

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

LILIAN PARRA PRIONE

Adaptação bacteriana: plasticidade fenotípica de *Pantoea ananatis* CCT 7673 exposta ao herbicida mesotrione

PONTA GROSSA

2014

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

LILIAN PARRA PRIONE

Adaptação bacteriana: plasticidade fenotípica de *Pantoea ananatis*
CCT 7673 exposta ao herbicida mesotrione

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pileggi

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

Ponta Grossa

2014

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

Prione, Lilian Parra
P958 Adaptação bacteriana: plasticidade
fenotípica de *Pantoea ananatis* CCT 7673
exposta ao herbicida mesotrione/ Lilian
Parra Prione. Ponta Grossa, 2014.
82f.

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.
Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Sonia Alvim
Veiga Pileggi.

1.Biodegradação de herbicidas.
2.Peroxidação lipídica. 3.Resposta
antioxidativa. 4.Adaptação bacteriana.
5.Callisto. I.Pileggi, Marcos. II.
Pileggi, Sonia Alvim Veiga. III.
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Universidade Estadual do Centro-Oeste.

CDD: 575

Agradecimentos

A CAPES pelo apoio financeiro;

- Ao meu orientador e pai científico Marcos Pileggi pelo apoio, amizade e aprendizado. Por me incentivar à pesquisa e me ensinar a desenvolver o senso crítico científico;

- Aos meus pais Maurício e Natalina, pelo apoio e amor incondicional, por me incentivarem a todo o momento a seguir meu caminho e os meus sonhos. Por não medirem esforços em me ver feliz, fazer o possível e o impossível, agradeço, do fundo do coração as palavras de sabedoria e incentivo em que recebi nos momentos de tristeza e solidão. Não foi fácil, mas sem vocês seria impossível.

- Ao meu irmão, Gustavo, pelo apoio, incentivo e amor a mim dedicados. À amizade de irmão que tanto prezo e que tanto senti falta nesses dois anos!

- Ao meu namorado, Fernando, pelo amor, companheirismo e incentivo, que me aguenta nos momentos de choro e ansiedade. Obrigada pelos conselhos, conversas e risadas, que tornam os meus dias mais leves e felizes.

- À recepção a mim concedida por dona Ercília, seu Dias e Ângela, que me ajudaram muito quando cheguei em Ponta Grossa;

- A minha tia Sônia e vó pelos mimos e marmitas;

- Ao meu amigo e “co-co-orientador” Ricardo, pelo aprendizado e imensa ajuda em todo o mestrado, auxiliando em todas as fases dos experimentos, obrigada pela paciência!

- À Manu e todo o pessoal do laboratório de genética da Esalq-USP pela paciência e apoio durante aquele mês tão puxada e tão crucial para minha pesquisa;

- Ao Bruno, pelo apoio e assistência da edição das figuras;

- A todo o pessoal do laboratório de microbiologia, Jana, Leandro, Fernanda, Géssica, Tati, pela ajuda, apoio e companhia;

- Aos professores Ricardo Antunes de Azevedo, Ivo Mottin Demiate, Jesiane S. S. Batista, Flávio Luís Beltrame e Sônia Alvim Veiga Pileggi por auxiliarem na realização deste trabalho;

- A Rosilene Prestes, pelo auxílio nas análises de FTIR e análise estatística;

- A todos os funcionários e professores do programa;

- A todos que de alguma forma, auxiliaram para a realização neste trabalho.

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”

Albert Einstein

Resumo

Herbicidas são amplamente utilizados para aumentar a produção agrícola e são responsáveis por 35% de todos os agrotóxicos aplicados anualmente. Após a aplicação, os herbicidas podem permanecer no solo como resíduos perigosos. O mesotrione (2 - [4 - metilsulfonil - 2 - nitrobenzoil] 1,3-cyclohexanedione) é o ingrediente ativo de Callisto, um herbicida utilizado no milho . *Pantoea ananatis* CCT 7673, é uma enterobactéria isolada de água e foi previamente caracterizada como linhagem degradadora do mesotrione. Os objetivos deste trabalho foram o avaliar a influência do mesotrione e Callisto como agentes indutores de estresse oxidativo para o metabolismo celular de *Pantoea ananatis* CCT7673, bem como identificar possíveis mecanismos de tolerância a estes herbicidas. As atividades enzimáticas de SOD, CAT e GR foram avaliadas em PAGE não desnaturante e de CAT, GR e GST em espectrofotômetro. Além disto, as taxas de malondialdeído (MDA), radical superóxido e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram medidas em espectrofotômetro. Todas as análises foram realizadas antes e após a degradação do mesotrione. Meio mínimo sem herbicida (MM) foi utilizado como controle. O herbicida provou ser agente causal do estresse oxidativo pelos dados de peróxido de hidrogênio. Inesperadamente, as taxas de MDA e GR mostraram-se inferiores nos tratamentos com herbicida em relação ao controle, sem alteração no crescimento bacteriano. A atividade de glutathione-S-transferase foi maior no tratamento com mesotrione em comparação com o controle e Callisto, durante e após a degradação. Estes resultados sugerem que essa enzima pode estar relacionada com o processo de degradação do mesotrione, provavelmente por cometabolismo. As taxas de peroxidação lipídica mostraram ser menores na presença do herbicida em comparação com o controle, sem mudanças na taxa de crescimento Quando exposta ao herbicida, *P. ananatis* CCT 7673 apresentou alterações na saturação de lipídios de membrana. Estas mudanças podem interferir na entrada do herbicida na célula. Tais características podem estar associadas a um nível de plasticidade fenotípica em *P. ananatis* CCT 7673, tornando essa bactéria um modelo interessante para estudos de tolerância a herbicidas e evolução de microbiotas em ambientes submetidos a diferentes graus de pressão seletiva.

Palavras-chave: biodegradação de herbicidas, peroxidação lipídica, lipídeos de membrana, resposta antioxidativa, adaptação bacteriana, Callisto.

Abstract

Herbicides are widely used to increase crop production and account for 35% of all agrochemicals applied annually. After application, the herbicides can remain in the soil as hazardous residues. Mesotrione, (2-[4-methylsulfonyl-2-nitrobenzoyl]1,3-cyclohexanedione), is the active ingredient of Callisto, an herbicide commonly used in corn. *Pantoea ananatis* CCT 7673, an Enterobacteria isolated from water, has been previously cited as mesotrione-degrading strain. The aim of this study was to evaluate the influence of mesotrione and Callisto as oxidative stress-inducing agents for cellular metabolism of *Pantoea ananatis* CCT7673 and identify possible mechanisms of tolerance. SOD, CAT and GR activities were evaluated in non-denaturing PAGE and CAT, GR and GST in spectrophotometer. Also, the rates of malonaldehyde (MDA), superoxid and peroxide hydrogen (H_2O_2) were measured in a spectrophotometer. Minimal medium with no herbicide (MM) was used as control. Lipid peroxidation, superoxide and peroxide hydrogen quantification and SOD, CAT, GR and GST activities were analyzed before and after degradation of mesotrione. The herbicide proved to be the cause of oxidative stress, according to peroxide hydrogen data. Unexpectedly, the rates of lipid peroxidation (MDA) and GR showed to be lower in the presence of the herbicide when compared to the control, with no changes in bacterial growth. The activity of GST was higher in mesotrione treatment in comparison to control and Callisto, during and after degradation. These results suggest that this enzyme may be related to the mesotrione degradation, probably by cometabolism. The rates of lipid peroxidation were shown to be lower in the presence of the herbicide compared to the control, with no changes in growth rates when exposed to herbicide. *P. ananatis* CCT 7673 showed changes in the saturation of membrane lipids. These changes may interfere with herbicide entry into the cell. These characteristics may be associated with a level of phenotypic plasticity in *P. ananatis* CCT 7673, making this an interesting bacterium for studies of herbicide tolerance and evolution of microbiota in environments subjected to different degrees of selective pressure model.

Keywords: herbicide biodegradation, lipid peroxidation, membrane lipids, antioxidative response, adaptative capacity, Callisto.

Lista de abreviaturas e siglas

AMBA - Ácido benzóico 2-amino-4-metilsulfonil

BSA- Albumina de soro bovino (Bovine serum albumin)

CAT - Catalase

DDT- Dicloro-difenil-tricloroetano

DPIP - dicloroindolacético

DTNB – Ácido nitrobenzóico

DTT - Ditioneitol

EDTA - Ácido etileno diamino tetracético

EROs - Espécies reativas de oxigênio

GR – Glutathione redutase

GSH – Glutathione reduzida

GSSG – Glutathione oxidada

GST- Glutathione-S-transferase

HPPD- 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenase

LB- Caldo Luria (Luria Broth)

MDA- Malondialdeído

MNBA - Ácido 4-metilsulfonil-2-nitrobenzóico

MM - Meio Mineral

MMC - Meio Mineral com Callisto

MMM - Meio Mineral com mesotrione

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

NBT- Nitroazul tetrazólio

PBS- Solução tampão de fosfato (Phosphate buffer solution)

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

PVPP – Polivinilpirrolidona

RPM- Rotações por minuto

SOD - Superóxido dismutase

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TBA- Ácido 2-tiobarbitúrico

TCA- Ácido tricloroacético

Lista de figuras

Figura 1 -Fórmula estrutural do mesotrione e subprodutos da biodegração por <i>Bacillus</i> sp.....	17
Figura 2 – Estrutura química do mesotrione.....	19
Figura 3 - Reação representada pela via bioquímica de SOD (superóxido dismutase) e CAT (catalase).....	22
Figura 4 - Reação representada pela via bioquímica de GR (glutathione redutase) e GST (glutathione-S-transferase).....	24
Figura 5 - Quantificação dos níveis de peróxido de hidrogênio em <i>Pantoea ananatis</i> CCT 7673 nos tratamento MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (callisto) após 12h, 17,5h e 19h de incubação.....	49
Figura 6 – Quantificação do radical de superóxido em <i>Pantoea ananatis</i> CCT 7673 nos tratamento MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (callisto) após 12h, 17,5h e 19h de incubação.....	50
Figura 7 – Curva de crescimento (O.D. em 600 nm) de <i>Pantoea ananatis</i> CCT 7673 nos tratamento MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (callisto) durante 24h de incubação.....	51
Figura 8 – Viabilidade celular (em U.F.C.) de <i>Pantoea ananatis</i> CCT 7673 nos tratamento MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (callisto) nos tempos de 30 min, 12h, 17,5h e 19h de incubação.....	52
Figura 9 – Níveis do MDA em <i>Pantoea ananatis</i> CCT 7673 nos tratamento MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (callisto) após 12h, 17,5h e 19h de incubação.....	53
Figura 10 – Quantificação de proteína (mg/ml) em <i>Pantoea ananatis</i> CCT 7673 nos tratamento MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (callisto) após 12h, 17,5h e 19h de incubação.....	54
Figura 11 – Perfil proteico SDS-PAGE de <i>Pantoea ananatis</i> CCT 7673: S- controle, MM (controle), LB 12h, 17,5h e 19h (1,2; 3,4; 5,6, respectivamente); MMM (mesotrione): 12h, 17,5h e 19h (7,8 e 9, respectivamente) e CMM (Callisto): 12h, 17,5h e 19h (10, 11 e 12, respectivamente).....	55

Figura 12 – SOD-PAGE de *Pantoea ananatis* CCT 7673 representam: S (padrão), MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (Callisto) nos tempos de 12h (1,2 e 3), 17,5h (4, 5 e 6) e 19h (7, 9 e 9) de incubação.....55

Figura 13 – Atividade de SOD-PAGE não desnaturante. S (padrão), 1 corresponde à atividade de SOD do controle, 2 mostra a atividade da SOD na presença de 2 mM de cianeto de potássio e 3 representa a atividade da SOD com mM H₂O₂.....56

Figura 14 – Atividade de catalase de *Pantoea ananatis* CCT 7673 nos tratamentos tratamento MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (callisto) após 12h, 17,5h e 19h de incubação.....57

Figura 15 – CAT-PAGE de *Pantoea ananatis* CCT 7673 representam: S (padrão), MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (Callisto) nos tempos de 12h (1,2 e 3), 17,5h (4, 5 e 6) e 19h (7, 8 e 9) de incubação.....58

Figura 16 – Atividade de glutathione redutase em *Pantoea ananatis* CCT 7673 nos tratamentos tratamento MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (callisto) após 12h, 17,5h e 19h de incubação.....59

Figura 17 – GR-PAGE de *Pantoea ananatis* CCT 7673 representam: S (padrão) MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (Callisto) nos tempos de 12h (1,2 e 3), 17,5h (4,5 e 6) e 19h (7,8 e 9) de incubação.....60

Figura 18 – Atividade de glutathione-S-transferase em *Pantoea ananatis* CCT 7673 nos tratamentos tratamento MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (callisto) após 12h, 17,5h e 19h de incubação.....62

Figura 19- Perfil do espectro de infravermelho do extrato lipídico de *Pantoea ananatis* incubadas nos tratamentos MM (controle), MMM (mesotrione) e MMC (Callisto) nos tempos de 12h, 17,5h e 19h.....63

Figura 20- Gráfico de escores (a) e pesos (b) para os resultados dos dados de *Pantoea ananatis* nos tratamentos MM (controle), MMM (mesotrione) e MMC (Callisto) nos tempo de 12h, 17,5h e 19h.....66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Uso de herbicidas e contaminação ambiental	13
1.2 Degradação de herbicidas	15
1.3 Caracterização do mesotrione	17
1.4 <i>Pantoea ananatis</i>	19
1.5 Sistema antioxidante de resposta	20
1.6 Superóxido Dismutase (SOD)	21
1.7 Catalase (CAT)	22
1.8 Glutathione redutase (GR)	23
1.9 Glutathione-S-Transferase (GST)	24
1.10 Estrutura de lipídios de membrana	25
2. OBJETIVO.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Isolamento da linhagem degradadora de mesotrione.....	28
3.2 Material biológico	28
3.3 Químicos utilizados	28
3.4 Curva de crescimento.....	28
3.5 Delineamento experimental e crescimento bacteriano	29
3.6 Viabilidade celular	29
3.7 Peroxidação de lipídios	29
3.8 Quantificação de Peróxido de hidrogênio.....	30
3.9 Quantificação do radical superóxido.....	30
3.10 Modificações na membrana bacteriana	30
3.11 Extração de proteínas	31
3.12 Quantificação de proteínas	31
3.13 Variações no perfil proteico	31
3.14 Atividades das enzimas antioxidativas.....	32
3.14.1 Atividade da SOD.....	33
3.14.1.1 Atividade em PAGE não desnaturante.....	33
3.14.1.2 Determinação das isoenzimas de SOD em PAGE não desnaturante	33
3.14.2 Atividade da CAT	34
3.14.2.1 Atividade em PAGE não desnaturante.....	34
3.14.2.2 Atividade em espectrofotômetro	34

3.14.3 Atividade de GR.....	34
3.14.3.1 Atividade em PAGE não desnaturante.....	34
3.14.3.2 Atividade em espectrofotômetro	35
3.14.4 Atividade de GST	35
3.14.4.1 Atividade em espectrofotômetro	35
3.15 Análise estatística.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Introdução	39
4.2 Material e métodos.....	41
4.3 Resultados e Discussão	47
4.3.1 Avaliação do estresse oxidativo gerado pelo herbicida.....	47
4.3.2 Tolerância de <i>P. ananatis</i> ao herbicida por meio do crescimento celular.....	50
4.3.3 Avaliação da peroxidação lipídica por meio da quantificação de MDA.....	52
4.3.4 Quantificação de proteínas e perfil proteico sob estresse causado por herbicida.....	53
4.3.5 Atividade de SOD e perfil protéico.....	55
4.3.6 Atividade de CAT e perfil protéico	56
4.3.7 Atividade de GR e perfil proteico	58
4.3.8 Atividade de GST	60
4.3.9 Alterações na saturação de lipídios de membrana em resposta aos herbicidas.....	62
4.3.10 Análise estatística.....	65
4.4 Conclusão	67
4.5. Referências.....	67
5. Referências gerais	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 Uso de herbicidas e contaminação ambiental

O DDT foi um dos primeiros compostos orgânicos a ser sintetizado - o pioneirismo coube a Othomar Zeidler, em 1874. A utilização de compostos como agroquímicos iniciou-se na década de 1920, durante a Segunda Guerra Mundial, sendo usada como arma química (Barbosa, 2004), e se destacou em 1941 com a síntese do 2,4-D, também durante a Segunda Guerra Mundial, (Oliveira et al., 2011) e, a partir de então, sua utilização se expandiu em todo o mundo.

Os herbicidas são substâncias químicas capazes de disseminar populações de plantas indesejáveis em uma cultura. Podem ser utilizados em pré-emergência, quando a aplicação do produto é feita antes da emergência da cultura, ou em pós-emergência, quando a cultura já emergiu, e o produto é absorvido em sua maior parte via foliar. Seu uso é de grande importância na agricultura, pois as plantas daninhas competem por luz, água, nutrientes e espaço físico com as culturas, podendo levar à redução de até 90% de rendimento de grãos se não forem controladas (Junior et al., 1997).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), para 50,7 milhões de hectares de área plantada em 2001, o Brasil utilizou 158,7 mil toneladas de agrotóxicos, sendo 91,8 mil toneladas só de herbicidas, o que corresponde a mais de 50% do total (IBGE, 2004). Segundo um dossiê divulgado pela Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO) (Carneiro et al., 2012) a utilização de agroquímicos nas lavouras brasileiras saltou de 599,5 milhões de litros no ano de 2002 para 852,8 milhões de litros em 2011, com consumo médio dos compostos de 10,5 litros por hectare em 2002, para 12,01 por hectare em 2011. O Brasil movimentou ainda, sozinho, 19% da produção mundial destes agroquímicos no ano de 2010, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa, 2011). Só no Estado do Paraná, no ano de 2000, foram comercializadas 15.283,2 toneladas de ingrediente ativo, o que corresponde a 68% do total de pesticidas comercializados no Estado (Inoue et al., 2003).

Com a crescente população mundial, estimada em 7 bilhões de pessoas (ONU, 2012), surge a necessidade do aumento de produção de alimentos, por

meio de novas tecnologias, visando otimizá-la e aumentá-la (Donaldson, 2010). Desta forma, o incremento do uso de herbicidas como componente crucial para o manejo e prevenção de plantas daninhas é inevitável. Embora nenhum herbicida permaneça indefinidamente no ambiente, alguns podem apresentar persistência por tempo suficiente para limitar ou injuriar outras espécies de culturas, resultar em contaminação e causar efeitos danosos em organismos não alvo (Oliveira et al., 2011; Van Eerd et al., 2003). Estima-se que apenas 0,1% dos pesticidas atinjam o alvo; o restante permanece 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).

Além da contaminação ambiental, pesticidas podem alterar os nutrientes presentes no solo, o metabolismo e a diversidade de comunidades micro e macrobióticas ali presentes. Sabe-se que muitos desses compostos também têm um efeito fisiológico negativo específico em animais e humanos, além de alguns serem mutagênicos, cancerígenos e teratogênicos (Bensalah et al., 2011).

Considerando seu potencial efeito sobre a diversidade microbiana, os herbicidas podem prejudicar negativamente o ciclo de carbono e nitrogênio, essenciais para a manutenção da fertilidade do solo (Ding et al., 2009) e influenciar ainda a expressão de genes responsáveis por ativar proteínas capazes de degradar herbicidas (Simon & Daniel, 2011; Kozdrój & Van-Elsas, 2001).

Há vários estudos relatando contaminação ambiental por pesticidas na literatura. Segundo D'Amato et al. (2002), a carga de contaminantes de atividades agropecuárias no Estado de São Paulo foi avaliada, confirmando-se que os maiores riscos de contaminação estão associados a locais com aplicação de herbicidas.

Herbicidas da classe s-triazinas, como a atrazina, são comumente encontrados em amostras de solo e água e possuem alta persistência no meio ambiente (WU et al., 2010). O mesotrione, ingrediente ativo do herbicida comercial Callisto, também apresentou potencial de risco de contaminação de águas subterrâneas e superficiais (Martinazzo et al., 2011). Batisson et al. (2009), demonstraram ainda que o mesotrione apresenta capacidade de

retenção moderada em solos diferentes, e provavelmente é lixiviado para águas superficiais.

Segundo Chaves (2007), no Estado do Paraná, no ano de 1974, constatou-se que 84% de amostras colhidas nos rios apresentaram resíduos de pesticidas e que 78% desses resíduos mantiveram-se na água mesmo depois do tratamento convencional das águas.

É estimado que anualmente, nos EUA, são aplicadas mais de 140.000 toneladas de pesticidas sintéticos, sendo que aproximadamente 300 pesticidas diferentes são relatados por serem contaminantes de produtos alimentícios europeus (Bjørling-Poulsen et al., 2008). Apesar do Brasil não utilizar frequentemente grandes concentrações de pesticidas, comparado a outros países em desenvolvimento o uso de agroquímicos tem aumentado consideravelmente (Schreinemachers & Tipraqsa, 2012).

