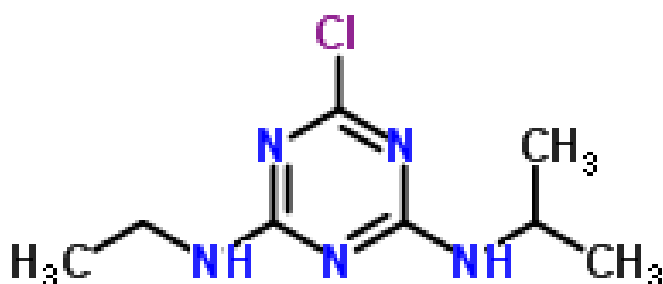


Figura 3: Fórmula estrutural da molécula da atrazina.

Esses herbicidas competem com a plastoquinona Qb parcialmente reduzida (QbH) pelo sítio na proteína D-1, ocasionando a saída da plastoquinona

e interrompendo o fluxo de elétrons entre os fotossistemas. Além da competição em si pelo sítio na proteína, os herbicidas apresentam maior tempo de residência do que a plastoquinona “Qb”, o que aumenta o seu efeito inibitório (RUTHERFORD, 2001).

A morte das plantas ocorre por outros motivos além da falta de carboidratos, em decorrência da inibição da reação luminosa da fotossíntese. As plantas suscetíveis morrem mais rapidamente quando expostas à luz após pulverizadas do que quando pulverizadas e colocadas no escuro. Além da fotoxidação da clorofila, provocando a clorose foliar, ocorrem rompimentos na membrana citoplasmática celular como consequência da peroxidação de lipídios causada pela ação dos radicais tóxicos (clorofila triplet e oxigênio singlet).

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar as respostas de diferentes isoenzimas envolvidas na defesa contra o estresse oxidativo em bactérias, não selecionadas, submetidas ao efeito de herbicidas com diferentes modos de ação.

3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar os índices de danos causados em linhagens com mutações para os genes codificantes das enzimas Mn-SOD (*sodA*) e Fe-SOD (*sodB*) da bactéria *Escherichia coli* K-12 expostas aos herbicidas 2,4-D, atrazina e paraquat.

- Avaliar as respostas das isoenzimas de SOD ao estresse oxidativo causado pelos herbicidas 2,4-D, atrazina e paraquat.

- Compreender aspectos do sistema de respostas de *E. coli* K-12 ao estresse causado pelos herbicidas 2,4-D, paraquat e atrazina

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens bacterianas

Foram utilizadas as linhagens selvagem (*wt* – linhagem controle) da bactéria *Escherichia coli* BW25133, derivada da linhagem K-12, e as mutantes $\Delta sodA$ e $\Delta sodB$, obtidas da “KEIO Knockout Collection” (Baba et al., 2006). Cada uma das linhagens mutantes foram obtidas por meio de substituição dos genes codificadores das isoenzimas Mn-SOD (*sodA*) e Fe-SOD (*sodB*) por um que confere resistência à canamicina, utilizando o método “Red Swap” (Datsenko e Wanner, 2000).

4.2 Herbicidas

Foram utilizados os herbicidas Gramoxone 200® (Syngenta), contendo o princípio ativo paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-dipiridílio dicloro); Aminol 806® (Milenia Agro Ciencias), com ácido 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético); e Primóleo® (Syngenta), contendo atrazina (6-cloro-N2-etil-N4-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina).

4.3 Condições de crescimento bacteriano

O meio utilizado como controle foi: LB (Caldo Luria: 10 g L⁻¹ de triptona, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura e 10 g L⁻¹ de NaCl). Os tratamentos foram realizados nos seguintes meios: PQ (LB com 0,185 mM de Gramoxone, o que equivale à 1 × FR [dose de campo]), 2,4-D (LB com Aminol na concentração equivalente de 0,226 mM de 2,4-D) e ATZ (LB com 0,147 mM de Primoleo). As condições de crescimento foram à 37 °C em mesa agitadora orbital sob agitação de 150 rpm. Os ensaios foram realizados em volumes de 100 mL (250 mL- volume total do frasco) em triplicata.

O pré-inóculo foi obtido pelo crescimento das linhagens em LB em fase log de crescimento (obtido em aproximadamente 5 h de incubação). O pré-inóculo foi

transferido para cada tratamento em uma D.O. (densidade óptica) inicial de 0,05, a 600 nm. No início do crescimento bacteriano, o monitoramento ocorreu a cada 30 min e após atingir a fase log a cada hora. As amostras foram diluídas sempre que atingissem valores de aproximadamente 0,6 de D.O., para minimizar os erros nas leituras, sendo que esses valores foram multiplicados pelos fatores de diluição correspondentes.

Para o cultivo em meio sólido, foram retiradas alíquotas de 100 µL nos tempos de 5h (meio da fase log) e 9h (fim da fase log). As amostras foram diluídas até 10^{-7} e 10^{-8} e plaqueadas em LA (LB + ágar 15 g L⁻¹) e incubadas à 37 °C. A contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada em 12 h de incubação.

4.4 Preparação das amostras para quantificação de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica

As culturas bacterianas foram obtidas conforme descritas no item 4.3. As culturas foram centrifugadas a 8.000 *g* durante 5 min a 4 °C, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado macerado com nitrogênio líquido. As amostras foram pesadas e 0,1g das mesmas foram congeladas para análises posteriores.

4.5 Quantificação de peróxido de hidrogênio

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

4.6 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação da produção de malondialdeído (MDA), metabólito reativo ao TBA (ácido 2-tiobarbitúrico) (HEALTH E PACKER, 1968, com modificações). De cada amostra 0,1 g foi homogeneizado com 1 mL de TCA 0,1% e centrifugada a 11.600 *g* por 5 min. Do sobrenadante, foi retirada uma alíquota de 0,25 mL e transferida para outro tubo com 1 mL de solução contendo TCA 20% e TBA 0,5%. A mistura foi colocada em banho-seco por 30 min a 95 °C, e resfriada em gelo por 10 min. As amostras foram centrifugadas por 10 min. a 10000 *g*. As concentrações de MDA foram monitoradas a 535 nm (todos os lipídeos) e 600 nm (todos menos o MDA) em espectrofotômetro, e as suas concentrações foram calculadas utilizando um coeficiente de extinção de 155 mMcm⁻¹. A quantidade de MDA foi expressa em µmol/g de massa fresca.

4.7 Análise do sistema antioxidante

4.7.1 Extração de proteínas para análises de estresse oxidativo

O crescimento celular deu-se conforme o Item 4.3. As extrações foram realizadas nos tempos de 5h e 9h. Para a extração das enzimas, as culturas foram centrifugadas a 8.000 *g* durante 10 min. e o precipitado foi macerado com nitrogênio líquido e homogeneizado (10:1 m/v) em 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5), contendo 1 mM EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético), 3 mM DTT (Ditiotreitol), e 5% (m/v) polivinilpolipirrolidona (GOMES JÚNIOR et al., 2007), e mantidas a 4 °C. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 *g* durante 30 min., o sobrenadante foi separado em alíquotas de 300 µL e congelado para posteriores análises enzimáticas. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA como padrão. Os resultados foram expressos em µmol/g de massa fresca.

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

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

A atividade de SOD-PAGE foi realizada de acordo com Beauchamp e Fridovich (1971) e modificado por Medici et al. (2004), no qual os géis foram lavados em água destilada e incubados no escuro, durante 30 min., em 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,8) contendo 1 mM EDTA, 0,005 mM de riboflavina, 0,1 mM de nitroazul de tetrazólio e 0,03 mM de temed (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina). Os géis foram expostos à luz branca e imersos em água até a revelação das bandas de SOD.

4.7.3 Atividade de CAT

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

4.8 Análise de saturação de lipídeos

As culturas, obtidas conforme descrito no item 4.3, foram centrifugadas a 8.000 g durante 5 min a 4°C. O precipitado foi lavado duas vezes com tampão PBS (8 g L⁻¹ de NaCl, 0,2 g L⁻¹ de KCl, 1,44 g L⁻¹ de Na₂HPO₄, 0,24 g L⁻¹ de KH₂PO₄) e liofilizado. A extração de lipídeos foi realizada como descrito por Bligh e Dyer (1959), com modificações. Os lipídeos de membrana foram analisados por espectroscopia de infravermelho (FTIR - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) em transmitância, nos comprimentos de onda de 400 a 4000 cm⁻¹ (utilizando 100 mg de KBr – Brometo de potássio).

4.9 Análise *in silico*

Para ajudar a compreender as interações entre as enzimas envolvidas no estresse oxidativo, utilizou-se o programa STRING 9.1 (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*), que tem como base um banco de dados das associações funcionais que tenham sido pré-computadas derivadas de uma ampla variedade de fontes, tais como dados experimentais de alto rendimento, literatura, análises de genes co-expressos e previsões computacionais.

Para este estudo, o banco de dados foi consultado usando “*superoxide dismutase*” e optou-se por *sodA* e *sodB*, selecionando-se as interações disponíveis para o *E. coli* K-12. As interações foram delineadas com base em um nível de confiança médio (0,7 mais do que 50%). O agrupamento de moléculas que partilham certo grau de similaridade, em termos de associação funcional, foi obtido aplicando o algoritmo *k-means clustering*, que é baseado na matriz de adjacência e descreve dados para um pré-definido número de clusters.

4.10 Análises Estatísticas

Os dados relativos à quantificação de H_2O_2 , quantificação de MDA, viabilidade celular, crescimento bacteriano e atividade de CAT foram analisados estatisticamente com três repetições para cada tratamento e com delineamento aleatório. A significância das diferenças foi mensurada por meio de análise de variância ($P > 0.05$). As análises foram feitas com R software versão 3.0.1., seguindo o método de Duncan para as comparações entre tratamentos e também para as comparações entre horários.

Para avaliar estatisticamente a saturação de lipídios, as linhas de base dos espectros obtidos foram corrigidas, e então processadas por PCA (análise de componentes principais) implementado no Pirouette v. Software 4.0. A PCA foi aplicada para separar as amostras de acordo com os seus espectros de FTIR (1.400 a 3.200 cm^{-1}). Portanto, os resultados obtidos para cada comprimento de onda foram representados como colunas e as amostras na forma de linhas. Foram utilizados os pré-processamentos centrado na média e range scale para tratar os dados.

5. Resultados e Discussão

Escherichia coli K-12 tolera a toxicidade dos herbicidas paraquat, 2,4-D e atrazina por meio de sistema de respostas não específicas

Resumo

Microrganismos representam componentes essenciais na manutenção dos ciclos biogeoquímicos e de ecossistemas. Em ambientes agrícolas, o uso contínuo de herbicidas para minimizar a perda na produtividade pode acarretar danos inibindo o crescimento em microrganismos. Uma das causas desta inibição é o aumento da produção de ERO (espécies reativas de oxigênio), como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxila ($OH^{\cdot}$), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), causando estresse oxidativo. A magnitude deste estresse pode ser condicionada pelo grupo químico e pelo modo de ação do herbicida. As respostas celulares contra ERO envolvem o aumento na expressão de enzimas como superóxido dismutase e catalase, responsáveis pela dismutação de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , respectivamente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre o efeito de herbicidas com diferentes modos de ação e as respostas das isoenzimas de superóxido dismutase (SOD) na bactéria *Escherichia coli* K-12. Assim, foram utilizados os herbicidas 2,4-D, atrazina e paraquat, e linhagens mutantes de *E. coli* K-12 nocauteadas para os genes codificantes das enzimas Mn-SOD (*sodA*) e Fe-SOD (*sodB*). Os herbicidas mostraram-se capazes de promover o desequilíbrio do potencial redox, aumentando a produção de H_2O_2 e malondialdeído (MDA), acima das taxas observadas nos controles e de forma distinta entre as linhagens. Expostas ao paraquat, o qual origina ciclisto redox *in vivo*, as linhagens de *E. coli* *wt* e Δ *sodB* apresentaram aumento na produção de H_2O_2 , além de aumento na atividade de Mn-SOD, provavelmente como consequência da ativação do SoxR, o qual promove a transcrição do gene *sodA*. Em Δ *sodA*, os índices de toxicidade com o paraquat não foram maiores que o controle, indicando uma possível regulação da expressão da enzima Fe-SOD pelo fator transcricional OxyR. Nossos resultados indicaram que a deleção dos genes codificantes para SOD provocaram padrões nas respostas antioxidativas, de acordo com os tempos testados, independentemente dos herbicidas. Para Δ *sodB*, os danos foram menores no tempo de 9h; já em Δ *sodA*, os danos foram menores no tempo de 5h, demonstrando a importância do papel destes genes na defesa contra o estresse oxidativo em diferentes fases de crescimento. As respostas celulares demonstraram que, apesar dos índices de toxicidade observados, as linhagens foram capazes de crescer em taxas próximas às verificadas no controle, incluindo ainda um aumento do valor adaptativo em Δ *sodA*, o que indica uma plasticidade ampla de respostas e um potencial de adaptação rápida. Ampliando esta hipótese, considerando um ambiente contendo uma molécula tóxica, e uma bactéria que possua um sistema polimórfico para SOD, caso ocorra uma mutação no gene para uma de suas isoformas, ela poderá aumentar a viabilidade celular e ainda manter uma enzima antioxidativa funcional. Sugere-se que *E. coli* K-12, uma linhagem desenvolvida em laboratório e provavelmente com baixa capacidade de sobrevivência em ambiente natural, apresenta mecanismos de tolerância *in vitro* a herbicidas, mesmo sem seleção prévia. Tal modelo de plasticidade fenotípica poderia ser encontrado em outras bactérias de solo agrícola com alta rotatividade de culturas e intenso uso de herbicidas, podendo causar um impacto considerável na diversidade e funcionalidade desta microbiota.

Palavras chave: microbiologia ambiental, estresse oxidativo, superóxido dismutase, peróxido, malondialdeído.

