

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(ASSOCIAÇÃO AMPLA ENTRE UEPG E A UNICENTRO)**

ELIZANGELA PAZ DE OLIVEIRA

**SISTEMAS DE RESPOSTAS ADAPTATIVAS AO GLIFOSATO EM POPULAÇÕES
BACTERIANAS ISOLADAS EM ÁGUA**

**PONTA GROSSA
2016**

ELIZANGELA PAZ DE OLIVEIRA

**SISTEMAS DE RESPOSTAS ADAPTATIVAS AO GLIFOSATO EM POPULAÇÕES
BACTERIANAS ISOLADAS EM ÁGUA**

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

Orientador: Prof.Dr. Marcos Pileggi

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

**PONTA GROSSA
2016**

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

Oliveira, Elizangela Paz de
O48 Sistemas de respostas adaptativas ao
 glifosato em populações bacterianas
 isoladas em água/ Elizangela Paz de
 Oliveira. Ponta Grossa, 2016.
 50f.

 Dissertação (Mestrado em Ciências
 Biológicas - Área de Concentração:
 Biologia Evolutiva), Universidade Estadual
 de Ponta Grossa.
 Orientador: Prof. Dr. Marcos Pileggi.
 Coorientadora: Prof^a Dr^a Sônia Alvim
 Veiga Pileggi.

 1.Tolerância a herbicidas. 2.Adaptação
 bacteriana. 3.Respostas antioxidativas.
 4.Estresse oxidativo. 5.Ambientes extremo.
 I.Pileggi, Marcos. II. Pileggi, Sônia
 Alvim Veiga. III. Universidade Estadual de
 Ponta Grossa. Mestrado em Ciências
 Biológicas. IV. T.

CDD: 597

UEPG



UNIVERSIDADE

Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

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



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 07/2016

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

Aos vinte e nove dias do mês de fevereiro de dois mil e dezesseis, no auditório do Programa da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Dr. Marcos Pileggi em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Elizângela Paz de Oliveira**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Marcos Pileggi (Orientador UEPG), Dr. Leopoldo Sussumi Matsumoto (UENP) e Drª Rosilene Aparecida Prestes (UTFPR). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Sistemas de respostas adaptativas ao glifosato em populações bacterianas isoladas em água**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de sessenta dias, assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade - Capes) até o prazo máximo de 90 dias após a defesa, o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

Novo título _____

Ponta Grossa, 29 de fevereiro de dois mil e dezesseis

Prof. Dr. Marcos Pileggi (UEPG) _____

Prof. Dr. Leopoldo Sussumi Matsumoto (UENP) _____

Profª Drª Rosilene Aparecida Prestes (UTFPR) _____

Dedico este trabalho às pessoas que me
, ajudaram e me incentivaram, principalmente
minha família.

- Primeiramente a Deus por me guiar até aqui;
- À CAPES pelo apoio financeiro;
- Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Pileggi, por todos os passos que me ensinou a percorrer na realização deste trabalho, por sua paciência em todo o processo de aprendizagem e por me ensinar a desenvolver o senso crítico e científico e por estar ao meu lado nos momentos em que eu precisei, pois nunca deixou de me escutar e aconselhar para nunca desistir desta conquista, muito obrigada;
- A minha co-orientadora Professora, Dra. Sônia A. V. Pileggi, por todo incentivo e dedicação na realização deste trabalho;
- A professora Dra. Mara. C. A. Matiello, por todo seu esforço e dedicação comigo;
- Ao professor Dr. Péricles Martim Reche pelo apoio nos testes estatísticos;
- Aos meus pais, *in memoriam*, José Paz de Oliveira e Regina Pedrolí de Oliveira, por acreditarem sempre nos meus sonhos e por me incentivarem sempre a nunca desistir, as palavras não seriam suficientes para expressar todo meu agradecimento, todo meu amor, tudo o que vocês fizeram e me ensinaram, simplesmente os amo e sei que onde estiverem ainda cuidam e olham por mim (Amor inexplicável);
- Aos meus irmãos Joílso, Jairton, Raquel, Roseli e Rosângela, pelo incentivo, amizade e por sempre acreditarem nas minhas conquistas;
- A Professora Dra. Rosilene A. Prestes, por participar na minha banca de defesa e por sempre estar solícita a ajudar com os experimentos;
- Ao professor Dr. Leopoldo S. Matsumoto por participar na minha banca de defesa e por suas sugestões em meu trabalho;
- A minha amiga Zelinda Schemczssen por estar presente neste momento importante em minha vida, sendo minha companheira de longas conversas, por me ouvir, aconselhar, por todos os nossos sorrisos e alegrias que dividimos em nossas viagens, amiga só tenho que agradecer a Deus pela nossa amizade;
- A minha amiga Janaina Emiliano por todos os momentos e conversas que compartilhamos muito obrigada amiga por estar ao meu lado, por compartilhar seus conhecimentos e por ser minha amiga;
- Ao meu amigo Bruno César do Espírito Santo, por sempre estar ao meu lado me apoiando e por me ajudar nas edições das figuras deste trabalho;
- Ao Michel dos Anjos Ferreira pelo incentivo, pela ajuda quando mais precisei você foi muito importante nesta minha conquista, muito obrigada;
- Aos meus amigos do laboratório Microbiologia Ambiental do qual faço parte, por compartilharmos muitos momentos de alegrias e muita aprendizagem, Stella, Janaina, Alyne, Paloma, Edna, Evelyn, Jana, Bruno, Ulisses, Ricardo.

- Ao laboratório de Genética Evolutiva por sempre estar à disposição, e pelas amizades em especial a minha amiga Thaís A. Dulz por me incentivar a fazer mestrado, Zelinda, Jonathan.

- A todos os funcionários e os demais professores que ajudaram de alguma forma na realização deste trabalho.

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta as mudanças”

Charles Darwin

Resumo

O uso de herbicidas tem se expandindo comercialmente e existe a preocupação em se entender os efeitos adversos que esses agroquímicos podem causar em animais, plantas e microrganismos. Principalmente porque esses resíduos podem permanecer no ambiente por longos períodos. O objetivo deste trabalho foi avaliar alguns mecanismos enzimáticos e estruturais de tolerância, contra agentes tóxicos em bactérias, e se estes poderiam se constituir em um sistema de respostas para adaptação a ambientes extremos. A *Pseudomonas veronii* é uma linhagem isolada de água de lavagem de embalagens de cinquenta agrotóxicos e foi caracterizada como tolerante ao herbicida glifosato. Foram avaliadas algumas estratégias de tolerância envolvendo enzimas antioxidativas e alterações na permeabilidade de membrana citoplasmática. As atividades das enzimas Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT), envolvidas no processo antioxidativo, foram analisadas em gel não desnaturante, e os indicadores de estresse foram avaliados por meio de viabilidade celular, taxas de malonaldeído (MDA) e Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2). Foi utilizado o Meio Mineral (MM), com diferentes concentrações de glifosato, tendo como base a concentração do herbicida utilizada e campo (MM, controle sem herbicida; MM1, uma vez a concentração de campo, MM10, MM40 e MM50). As taxas de crescimento bacteriano foram menores nas concentrações MM40 e MM50 no início da fase *log* comparada com o controle. Quando comparamos as taxas de H_2O_2 o controle apresenta uma produção relativamente baixa no início da fase *log* com aumentos, significativos a partir da *log* intermediária, não tendo o mesmo efeito na taxa de crescimento. Em controle as taxas de MDA tem correspondência com as taxas de H_2O_2 e com possíveis níveis de peroxidação lipídica. No tratamento MM10 foi encontrada a maior taxa de MDA correspondendo com as taxas de H_2O_2 . A isoforma Mn-SOD teve sua atividade no início e final da *log* em controle, em MM50 não foi determinada nenhuma atividade. As isoformas de CAT, HPI em controle, foi observada em todas as fases da *log*, com o pico no meio da *log*. Na presença de glifosato ambas as isoformas apresentaram altas atividades nos tratamentos MM1 e MM10, porém muito baixas em MM40 e MM50, essas isoformas foram fundamentais contra o estresse gerado pelo glifosato, até o tratamento MM10. A linhagem *P. veronii* apresentou ser tolerante em MM1 e MM10 no início meio e final da fase *log*, com alta taxa de atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD.

Palavras-chaves: Tolerância a herbicidas, adaptação bacteriana, respostas antioxidativas, estresse oxidativo, ambientes extremo.

Abstract

The use of herbicides has been commercially expanding and there is concern in understanding the adverse effects that these pesticides can cause in animals, plants and microorganisms. Mainly because these residues may remain in the environment for long periods. The aim of this study was to evaluate some enzymatic and structural mechanisms of tolerance against toxic agents in bacteria, and these could constitute a system of responses to adaptation to extreme environments. *Pseudomonas veronii* is a strain isolated from wash water fifty packaging agrochemicals and was characterized as tolerant to glyphosate herbicide. We evaluated some tolerance strategies involving antioxidative enzymes and changes in the permeability of the cytoplasmic membrane. The activities of the enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) involved in antioxidative process were analyzed in non-denaturing gel, and stress indicators were assessed by cell viability malonaldehyde rates (MDA) and Hydrogen Peroxide (H₂O₂). It used the mineral medium (MM) with different glyphosate concentrations, based on the concentration of the herbicide used and the field (MM without herbicide control, MM1, since the concentration camp, MM10, MM40 and MM50). The bacterial growth rates were lower in MM40 and MM50 concentrations in the early log phase compared with the control. When comparing rates of H₂O₂ control has a relatively low production early log phase increases, significant starting from the intermediate log, having the same effect on growth rate. Control MDA rates have correspondence with the H₂O₂ rates and possible levels of lipid peroxidation. In MM10 treatment was the highest MDA rate corresponding to the rate of H₂O₂. The Mn-SOD isoform had its activity at the beginning and end of the log in control, MM50 has not been determined no activity. CAT isoforms HPI in control, was observed in all stages of the log, with the peak in the middle of the log. In the presence of glyphosate both isoforms showed high activity in MM1 and MM10 treatments, but very low in MM40 and MM50, these isoforms were key against stress generated by glyphosate to the MM10 treatment. *P. veronii* strain showed to be tolerant in MM1 and MM10 at the beginning middle and end of the log phase, with high rate of activity of antioxidant enzymes SOD and CAT.

Keywords: tolerance to herbicides, bacterial adaptation, antioxidant responses, oxidative stress, extreme environments.

