Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Estudo da resposta antioxidativa de linhagens bacterianas na presença do herbicida
Acetochlor

Giselle de Carvalho

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre
em Agronomia. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2007

Giselle de Carvalho
Bióloga

Estudo da resposta antioxidativa de linhagens bacterianas na presença do
herbicida Acetochlor

Orientador:

Prof. Dr. RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre
em Agronomia. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Carvalho, Giselle de

Estudo da resposta antioxidativa de linhagens bacterianas na presença do herbicida
Acetochlor / Giselle de Carvalho. - - Piracicaba, 2007.
68 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Bactéria – metabolismo 2. Estresse oxidativo 3. Herbicidas – toxicidade I. Título

CDD 589.9

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*Aos meus pais, Amauri e Maria Dirlei,
As minhas irmãs, Elaine e Mariana,
Ao meu afilhado Rafael,
que jamais mediram esforços
para que eu chegasse até aqui*
DEDICO

*Ao meu querido Endson,
por todo incentivo,
amor, paciência, ajuda e
companheirismo,
fundamentais para essa conquista*
OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por me permitir acordar todos os dias e me dar forças para realizar todas as minhas atividades;

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, pela grande oportunidade, confiança e apoio;

Em especial a Paula, por toda nossa história, o companheirismo, a paciência, a amizade, a força, por todos os passos que demos juntas desde o início do desenvolvimento desse trabalho, por todas as vitórias que juntas conquistamos;

A Salete, pelas sugestões e contribuições no trabalho, e pelos momentos em que me deu atenção quando precisei;

Ao Prof. Dr. Marcos Pileggi, pelo incentivo, apoio e contribuições desde o início do desenvolvimento deste trabalho;

Ao Carlinhos, pela amizade e presença;

Aos amigos do Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas: Bertha, Carla, Carol, Fabrício, Flávia, Lú, Renata, Vanderlei pela convivência e apoio e ao Léo pelas discussões sobre o trabalho e ajuda na análise estatística;

A Pri, pelo apoio, atenção e amizade dedicados a mim e ao trabalho desde o seu princípio;

Aos amigos e colegas: Camila, Hanai, Fátima, Michelle, Marise, Lucélia, Rafa e ao pessoal do vôlei, pelos momentos de confraternização;

As amigas: Fran, Geisa, Gisinha, Leda, Lizi e Rê, que mesmo distantes sempre me incentivaram de alguma forma;

Aos professores e funcionários do Programa;

A ESALQ e ao Departamento de Genética, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado e pela estrutura oferecida;

Ao CNPq e a FAPESP pela concessão das bolsas de estudo;

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	07
ABSTRACT	08
1 INTRODUÇÃO.....	09
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 Poluentes ambientais	10
2.2 Caracterização do herbicida Acetochlor.....	11
2.3 Dados de contaminação e toxicidade do herbicida Acetochlor.....	12
2.4 Sistema antioxidante.....	14
2.4.1 Sistema antioxidante em bactérias.....	16
2.4.1.1 Catalase (CAT).....	18
2.4.1.2 Superóxido Dismutase (SOD)	19
2.4.1.3 Glutathione Redutase (GR)	20
2.4.1.4 Glutathione S-Transferase (GST).....	21
2.5 Biodegradação de herbicidas e biorremediação	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Material Biológico.....	24
3.2 Meios de cultura	24
3.2.1 Meio caldo nutriente.....	24
3.2.2 Meio ágar nutriente.....	25
3.3 Identificação das bactérias.....	25
3.3.1 Extração do DNA bacteriano.....	25
3.3.2 Amplificação do gene 16S rDNA.....	26
3.3.3 Purificação dos produtos de PCR	27
3.3.4 Sequenciamento do gene 16S rDNA	27
3.4 Experimento básico	28
3.5 Extração de proteínas	28
3.6 Determinação de proteínas	29
3.7 SDS-PAGE.....	29
3.8 Peroxidação lipídica	30
3.9 Atividade das enzimas antioxidantes.....	30