Abstract

Microorganisms are essential components in the maintenance of biogeochemical cycles and ecosystems. In agricultural environments, continuous use of herbicides to minimize the loss in productivity could damage growth inhibition of micro-organisms. One cause of this inhibition is increased production of ROS (reactive oxygen species), such as superoxide radicals ($O_2^{\cdot-}$) and hydroxyl ($OH^{\cdot}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2), causing oxidative stress. The magnitude of this stress can be conditioned by the chemical group and mode of action of the herbicide. The cell responses against ROS involve an increase in the expression of enzymes such as superoxide dismutase and catalase, responsible for the dismutation of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 , respectively. The objective of this study was to evaluate the relationship between the effect of herbicides with different modes of action and answers of superoxide dismutase (SOD) isoenzymes in the bacterium *Escherichia coli* K-12 bacteria. For this, 2,4-D, paraquat and atrazine herbicides were used, and knockout strains of *E. coli* K-12 strains carrying mutations in the gene encoding Mn-SOD (*sodA*) and Fe-SOD (*sodB*). Herbicides were shown to be capable of promoting the imbalance of redox potential, increasing the production of H_2O_2 and malondialdehyde (MDA) above the rates observed in controls and differently between strains. Exposed to paraquat, which induces in vivo redox cycling, strains of *E. coli* *wt* and Δ *sodB* showed increased production of H_2O_2 , and increase in the Mn-SOD activity, probably as a result from activation of the SoxR, which promotes the transcription of the gene *sodA*. In Δ *sodA*, the toxicity rates with paraquat were not higher than the control, indicating a possible regulation of the Fe-SOD expression by OxyR transcriptional factor. Our results indicated that deletion of genes encoding SOD enzymes originated patterns of antioxidative responses, according to the tested periods of time, regardless the herbicides. To Δ *sodB*, the damage was minor in time 9pm; but in Δ *sodA*, the damage was minor in time 5pm, demonstrating the important role of these genes in the defense against oxidative stress in different stages of growth. Cellular responses demonstrated despite the observed toxicity indices, the strains were able to grow at rates close to those verified in control, including an increase in the fitness value in Δ *sodA*, which indicates a wide plasticity of responses, and a potential for a quick fitting of *E. coli* K-12. Extending this hypothesis, considering an environment containing a toxic molecule, such as an herbicide, and a bacterium having a polymorphic system for SOD, if a mutation appears in a gene coding for isoforms, it may show an increase in cell viability and still maintain a functional antioxidative enzyme. We suggest that *E. coli* K-12, a strain created in a laboratory, and with probably low survivability in a natural environment, developed mechanisms of *in vitro* herbicide tolerance, even without previous selection. This phenotypic plasticity model might be found in other bacteria of agricultural land, with high turnover of cultures and intense use of herbicides, which could cause a considerable impact on the diversity and functionality of soil microbiota.

Key words: environmental microbiology, oxidative stress, superoxide dismutase, peroxide, malondialdehyde.

5.1 Introdução

O equilíbrio de ecossistemas ocorre por meio da manutenção das funções desempenhadas por vários organismos, sendo que os microrganismos representam um fator muito importante, pois além de ocuparem os mais diversos habitats, ainda apresentam funções metabólicas particulares, e de extrema relevância para a ciclagem de nutrientes. Em ecossistemas agrícolas o uso contínuo de herbicidas e outros compostos químicos, visando à minimização de perda na produtividade, podem acarretar efeitos danosos em organismos não alvos (VAN EERD et al., 2003). Uma consequência da exposição de microrganismos a herbicidas é a elevada concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (LÜ et al., 2004; OLCANHESKI et al., 2014; PETERS et al., 2014; MARTINS et al., 2011a)

As ERO, como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), são radicais livres produzidos durante o metabolismo normal de organismos aeróbios, porém, o acúmulo de ERO pode ser intensificado por fatores ambientais, como no caso de herbicidas, podendo chegar a níveis acima da capacidade de defesa da célula, condição denominada estresse oxidativo. Herbicidas, estão disponíveis em uma gama de formas químicas e modos de ação. Tais características estão acopladas a magnitude da toxicidade destes agentes.

O 2,4-D, a atrazina e o paraquat, são herbicidas de ampla aplicação em lavouras. São herbicidas com estruturas moleculares diferentes (Fig.1) e, conseqüentemente, possuem modos de ação distintos. Porém, todos apresentam alta eletronegatividade. Em plantas esses herbicidas são caracterizados por agirem em sítios específicos: o 2,4-D age interferindo a ação da RNA-polimerase, atrazina atuando sob fotossistema II e o paraquat agindo no fotossistema I, devido a capacidade redutora destes químicos, a geração de ERO é o resultado comum. Em microrganismos, as ações redox destes herbicidas funcionam da mesma forma geral que ocorre nas plantas, porém ativando outras vias metabólicas.

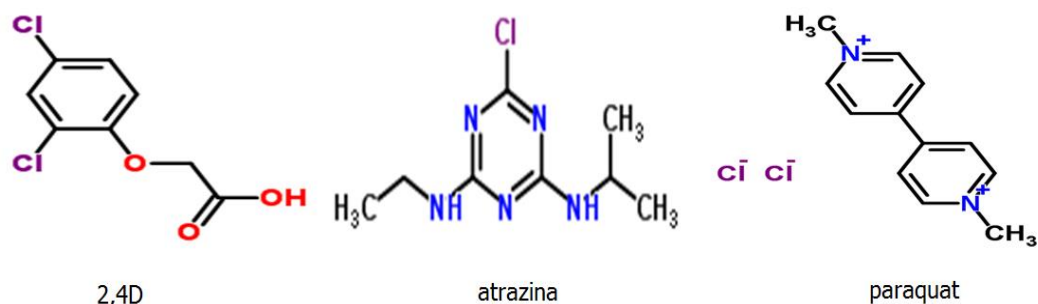


Figura 1: Representação da formula molecular dos herbicidas 2,4-D, atrazina e paraquat.

As respostas celulares, nesta condição, incluem o aumento na atividade de enzimas específicas que são capazes de metabolizar ERO (SCANDALIOS, 2005; LÜ et al., 2009; MARTINS et al., 2011b). Enzimas como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), responsáveis pela dismutação de $O^{\cdot -2}$ e H_2O_2 , respectivamente, vem sendo relacionado à sobrevivência em ambientes estressantes.

Escherichia coli é um modelo importante no estudo de enzimas do sistema antioxidante. A SOD, a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo (GRATÃO et al., 2005), é encontrada nesse organismo sob forma de 3 isoenzimas, localizadas no citoplasma as isoenzimas manganês (Mn) SOD, codificada pelo gene *sodA*, sob controle dos regulons SoxRS e Fur (*ferric uptake regulon*); e a ferro (Fe) SOD, codificada por *sodB*, sob controle de Fur; a terceira isoenzima cobre/zinco (Cu/Zn) SOD, codificada pelo gene *sodC*, está presente no espaço periplasmático e é controlada pelo regulon RpoS (IMLAY, 2013). Em resposta a exposição a herbicidas, SOD pode apresentar variações na sua atividade. Estas diferenças de atividade podem estar relacionadas ao metabolismo de adaptação a toxicidade do xenobiótico. (LU, et al., 2004; YAO et al., 2006).

Este estudo foi realizado visando encontrar a atividade diferencial das isoenzimas de SOD ao estresse oxidativo causado por herbicidas com diferentes modos de ação (paraquat, atrazina e 2,4-D), usando como modelo mutantes da bactéria *Escherichia coli* K-12, para os genes codificantes das enzimas Mn-SOD (*sodA*) e Fe-SOD (*sodB*).

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Linhagens bacterianas

Foram utilizadas as linhagens selvagem (*wt* – linhagem controle) da bactéria *Escherichia coli* BW25133, derivada da linhagem K-12, e as mutantes da mesma Δ *sodA* e Δ *sodB* foram obtidas da “KEIO Knockout Collection” (BABA et al., 2006). As linhagens mutantes tiveram os respectivos genes substituídos por um gene que confere resistência à canamicina por meio do método “Red Swap” (DATSENKO E WANNER, 2000).

5.2.2 Herbicidas

Foram utilizados os herbicidas Gramoxone 200® (Syngenta), contendo o princípio ativo paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-dipiridílio dicloro); Aminol 806® (Milenia Agro Ciencias), com ácido 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético); e Primóleo® (Syngenta), contendo atrazina (6-cloro-N2-etil-N4-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina).

5.2.3 Crescimento bacteriano

O meio utilizado como controle foi: LB (Caldo Luria: 10 g L⁻¹ de triptona, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura e 10 g L⁻¹ de NaCl). Os tratamentos foram realizados nos seguintes meios: PQ (LB com 0,185 mM de Gramoxone, o que equivale à 1 × FR [dose de campo]), 2,4-D (LB com Aminol na concentração equivalente de 0,226 mM de 2,4-D) e ATZ (LB com 0,147 mM de Primoleo). As condições de crescimento foram a 37 °C em mesa agitadora orbital sob agitação de 150 rpm. Os ensaios foram realizados em volumes de 100 mL (250 mL- volume total do frasco) em triplicata.

O pré-inóculo foi obtido pelo crescimento das linhagens em LB em fase log de crescimento (obtido em aproximadamente 5h de incubação). O pré-inóculo foi transferido para cada tratamento em uma D.O. (densidade óptica) inicial de 0,05, a 600 nm. No início do crescimento bacteriano, o monitoramento ocorreu a cada

30 min. e após atingir a fase log a cada hora, sendo diluídas as amostras sempre que as leituras atingissem valores de aproximadamente 0,6, para minimizar os erros nas leituras, os valores foram multiplicados pelos fatores de diluição correspondentes.

Para o cultivo em meio sólido, foram retiradas alíquotas de 100 µL nos tempos de 5h (meio da fase log) e 9h (fim da fase log). As amostras foram diluídas até 10^{-7} e 10^{-8} e plaqueadas em LA (LB + ágar 15 g L^{-1}) e incubadas à 37 °C. A contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada em 12 h de incubação.

5.2.4 Preparação das amostras para quantificação de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica

O crescimento deu-se conforme descrito no item 4.3. As culturas foram centrifugadas a 8.000 g durante 10 min., sendo o sobrenadante descartado e o precipitado macerado com nitrogênio líquido. As amostras foram pesadas 0,1g e congeladas para posterior análise.

5.2.5 Quantificação de Peróxido de hidrogênio

O H_2O_2 foi quantificado por meio da liberação de iodo, proveniente da reação com 200 µL de amostra (100mg de extrato proteico homogeneizadas com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% e centrifugado a 10.000 g por 15 min a 4 °C), 0,2 mL de tampão fosfato de potássio ($14,52 \text{ g L}^{-1}$ de K_2HPO_4 , $2,26 \text{ g L}^{-1}$ de KH_2PO_4 , pH 7,5) e 0,8 mL de iodeto de potássio 1M, mantida por 1 hora em gelo, no escuro. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 390nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/g}$ de massa fresca.

5.2.6 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação da produção de MDA (malondialdeído), metabólito reativo ao TBA (ácido 2-tiobarbitúrico) (HEALTH E PACKER, 1968, com modificações). De cada amostra 0,1 g foi homogeneizado com 1 mL de TCA 0,1% e centrifugados a 11600 *g* por 5 min. Do sobrenadante, foi retirada uma alíquota de 0,25 mL e transferida para outro tubo com 1 mL de solução contendo TCA 20% e TBA 0,5%. A mistura foi colocada em banho-seco por 30 min a 95 °C, e resfriada em gelo por 10 min. As amostras foram centrifugadas por 10 min. a 11600 *g*. As concentrações de MDA foram monitoradas a 535 nm (todos os lipídeos) e 600 nm (todos menos o MDA) e as suas concentrações foram calculadas utilizando um coeficiente de extinção de 155 mMcm⁻¹. A quantidade de MDA foi expressa em µmol/g de massa fresca.

5.2.7 Análise do sistema antioxidante

5.2.7.1 Extração de proteínas para análises de estresse oxidativo

O crescimento celular deu-se conforme o Item 4.3. As extrações foram realizadas nos tempos de 5h e 9h. Para a extração das enzimas, as culturas foram centrifugadas a 8.000 *g* durante 10 min. e o precipitado foi macerado com nitrogênio líquido e homogeneizado (10:1 m/v) em 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5), contendo 1 mM EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético), 3 mM DTT (Ditiotreitol), e 5% (m/v) polivinilpolipirrolidona (GOMES JÚNIOR et al., 2007), e mantidas a 4 °C. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 *g* durante 30 min., e o sobrenadante foi separado em alíquotas e congeladas para posteriores análises enzimáticas. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA como padrão. Os resultados foram expressos em µmol/g de massa fresca.

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

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

A atividade de SOD-PAGE foi realizada de acordo com Beauchamp e Fridovich (1971) e modificado por Medici et al. (2004), no qual os géis foram lavados em água destilada e incubados no escuro, durante 30 min., em 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,8) contendo 1 mM EDTA, 0,005 mM de riboflavina, 0,1 mM de nitroazul tetrazólio e 0,03 mM de temed (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina). Os géis foram expostos à luz branca e imersos em água até a revelação das bandas de SOD.

5.2.7.3 Atividade de CAT

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

5.2.8 Análise de saturação de lipídeos

O crescimento deu-se conforme descrito no item 4.3. As culturas foram centrifugadas a 8.000 g durante 5 min a 4°C. O precipitado foi lavado duas vezes com tampão PBS (8 g L⁻¹ de NaCl, 0,2 g L⁻¹ de KCl, 1,44 g L⁻¹ de Na₂HPO₄, 0,24 g L⁻¹ de KH₂PO₄) e liofilizado. A extração de lipídeos foi realizada como descrito por Bligh e Dyer (1959), com modificações. Os lipídeos de membrana foram analisados por espectroscopia de infravermelho FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) em transmitância, nos comprimentos de onda de 400 a 4000 cm⁻¹ (utilizando 100 mg de KBr – Brometo de potássio).

5.2.9 Análise *in silico*

Para ajudar a compreender as interações entre as enzimas envolvidas no estresse oxidativo, utilizou-se o STRING 9.1 (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*), que tem como base um banco de dados das associações funcionais que tenham sido pré-computadas derivadas de uma ampla variedade de fontes, tais como dados experimentais de alto rendimento, literatura, análises de genes co-expressos e previsões computacionais.