Lista de abreviaturas e siglas

BSA–Ácidobenzóico 2 –amino-4metilsulfonil

CAT – Catalase

DDT – Dicloro-defenil-tricloroetano

DTT- Ditiotreil

EDTA – Ácido etileno diaminotetracético

ERO Espécies reativas em oxigênio

g– Força da gravidade

MDA- Malondealdeído

MM – Meio mineral

MM+G – Meio mineral com glifosato

NBT – Nitroazultetrazólio

PVPP – Polivinilpirrolidona

RPM – Rotação por minuto

SOD – Superóxido Dismutase

TBA – Ácido 2-tiobarbitúrico

TCA – Ácido tricloroacético

Lista de figuras

Figura 1 - Fórmula estrutural da molécula do glifosato.....	12
Figura 2 - Curva de crescimento bacteriano (O.D em 600 nm) em linhagens de <i>Pseudomonaveronii</i> , nos tratamento com MM (controle) MM1, MM10, MM40 e MM50 a concentração do glifosato durante 40h.	30
Figura 3 - Viabilidade celular em linhagens de <i>Pseudomonas veronii</i> nos tratamentos MM controle MM1, MM10, MM40 e MM50 a concentração do glifosato, nos tempos 20h, 30h e 40h.	32
Figura 4 - Quantificação de Peróxido de Hidrogênio em linhagens de <i>Pseudomonasveroni</i> nos tratamentos com MM (controle) MM1, MM10, MM40 e MM50 a concentração do glifosato em 20h, 30h e 40h.....	33
Figura 5 - Quantificação de MDA em linhagens de <i>Pseudomona veronii</i> nos tratamentos MM (controle) e MM1, MM10, MM40 e MM50 concentração do glifosato nos tempos de 20h, 30h 3 40h.	34
Figura 6 - Géis de isoformas de SOD-Mg, em diferentes tempos e tratamentos.	35
Figura 7 - Atividade em gel de SOD nos tempos de 20h, 30h e 40h.....	36
Figura 8 - Atividade em gel catalase em diferentes concentrações do glifosato e em diferentes tempos 20h 30h e 40h.	37

Lista de tabelas

Tabela 1 - Marcas de herbicidas presentes nos tanques de lavagens	Erro! Indicador não definido.
--	--------------------------------------

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Agroquímicos.....	11
1.2 Caracterização do Glifosato.....	11
1.3 Efeitos Adversos de Herbicidas em Seres Vivos	12
1.4 Sistema de respostas antioxidantes em microrganismos	13
1.5 Superóxido Dismutase.....	15
1.6 Catalase.....	15
2. OBJETIVO	17
2.1 Objetivos específicos:.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Herbicida.....	18
3.2 Condições de crescimento bacteriano	18
3.3 Extrações de proteínas para análise de estresse oxidativo	18
3.4 Peroxidação Lipídica.....	19
3.5 Peróxido de hidrogênio	19
3.6 Viabilidade celular.....	19
3.7 Atividade SOD	20
3.8 Determinação de isoenzimas de SOD	20
3.9 Atividade Catalase	20
3.10 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA.....	21
3.11 Análise estatística	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 INTRODUÇÃO.....	24
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.2.1 Linhagens bacterianas	27
4.2.2 Substâncias químicas e reagentes.....	27
4.2.3 Condições de crescimento bacteriano	27
4.2.4 Extração de proteínas para análise de estresse oxidativo.	27
4.2.5 Peroxidação Lipídica	28
4.2.6 Peróxido de hidrogênio.....	28
4.2.7 Viabilidade celular	28

4.2.8 Atividade SOD	28
4.2.9 Determinação das isoenzimas de SOD	29
4.2.10 Atividade Catalase.....	29
4.2.11 Análise estatística	29
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.3.1 Capacidade de Crescimento de <i>Pseudomonas veronii</i> em meio com glifosato	29
4.3.2 Viabilidade Celular	31
4.3.3 Quantificação do Peróxido de Hidrogênio	32
4.3.4 Quantificação de MDA.....	33
4.3.5 Enzimas no processo antioxidante de defesa ao glifosato	35
4.3.6 Catalase	36
4.4 CONCLUSÕES.....	37
5. REFERÊNCIAS	38
ANEXO 1 Análises Estatísticas: Peróxido.....	43
ANEXO 2 Análises Estatísticas: MDA.....	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 Agroquímicos

O mercado de agroquímicos se desenvolveu para controlar pragas agrícolas, a descoberta dodicloro-difenil-tricloroetano (DDT) em 1939, iniciou novas práticas com a produção de inseticidas na agricultura (RUUS et al., 2010). Posteriormente novos agroquímicos surgiram, incluindo os herbicidas, expandindo assim o mercado.

Os herbicidas têm a função de eliminar ou impedir o crescimento de ervas daninhas que prejudicam o crescimento de plantas de interesse na agricultura, substituindo a capina mecânica ou manual (GOMES et al., 2014). Observou-se um aumento na produtividade por meio do combate a pragas e doenças e também uma melhora na nutrição e no pH do solo (VERCRAENE et al, 2010).

Considerando o aumento no uso dos herbicidas, os agroquímicos vêm á contribuir com a contaminação do ambiente, já que eles podem ser deslocados através da pulverização, volatilização, drenagem e lixiviação. Estes compostos, quando encontrados em águas superficiais podem ser perigosos, atingindo organismos que não deveriam ser seus alvos, sendo que aproximadamente 80% da população humana está exposta a pesticidas presentes na água. Além de contaminar o ambiente, herbicidas podem alterar a microbiota dos solos alterando suas atividades ecológicas e metabólicas que são fundamentais para manutenção e fertilidade do solo (VAN et al., 2014).

1.2 Caracterização do Glifosato

O glifosato, N-(fosfonometil) glicina com a estrutura química $C_3H_8NO_5P$ (Fig. 1) e está na composição de mais de 150 marcas, incluindo o Roundup Transorb^R, estudado neste trabalho tem atuação sistêmica e pós emergente, representando atualmente 60% do mercado mundial de herbicidas não seletivos (ANVISA, 2012). Comercializado em mais de 130 países e utilizado em várias culturas agrícolas passou a ser comercializado nos Estados Unidos e em outros países, junto com culturas transgênicas resistentes (WEBSTER et al, 2013).

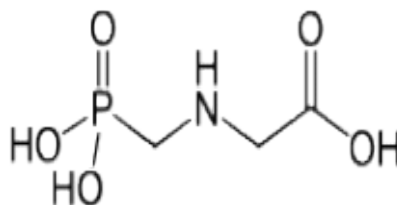


Figura 1 - Fórmula estrutural da molécula do glifosato.

No Brasil é muito utilizado como dessecante em cultivos sob plantio direto, principalmente nos cultivos de soja, e também na eliminação de plantas daninhas tanto de folhas largas e gramíneas, (PRASAD, JAUHARI, TIWARI, 2014).

A atuação do glifosato ocorre por meio da inibição da enzima (5-enolpiruvato-chiquímato-3-fosfato sintase) EPSPS que se localiza no cloroplasto, interfere na biossíntese de três aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano por meio do bloqueio da via do ácido chiquímico que está presente em plantas, microrganismos como bactérias e fungos, mas ausente em animais. A falta destes nutrientes essenciais impede o crescimento das plantas (WEBSTER et al., 2013).

A resistência da soja ao glifosato é devido a inserção do gene resistente proveniente de uma linhagem microbiana CP4 *Agrobacterium* permitindo a expressão funcional da via do ácido chiquímico (GOMES et al., 2014).

1.3 Efeitos Adversos de Herbicidas em Seres Vivos

A maioria dos agrotóxicos quando persistem no ambiente, podem ser lixiviados contaminando córregos, rios e lagos e assim atingindo organismos não alvos, inclusive humanos e animais (KNAUERT, 2010). Peixes e invertebrados aquáticos são muito sensíveis ao glifosato e aos adjuvantes deste herbicida (GOMES et al., 2014).

Alguns estudos relatam efeitos adversos de herbicidas nas taxas fotossintéticas em macrófitas aquáticas como *Elodea canadensis*, *Myriophyllum spicatum* e *Potamogeton lucens*. Em plantas os herbicidas agem impedindo o fluxo de agentes químicos bloqueando a biossíntese de aminoácidos, carotenóides ou lipídeos, bloqueando o fluxo de elétrons e inibindo a fotossíntese, levando a morte (GOMES et al., 2014).

Os herbicidas também podem afetar o crescimento e resistência a doenças e pragas em plantas, já que podem limitar a disponibilidade de micronutrientes (GOMES et al., 2014).

Entretanto, o uso contínuo de herbicidas pode levar à resistência de algumas ervas daninha, e comprometer o nível de controle (TSAI, 2013). A extensa utilização do glifosato em culturas como a soja, canola, algodão, milho acabou por levar a um uso mais intenso deste herbicida. Desta maneira, o glifosato é translocado às raízes e para a rizosfera, sendo que os efeitos tóxicos podem se acumular na microbiota (CHOI, BERGES, YOUNG, 2012).

Os microrganismos do solo são a base do ecossistema, exercendo funções importantes como a ciclagem de nutrientes, troca de gases com a atmosfera, decomposição da matéria orgânica, promoção de crescimento para as plantas, controle biológico de doenças e degradação de contaminantes (MOLDES et al, 2012).

Os microrganismos aquáticos também participam na produtividade primária, na ciclagem de nutrientes e decomposição. Os ambientes aquáticos recebem contribuições diretas e indiretas de pesticidas expondo os microrganismos aos seus efeitos tóxicos, e podem ter impactos subsequentes para níveis tróficos superiores, como mudanças na composição de espécies de fitoplâncton ou zooplâncton (DeLORENZO et al., 2001).

O glifosato apresenta toxicidade em bactérias e fungos, alterando a estrutura de microbiotas, e sendo desfavorável para a funcionalidade biológica e fisiológica dos microrganismos (DICKSON et al, 2011).

Quando as comunidades microbianas são expostas ao glifosato, algumas linhagens conseguem sobreviver enquanto outras, com pouca eficiência, morrem porque perdem energia combatendo o estresse causado pelo herbicida. Essas alterações como a peroxidação lipídica provocam danos oxidativos devido à presença das espécies reativas de oxigênio ERO presentes nos sistemas biológicos devido ao metabolismo energético utilizando o oxigênio no transporte de elétrons (ZABALOY et al, 2011).

1.4 Sistema de respostas antioxidantes em microrganismos

Devido à toxicidade pelos herbicidas, existe uma preocupação com os efeitos, sobre organismos do solo e água. Na atualidade tentamos compreender quais são

os danos gerados e quais são os mecanismos de adaptação e defesa (GOMES, 2014).

Os danos causados pelos herbicidas podem atingir o metabolismo celular de bactérias, dificultando o crescimento bacteriano, devido ao aumento na produção de ERO. O estresse oxidativo é caracterizado pelo excesso de radicais livres, que não são eliminados pelo sistema que protege a estrutura celular. Com exceção de algum grupo de bactérias anaeróbias estritas os seres vivos precisam mesmo que em apenas uma parte do seu ciclo de vida, do oxigênio para produzir energia, na forma de ATP. Neste caso, o oxigênio atua comoceptor final de elétrons durante a respiração, por meio da fosforilação oxidativa (TSAI, 2013).

As espécies reativas de oxigênio são formadas pela redução do O_2 formando o radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($OH^\cdot$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esses radicais livres são elétrons que se encontram desemparelhados nos átomos de oxigênio ou nitrogênio apresentando-se de forma reativa, ocasionando modificações na estrutura de aminoácidos, quebra de ligações peptídicas, mutações pontuais, despolimerização de ácidos nucleicos (TSAI, 2013).

O estresse oxidativo é um mecanismo que ocorre naturalmente nas células vivas, mas isso pode aumentar quando estas células precisam combater agentes estressantes e poluentes tóxicos. Linhagens de *Pseudomonas* são muito utilizadas como modelo de estudo de mecanismos de defesa em condições de estresse (ZHANG et al., 2012).

Alguns destes mecanismos envolvem enzimas antioxidativas as quais atuam no processo de defesa bacteriana sendo essenciais para a sua adaptação em ambientes considerados estressantes (BHAT et al, 2015; LIN et al., 2009).

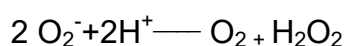
Existem as defesas não-enzimáticas, baseadas em compostos antioxidantes que ajuda manter o ambiente redutor, como o β -caroteno, glutathiona reduzida (GSH), α -tocoferol vitaminaE, ácido ascórbico, NADPH e NADH. Os enzimáticos envolvem a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathiona S-transferase (GST), glutathiona redutase (GR) (MARTINS et al., 2011).

Entretanto a reação entre o ferro, e oxigênio resulta na formação de superóxido e radicais hidroxila que são prejudiciais, as macromoléculas (DNA, proteínas e lipídios). Os seres vivos têm que construir mecanismos para se proteger contra o estresse oxidativo, enzimas como a superóxido dismutase e catalase,

respostas genéticas de bactérias ao estresse oxidativo, são controladas por dois principais reguladores da transcrição OxyR e SoxRS (COBISCOL et al., 2000).