Um controle rigoroso para o uso de pesticidas tem-se firmado a fim de evitar a contaminação em reservas de água e, inclusive, em água para consumo humano, já que aproximadamente 80% da população humana está exposta aos pesticidas que estão presentes na água (Vörösmarty et al., 2010).

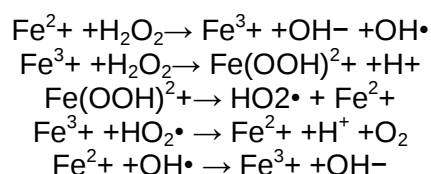
1.2 Degradação de herbicidas

O uso constante de agroquímicos nas culturas tem se tornado preocupante em relação à sua destinação. Como já citado, sabe-se que apenas 0,1% dos pesticidas atingem seu alvo; o restante tende a ficar retido em solos, ar, águas superficiais e subterrâneas (Sharma et al., 2010).

Quando ocorre a aplicação de um herbicida e a molécula chega ao solo, ela pode sofrer processos de degradação e sorção. Os resultados desses processos podem ser a absorção da molécula pelas plantas e lixiviação, podendo atingir solo, e até cursos de água subterrâneos ou formação de resíduos, pela degradação do herbicida em outras moléculas (Prata, 2000). O acúmulo de herbicidas no meio ambiente é dependente das condições físicas e químicas do solo, condições climáticas e microbiota presente no local (Konda & Pasztor, 2001).

Devido ao uso demasiado de herbicidas atualmente, há uma preocupação em relação à contaminação do meio ambiente. Para que essa

contaminação seja diminuída, alguns processos químicos ou biológicos para tratamento de ambientes impactados com herbicidas são adotados. Um exemplo de degradação química é a oxidação, que é uma das alternativas de tratamento para remoção de herbicidas. Um dos processos avançados de oxidação (AOPs) é o método de eletro Fenton que é a geração de peróxido de hidrogênio sobre um cátodo que em presença de íons Fe^{2+} forma radical $\cdot\text{OH}$ capaz de oxidar o contaminante (Bensalah, 2011):



Para a degradação do mesotrione, Bensalah (2011) demonstrou a efetividade desse método, que leva a molécula à mineralização.

Em alternativa à degradação química, a degradação de xenobióticos por microrganismos é uma estratégia muito eficiente para a remoção dessas moléculas do ambiente (Dabrowska, et al., 2004). Os processos de biodegradação e biorremediação microbiana constituem-se numa das áreas mais promissoras da biotecnologia (Martins et al., 2007; Silva et al., 2007).

Fungos e bactérias são os principais microrganismos degradadores de xenobióticos. Esses microrganismos podem degradar os poluentes em um efeito interativo, contando com a diversidade de fungos e bactérias encontradas no solo, como exemplo o cometabolismo e o consórcio (Silva, 2007; Chukwuma et al., 2012; Penny et al., 2010). O cometabolismo é caracterizado pela biodegradação fortuita de um químico alvo por meio de reações catalisadas por enzimas microbianas não específicas, por meio de seu metabolismo funcional normal (Maestre et al., 2013). Já o consórcio consiste na biodegradação de um composto que usualmente requer a cooperação de várias espécies microbianas com diferentes capacidades metabólicas, degradando o composto em conjunto (Ghazali et al., 2004).

Além de conseguirem adaptar sua maquinaria catabólica para degradar esses poluentes, alguns ainda utilizam os subprodutos como substratos para seu crescimento (Chukwuma et al., 2012).

Em decorrência destas características dos microrganismos, a biorremediação é capaz de amenizar ou anular a contaminação causada por esses pesticidas. A biorremediação consiste na transformação de xenobióticos em subprodutos menos tóxicos ou atóxicos. Vários microrganismos podem ser potenciais remediadores como bactérias, fungos, algas e mesmo plantas. Para que isso ocorra em ambiente natural, é necessário que o local permita o crescimento desses microrganismos por meio de condições adequadas de pH, temperatura, oxigênio e disponibilidade de nutrientes (Chandrakant, 2011).

Crouzet et al. (2010) demonstraram que *Bacillus* sp degrada o mesotrione e tem como subprodutos o ácido 4-metilsulfonil-2-nitrobenzóico (MNBA) e o ácido benzóico 2-amino-4-metilsulfonil (AMBA) (Fig. 1) sendo AMBA mais tóxico que o próprio mesotrione. Já Pileggi et al. (2012), descreveram *Pantoea ananatis* como degradadora do mesotrione em subprodutos provavelmente menos tóxicos que a molécula inicial.

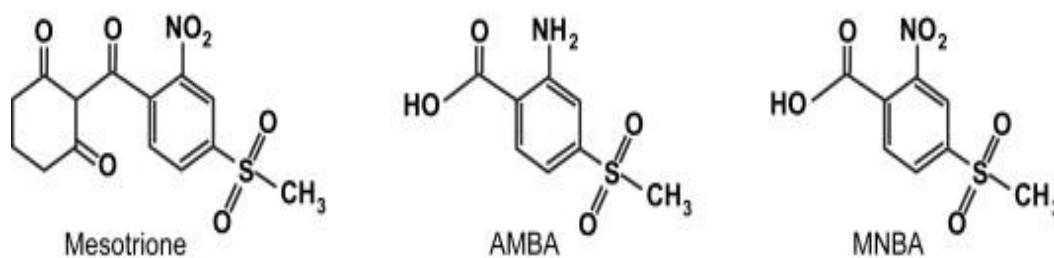


Figura 1: Fórmula estrutural do mesotrione e subprodutos da biodegradação por *Bacillus* sp.

1.3 Caracterização do mesotrione

O mesotrione foi descoberto por meio de estudos envolvendo a planta *Callistemon citrinus*. Pesquisadores do *Western Research Center* (Califórnia-EUA) observaram que relativamente poucas plantas cresciam sob essa planta (Mitchell et al., 2001). A partir do seu composto natural (leptospermone) foram produzidos análogos, dos quais resultou a molécula do mesotrione, com atividade herbicida 100 vezes maior que o composto natural (Hugie et al., 2008).

O mesotrione 2-(4-metil-nitrobenzoil) ciclo-hexano-1,3- diona (Fig. 2), é o ingrediente ativo do herbicida comercialmente conhecido como Callisto (Syngenta Crop Protection). Em sua formulação comercial, apresenta aproximadamente 48% do princípio ativo mesotrione. Para a composição do

herbicida, os outros 52% são compostos inertes e adjuvantes. Esses compostos como adjuvantes e surfactantes são importantes na ação do herbicida, pois aumentam a estabilidade, distribuição, penetração foliar e eficácia do produto (Surganet al., 2010).

O Callisto é um herbicida seletivo do grupo benzoilciclohexeno-1,3-dione, de ação sistêmica, que pode ser usado em pré ou pós emergência na cultura do milho e cana-de-açúcar em ervas daninhas dicotiledôneas. Essas culturas são capazes de resistir ao mesotrione, pois metabolizam esse herbicida rapidamente, produzindo metabólitos não tóxicos (Karam, 2004).

Os herbicidas que pertencem a esse grupo agem inibindo a enzima 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenase (HPPD). Essa enzima é responsável pela conversão de tirosina em plastoquinona e α -tocoferol, atuando como componente da via de biossíntese de carotenoides. Quando o mesotrione age inibindo a ação dessa enzima, ocorre a redução dos níveis de plastoquinona, que é de fundamental importância no carregamento de elétron entre a fotossíntese 1 e 2 (Senseman, 2007), e a diminuição de carotenoides. Dessa forma, perde-se a proteção da clorofila pela foto-oxidação, fazendo com que ocorra a decomposição da clorofila pela luz, levando ao esbranquecimento das folhas, com posterior necrose e morte (Karam, 2004).

A molécula de mesotrione (Fig. 2) é composta de duas partes: um grupamento benzil e um dione. O grupamento benzil é requerido para que a molécula apresente atividade herbicida. O grupamento presente na posição 4 tende a aumentar a acidez da molécula, e também a ação herbicida. A parte ciclohexanodione foi adicionada à molécula para bloquear sítios de metabolismo da molécula pelas plantas, o que resulta em melhor atividade do herbicida, dificultando assim a detoxificação da molécula (Mitchell et al., 2001).

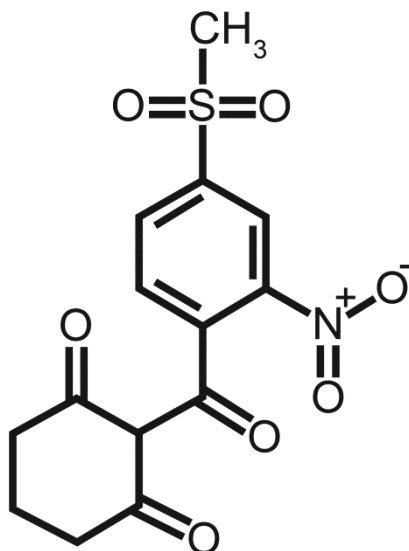


Figura 2: Fórmula estrutural da molécula do mesotrione.

1.4 *Pantoea ananatis*

P. ananatis é uma enterobactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, que produz, geralmente, um pigmento amarelado em cultura. Algumas estirpes foram caracterizadas como fitopatogênicas em hospedeiras monocotiledôneas e dicotiledôneas (Coutinho & Venter, 2009). Porém possui a capacidade de crescer em pH ácido, é resistente a concentrações saturadas de ácido glutâmico (Hara *et al.*, 2012) e apresenta características fisiológicas de interesse para estudos biotecnológicos (Katashkina *et al.*, 2009; Stavrínides & Ochman, 2010).

P. ananatis CCT 7673 é uma linhagem degradadora do mesotrione descrita previamente por Pileggi, *et al.* (2012), a qual foi isolada dentre 359 microrganismos tolerantes ao mesotrione de um lago próximo a uma área de cultura de milho onde era feita a aplicação do Callisto. Sua capacidade de tolerância ao mesotrione e Callisto foi previamente confirmada por meio das curvas de crescimento na presença dos compostos, cujos padrões foram semelhantes à condição controle (Pileggi, *et al.*, 2012).

Análises de HPLC demonstraram que *P. ananatis* CCT 7673 degrada 100% do herbicida em um período de incubação de 18 horas e produz subprodutos menos tóxicos que o mesotrione, como já citado anteriormente. Apesar de *P. ananatis* degradar 100% do herbicida, não o utiliza como fonte de nutriente e necessita da fonte de carbono glucose como fonte de energia inicial

para a degradação (Pileggi, et al., 2012). Os autores sugerem, ainda, que essa degradação ocorra em um processo de cometabolismo, onde não há especificidade nas enzimas e o herbicida é degradado em uma rota metabólica não específica.

1.5 Sistema antioxidante de resposta

Como visto até aqui, apesar de os herbicidas serem substâncias tóxicas, algumas bactérias têm a capacidade de degradá-lo por meio de enzimas inespecíficas. Algumas destas são ativadas para combater o estresse oxidativo em que microrganismos são submetidos quando entram em contato com substâncias tóxicas. Estas enzimas compõem o sistema antioxidante de resposta, que existe para combater as moléculas tóxicas geradas pelo próprio metabolismo celular, como respiração, por meio da redução do O_2 ou em condições ambientais adversas.

O oxigênio molecular é essencial para manutenção da vida na Terra. Foi devido ao acúmulo desta molécula que foi possível a evolução de vários organismos. Os aeróbicos utilizam o oxigênio como aceptor final de elétrons na respiração e para obtenção de nutrientes, por meio da oxidação (Scandalios, 2005).

Durante esses processos metabólicos, são formadas as espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são originadas por meio da redução do O_2 formando o radical superóxido ($O_2^{\bullet}$), seguido de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e por fim o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) (Garg & Manchanda, 2009; Cabiscol et al., 2000). Essas espécies são radicais livres que possuem um elétron desemparelhado, centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio. Por esta razão, são altamente reativos (Barreiros et al., 2006). Em bactérias essa redução ocorre, na maioria das vezes, pelas enzimas de cadeia respiratória associada à membrana plasmática (Lushchak, 2001).

Quando esses radicais têm seus níveis elevados, podem causar danos ao RNA, DNA, lipídeos e proteínas (Cabiscol et al., 2000; Gratão et al., 2005; Monteiro et al., 2011). Se estes radicais estiverem em alto nível na célula a ponto de exceder a capacidade de defesa, esse estado é caracterizado como estresse oxidativo (Gratão et al., 2005; Ghelfi et al., 2011).

Para que esses danos sejam minimizados ou evitados, os seres vivos possuem um sistema antioxidante de resposta, que pode ser enzimático, incluindo a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR), glutathione-S-transferase (GST) e peroxidases, ou não enzimático, o qual inclui compostos antioxidantes, que auxiliam para manter o ambiente redutor como o β -caroteno, α -tocoferol (vitamina E), glutathione reduzida (GSH), ácido ascórbico, NADPH, NADH (Scandalios, 2005; Cabiscol et al., 2000).

Em bactérias, envolvidas nessa resposta estão a defesa específica contra radicais peróxidos, mediada por um ativador transcricional OxyR, e outra defesa contra superóxido, controlado por estágios do sistema *soxRS*. Além destes sistemas transcricionais, pequenas moléculas proteicas como tioredoxina e glutaredoxina estão envolvidas no controle regulatório do sistema antioxidante (Cabiscol et al., 2000).

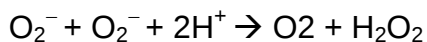
Quando o fluxo de peróxido está elevado, o fator transcricional OxyR é convertido para sua forma oxidada, ativando a expressão do *gene oxyR* que controla a expressão de outros genes, como os das enzimas HPI CAT e GR (Cabiscol et al., 2000). Já o sistema regulon *soxRS* contém pelo menos 10 genes, incluindo os genes que codificam a enzima Mn-SOD, uma das classes de enzimas SOD, as quais têm sua atividade correlacionada com mecanismos de sobrevivência a herbicidas (Stamper et al., 2003).

As enzimas do sistema antioxidante possuem papel crucial para o mecanismo redox da célula, que é o equilíbrio entre a produção de EROs e sua desintoxicação por meio das enzimas. Por isso há uma necessidade de discriminar a função destas enzimas em nível bioquímico, já que algumas delas estão relacionadas com o mecanismo de tolerância e desintoxicação de herbicidas (Van Eerd et al., 2003).

1.6 Superóxido Dismutase (SOD)

Esta enzima faz parte de um grupo de metaloproteínas que catalisa a formação de H_2O_2 a partir do radical superóxido (O_2^-), por meio da dismutação. Além disso, é a única enzima cuja atividade controla a concentração de O_2^- e H_2O_2 , substratos da reação de Haber-Weiss, o que dá origem ao radical $OH^\bullet$. Por isso, é considerada linha de frente contra o estresse oxidativo, atuando na

defesa celular contra o risco de oxidação por estes radicais (Malstrom et al., 1975; Ryan et al., 2010). Sua reação pode ser observada abaixo:



As SODs são classificadas de acordo com o metal presente em seu sítio ativo, podendo ser: Manganês [(Mn)-SOD], Ferro [(Fe)-SOD], Cobre/Zinco [(Cu/Zn)-SOD] e Níquel [(Ni)-SOD]. A Mn-SOD é encontrada em procariotos e mitocôndrias; a Fe-SOD em procariotos, algas e cloroplastos de algumas plantas (Scandalios, 2005); Cu/Zn-SOD em eucariotos, cloroplastos, e em procariotos na região periplasmática (Battistoni, 2003). A Ni-SOD é a isoforma mais rara de SOD e foi encontrada em uma fração citosólica de actinobactérias do gênero *Streptomyces* (Mates, 2000).

A enzima Fe-SOD é considerada a mais importante para proteção citoplasmática contra o estresse oxidativo (Grubber et al., 1990). A Cu/Zn-SOD contém um átomo de cada metal, o de cobre é ciclicamente reduzido/oxidado e o de zinco confere a estabilidade estrutural ao sítio ativo (Bordo et al., 1994). A isoenzima Mn-SOD é sensível ao estresse endógeno e é responsável pela alta proteção contra danos oxidativos ao DNA em *E. coli* (Lushchak, 2001). Em *Burkholderia cepacia*, Mn-SOD foi induzido para proteção à toxicidade do herbicida Quinclorac (Li et al., 2009).

1.7 Catalase (CAT)

A dismutação do radical superóxido, feita pela SOD, dá origem ao radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Fig.3). O radical H_2O_2 pode oxidar proteínas que apresentam resíduos de metionina e cisteína ou grupos tiol muito reativos, além de ser capaz de transpor membranas e gerar o radical hidroxila (Imlay, 2008; Barreiros et al., 2006).

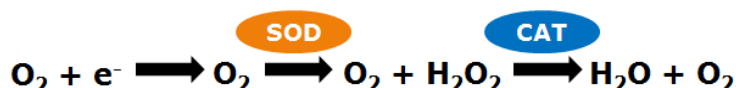
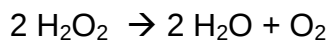


Figura 3: Reação representada pela via bioquímica de SOD (superóxido dismutase) e CAT (catalase).

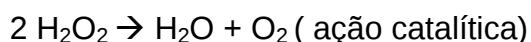
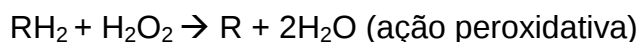
A catalase é uma enzima tetrâmera que possui grupos heme em sua estrutura, com papel importante na defesa celular, impedindo a formação do

radical hidroxila por meio da conversão de duas moléculas de H_2O_2 em água e O_2 pela transferência de dois elétrons (Zeng et al., 2010):



Em bactérias existem dois tipos de catalases: as catalases monofuncionais e a catalase-peroxidase, que se diferem pelas suas propriedades enzimáticas e sequências de aminoácidos (Nadler et al., 1986). As catalases monofuncionais são as mais difundidas entre os seres vivos. Já as catalases peroxidases (CP) são encontradas apenas em bactérias e alguns fungos e tem como função decompor o H_2O_2 , reduzindo o peróxido em água, utilizando redutores intracelulares (Nadler et al., 1986; Passardi et al., 2007).

As catalases têm sua atividade dependente da concentração de H_2O_2 , podendo atuar como peroxidativa ou catalítica. Em baixas concentrações ($<1\mu\text{M}$) atua com ação peroxidativa, e o Fe do grupo heme que interage com o H_2O_2 , formando peróxido de ferro, pode ser reduzido por doadores de hidrogênio, como etanol e ácido ascórbico. Em elevadas concentrações atua de forma catalítica, formando H_2O e O_2 , como pode ser observado abaixo:



A CAT é a única enzima que não consome equivalentes redutores celulares, e mesmo assim é muito eficiente na remoção do peróxido de hidrogênio, sob condições de estresse (Scandalios, 2005). Quando expostas a pesticidas, algumas bactérias aumentam a atividade de CAT para combate ao estresse oxidativo (Yao et al., 2006)

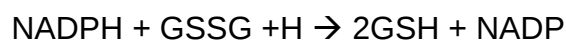
1.8 Glutathiona redutase (GR)

A enzima glutathiona redutase (GR) contém um grupo prostético flavina adenina dinucleotídeo (FAD) transferidor de elétrons, que catalisa a redução dependente de NADPH, da glutathiona oxidada (GSSG) para glutathiona reduzida (GSH) (Fig. 4) (Cabiscol et al., 2000).



Figura 4: Reação representada pela via bioquímica de GR (glutathione reductase) e GST (glutathione-S-transferase).

Sua reação encontra-se abaixo:



A GR é uma enzima importante no combate às EROs O_2^- e H_2O_2 via ciclo Halliwell-Asada. Sua expressão é promovida por meio do gene *gor* e sua regulação por meio do fator transcricional OxyR, responsável pela ativação de enzimas para o combate ao estresse oxidativo (Masip & Veermavalli, 2006). O gene *gor* é distribuído amplamente nos procariotos, plantas, protozoários e animais (Smirnova & Oktyabsky, 2005).

A glutathione encontra-se principalmente em bactérias gram-negativas e é responsável pela manutenção da homeostase redox da célula (Smirnova & Oktyabsky, 2005). Seus níveis na célula podem variar durante o crescimento, porém condições de estresse podem causar mudança nestes níveis. Sua atividade é de grande importância, pois pode refletir as condições ambientais as quais os organismos estão expostos. Isto ocorre, pois a GR tem a função de reduzir a glutathione, e os níveis de GSSG e GSH podem indicar condições adversas (Martins et al., 2011).