Para este estudo, o banco de dados foi consultado usando “*superoxide dismutase*” e optou-se por *sodA* e *sodB* selecionando as interações disponíveis para o *E. coli* K-12. As interações foram delineadas com base em um nível de confiança médio (0,7 mais do que 50%). O agrupamento de moléculas que partilham certo grau de similaridade, em termos de associação funcional, foi obtido aplicando o algoritmo *k-means clustering*, que é baseado na matriz de adjacência e descreve dados para um pré-definido número de clusters.

5.2.10 Análise Estatística

Os dados relativos à quantificação de H_2O_2 , quantificação de MDA, viabilidade celular, crescimento bacteriano e atividade de CAT foram analisados estatisticamente com três repetições para cada tratamento e com delineamento aleatório. A significância das diferenças foi mensurada por meio de análise de variância ($P > 0.05$). As análises foram feitas com R software versão 3.0.1., seguindo o método de Duncan para as comparações entre tratamentos e também para as comparações entre horários.

Para avaliar estatisticamente a saturação de lipídios, a linha de base dos espectros obtidos foram corrigidos, e então processado por PCA (análise de componentes principais) implementado no Pirouette v. Software 4.0. APC foi aplicado para separar as amostras de acordo com os seus espectros de FTIR (1.400 a 3.200 cm^{-1}). Portanto, os resultados obtidos para cada comprimento de onda foram representados como colunas e as amostras na forma de linhas. Foram utilizados os pré-processamentos centrado na média e range scale para tratar os dados.

5.3 Resultados e Discussão

Caracterização dos herbicidas como agentes estressantes para *E.coli* K-12

Herbicidas tem demonstrado potencial para aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) no meio intracelular, (VOIE E FONNUM, 2000; COTEUR et al., 2001; RUIZ-LEAL E GEORGE, 2004; PAZMIÑO et al., 2011) o que, conseqüentemente pode levar a peroxidação lipídica, que são modificações nos lipídios de membrana e tem resposta sobre as taxas de crescimento bacteriano (PETERS et al., 2014; OLCCHANHESKI et al., 2014). Neste trabalho, foram considerados índices de danos causados à *E. coli* K-12 pelos herbicidas, os seguintes fatores: produção de espécies reativas, peroxidação lipídica, saturação dos lipídios e monitoramento do crescimento e viabilidade celular.

Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

O primeiro composto avaliado como dano causado em *E. coli* foi o H_2O_2 , o qual é formado a partir da enzima SOD, responsável pela conversão do $O_2^{\bullet -}$ em H_2O_2 e oxigênio molecular. A quantificação dessa ERO nas linhagens *wt* e $\Delta sodA$, $\Delta sodB$ na presença dos herbicidas é representada na Fig. 2.

A quantidade de H_2O_2 , na presença do herbicida 2,4-D (Fig. 2), aumentou significativamente apenas para a linhagem *wt* nos tempos de 5h e 9h, em relação ao controle. Provavelmente, esse aumento se deu pelo fato da linhagem *wt* possuir três enzimas capazes de converter o $O_2^{\bullet -}$ em H_2O_2 . Embora os mecanismos exatos pelos quais este herbicida promova a produção de ERO em células bacterianas ainda não sejam totalmente compreendidos, estudos com outros modelos demonstram sua toxicidade. Um estudo realizado em peixes demonstrou a indução do estresse oxidativo em células do fígado que metabolizaram este herbicida (MARTINEZ-TABCHE et al., 2004). Em plantas, observou-se que o 2,4-D possui capacidade de alterar a síntese de proteínas e a divisão celular (STEVENS E BRECKENRIDGE, 2001). Em leveduras, estes mecanismos foram um pouco mais elucidados, incluindo a regulação positiva de genes envolvidos na beta-oxidação peroxissomal e da fosforilação oxidativa

mitocondrial, processos metabólicos que conduzem à produção endógena de ERO (ROMERO-PUERATS et al., 2004).

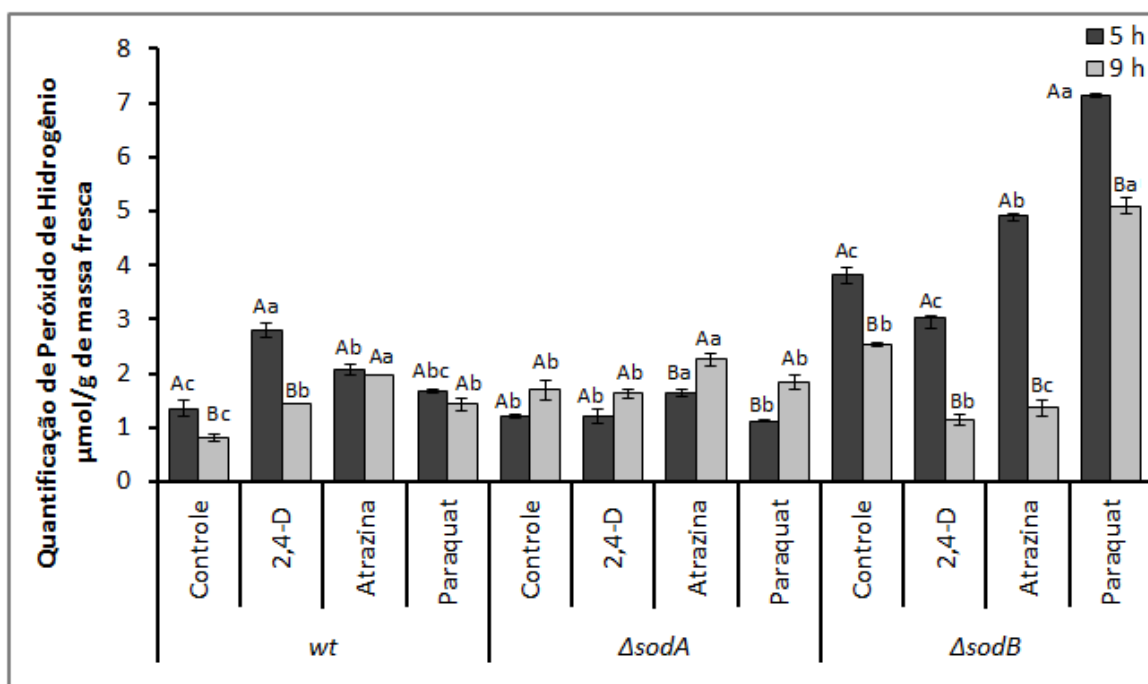


Figura 2: Quantificação de H_2O_2 em linhagens de *E. coli* K-12 expostas aos herbicidas 2,4-D, atrazina, paraquat, e em controle, após 5h e 9h de incubação. As médias foram comparadas por ANOVA. Utilizou-se o teste de Duncan com $p \leq 0,05$. Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística significativa, sendo letras minúsculas em relação aos tratamentos e letras maiúsculas em relação aos tempos de incubação.

As três linhagens apresentaram maior quantidade de H_2O_2 se comparadas à linhagem controle, quando expostas ao herbicida atrazina, sendo este aumento em $\Delta sodb$ apenas no tempo de 5h (Fig. 2), demonstrando o efeito toxico do herbicida independente das isoenzimas presentes. A geração de ERO induzida por atrazina já havia sido relatada em células bacterianas em dois estudos de Zhang et al. (2012a; 2012b), os quais justificaram o aumento da produção de ERO pelo desequilíbrio do potencial redox gerado pelo contato ao herbicida, o que pode levar a um distúrbio metabólico. Este mecanismo, aparentemente, segue o mesmo princípio metabólico descrito para plantas, nas quais a atrazina inibe o processo de transferência de elétrons fotossintéticos, e a síntese de ATP e NADPH, no cloroplasto, é comprometida. Isso resulta em uma incapacidade de fixar CO_2 e produzir os nutrientes necessários para a planta sobreviver. O bloco

de transferência eletrônica não funcional causa estresse oxidativo, e gera radicais que provocam danos celulares rápidos (MARKWELL E NAMUTH, 2003).

Na presença do herbicida paraquat, a linhagem *wt* apresentou maiores quantidades de H_2O_2 apenas no tempo de 9h se comparado ao controle (Fig. 2), enquanto a linhagem $\Delta sodB$ apresentou maiores níveis de H_2O_2 em ambos os tempos testados em proporções significativamente maiores tanto em relação ao seu controle, quanto em relação a todos os tratamentos das outras linhagens.

Esta superprodução de H_2O_2 na linhagem $\Delta sodB$ (Fig. 2) provavelmente se dá pelo modo de ação deste herbicida, somado ao modo de defesa da célula que envolve o gene *sodA* (FUKUSHIMA et al., 2003). O paraquat promove algo conhecido como ciclo redox *in vivo*, sendo reduzido por um doador de elétrons, como NADPH, a um radical instável de paraquat, que posteriormente é reoxidado por um receptor de elétrons (ex.: O_2) produzindo $O_2^{\cdot-}$ intracelular por ordens de grandeza acima da taxa normal (GU E IMLAY, 2011). Como resposta adaptativa, a proteína SoxR expõe o cluster [2Fe-2S] em sua superfície, como um sensor para químicos que promovem o ciclo redox (WATANABE et al., 2008). Esse cluster é oxidado pelo paraquat e ativa a SoxR, a qual estimula fortemente a transcrição de um único gene, *soxS*. SoxS é produzida em grandes quantidades e, por sua vez, ativa a transcrição dos genes do regulon *soxRS* que consiste em pelo menos 14 genes, incluindo o gene *sodA*, envolvidos em funções que eliminam a causa do estresse oxidativo, (NUNOSHIBA et al., 1992; BLANCHARD et al., 2007). O gene *sodA* codifica a enzima Mn-SOD, que fará a conversão do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 .

Mecanismos semelhantes são sugeridos para explicar os níveis de H_2O_2 apresentados em *wt* em contato com o paraquat. Entretanto, na linhagem $\Delta sodA$, os níveis de H_2O_2 no tratamento com paraquat não são significativamente maiores em comparação com o tratamento controle (Fig.2) como era esperado caso os modelos de *sodA* e *sodB* funcionassem da mesma forma. Para melhor compreender estas discrepâncias avaliou-se as propriedades de interação das enzimas codificadas pelos genes *sodA* e *sodB* *in silico*, utilizando um banco de dados de interações físicas e funcionais entre proteínas pelo programa STRING 9.1 (Franceschini, et al. 2013). Utilizando-se o algoritmo *clustering k means*, foram obtidos quatro clusters (Fig. 3).

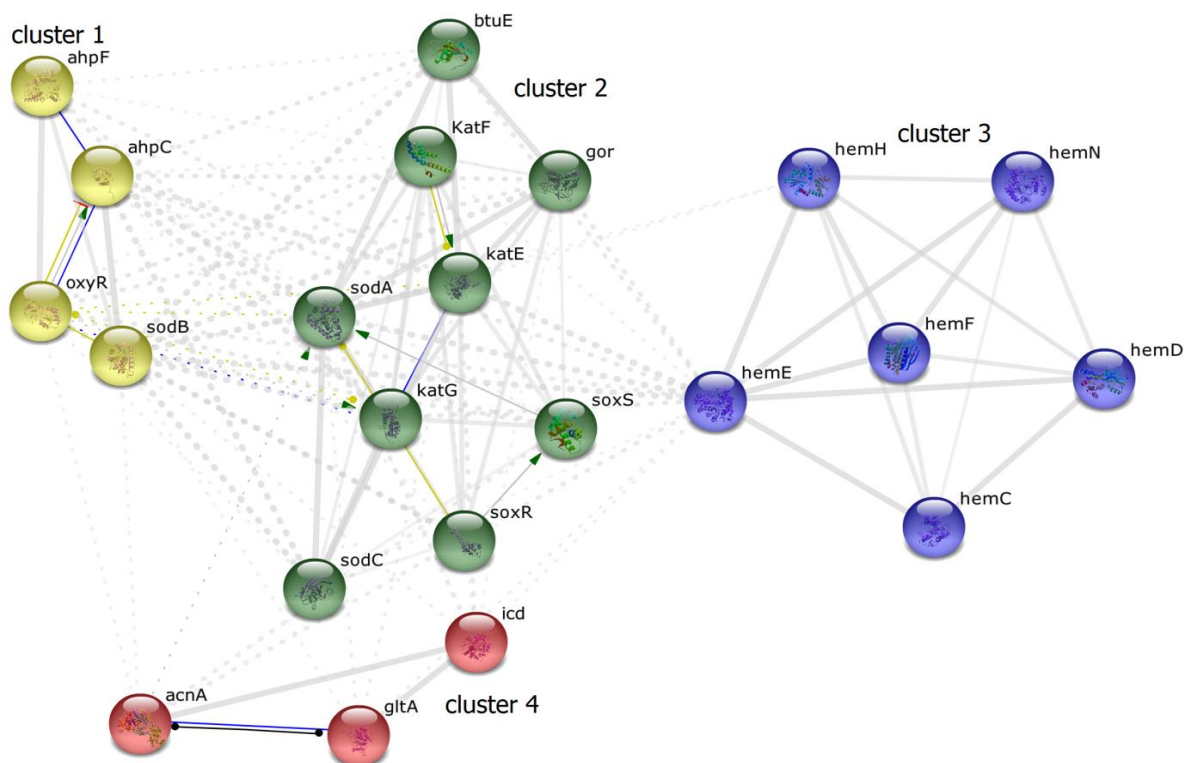


Figura 3: Representação gráfica da rede de interações dos genes *sodA* e *sodB* em *E.coli* K-12 obtido em STRING 9.1. O cluster 1, na cor amarela, representa a associação do gene *sodB* com duas peroxidases (*ahpF* e *ahpC*) e do fator transcricional das peroxidases (OxyR); o cluster 2, em verde, representa um grupamento de genes, incluindo o *sodA*, que apresentam interação de regulação; o cluster 3, na cor azul, é referente aos genes envolvidos na biossíntese de grupamentos heme; e o cluster 4, em vermelho, representa a interação entre os genes que codificam para as enzimas citrato cintase (*gltA*), isocitrato desidrogenase (*icd*) e aconitase (*acnA*).