1.5 Superóxido Dismutase

A SOD é uma enzima muito importante no processo de defesa contra o estresse oxidativo, pois é a primeira a participar da defesa celular contra as ERO. É classificada como metaloproteína e de acordo com o metal em seu sítio ativo pode ser Ferro (Fe)-SOD, Manganês (Mn)-SOD, Cobre Zinco (Cu/Zn)-SOD e Níquel (Ni)-SOD, é a única enzima eucariótica capaz de desintoxicar superóxido reação 1 (RYAN et al, 2010).



Reação1

As isoenzimas Fe-(SOD) e Mn-SOD, se localizam no citoplasma, são reguladas em resposta a níveis de ferro (IMLAY, 2013). A Fe-SOD e Mn-SOD são isoenzimas importante na proteção citoplasmática contra o estresse oxidativo. Em *E. colie Burkholderia cepacia* a Mn-SOD foi induzida a proteção contra a toxicidade do herbicida Quinclorac, em bactérias gram-negativas a Cu/Zn-SOD é produzida na fase estacionária e se localiza no espaço periplasmático (LI et al., 2009). As SODs são as enzimas antioxidantes mais eficientes. Sua ação combinada converte o radical superóxido potencialmente perigoso (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e água (H_2O) oxigênio molecular (O_2), evitando assim danos celulares (SCANDALIOS, 1993).

Estudos indicam que, em ambos os procariotas e eucariontes, o estresse oxidativo induz ou aumenta a atividade de SOD (SCANDALIOS, 1990; BOWLER et al, 1992; GRALLA KOSMAN, 1992). O aumento na atividade da SOD foi observado em resposta ao tratamento com herbicidas paraquat. O herbicida paraquat produz os seus efeitos citotóxicos através de um radical livre, ele é utilizado como um indicador em estudos de toxicidade de O_2 em muitos organismos (SCANDALIOS, 1993).

1.6 Catalase

A catalase é uma enzima antioxidante presente em quase todos os organismos aeróbios plantas, animais, fungos e bactérias. Está localizada nos

peroxissomo e controla o aumento de H_2O_2 nos tecidos celulares (MADEJ et al, 2015).



Reação 2

A catalase possui papel importante na defesa celular, sua atividade depende da produção gerada de H_2O_2 , podendo atuar como resposta peroxidativa ou catalítica, sendo uma enzima eficiente na remoção do peróxido de hidrogênio, sob condições de estresse e quando expostas à herbicida a atividade de CAT aumenta em algumas bactérias (SCANDALIOS, 2005).

O processo de desintoxicação enzimático do H_2O_2 em bactérias é realizado pelas enzimas catalases peroxidases denominadas HPI e HP II (LOEWEN, 1996). Em *Escherichia coli* quando exposta ao peróxido de hidrogênio, a HPI é induzida a se expressar para eliminar esse composto tóxico. Em contraste, a síntese da enzima HP II não é induzida pelo peróxido de hidrogênio. A expressão de ambos HPI e HP II é dependente da fase de crescimento. São 10 vezes mais elevada em culturas de fase estacionária do que na fase exponencial (LOEWEN, 1996).

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar alguns mecanismos enzimáticos e estruturais de tolerância, contra agentes tóxicos em bactérias, e se estes poderiam se constituir em um sistema de respostas para adaptação a ambientes extremos.

2.1 Objetivos específicos:

- Identificar e quantificar indicadores de estresse, relacionados à formação de ERO, em linhagens bacterianas expostas ao glifosato, selecionadas a ambientes extremos;
- Analisar a eficiência dos sistemas antioxidativos, por meio de análises de atividades de SOD e CAT, em responder ao estresse oxidativo causado pelo glifosato em linhagem selecionada;
- Analisar os sistemas antioxidativos em respostas ao estresse oxidativo, causado pelo herbicida glifosato em linhagem selecionada pela análise da atividade da CAT e SOD.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Herbicida

A formulação comercial utilizada foi o glifosato RoundupTransorb^R que contém 58% (588 g/L) de sal de potássio de glifosato, dos quais 48% (480 g/L) está na forma de ácido N fosfonometil glicina glifosato, e ingredientes inertes 82 %.

3.2 Condições de crescimento bacteriano

Os seguintes meios de culturas foram utilizados para conduzir a maioria dos experimentos descrito neste trabalho, Meio Mineral (MM), contendo 10 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,0; 3 g L⁻¹ de NaNO₃; 0,5 g L⁻¹ de MgSO₄; 0,5 g L⁻¹ de KCl; 0,01 g L⁻¹ de FeSO₄; 0,04 g L⁻¹ de CaCl₂; 0,001 g L⁻¹ de MnSO₄; sendo adicionado 0,4 g L⁻¹ de glucose, MM (controle), MM com glifosato na concentração de 0,2307 mM dose de campo (MM1), com glifosato na concentração de 2,3 mM (MM10), com glifosato na concentração de 9,223mM (MM40), com glifosato na concentração de 11,545 mM (MM50), as condições de crescimento foram a 30 °C sob agitação de 120 rpm.

O pré-inóculo foi obtido pelo crescimento da linhagem bacteriana em MM até a fase *log* de crescimento (20h de incubação). O pré-inóculo foi transferido para cada tratamento 0,4 g L⁻¹ de glucose, MM (controle), MM com glifosato na concentração de 0,2307 mM dose de campo (MM1), com glifosato na concentração de 2,3 mM (MM10), com glifosato na concentração de 9,223mM (MM40), com glifosato na concentração de 11,545 mM (MM50), em uma D.O. (densidade óptica) inicial de 0,05 a 600 nm, sendo diluídas as amostras sempre que as leituras atingissem valores de aproximadamente 0,6, para minimizar os erros. Os valores obtidos multiplicados pelos fatores de diluição correspondentes.

3.3 Extrações de proteínas para análise de estresse oxidativo

Depois do pré-inóculo de 20h, foi acertado a D.O em 0,05 densidade óptica em um tratamento contendo apenas o MM, os tempos para fazer as extrações de proteínas foram de acordo com as fases *log* inicial, intermediária e terminal correspondente á 20, 30 e 40h.

As células foram centrifugadas a 5.000g durante 15min duas vezes, ressuspendidas em tubos de centrifuga de 50 mL contendo os seguintes meios MM

(controle), MM1, MM10, MM40 e MM50. O precipitado foi macerado com nitrogênio líquido e homogeneizado (10:1 m/v) em 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5), contendo 1 mM de ácido etileno diaminotetracético (EDTA), 3 mM ditioneitol (DTT) e polivinilpirrolidona 5 % (PVPP) e mantidas a 4°C. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g durante 30min, e o sobrenadante foi separado em alíquotas, colocado em tubos de microcentrifuga e congelado a -80 °C para posteriores análises enzimáticas. A concentração de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando (“bovine serum albumin”) BSA como padrão.

3.4 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica foi analisada em espectrofotômetro a 535 e 600 nm, para quantificar a produção de (MDA), um metabólico reativo ao ácido tiobarbitúrico (TBA), esse método foi adaptado por Health e Packer (1968). Assim 250 µL de amostra (100 mg de extrato protéico homogeneizada com 1 mL de TCA 0,1% e centrifugadas a 10.000 g por 15 min a 4°C), juntamente com 200 µL de tampão fosfato de potássio (pH7,5) e 1 mL de TCA 20%+ TBA 0,1% foram mantidas por 30 min em banho-maria a 97°C. Posteriormente as amostras permaneceram por 10 min em gelo antes de serem centrifugadas a 10.000 g por 10 min e, o sobrenadante ser lido em espectrofotômetro.

3.5 Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio foi quantificado em espectrofotômetro a 390 nm por meio da liberação do iodo, proveniente da reação com 200 µL de amostra (100 mg de extrato protéico seção (3.3) homogeneizadas com 1 mL de TCA 0,1% e centrifugadas a 10.000 g por 15 min a 4°C), 200 µL de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) e 800 µl de iodeto de potássio 1M, mantida por 1 h em gelo, na ausência de luz.

3.6 Viabilidade celular

O procedimento inicial do crescimento bacteriano é de acordo com o parágrafo (3.2), a bactéria em suspensão foi diluída até se obter entre 25 á 300 colônias para diminuir erros estatísticos. As amostras de 100uL foram plaqueadas em triplicata em MM e incubadas a 30°C por 24h para contagem subsequente das colônias.

3.7 Atividade SOD

A atividade SOD e caracterização de suas isoformas, realizou-se a corrida em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE não-desnaturante a 12%), por meio de 20 μ g de extrato protéico seção (3.3) de cada tratamento em 20h, 30h e 40h. Durante a corrida a 4°C, uma corrente constante de 15 mA gel⁻¹ foi aplicada durante 3 horas. Ao final da corrida os géis foram lavados com água deionizada e incubados no escuro, na temperatura ambiente, em uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8 mM EDTA, 0,05 mM riboflavina, 0,01 mM nitro azul tetrazólio (NBT) 0,3 % TEMED. Ao final de 30 min, a mistura de reação foi descartada, os géis lavados com água deionizada e colocados sob iluminação até o aparecimento de bandas (CIA et al., 2012).

3.8 Determinação de isoenzimas de SOD

As isoformas de SOD foram avaliadas a partir de PAGE não desnaturante (12%). O gel foi dividido verticalmente em três partes antes de ser corado. A primeira foi mantida em uma solução de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a segunda foi colocada em 100 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM contendo KCN 2 mM e EDTA 1 mM, a terceira parte foi imersa em 100 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM com 5 mM de H₂O₂ e EDTA 1 mM. Esse processo foi realizado na ausência de luz.

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

3.9 Atividade Catalase

A determinação da atividade de CAT foi realizada em 4°C com a corrente contínua de 15 mA. O padrão utilizado foi de CAT de fígado de boi (2 unidades) e foram aplicadas 13 μ g de extrato protéico das amostras. Após o tempo de corrida de 18h, o gel foi lavado em água deionizada (3x de 15min cada) e incubados por 10 min em solução de H₂O₂ 0,003 % (v/v), á temperatura ambiente, sob agitação, após esse período o gel foi lavado em água deionizada e colocada por 10 min em solução de FeCl₃ 1% e K₂Fe(CN₆) 1% (m/v) sob agitação. Em seguida a solução foi retirada e o gel lavado com água deionizada. A fixação foi realizada com solução de ácido acético (7%) por 15 min e fotografados.

3.10 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA

Foi utilizado o oligonucleotídeo iniciador universal 27F: 5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 1492R: 5' - ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'. O programa de PCR usado foi: 2 minutos a 94°C, 25 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C, 1 minuto e 15 segundos a 72°C e uma extensão a 72°C por 10 minutos. Em seguida, os produtos de PCR foram tratados com 5,2 U e 0,77 U de Exonuclease/SAP (shrimp alkaline phosphatase – Fermentas), respectivamente, e incubados a 37°C por 1 hora, seguindo com a inativação das enzimas a 80°C por 30 minutos. Os amplificadores do gene 16S rRNA foram sequenciados com BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing Kit (AppliedBiosystems) e os primers 27F e 1492R no sequenciador de DNA ABI 3500 (Applied Biosystems).

Para análise do produto do sequenciamento, as extremidades das sequências do gene 16S rRNA com valor de Phred menor que 20 foram removidas (EWING *et al*, 2005). Posteriormente, as sequências derivadas dos primers 27F e 1492R de cada isolado foram analisadas pelo programa Ph rap e uma sequência consenso de aproximadamente 1400pb foi gerada utilizando o programa Consed (Gordon *et al*, 2004). Para classificação taxonomica as sequências foram comparadas com o banco de dados de 16S rRNA do National Center for Biotechnology GenBank.