1.9 Glutathione-S-Transferase (GST)

A GST é constituinte de uma superfamília de enzimas que desempenham papel fundamental na desintoxicação celular. As GSTs estão agrupadas em diversas classes e estão presentes em eucariotos e procariotos. Foi demonstrado que essa enzima encontra-se no compartimento periplasmático em bactérias (Alocatti et al., 2009). É constituída de heterodímeros ou homodímeros geralmente com subunidades de 23 a 29 kDa. Cada subunidade possui um sítio de ligação com GSH (sítio G), e um sítio de ligação para o substrato eletrofílico adjacente (sítio H). A GST possui uma

especificidade ampla para substratos eletrofílicos, composta de ligações duplas conjugadas adjacentes a um grupo aceptor de elétrons.

Sua principal função é a capacidade de catalisar a conjugação da glutatona a diversos substratos hidrofóbicos eletrolíticos, sendo que a GSH é a doadora de tiol para a enzima (Hayes et al., 2005). Estão associadas à metabolização de compostos xenobióticos e toxinas, e proteção contra o estresse oxidativo e químico (Allocati et al., 2009). Podem ainda participar em processos de desintoxicação por formação de conjugados com GSHs, e atuar no metabolismo de produtos secundários, incluindo a estabilização de flavonóides (Mattison, 1998).

Esta enzima é capaz de detoxificar classes de pesticidas, como as s-triazinas, atuando na primeira etapa de biodegradação do herbicida por meio da remoção do átomo de cloro a partir da conjugação atrazina- GSH (Labrou et al., 2005). Existe um complexo de reações após a entrada de herbicidas na célula, que envolvem vias de catabolismo de S-glutationalização, e que podem resultar tanto na desintoxicação metabólica, como na bioativação de vias específicas de degradação de pesticidas (Hicks-brazier et al., 2008).

1.10 Estrutura de lipídios de membrana

É evidente que xenobióticos, como os pesticidas, afetam de alguma forma o metabolismo celular de microrganismos. Como já citado anteriormente, quando bactérias são expostas a condições de estresse, uma resposta antioxidativa composta por enzimas é ativada. Como forma de proteção, além das enzimas, as bactérias possuem a capacidade de modificar a composição de ácidos graxos da membrana plasmática, bem como a saturação dos mesmos, conhecida como “homeoviscous adaptation”, muito citada em bactérias Gram-negativas (Petersen et al., 1994; Heipeiper et al., 1994).

Um estudo feito por Balague et al. (2001), com *Escherichia coli*, exposta ao herbicida 2,4-D, demonstrou a diminuição da fluidez da membrana em resposta aos danos causados pelo herbicida no meio de cultura. Já com *Staphylococcus haemolyticus*, exposto a tolueno, benzeno e ciclohexeno, a membrana celular apresentou um aumento na fluidez (Nielsen et al., 2005).

A maioria dos estudos encontrados sobre mudança na fluidez de membrana plasmática em resposta a herbicidas são com bactérias Gram-negativas, porém *Bacillus* sp. ORAs2, na presença de tolueno, e em *Rhodococcus erythropolis* DCL14, na presença de alcanos, alcenos e terpenos, apresentaram aumento na saturação de lipídeos de membranas (Carvalho, et al., 2008).

A mudança de saturação dos lipídeos de membrana seria uma possível resposta adaptativa em bactérias para suportar um ambiente estressante causado pelo herbicida, evitando maiores danos celulares, já que as EROs têm a capacidade de reagir com ácidos graxos insaturados (Lima & Abdala, 2001).

2. OBJETIVO

O presente estudo teve por escopo avaliar a influência do mesotrione e Callisto como agentes indutores de estresse oxidativo para o metabolismo celular de *Pantoea ananatis* CCT7673, bem como identificar possíveis mecanismos de tolerância.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento da linhagem degradadora de mesotrione

As linhagens tolerantes ao Callisto foram isoladas de água de um lago em torno a uma plantação de milho tratado com este herbicida, situado na Fazenda Escola Capão da Onça (Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brasil, longitude 50°03'W, latitude 25°05'S, altitude média de 1000 m). O isolamento foi feito por diluição em série, em solução 0,9% de NaCl. O material foi plaqueado em Meio Mineral com Mesotrione (MMM), contendo 0,04 mM de Mesotrione (concentração de campo) e tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, e os seguintes ingredientes, em g/L: 3 NaNO₃; 0,5 MgSO₄; 0,5 KCl; 0,01 FeSO₄; 0,04 CaCl₂; 0,001 MnSO₄; 0,4% glicose e 15 ágar. As amostras foram incubadas a 30° C. Linhagens com tolerância ao mesotrione foram isoladas e estocadas em 50% de glicerol a – 86°C até serem usadas (Pileggi et al., 2012).

3.2 Material biológico

P. ananatis CCT 7673 foi isolada, dentre 359 microorganismos tolerantes ao Callisto, e previamente caracterizada como linhagem degradadora do mesotrione (Pileggi et al., 2012).

3.3 Químicos utilizados

Foram utilizados o herbicida comercial Callisto, que apresenta 48 % de mesotrione em sua composição, e adjuvantes [1,2-benzisotiazolin-3-one; 1-Octanol; poli(oxi-1,2-etanediil), alfa-isodecil-omega-hidroxi-fosfato; - (<http://www.syngenta-crop.co.uk/>)], bem como o princípio ativo mesotrione utilizado em meios de cultura fornecido pela Syngenta Crop Protection.

3.4 Curva de crescimento

Amostras de 600 µL foram coletadas a cada 2 h durante um período de 24 h para determinação da densidade óptica em espectrofotômetro (600nm). Para uma maior precisão na quantificação do crescimento bacteriano, diluições

foram feitas com solução salina (NaCl 0,9%) sempre que as amostras atingiram um valor de densidade óptica maior que 0,6.

3.5 Delineamento experimental e crescimento bacteriano

A linhagem foi crescida em 1350 mL de LB [Luria Broth (componentes em g L⁻¹: 10.0 triptona; 5.0 extrato de levedura; 10.0 NaCl)] a 30 °C durante 24 h. Após o período de crescimento, as amostras foram centrifugadas a 11600 g por 5 min. a 4°C. O precipitado foi lavado duas vezes com tampão PBS (dados em g L⁻¹: 8 NaCl; 0,2 KCl; 1,44 Na₂HPO₄ e 0,24 KH₂PO₄) e dividido em 9 tubos de centrifuga contendo 50 mL de Meio Mineral (10 mM tampão fosfato potássio pH 7.0, (expresso em g L⁻¹): 3 NaNO₃; 0,5 MgSO₄; 0,5 KCl; 0,01 FeSO₄; 0,04 CaCl₂; 0,001 MnSO₄ e 0,4% glucose).

Os tratamentos MM (controle), Meio Mineral Mesotrione (MMM: MM + 0.04 mM mesotrione, 1 × concentração campo), e Meio Mineral Callisto (MMC: MM + 0.04 mM mesotrione em Callisto) foram realizados em triplicatas, incubados a 30°C, centrifugadas após 12h, 17,5h e 19h e utilizados nos experimentos subsequentes. Esses horários foram definidos a fim de avaliar o efeito da degradação do mesotrione nas atividades enzimáticas nos períodos antes, durante e depois da degradação, pois foi descrito previamente por Pileggi et al. (2012) que *P. ananatis* degrada 100% do herbicida entre 17 e 18 horas de incubação.

3.6 Viabilidade celular

A bactéria em suspensão (item 3.5) foi diluída a 10⁻⁷ em 30 min e 10⁻⁸ para 12h, 17,5h e 19h em uma solução salina e homogeneizada. Amostras (100 µL) foram plaqueadas em triplicada em meio LA (Luria broth + Agar), e incubadas a 30°C por 24h para contagem subsequente de colônias.

3.7 Peroxidação de lipídios

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação da produção de malondialdeído (MDA), um metabólito reativo ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), método adaptado de Health & Packer (1968). As células (item 3.5) foram centrifugadas após 12h, 17,5 h e 19 h de incubação a 11600 g

por 5 min a 4 °C, e o precipitado foi macerado em nitrogênio líquido; 0,1 g do macerado de cada uma das amostras foi homogeneizado com 1 mL de TCA (ácido tricloroacético) 0,1 % e centrifugados a 11600 g por 5 min. Do sobrenadante, foi retirada uma alíquota de 0,25 mL e transferida para outro tubo juntamente com 1 mL de solução contendo TCA 20 % e TBA 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, e o sobrenadante foi retirado para leitura em espectrofotômetro a 535 e 600 nm. A quantidade de MDA foi expressa em mmol/mg de massa fresca.

3.8 Quantificação de Peróxido de hidrogênio

As células [0,1g (item 3.5)] foram maceradas em nitrogênio líquido, homogeneizadas com TCA 0,1% e centrifugadas a 11.600 g por 15 min a 4°C. Foi retirado 0,2 mL do sobrenadante e transferido para um tubo contendo 0,2 mL de uma solução 100 mM de tampão fosfato pH 7,5 e 0,8 mL da solução 1M de KI. A solução foi acondicionada no escuro a 4°C por 1 h, seguido por 20 min em temperatura ambiente. A absorbância foi medida em espectrofotômetro em 390 nm e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/g}$ de massa fresca (Alexieva et al., 2001).

3.9 Quantificação do radical superóxido

As células [0,1 g (item 3.5)] foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas com 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,8; NBT 0,05% e NaNO_3 10 mM. A solução foi deixada por 1 h em temperatura ambiente, transferido 1 mL para outro tubo e aquecido a 85°C por 15 min. As amostras foram resfriadas rapidamente no *freezer*, a fim de parar a reação e lidas em espectrofotômetro a 580 nm (Duke & Salin, 1983).

3.10 Modificações na membrana bacteriana

O material (item 3.5) foi centrifugado por 5 min a 11,600 g a 4°C e o precipitado foi congelado a -80°C. O material foi liofilizado por 15 h, ao qual foi

adicionada uma solução de clorofórmio, metanol e água (1: 2: 0,8) e mantido sob agitação a 180 rpm por 18h segundo Bligh e Dyer (1959), com modificações. Foi adicionado clorofórmio e água até uma proporção de 1:1:0,9 de clorofórmio, metanol e água. A fase com o clorofórmio foi coletada. Os lipídios de membrana foram analisados em espectroscopia de infravermelho em transmitância (FTIR), nos comprimentos de onda de 400 a 4000 cm^{-1} (utilizando 100 mg de KBr – Brometo de potássio e 4 mg do extrato bacteriano). Os resultados foram avaliados por meio da análise de componentes principais (PCA) utilizando o *software* Pirouette v 4.0 (Infometrix, Bothell, WA, EUA), nos comprimentos de onde de 1400 a 3200 cm^{-1} .

3.11 Extração de proteínas

Para a extração de proteínas, todos os passos foram realizados a 4°C, salvo indicação contrária. A cultura (item 3.5) foi centrifugada a 11600 *g* por 10 min, e o precipitado macerado com nitrogênio líquido e homogeneizado em 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,5 contendo ácido etileno diamino tetracético 1 mM (EDTA), ditioneitol 3 mM (DTT) e polivinilpirrolidona 5% (PVPP) (Azevedo et al., 1998). O material foi então centrifugado a 11600 *g* por 30 min, e o sobrenadante foi armazenado em alíquotas a -80 °C.

3.12 Quantificação de proteínas

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

3.13 Variações no perfil proteico

As proteínas das amostras bacterianas foram separadas por eletroforese em sistema de SDS-PAGE, que utiliza o agente dissociante dodecil sulfato de sódio (SDS) para desnaturar as proteínas em subunidades (Gratão et al., 2008).

Para a confecção do gel desnaturante (10 % poliacrilamida) foi utilizado o seguinte protocolo: Gel resolução: 2,5 mL de uma solução de poliacrilamida 40% (Sigma), 2,5 mL de Tampão TRIS-HCl 2,9 M, pH 8,9, 100 µL de SDS (10 %) e 5 mL de água. Como catalisadores foram utilizados 19 µL de TEMED e 25 µL de persulfato de amônia 1 %. Para a confecção do gel de empacotamento foi utilizado 500 µL da solução de poliacrilamida 40% (Sigma), 1,25 mL de Tampão TRIS-HCl 500 mM, pH 6,7, 50 µL de SDS (10 %), 2,75 mL de água destilada, 10 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônio 1 %. Foram aplicadas 20 µg de proteína das amostras no gel juntamente com o tampão de amostra [3 mL de água destilada, 1 mL de tampão de TRIS-HCl 500 mM pH 6,7, 1,6 mL de SDS (10%), 400 µL de solução 0,5% de azul de bromofenol e 400 µL de mercaptoetanol na proporção 1:1].

Os géis foram submetidos a uma corrente constante de 15 mA, na temperatura ambiente com tampão de corrida: TRIS 25 mM pH 8,3, 192 mM de glicina e SDS 1%. Após a eletroforese, o gel foi corado com Comassie-Blue (0,5g de Comassie Blue R-250 em 500 mL de solução descorante) por 12 horas e posteriormente incubado em solução descorante (400 mL de Metanol p.a. e 70 mL de ácido acético glacial, completando o volume para 1000 mL de água destilada) até a visualização das bandas.

3.14 Atividades das enzimas antioxidativas

As enzimas antioxidativas analisadas quantitativamente foram catalase, glutathiona redutase e glutathiona-S-transferase por espectrofotometria. As análises qualitativas de catalase, superóxido dismutase e glutathiona redutase foram determinadas por atividade em géis não desnaturantes

Para a confecção dos géis não desnaturantes (12 % poliacrilamida) foi utilizado o mesmo protocolo para todas as enzimas (Azevedo et al., 1998). Para a confecção de um gel foi usado: Gel de resolução: 3 mL de uma solução de poliacrilamida 40% (Sigma), 2,5 mL de Tampão TRIS 3M, pH 8,9, 4,5 mL de água destilada. Como catalisadores utilizaram-se 19 µL de TEMED e 25 µL de persulfato de amônia 1 %. Para o gel de empacotamento foi utilizada uma solução composta por 500 µL de uma solução poliacrilamida 40% (Sigma), 1,25 mL de Tampão TRIS 500 mM pH 6,7, 2,75 mL de água, 10 µL de TEMED e 50

μL de persulfato de amônio 1 %. O tampão de eletrodo para corrida do gel foi composto por TRIS 25 mM, pH 8,3 acrescido de 192 mM de glicina.

3.14.1 Atividade da SOD

3.14.1.1 Atividade em PAGE não desnaturante

A atividade de SOD e a caracterização de suas isoformas foram realizadas em PAGE. Na eletroforese em PAGE foram utilizadas como padrão duas (2) unidades de SOD de fígado de boi (Sigma). Após a separação das proteínas por eletroforese, a atividade de SOD foi determinada como descrito por Beuchamp & Fridovich (1971).

Ao final do tempo de corrida, os géis foram lavados com água deionizada e incubados no escuro, na temperatura ambiente, em uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8, EDTA 1 mM, riboflavina 0,05 mM, nitroazul tetrazólio (NBT) 0,1 mM e TEMED 0,3 %. Ao final de 30 min, a mistura de reação foi descartada, os géis lavados com água deionizada e colocados sob iluminação até o aparecimento de bandas.

3.14.1.2 Determinação das isoenzimas de SOD em PAGE não desnaturante

Para a caracterização das isoformas de SOD, o gel foi dividido verticalmente em três partes após a corrida eletroforética. Uma parte foi imersa em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8. A segunda parte imersa em uma solução com 100 mL do mesmo tampão contendo 0,0292 g de EDTA e 0,0130 g de KCN, e a última foi imersa em uma solução do tampão já citado, acrescido de 0,0292 g de EDTA e 70 μL de H_2O_2 30 %. Os géis permaneceram imersos nas respectivas soluções de revelação por 20 min; em seguida foram lavados com H_2O destilada e submetidos à revelação com NBT e riboflavina como descrito anteriormente. Ao final da revelação, as bandas foram analisadas quanto à presença conforme o fator inibidor presente nas soluções de tratamento. As isoformas foram classificadas como descrito por Guelfi et al. (2003): Cu/Zn-SOD quando inativada na presença de KCN e H_2O_2 ; Fe-SOD se a banda foi inativada somente na presença de H_2O_2 , sendo resistente ao KCN,

e Mn-SOD se a isoforma foi resistente aos dois tratamentos (Azevedo et al., 1998).

3.14.2 Atividade da CAT

3.14.2.1 Atividade em PAGE não desnaturante

A determinação da atividade de CAT foi realizada em PAGE 12 %, a 4°C e com corrente constante de 15 mA. O padrão utilizado foi de CAT de fígado de boi (2 unidades) e 13 µg de extrato proteico das amostras. Após o tempo de corrida (21 horas), o gel foi lavado em água deionizada (3 × 15 min) e incubado por 10 min em solução de H₂O₂ 0,003 % (v/v), à temperatura ambiente, sob agitação em mesa oscilatória. Após esse período, o gel foi lavado em água deionizada e colocado por 10 min em uma solução de FeCl₃ 1 % e K₂Fe(CN)₆ 1 % (m/v) sob agitação. Em seguida, a solução foi retirada e o gel lavado com água deionizada. A fixação foi realizada com uma solução de ácido acético (7%) por 15 min e os géis foram foto documentados (Azevedo et al., 1998).

3.14.2.2 Atividade em espectrofotômetro

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

3.14.3 Atividade de GR

3.14.3.1 Atividade em PAGE não desnaturante

Foram aplicados 20 µg de extrato proteico das amostras em PAGE (12%) (item 3.12) e utilizada 1 (uma) unidade de GR como padrão. Após

aproximadamente 5 h de corrida eletroforética, o gel foi lavado em água destilada e incubado por 30 min na temperatura ambiente em uma solução de Tris 0,25 M pH 7,5, MTT 0,5 mM, DPIP 0,7 mM, GSSG 3,4 mM e NADPH 0,5 mM. Após o aparecimento das bandas, essa solução foi retirada e o gel incubado por 15 min em uma solução de 7% de ácido acético. Após a fixação, o gel foi documentado (Lee & Lee, 2000).

3.14.3.2 Atividade em espectrofotômetro

A atividade de GR foi determinada em espectrofotômetro, como descrito por Gomes-Junior et al. (2007), com modificações. O ensaio foi realizado a 30°C em uma mistura de reação contendo 1 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,5), 500 µL de DTNB 1mM, 100 µL de GSSG 1 mM e 100µL de NADPH 0,1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 20 µL do extrato proteico à mistura de reação e monitorada por 1 min através da redução da glutathiona oxidada em 412 nm. A GSH reduziu o composto DTNB, que representa a cromóforo amarelo. Os valores da atividade de GR foram expressos em µmol/minuto/mg de proteína.

3.14.4 Atividade de GST

3.14.4.1 Atividade em espectrofotômetro

A atividade de GST for determinada seguindo o protocolo descrito por Zablutowics et al. (1995), com modificações. O ensaio foi conduzido em uma solução contendo: 900µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,5), 25 µL de CDNB 40 mM, ambos incubados a 30°C, 50µL de GSH 0,1 mM e 25µL do extrato proteico da amostra, completando o volume para 1 mL. A leitura foi monitorada durante 3 min em espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 340 nm, que monitora a conjugação CDNB-GSH, sendo iniciada a partir de 1 min depois da mistura da solução.

A reação foi iniciada com a adição de GSH ao tampão já citado, e o CDNB foi usado como branco do ensaio. A atividade de CDNB foi analisada e seu valor subtraído dos valores reais das amostras, o qual serviu como um controle da reação (Zablutowicz et al., 1995).