Uma associação entre as proteínas codificadas pelos genes *sodB*, (alquil hidroperoxido redutase) e OxyR (regulador transcricional de hidroperoxidases) é observado no cluster 1. Além deste agrupamento, podem ser observados outros três. O cluster 2 agrupa o gene *sodA* com seu regulon soxRS, catalases e com o gene *sodC*, evidenciando maior proximidade entre estas proteínas. O cluster 3 é formado por genes envolvidos na biossíntese de grupamentos heme (composto de ferro complexado num anel de porfirina).

A correlação entre o gene *sodB*, observado no cluster 1, com o principal fator transcricional das peroxidases, oxyR, o qual detecta diretamente H_2O_2 , sugere a participação da enzima FeSOD no controle indireto do H_2O_2 , o que apoia os dados apresentados já que as duas linhagens que possuem esta enzima apresentaram níveis menores de H_2O_2 .

Peroxidação Lipídica

O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, e tem sido utilizado como indicador da peroxidação lipídica em diversos estudos que envolvem estresse oxidativo (LIMA E ABDALLA, 2001; DEL RIO ET al., 2005; BHATNAGAR et al., 2013; DANULESCU et al., 2014; PETERS et al., 2014). Os dados referentes a determinação dos níveis de MDA nas linhagens *wt* e Δ *sodA*, Δ *sodB* de *E. coli* K-12 na presença dos herbicidas, estão apresentados na Fig. 4.

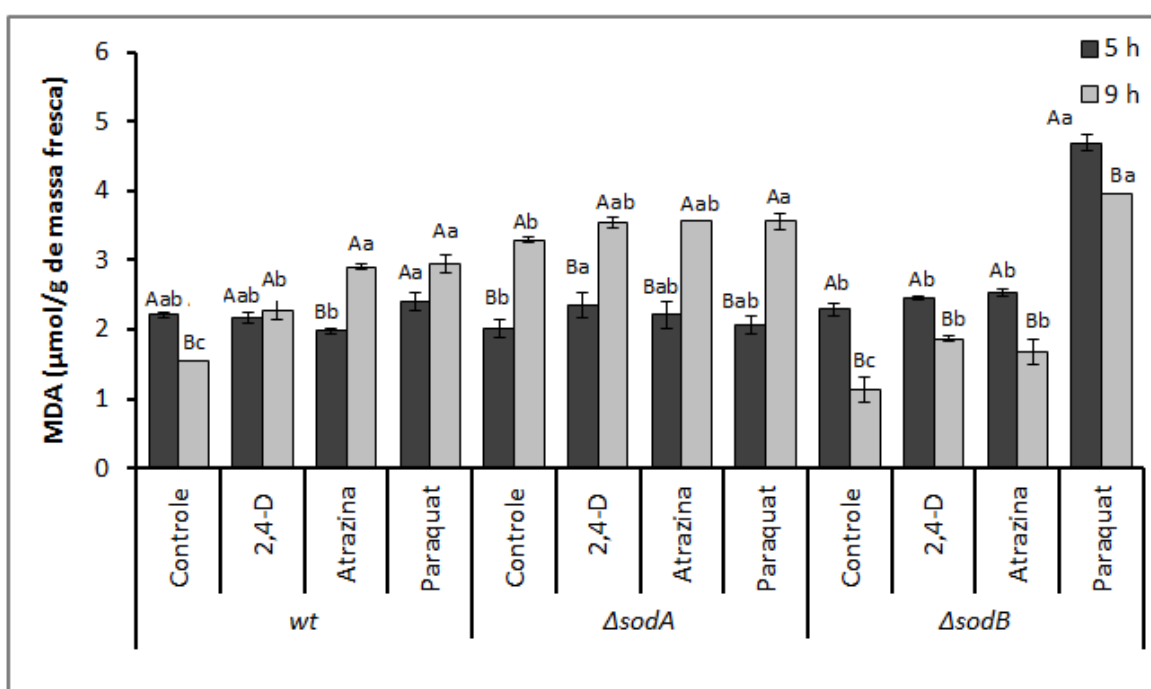


Figura 4: Quantidade de MDA em linhagens de *E. coli* K-12 expostas aos herbicidas 2,4-D, atrazina, paraquat, e em controle, após 5h e 9h de incubação. As médias foram comparadas por ANOVA. Utilizou-se o teste de Duncan com $p \leq 0,05$. Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística significativa, sendo letras minúsculas em relação aos tratamentos e letras maiúsculas em relação aos tempos de incubação.

Ao avaliar a quantificação de MDA nas três linhagens em contato com os herbicidas é possível observar danos de peroxidação lipídica apenas no tempo de 9h. Quando expostas aos herbicidas 2,4-D, pode-se verificar o aumento nos níveis de MDA apenas nas linhagens *wt* e Δ *sodB*, se comparado aos respectivos controles (Fig. 4), corroborando com nossos dados estudos demonstram que o 2,4-D pode ligar-se a certos fosfolípidos e perturbar interações físicas na

membrana, gerando assim altos níveis de peroxidação lipídica (BUKOWSKA, 2005).

Assim como observado com o herbicida 2,4-D, em exposição ao herbicida atrazina às taxas de MDA foram maiores que o controle para nas linhagens wt e $\Delta sodB$. O dano de membrana causado por este herbicida corresponde aos níveis de H_2O_2 observados na figura 1. Corroborando com nosso estudo, Nwani e colaboradores (2010) destacaram que o elevado nível de peroxidação lipídica no fígado de *Channa punctatus* (peixe) em resposta à exposição à atrazina sugeriu um aumento da produção de ERO.

Expostas ao paraquat as três linhagens mostraram taxas de MDA superiores ao controle (Fig. 4). O aumento da peroxidação lipídica a partir do paraquat provavelmente provém de seu modo de ação e de sua consequente geração de espécies reativas. Alguns estudos apresentam a peroxidação lipídica como sendo um mecanismo de toxicidade do paraquat, por exemplo, o estudo de Wei e colaboradores (2014) com grupos de ratos tratados com o paraquat que demonstrou altos níveis de MDA indicando estresse oxidativo nos tecidos renais.

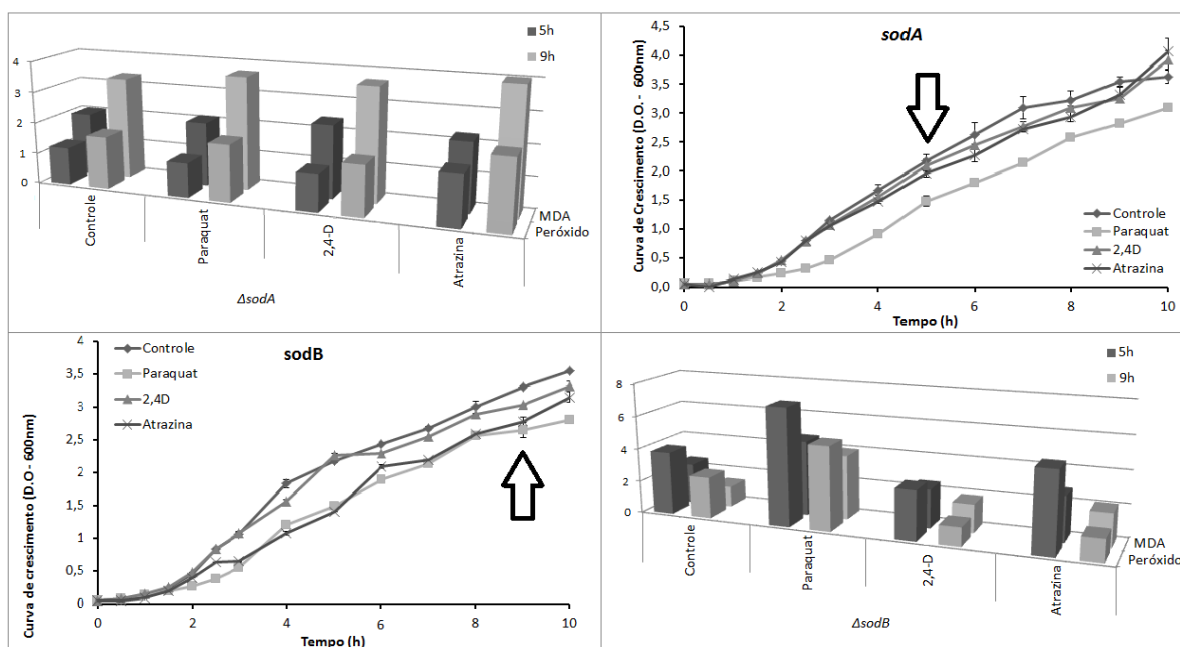


Figura 5: *Graphical abstract* mostrando o padrão de danos causados pelos herbicidas 2,4-D, atrazina e paraquat em *E. coli* K-12 nos diferentes tempos de incubação de acordo com a isoenzima de SOD nocauteada.

Considerando tanto os danos de membrana quanto a geração de ERO, pode-se destacar que, com a deleção dos genes codificantes das isoenzimas de SOD, houve um padrão nos danos relacionados aos tempos analisados (Fig. 5).

Assim, com a deleção do gene *sodA* os danos foram significativamente menores no tempo de 5h (meio da fase exponencial, considerando o período analisado). Com a deleção do gene *sodB* os danos foram significativamente menores no tempo de 9h (mais tarde na fase exponencial), demonstrando a importância do papel destes genes na defesa contra o estresse oxidativo em diferentes fases de crescimento. É importante salientar ainda que no tempo de 9h, que a deleção deste gene *sodA* gerou níveis de peroxidação lipídica maiores que os observados nos tratamentos da linhagem *wt*.

Segundo Imlay (2013) a regulação por Fur (*ferric uptake regulator*), um regulador do controle do metabolismo de ferro o qual é parte integrante da resposta de defesa antioxidante, que age de forma antagônica sobre as duas isoenzimas, assegura que o Fe-SOD é a enzima padrão, e que Mn-SOD é sintetizada quando Fe-SOD não pode ser ativada. Portanto, este padrão de resposta observado para as diferentes isoenzimas de SOD pode ser influenciado pela diferente regulação gênica destas enzimas.

Influência dos herbicidas sobre a viabilidade celular

O teste de viabilidade celular das linhagens de *E. coli* K-12, foi realizado, em contato com os herbicidas em duas fases distintas de crescimento, correspondente a 5 e 9 horas (Fig. 6).

A viabilidade celular é um teste mais sensível que os ensaios realizados em espectrofotômetro, sendo capaz de avaliar a perda da capacidade de formação de colônias. Os dados apresentados na Fig. 6 demonstram em todas as linhagens a redução da viabilidade celular quando expostas aos herbicidas nos tempos de incubação de 5h e 9h. Esta redução provavelmente é resultado da indução do estresse oxidativo pela presença dos herbicidas.

Entre os três herbicidas, a maior redução na viabilidade foi encontrada nas linhagens em contato com o paraquat possivelmente em consequência do aumento da síntese de enzimas, tem-se que a síntese excessiva de qualquer

enzima pode debilitar as células e impedem o crescimento, por outro lado, células de crescimento lento geralmente são menos vulneráveis a mecanismos de morte (IMLAY, 2015), sendo esta redução da viabilidade uma estratégia de adaptação celular ao xenobiótico.

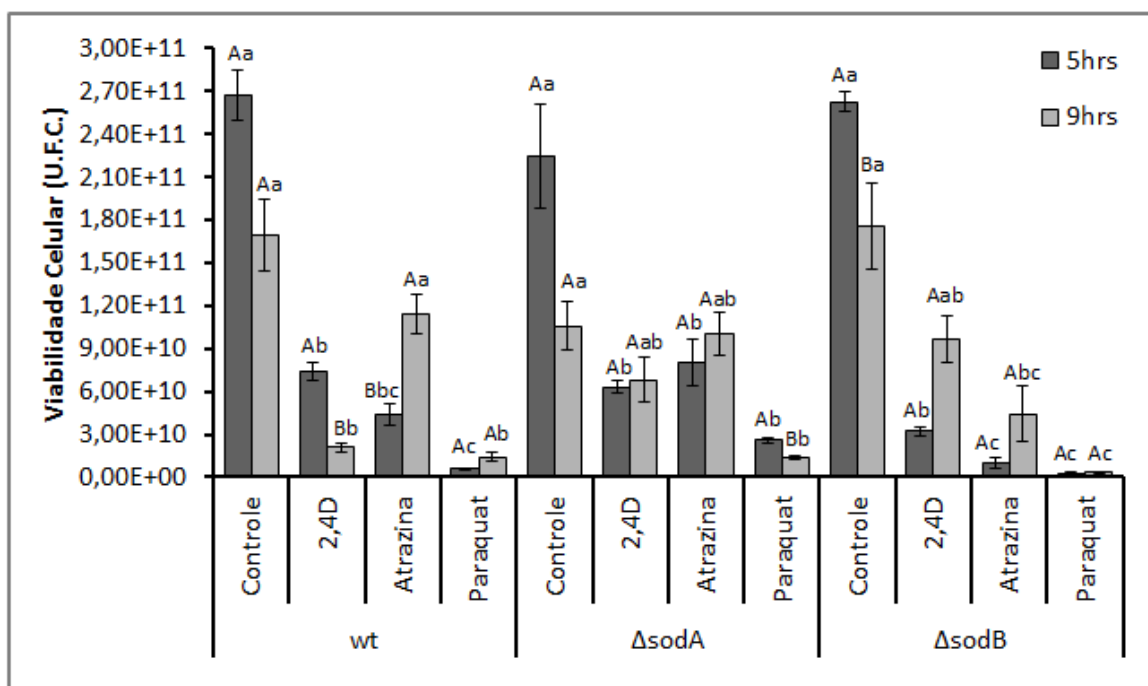


Figura 6: Viabilidade celular (em U.F.C.) de linhagens de *E. coli* K-12 expostas aos herbicidas 2,4-D, atrazina, paraquat, e em controle, após 5h e 9h de incubação. As médias foram comparadas por ANOVA. Utilizou-se o teste de Duncan com $p \leq 0,05$. Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística significativa, sendo letras minúsculas em relação aos tratamentos e letras maiúsculas em relação aos tempos de incubação.