3.11 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados pela ANOVA, de Bonferroni e Fischer.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sistemas de Respostas adaptativas ao glifosato em populações bacterianas isoladas em água

Adaptive responses of systems to glyphosate in bacterial populations isolated in Water

RESUMO

O uso de herbicidas tem se expandindo comercialmente e existe a preocupação em se entender os efeitos adversos que esses agroquímicos podem causar em animais, plantas e microrganismos. Principalmente porque esses resíduos podem permanecer no ambiente por longos períodos. O objetivo deste trabalho foi avaliar alguns mecanismos enzimáticos e estruturais de tolerância, contra agentes tóxicos em bactérias, e se estes poderiam se constituir em um sistema de respostas para adaptação a ambientes extremos. A *Pseudomonas veronii* é uma linhagem isolada de água de lavagem de embalagens de cinquenta agrotóxicos e foi caracterizada como tolerante ao herbicida glifosato. Foram avaliadas algumas estratégias de tolerância envolvendo enzimas antioxidativas e alterações na permeabilidade de membrana citoplasmática. As atividades das enzimas Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT), envolvidas no processo antioxidativo, foram analisadas em gel não desnaturante, e os indicadores de estresse foram avaliados por meio de viabilidade celular, taxas de malonaldeído (MDA) e Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2). Foi utilizado o Meio Mineral (MM), com diferentes concentrações de glifosato, tendo como base a concentração do herbicida utilizada e campo (MM, controle sem herbicida; MM1, uma vez a concentração de campo, MM10, MM40 e MM50). As taxas de crescimento bacteriano foram menores nas concentrações MM40 e MM50 no início da fase *log* comparada com o controle. Quando comparamos as taxas de H_2O_2 o controle apresenta uma produção relativamente baixa no início da fase *log* com aumentos, significativos a partir da *log* intermediária, não tendo o mesmo efeito na taxa de crescimento. Em controle as taxas de MDA tem correspondência com as taxas de H_2O_2 e com possíveis níveis de peroxidação lipídica. No tratamento MM10 foi encontrada a maior taxa de MDA correspondendo com as taxas de H_2O_2 . A isoforma Mn-SOD teve sua atividade no início e final da *log* em controle, em MM50 não foi determinada nenhuma atividade. As isoformas de CAT, HPI em controle, foi observada em todas as fases da *log*, com o pico no meio da *log*. Na presença de glifosato ambas as isoformas apresentaram altas atividades nos tratamentos MM1 e MM10, porém muito baixas em MM40 e MM50, essas isoformas foram fundamentais contra o estresse gerado pelo glifosato, até o tratamento MM10. A linhagem *P. veronii* apresentou ser tolerante em MM1 e MM10 no início meio e final da fase *log*, com alta taxa de atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD.

Palavras-chaves: Tolerância a herbicidas, adaptação bacteriana, respostas antioxidativas, estresse oxidativo, ambientes extremo.

Abstract

The use of herbicides has been commercially expanding and there is concern in understanding the adverse effects that these pesticides can cause in animals, plants and microorganisms. Mainly because these residues may remain in the environment for long periods. The aim of this study was to evaluate some enzymatic and structural mechanisms of tolerance against toxic agents in bacteria, and these could constitute a system of responses to adaptation to extreme environments. *Pseudomonas veronii* is a strain isolated from wash water fifty packaging agrochemicals and was characterized as tolerant to glyphosate herbicide. We evaluated some tolerance strategies involving antioxidative enzymes and changes in the permeability of the cytoplasmic membrane. The activities of the enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) involved in antioxidative process were analyzed in non-denaturing gel, and stress indicators were assessed by cell viability malondialdehyde rates (MDA) and Hydrogen Peroxide (H₂O₂). It used the mineral medium (MM) with different glyphosate concentrations, based on the concentration of the herbicide used and the field (MM without herbicide control, MM1, since the concentration camp, MM10, MM40 and MM50). The bacterial growth rates were lower in MM40 and MM50 concentrations in the early log phase compared with the control. When comparing rates of H₂O₂ control has a relatively low production early log phase increases, significant starting from the intermediate log, having the same effect on growth rate. Control MDA rates have correspondence with the H₂O₂ rates and possible levels of lipid peroxidation. In MM10 treatment was the highest MDA rate corresponding to the rate of H₂O₂. The Mn-SOD isoform had its activity at the beginning and end of the log in control, MM50 has not been determined no activity. CAT isoforms HPI in control, was observed in all stages of the log, with the peak in the middle of the log. In the presence of glyphosate both isoforms showed high activity in MM1 and MM10 treatments, but very low in MM40 and MM50, these isoforms were key against stress generated by glyphosate to the MM10 treatment. *P. veronii* strain showed to be tolerant in MM1 and MM10 at the beginning middle and end of the log phase, with high rate of activity of antioxidant enzymes SOD and CAT.

Keywords: tolerance to herbicides, bacterial adaptation, antioxidative responses, oxidative stress, extreme environments.

4.1 INTRODUÇÃO

Desde a Revolução Industrial, a produção e utilização de produtos químicos aumentaram como consequência, todos os tipos de resíduos que são produzidos são liberados no ambiente. Muitos produtos, tais como herbicidas utilizados para controlar ervas daninhas e pragas têm gerado preocupação quanto seus efeitos tóxicos, quando poluem solos e águas. Hoje em dia, há uma crescente conscientização sobre os possíveis efeitos tóxicos de produtos químicos (ARMAS et al., 2007).

Os herbicidas têm a função de eliminar ou impedir o crescimento de ervas daninhas que prejudicam o crescimento de plantas de interesse na agricultura, substituindo a capina mecânica ou manual (GOMES et al., 2014). Observou-se um aumento na produtividade por meio do combate a pragas e doenças e também uma melhora na nutrição e no pH do solo (VERCRAENE et al, 2010).

A utilização de agroquímicos passou ser necessária na agricultura e beneficiou a produtividade, combatendo pragas e doenças nas plantações, também ajuda a melhorar os nutrientes e o pH do solo, mas quando utilizadas em doses intensas e formulações tóxicas, contribui com os desequilíbrios ambientais devido seu forte impacto contaminando solos e águas, esta é uma das preocupações referentes aos efeitos adversos destes herbicidas (VAN et al., 2014).

Os herbicidas têm a função de eliminar e impedir o crescimento de ervas daninha, plantas indesejáveis que prejudicam o crescimento de plantas de interesse na agricultura, sendo esse meio substituído pela capina mecânica ou manual (GOMES et al., 2014).

Considerando esse aumento no uso dos herbicidas, os agroquímicos têm vindo a contribuir com a contaminação do ambiente, eles podem ser deslocadas através da pulverização, volatilização, drenagem e lixiviação, estes compostos quando encontrados em águas superficiais podem ser perigosos, atingindo organismos que não deveriam ser seus alvos, aproximadamente 80% da população humana está exposta a pesticidas presentes na água, além de contaminar o ambiente, esses herbicidas podem alterar a microbiota dos solos alterando as atividades ecológicas e metabólicas dos microrganismos, sendo estes fundamentais para manutenção e fertilidade dos solos (WITTEMER et al., 2010).

A extensa utilização do glifosato em culturas como a soja, canola, algodão, milho intensificou a sua aplicação nestes sistemas de produção, o glifosato é

translocado às raízes e lançado em toda a rizosfera e os efeitos tóxicos a microbiota se torna acumulativos (CHOI, BERGES, YOUNG., 2012).

Em experimento em campo, para avaliar o efeito do cultivo de soja geneticamente modificado e do controle de plantas daninhas, com aplicações de glifosato, foi verificado que houve menor incorporação de carbono pela biomassa microbiana e maior produção de CO₂ nas parcelas com aplicação de glifosato (BOHM et al, 2010).

Quando as comunidades microbianas ficam expostas ao glifosato, algumas linhagens conseguem sobreviver mediante a toxicidade, outras com pouca eficiência vão morrendo lentamente porque perdem energia combatendo estresse causado pelo herbicida (ZABALOY et al, 2011).

Quando os microrganismos ficam expostos aos herbicidas, muitos podem mudar seu comportamento fisiológico, quando ocorrem alterações em seu meio, provocando danos oxidativos devido ao estresse, aumentando as ERO, algumas destas alterações manifestadas, ativam enzimas antioxidativas que são as atividades de proteínas que atuam neste processo de defesa bacteriana, sendo essencial para sua adaptação em ambientes considerados estressantes, em *Pseudomonas* esse mecanismo de complexidade em sobreviver em ambientes alterados são estratégias metabólicas adquiridas para sua sobrevivência (BHAT et al, 2015).

Devido esta toxicidade apresentada atualmente há certa preocupação com os contaminantes pesticidas e herbicidas e seus efeitos hoje em longo prazo, que estão sendo lançados no solo e na água. Por tanto tentamos compreender quais são os danos gerados, nos seres que são atingidos por essas substâncias tóxicas, e quais são os mecanismos de adaptação e defesa que esses organismos apresentam para sobreviver nestas condições, em ambientes considerados estressantes na presença destes agroquímicos. Podendo causar muitos danos no metabolismo celular, dificultando o crescimento bacteriano aumentando produção de espécies reativas de oxigênio ERO, o estresse oxidativo, no seu sistema de defesa existem enzimas que fazem parte do seu sistema antioxidante que podem ajudar na defesa contra essas substâncias tóxicas (LI et al., 2009).

O estresse oxidativo é excesso de radicais livres comparados com o sistema que protege a estrutura celular contra efeitos que podem lhe causar danos na presença do oxigênio. Com exceção de alguns grupos de bactérias aeróbias e

anaeróbias que são facultativas, os seres vivos aeróbios precisam do oxigênio para produzir energia ATP comoceptor final de elétrons durante a respiração, através da oxidação, quando ocorre a fosforilação oxidativa, ocorre a redução do oxigênio em água sendo este o processo principal na produção de energia para organismos aeróbios (TSAI, 2013).

Por tanto tentamos compreender quais são os danos gerados nos seres que são atingidos por essas substâncias tóxicas, e quais são os mecanismos de adaptação e defesa, que esses organismos apresentam para sobreviver nestas condições, em ambientes considerados estressantes na presença destes agroquímicos. Podendo causar muitos danos no metabolismo celular, dificultando o crescimento bacteriano aumentando produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), o estresse oxidativo, no seu sistema de defesa existem enzimas que fazem parte do seu sistema antioxidante que podem ajudar na defesa contra essas substâncias tóxicas (HARE et al., 2011).

O sistema antioxidante é um dos meios para diminuir esses danos nos seres vivos, este sistema possui muita importância para os mecanismos redox da célula, onde ela equilibra a produção de ERO e a desintoxicação através de enzimas (BHAT et al., 2015).

Quando observamos consideramos que é uma resposta a compostos estressantes como os herbicidas, mas outro sistema chamado antioxidante começa a atuar protegendo as células contra esses agentes estressantes incluindo os herbicidas, essa defesa pode ser enzimática ou não enzimática, as não-enzimáticas possuem compostos antioxidante que ajuda manter o ambiente redutor, β -caroteno, glutathione reduzida (GSH), α -tocoferol vitamina E, ácido ascórbico, NADPH NADH, os enzimáticos são catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR) (MARTINS et al., 2011). Os objetivos deste trabalho foram avaliar alguns mecanismos enzimáticos e estruturais de tolerância, contra agentes tóxicos em bactérias, e se estes poderiam se constituir em um sistema de respostas para adaptação a ambientes extremos, analisar quais são os mecanismos de defesa da linhagem bacteriana em contato com o herbicida glifosato, e as atividades das enzimas antioxidantes contra o estresse oxidativo CAT e SOD.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Linhagens bacterianas

A linhagem selecionada para este estudo foi obtida a partir da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Ambiental da UEPG, tendo sido isolada de água de lavagem de embalagens de herbicidas.