A atividade de GST foi expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, utilizando o coeficiente de extinção de $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.15 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise multivariada de componentes principais (PCA) utilizando o programa Pirouette 4.0 (Infometrix) com pré-processamento autoescalado, com tratamento em 1 derivada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade específica de glutathione-S-transferase e mudança na saturação lipídica podem estar relacionadas com a degradação do mesotrione por *Pantoea ananatis* CCT 7673

Resumo

Herbicidas são amplamente utilizados para aumentar a produção agrícola e são responsáveis por 35% de todos os agrotóxicos aplicados anualmente. Após a aplicação, os herbicidas podem permanecer no solo como resíduos perigosos. O mesotrione (2 - [4 - metilsulfonil - 2 - nitrobenzoi] 1,3-cyclohexanedione) é o ingrediente ativo de Callisto, um herbicida utilizado no milho . *Pantoea ananatis* CCT 7673, é uma enterobactéria isolada de água e foi previamente caracterizada como linhagem degradadora do mesotrione. Os objetivos deste trabalho foram o avaliar a influência do mesotrione e Callisto como agentes indutores de estresse oxidativo para o metabolismo celular de *Pantoea ananatis* CCT7673, bem como identificar possíveis mecanismos de tolerância a estes herbicidas. As atividades enzimáticas de SOD, CAT e GR foram avaliadas em PAGE não desnaturante e de CAT, GR e GST em espectrofotômetro. Além disto, as taxas de malondialdeído (MDA), radical superóxido e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram medidas em espectrofotômetro. Todas as análises foram realizadas antes e após a degradação do mesotrione. Meio mínimo sem herbicida (MM) foi utilizado como controle. O herbicida provou ser agente causal do estresse oxidativo pelos dados de peróxido de hidrogênio. Inesperadamente, as taxas de MDA e GR mostraram-se inferiores nos tratamentos com herbicida em relação ao controle, sem alteração no crescimento bacteriano. A atividade de glutathione-S-transferase foi maior no tratamento com mesotrione em comparação com o controle e Callisto, durante e após a degradação. Estes resultados sugerem que essa enzima pode estar relacionada com o processo de degradação do mesotrione, provavelmente por cometabolismo. As taxas de peroxidação lipídica mostraram ser menores na presença do herbicida em comparação com o controle, sem mudanças na taxa de crescimento Quando exposta ao herbicida, *P. ananatis* CCT 7673 apresentou alterações na saturação de lipídios de membrana. Estas mudanças podem interferir na entrada do herbicida na célula. Tais características podem estar associadas a um nível de plasticidade fenotípica em *P. ananatis* CCT 7673, tornando essa bactéria um modelo interessante para estudos de tolerância a herbicidas e evolução de microbiotas em ambientes submetidos a diferentes graus de pressão seletiva.

Palavras-chave: biodegradação de herbicidas, peroxidação lipídica, lipídeos de membrana, resposta antioxidativa, adaptação bacteriana, Callisto.

Abstract

Herbicides are widely used to increase crop production and account for 35% of all agrochemicals applied annually. After application, the herbicides can remain in the soil as hazardous residues. Mesotrione, (2-[4-methylsulfonyl-2-nitrobenzoyl]1,3-cyclohexanedione), is the active ingredient of Callisto, an herbicide commonly used in corn. *Pantoea ananatis* CCT 7673, an Enterobacteria isolated from water, has been previously cited as mesotrione-degrading strain. The aim of this study was to evaluate the influence of mesotrione and Callisto as oxidative stress-inducing agents for cellular metabolism of *Pantoea ananatis* CCT7673 and identify possible mechanisms of tolerance. SOD, CAT and GR activities were evaluated in non-denaturing PAGE and CAT, GR and GST in spectrophotometer. Also, the rates of malonaldehyde (MDA), superoxid and peroxide hydrogen (H_2O_2) were measured in a spectrophotometer. Minimal medium with no herbicide (MM) was used as control. Lipid peroxidation, superoxide and peroxide hydrogen quantification and SOD, CAT, GR and GST activities were analyzed before and after degradation of mesotrione. The herbicide proved to be the cause of oxidative stress, according to peroxide hydrogen data. Unexpectedly, the rates of lipid peroxidation (MDA) and GR showed to be lower in the presence of the herbicide when compared to the control, with no changes in bacterial growth. The activity of GST was higher in mesotrione treatment in comparison to control and Callisto, during and after degradation. These results suggest that this enzyme may be related to the mesotrione degradation, probably by cometabolism. The rates of lipid peroxidation were shown to be lower in the presence of the herbicide compared to the control, with no changes in growth rates when exposed to herbicide. *P. ananatis* CCT 7673 showed changes in the saturation of membrane lipids. These changes may interfere with herbicide entry into the cell. These characteristics may be associated with a level of phenotypic plasticity in *P. ananatis* CCT 7673, making this an interesting bacterium for studies of herbicide tolerance and evolution of microbiota in environments subjected to different degrees of selective pressure model.

Keywords: herbicide biodegradation, lipid peroxidation, membrane lipids, antioxidative response, adaptative capacity, Callisto.

4.1 Introdução

Com o advento da Revolução Verde em 1970, culturas agrícolas têm se aperfeiçoado e o uso de herbicidas e fertilizantes foi triplicado em culturas de cereais e outras vegetais (Sands et al., 2009). Estima-se que anualmente nos EUA, são aplicadas mais de 140.000 toneladas de pesticidas sintéticos, e na Europa, aproximadamente 300 pesticidas diferentes foram relatados por serem contaminantes de produtos alimentares (Bjørling-Poulsen et al., 2008). O Brasil atualmente não usa grandes quantidades de pesticidas em comparação aos países desenvolvidos, porém o uso de agroquímicos tem aumentado consideravelmente (Schreinemachers & Tipraqsa, 2012). Pesticidas têm sido amplamente utilizados para aumentar a produção agrícola a fim de sustentar o crescimento da população humana (Donalson, 2010). Entretanto, existem preocupações sobre os efeitos adversos desses químicos no meio ambiente, pois os agroquímicos não são degradados com facilidade por todos os microrganismos (Copley, 2009). Esses pesticidas podem, ainda, alterar a diversidade microbiana (Ge et al., 2011; Yu et al., 2013) em decorrência de mudanças nas propriedades do solo. Microrganismos de solo desempenham papel importante na decomposição de matéria orgânica e ciclagem de nutrientes e a alteração desses organismos pode afetar até a fertilidade do solo (Ding et al., 2009).

A contaminação do solo por pesticidas pode atingir o lençol freático e, conseqüentemente, rios e lagos. Sabe-se que aproximadamente 80% da população mundial está exposta a pesticidas presentes na água (Vörösmarty et al., 2010).

Mesotrione (2-[4-methylsulfonyl-2-nitrobenzoyl]1,3-cyclohexanedione) é o ingrediente ativo do herbicida Callisto usado em pré ou pós-emergência no controle de ervas daninhas na cultura do milho (Batisson et al., 2009). Esse herbicida é derivado de uma fitotoxina produzida pela planta *Callistemon citrinus* e age inibindo a enzima - 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenase (HPPD), que interfere na síntese de carotenóides (Mitchell et al., 2001). Mesotrione já foi previamente citado em estudos de contaminação ambiental (Stoob et al., 2005). Foram descritos como subprodutos do mesotrione o ácido 4-metilsulfonil-2-nitrobenzóico (MNBA) e o ácido benzóico 2-amino-4-metilsulfonil (AMBA) degradado por *Bacillus* sp (Durand et al., 2006). Desses produtos,

AMBA é mais tóxico que o mesotrione (Bonnet et al., 2008; Mitchell et al., 2001). Em um estudo de Pileggi et al. (2012), demonstrou-se que produtos diferentes de AMBA foram obtidos por meio da degradação do mesotrione por *Pantoea ananatis* CCT 7673.

A degradação biológica de pesticidas é uma estratégia importante para a remoção de xenobióticos do ambiente. A aplicação da biodegradação e biorremediação de herbicidas é uma das áreas mais promissoras da pesquisa de biotecnologia (Martins et al., 2007; Silva et al., 2007). Bactérias e fungos são os principais agentes degradadores desses xenobióticos, podendo agir de forma interativa uns com os outros, contando com a versatilidade metabólica desses organismos (Silva, 2004).

Microrganismos degradadores podem tolerar agroquímicos através da indução da resposta antioxidativa ao estresse. Isolados de bactérias expostos a 62mM e 620 mM do herbicida acetochlor mostraram um aumento de 39% e 34%, na peroxidação lipídica respectivamente (Martins et al., 2011).

Estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) a níveis que excedem a capacidade de defesa da célula (Gratão et al., 2005; Ghelfi et al., 2011). Em bactérias, a maioria das EROs são derivadas de redução sequencial do O₂, o qual é catalizado por enzimas da cadeia respiratória que estão associadas com a membrana plasmática (Lushchak, 2001). Os produtos do metabolismo aeróbico são altamente reativos: peróxido de hidrogênio, (H₂O₂) superóxido (O₂[•]) e hidroxila (OH[•]) são radicais que podem causar danos ao DNA, RNA, proteínas e lipídios (Cabiscol et al., 2000; Gratão et al., 2005; Monteiro et al., 2011). Entretanto, um complexo sistema de enzimas antioxidativas está envolvido no combate as EROs, que inclui superóxido dismutase, catalase, peroxidases e glutathione redutase (Gratão et al., 2005).

P. ananatis CCT 7673 é uma linhagem degradadora de mesotrione previamente descrita por Pileggi et al. (2012), a qual foi isolada de água, junto a outros 359 microrganismos tolerantes ao herbicida. Essa bactéria pode crescer em pH ácido e apresenta características fisiológicas de interesse em estudos biotecnológicos (Katashkina et al., 2009).

O crescimento de *P. ananatis* (Pileggi, et al., 2012) mostrou que essa bactéria pode tolerar mesotrione e Callisto, pois não apresentou diferenças no

crescimento celular. Análises de HPLC demonstraram que *P. ananatis* CCT 7673 degrada 100% do herbicida em até 18 horas de incubação. Diferentemente de Crouzet et al. (2010), que mostrou que *Bacillus* sp. degrada o mesotrione em AMBA e MNBA como subprodutos, *P. ananatis* apresentou subprodutos menos tóxicos. Apesar de *P. ananatis* degradar mesotrione, não o utiliza como fonte de nutriente (Pileggi et al, 2012).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o ingrediente ativo mesotrione e seu produto comercial Callisto como fontes estressantes para o metabolismo celular de *P. ananatis*, bem como a capacidade desta bactéria em tolerar uma condição de estresse oxidativo.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Formulações utilizadas do herbicida

Nos meio de cultura indicados neste trabalho, foram utilizados o herbicida comercial Callisto (Syngenta Crop Protection), que apresenta 48% de mesotrione (Fig.2) em sua composição, e adjuvantes [1,2-benzisotiazolin-3-one; 1-Octanol; poli (oxi-1,2-etanediil) e alfa-isodecil-omega-hidroxi-fosfato], e o princípio ativo mesotrione, para meio de cultura com 88% de pureza fornecido pela Syngenta Crop Protection.

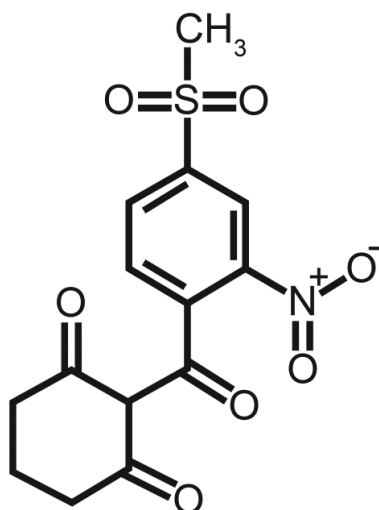


Figura 2: Estrutura química do mesotrione

4.2.2 Linhagem degradadora de mesotrione

A bactéria usada neste trabalho foi a linhagem de *Pantoea ananatis* CCT 7673, a qual foi isolada da Fazenda Escola Capão da Onça – Universidade Estadual de Ponta Grossa Ponta Grossa-PR, Brasil, que se mostrou como uma linhagem degradadora deste herbicida (Pileggi et al., 2012).

4.2.3 Tratamento com herbicida e determinação da curva de crescimento

Amostras de 600 µL foram coletadas a cada 2h durante 24h para determinação da absorbância da cultura em espectrofotômetro (600nm). Para uma maior precisão do crescimento bacteriano, diluições foram feitas com solução salina (0,9% de NaCl) sempre que as amostras atingiram um valor maior que 0.6 O.D.

4.2.4 Crescimento bacteriano

A linhagem foi crescida em 1.350 mL de LB (Caldo Luria) a 30 °C durante 24 h. Após o período de crescimento, as amostras foram centrifugadas a 11600 g por 5 min a 4 °C. O precipitado foi lavado duas vezes com tampão PBS (expresso em g L⁻¹): (8 NaCl, 0,2 KCl, 1,44 Na₂HPO₄ e 0,24 KH₂PO₄) e dividido em 9 tubos de centrífuga contendo 50 mL de Meio Mineral [tampão fosfato potássio 10 mM, pH 7.0, (expresso em g L⁻¹): 3 NaNO₃, 0,5 MgSO₄, 0,5 KCl, 0,01 FeSO₄, 0,04 CaCl₂, 0,001 MnSO₄, 0,4 glucose].

Os experimentos foram realizados em triplicata nas seguintes condições: MM (controle), Meio Mineral Mesotrione (MMM: MM + 0,04 mM mesotrione, 1 × concentração campo), e Meio Mineral Callisto (MMC: MM + 0,04 mM mesotrione em Callisto). Todos os tratamentos foram incubados a 30°C. Para os testes subsequentes, as amostras foram centrifugadas nos tempos de 12h, 17,5h e 19h de incubação nos tratamentos.

4.2.5 Viabilidade celular

A bactéria em suspensão (4.2.5) foi diluída a 10⁻⁷ em 30 min e 10⁻⁸ para 12h, 17,5h e 19h em solução salina e homogeneizada. Amostras (100 µL) foram plaqueadas em triplicata contendo meio LA (Caldo Luria + Agar), e incubados a 30°C por 24h para contagem subsequente de colônias.

4.2.6 Peroxidação de lipídios

A peroxidação lipídica foi quantificada por meio da estimativa dos níveis do ácido tiobarbiturico (TBA) substâncias reativas (Heath & Packer, 1968). As concentrações do malondialdeído (MDA) foram monitoradas a 535 nm e 600 nm em espectrofotômetro e as concentrações do MDA foram calculadas utilizando um coeficiente de extinção de 155 mM cm^{-1} .

4.2.7 Quantificação de Peróxido de hidrogênio

As células [0,1 g (item 4.2.5)] foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas com ácido tricloroacético 0,1% (TCA) e centrifugadas a 11.600 g por 15 min a 4°C. A seguir, 0,2 mL do sobrenadante foi retirado e transferido para um tubo contendo 0,2 mL da solução 100 mM de tampão fosfato pH 7,5 e 0,8 mL da solução 1M KI. A solução foi, então, acondicionada no escuro a 4°C por 1 h, ao que se seguiram 20 min em temperatura ambiente. A absorbância foi medida em espectrofotômetro em 390 nm e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/g}$ de massa fresca (Alexieva et al., 2001).

4.2.8 Quantificação do radical superóxido

As células [0,1 g (item 4.2.5)] foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas com 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,8; NBT 0,05% e NaNO_3 10 mM. A solução foi deixada por 1h em temperatura ambiente. A seguir, transferiu-se 1 mL da referida solução para outro tubo, que foi aquecido a 85°C por 15 min. Após esse período, as amostras foram resfriadas rapidamente no freezer e lidas em espectrofotômetro a 580 nm (Duke & Salin, 1983).

4.2.9 Modificações na membrana bacteriana

O material (item 4.2.5) foi centrifugado por 5 min a 11,600 g a 4°C e o precipitado foi congelado a -80°C. O material foi liofilizado por 15 h, ao qual foi adicionada uma solução de clorofórmio, metanol e água (1: 2: 0,8) e mantido

sob agitação a 180 rpm por 18h segundo Bligh e Dyer (1959), com modificações. Foi adicionado clorofórmio e água até uma proporção de 1:1:0,9 de clorofórmio, metanol e água. A fase com o clorofórmio foi coletada. Os lipídios de membrana foram analisados em espectroscopia de infravermelho em transmitância (FTIR), nos comprimentos de onda de 400 a 4000 cm^{-1} (utilizando 100 mg de KBr – Brometo de potássio e 4 mg do extrato bacteriano). Os resultados foram avaliados por meio da análise de componentes principais (PCA) utilizando o *software* Pirouette v 4.0 (Infometrix, Bothell, WA, EUA), nos comprimentos de onde de 1400 a 3200 cm^{-1} .

4.2.10 Extração de proteínas e quantificação

Para a extração de proteínas todos os passos foram realizados a 4°C, salvo indicação contrária. A cultura (item 4.2.5) foi centrifugada a 11600 *g* por 10 min e o precipitado macerado com nitrogênio líquido e homogeneizado em 100 mM tampão fosfato de potássio pH 7,5 contendo ácido etileno diamino tetracético 1 mM (EDTA), ditioneitol 3 mM (DTT) e polivinilpirrolidona 5% (PVPP) (Gratão et al., 1998). O material foi então centrifugado a 11600 *g* por 30 min, e o sobrenadante foi armazenado em alíquotas a -80 °C. Para determinar as concentrações de proteínas totais, foi utilizado o método de Bradford (1976), utilizando o BSA (“bovine serum albumin”) como padrão.

4.2.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese foi realizada utilizando-se géis contendo 12% de poliacrilamida com 4% de gel de empilhamento. SDS foi omitido para os géis não desnaturantes. Uma corrente constante de 15 mA gel^{-1} foi aplicada durante 3 h (géis corados para atividade de SOD), 5 h (géis corados para atividade de GR) ou 21 h (géis corados para atividade de CAT), a 4 ° C. Quantidades iguais de proteína (20 ug) foram aplicadas em géis de PAGE não desnaturantes. Para a análise de SDS-PAGE, os géis foram confeccionados com 10% de poliacrilamida, lavados com água destilada deionizada, incubadas durante a noite em uma solução de azul de Coomassie R-250 0,05% em 40:7:53 metanol: ácido acético: água (v / v / v) e solução descolorante em lavagens

sucessivas numa solução em 40:7:53 metanol: ácido acético: água (v / v / v) de solução até a visualização das bandas (Gratão et al, 2008).

4.2.12 Atividade da SOD

4.2.12.1 Atividade em PAGE não desnaturante

Ao final do tempo de corrida (item 4.2.12) os géis foram lavados com água deionizada e incubados no escuro, na temperatura ambiente, em uma mistura de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,8, EDTA 1 mM, riboflavina 0,05 mM, nitroazul tetrazólio 0,1 mM (NBT) e N,N,N',N'-tetrametiletilenediamine 0,3% (TEMED). Foi utilizada como padrão uma unidade de enzima de fígado de boi (Sigma). Ao final de 30 min, a mistura de reação foi descartada, os géis lavados com água deionizada e colocados sob iluminação até o aparecimento de bandas (Cia, et al., 2012).

4.2.12.2 Determinação das isoenzimas de SOD em PAGE não desnaturante

A análise das isoformas de SOD foi realizada por PAGE não desnaturante (12%) como descrito na seção anterior. Antes da coloração, o gel foi dividido verticalmente em três partes. A primeira parte foi mantida a 4° C em tampão de fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8. A segunda porção foi imersa em 100 mL do mesmo tampão contendo KCN 2 mM e EDTA 1 mM, e a terceira parte foi imersa em 100 mL de tampão contendo 5 mM de H₂O₂ e EDTA 1,0 mM. Todos os passos foram realizados no escuro. As isoformas foram classificadas como Cu / Zn-SOD, a SOD e de Fe-Mn-SOD (Azevedo et al., 1998).

4.2.13 Atividade da CAT

4.2.13.1 Atividade em PAGE não desnaturante

Após o tempo de corrida (item 4.2.12), o gel foi incubado por 10 min em solução de H₂O₂ 0,003%, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Após este período, o gel foi colocado por 10 min em uma solução de FeCl₃ 1 %

e $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 % sob agitação de uma mesa oscilatória. Uma unidade de CAT de fígado de boi foi utilizado como padrão (Azevedo et al., 1998).

4.2.13.2 Atividade em espectrofotômetro

A atividade de catalase foi determinada na temperatura de 25 °C, em uma solução de reação formada por 1mL de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5 e 0,025 mL de peróxido de hidrogênio 25 %, solução preparada no momento do ensaio. A reação foi iniciada com 25 μL de extrato proteico, sendo a atividade determinada por meio da decomposição de peróxido de hidrogênio, monitorada por 1 min através de alterações na absorbância a 240 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína para o meio.

4.2.14 Atividade de GR

4.2.14.1 Atividade em PAGE não desnaturante

Após o tempo de corrida (item 4.2.12) o gel foi incubado por 30 min na temperatura ambiente em uma solução de TRIS 0,25 M pH 7,5, MTT 0,5 mM, DPIP 0,7 mM, GSSG 3,4 mM e NADPH 0,5 mM. Foi utilizada 1 (uma) unidade de GR como padrão (Lee & Lee, 2000).

4.2.14.2 Atividade em espectrofotômetro

A atividade de GR foi determinada em espectrofotômetro em uma mistura de reação a 30°C contendo: 1 mL de tampão fosfato 100 mM pH 7,5, 500 μL de DTNB 1mM, 100 μL de GSSG 1 mM e 100 μL de NADPH 0,1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 20 μL do extrato proteico à mistura de reação e monitorada por 1 min através da redução da glutathiona oxidada a 412 nm. Os valores da atividade de GR foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{minuto}/\text{mg}$ de proteína (Gomes-Junior et al., 2007).