Efeito dos herbicidas sobre a saturação de lipídios de membrana

As membranas celulares são extremamente sensíveis às diversas condições ambientais, e as alterações dos lipídeos de membrana se mostraram eficazes para manter a fluidez necessária para as atividades funcionais da célula, mesmo em condição de estresse (SCHERBER et al., 2009). Alguns estudos tem demonstrado o efeito de herbicidas sobre a modulação da composição lipídica da membrana (BALANGUÉ et al., 2001; OLCANHESKI et al., 2014).

A fim de compreender o efeito da peroxidação lipídica causada pelos herbicidas sobre a saturação de lipídios, a investigação por espectroscopia de

infravermelho foi realizada sob a fração de lipídios na busca de detectar mudanças.

Dentre os comprimentos de onda entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} obtidos nos espectros de FTIR, foram selecionados neste estudo, três bandas (Fig. 7), as quais foram utilizadas para o estudo estatístico (Fig. 8, 9 e 10). Sendo a banda 1 a porção de 2.955 cm^{-1} o estiramento do hidrogênio de carbono insaturado por ligação dupla ($\text{C}=\text{C}-\text{H}$), e as porções de 2.915 e 2.840 cm^{-1} são referentes a ligação ($\text{C}-\text{H}_2$ e $\text{C}-\text{H}_3$) de alcanos; a banda 2 na região de 1.740 cm^{-1} relativa à frequência de estiramento do grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$), característico dos ésteres, e, por fim a banda 3 com ácidos graxos de cadeia longa com um padrão de três bandas nas regiões 1.277 , 1.227 e 1.175 cm^{-1} (SILVERSTEIN E WEBSTER, 1998).

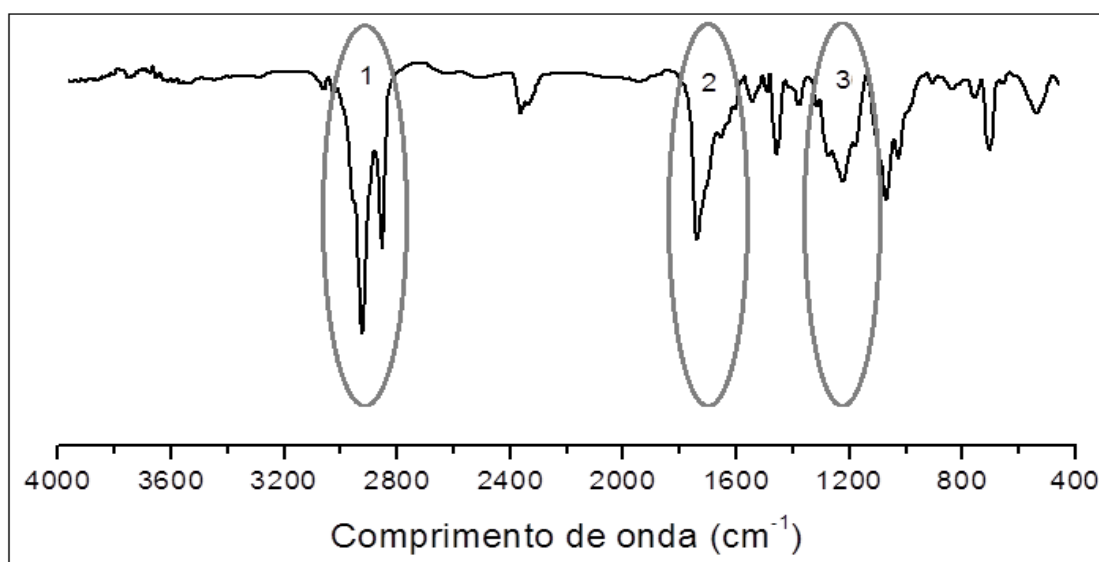


Figura 7: Espectro de FTIR obtido de uma amostra de ácidos graxos extraídos de *E. coli* K-12.

Para classificação dos espectros, foi realizada a Análise de Componentes Principais (PCA – Principal Components Analysis). Os resultados da PCA foram apresentados por meio de gráficos (Fig. 8, 9 e 10), que confrontam os PCs (componentes principais) ao deslocamento FT-IR, favorecendo a identificação das principais bandas que possibilitaram a classificação entre os espectros das amostras. Considerou-se o posicionamento dos tratamentos em quadrantes diferentes como mudanças de saturação.

A partir do gráfico de variáveis (dados não apresentados) obtivemos a separação por mudanças na saturação dos lipídios de membrana. De tal modo, para a linhagem *wt* observa-se que há uma mudança no padrão de saturação lipídica entre os tempos de incubação para o controle (Fig. 8), indicando uma mudança natural na composição lipídica de acordo com a fase de crescimento (CABISCOL, 2000).

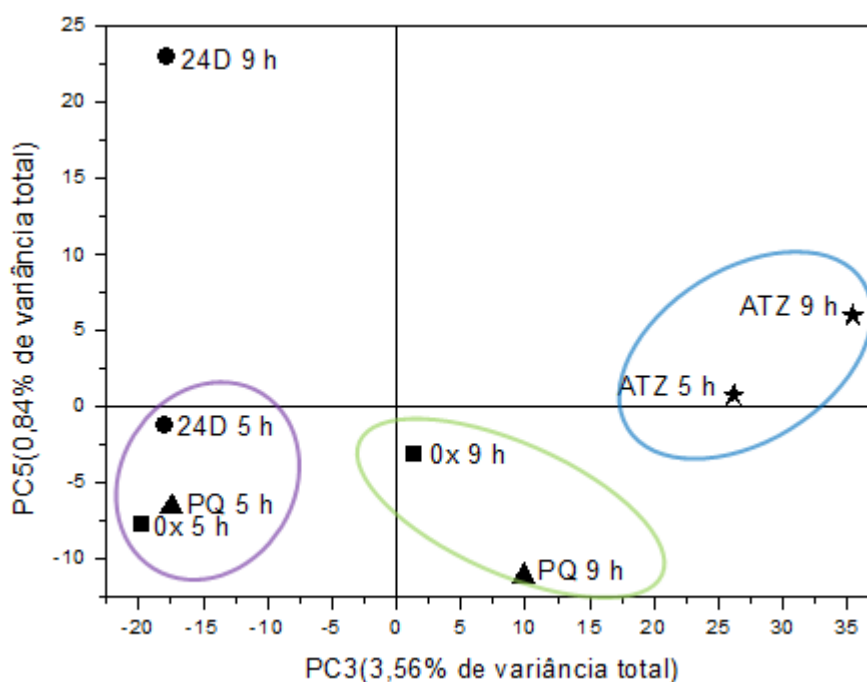


Figura 8: Análise de lipídios de *E. coli* K-12 *wt* usando FTIR e análise de componentes principais. Controle (■); 2,4-D(●); Atrazina (★); Paraquat (▲), os tempos de incubação estão discriminados na figura.

Na Fig. 8 observa-se modificação na saturação de lipídios para o tratamento com o atrazina em ambos os tempos de incubação, e para o tratamento com o 2,4-D apenas no tempo de 9h. As alterações na conformação de ácidos graxos saturados e insaturados de membrana plasmática poderiam ser consideradas uma proteção para as bactérias em contato com herbicidas. Balagué e colaboradores mostraram que houve uma diminuição de lipídios insaturados da membrana plasmática de *E. coli* HB101, após tratamento com 2,4-D, estes autores consideraram a redução da fluidez de membrana como um possível mecanismo de defesa contra os danos celulares. Nossos dados demonstram que, mesmo com estas mudanças, o aumento da peroxidação lipídica foi observada, possivelmente devido ao sítio de ação desses herbicidas,

os quais são voltados para modificações em proteínas ligadas a membrana em plantas, podendo funcionar da mesma forma metabólica em bactérias.

De forma contrária a *wt*, a linhagem $\Delta sodA$ não apresenta modificação na saturação entre os tempos de incubação no tratamento controle (Fig. 9), talvez a conservação da saturação em diferentes momentos do crescimento tenha ocasionado os danos mais altos em peroxidação lipídica observados no tempo de 9h, nesta fase a bactéria convive com uma quantidade maior de metabólitos, potencializando ainda mais os danos se não ocorre a modificação na membrana para sua proteção. Em contato com os herbicidas, a peroxidação lipídica é maior no tempo de 9h, já que sem mudança na saturação como forma de proteção, o contato com as substâncias tóxicas é mais crítico. A separação clara entre os tratamentos, mostrando a diferença de saturação pelo contato com os herbicidas pode ser observado na figura 9. O gráfico mostra que cada herbicida modificou a membrana de uma forma diferente nesta linhagem.

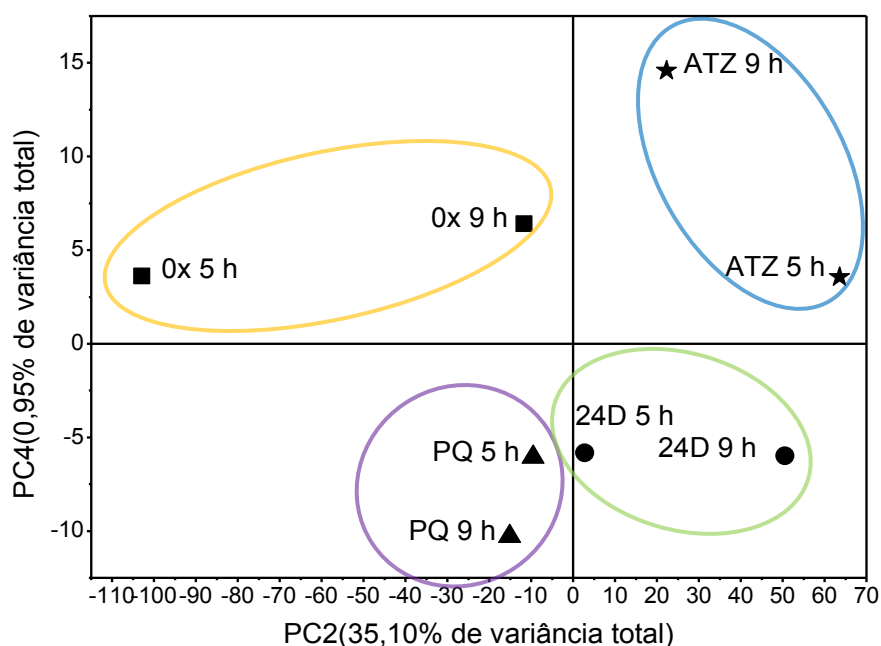


Figura 9: Análise de lipídios de *E. coli* K-12 $\Delta sodA$ usando FTIR e análise de componentes principais. (■); 2,4-D(●); Atrazina (★); Paraquat (▲), os tempos de incubação estão discriminados na figura.

A separação para os lipídios encontrados na linhagem $\Delta sodB$ se deu, basicamente, com relação aos tempos de incubação (Fig. 10). Assim como na

linhagem *wt*, ocorre modificação na saturação dos lipídios de membrana no tratamento controle.

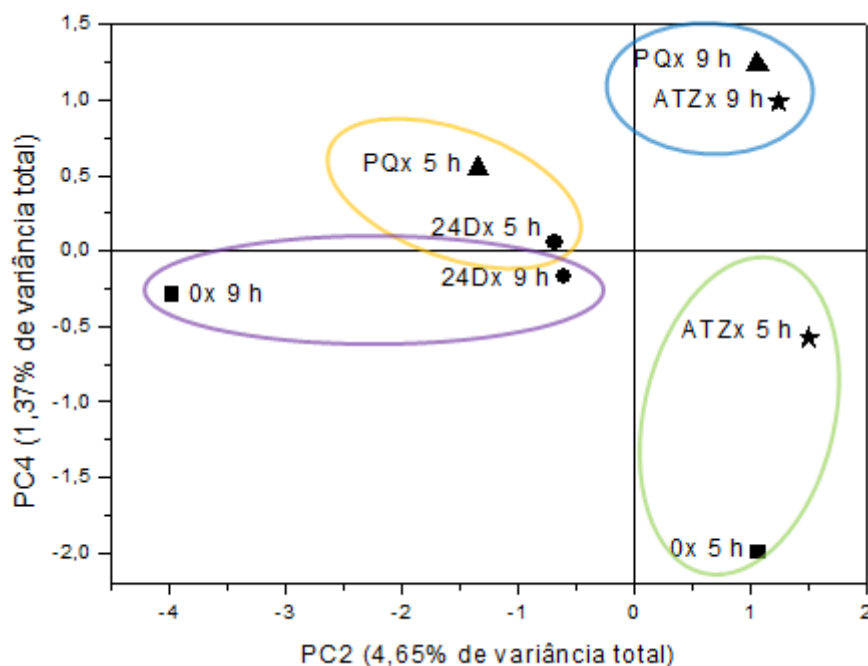


Figura 10: Análise de lipídios de *E. coli* K-12 Δ *sodB* usando FTIR e análise de componentes principais. (■); 2,4-D(●); Atrazina (★); Paraquat (▲), os tempos de incubação estão discriminados na figura.

As modificações nos tratamentos com herbicida são observadas, portanto para os herbicidas paraquat e 2,4-D em 5h, e paraquat e atrazina no tempo de 9h. Nesta linhagem como já havia sido relacionado, os tempos de 5h apresentaram maiores danos, tanto para quantificação de H_2O_2 , quanto para quantificação de MDA. De acordo com Böger et al., um aumento na proporção de ácidos graxos insaturados nas membranas celulares de bactérias, torna-as mais susceptíveis ao ataque por ERO, e induz a maiores taxas de produção de MDA.

Influência dos herbicidas sobre o crescimento bacteriano

Os herbicidas podem alterar as taxas de crescimento de bactérias degradadoras ou tolerantes (TIRONI et al., 2009) em relação aos controles. Os dados de crescimento nas linhagens *wt* e Δ *sodA*, Δ *sodB* de *E. coli* K-12 na presença dos herbicidas estão representados na Fig. 11.