4.2.2 Substâncias químicas e reagentes

A formulação comercial utilizada foi o glifosato Roundup que contém 58,8 % de sal de potássio de glifosato, ácido N fosfonometil glicina glifosato 48% m/v (480 g/L) e ingredientes inertes 82 %.

4.2.3 Condições de crescimento bacteriano

As linhagens foram crescidas no Meio Mineral (MM), em 30°C durante 20h inoculadas nos tratamentos em triplicatas: MM (controle) com glifosato na concentração de 0,2307 mM dose de campo, MM1 com glifosato na concentração de 2,3 mM, MM10 com glifosato na concentração de 9,223 mM, MM40 com glifosato na concentração de 11,545 mM, MM50. O inóculo foi padronizados para iniciar em densidade óptica (DO) de 0,05 de absorbância, o crescimento bacteriano foi avaliado em espectrofotômetro a 600 nm. Sendo diluídas as amostras sempre que atingissem valores de aproximadamente 0,6, os valores foram multiplicados pelos fatores de diluição correspondentes.

4.2.4 Extração de proteínas para análise de estresse oxidativo.

O crescimento bacteriano é de acordo com o parágrafo (4.2.3). As proteínas foram extraídas no período de crescimento no início da fase *log*, meio da fase *log* e final desta fase, após o tempo de incubação de 20 30 e 40h, foram centrifugadas á 5.000 *g* durante 15 min. O precipitado foi macerado com nitrogênio líquido e homogeneizado em 1:10 m/v com tampão de fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5 (em g L⁻¹: 14,520 K₂HPO₄; 2,260 KH₂PO₄; 0,372 EDTA; 0,462 DL- dithiothreitol e 5% (w/w) polivinilpolipirrolidone-PVPP (10:1 volume do tampão: peso da amostra). As amostras são mantidas á 4°C e centrifugadas a 10.000 *g* por 30 min, o sobrenadante é armazenado a -80°C. A concentração de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA como padrão.

4.2.5 Peroxidação Lipídica

O processo inicial do crescimento bacteriano e pré-inóculo são de acordo com o parágrafo (4.2.3). A peroxidação lipídica foi determinada em espectrofotômetro á 530 e 600 nm, através da produção de malondealdeído (MDA), sendo este um metabólito reativo ao ácido 2-tiobarbitúrico. Retira 250 μL de amostra (100mg de extrato protéico homogeneizadas com 1 mL de TCA 0,1% e centrifugadas a 10.000 g por 15 min á 4 °C), com 200 μL de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) e 1 mL de TCA 20% + TBA 0,1% foram mantidas por 30 min em banho-maria á 97 °C. Posteriormente as amostras permaneceram por 10 min em gelo antes da centrifugação á 10.000 g por 10 min e, o sobrenadante foi lido em espectrofotômetro.

4.2.6 Peróxido de hidrogênio

A quantificação do peróxido de hidrogênio foi através de espectrofotômetro á 390 nm através da liberação do iodo, proveniente da reação com 200 μL de amostra (100 mg de extrato protéico (4.2.4) homogeneizadas com 1 mL de TCA 0,1% e centrifugadas a 10.000 g por 15 min á 4 °C), 200 μL de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) e 800 μL de iodeto de potássio 1M durante 1 h no gelo, no escuro.

4.2.7 Viabilidade celular

O procedimento inicial do crescimento bacteriano é de acordo com o parágrafo (4.2.3), a bactéria em suspensão foi diluídas em 20h, 10^{-25} no controle, MM1 e MM10 e 10^{-10} em MM40 e MM50. Em 30h Controle 10^{-28} MM1 10^{-25} , MM10 10^{-15} , MM40 10^{-15} , MM50 10^{-15} , em 40h controle MM 10^{-15} , MM1 10^{-15} , MM10 10^{-15} , MM40 10^{-15} , MM40 10^{-15} , MM50 10^{-15} . Amostras de 100uL foram plaqueadas em triplicata em MM e incubadas a 30 C por 24h para contagem subsequente das colônias.

4.2.8 Atividade SOD

A atividade SOD e caracterização de suas isoformas foram realizadas na eletroforese em PAGE foram utilizadas como padrão duas unidades de SOD de fígado de boi (Sigma). Ao final da corrida os géis foram lavados com água deionizada e incubadas no escuro, na temperatura ambiente, em uma mistura com

50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8, EDTA 1 mM, riboflavina 0,05 mM, nitro azul tetrazólico (NBT) 0,1 mM e TEMED 0,3% deixando reagir por 30min e descarta essa mistura lavando os géis com água deionizada e colocada sob iluminação até aparecer as bandas.

4.2.9 Determinação das isoenzimas de SOD

Para caracterizar as isoformas de SOD, o gel foi dividido verticalmente em três partes após a corrida da eletroforese. Uma parte foi imersa em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8. A segunda parte imersa em solução com 100 ml do mesmo tampão contendo 0,0292 g de EDTA e 0,0130 g de KCN, e a última imersa na solução já citada acrescida de 0,0292 g de EDTA e 70 μ L H_2O_2 30% . As isoformas são classificadas como Cu/Zn-SOD quando inativada na presença do KCN e H_2O_2 , Fe-SOD se a banda for 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).

4.2.10 Atividade Catalase

A determinação da atividade de CAT foi realizada em 4°C com a corrente contínua de 15 mA. O padrão utilizado foi de CAT de fígado de boi (2 unidades) e 13 μ g de extrato protéico das amostras. Após o tempo de corrida de 18h, o gel foi lavado em água deionizada (3x 15 min) e incubados por 10 min em solução de H_2O_2 0,003 % (v/v), á temperatura ambiente, sob agitação, após esse período o gel foi lavado em água deionizada e colocada por 10 min em solução de $FeCl_3$ 1% e $K_2Fe(CN)_6$ 1% (m/v) sob agitação. Em seguida a solução será retirada e o gel lavado com água deionizada. A fixação foi realizada com solução de ácido acético (7%) por 15 min e fotografados.

4.2.11 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados pela ANOVA, de Bonferroni e Fischer.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Capacidade de Crescimento de *Pseudomonas veronii* em meio com glifosato

A linhagem foi identificada como *Pseudomona veronii*, pelo seqüenciamento do gene 16S, foi selecionada em um tanque de lavagem de embalagem com vários fungicidas, pesticidas e herbicidas incluindo o glifosato.

Este local de coleta foi considerado um ambiente extremo, devido à presença de diferentes substâncias tóxicas em um tempo longo (até seis meses). Assim a *P. veronii* foi selecionada devida sua capacidade em crescer na presença do glifosato em taxas equivalentes ao controle MM mesmo na concentração de MM1x e MM10x não teve interferência. De acordo com a curva de crescimento, em MM controle e como mostra a Fig 2. Nas concentrações com herbicida nos mostra, MM1x e MM10x não teve interferências significativas, sobre as taxas de crescimento bacteriano, comparando com o controle MM. Este efeito que inibe o crescimento bacteriano foi observado nas concentrações de MM40x e MM50x. A fase de crescimento bacteriano ficou entre a *log* inicial, mediana e terminal em 20h, 30h, e 40h.

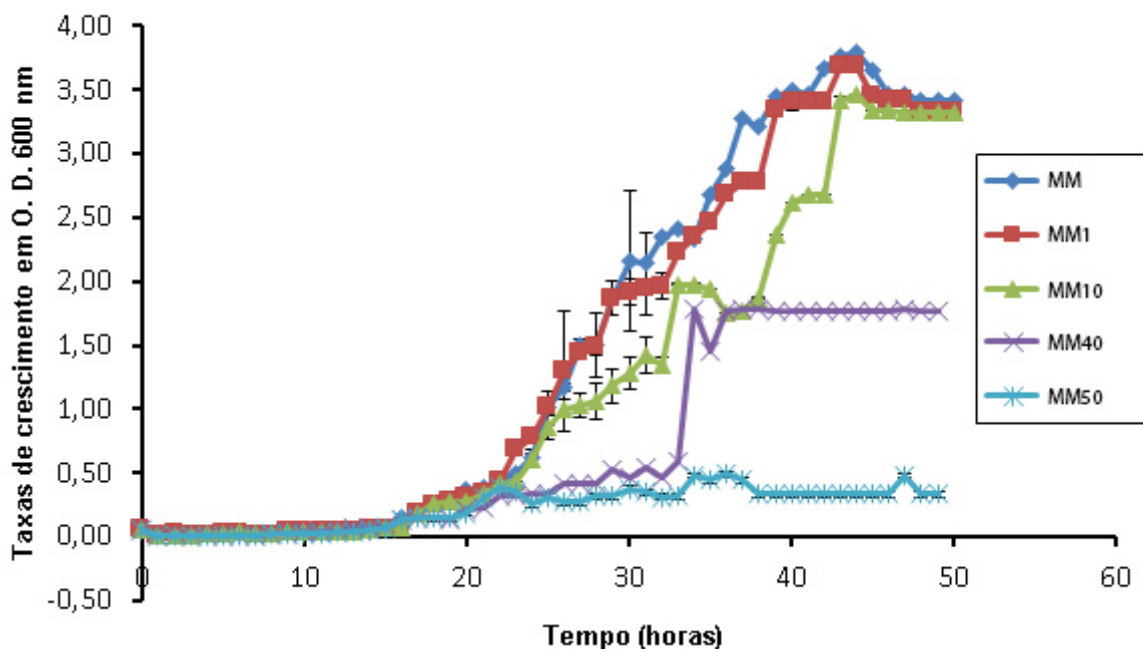


Figura 2 - Curva de crescimento bacteriano (O.D em 600 nm) em linhagens de *Pseudomonaveronii*, nos tratamento com MM (controle) MM1, MM10, MM40 e MM50 a concentração do glifosato durante 40h.

O ambiente onde a linhagem foi isolada possui várias substâncias tóxicas, inseticidas, fungicidas e herbicidas incluindo o glifosato, desta forma deve ter selecionado microrganismos com capacidade de tolerância, como a *P. veronii*.

De acordo com ORTIZ-HERNANDEZ et al (2013), os microrganismos presentes em ambientes aquáticos podem sofrer uma pressão seletiva quando ficam em contato com herbicidas, processo semelhante aos microrganismos presentes no solo. Quando estes microrganismos ficam expostos em condições com pouco nutrientes ou na presença de compostos tóxicos, rapidamente precisam se adaptar para sobreviverem (SCHIMEL et al., 2007).

Estudos de FITZGIBBON (1990) mostram que o glifosato foi capaz de inibir o crescimento de uma grande variedade de procariontes e organismos eucarióticos, contudo *Pseudomonas* ssp. linhagem PG2982, foi capaz de crescer em concentrações de glifosato superiores 100 mM enquanto que o crescimento de *E. coli* foi inibido em 5 mM não tolerando o herbicida (SCHULZ, 1984). JACOB et al (1988) descreve em seu trabalho que a *Pseudomonas* sp. linhagem LBR, degradou o glifosato utilizando fósforo como fonte de nutriente eliminando assim o fator tóxico que poderia inibir o crescimento.