3.9.1 Atividade da CAT.....	30
3.9.1.1 Atividade em espectrofotômetro	31
3.9.1.2 Atividade em PAGE	31
3.9.2 Atividade da SOD.....	32
3.9.2.1 Atividade em PAGE	32
3.9.2.2 Determinação das isoformas de SOD.....	32
3.9.3 Atividade da GR	33
3.9.3.1 Atividade em espectrofotômetro	33
3.9.3.2 Atividade em PAGE	33
3.9.4 Atividade da GST	34
3.9.4.1 Atividade em espectrofotômetro	34
3.10 Análise densitométrica dos géis de atividade enzimática (PAGE)	34
3.11 Delineamento experimental.....	35
4 RESULTADOS	36
4.1 Identificação das linhagens bacterianas.....	36
4.2 Crescimento das linhagens em meio de cultivo	36
4.3 Proteínas	37
4.3.1 Quantificação de proteínas em espectrofotômetro	37
4.3.2 Perfil protéico em SDS-PAGE	39
4.4 Peroxidação lipídica	40
4.4.1 Quantificação do malonaldeído (MDA) em espectrofotômetro.....	40
4.5 Atividade das enzimas antioxidantes.....	41
4.5.1 Atividade da CAT em espectrofotômetro e em PAGE	41
4.5.2 Atividade da SOD em PAGE	44
4.5.3 Atividade da GR em espectrofotômetro e em PAGE.....	46
4.5.4 Atividade da GST em espectrofotômetro	49
5 DISCUSSÃO.....	52
6 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61

RESUMO

Estudo da resposta antioxidativa de linhagens bacterianas na presença do herbicida Acetochlor

Atualmente existe uma grande preocupação com relação aos efeitos a curto e longo prazo que muitos herbicidas podem ter sobre a saúde pública e o meio ambiente. Estes podem causar sérios danos ao metabolismo celular, levando geralmente a inibição do crescimento em microrganismos. Em exposição a herbicidas, esses microrganismos aumentam significativamente a geração de EAOs (Espécies Ativas de Oxigênio), causando estado de estresse oxidativo. O objetivo desse trabalho foi estudar a relação entre o efeito do herbicida acetochlor e a resposta do sistema antioxidante. Três linhagens de *Klebsiella oxytoca* foram submetidas ao crescimento em meio nutritivo com este herbicida nas concentrações de 0, 62 e 620 mM. O perfil protéico foi avaliado em SDS-PAGE, o qual revelou diferenças de intensidade das bandas, bem como a presença e ausência das mesmas em meio com herbicida. O herbicida causou estresse oxidativo nas três linhagens, o qual foi avaliado através da peroxidação de lipídeos, observado principalmente na concentração de 620 mM. As atividades da Catalase (CAT) e Superóxido Dismutase (SOD) foram altas para as três linhagens na concentração de 62 mM seguida de queda em 620 mM. Para a atividade da Glutathione Redutase (GR) foi observado decréscimo gradativo da atividade com o respectivo aumento da concentração de herbicida para as três linhagens. Porém para a atividade da Glutathione-S-transferase (GST), as três linhagens apresentaram comportamento diferencial para os mesmos tratamentos. O estudo da resposta antioxidativa de microrganismos na presença de xenobióticos são importantes para a compreensão de mecanismos de tolerância, biodegradação bem como para aplicação na biorremediação de ambientes contaminados.

Palavras-chave: Acetochlor, Herbicida, Bactéria, Estresse oxidativo, Enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

Study of the response antioxidative of bacterial strains in the presence of herbicide Acetochlor

Currently there is a great concern with respect to short and long term effects that many herbicides may cause on public health and the environment. They may seriously damage the cellular metabolism, generally leading to inhibition of the microbial growth. With the exposure to herbicides, these microorganisms significantly increase the generation of EAOs (Active Oxygen Species), generating a state of oxidative stress. The aim of this work was to study the effect of acetochlor herbicide in the response of antioxidant system. Three strains of the bacteria *Klebsiella oxytoca* were grown in a nutritional media containing the herbicide in concentrations of 0, 62 and 620 mM. The protein profile was evaluated in SDS-PAGE, which showed differences in the intensity of the bands, as well as the presence and absence in the media with herbicide. The oxidative stress was evaluated through the lipid peroxidation, and herbicide caused stress in all the three strains, mainly at the concentration of 620 mM. The activities of Catalase (CAT) and Superoxide Dismutase (SOD) were higher for the three strains in the concentration of 62 mM followed by a decrease at the concentration of 620 mM. For Glutathione Reductase (GR) it was observed a gradual reduction in its activity with the increase of herbicide concentration for all the three strains. However, in the case of Glutathione-S-transferase (GST) activity, the three strains showed differential behavior for the same treatments. The study of the antioxidative response of microorganisms in the presence of xenobiotics is important for the understanding of tolerance mechanisms, biodegradation as well as for application in the bioremediation of contaminated environments.