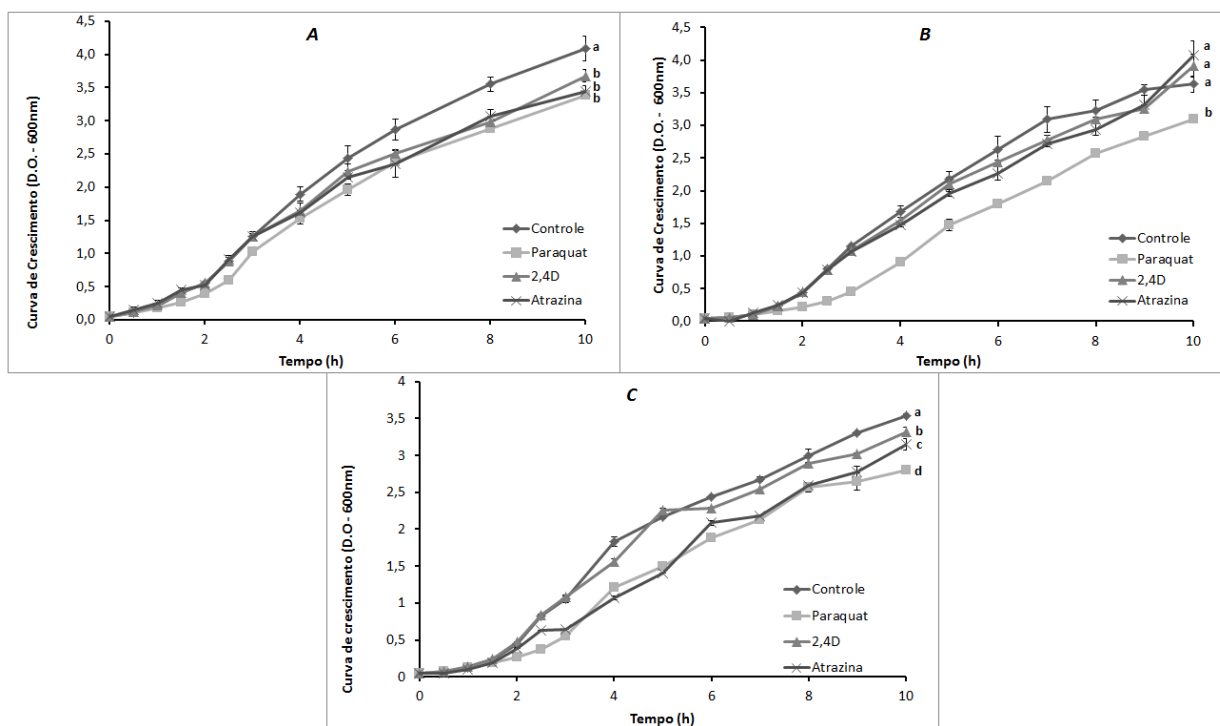


Figura 11: Curvas de crescimento (OD em 600 nm) de linhagens de *E. coli* K-12 expostas aos herbicidas 2,4-D, atrazina, paraquat, e em controle, após 5h e 9h de incubação, sendo A referente a linhagem *wt*, B representando $\Delta sodA$ e C $\Delta sodB$. As médias foram comparadas por ANOVA. Utilizou-se o teste de Duncan com $p \leq 0,05$. Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística significativa, sendo letras minúsculas em relação aos tratamentos e letras maiúsculas em relação aos tempos de incubação.

O crescimento da linhagem *wt* apresentou uma redução significativa nos tratamentos, em relação ao controle, (Fig.11), indicando que as ERO geradas pelos herbicidas podem danificar as células, diminuindo o crescimento bacteriano.

Outros trabalhos corroboram os dados apresentados, como em Balangué et al., com duas linhagens de *E. coli* expostas ao herbicida 2,4-D. Em um estudo de Zhang et al. (2012a) realizado com *Rhodobacter sphaeroides* W16, *Acinetobacter lwoffii* DNS32 e *Bacillus subtilis* B19, as tendências de crescimento de bactérias indicaram que as ERO gerada por atrazina e seus metabolitos podem danificar as células bacterianas e reduzir as taxas de crescimento, principalmente nas linhagens incapazes de degradação. Segundo Botelho et al. (2012), paraquat reduziu a taxa de crescimento em *E. coli* ATCC

25922, provavelmente associado com o modo de ação do herbicida, provocando a formação de $O_2^{\cdot-}$, o qual reage com os lipídios de membrana.

Assim, o consenso observado é que estes herbicidas amplificam a formação de ERO e produzem danos a células. Os resultados de nosso trabalho mostraram que *E. coli*, com o gene *sodB* nocauteado, apresentou uma escala crescente de toxicidade entre os herbicidas: 2,4-D < atrazina < paraquat. Com a falta da enzima Fe-SOD, provavelmente ocorreu uma redução da taxa metabólica como forma de defesa, de acordo com o grau de toxicidade do herbicida (Gérard et al., 1999; Moreau et al., 2001). Entretanto, um padrão diferente do que foi discutido até agora foi constatado quando o gene nocauteado foi o *sodA*. Nessa linhagem, a capacidade de crescimento frente aos herbicidas 2,4-D e atrazina se igualou ao tratamento controle, criando-se uma situação na qual o valor adaptativo em $\Delta sodA$ foi maior do que $\Delta sodB$. *sodA* e *sodB* possuem, como já discutido, diferentes sistemas de regulação e respondem a diferentes estímulos bioquímicos. As curvas de crescimento, por outro lado, representam um conjunto global de adaptação. Assim, outros fatores, além dos estudados nesse trabalho, devem estar ligados ao maior valor adaptativo $\Delta sodA$, observados nas condições definidas. A redução das taxas de crescimento não se constituiu em uma forma de defesa aos herbicidas para este gene. O paraquat reduziu as taxas de crescimento em todas as situações, provavelmente relacionado ao seu modo de ação, também já discutido.

Respostas enzimáticas ao estresse oxidativo gerado pelos herbicidas

Superoxido dismutase: primeira linha de defesa

A enzima SOD é citada em artigos sobre toxicidade de contaminantes ambientais como sendo uma enzima chave na resposta antioxidante ao estresse causado por estes agentes, como herbicidas e metais pesados (PANDEY et al., 2010, MARTINS et al., 2011, LÜ et al., 2009).

Em *E. coli*, estão presentes as isoenzimas Mn-SOD (*sodA*), Fe-SOD (*sodB*) e Cu/Zn-SOD (*sodC*). A Fig. 12 mostra que a bactéria *E. coli* K-12 *wt* induz, as 3 isoenzimas de SOD.

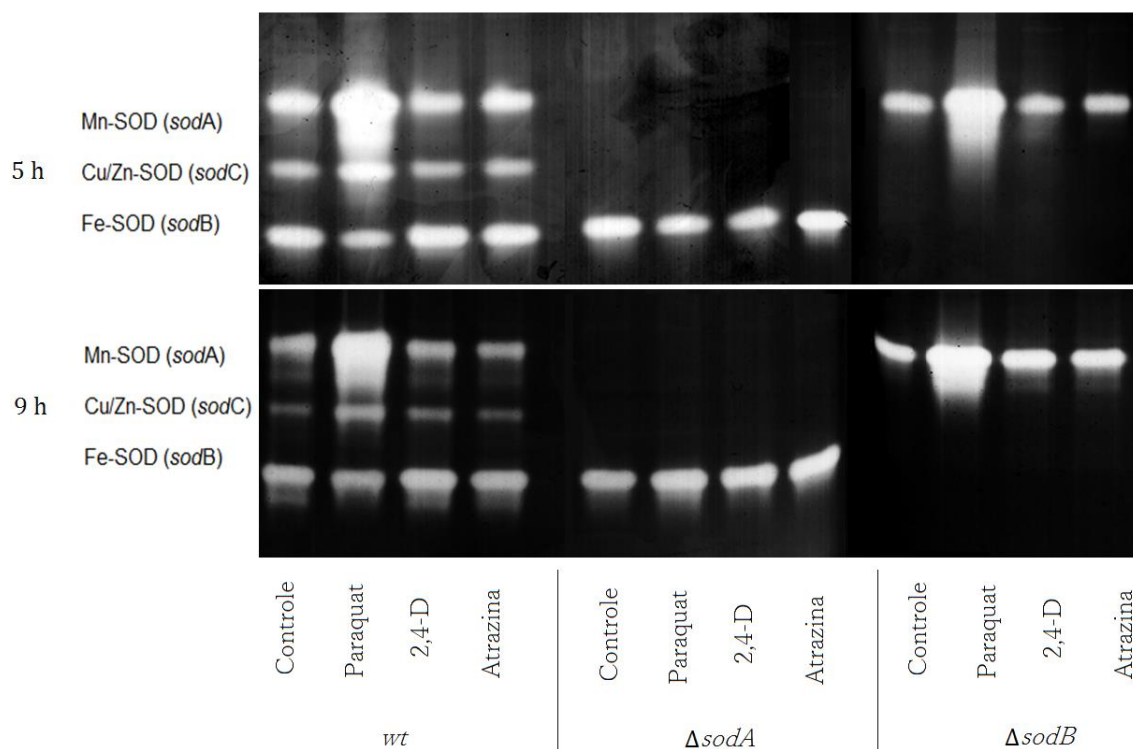


Figura 12: Atividade de SOD-PAGE em linhagens de *E. coli* K-12 controle, paraquat, 2,4-D, atrazina nos tempos de incubação de 5h e 9h.

Um ponto interessante da atividade de SOD em PAGE ao analisarmos as linhagens $\Delta sodA$ e $\Delta sodB$, é que a deleção destes genes, indiretamente inibe a atividade/expressão da terceira isoenzima Cu/Zn-SOD. Esta ausência pode ser decorrente da atividade de Cu/Zn-SOD abaixo do limiar de detecção pela técnica utilizada ou mesmo pela inibição da expressão gênica. Estes dados podem indicar uma possível regulação entre as isoenzimas de SOD. Neste caso, uma possibilidade é que a atividade da isoenzima Cu/Zn-SOD esteja, de alguma forma, sob regulação das outras duas isoenzimas, Mn-SOD e Fe-SOD, as quais por sua vez são reguladas de maneira independente (NIEDERHOFFER et al., 1990; NUNOSHIBA et al., 1992; CORNELIS et al., 2011), isto pode ser observado na Fig.3 Onde os dados obtidos através do STRING evidenciam a relação tanto de *sodA* quanto de *sodB* sobre *sodC*.

A atividade de SOD em PAGE possibilitou demonstrar a contribuição diferencial das isoenzimas na atividade enzimática total, apenas para o herbicida paraquat. Em contato com este herbicida a isoenzima Mn-SOD foi a que apresentou maior atividade nas duas linhagens em que está presente. O aumento

da atividade da Mn-SOD foi descrita anteriormente no assunto H_2O_2 . Portanto, possivelmente este dado explica os dados de viabilidade apresentados. Outro trabalho já havia descrito o aumento da biossíntese desta isoenzima em contato com o paraquat (HASSAN E FRIDOVICH, 1977).

Catalase

O H_2O_2 é prejudicial para quase todos os componentes da célula e, devido a isso, sua eficiente remoção é de importância essencial para os organismos. Além da formação a partir da SOD ele é formado naturalmente durante o crescimento celular aeróbico, como produto de reações redox, sendo as flavoproteínas apontadas como principais fontes de H_2O_2 no interior da célula (MESSNER E IMLAY, 1999).

A atividade total de catalase em *E. coli* é atribuída a duas enzimas, localizadas no periplasma (HPI) e no citosol da célula (HPII). Codificadas por genes diferentes e regulados de maneira independente, as enzimas hidroxidases têm papéis específicos na defesa contra o estresse oxidativo (SEEVER E IMLAY, 2001). A exposição aos herbicidas induziu diferentes respostas nas linhagens de *E. coli* K-12 (Fig. 13), quando analisada a atividade total de catalase.

Conforme mostrado anteriormente, a presença do herbicida 2,4-D aumentou a concentração de H_2O_2 intracelular na linhagem $\Delta sodA$ (Fig. 2), o que poderia causar indução da maquinaria enzimática necessária para combate à ERO. Isto justifica a maior atividade encontrada no tratamento com este herbicida no tempo de 9h em $\Delta sodA$. Corroborando com nosso estudo, outros trabalhos citam a indução da atividade de CAT por este herbicida (ROMERO-PUERTAS et al., 2004; BUKOWSKA, 2006).

Em exposição ao herbicida atrazina a atividade de CAT aumentou na linhagem *wt* no tempo de 5h, as quantificações de H_2O_2 quando esta linhagem entrou em contato com o herbicida atrazina foi mais alta, o que pode justificar o aumento da atividade de CAT, este mesmo resultado foi descrito em trabalho de ZHANG e colaboradores (2012a; 2012b).