4.3.2 Viabilidade Celular

A viabilidade celular é caracterizada pela quantidade de células viáveis em um momento estabelecido (Fig.3), a viabilidade é um indicador de estresse oxidativo, na fase inicial ou mediana da *log* 20h e 30h a viabilidade das concentrações comparando com o controle são menores, sugerindo o efeito tóxico do glifosato sobre as células bacterianas. A viabilidade celular na concentração de MM10x em 20h e 30h foi maior que em MM1x, correspondendo com a curva de crescimento (Fig. 2), na fase tardia da *log*, os níveis de viabilidade são equivalentes ao controle e em tratamentos, provavelmente vinculado ao estresse neste ponto do crescimento bacteriano próximo da fase final da *log*.

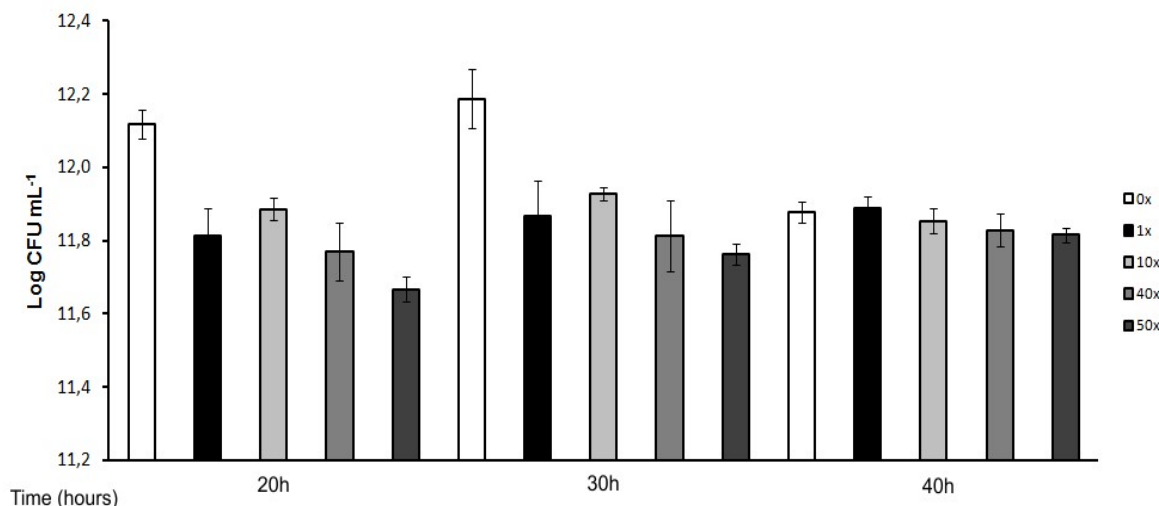


Figura 3 - Viabilidade celular em linhagens de *Pseudomonas veronii* nos tratamentos MM controle MM1, MM10, MM40 e MM50 a concentração do glifosato, nos tempos 20h, 30h e 40h.

Os microrganismos quando ficam expostos a ambientes estressantes, na presença de compostos tóxicos, necessitam de mudanças nos processos celulares para sobreviver, que incluem sistemas fisiológicos e estruturais de tolerância (TIRONI et al., 2009).

Apesar das taxas de viabilidade indicarem que o glifosato é tóxico para *P. veronii* a partir da concentração MM1(Fig.3), as taxas de crescimento mostram uma boa tolerância a um nível de concentração de glifosato de MM10, e uma tolerância menor mais considerável a MM40. As células bacterianas possuem mecanismos complexos, que podem aumentar o seu potencial para sobreviver em contato a diferentes condições de estresse, nas quais as enzimas antioxidantes podem ter um papel fundamental (ERMAKOVA et al., 2010).

4.3.3 Quantificação do Peróxido de Hidrogênio

O estresse oxidativo se caracteriza pela produção de radicais livres, sem o controle efetivo por sistemas enzimáticos e não enzimáticos, podendo causar danos celulares. O H_2O_2 é uma espécie reativa do oxigênio extremamente deletério, é capaz de atravessar camadas lipídicas e pode reagir com a membrana e com proteínas ligadas ao Fe, sendo altamente tóxico para as células quando a sua produção é elevada (COLAS et al., 2012).

Os nossos resultados demonstram comportamentos diferentes entre controle e tratamento, ao longo das fases de crescimento. O controle apresenta uma

produção relativamente baixa de H_2O_2 no início da fase *log* 20h, a concentração de MM1x foi significativo comparado com o controle $p < 0,036$ (Anexo 1 seção 1,2), com aumentos, significativos a partir da *log* intermediária 30h, nas concentrações de MM40 em relação a concentração de MM1 $p < 0,040$ (Anexo 1 seção 1,3). As taxas de H_2O_2 (Fig.4) apesar de variáveis apresentam tendências de aumento já na fase *log* inicial, estas taxas não terão o mesmo efeito sobre as taxas de crescimento, como já mencionado. Portanto, os mecanismos antioxidativos devem ter tido papéis diferenciados, de acordo com a concentração de glifosato utilizado nos tratamentos.

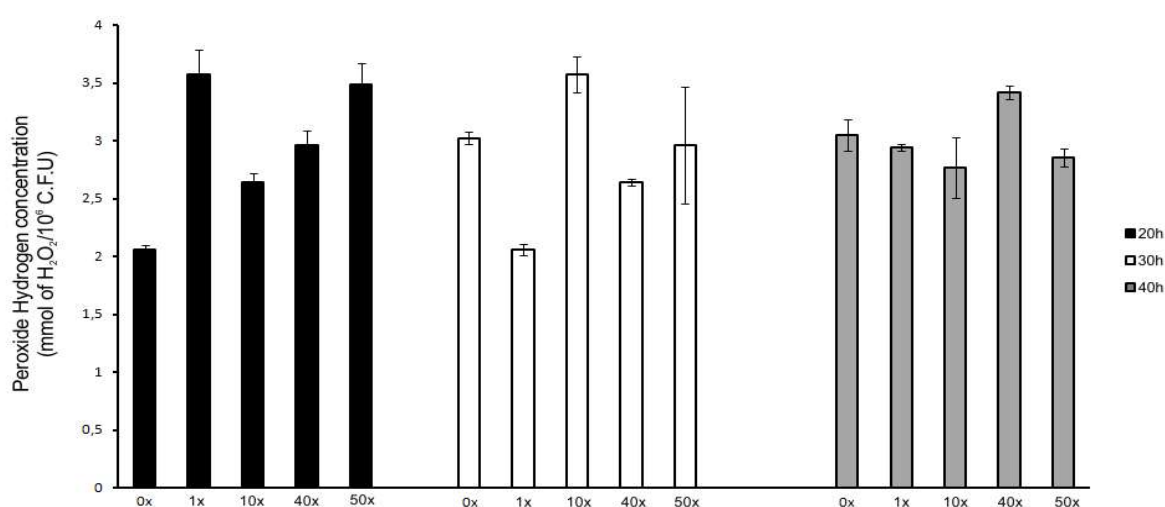


Figura 4 - Quantificação de Peróxido de Hidrogênio em linhagens de *Pseudomonas veroniinos* tratamentos com MM (controle) MM1, MM10, MM40 e MM50 a concentração do glifosato em 20h, 30h e 40h.

4.3.4 Quantificação de MDA

Altas taxas de H_2O_2 , geralmente encontrados em organismos que estão em contato com contaminantes, podem provocar danos na membrana devido à reação com os ácidos graxos insaturados, liberando produtos tóxicos, como o MDA (ORTIZ-HERNANDEZ et al., 2013). Portanto esta substância é considerada outro indicador de estresse oxidativo (ZHANG et al, 2012). Em controle as taxas de MDA (Fig.5) que tem correspondência com as taxas de H_2O_2 (Fig.4) e com possíveis níveis de peroxidação lipídica.

Contudo observou-se uma maior variação de taxas de MDA em relação aos tratamentos com glifosato. No tratamento MM10 na fase *log* intermediária 30h foi encontrada a maior taxa de MDA (Fig.5) sendo significativo comparando com o

controle e MM1 $p < 0,001$ (Anexo 2 seção 2,5) sendo correspondente com as taxas de H_2O_2 observadas.

Os dados mais contrastantes foram observados nas concentrações MM40 e MM50, na fase final da *log* 40h a concentração MM40 foi significativo comparando com o controle $p < 0,006$ (Anexo 2 seção 2,8) e significativo quando comparada a concentração de MM10 $p < 0,029$ (Anexo 2 seção 2,8), em MM50 foi significativo comparado com MM1 e MM10 $p < 0,001$ (Anexo 2 seção 2,8). Porém as altas taxas de H_2O_2 nestes tratamentos (Fig 4) não se traduziram em altas taxas de MDA (Fig.5).

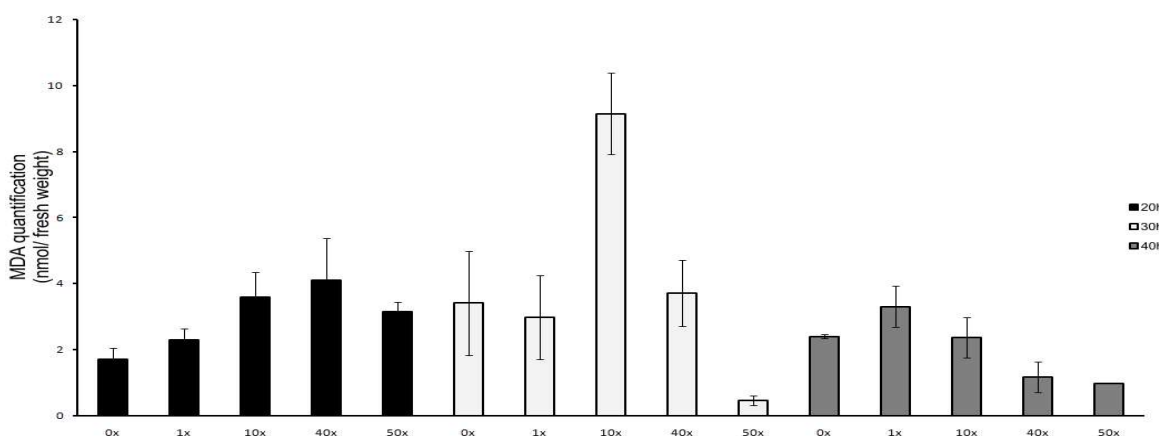


Figura 5 - Quantificação de MDA em linhagens de *Pseudomonas veronii* tratamentos MM (controle) e MM1, MM10, MM40 e MM50 concentração do glifosato nos tempos de 20h, 30h e 40h.

Balague et al (2001) mostraram que houve uma diminuição de lipídios insaturados na membrana plasmática de *E. coli* HB101, após tratamento com ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) herbicida, estes autores consideraram a redução da fluidez da membrana como um possível mecanismo de defesa contra os danos celulares. Além disso, SANCHEZ et al., (2005) relataram que um aumento do nível de saturação dos lipídios da membrana em *Klebsiella Planticola* DSS permitiu o crescimento num meio de cultura com o herbicida simazina. Portanto, as taxas de MDA observadas em relação às maiores concentrações de glifosato podem refletir uma mudança na permeabilidade da membrana de *P. veronii* em resposta à este nível tóxico, por meio de alterações na saturação de lipídeos, o que vai interferir com o nível de MDA produzido, o qual é dependente de insaturações para ser produzido. No funcionamento biológico a ativação do O_2 pode ser por meio da redução de

O_2 formando o radical O_2^- , seguido do H_2O_2 e finaliza com radical OH, em diversas condições ambientais (GRATÃO et al., 2012).

4.3.5 Enzimas no processo antioxidante de defesa ao glifosato

A SOD é uma enzima que catalisa a dismutação do O_2^- a H_2O_2 e O_2 . Podem ser compostas de isoenzimas com diferentes cofatores metálicos como cobre, ferro, zinco e manganês (SCANDALIOS et al., 1990).