4.2.15 Atividade de GST

4.2.15.1 Atividade em espectrofotômetro

A atividade de GST foi avaliada em uma solução contendo: tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,5, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,04 M (CDNB), ambos incubados a 30°C, glutathiona reduzida 0,1 Mm (GSH) e 25µL do extrato proteico da amostra. A reação foi iniciada após 1 min da mistura. A atividade foi determinada pelo monitoramento da conjugação CDNB-GSH em espectrofotômetro por 3 min. A atividade de GST foi expressa em µmol/min/mg de proteína, utilizando o coeficiente de extinção de 9,6 mM⁻¹ cm⁻¹ (Zablotowics et al., 1995).

4.2.16 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise multivariada de componentes principais (PCA) utilizando o programa Pirouette 4.0 (Infometrix) com pré-processamento autoescalado, com tratamento em 1 derivada.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Avaliação do estresse oxidativo gerado pelo herbicida

Em organismos aeróbicos, durante o metabolismo celular, o O₂ é reduzido e pode causar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Esses produtos, tais como H₂O₂ e O₂[•], são gerados pelo próprio metabolismo aeróbio, ou em condições ambientais adversas (Yao et al., 2006; Gratão et al., 2012). Este aumento de EROs pode causar estresse oxidativo na célula, alterando moléculas de DNA, RNA, proteínas e lipídios. Para evitar esses danos, os organismos possuem um sistema antioxidativo, equipado com enzimas que combatem estes ERO, por meio da ativação da transcrição de genes *oxyR* e *SoxRS*. Tal dano pode ser avaliado por quantificação de H₂O₂ nas células, que é a principal causa de estresse oxidativo (Cabiscol, et al., 2000). Os níveis de MDA também podem ser utilizados como marcador de estresse oxidativo (Shao et al., 2009).

Os índices de peróxido encontrados neste trabalho indicaram que o mesotrione e Callisto causam estresse oxidativo em *P. ananatis* CCT 7673 nos tempos analisados (Fig. 5).

A molécula do mesotrione (Fig. 2) é composta de duas partes: um grupamento benzil e um dione. O grupamento benzil está localizado na posição 2 e é requerido para que a molécula apresente atividade herbicida. O grupamento presente na posição 4 tende a aumentar a acidez da molécula, e também a atividade herbicida. A parte ciclohexanodione é adicionada à molécula para bloquear sítios de metabolismo da molécula pelas plantas, o que resulta em melhor atividade do herbicida, dificultando, assim, a detoxificação da molécula (Mitchell et al, 2001). Esses grupos nitro e-metanossulfonil, que são provavelmente responsáveis pelo estresse oxidativo observado, também são encontrados em MNBA e AMBA, que são produtos da degradação do mesotrione por *Bacillus* sp. (Durand et al., 2006). Em contraste, os grupos nitro e de metanossulfonil são removidos ou modificados após 18 h de degradação por *P. ananatis* CCT 7673, produzindo subprodutos diferentes de MNBA e AMBA (Pileggi et al., 2012). AMBA foi descrita por apresentar maior toxicidade que a molécula original (Mitchell et al., 2001). Embora o crescimento não apresente diferença entre os tratamentos, os dados indicam que o herbicida causa estresse oxidativo para *P. ananatis* devido aos altos níveis de peróxido de hidrogênio (Fig. 5). Este é o primeiro relato confirmando que o mesotrione e Callisto causam estresse oxidativo para bactéria. Estudos futuros em LC/MS-MS podem caracterizar e identificar a toxicidade dos subprodutos gerados pela degradação do mesotrione.

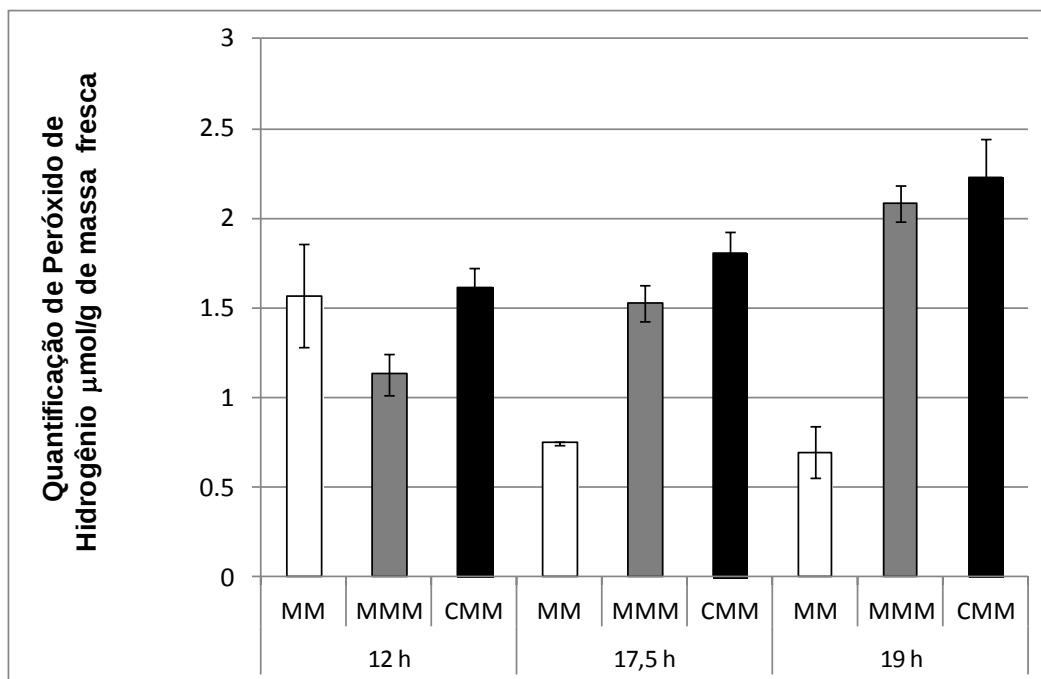


Figura 5: Quantificação de peróxido de hidrogênio em *P. ananatis* CCT 7673 nos tratamentos MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (Callisto) após 12h, 17,5h e 19h de incubação.

O radical peróxido de hidrogênio é formado a partir da dismutação do radical superóxido, catalisada pela enzima superóxido dismutase. O radical superóxido é o primeiro a ser formado, tendo sua origem em bactérias, principalmente pela redução sequencial do O_2 . Esse radical pode reagir rapidamente com pequenas moléculas, ou até inativar enzimas como catalase e glutathione peroxidase. Pode, ainda, reagir com ferro-sulfaproteínas, liberando Fe^{2+} e formando o radical hidroxila $OH^\cdot$, o qual apresenta forte potencial oxidante, podendo reagir com qualquer molécula orgânica, por meio da reação de Fenton (Barreiros et al., 2006).

A quantificação do radical superóxido demonstrou a maior concentração deste radical nos tempos de 12h, seguido por 19h, após a degradação do herbicida (Fig.6). Em 12 horas a quantificação de superóxido nos tratamentos com mesotrione e Callisto está alta, demonstrando que o herbicida causa estresse para a bactéria. Nos tempos de 17,5h e 19h o nível de superóxido decresce (Fig. 6), possivelmente devido à degradação do herbicida e de seus subprodutos. A presença do herbicida no meio de cultura já desencadeia uma resposta adaptativa no metabolismo celular da bactéria, envolvendo alterações na expressão das enzimas antioxidativas. Apesar dos níveis de peróxido de

hidrogênio e do radical superóxido estarem altos, causando o estresse para a bactéria, em nenhum dos tempos estudados foi possível confirmar um estado de estresse oxidativo em *P. ananatis*, visto que o crescimento não apresenta mudanças significativas (Fig. 7)

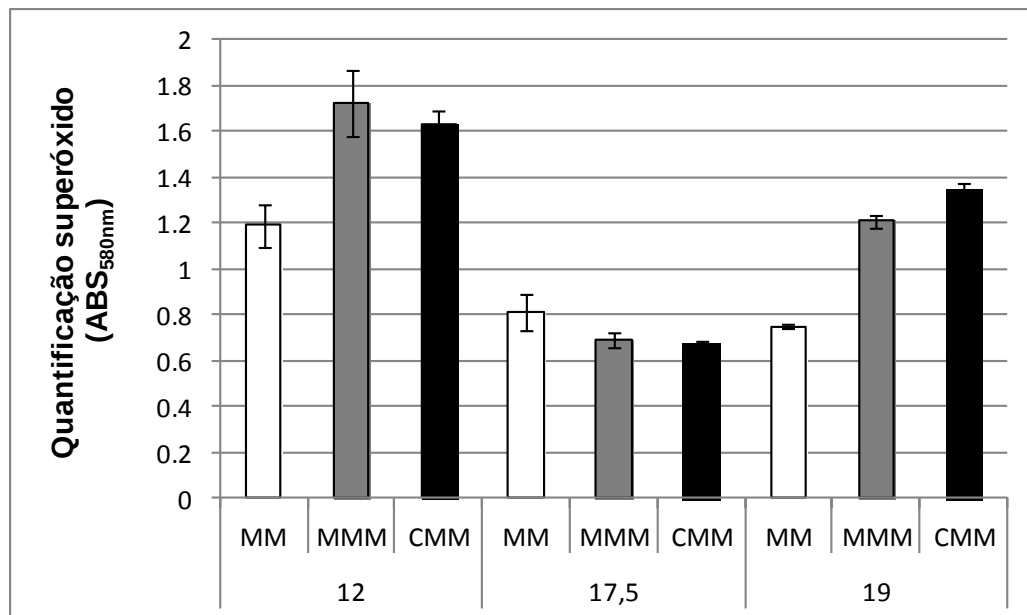


Figura 6: Quantificação do radical superóxido em *P. ananatis* CCT 7673 nos tratamentos MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (Callisto) após 12h, 17,5h e 19h de incubação.

4.3.2 Tolerância de *P. ananatis* ao herbicida por meio do crescimento celular

Os resultados da curva de crescimento em MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (Callisto), estão demonstrados na Fig. 7:

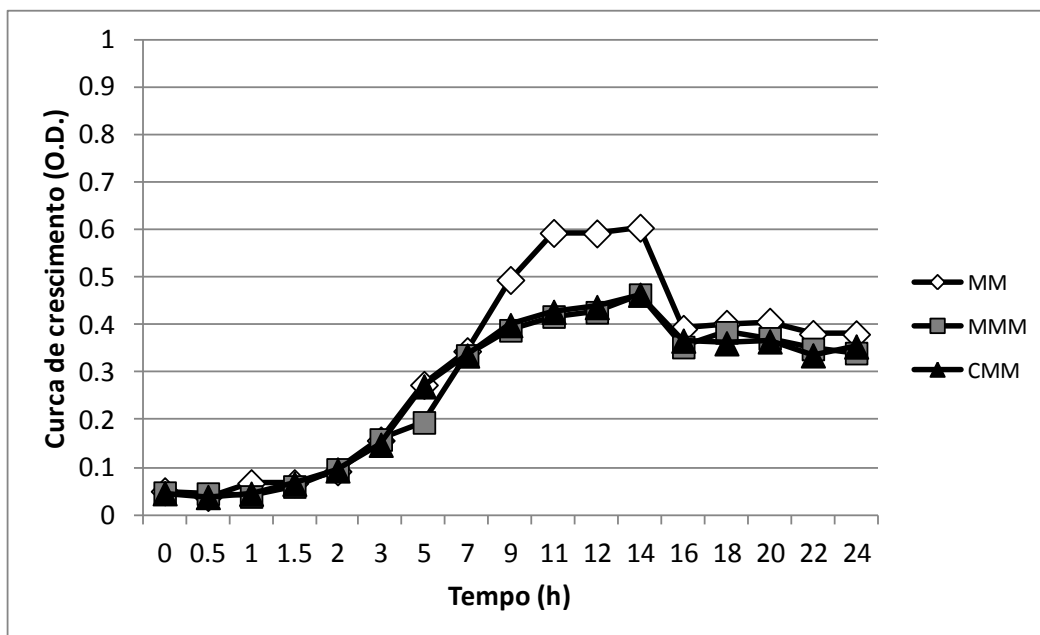


Figura 7: Curva de crescimento (OD em 600 nm) de *P. ananatis* CCT 7673 nos tratamentos MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (Callisto) durante 24h de incubação.

As taxas de crescimento não apresentaram diferença entre os tratamentos com herbicida, apenas em relação ao controle, porém não significativa (Fig. 7), como já demonstrado por Pileggi et al. (2012), indicando que *P. ananatis* tolera o herbicida. Já na taxa de viabilidade celular, houve diferença entre os tempos estudados, mas não entre os tratamentos (Fig. 8). Essa diferença no crescimento celular, principalmente no tempo de 30 min, se dá provavelmente pela adaptação da bactéria ao meio de cultura, já que *P. ananatis* foi crescida em LB (meio rico) e transferida ao MM (meio mineral) com concentração limitada de nutrientes. A baixa concentração de células nesse horário é explicada pela fase de crescimento em que ela se encontra, fase *lag*, onde há um período de adaptação celular. A tolerância de *P. ananatis* CCT 7673 ao herbicida pode ser explicada devido ao seu isolamento ter sido feito em água com resíduos de Callisto, já que altas concentrações de herbicidas podem selecionar linhagens tolerantes ou degradadoras de herbicida (Batisson et al., 2009). Portanto, qualquer diferença na resposta oxidativa nesta cultura se dá devido a uma indução específica do herbicida, visto que as taxas de H_2O_2 indicam que o herbicida causa estresse oxidativo.

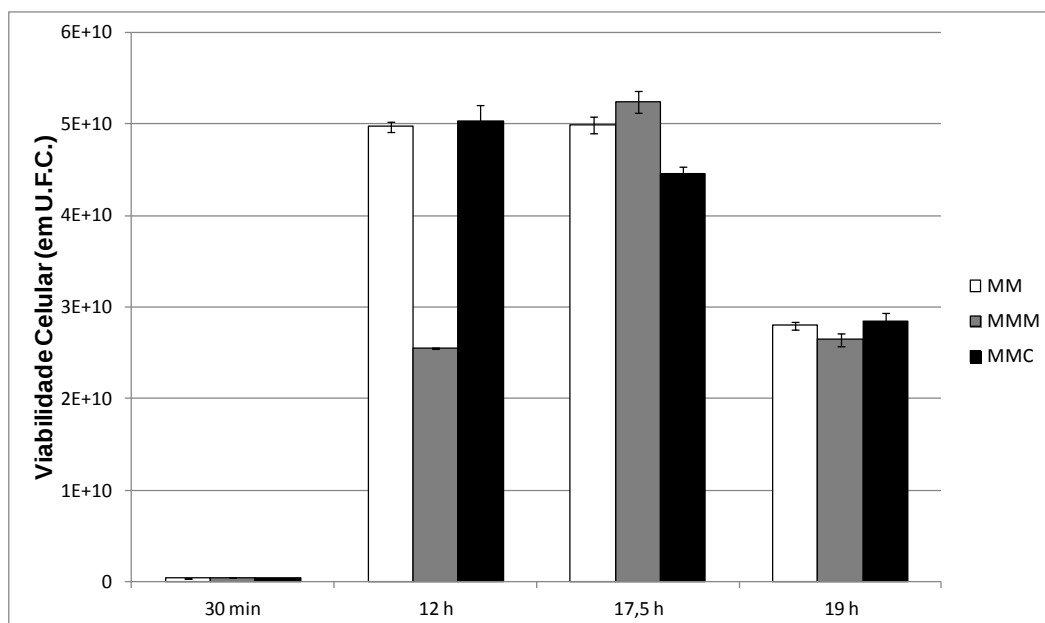


Figura 8: Viabilidade celular (em U.F.C.) de *P. ananatis* CCT 7673 nos tratamentos MM (controle), MMM (mesotrione) e MMC (Callisto) nos tempos de 30 min, 12h, 17,5h e 19h de incubação.

4.3.3 Avaliação da peroxidação lipídica por meio da quantificação de MDA

Uma diminuição intrigante na produção de MDA nos tratamentos com mesotrione, em comparação com o respectivo controle, foi observada neste trabalho. MDA (malondialdeído) é utilizado para determinar a quantidade de peroxidação lipídica e a toxicidade de herbicidas (Shao et al., 2009). No presente estudo, as taxas de MDA foram maiores no controle durante a degradação de mesotrione e no tratamento com Callisto no tempo de 19h (Fig. 9).

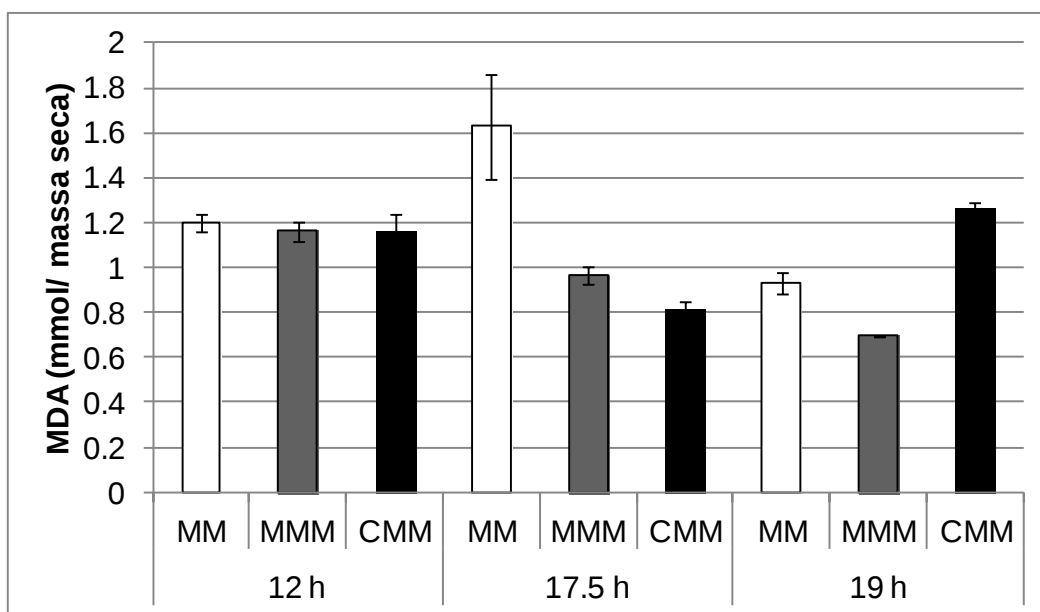


Figura 9: Níveis do MDA (representando peroxidação lipídica) em *P. ananatis* CCT 7673 nos tratamentos MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (Callisto) nos tempos de 12h, 17,5h e 19h de incubação.

MDA é um aldeído, produto tóxico, que é liberado quando uma ERO reage com o ácido graxo insaturado da membrana celular, podendo causar danos celulares (Helth & Packer, 1968). A composição dos resíduos dos ácidos graxos de membrana pode impedir a peroxidação lipídica e a produção do MDA, dependendo da condição de estresse. Na presença de oxidantes, a estabilidade (resistência mecânica) de membranas biológicas diminui. Enzimas antioxidativas, como SOD, CAT e GST podem retardar ou inibir reações de peroxidação lipídica, aumentando, assim, a estabilidade da membrana. Isso pode ser indicado pela baixa taxa de MDA no tratamento de mesotrione, durante e após a sua degradação. Ogliari et al. (2009) mostraram que o mesotrione promoveu uma ativação diferencial dos principais sistemas de transporte de próton para as enzimas de desintoxicação de plantas de milho. Essa proteção induzida por mesotrione poderia ser uma das razões para as alterações na membrana observadas neste trabalho.

4.3.4 Quantificação de proteínas e perfil proteico sob estresse causado por herbicida

O tratamento com mesotrione apresentou maior concentração que o controle nos tempos de 12h e 17,5 h (Fig.10):

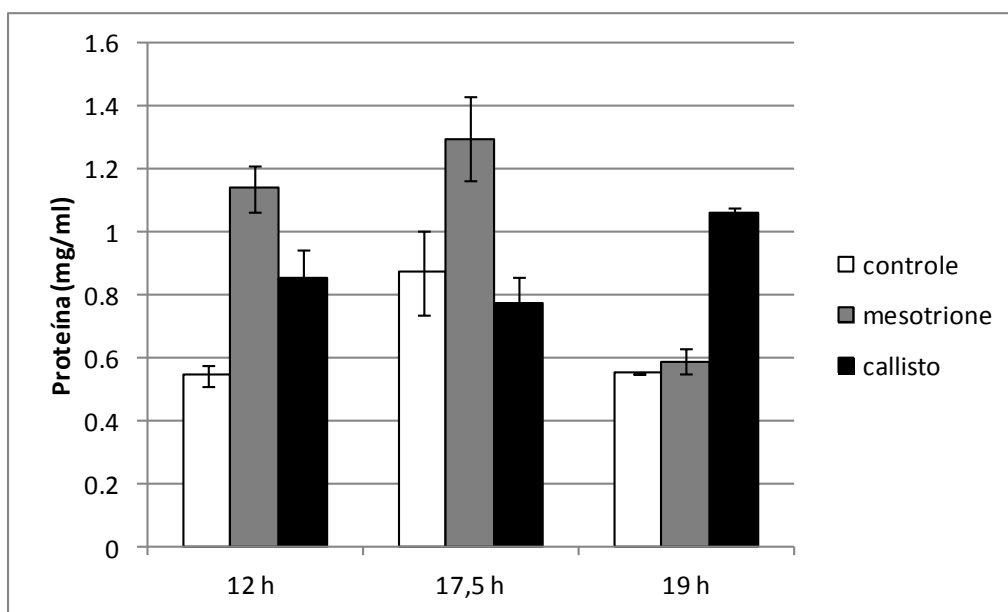


Fig. 10: Quantificação de proteína (mg/ml) em *P. ananatis* CCT 7673 nos tratamentos MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (Callisto) nos tempos de 12h, 17,5h e 19h de incubação.