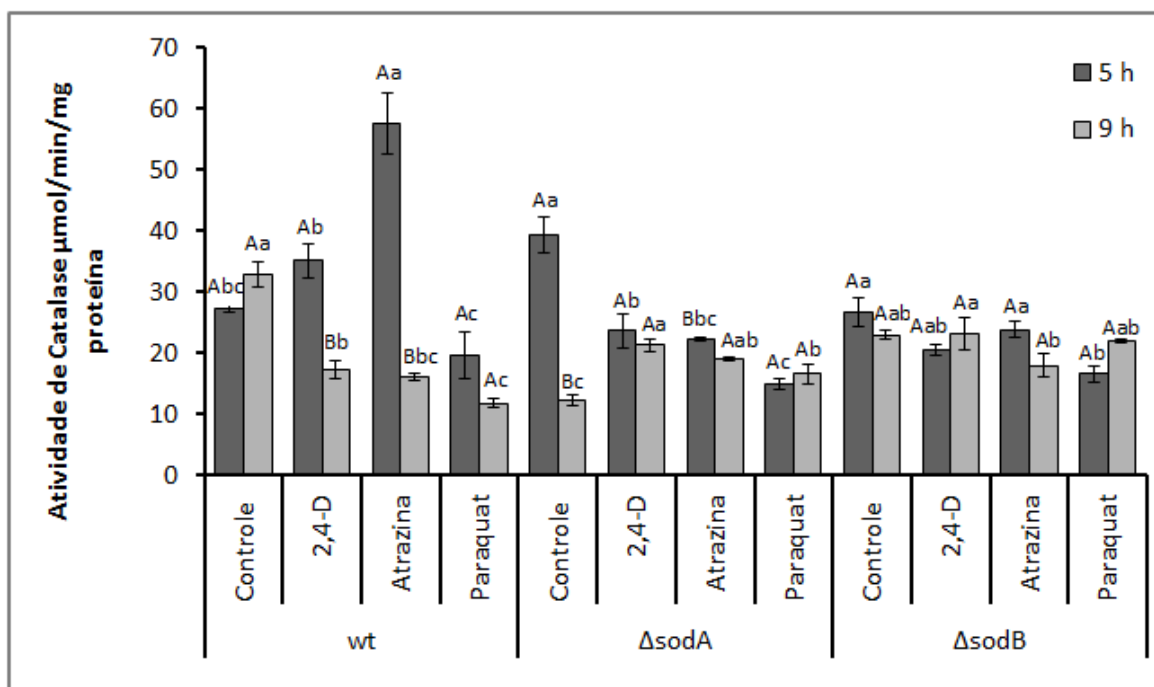


Figura 13: Atividade de catalase em linhagens de *E. coli* K-12 expostas aos herbicidas 2,4-D, atrazina, paraquat, e em controle, após 5h e 9h de incubação. As médias foram comparadas por ANOVA. Utilizou-se o teste de Duncan com $p \leq 0,05$. Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística significativa, sendo letras minúsculas em relação aos tratamentos e letras maiúsculas em relação aos tempos de incubação.

Em contato com o herbicida paraquat, o qual se mostrou mais tóxico para as linhagens, considerando a viabilidade e o crescimento celular, nenhuma das linhagens apresentou diferença significativa da atividade de CAT se comparado ao controle. Sendo assim, como as linhagens *wt* e *ΔsodA* como não apresentam níveis elevados de H_2O_2 possivelmente a resposta de defesa foi mediada por outra peroxidase.

Um fato interessante é observado na linhagem *ΔsodB*, a qual não apresentou níveis maiores de atividade de CAT em nenhum dos tratamentos. Esta é a linhagem em que são encontrados os maiores danos de membrana e as maiores quantidade de H_2O_2 , demonstrando que a deleção deste gene promove um defeito no sistema antioxidante.

Sistema de respostas de *E. coli* K-12 ao estresse causado pelos herbicidas 2,4-D, paraquat e atrazina

O sistema de respostas adaptativas é constituído de elementos que controlam os níveis de ERO de maneira integrada. Enzimas como SOD e CAT apresentam importante papel na defesa antioxidante, entretanto, vários fatores estão envolvidos na resposta ao estresse. Neste estudo foram observadas mudanças fisiológicas em *E. coli* K-12 em resposta ao estresse oxidativo de modo pontual através da caracterização das isoenzimas de SOD, considerando seus fatores de regulação, na tentativa de melhor compreender o funcionamento deste metabolismo (Fig 14).

O H₂O₂ é reconhecido como um dos elementos centrais na caracterização do estado de estresse oxidativo. Entre as linhagens testadas, a concentração de H₂O₂, de forma geral, foi maior quando o gene que expressa a isoenzima Fe-SOD foi nocauteado, sugerindo uma maior participação desta enzima no controle indireto de H₂O₂, o que teve apoio pela correlação observada entre esta enzima e o fator transcricional das peroxidases OxyR.

Cada isoenzima atua de maneira particular ao estresse oxidativo considerando o padrão de danos (MDA e H₂O₂) observado de acordo com a fase de crescimento para cada isoenzima, assim constatou-se que *sodB* provavelmente é mais importante na defesa contra o estresse oxidativo no meio da fase exponencial e *sodA* provavelmente é mais importante no fim desta fase, o que possivelmente envolve os diferentes fatores transcricionais destes genes.

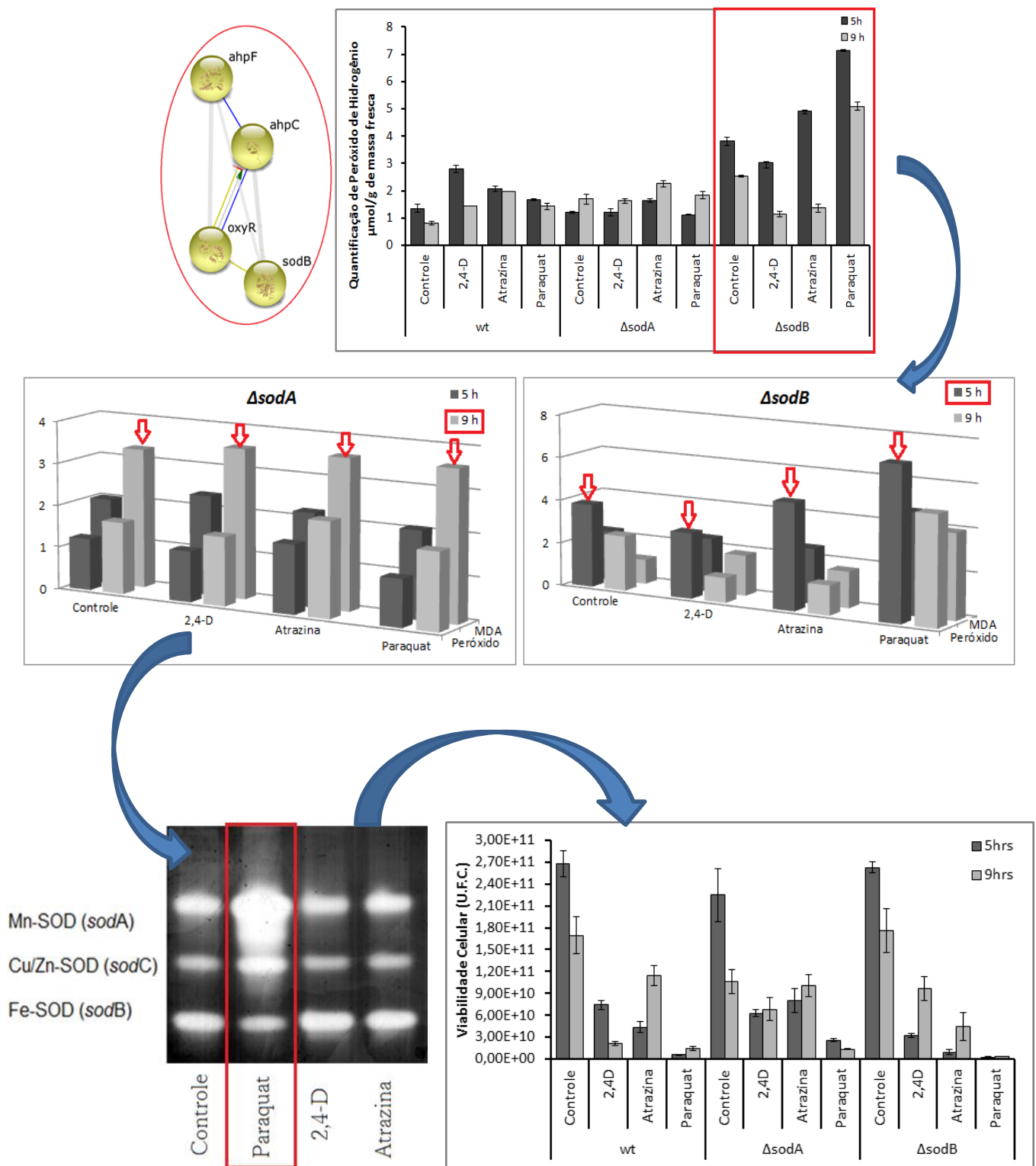


Figura 14: Resumo gráfico mostrando os danos causados pelos herbicidas 2,4-D, atrazina e paraquat e as respostas celulares de *E. coli* K-12, avaliados nesse trabalho.

A capacidade e intensidade de tolerância a herbicidas são representadas, por meio das curvas de crescimento, como um conjunto global de adaptações a condições tóxicas. Apesar dos índices de toxicidade observados, as linhagens estudadas neste trabalho foram capazes de crescer em taxas próximas às observadas no controle, mostrando níveis de adaptação em condições de estresse para às quais elas não foram selecionadas. O aumento no valor adaptativo quando o gene *sodA* é nocauteado, nos tratamentos com 2,4-D e atrazina, indica uma plasticidade ampla de respostas e um potencial de adaptação rápida em *E. coli* K-12, pois em um ambiente contendo uma molécula tóxica como um herbicida, bactérias possuindo um sistema polimórfico para SOD, uma mutação para um gene codificantes para uma das isoformas poderia aumentar a viabilidade celular e ainda manter um tipo enzimático funcional. Este é um modelo interessante para microbiotas que vivem em condições ambientais estressantes e de alta rotatividade, como é o caso do uso de herbicidas em agricultura.

5.1.4 Conclusão

O conjunto de dados reunidos nesse trabalho demonstra que o alto potencial eletronegativo dos herbicidas estudados torna-os capazes de promover o desequilíbrio redox e consequentemente, gerar estresse oxidativo em uma linhagem selvagem de *E. coli* K-12. O sistema de respostas celulares analisado por meio do nocaute das isoenzimas de SOD possibilitou a observação de respostas diferenciais destas isoenzimas, mesmo sem exposição prévia aos herbicidas, além de mostrar o aumento do valor adaptativo com o nocaute de uma das SOD. Assim, a resposta adaptativa bacteriana a compostos tóxicos, como os herbicidas, mostra que *E. coli* K-12 representa um modelo de plasticidade fenotípica para adaptação a presença de moléculas tóxicas em seu ambiente. O que possivelmente pode ser encontrado em outros microrganismos, inclusive naqueles que tenham sido expostos a herbicidas, garantindo a perpetuação de uma espécie, o que, a longo prazo, proporcionam flexibilidade adaptativa frente às eventuais alterações do ambiente e às modificações que normalmente ocorrem em condições naturais em todo o sistema.

5.1.5 Referências Bibliográficas

BALAGUÉ, C.; STURTZ, N.; DUFFARD, R.; DUFFARD, A.M.E. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide on *Escherichia coli* growth, chemical composition and cellular envelope. **Environmetal Toxicology**, v. 16, p. 43-53. 2001.

BERRA, C.M.; MENCK, C.F.M.; MASCIO, P.D. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, p. 1340-1344. 2006.

BHATNAGAR, R.; TANDON, R.; MEENA, L.P.; IQBAL, A.; BHARTI, A.; BHANDOHAL, J.S.; SARAVANAN'S, A. Study the status of oxidative stress markers and trace elements related to the antioxidative system in type 2 diabetes. **Asian Journal of Medical Research**, v. 2(1), p. 24-26. 2013.

BLANCHARD, J.L.; WHOLEY, W-Y.; CONLON, E.M.; POMPOSIELLO, P.J. Rapid Changes in Gene Expression Dynamics in Response to Superoxide Reveal SoxRS-Dependent and Independent Transcriptional Networks. **Plos One**, v. 2(11), p.1186. 2007.

BLOCH, A.C.; AUSUBEL, F.M. Paraquat-Mediated Selection for Mutations in the Manganese-Superoxide Dismutase Gene *sodA*. **Journal of Bacteriology**, v. 168(2), p. 795-798. 1986.

BÖGER, P.; MATTHES, B.; SCHMALFUB, J. Towards the primary target of chloroacetamides - new findings pave the way. **Pest Management Science**, v. 56, p. 497-508. 2000.

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

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

BUKOWSKA, B. Toxicity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid – Molecular Mechanisms. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15(3), p. 365-374. 2006.

CORNELIS, P.; WEI, Q.; ANDREWS, S.C.; VINCKX, T. Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. **Metallomics**, v. 3, p. 540-549. 2011.

COTEUR, G.; DANIS, B.; FOWLER S. W.; TEYSSIE, J.L.; DUBOIS, P.; WARNAU, M. Effects of PCBs on reactive oxygen species (ROS) production by the immune cells of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata). **Marine Pollution Bulletin**, v. 42(8), p. 667-72. 2001.

DANULESCU, R.S.M.; ALIN, C.; CAROL, S.; SINGEAP, ANA MARIA, S.; IORGA, R.; ANCA, T. The relevance of oxidative stress balance (superoxide dismutase versus malondialdehyde) in spontaneous bacterial peritonitis. **Archives of Biological Science**, v. 66(2), p. 793-799. 2014.

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

DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15(4), p. 316-28. 2005.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43(1), p.61-68. 1997.

FRANCESCHINI, A.; SZKLARCZYK, D.; FRANKILD, S.; KUHN, M.; SIMONOVIC, M.; ROTH, A.; JENSEN, L. J. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. **Nucleic Acids Research**, v 41(Database issue), D808–D815. 2013.

FUKUSHIMA, T.; TANAKA, K.; LIM, H.; MORIYAMA, M. Mechanism of cytotoxicity of paraquat. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 7(3), p. 89–94. 2002.

GÉRARD, F.; DRI, A.M.; MOREAU, P. L. Role of *Escherichia coli* RpoS, LexA and H-NS global regulators in metabolism and survival under aerobic, phosphate-starvation conditions. **Microbiology**, v. 145, p. 1547-1562. 1999.

GRATÃO PL, POLLE A, LEA PJ, AZEVEDO RA. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**. 32:481-494. 2005.

GU, M.; IMLAY, J. A. The SoxRS response of *Escherichia coli* is directly activated by redox-cycling drugs rather than by superoxide. **Molecular Microbiology**, v. 79(5), p. 1136–1150. 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. **Oxford:Oxford university press**, 4a ed. p 888. 2007.

HASSAN, H.M.; FRIDOVICH, I. Paraquat and *Escherichia coli*, mechanisms of production of extracellular superoxide radical. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, p. 10846-10852. 1979.

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

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P., Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, p. 293-303. 2001.

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**, v. 39, p. 431-441. 2004.