Keywords: Acetochlor, Herbicide, Bacteria, Oxidative stress, Antioxidative enzymes.

1. INTRODUÇÃO

O estudo dos pesticidas é de grande importância devido aos seus efeitos tóxicos ao homem e outros seres vivos, associados à exaustiva utilização destes na agricultura. Com a modernização da agricultura nos anos 60, observou-se o uso massivo de agroquímicos, fertilizantes e maquinaria para o aumento da produtividade. O objetivo foi alcançado, embora o uso intensivo e abusivo destas substâncias acarretou em diversos danos. Os resíduos dos pesticidas no solo podem causar injúrias a plantas sensíveis em um sistema de rotação de culturas, serem absorvidos por culturas subseqüentes, inibir o crescimento de microrganismos benéficos ou contaminar águas, sendo passíveis de causar efeitos prejudiciais à saúde humana e a fauna de habitats próximos aos campos tratados.

Dentre os principais agravantes de contaminação ambiental estão os pesticidas, sendo que os herbicidas correspondem a cerca de 50% do total de agroquímicos comercializados no mundo. O Brasil está enquadrado entre os maiores consumidores mundiais desses pesticidas. Os herbicidas da classe cloroacetanilida são de uso intensivo na agricultura, incluindo o acetochlor, um herbicida que apresenta alta toxicidade e é extensivamente citado na literatura como um agravante ambiental, tanto de solos como de águas.

Estes compostos xenobióticos podem causar sérios danos ao metabolismo celular devido à intensificação na produção de Espécies Ativas de Oxigênio (EAOs). Em resposta ao aumento da EAOs na presença de herbicidas, os microrganismos ativam mecanismos de defesa em combate ao estresse oxidativo. O estudo do estresse causado pela exposição de microrganismos a herbicidas visa compreender o mecanismo de transdução de sinais entre moléculas antioxidantes e xenobióticos, uma vez que este conhecimento é de grande importância para a melhor compreensão dos mecanismos enzimáticos de biodegradação e posterior aplicação de técnicas biotecnológicas de desintoxicação ambiental, como a biorremediação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Poluentes Ambientais

A preocupação com o meio ambiente é crescente, principalmente devido à consciência que tem sido construída nas sociedades de que, a qualidade ambiental é a base para a preservação da vida das futuras gerações.

O termo poluição ambiental pode ser definido como toda alteração das propriedades naturais do meio ambiente que seja prejudicial à saúde, à segurança ou ao bem estar da população sujeita aos seus efeitos, causadas por agente de qualquer espécie (MANO et al., 2005).

A crescente industrialização tem exposto animais, plantas e microrganismos a uma série de elementos potencialmente tóxicos com efeitos danosos à saúde pública e ao meio ambiente. Dentre os principais agravantes de contaminação ambiental estão os pesticidas, sendo que os herbicidas correspondem a cerca de 50% do total de agroquímicos comercializados no mundo (SATTIN et al., 1995; KOLPIN et al., 1998). Segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2004) essa porcentagem também é válida para o Brasil, país que é enquadrado entre os maiores consumidores mundiais desses pesticidas (LAABS et al., 2002).

O aumento da produtividade da agropecuária fez com que, de 1992 a 2002, a quantidade de fertilizantes utilizada em terras brasileiras tenha crescido cerca de duas vezes e meia. Segundo o IBGE (2004) em 2002, para 53,5 milhões de hectares plantados, o Brasil utilizou 7,6 milhões de toneladas de fertilizantes.

Apesar do benefício decorrente do uso de herbicidas, o problema de contaminação pelo uso de defensivos se tornou crescente, sobretudo pelo fato de que esses produtos são contaminantes potenciais do solo, água e alimentos. Esses compostos podem causar injúrias a plantas sensíveis em um sistema de rotação de culturas, serem absorvidos por culturas subseqüentes, inibir o crescimento de microrganismos benéficos, sendo passíveis de causar efeitos prejudiciais à saúde humana e a fauna de habitat próximo aos campos tratados (CORBI et al., 2006).