Para sugerir possíveis mecanismos de tolerância ao herbicida, tanto mesotrione quanto o Callisto, os quais foram caracterizados como agentes causais do estresse oxidativo para *P. ananatis*, iniciamos com a avaliação do perfil de proteínas específicas e enzimas antioxidativas.

O perfil proteico de *P. ananatis* CCT 7673 não revelou diferença no metabolismo celular, independentemente do tratamento com herbicida (Fig.11). Embora a análise de SDS-PAGE tenha revelado apenas as bandas principais de proteínas, a intensidade das bandas não apresentou diferença. Assim, nas concentrações e condições experimentais utilizadas, o herbicida não induziu alterações significativas na expressão de proteína. Análises futuras por 2D-PAGE podem apresentar novos *insights* sobre os efeitos mais específicos do herbicida sobre as mudanças proteicas.

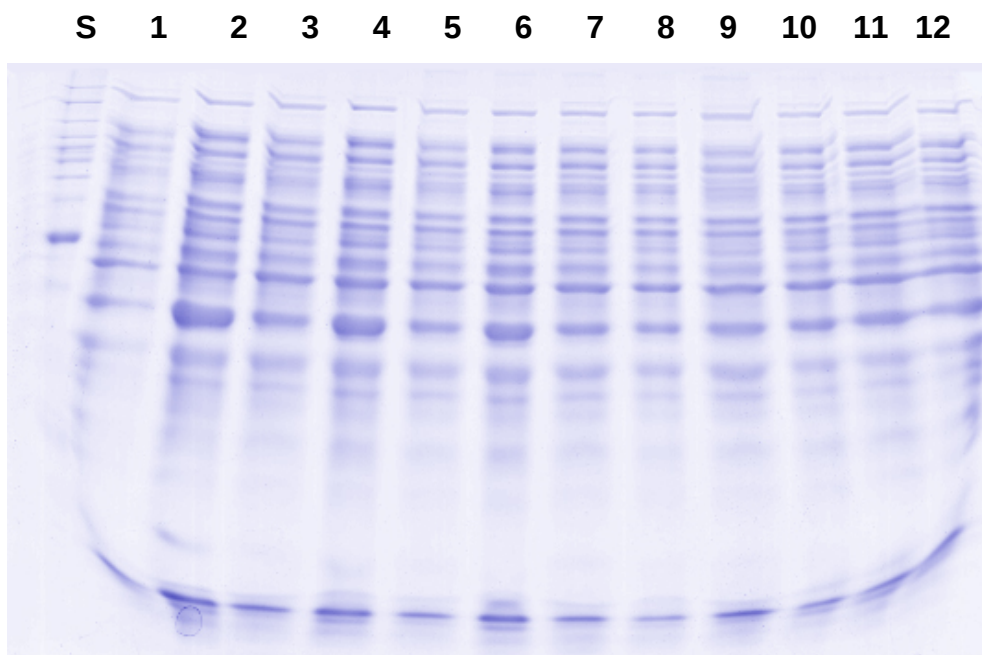


Figura 11: Perfil proteico SDS-PAGE de *P. ananatis* CCT 7673: S- padrão, MM, LB 12 h, 17,5h e 19h (1,2; 3,4; 5,6, respectivamente); MMM: 12h, 17,5h e 19h (7,8 e 9, respectivamente) e CMM: 12h, 17,5h e 19h (10, 11 e 12, respectivamente) de incubação.

4.3.5 Atividade de SOD e perfil protéico

Cinco bandas de SOD se mostraram ativas em *P. ananatis* CCT 7673 (Fig. 12), porém não apresentaram diferença quantitativa. O padrão eletroforético da atividade de SOD, portanto, não indicou uma resposta SOD específica para os tratamentos com herbicida.

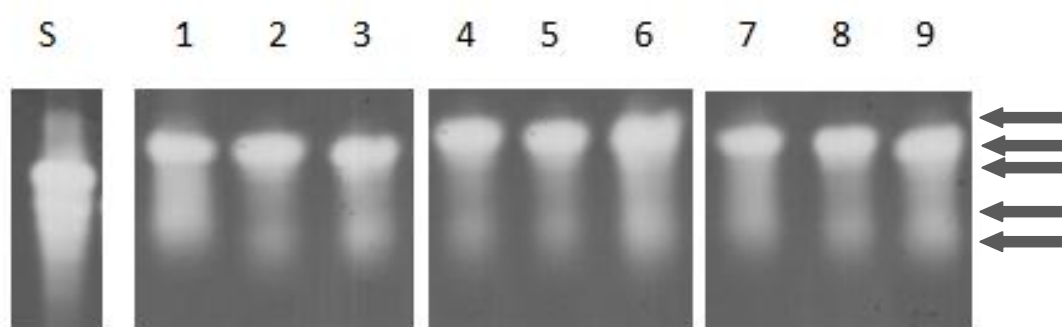


Figura 12: SOD-PAGE de *P. ananatis* CCT 7673 representam: S (padrão), MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (Callisto) nos tempos de 12h (1,2 e 3); 17,5h (4,5 e 6) e 19h (7,8 e 9) de incubação.

As isoformas de SOD de *P. ananatis* CCT 7673 descritas por Olchanheski et al. (2013 em preparação) foram estudadas nas mesmas

condições deste trabalho, porém nos tempos de 12h e 24h. A banda I, isoforma Cu / Zn-SOD, localiza-se no espaço periplasmático (Battistoni, 2003), mas estudos dessa forma bacteriana são escassos. Bandas II, III, IV e V correspondem a Mn-SOD (Fig. 13), uma isoforma que é normalmente encontrada no citoplasma bacteriano e responde provavelmente ao aumento dos níveis do radical $O_2 \cdot$ (Imlay, 2008; Li et al., 2009).

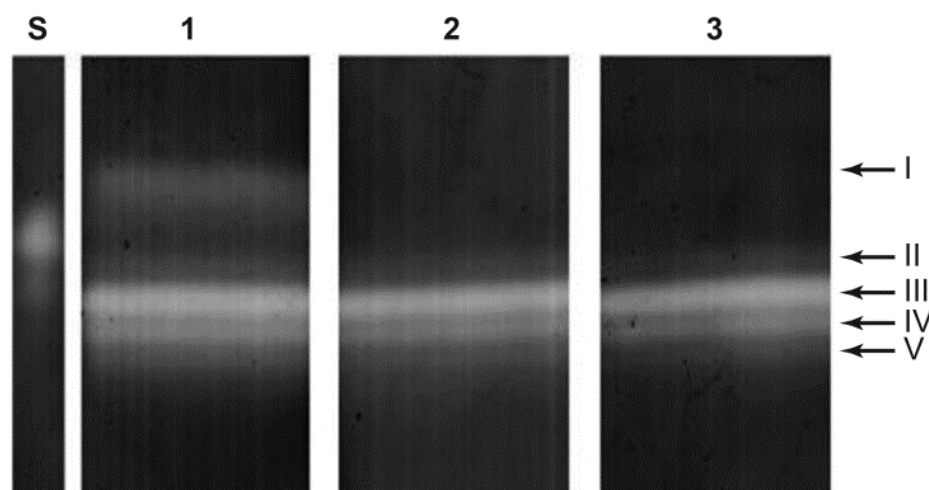


Figura 13: Atividade de SOD-PAGE não desnaturante em *Pantoea ananatis* CCT 7673. S (padrão), 1 corresponde à atividade de SOD do controle; 2 mostra a atividade da SOD na presença de 2 mM de cianeto de potássio; 3 representa a atividade SOD com 5 mM H_2O_2 .

As bandas indicaram aproximadamente o mesmo nível de atividade em todos os tratamentos e períodos de tempo. A inexistência de alterações na atividade da SOD sugere que os tratamentos não alteram o crescimento bacteriano e seu metabolismo basal.

4.3.6 Atividade de CAT e perfil protéico

A atividade de CAT nos tempos estudados (12h, 17,5h e 19h) foi maior no controle seguido por mesotrione e Callisto (Fig.14).

O H_2O_2 pode ter seus níveis aumentados de 5-10 vezes durante a transição da fase de latência para a fase de crescimento exponencial em *Escherichia coli* (González-flecha & Demple, 1997). Porém, a atividade de CAT não apresentou diferença porque todos os tratamentos e controles foram testados durante a fase estacionária de crescimento (Fig. 7).

A alta concentração de peróxido de hidrogênio se deu devido ao alto crescimento celular, já que *P. ananatis* não apresentou diferença em suas taxas de crescimento (Fig. 7), mas principalmente esse estresse foi causado pelo herbicida. Os resultados com mesotrione e Callisto apresentaram maior concentração de peróxido de hidrogênio, demonstrando que o herbicida é agente estressante para a bactéria.

Mesotrione não é detectável por análise de HPLC após 19h de incubação (Pileggi et al., 2012), mas H_2O_2 foi produzido pelas células bacterianas, em resposta a um crescimento celular, bem como a mesotrione e Callisto. Como as atividades de SOD e CAT permaneceram inalteradas a uma resposta específica para Callisto e mesotrione, a geração excessiva de H_2O_2 poderia ter sido o resultado de outra via metabólica ou atividade de outra peroxidase.

O baixo nível de peroxidação lipídica induzida por mesotrione, mesmo com uma alta taxa de H_2O_2 , foi contrária às nossas expectativas iniciais, mas os dados de MDA e saturação de membrana lipídica nos levou a elaborar uma explicação alternativa, que será descrita neste trabalho.

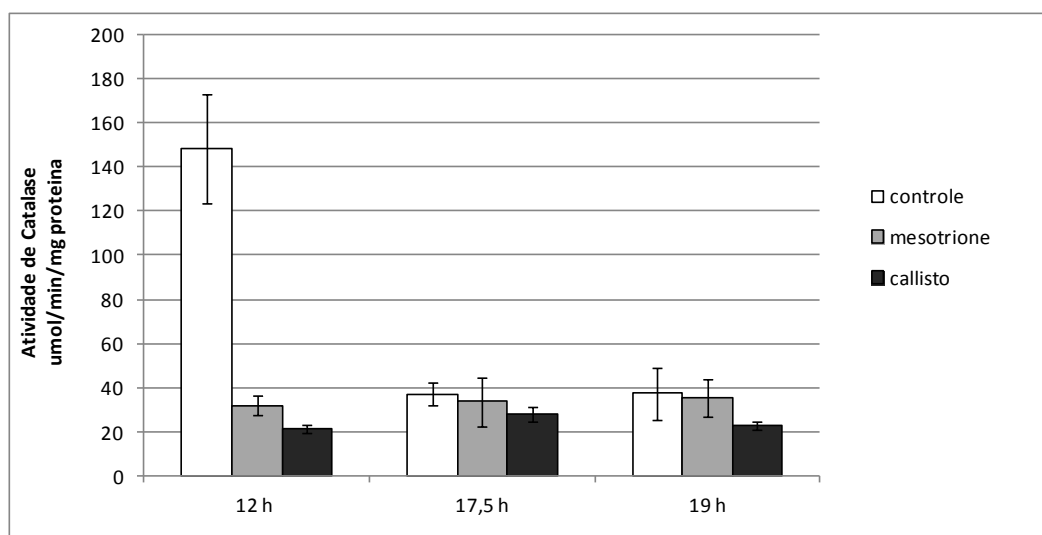


Figura 14: Atividade de catalase em *P. ananatis* CCT 7673 nos tratamentos MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (Callisto) nos tempos de 12h, 17,5h e 19h de incubação.

O perfil de isoformas de CAT revelado por eletroforese em gel, indicam 5 isoformas, porém não indicam a indução de novas isoformas, mas indica

alterações na intensidade de bandas (Fig. 15). Tais modificações sugerem o aumento da produção de H_2O_2 , mas isso não é aparentemente devido à dismutação do radical $O_2 \cdot$ pela SOD com base no perfil de atividade de SOD observado anteriormente, sugerindo uma outra via metabólica.

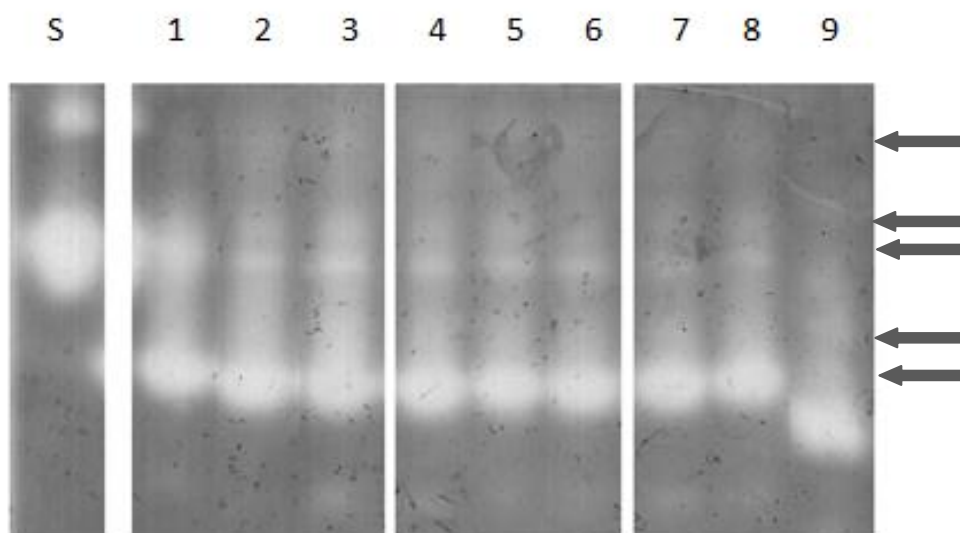


Figura 15: CAT-PAGE de *P. ananatis* CCT 7673 representam: S (padrão), MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (Callisto) no tempo de 12h (1,2 e 3); 17,5h (4,5 e 6) e 19h (7,8 e 9) de incubação.

4.3.7 Atividade de GR e perfil proteico

A atividade de glutathiona redutase foi maior no controle em comparação ao tratamento com herbicida, sem atividade específica de GR para os tratamentos com herbicida (Fig. 16). Martins et al. (2011) também mostraram uma redução na atividade específica na presença de altas concentrações dos herbicidas acetochlor e metalochlor.

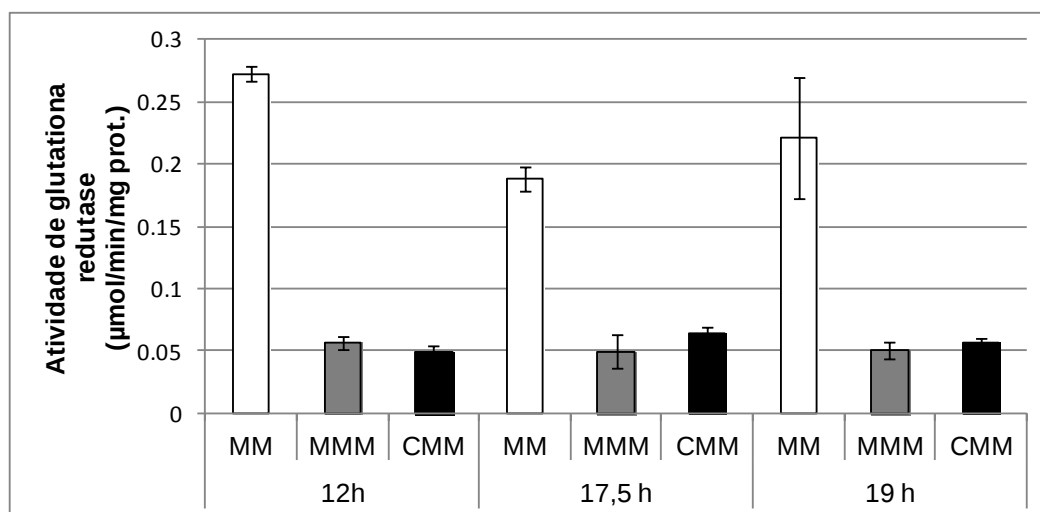


Figura 16: Atividade de glutatona redutase em *P. ananatis* CCT 7673 nos tratamentos MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (Callisto) nos tempos de 12h, 17,5h e 19h de incubação.

O gel de perfil proteico exibiu duas isoenzimas de GR nas condições testadas, porém sem indução específica pelo herbicida (Fig.17), com atividade maior no controle.

GR é uma enzima importante, responsável pela detoxicação do peróxido (H_2O_2) que transforma glutatona oxidada (GSSG) em glutatona reduzida (GSH) (Monteiro et al., 2011). Quando uma bactéria apresenta condição de estresse em resposta as ERO, OxyR é ativada, induzindo a expressão de vários genes, incluindo a expressão de GR (Masip & Veeravalli, 2006). Apesar da glutatona ser um dos mais importantes metabolitos no mecanismo redox em bactérias Gram negativas, Smirnova & Oktyabrsky (2005) sugerem que outras enzimas e compostos celulares com a mesma função de GR, como sistema tiol-redox e as glutaredoxina e tioredoxina, podem ser ativadas (Cabiscol et al., 2000). Linhagens mutantes de *E. coli* para o gene *gor* apresentaram crescimento normal e altos níveis de glutatona reduzida, demonstrando a ação de outra enzima, ou composto independente da GR (Smirnova & Oktyabrsky, 2005).

P. ananatis CCT 7673 apresentou alta concentração de peróxido de hidrogênio nos tratamentos com o herbicida, caracterizando estresse, como já visto anteriormente. Esse estresse causado pelo herbicida pode interferir no metabolismo celular, inibindo a atividade de algumas enzimas (Lu et al., 2004).

Foi demonstrado por Smirnova & Oktyabrsky (2005) que algumas proteínas de linhagens de *E.coli* sofreram oxidação e algumas enzimas foram inibidas quando entraram em contato com o agente estressante peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Os ensaios enzimáticos de SOD, CAT e GR foram realizados na mesma fase de crescimento de *P. ananatis* CCT 7673, na fase estacionária. Isso provavelmente pode explicar o padrão de bandas, ou seja, não há diferença na atividade enzimática, já que diferentes isoformas podem atuar, com diferentes vias de regulação, dependendo da fase de crescimento (Jung & Kim, 2003).



Figura 17: GR-PAGE de *P. ananatis* CCT 7673: representam S (padrão), MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (Callisto) no tempo de 12h (1,2 e 3); 17,5h (4,5 e 6) e 19h (7,8 e 9) de incubação.

4.3.8 Atividade de GST

A GST está presente em inúmeros organismos, e tem papel fundamental na detoxificação de compostos por meio da conjugação da GSH a um substrato hidrofóbico que possua um centro eletrofílico (Masip & Veeravalli, 2006). A GSH é um antioxidante não enzimático que pode agir como doador de elétrons, com dois grupos carboxílicos, com propriedades de redução e remoção eficiente de ROS, devido à sua capacidade de transferir elétrons para GST (Ghelfi et al., 2011).

Pileggi et al. (2012) demonstraram que *P. ananatis* CCT 7673 degradava o mesotrione após 18h de incubação. Análises de GST foram realizadas nos tempos de 12h (antes da degradação do mesotrione), 17,5h (durante a degradação do mesotrione) e 19h (após a degradação do mesotrione e na presença dos subprodutos da degradação no meio), a fim de avaliar a atividade específica da GST.

A GST apresentou maior atividade nos tempos de 17,5h e 19h de incubação, ou seja, durante e logo após a degradação (Fig.18). Esse aumento da atividade da GST nos tempos específicos de degradação pode ser mais um indício de estresse oxidativo causado pelo herbicida, assim como já demonstrado com os dados de peróxido de hidrogênio. Mas pode também indicar uma relação dessa enzima com o processo de degradação do herbicida. Relações da GST com degradação de herbicidas foram também observadas com diuron e altas concentrações de oxyfluorfen (Geoffroy, 2002), atrazina e chloroacetanilida (Labrou et al, 2005; Van Eerd et al, 2003) e metalochlor (Stamper et al., 2003).