As isoformas de SOD em *P. veronii*, foram caracterizadas nos três tempos da *log* estabelecidas e sem a presença do herbicida (Fig.6) foi identificada uma Mn-SOD. Segundo os dados obtidos em PAGE nos tempos de 20h, 30h e 40h a atividade predominante foi a Mn-SOD, elas situam-se no citoplasma, são reguladas de acordo com a quantidade de ferro e estão relacionadas ao processo de desintoxicação de herbicidas, sendo que provavelmente a Mn-SOD corresponde ao aumento no nível do radical O_2^- e atua no processo de desintoxicação de produtos tóxicos como os herbicidas em vários organismos (RODRIGUES, et al, 2010).

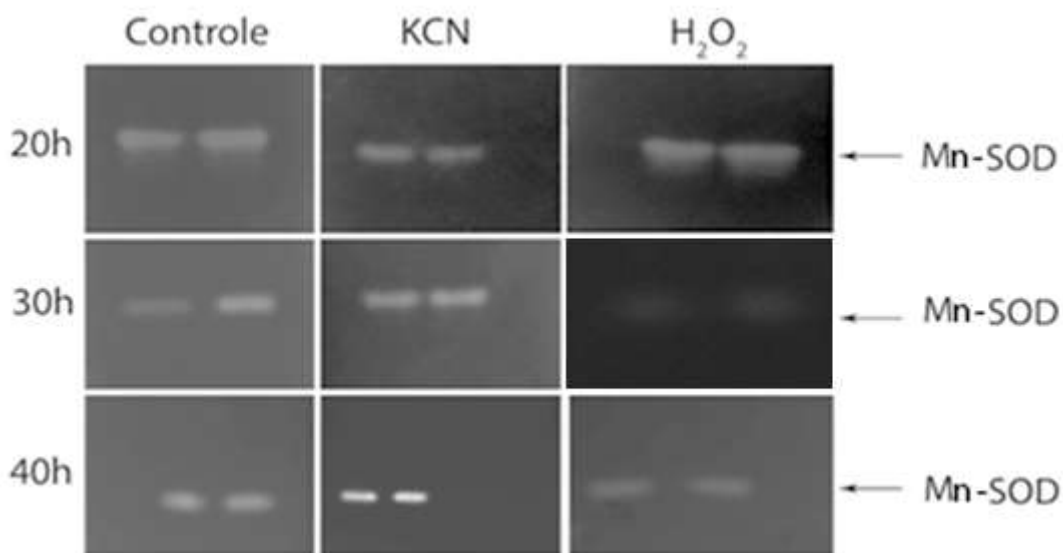


Figura 6 - Géis de isoformas de SOD-Mg, em diferentes tempos e tratamentos.

No tratamento MM50, não foi determinada a atividade de nenhuma isoforma tanto em 20h quanto em 40h. Consideramos que esta concentração de glifosato (Fig.4) foi muito tóxica e interferiu com a atividade desta enzima.

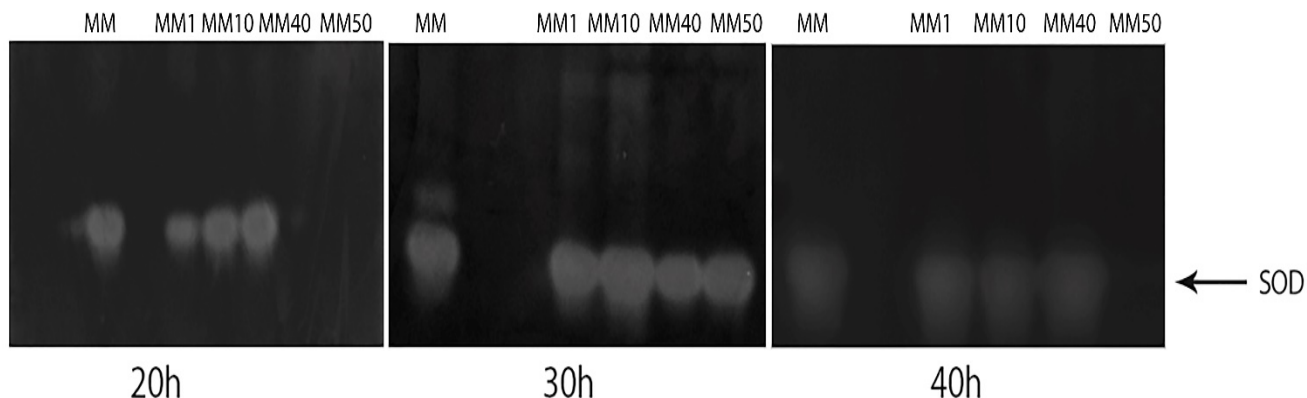


Figura 7 - Atividade em gel de SOD nos tempos de 20h, 30h e 40h.

As ERO podem causar muitos danos às células, se não tiver uma atuação efetiva da SOD. Com sua atividade diminuída tem-se uma menor expectativa nas taxas de crescimento como em *P. aeruginosa* (RODRIGUES, 2010). E em nosso trabalho (Fig.2). A atividade de CAT e SOD são fundamentais na manutenção do mecanismo de tolerância a herbicidas (OLCHANHESKI, 2014).

4.3.6 Catalase

A CAT é uma enzima importante na defesa celular, pois impede a formação de $\text{OH}^\cdot$ convertendo a molécula do H_2O_2 em água e O_2 , existem dois tipos de catalases as monofuncionais e as peroxidases, que diferem pelas sequências de aminoácidos e propriedades enzimáticas. As monofuncionais são mais comuns nos eucariotos, já as peroxidases somente em bactérias (MARTINS., 2011).

A CAT pode apresentar duas isoformas principais: HPI que é encontrada no espaço periplasmático, HP II encontrada no citoplasma bacteriano (HEIMBERGER e EISENSTARK, 1988). O mecanismo por meio do qual a HP II confere proteção é desconhecido, embora possivelmente participe dos processos de eliminação do H_2O_2 (JUNG e KIM, 2003).

As duas isoformas encontradas em *P. veronii*. Ambas isoformas apresentaram atividade em controle, com a HPI sendo observada em todas as fases da *log*, mas com o pico em 30h provavelmente respondendo a demanda produzida pela SOD (Fig.7).

Na presença de glifosato ambas as isoformas apresentaram altas atividades nos tratamentos MM1 e MM10, porém muito baixas em MM40 e MM50. Consideramos estes resultados fundamentais para explicar as taxas de H_2O_2

gerados nos tratamentos com estas concentrações de glifosato (Fig.4) e as consequências para o crescimento desta linhagem bacteriana (Fig.2).

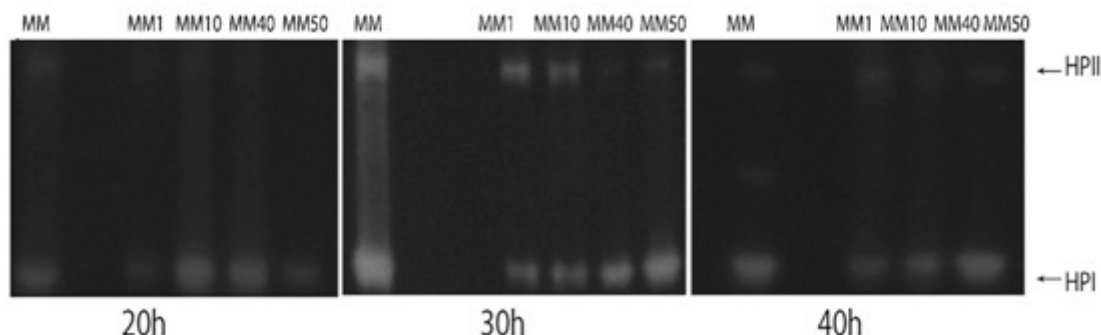


Figura 8 - Atividade em gel catalase em diferentes concentrações do glifosato e em diferentes tempos 20h 30h e 40h.

Neste trabalho consideramos que as duas isoformas de CAT foram fundamentais para diminuir o estresse oxidativo gerado pelo glifosato até o tratamento MM10. A atividade de CAT aumenta como um mecanismo antioxidante na tolerância ao glifosato. Em *Escherichia coli* submetida ao tratamento com glifosato o H_2O_2 é removido pelas duas isoformas de CAT. Neste caso a HPII tem sua atividade induzida na fase final do seu crescimento (COBISCOL et al., 2000). Diferentemente do que foi observado em *P. veronii* no tempo de 40h.

4.4 CONCLUSÕES

A linhagem identificada como *Pseudomonas veronii*, isolada em água contaminada com diferentes herbicidas considerados tóxicos, apresentou diferentes respostas ao estresse oxidativo em contato com o glifosato, com atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, combatendo as altas taxas produzidas pelo peróxido e menores níveis de MDA, a SOD produziu mais peróxido na concentração de MM10, não sofrendo estresse nesta concentração, quando aumentada para MM40 e MM50 a linhagem teve seu crescimento afetado, mas seu sistema de resposta conseguiu responder esse estresse causado pelo herbicida, fazendo com que essa linhagem tolerasse alta concentração do glifosato.

5. REFERÊNCIAS

ARMAS, E.D.D.; MONTEIRO, R.T.R.; ANTUNES, P.M.; SANTOS, M.A.P.F.D.; CAMARGO, P.B.D.; ABAKERLI, R.B. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. **Quím Nova**, v. 30, p. 1119-1127, 2007.

AZEVEDO, R.A.; ALAS,R.M.,; SMIRT, 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, E.; MARIA, A. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide on *Escherichia coli* growth, chemical composition, and cellular envelope. **Environmental Toxicology**,v.16, n.1, p. 43-53. 2001.

BHAT, V. S.; BOOTH, C.S; VANTOMME, N.A.E.; AFROI. S; YOST, K. C; DAHMS,S.E.T. Oxidative stress and metabolic perturbations in *Escherichia coli* exposed to sublethal levels of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.**Chemosphere**, 2015.

BLAND, J. M. & ALTMAN, D.G. Multiple significances test: the Bonferroni method. *British Medical Journal*, n. 310:170, 21, jan. 1995.

BOHM, G. M. V.; ROMBALDI, C. V.; Genetic transformation and the use glyphosate on soil microbial, biological nitrogen fixation, quality and safety of genetically modified soybean. **Cienc. Rural**, 40. 213–221, 2010.

BRADFORD, M. M. Bradford a rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72:248–254, 1976.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J, ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **IntMicrobiol**. 2000.

CHOI, C. J.; BERGES, J. A.; Young, E.B.; Rapid effects of diverse toxic water pollutants on chlorophyll a fluorescence: variable responses among freshwater microalgae. **Water Research**, 46, 2615–2626, 2012.

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

DeLORENZO, E.M, Geoffrey I. Scott, P. E. Ross. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2001.

DICKSON, J. W.; SCOTT, R. C.; BURGOS, N. R.; SALAS, R. A and SMITH, K. L. Confirmation of glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. multiflorum) in Arkansas. **Weed Technol**, 25:674–679 2011.

ERMAKOVA, I.T.; KISELAVA, N.I.; SHUSHKOVA, T.; ZHARIKOV, M.; ZHARIKOV, G. A.; LEONTIEVSKY, A. A. Bioremediation of glyphosate-contaminated soils. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 88, 585–594, 2010.

FITZGIBBON, E.J; BRAYMER, D.H. Cloning of a Gene from *Pseudomonas* sp. Strain PG2982 Conferring Increased Glyphosate Resistance Department of Microbiology, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana 70803 **Environmental Microbiology**, Received 9 April 1990/Accepted 22 August 1990.