Os herbicidas da classe cloroacetanilida, os quais incluem o acetochlor, metolachlor e alachlor são amplamente utilizados mundialmente e frequentemente detectados como contaminantes de solos e águas (KONDA; PÁSZTOR, 2001). Extensas pesquisas buscam investigar a ocorrência, destino, efeitos para o meio ambiente e saúde humana do uso de

herbicidas (KOLPIN et al., 1998). Existe uma atenção especial no estudo da contaminação das águas subterrâneas, principalmente em áreas na qual essa água é utilizada para o consumo humano (PARAÍBA et al., 2003).

A compreensão das conseqüências do uso permanente de agrotóxicos é de importância mundial. A poluição ambiental e a procura por mecanismos eficazes capazes de reduzir os impactos ambientais são considerados como um dos maiores desafios a serem enfrentados na atualidade.

2.2 Caracterização do herbicida Acetochlor

O herbicida Acetochlor pertence a uma das três maiores classes de herbicidas utilizados no mundo: cloroacetanilida (herbicidas organoclorados) (SCRIBNER et al., 2000). Foi lançado em 1994 para o controle de espécies invasoras de mono e dicotiledôneas e pode persistir de oito a doze semanas no solo onde foi utilizado (HERBICIDE HANDBOOK, 1994). Pertence à classe toxicológica I – extremamente tóxico e, altamente perigoso ao meio ambiente (periculosidade ambiental classe I). É um herbicida de aplicação pré e pós-emergente (precoce) utilizado principalmente em culturas de milho e soja (RODRIGUES; ALMEIDA, 1998; ANDREI, 2005).

É relativamente resistente a fotodecomposição e sua degradação é essencialmente microbiana (RODRIGUES; ALMEIDA, 1998), sendo o último, considerado o primeiro mecanismo de dissipação dos herbicidas organoclorados no solo (VILLARREAL et al., 1991). Sua fórmula química [2-cloro-N-(etoximetil)-N-(2-etil-6-metilfenil)acetamida] (HERBICIDE HANDBOOK, 1994; MONSANTO, 2000) apresenta uma porção aromática de difícil degradação devido suas ligações covalentes (LIU et al., 1987), fator que colabora com sua persistência no meio ambiente (VILLARREAL et al., 1991) (Figura 1). Mas a degradação dessa molécula também resulta em moléculas de ácido orgânico, que são metabolizadas por microrganismos.

Figura 1 – Estrutura química do herbicida Acetochlor

O mecanismo de ação desse herbicida nas plantas não é bem conhecido. Inicialmente é absorvido pelas estruturas primárias (hipocótilo e epicótilo) e secundariamente pelas raízes das plântulas. Afeta a biossíntese de ácidos graxos e lipídeos, proteínas, isoprenóis e flavonóides (HERBICIDE HANDBOOK, 1994; ROBERTS, 1998). Contudo, alguns autores citam que ele é principalmente absorvido pelas raízes, mas após a translocação, atinge as folhas e inibe a cadeia transportadora de elétrons da fotossíntese (TOMLIN, 1994).

O acetochlor possui alta solubilidade em água (223 mg L^{-1} - 25°C) e baixa absorção em partículas do solo quando comparado com outros herbicidas da mesma classe. Essas características contribuem fortemente para que esse herbicida seja vastamente encontrado como contaminantes de águas subterrâneas (KONDA; PÁSZTOR, 2001).

2.3 Dados de contaminação e toxicidade do herbicida Acetochlor

Os resíduos da classe cloroacetanilida são comumente encontrados em aquíferos próximos as áreas onde foram utilizados (STAMPER et al., 1998). Uma série de estudos realizados pelo NAWQA (Programa Nacional de Avaliação da Qualidade da Água) e USGS (Programa de Exames Geológicos) relata que herbicidas dessa classe são frequentemente citados como contaminantes de águas subterrâneas nos E.U.A. (KOLPIN et al., 2000; 2002). Em vários países da Europa como Alemanha, Hungria, dentre outros, também foram detectados vários pesticidas e seus produtos como contaminantes de águas (KONDA; PÁSZTOR, 2001).