Esta enzima possui sítios específicos de ligação, um com GSH (sítio G) e outro com substratos eletrofílicos adjacentes (sítio H), portanto sua alta atividade pode estar relacionada com a alta concentração de GSH, ou indicando uma ligação a outro substrato, como o herbicida. Labrou et al. (2005) demonstraram que a GST está envolvida no processo de biodegradação do herbicida atrazina com a remoção do cloro a partir da conjugação atrazina-GSH.

A GST, dentre as enzimas estudadas neste trabalho, foi a única que apresentou atividade específica envolvida no processo de degradação, e possivelmente na detoxificação celular. Em bactérias Gram-negativas, a estrutura da membrana é diferenciada, com duas membranas: citoplasmática e externa, entre as membranas, existe o espaço periplasmático, o qual se constitui de diversos componentes, entre eles, enzimas (Duffy & Power, 2010). O fato de que a GST apresentou uma resposta diferente das outras enzimas, possivelmente é devido à sua localização celular, no espaço periplasmático da célula (Alocatti et al., 2009). Este pode ser um indício interessante, onde a GST e outras enzimas podem atuar como primeira linha de defesa já combatendo o estresse oxidativo e degradando o mesotrione.

Portanto, como a GST apresentou alta atividade do mesotrione no tempo de 17,5h e 19h de incubação, sugerimos que a GST está envolvida no processo de degradação do mesotrione em *Pantoea ananatis*. Porém, os estudos sobre os subprodutos da degradação do mesotrione e processo de conjugação da GST devem ser aprofundados para melhor se compreender o processo de detoxificação deste herbicida.

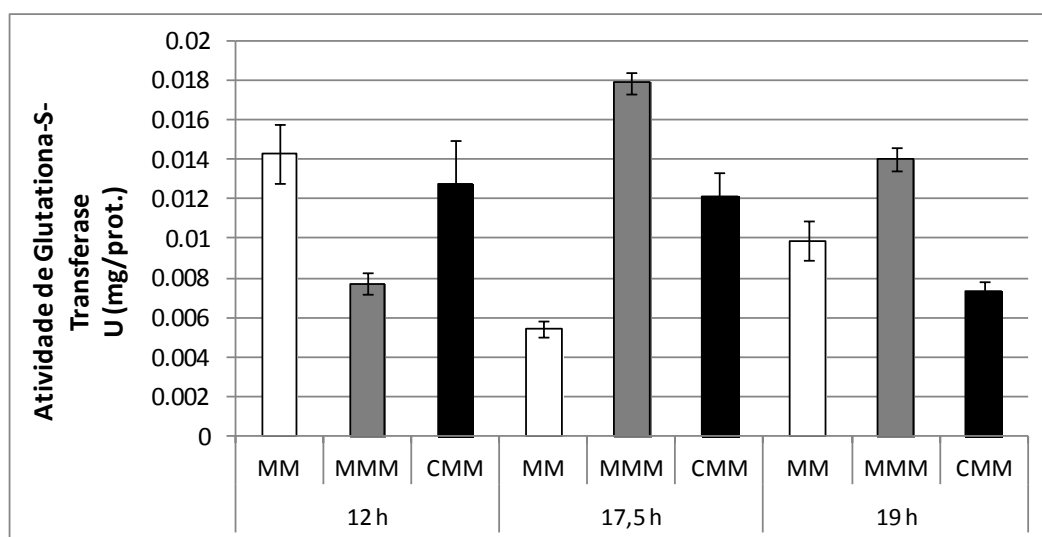


Figure 18: Atividade de glutathione-S-transferase em *P. ananatis* CCT 7673 nos tratamentos MM (controle), MMM (mesotrione) e CMM (Callisto) nos tempos de 12h, 17,5h e 19 h de incubação.

4.3.9 Alterações na saturação de lipídios de membrana em resposta aos herbicidas

Uma análise do perfil de ácidos graxos foi realizada a fim de melhorar o entendimento sobre os dados de MDA, nos quais a quantificação de malondialdeído foi menor nos tratamentos com herbicidas. Considera-se que alteração na conformação de ácidos graxos saturados e insaturados como forma de proteção à membrana plasmática bacteriana ocorra quando em contato com herbicidas. Balague et al. (2001) já demonstraram que houve uma diminuição de lipídios insaturados na membrana plasmática de *E. coli* HB101, e, assim, uma redução na fluidez da membrana bacteriana induzida por 2,4-D, como possível mecanismo de defesa contra danos celulares. Um aumento no nível de saturação dos lipídios de membrana em *Klebsiella planticola* DSZ permitiu o crescimento em meio de cultura com o herbicida simazina de acordo com por Sánchez et al. (2005). O mesmo foi relatado por Danilo et al. (1996) com células cultivadas de *Ochrobactrum anthropi* em presença de atrazina.

No entanto, nossos dados apresentaram um perfil de absorção diferenciado dos tratamentos com herbicida em relação ao controle. O perfil está representado na Fig. 19.

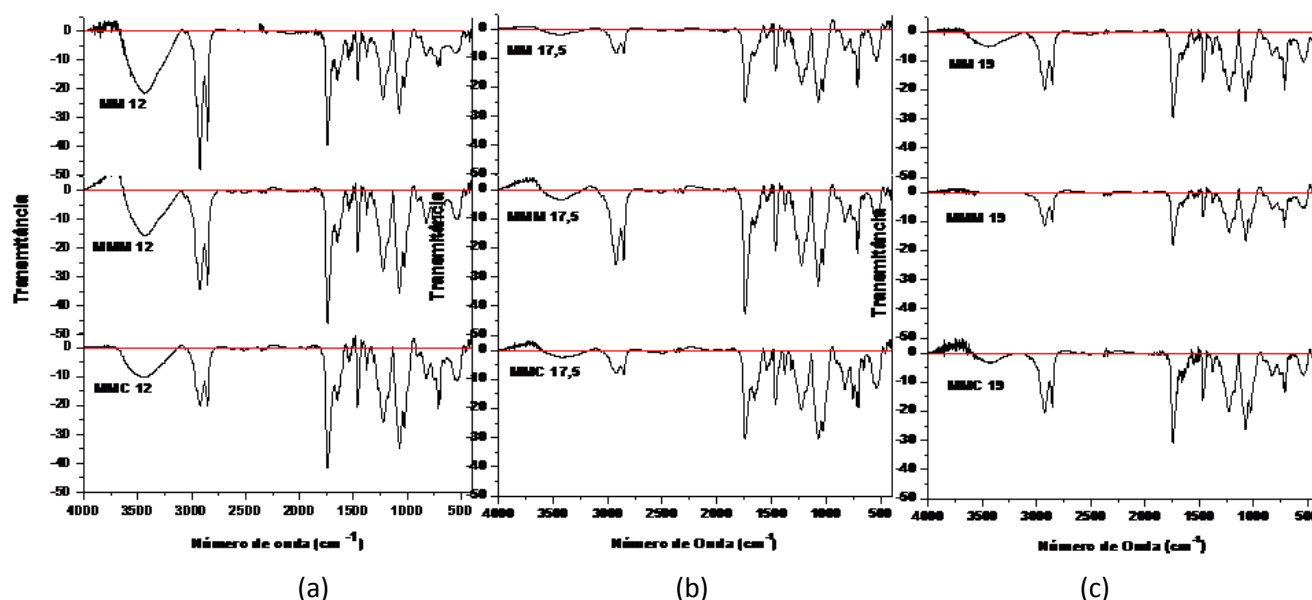


Figura 19: Perfil do espectro de infravermelho do extrato lipídico de *Pantoea ananatis* incubadas nos tratamentos MM (controle), MMM (mesotrione) e MMC (Callisto) nos tempos de 12h (a), 17,5h (b) e 19h (c).

Na figura 19 observa-se na região de 3.000 cm^{-1} o estiramento do hidrogênio de carbono insaturado por ligação dupla ($C=C-H$). As bandas 2.929 e 2854 cm^{-1} são referentes à ligação ($C-H$) de alcanos. Na região de 1746 cm^{-1} aparece uma banda intensa relativa à frequência de estiramento do grupo carbonila ($C=O$).

Os resultados demonstraram um perfil incomum dos ácidos graxos. No tempo de 12h, no tratamento com Callisto, na região de 1746 cm^{-1} , houve um aumento no grau de insaturação em relação ao controle. Neste horário, de acordo com a curva de crescimento (Fig.7) *P. ananatis* se encontra no final na fase *log*, em que o metabolismo está mais ativo. Esta insaturação no tratamento com Callisto pode-se dar em decorrência dos adjuvantes, que tornam o herbicida mais tóxico e facilitam a entrada do herbicida na planta. O Callisto pode ser o responsável pela alteração na membrana de *P. ananatis* neste tempo do experimento. No tempo de 17,5h, no tratamento com

mesotrione, houve o mesmo comportamento. No momento da degradação do mesotrione, os ácidos graxos se apresentam mais insaturados, ou seja, a membrana está mais suscetível e pode ocorrer a entrada de componentes dentro da célula.

A presença de componentes aromáticos ou substâncias como álcool de cadeia longa aumenta o nível de insaturação (Kewelohet al., 1991). Esses componentes são tóxicos para os organismos, pois se espalham na membrana, aumentando a fluidez a uma taxa de permeabilidade específica (Heipieper et al., 1994; Sikkema et al., 1994), tornando a membrana mais suscetível à entrada de substâncias tóxicas na célula. A hidrofobicidade de triazinas e outros xenobióticos implicam em uma elevada lipoafinidade, o que significa que a membrana celular é provavelmente o primeiro e mais importante alvo de toxicidade de ação de xenobióticos lipossolúveis (Sanchez et al., 2005).

Esta pode ser uma explicação para o perfil apresentado nesse experimento, exceto para o tratamento com mesotrione, no tempo de degradação (17,5h), onde foi apresentado um elevado grau de insaturação em relação aos outros tratamentos.

Alterações na composição da membrana citoplasmática para manutenção ou ajuste da fluidez da bicamada lipídica são importantes mecanismos de adaptação às mudanças do meio, como temperatura e presença de hidrocarbonetos ou substratos aromáticos (Sikkema et al., 1995). Estas alterações dos lipídeos de membrana se mostraram eficazes para manter a fluidez necessária para as atividades funcionais da célula, mesmo em condição de estresse, ou em contato com substâncias tóxicas (Herbert, 1986).

Essa tendência de perfil de ácidos graxos demonstra a complexidade do comportamento bacteriano, em que enzimas e mudanças na conformação lipídica podem atuar de diferentes formas na resposta ao estresse oxidativo de forma heterogênea para se proteger dessa condição.

Análises futuras com uma curva de calibração com padrão bacteriano e de ressonância magnética nuclear (RMN) poderão mostrar com exatidão a mudança de saturação em regiões específicas no perfil lipídico.

4.3.10 Análise estatística

Os dados estudados neste trabalho estão agrupados por similaridade, determinando quais variáveis de maior importância e discriminando as amostras de maior semelhança. A fig. 20 mostra o gráfico de escores (a) e pesos (b). O gráfico de escores mostra os dados do PC1 (componentes principais) e PC2 com porcentagem de variância de 38,61% e 27,61%, respectivamente, que forneceram 90% de informação. Dessa forma, plotando os dados de PC1 e PC2, obteve a melhor discriminação das amostras, onde foram agrupadas por horários do experimento. Os dados com maior semelhança estão no gráfico de escores, e os testes que contribuíram para esse agrupamento, no gráfico de pesos. Em 12h, os testes que contribuíram para o agrupamento foram proteínas e MDA; 17,5h: superóxido, SOD, viabilidade, GR e GST; e em 19h: peróxido e CAT.

No horário durante a degradação (17,5h) foi o tempo em que mais variáveis contribuíram para seu agrupamento. Esse pode ser um indício da importância da relação das enzimas antioxidativas para a degradação do mesotrione. Nos dados de lipídios de membrana, a insaturação no tratamento do mesotrione neste horário, pode indicar a entrada desse herbicida na célula, possivelmente no espaço periplasmático. Como já citado anteriormente, a GST está presente no espaço periplasmático da célula (Alocatti et al., 2009) e está relacionada com a degradação de herbicidas (Geoffroy, 2002). Este pode ser um indício da entrada no mesotrione na célula e sua degradação pela enzima GST. Esses resultados demonstraram a importância de cada enzima e as EROs para a resposta enzimática de *P. ananatis* de acordo com o tempo de degradação.

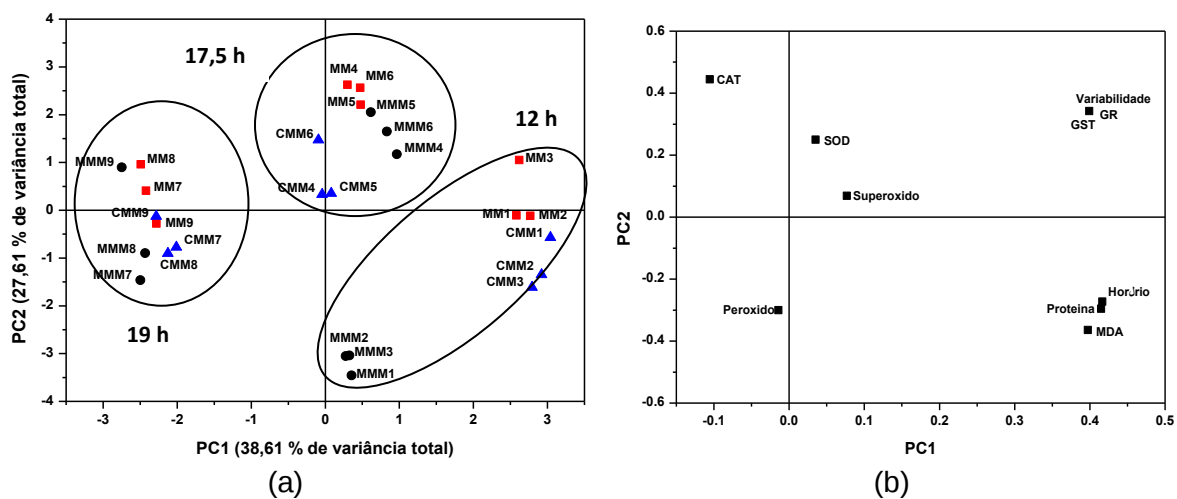


Figura 20: Gráfico de escores (a) e pesos (b) para os resultados dos dados de *Pantoea ananatis* nos tratamentos MM (controle), MMM (mesotrione) e MMC (Callisto) nos tempo de 12h, 17,5h e 19h.

4.4 Conclusão

Constatou-se que *P. ananatis* CCT 7673 pode tolerar o herbicida Callisto (formulação comercial), bem como seu ingrediente ativo mesotrione, crescendo eficientemente na sua presença, nas concentrações que são normalmente utilizadas nas práticas agrícolas. Esta bactéria não apresentou diferença em seu crescimento na presença do herbicida; porém, os dados de peróxido de hidrogênio demonstraram que o herbicida é agente causal do estresse oxidativo. CAT e SOD não apresentaram atividade específica em resposta ao herbicida e GR foi inibida na presença do herbicida; entretanto, GST pode estar envolvida no processo de degradação devido à sua alta atividade nos tempos associados à degradação. Quando exposta ao herbicida, *P. ananatis* CCT 7673 apresentou alterações na saturação de lipídios de membrana. A indução pelo herbicida de uma enzima não específica para a degradação, e de modificações nas características estruturais e fisiológicas na membrana citoplasmática, pode estar associada a um nível de plasticidade fenotípica em *P. ananatis* CCT 7673, tornando esta bactéria um modelo interessante para estudos de tolerância a herbicidas e evolução de microbiotas em ambientes submetidos a diferentes níveis de pressão seletiva.

4.5. Referências

CARNEIRO, F F; PIGNATI, W; RIGOTTO, R M; AUGUSTO, L G S. RIZOLLO, A; MULLER, N M; ALEXANDRE, V P. FRIEDRICH, K; MELLO, M S C. **Dossiê ABRASCO –Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** ABRASCO, 1ª Parte, 98p, 2012.

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, L.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment** v. 24, p. 1337-1344, 2001.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Agrotóxicos e Toxicologia.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>> acesso em 14 de janeiro de 2014.

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

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

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

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

BATTISTONI, A. Role of prokaryotic Cu/Zn superoxide dismutase in pathogenesis. **Biochemical Society Transactions** v.1, p.1326-1329, 2003.

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

BJØRLING-POULSEN, M.; ANDERSEN, H.R.; GRANDJEAN, P. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. **Environmental Health** v.7, p.50-71, 2008.

BONNET, J.L.; BONNEMOY, F.; DUSSE, M.; BOHATIER, J. Toxicity assessment of the herbicides Sulcotrione and Mesotrione toward two reference environmental micro-organisms: *Tetrahymena pyriformis* and *Vibrio fischeri*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** n.55, p.576-583, 2008.

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.

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

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

COPLEY, S.D. Evolution of efficient pathways for degradation of anthropogenic chemicals. **Nature Chemical Biology** v. 5, p.559–566, 2009.

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

DANILO, L.; DE SOCIO, G.; FRASSANITO, R.; ROTILIO, D. Effects of atrazine on *Ochrobactrum anthropi* membrane fatty acids. **Applied of Environmental Microbiology** v. 62, p.2644–2646, 1996.

DING, N.; GUO, H.; HAYAT, T.; WU, Y.; XU, J. Microbial community structure changes during Aroclor 1242 degradation in the rhizosphere of ryegrass (*Lolium multiflorum* L.). **FEMS Microbiology Ecolog** v. 70, p.305-314, 2009.

DONALDSON, C. Feed the world. **Public Health** v.130, p.154-155, 2010.

DUFFY, C.F.; POWER, R.F. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plants extracts. **International Journal of Antimicrobial Agents** v.17, p.527-529, 2001.

DUKE M.V., SALIN M.L. Isoenzymes of Cu,Zn-SOD from *Pisum stivum*. *Phytochemistry* v. 22, p.2369-2373, 1983.

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

GE, T.D.; NIE, S.A.; WU, J.S.; SHEN, J.L.; XIAO, H.A.; TONG, C.L.; HUANG, D.F.; HONG, Y.; IWASAKI,K. Chemical properties, microbial biomass, and activity differ between soils of organic and conventional horticultural systems under greenhouse and open field management: a case study. **Journal of Soils and Sediments** v. 11, p.25–36. 2011.

GHELFI, A.; GAZIOLA, S.A.; CIA, M.C.; CHABREGAS, S.M.; FALCO, M.C.; KUSER-FALCÃO, P.R. et al. Cloning, expression, molecular modelling and docking analysis of glutathione transferase from *Saccharum officinarum*. **Annals of Applied Biology** v. 159, p.267–280, 2011.

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

GONZÁLEZ-FLECHA, B.; DEMPLE, B. Metabolic sources of hydrogen-peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry** v. 270, p.13681-13687, 1997.

GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A.. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology** v 32, p.481-494, 2005.

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

GRATÃO, P.L.; MONTEIRO, C.C.; CARVALHO, R.F.; TEZOTTO, T.; PIOTTO, F.A.; PERES, L.E.P et al.. Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. **Plant Physiology and Biochemistry** v. 56, p.79-96, 2012.

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

HERBERT, R.A. The ecology and physiology of psychrophilic microorganisms. em: Herbert, R.A., Codd GA (eds) **Microbes in extreme environments** p.1–23, 1986.

HEIPIEPER, H.J.; DE BONT, J.A.M. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes. **Applied of Environmental & Microbiology** v. 60, p.4440–4444, 1994.

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

JUNG, I. L.; KIM, I. G. Transcription of *ahpC* and *katE* genes in *Escherichia coli* is regulated by polyamines: polyamine-deficient mutant sensitive to H₂O₂-induced oxidative damage. **Biochemical and Biophysical Research Communication** v.301, p.915-92, 2003.

KATASHKINA, J.I.; HARA, Y.; GOLUBEVA, L.I.; ANDREEVA, I.G.; KUVAEVA, T.M.; MASHKO, S.V.. Use of the λ Red- recombineering method for genetic engineering of *Pantoea ananatis*. **BMC Molecular Biology** v.10, p.34-45. 2009.

KEWELOH, H.; DIEFENBACH, R.; REHM, H. J. Increase of phenol tolerance of *Escherichia coli* by alterations of the fatty acid composition of the membrane lipids. **Archives of Microbiology**. v.157, p.49–53, 1991.

LABROU, E.N.; KARAVANGELLI, M.; CLONIS, T.D.; TSAFTARIS, A. Development of transgenic tobacco plants overexpressing maize glutathione-S-transferase I for chloroacetanilide herbicides phytoremediation. **Biomolecular Engineering** v. 22, p.121-128, 2005.

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

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

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science** v. 37, p.293-303, 2001.

LU, Z. M.; 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 Science and Health Part B-Pesticides Food Contamination and Agricultural Wastes. v.9, p.431-441, 2004.