GOMES, P. M.; SMEDBOL, E.; CHALIFOUR, A.; ETHIER, H.L, LABRECQUE, M.; LEPAGE, L.; LUCOTTE, M.; JUNEAU, J.P. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 65, No. 17, pp. 4691–4703, 2014.

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

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

HEIMBERGER, A, EISENSTARK, A. Compartmentalization of catalases in *Escherichia coli*. **Biochem Biophys Res Commun**. Jul 15;154(1): 392-7. 1988.

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

JACOB, G.S; GARBOW, R.J; HALLAS, E.L; KIMACK, M.N; KISHORE, M.G; AND SCHAEFER, J. Metabolism of Glyphosate in *Pseudomonas* sp. Strain LBr Physical Sciences Centre' and Monsanto. **American Society for Microbiology**, p. 2953-2958, 1988.

JUNG L. I.; KIM I. G. Transcription of *ahpC*, *katG*, and *katE* genes in *Escherichia coli* is regulated by polyamine-deficient mutant sensitive to H₂O₂ induced oxidative damage., *Biological and Biophysical Research Communications*, n. 301, p. 915-922, **Elsevier**, 2003.

KNAUERT, S.; SINGER, H.; HOLLENDER, J.; KNAUER, K. Phytotoxicity of atrazine, isoproturon, and diuron to submersed macrophytes in outdoor mesocosms. **Environ Poll**, v. 158, p. 167-174, 2010.

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

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

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

MOLDES, C.; CAMINA, C.; MEDICI, L.; TSAI, S.; R. Azevedo. Physiological effects of glyphosate over amino acid profile in conventional and transgenic soybean (*Glycine max*). **Pest. Biochem. Physiol**, 102, pp. 134–141, 2012.

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

ORTIZ-HERNANDEZ, M. L.; SANCHEZ-SALINAS, E.; DANTAN-GONZALES, E.; CASTREJON-GODINEZ, M. L. Mechanisms, Genetics and Strategies to Enhance the Process, **Pesticide Biodegradation**, 2013.

PRASAD, B. B.; JAUHARI, D.; TIWARI, P. M.; Doubly imprinted polymer nanofilm-modified electrochemical sensor for ultra-trace simultaneous analysis of glyphosate and glufosinate. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 59, 2014.

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

RUUS, A.; GREEN, N. W.; MAAGE, A.; AMUNDSEN, C. E.; SCHOYEN, M.; SKEI, J. Post World War II orcharding creates present day DDT-problems in the Sørkjøl (Western Norway) - A case study. **Marine Poll Bull**, v. 60, p. 1856-1861, 2010.

RYAN, K. C.; JHONSON, 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.

SANCHEZ, M.; GARBI,C.; MARTINEZ-ALVAREZ,R.; ORTIZ,L.T.; ALLENDE, J.L.; MARTIN. *Klebsiellaplanticolasatrain* DSZ mineralizes simazine: physiological adaptations involved in the process. **Applied of Microbiology and Biotechnology**,2005.

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

SCANDALIOS, J.G. Regulation and properties of plant catalases. Zn C Foyer, P Mullineaux, eds, Photooxidative Stress in Plants. CRC Press, Boca Raton, FL (in press), 1993.

SCANDÁLIOS. J.G. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Adv Genet* 28: 1-41(1990).

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

SCHULTZ. A. D. S; AMRHEIN.N. Insensitivity of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase to glyphosate confers resistance to this herbicide in a strain of *Aerobacteraerogenes*. **Arch. Microbiol**,137:121-123, 1984.

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

TSAI, W. A. Review on environmental exposure and health risks of herbicidparaquat.**Toxicology Environmental Chemistry**, v.95, n.2, p.197-206, 2013.

VAN, S. D.R.; J.W. ROY.; S, J. BROWN.; G, BICKERTON.Residues of the herbicide glyphosate in riparian groundwater in urban catchments.**Chemosphere**, 2014.

VERCRAENE, E. M.; LAUGA, B.; SAINT, S.L.; MAZZELLA, N.; BOUTRY, S.; SIMON, M.; KARAMA, S.; DELMAS, F.; DURAN, R. Diuron biotransformation and its effects on biofilm bacterial community structure.**Chemosphere**, v. 81, p. 837-843, 2010.

WEBSTER.U.M.T; LAING.V.L; FLORANCE.H; SANTOS.M.E. Effects of Glyphosate and its Formulation, Roundup, on Reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*).**American Chemical Society**,2013.

WITTMER, I.K.; BADER, H.P.; SCHEIDEGGER, R.; SINGER, H.; LNCK, A.; HANKE, I.; CARLSSON, C.; STAMM, C. Significance of urban and agricultural land use for

biocide and pesticide dynamics in surface waters. **Water Res**, v. 44, p. 2850-2862, 2010.

ZABALOY.C.M; GOMEZ.E; GARLAND.L.J; GOMES.A.M. Assessment of microbial community function and structure in soil microcosms exposed to glyphosate. **Applied Soil Ecology**, 2011.

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

ANEXO 1

Análise Peróxido

Seção 1: 20hr sconc, bonferroni meansst

```

              |Summaryof 20 horas
Cod conc |      MeanStd. Dev.
-----+-----
0 |    2.2833334    .48618071 |    3.1761111    .7143061910 |2.8074444
.48150108
      40 |3.2923334    .74547469 50 |3.7063333    .58655478
-----+-----
      Total |3.0531111    .75968756

```

1.1: Analysis of Variance

```

Source              SS              df              MS              F              Prob> F
-----+-----
-----
Between groups      10.3676893              42.59192232              6.90              0.0003
Within groups       15.0258192              40              .375645481
-----+-----
-----
      Total          25.3935085              44              .577125194

```

Seção 1.2: Comparison of 20 horas by conc

(Bonferroni)

```

Row Mean-|
Col Mean |          0          1          10          40
-----+-----

```

```

1 |      .892778
    |      0.036
    |
10 |      .524111    -.368667
    |      0.772      1.000
    |
40 |      1.009      .116222    .484889
    |      0.012 1.000      1.000
    |
50 |      1.423      .530222    .898889    .414
|      0.0000.739      0.034      1.000

```

Seção 1.3: 30hrs conc, bonferroni meansst

```

      |Summary of 30 horas
Cod conc |      Mean Std. Dev.
-----+-----
0 |    3.0208889    .39745047
1 |    3.7385556    .88711123
      |
      10 |3.1566667    .44777452
      40 |2.5808889    .5376224
      50 |3.0984444    1.339601
      |
-----+-----
      Total |3.1190889    .8527489

```

Seção 1.4: Analysis of Variance

Source	SS	df	MS	F	Prob> F
Between groups	6.16391818	41.54097955	2.39	0.0672	

Within groups	25.8320318	40	.645800795
---------------	------------	----	------------

Total	31.99595	44	.727180681
-------	----------	----	------------

Seção 1.5: Comparison of 30 horas by conc

(Bonferroni)

Row Mean-|

Col Mean	0	1	10	40
----------	---	---	----	----

-----+-----

1	.717667
---	---------

	0.654
--	-------

--

10	.135778	-.581889
----	---------	----------

	1.000	1.000
--	-------	-------

--

40	-.44	-1.15767	-.575778
----	------	----------	----------

	1.000	0.040	1.000
--	-------	--------------	-------

--

50	.077556	-.640111	-.058222	.517556
----	---------	----------	----------	---------

	1.000	0.989	1.000	1.000
--	-------	-------	-------	-------

Seção 1.6:40hrs conc, bonferroni meansst

|Summary of 40 horas

Cod conc	Mean Std. Dev.
----------	----------------

-----+-----

0	3.1435555	.38956324
---	-----------	-----------

1	3.0337778	.37080581
---	-----------	-----------

10	3.0661111	.67446637
----	-----------	-----------

40 | 3.1955556 .51282236

50 | 3.1823334 .70923271

-----+-----

Total | 3.1242667 .52796434

Seção 1.7: Analysis of Variance

Source	SS	df	MS	F	Prob> F
--------	----	----	----	---	---------

Between groups	.183566044	4	.045891511	0.15	
----------------	------------	---	------------	------	--

Within groups	12.0812733	40	.302031832		
---------------	------------	----	------------	--	--

Total	12.2648393	44	.278746348		
-------	------------	----	------------	--	--

Seção 1.8: Comparison of 40 horas byconc

(Bonferroni)

Row Mean-

Col Mean	0	1	10	40
----------	---	---	----	----

-----+-----

1 | -.109778

| 1.000

|

10 | -.077444 .032333

| 1.000 1.000

|

40 | .052 .161778 .129445

| 1.000 1.000 1.000

|

50	.038778	.148556	.116222	-.013222
	1.000	1.000	1.000	1.000

ANEXO 2

Análise MDA

Seção 2: Mda 20horas cod mda, bonferroni meansst

Summary of mda20 horas		
Cod mda	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
0	.011	.00404969
1	.01233333	.00458984
10	.01783333	.0162532
40	.0265	.02230471
50	.02033333	.00294392
-----+-----		
Total	.0176	.01311383

Seção 2.1: Analysis of Variance

Source	SS	df	MS	F	Prob> F

Between groups	.0009482	4	.00023705	1.47	
0.2419					
Within groups	.004039	25	.00016156		

Total	.0049872	29	.000171972		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(4) = 26.0822$ Prob> $\chi^2 = 0.000$

Seção 2.2: Comparison of mda20 horas by cod mda

(Bonferroni)

Row Mean-

Col Mean | 0 1 10 40

-----+-----

1		.001333			
		1.000			
10		.006833	.0055		
		1.000	1.000		
40		.0155	.014167	.008667	
		0.448	0.650	1.000	
50		.009333	.008	.0025	-.006167
		1.000	1.000	1.000	1.000

Seção 2.3: Mda 30horas cod mda, bonferroni meansst

| Summary of mda30 horas

Cod mda | Mean Std. Dev.

-----+-----

0		.022	.01428286
1		.021	.01738965
10		.059	.01378405

40	.017	.01334166
50	.00683333	.00738693
-----+-----		
Total	.02516667	.02204554

Seção 2.4: Analysis of Variance

Source	SS	df	MS	F	Prob> F

Between groups	.009449334	4	.002362333	12.71	0.0000
Within groups	.004644833	25	.000185793		

Total	.014094167	29	.000486006		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(4) = 3.0790$ Prob> $\chi^2 = 0.545$

Seção 2.5: Comparison of mda30 horas by cod mda (Bonferroni)

Row Mean-				
Col Mean	0	1	10	40
-----+-----				
1	-.001			
		1.000		
10	.037	.038		
		0.001	0.001	

40		-.005	-.004	-.042
		1.000	1.000	0.000
50		-.015167	-.014167	-.052167
		0.654	0.839	0.000
				1.000

Seção 2.6: Mda40horas cod mda, bonferroni meansst

Summary of mda40 horas		
Cod mda	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
0	.017	.00189737
1	.02133333	.00640833
10	.01533333	.00621825
40	.00683333	.00318852
50	.003	.00244949
-----+-----		
Total	.0127	.00802646

Seção 2.7: Analysis of Variance

Source	SS	df	MS	F	Prob> F

Between groups	.0013708	4	.0003427	17.22	0.0000
Within groups	.0004975	25	.0000199		

Total	.0018683	29	.000064424		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(4) = 10.1464$ Prob> $\chi^2 = 0.038$

Seção 2.8: Comparison of mda40 horas by cod mda

(Bonferroni)

Row Mean-

Col Mean | 0 1 10 40

-----+-----

1		.004333			
		1.000			
10		-.001667	-.006		
		1.000	0.282		
40		-.010167	-.0145	-.0085	
		0.006	0.000	0.029	
50		-.014	-.018333	-.012333	-.003833
		0.000	0.000	0.001	1.000