No Brasil foi realizado um estudo no Estado do Mato Grosso do Sul, o qual se encontra sobre a área do Aquífero Guarani, e foram detectados vários herbicidas, dentre os quais, os da classe cloroacetanilida como contaminantes desse local. Essa área possui características

agravantes para essa situação: alta permeabilidade do solo e uso de produtos com alta mobilidade que se constituem em fatores que aumentam o potencial de lixiviação (LAABS et al., 2002; PARAÍBA et al., 2003).

A permanência dos pesticidas no meio ambiente depende de suas propriedades físico-químicas, da natureza do solo e organismos presentes, condições climáticas e interação desses com a água (KONDA; PÁSZTOR, 2001). Os pesticidas podem ser metabolizados ou acumulados por microrganismos, sendo os mecanismos de toxicidade variáveis, dependendo do tipo de solo e da microbiota exposta (DE LORENZO et al., 2001). A classe cloroacetanilida, incluindo o herbicida acetochlor, tem sido extensivamente citada como um agravante ambiental, tanto de solos como de águas (LAABS et al., 2002; PARAÍBA et al., 2003).

Ferri, Vidal (2003) estudaram o efeito de diferentes sistemas de manejo (plantio direto e convencional) e relacionaram com a persistência do herbicida acetochlor no solo, sendo que foi observado que a palha na superfície do solo contribuiu significativamente para o aumento da sua persistência.

Estudos relacionados à persistência e estabilidade de herbicidas no solo e na água constataram que não basta apenas monitorar as concentrações dos compostos iniciais (composto “mãe”), mas também os metabólitos secundários que são gerados antes da sua completa mineralização. Decorrente disso pode-se ter falsas impressões de que esse composto foi removido do ambiente, além do que, muitos metabólitos podem ser mais tóxicos do que o composto inicial (KOLPIN et al., 1998).

Virág et al. (2007) estudaram o efeito de metabólitos de pesticidas usando testes de genotoxicidade padrão e testes de toxicidade ambiental em microrganismos. Os efeitos dos produtos de degradação exibiram diferentes resultados de acordo com o tipo de pesticida. O acetochlor e seus produtos se mostraram mais tóxicos para bactérias do que para fungos.

Em estudos com microrganismos, foi observada a inibição do crescimento de linhagens de *Escherichia coli* ML35 em contato com herbicidas (GUVEN et al., 2005), já em microrganismos aquáticos, a fotossíntese geralmente é afetada. (DE LORENZO et al., 2001).

Estudando a toxicidade em peixes, foi demonstrado que o herbicida glifosato afetou a transcrição nos embriões em estágio de mórula, sugerindo um potencial risco para a saúde humana (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2003). Outro trabalho ressalta a importância de analisar o efeito dos pesticidas em organismos aquáticos de diferentes grupos taxonômicos como bactérias, microalgas, protozoários e crustáceos. Bactérias e protozoários apresentaram toxicidade similar e

em contraste, microalgas e crustáceos se mostraram cerca de cinco vezes mais sensíveis aos efeitos do herbicida Roundup, concluindo que a sensibilidade parece ser espécie dependente (TSUI, CHU, 2003).

2.4 Sistema Antioxidante

A Terra é o único planeta do nosso sistema solar que contém oxigênio molecular O_2 em sua atmosfera. No entanto, quando essa atmosfera foi formada sobre a Terra, a cerca de 4,5 bilhões de anos atrás, o ambiente era ao contrário do atual, sendo principalmente redutor e essencialmente livre de oxigênio (SCANDALIOS, 2005). O surgimento do O_2 na atmosfera se deu com a evolução dos organismos aeróbios e segundo Cabsicol et al. (2000) foi um dos primeiros eventos de poluição ocorridos no planeta.

O acúmulo do oxigênio na atmosfera permitiu a evolução de uma enorme variedade de organismos aeróbios que usam o O_2 comoceptor final de elétrons, proporcionando assim uma maior produção de energia na respiração, em comparação com a fermentação anaeróbia.

Em sua configuração normal o O_2 é pouco reativo. No entanto, durante os processos metabólicos normais, e como consequência de diversas perturbações ambientais, o O_2 tem a capacidade de originar estados reativos denominados Espécies Ativas de Oxigênio (EAOs) as quais incluem o Radical Superóxido ($O_2^{\bullet-}$), Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), Radical Hidroxila ($OH^{\bullet}$) e Oxigênio “singlet” (O_2^1) (SCANDALIOS, 2005).