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

MARTINS, P.F.; MARTINEZ, C.O.; CARVALHO, G.; CARNEIRO, P.I.B.; AZEVEDO, R.A.; PILEGGI, S.A.V. et al. Selection of Microorganisms Degrading S-Metolachlor Herbicide. **Brazilian Archives of Biology and Technology** v. 50, p.153-159, 2007.

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

MASIP, L.; VEERAVALLI, K. The many faces of glutathione in bacteria. **Antioxidants and Redox Signaling** v.8, p.753-762, 2006.

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

MONTEIRO, C.C.; CARVALHO, R.F.; GRATAO, P.L.; CARVALHO, G.; TEZOTTO, T.; MEDICI, L.O.; PERES, L.E.P.; AZEVEDO, R.A. Biochemical responses of the ethyleneinsensitive *Never ripe* tomato mutant subjected to cadmium and sodium stresses. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 71, p. 306-320, 2011.

MONTEIRO, C.; CARVALHO, R.F.; GRATÃO, P.L.; CARVALHO, G.; TEZOTTO, T.; MEDICI, L.O. et al. Biochemical responses of the ethylene-insensitive *Never ripe* tomato mutant subjected to cadmium and sodium stresses. **Environmental and Experimental Botany** v. 71, p.306-320, 2011.

OGLIARI, J.; FREITAS, S.P.; RAMOS, A.C.; BRESSAN-SMITH, R.E.; FAÇANHA, A.R. Proton transport primary systems used as mechanisms of Mesotrione detoxification in corn plants. **Planta Daninha** v. 27, p.799-807, 2009.

SÁNCHEZ, M.; GARBI, C.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.; ORTIZ, L. T.; ALLENDE, J. L.; MARTIN. *Klebsiella planticola* strain DSZ mineralizes simazine: physiological adaptations involved in the process. **Applied of Microbiology and Biotechnology** v. 66, p.589-596, 2005.

SANDS, D.C.; MORRIS, C.E.; DRATZ, E.A.; PILGERAM, A. Elevating optimal human nutrition to a central goal of plant breeding and production of plant-based foods. **Plant Science** v. 117, p.377–389, 2009.

SCHREINEMACHERS, P.; TIPRAQSA, P. Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries. **Food Policy** v. 37, p.616-626, 2012.

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

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry** v. 269, p.8022–8028, 1994.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews** v. 59, p.201–222, 1995.

SHAO, T.; YUAN, H.; YAN, B.; LÜ, Z.; MIN, H. Antioxidant enzyme activity in bacterial resistance to nicotine toxicity by reactive oxygen species. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** v. 57, p.456–462, 2009.

STAMPER, D.; POPOVIC, M.; STAJNER, M. Herbicide induced oxidative stress in lettuce, beans, pea seeds and leaves. **Biologia Plantarum** v. 4, p.575-579, 2003.

SMIRNOVA, G. V.; OKTYABRSKY, O. N. Glutathione in bacteria. **Biochemistry- Moscow** v.70, p.1199-1211, 2005.

STOOB, K.; SINGER, H.P.; GOETZ, C.W.; RUFF, M.; MUELLER, S.R. Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography–tandem mass spectrometry quantification of sulfonamide antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters. **Journal of Chromatography A** v. 1097, p.138–147, 2005.

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

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

VÖRÖSMARTY, C.J.; MCINTYRE, P.B.; GESSNER, M.O.; DUDGEON, D.; PRUSEVICH, A.; GREEN, P. ET AL. Global threats to human water security and river biodiversity. **Nature** v. 467, p.555-561, 2010.

YAO, X.H.; MIN, H.; LV, Z.M. Response of superoxide dismutase, catalase and ATPase activity in bacteria exposed to acetamiprid. **Biomedical and Environmental Science** v.19, p.309-314, 2006.

YU, WAN-TAI; BI, MING-LI; XU, YONG-GANG; ZHOU, HUA; MA, QIANG; JIANG, CHUN-MING. Microbial biomass and community composition in a Luvisol soil as influenced by long-term land use and fertilization. **Catena** v. 107, p.89-95. 2013.

5. Referências gerais

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, L.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment** v. 24, p. 1337-1344, 2001.

ALLOCATI, N.; FEDERICI, L.; MASULLI, M.; DI ILIO, C. Glutathione transferases in bacteria. **Febs Journal** v.276, p.58-75, 2009.

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

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

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

BARBOSA, L.C.A. Os pesticidas, o homem e o meio ambiente. Ed. **Universidade Federal de Viçosa**, 2004.

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

BATTISTONI, A. Role of prokaryotic Cu/Zn superoxide dismutase in pathogenesis. **Biochemical Society Transactions** v.1, p.1326-1329, 2003.

BENSALAH, N.; KHODARY, A.; WAHAB-ABDEL, A. Kinetic and mechanistic investigations of Mesotrione degradation in aqueous medium by Fenton process. **Journal of Hazardous Materials** v.189, p.479-485, 2011.

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

BJØRLING-POULSEN, M.; ANDERSEN, H.R.; GRANDJEAN, P. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. **Environmental Health** v.7, p.50-71, 2008.

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

BONNET, J.L.; BONNEMOY, F.; DUSSER, M.; BOHATIER, J. Toxicity assessment of the herbicides Sulcotrione and Mesotrione toward two reference environmental micro-organisms: *Tetrahymena pyriformis* and *Vibrio fischeri*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** n.55, p.576-583, 2008.

BORDO, D.; DJINOVIC, K.; BOLOGNESI, M. Conserved patterns in the CuZn superoxide dismutase family. **Journal of Molecular Biology** v. 238, n.3, p.366-386, 1994.

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.

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

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

CHAVES, A. C. O. Comportamento ambiental da ametrina e suas influências sobre a biodiversidade da comunidade microbiana dos solos. **Centro de Energia Nuclear na Agricultura**. Universidade de São Paulo 83p, 2007.

CHUKWUMA, S. E.; TAGBO, R.; ANIKE, E. N.; OJE, O. A.; ONWURAH, I. N. E. Biotechnological Tools for Environmental Sustainability: Prospects and Challenges for Environments in Nigeria- A Standard Review. **Biotechnology Research International** v.2012, 26 p, 2012.

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

COPLEY, S.D. Evolution of efficient pathways for degradation of anthropogenic chemicals. **Nature Chemical Biology** v. 5, p.559–566, 2009.

COUTINHO, T.A.; VENTER, S.N. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. **Molecular Plant Pathology** v.10, p. 325- 335, 2009.

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

D'AMATO, C.; TORRES, J.P.M.; MALM, O. DDT (Dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. **Química Nova** v. 25, p.995- 1002, 2002.

DABROWSKA, D.; KOT-WASIK, A.; NAMIESNIK, J. The importance of degradation in the fate of selected organic compounds in the environment. Part II. Photodegradation and biodegradation. **Polish Journal of Environmental Studies** v. 13, p.617-626, 2004.

DANILO, L.; DE SOCIO, G.; FRASSANITO, R.; ROTILIO, D. Effects of atrazine on *Ochrobactrum anthropi* membrane fatty acids. **Applied of Environmental Microbiology** v. 62, p.2644–2646, 1996.

DING, N.; GUO, H.; HAYAT, T.; WU, Y.; XU, J. Microbial community structure changes during Aroclor 1242 degradation in the rhizosphere of ryegrass (*Lolium multiflorum* L.). **FEMS Microbiology Ecolog** v. 70, p.305-314, 2009.

DONALDSON, C. Feed the world. **Public Health** v.130, p.154-155, 2010.

COUTINHO, T.A.; VENTER, S.N. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. **Molecular Plant Pathology** v. 10, p.325- 335, 2009.

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

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

GARG, N.; MANCHADA, G. ROS generation in plants: Boon or bane? **Plant Biosystems** v.143, p.81-96, 2009.

GHAZALI, F. M., ABDUL-RAHMAN, R. N. Z., SALLEH, A. B., BASRI, M. Biodegradation of hydrocarbon in soil by microbial consortium. **International Biodeterioration and Biodegradation** n. 54, p.61-67, 2004.

GEOFFROY L. Effect of oxyfluorfen and diuron alone and in mixture on antioxidative enzymes of *Scenedesmus obliquus*. **Pesticides Biochemistry and Physiology** v.72, p.178-185, 2002.

GE, T.D.; NIE, S.A.; WU, J.S.; SHEN, J.L.; XIAO, H.A.; TONG, C.L.; HUANG, D.F.; HONG, Y.; IWASAKI, K. Chemical properties, microbial biomass, and activity differ between soils of organic and conventional horticultural systems under greenhouse and open field management: a case study. **Journal of Soils and Sediments** v. 11, p.25–36. 2011.

GHELFI, A.; GAZIOLA, S.A.; CIA, M.C.; CHABREGAS, S.M.; FALCO, M.C.; KUSER-FALCÃO, P.R. et al. Cloning, expression, molecular modelling and docking analysis of glutathione transferase from *Saccharum officinarum*. **Annals of Applied Biology** v. 159, p.267–280, 2011.

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

GONZÁLEZ-FLECHA, B.; DEMPLE, B. Metabolic sources of hydrogen-peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry** v. 270, p.13681-13687, 1997.

GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A.. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology** v 32, p.481-494, 2005.

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

GRATÃO, P.L.; MONTEIRO, C.C.; CARVALHO, R.F.; TEZOTTO, T.; PIOTTO, F.A.; PERES, L.E.P et al.. Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. **Plant Physiology and Biochemistry** v. 56, p.79-96, 2012.

GRUBBER, M. Y.; GLICK, B. R.; THOMPSON, J. E. Cloned manganese superoxide dismutase reduces oxidative stress in *Escherichia coli* and *Anacystis nidulans*. **Proceeding of the National Academy Of Sciences of the United States of America** v.87, p.2608-2612, 1990.

HARA, Y.; KADOTANI, N.; IZUI, H.; KATASHKINA, J.; KUVAEVA, T. M.; ANDREEVA, I. G.; GOLUBEVA, L. I. et al. The complete genome sequence of *Pantoea ananatis* AJ 13355 an organism with great biotechnological potential. **Applied of Microbiology and Biotechnonoly** v. 93, p.331-341, 2012.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** v. 45, p.51-88, 2005.

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

HERBERT, R.A. The ecology and physiology of psychrophilic microorganisms. em: Herbert, R.A., Codd GA (eds) **Microbes in extreme environments** p.1–23, 1986.

HEIPIEPER, H.J.; DE BONT, J.A.M. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes. **Applied of Environmental & Microbiology** v. 60, p.4440–4444, 1994.

HICKS-BRAZIER, M.; EVANS, K. M.; CUNNINGHAM, O. D.; HODGSON, D. W. R.; STEEL, P. G.; EDWARDS, R. Catabolism of glutathione conjugates in *Arabidopsis thaliana*, role in metabolism reactivation of the herbicide safener fenclorim. **The Journal of Biological Chemistry** v.77, p.755-776, 2008.

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

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável**. Brasil, 2004. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=247&id_pagina=1&titulo=Brasil-tem-melhora-na-qualidade-do-ar,-mas-continuam-intensos-o-desflorestamento-e-o-uso-de-fertilizantes-e-agrotoxicos> acesso em 18 de junho de 2012.

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

INOUE, M. H.; OLIVEIRA, J.R.; REGITANO, R. S.; TORMENA, J. B., TORNISIELO, C. A.; CONSTANTIN, V. L. J. Critério para avaliação do potencial de lixiviação dos herbicidas comercializados do estado do Paraná. **Planta daninha** v.21, p.313-323. 2003.

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.

JUNIOR, A. M.; GLIIDLIN, A. F.; ALMEIDA, M. L.; HAVERROTH, H. S. Aumento da população de plantas e uso de herbicidas no controle de plantas daninhas em milho. **Planta daninha** v.15, 1997.

JUNG, I. L.; KIM, I. G. Transcription of *ahpC* and *katE* genes in *Escherichia coli* is regulated by polyamines: polyamine-deficient mutant sensitive to H₂O₂-induced oxidative damage. **Biochemical and Biophysical Research Communication** v.301, p.915-92, 2003.

KARAM, D. Características do herbicida Mesotrione na cultura do milho. **Embrapa milho e sorgo**. Cultura técnica. ISSN 1518-4269, 2004.

KATASHKINA, J.I.; HARA, Y.; GOLUBEVA, L.I.; ANDREEVA, I.G.; KUVAEVA, T.M.; MASHKO, S.V.. Use of the λ Red- recombineering method for genetic engineering of *Pantoea ananatis*. **BMC Molecular Biology** v.10, p.34-45. 2009.

KEWELOH, H.; DIEFENBACH, R.; REHM, H. J. Increase of phenol tolerance of *Escherichia coli* by alterations of the fatty acid composition of the membrane lipids. **Archives of Microbiology** v.157, p.49-53, 1991.

KOZDRÓJ, J.; VAN ELSAS, J.D. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. **Journal of Microbiological Methods** v.43, p.197-212, 2001.

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

KRAUS, T. E. et al. Paclobutrazol enhances tolerances to increased levels of UV-B radiation in soybean (*Glycine max*) seedlings. **Canadian Journal Botany** v. 73, p.797-806. 1995.

LABROU, E.N.; KARAVANGELLI, M.; CLONIS, T.D.; TSAFTARIS, A. Development of transgenic tobacco plants overexpressing maize glutathione-S-transferase I for cloroacetanilide herbicides phytoremediation. **Biomolecular Engineering** v. 22, p.121-128, 2005.

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

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

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science** v. 37, p.293-303, 2001.

LU, Z. M.; MIN, H.; XIA, Y. The response of *Escherichia coli* *Bacillus subtilis* and *Burholderia cepacia* WZ1 to oxidative stress of exposure to quinclorac. **Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contamination and Agricultural Wastes**. v.9, p.431-441, 2004.

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

MAESTRE, J. P.; WAHMAN, D. G.; SPEITEL JR. G. E. Monochloramine cometabolism by *Nitrosomas europaea* under drinking water conditions. **Water research** n. 47, p.4701- 4709. 2013.

MALSTRON, B.; ANDREASSON, L.; REINHAMMAER, B. In: **Boyer, P. (Ed) In the Enzymes, v. XIIB**. p.533, 1975.

MARTINAZZO, R.; DICK, D.P.; HIRSCH, M. M.; LEITE, S.B.; PERALHA, M.C.R. Sorção de atrazina e de mesotrina em latossolos e estimativas do potencial de contaminação. **Química Nova** v.34, p.1378- 1384, 2011.

MARTINS, P.F.; MARTINEZ, C.O.; CARVALHO, G.; CARNEIRO, P.I.B.; AZEVEDO, R.A.; PILEGGI, S.A.V. et al. Selection of Microorganisms Degrading S-Metolachlor Herbicide. **Brazilian Archives of Biology and Technology** v. 50, p.153-159, 2007.

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

MASIP, L.; VEERAVALLI, K. The many faces of glutathione in bacteria. **Antioxidants and Redox Signaling** v.8, p.753-762, 2006.

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

MATES, L. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Biogenic amines** v.153, p.83-104, 2000.

MONTEIRO, C.C.; CARVALHO, R.F.; GRATAO, P.L.; CARVALHO, G.; TEZOTTO, T.; MEDICI, L.O.; PERES, L.E.P.; AZEVEDO, R.A. Biochemical responses of the ethyleneinsensitive *Never ripe* tomato mutant subjected to cadmium and sodium stresses. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 71, p. 306-320, 2011

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

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

MONTEIRO, C.; CARVALHO, R.F.; GRATÃO, P.L.; CARVALHO, G.; TEZOTTO, T.; MEDICI, L.O. et al. Biochemical responses of the ethylene-insensitive *Never ripe* tomato mutant subjected to cadmium and sodium stresses. **Environmental and Experimental Botany** v. 71, p.306-320, 2011.

OGLIARI, J.; FREITAS, S.P.; RAMOS, A.C.; BRESSAN-SMITH, R.E.; FAÇANHA, A.R. Proton transport primary systems used as mechanisms of Mesotrione detoxification in corn plants. **Planta Daninha** v. 27, p.799-807, 2009.

OLIVEIRA, J.R.; CONSTANTIN, R. S.; INOUE, J. M. H. Biologia e manejo de plantas daninhas. **Omnipax editora**. Curitiba, 2011.

ONU.ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **A ONU e a população mundial**.Disponível em:< <http://www.onu.org.br/a-onu-em-acao/a-onu-em-acao/a-onu-e-a-populacao-mundial/>> acesso em 18 de junho de 2012.

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

SÁNCHEZ, M.; GARBI, C.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.; ORTIZ, L. T.; ALLENDE, J. L.; MARTIN. *Klebsiella planticola* strain DSZ mineralizes simazine: physiological adaptations involved in the process. **Applied of Microbiology and Biotechnology** v. 66, p.589-596, 2005.

SANDS, D.C.; MORRIS, C.E.; DRATZ, E.A.; PILGERAM, A. Elevating optimal human nutrition to a central goal of plant breeding and production of plant-based foods. **Plant Science** v. 117, p.377–389, 2009.

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.

SCHREINEMACHERS, P.; TIPRAQSA, P. Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries. **Food Policy** v. 37, p.616-626, 2012.

SENSEMAN, S.A. HERBICIDE HANDBOOK. edição 9. Lawrence, EUA: **Weed Science Society of America** 458p, 2007.

SILVA, C. M. A. S. Agrotóxicos: aspectos gerais. In: SILVA, C. M. A. S.; FAY, E. F. Agrotóxicos & Ambiente. **Embrapa Informação Tecnológica** v. 1, p.17-67, 2004.

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

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry** v. 269, p.8022–8028, 1994.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews** v. 59, p.201–222, 1995.

SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomic Analyses: Past and Future Trends. **Applied and Environmental Microbiology** v. 77, n.4, p.153–1161, 2011.

SHAO, T.; YUAN, H.; YAN, B.; LÜ, Z.; MIN, H. Antioxidant enzyme activity in bacterial resistance to nicotine toxicity by reactive oxygen species. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** v. 57, p.456–462, 2009.

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.

STAMPER, D.; POPOVIC, M.; STAJNER, M. Herbicide induced oxidative stress in lettuce, beans, pea seeds and leaves. **Biologia Plantarum** v. 4, p.575-579, 2003.

SMIRNOVA, G. V.; OKTYABRSKY, O. N. Glutathione in bacteria. **Biochemistry- Moscow** v.70, p.1199-1211, 2005.

STAVRINIDES, J.; NO, A.; OCHMAN, H. A single genetic locus in the phytopathogen *Pantoea stewartii* enables gut colonization and pathogenicity in an insect host. **Environmental Microbiology** v. 12, p.147–155, 2010.

STOOB, K.; SINGER, H.P.; GOETZ, C.W.; RUFF, M.; MUELLER, S.R. Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid

chromatography–tandem mass spectrometry quantification of sulfonamide antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters. **Journal of Chromatography A** v. 1097, p.138–147, 2005.

PASSARDI, F.; ZAMOCHY, M.; FAVET, J. ET AL. Phylogenetic distribution of catalase-peroxidases: Are there patches of order in chaos? **Gene** v.397, p.101-113, 2007.

PENNY, C.; VUILLEUMIER, S.; BRINGEL, F. Microbial degradation of tetrachloromethane: mechanisms and perspectives for bioremediation. **FEMS Microbiology Ecology** v.74, p.257-275, 2010.

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

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

PRATA, F.; LAVORENTI, A. Herbicides behavior in soil: influence of organic matter. **Revista Biociência** v. 6, p.17-22. 2000.

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

VÖRÖSMARTY, C.J.; MCINTYRE, P.B.; GESSNER, M.O.; DUDGEON, D.; PRUSEVICH, A.; GREEN, P. ET AL. Global threats to human water security and river biodiversity. **Nature** v. 467, p.555-561, 2010.

YAO, X.H.; MIN, H.; LV, Z.M. Response of superoxide dismutase, catalase and ATPase activity in bacteria exposed to acetamiprid. **Biomedical and Environmental Science** v.19, p.309-314, 2006.

ZENG, H. W.; CAI, Y.J.; LIAO, X.R.; QIAN, S.L.; ZHANG, F.; ZHANG, D.B. Optimization of catalase production and purification and characterization of a novel cold-adapted Cat-2 from mesophilic bacterium *Serratia marcescens* SYBC-01. **Annals of Microbiology** v.60, p. 701-708, 2010.

WU, H. C.; CHEN, P. C.; TSAY, T. T. Assessment of nematode community structure as a bioindicator in river monitoring. **Environmental Pollution** v. 158, p.1741-1747, 2010.

YU, WAN-TAI; BI, MING-LI; XU, YONG-GANG; ZHOU, HUA; MA, QIANG; JIANG, CHUN-MING. Microbial biomass and community composition in a

Luvisol soil as influenced by long-term land use and fertilization. **Catena** v. 107, p.89-95. 2013.