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

MARKWELL, J.; NAMUTH, D. Herbicides That Act Through Photosynthesis: Overview. **Plant & Soil Sciences eLibrary**. JNRLSE. 2003.

MARTINEZ-TABACHE, L.; MADRIGAL-BUJADAR, E. & NEGRETE, T. Genotoxicity and lipoperoxidation produced by paraquat and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Bulletin Environnemental Contamination Toxicology**. v. 73, p. 146–152. 2004.

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

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

MESSNER, K.R.; IMLAY, J.A. The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 10119-10128. 1999.

MOREAU, P.L.; GÉRARD, F.; LUTZ, N.W.; COZZONE, P. Non-growing *Escherichia coli* cells starved for glucose or phosphate use different mechanisms to survive oxidative stress. **Molecular Microbiology**, v. 39(4), p. 1048-1060. 2001.

NIEDERHOFFER, E.C.; NARANJO, C.M.; BRADLEY, K.L.; FEE, J.A. Control of *Escherichia coli* Superoxide Dismutase (*sodA* and *sodB*) Genes by the Ferric Uptake Regulation (*fur*) Locus. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 1930-1938. 1990.

NUNOSHIBA, T.; HIDALGO, E.; CUEVAS, C.F.A.; DEMPSE, B. Two-Stage Control of an Oxidative Stress Regulon: the *Escherichia coli* SoxR Protein Triggers Redox-Inducible Expression of the *soxS* Regulatory Gene. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 6054-6060. 1992.

NURMINSKY, V.N.; OZOLINA, N.V.; SAPEGA, J.G.; ZHELEZNYKH, A.O.; PRADEDOVA, E.V.; KORZUN, A.M.; SALYAEV, R.K. The effect of dihydroquercetin on active and passive ion transport systems in plant vacuolar membrane. **Biological Bulletin**, v. 36(1), p. 1–5. 2009.

NWANI, C.D.; LAKRA, W. S.; NAGPURE, N.S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; SRIVASTAVA, S.K. Toxicity of the Herbicide Atrazine: Effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7(8), p. 3298–3312. 2010.

OLCHANHESKI, L.R.; DOURADO, M.N.; BELTRAME, F.L.; ZIELINSKI, A.A.F.; DEMIATE, I.M.; PILEGGI, S.A.V.; AZEVEDO, R.A.; MICHAEL J.S.; PILEGGI, M. Mechanisms of Tolerance and High Degradation Capacity of the Herbicide Mesotrione by *Escherichia coli* Strain DH5- α . **Plos One**, v. 9(6), p. e99960. 2014.

PANDEY, S.; SAHA, P.; BARAI, P.K.; MAITI, T.K. Characterization of a Cd²⁺-resistant strain of *Ochrobactrum* sp. Isolated from slag disposal site of an iron and steel factory. **Current Microbiology**, v. 61, p. 106-111. 2010.

PAZMIÑO, D.M.; RODRÍGUEZ-SERRANO, M.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; ARCHILLA-RUIZ, A.; DEL RÍO, L.A.; SANDALIO, L. M. Differential response of young and adult leaves to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in pea plants: role of reactive oxygen species. **Plant, Cell & Environment**, v. 34(11), p. 1874-1879. 2011.

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

ROMERO-PUERTAS, M.; MCCARTHY, I.; GOMEZ, M.; SANDALIO, L.; CORPAS, F.; DEL RIO, L. & PALAMA, J. Reactive oxygen species-mediated enzymatic systems involved in the oxidative action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Plant, Cell & Environment**. v.27, p. 1135–1148. 2004.

ROSZAK, D.B.; COWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiological Reviews**, v. 51, p. 365-379. 1987.

RUIZ-LEAL, M.; GEORGE, S. An in vitro procedure for evaluation of early stage oxidative stress in an established fish cell line applied to investigation of PHAH and pesticide toxicity. **Marine Environmental Research**, v. 58, p.631–635. 2004.

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

SCHERBER, C.M.; SCHOTTEL, J.L.; AKSAN, A. Membrane phase behavior of *Escherichia coli* during desiccation, rehydration, and growth recovery. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1788, p. 2427–2435. 2009.

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

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. Identificação Espectrométrica de compostos Orgânicos. Livros Técnicos e Científicos. São Paulo. 6° ed. 1998.
TIRONI, S.P.; BELO, A.F.; FIALHO, C.M.T.; GALON, L.; FERREIRA, E.A. Efeito de herbicidas na atividade microbiana do solo. **Planta Daninha**, v. 27 995–1004. 2009.

VARGHESE, S.; WU, M.; PARK, S.; IMLAY, K.C.R.; IMLAY, J.A. Submicromolar hydrogen peroxide disrupts the ability of Fur protein to control free-ion levels in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 64, p. 822-830. 2007.

VOIE, O. A.; FONNUM, F. Effect of polychlorinated biphenyls on production of reactive oxygen species (ROS) in rat synaptosomes. **Archives of Toxicology**. v. 73, p. 588– 593. 2000.

WATANABE, S.; KITA, A.; KOBAYASHI, K.; MIKI, K. Crystal structure of the [2Fe–2S] oxidative-stress sensor SoxR bound to DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105, p. 4121–4126. 2008.

WEI, T.; TIAN, W.; LIU, F.; XIE, G. Protective effects of exogenous β -hydroxybutyrate on paraquat toxicity in rat kidney. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 447, p.666-671. 2014.

ZAID, T.; SRIKUMAR, T.S.; BENOVA, L. Growth of *Escherichia coli* in iron-enriched medium increases HPI catalase activity. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. v. 36(6), p. 608-610. 2003.

ZHANG, Y.; MENG, D.; WANG, Z.; GUO, H.; WANG, Y. Oxidative stress response in two representative bacteria exposed to atrazine. **FEMS Microbiology Letters**, p. 1–7. 2012b.

ZHANG , Y.; MENG, D.; WANG, Z.; GUO, H.; WANG, Y.; WANG, X.; DONG, X. Oxidative stress response in atrazine-degrading bacteria exposed to atrazine. **Journal of Hazardous Materials**,v. 229– 230, p. 434– 438. 2012a.

6. Referências bibliográficas gerais

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

AHRENS, W.H. Herbicide Handbook 7th Edition. **Champaign: Weed Science Society of America**. 352p. 1994.

BABA, T.; HASEGAWA, M.; TAKAI, Y.; OKUMURA, Y.; BABA, M.; DATSENKO, K.A.; TOMITA, M.; WANNER, B.L.; MORI, H. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. **Molecular Systems Biology, Heidelberg**, v. 2, p. 1-11. 2006.

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

BERTRAND, R. Lag phase-associated iron accumulation is likely a microbial counter-strategy to host iron sequestration: Role of the ferric uptake regulator (fur). **Journal of Theoretical Biology**, v. 359, p. 72–79. 2014.

BOYER, J.S. Plant productivity and environment. **Science**, v. 218, p. 443–448. 1982.

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

BUCHA, H.C.; TODD, C.W., 3(p-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea - a new herbicide. **Science**, v. 144, p. 403-494. 1954.

CHEN, Z.; LEWIS, K.A.; SHULTZABERGER¹, R.K.; LYAKHOV, I.G.; ZHENG, M.; DOAN, B.; STORZ, G.; SCHNEIDER, T.D. Discovery of Fur binding site clusters in *Escherichia coli* by information theory models. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. 6762–6777. 2007.

CHEVRIER, C.; LIMON, G.; MONFORT, C.; ROUGET, F.; GARLANTÉZEC, R.; PETIT, C. et al. Urinary biomarkers of prenatal atrazine exposure and adverse birth outcomes in the PELAGIE Birth Cohort. **Environmental Health Perspectives**, v. 119 (7), p. 1034-1041. 2011.

CRAGIN, L.A.; KESNER, J.S.; BACHAND, A.M.; BARR, D.B.; MEADOWS, J.W.; KRIEG, E.F. et al. Menstrual cycle characteristics and reproductive hormone levels in women exposed to atrazine in drinking water. **Environmental Research**, v. 111, p. 1293-1301. 2011.

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

FANTROUSSI, S.; VERSTRAETE, W.; TOP, E.M. Environmental and molecular characterization of a bacterial culture that degrades methoxy-methyl urea herbicides and their aniline derivatives. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66(12), p. 5110-5115. 2000.

FLORES, A.V.; RIBEIRO, J.N.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, E.L.P. Organoclorados: Um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade**, v. 8 (2), p. 111-125. 2004.

GRANT, C.M. Regulation of translation by hydrogen peroxide. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, p. 191-203. 2011.

GU, M.; IMLAY, J.A. The SoxRS response of *Escherichia coli* is directly activated by redox-cycling drugs rather than by superoxide. **Molecular Microbiology**, v. 79(5), p. 1136–1150. 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford**. 2007

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

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. & ARAUJO, R.S. Fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro. *Biologia dos solos dos cerrados*. **Embrapa-CPAC**, p.189-294. 1997.

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

IVANOVA, A.; MILLER, C.; GLINSKY, G.; ELSENSTARK, A. Role of rpoS (katF) in oxyR-independent regulation of hidropoxidase I in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 12, p. 571-578. 1994.

JARDIM, J.C.S.F.; ANDRADE, J.A.; QUEIROZ, S.C.N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - um enfoque às maçãs. **Química nova**, v. 32, p. 996-1012. 2009.

JAVARONI, R.C.; LANDGRAF, M.D.; REZENDE, M.O.O. Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 22, p. 58-64. 1999.

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

KRAEMER, A.F.; MARCHESAN, E.; AVILA, L.A.; MACHADO, S.L.O.; GROHS, M.; MASSONI, P.F.S.; SARTORI, G.M.S. Persistência dos herbicidas Imazethapyr e Imazapic em solo várzea sob diferentes sistemas de manejo. **Planta Daninha**, v. 27, p. 581-588. 2009.

LOEWEN, P. Probing the structure of catalase HP11 of *Escherichia coli* – a review. **Gene**, v.179, p. 39-44. 1996.

MAHAIAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, p. 139-158. 2005.

MAHALINGAM, R.; FEDOROFF, N. Stress response, cell death and signaling: the many faces of reactive oxygen species. **Physical Plant**, v. 119, p. 56-68. 2003.

MARTH, P.C.; MITCHELL, J.W., 2,4- dichlorophenoxyacetic acid as a differential herbicide. **Botanical Gazette**, v. 106, p. 224-232. 1944.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, v. 11, p. 15–18. 2006.

NASCIMENTO, E.R.; YAMASHITA, O.M. Desenvolvimento inicial de olerícolas cultivadas em solos contaminados com resíduos de 2,4-D + picloram. **Semina Ciências Agrárias**, v. 30, p. 47-54. 2009.

NEGRISOLI, E.; VELINI, E.D.; TOFOLI, G.R.; CAVENAGHI, A.L.; MARTINS, D.; MORELLI, J.L.; COSTA, A.G.F. Seletividade de herbicidas aplicados em pré-emergência na cultura de cana-de-açúcar tratada com nematicidas. **Planta Daninha**, v. 22, p. 567-575. 2004.

NETZER, N.; GOODENBOUR, J.M.; DAVI, A.; DITTMAR, K.A.; JONES, R.B.; SCHNEIDER, J.R.; BOONE, D.; EVES, E.M.; ROSNER, M.R.; GIBBS, J. S.; EMBRY, A.; DOLAN, B.; DAS, S.; HICKMAN, H. D.; BERGLUND, D.; BENNINK, J.R.; YEWDELL, J.W.; PAN, T. Innate immune and chemically triggered oxidative stress modifies translational fidelity. **Nature**, v. 462, p. 522-526. 2009.

OGLESBY-SHERROUSE, A.G.; MURPHY, E.R. Iron-responsive bacterial small RNAs: variations on a theme. **Metallomics**, v. 5, p. 276-286. 2013.

PY, B.; BARRAS, F. Building Fe–S proteins: bacterial strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 436-446, 2010.

POKORNY, R. Some chlorophenoxyacetic acids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 63, p. 176. 1941.

RUTHERFORD, A.W.; KRIEGER-LISZKAY, A. Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 26, p. 648-653. 2001.

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

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

SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. Microbiota do solo e qualidade ambiental. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007. 312 p.

SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.M.S.; GRISI, B.M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. Mecanismos e processos biológicos de solo: Perspectiva ambiental. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Soja. – Documentos, 45, p. 142. 1994.

THILL, D. Growth regulator herbicides. In: WELLER, S.C.; THILL, D.; BRIDGES, D.C.; VAN SCOYOC, G.E.; GRAVEEL, J.G.; TURCO JÚNIOR., R.F.; GOLDSBROUGH, P.; RUHL, G.E.; HOLT, H.A.; REICHER, Z.J.; WHITFORD, F. Herbicide action course. West Lafayette: Purdue University, p. 267-275. 2003.

TOUATI, D. Sensing and protecting against superoxide stress in *Escherichia coli* – how many ways are there to trigger soxRS response? **Redox Report**, v. 5, p. 287-293. 2000.

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

URSIN, V.W.; BRADFORD, K.J. Auxin and ethylene regulation of petiole epinasty in two developmental mutant tomatoes. **Plant Physiology**, v. 90, p. 1341-1349. 1989.

VEAL, E.; DAY, A. Hydrogen peroxide as a signaling molecule. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, p. 147-151. 2011.

VIBHA, B.; NEELAM, G. Importance of Exploration of Microbial Biodiversity. **ISCA Journal of Biological Sciences**, v. 1, p. 78-83. 2012.

VITOUSEK, P.M.; PORDER, S.; HOULTON, B.Z.; CHADWICK, O.A. Terrestrial phosphorus limitation: mechanisms, implications, and nitrogen-phosphorus interactions. **Ecological Applications**, v. 20, p. 5-15. 2010.

WACHOWSKA, U.; BANASZKIEWICZ, T. Effect of herbicide roundup on microorganisms in the rhizosphere of grasses. **Natural Science**, v.2, p. 191-200. 1999.

WU, J.; WEISS, B. Two-stage induction of the soxRS (superoxide response) regulon of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 3915-3920. 1992.

ZIMDAHL, R. L. Fundamentals of weed science. **Academic Press**, p. 450. 1993