A transformação de O_2 a H_2O ocorre pela utilização de 4 elétrons em um ciclo que são originados espécies intermediárias (SCANDALIOS, 2005). Em bactérias, a maioria dessas espécies é derivada da redução sequencial do oxigênio molecular catalizada pelas enzimas da cadeia respiratória associada à membrana plasmática (CABISCOL et al., 2000; CASH et al., 2007). Dados experimentais indicam que, em *Escherichia coli*, a cadeia respiratória é responsável por cerca de 87% da produção total de H_2O_2 (GONZÁLEZ-FLECHA; DEMPLE, 1995).

Portanto, a geração de EAOs faz parte do metabolismo aeróbio normal, mas em diversas situações, a produção dessas espécies é aumentada, seja por fonte endógena ou exógena. Dentre as fontes endógenas pode-se citar: metabolismo aeróbio normal, cadeia respiratória, reações de Fenton e Haber-Weiss, dentre outras (GEORGIEVA, 2005; SCANDALIOS, 2005). Já as fontes exógenas envolvem vários fatores ambientais de estresse como: seca, metais pesados, elevadas concentrações de sais, extremos de temperatura, radiação UV, poluição do ar, herbicidas, estresse

físico e mecânico e também como resposta aos estresses bióticos como o ataque de patógenos (MALLICK; MOHN, 2000).

Em baixas concentrações, as EAOs são necessárias para numerosos processos fisiológicos, porém em altas concentrações a reatividade química elevada, conduz a danos nas macromoléculas de DNA, RNA proteínas e lipídeos (CABISCOL et al., 2000). Esses danos acarretam na oxidação de proteínas, quebras na cadeia de DNA, distúrbios na homeostase intracelular de íons cálcio livres e peroxidação de lipídeos da membrana celular (GEORGIEVA, 2005).

Para minimizar esses efeitos danosos resultantes da ação dessas espécies, os organismos aeróbios desenvolveram mecanismos capazes de combater a produção de EAOs, denominado de sistema antioxidante de defesa, o qual pode ser dividido em não-enzimático e enzimático. As defesas não-enzimáticas incluem compostos com intrínseca propriedade antioxidante, como o β -caroteno, α -tocoferol (vitamina E), glutathiona reduzida (GSH), ácido ascórbico (SCANDALIOS, 2005), NADPH e NADH, as quais são moléculas que ajudam a manter o ambiente redutor (CABISCOL et al., 2000). Já os mecanismos enzimáticos envolvem a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), peroxidases, Glutathiona Redutase (GR), Glutathiona S-Transferase (GST), dentre outras (SCANDALIOS, 2005).

Existe um equilíbrio entre as EAOs e o sistema antioxidante. O estado de equilíbrio entre a geração de EAOs e a capacidade de proteção endógena do sistema antioxidante pode ser especificado como Balanço Oxidativo Ecológico (EOB). Nesse estado, há máxima proteção contra as influências tóxicas oxidativas. Quando esse equilíbrio é perturbado, os sistemas biológicos estão expostos a ação das EAOs, resultando no estado de estresse oxidativo (MATÉS, 2000; GEORGIEVA, 2005), estado que desencadeia nos danos descritos anteriormente.

A redução na atividade das enzimas antioxidantes pode ter um dramático efeito sobre a resistência das células aos agentes oxidantes, induzindo danos no genoma e aumento na taxa de morte celular (ANDERSON et al., 1999). Segundo Cabiscol et al. (2000), os lipídeos são os maiores alvo durante o estresse oxidativo. Portanto, a peroxidação de lipídeos está entre as melhores preditoras do nível de EAOs-induzidos por danos no sistema biológico, afetando diretamente os elementos estruturais das membranas biológicas (GEORGIEVA, 2005) e por isso consiste numa ferramenta de grande importância para estudos de estresse oxidativo.

Por fim, um conjunto de genes é necessário para manter a estabilidade e precisão das funções metabólicas. Genes cuja expressão é aumentada em situações de estresse,

presumivelmente são críticos para a sobrevivência do organismo em condições adversas. Muitos xenobióticos como herbicidas, inseticidas e outros produtos tóxicos ambientais, direta ou indiretamente causam efeitos danosos, via a geração de EAOs. Portanto, a análise e o estudo desses genes “responsivos ao estresse” têm implicação para a saúde e bem-estar humano, produtividade agrícola, bem como avanços na base biológica do conhecimento (SCANDALIOS, 2005).

2.4.1 Sistema Antioxidante em bactérias

Microrganismos, como linhagens de *Escherichia coli*, são expostos aos efeitos tóxicos de fontes endógenas e exógenas. Em exposição a herbicidas, esses organismos aumentam significativamente a geração de EAOs (ZABLOTOWICZ et al., 1995).

Dentre os microrganismos, as bactérias desenvolveram mecanismos de defesa que parecem originais a esses seres, sendo que muito deles conferem proteção a estresses múltiplos. Na ausência de um destes mecanismos, as EAOs induzem a morte rápida desses microrganismos (FERGUSON, 1999).

Em bactérias, tem sido citado que, além dos compostos antioxidantes não-enzimáticos descritos anteriormente, incluem-se pequenas moléculas protéicas denominadas thioredoxina e glutaredoxina. Essas duas moléculas estão envolvidas no controle genético do sistema antioxidante (CABISCOL et al., 2000).

As bactérias apresentam dois sistemas distintos de resposta ao estresse. A resposta ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é mediada pelo ativador transcricional denominado **OxyR**, já a resposta ao radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é controlada pelo sistema **SoxRS**, também denominados de regulons. Ambos os mecanismos estão presentes nesses microrganismos, porém estão inativados em situações “não-estressantes”. O gene *oxyR* controla, entre outros, os genes que codificam para Catalase (HPI-Hidroperoxidase I), glutaredoxina, Glutathione Redutase (GR) (CABISCOL et al., 2000). Pode estar na forma reduzida ou oxidada, sendo que somente a forma oxidada ativa a transcrição. O *regulon* SoxRS contém cerca de dez genes, incluindo o gene de Mn-SOD e endonuclease IV, sendo a última, componente do sistema de reparo do DNA. A ativação desses sistemas aumenta a resistência celular aos agentes oxidativos (CABISCOL et al., 2000; CARMEL-HADEL; STORZ, 2000).

A ativação e desativação de OxyR é condicionada por ligações dissulfeto que ocorrem como um sistema “on-off”, o qual funciona como uma rápida resposta às condições oxidativas. Existe uma particular dependência da glutaredoxin, sendo que o gene que codifica para essa proteína é regulado por OxyR, assim compreendendo um mecanismo de auto-regulação (Figura 2).

Figura 2 – Estresse Oxidativo ativa OxyR pela formação de pontes dissulfeto. OxyR desencadeia na expressão de enzimas antioxidantes (CABISCOL et al, 2000)

A regulação de *SoxRS* ocorre pela conversão de SoxRS para uma forma ativa que aumenta a transcrição de *soxS*. O aumento dos níveis de SoxS, por sua vez, ativam a expressão do regulon. Além de SoxR e OxyR, vários outros reguladores transcricionais modulam a expressão de genes que codificam antioxidantes em bactérias, indicando a complexidade e conectividade dos sistemas reguladores (SCANDALIOS, 2005).

2.4.1.1 Catalase (CAT)

A catalase (EC 1.11.1.6.) é uma enzima tetramérica que contém grupos heme e é encontrada em todos os organismos vivos. Devido à sua ampla distribuição e capacidade de degradar rapidamente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), foi proposto que a CAT desempenha um papel fundamental nos sistemas que capacitam os organismos a viverem em ambientes aeróbicos (MATÉS, 2000). Dependendo da concentração de H_2O_2 a CAT pode atuar com ações peroxidativas e catalíticas. O Fe do grupo heme interage com o H_2O_2 , formando peróxido de ferro, rico em O_2 , denominado de componente I. Em baixas concentrações de H_2O_2 ($< 1 \mu\text{M}$), a CAT atua com ações peroxidativas, e o componente I pode ser reduzido por doadores de hidrogênio (H), como o etanol e ácido ascórbico. Em elevadas concentrações, atua rapidamente de forma catalítica, formando H_2O e O_2 (SCANDALIOS, 2005). Essas reações podem ser observadas abaixo:

A CAT é a única entre as enzimas degradantes de H_2O_2 que não consome equivalentes redutores celulares e possui um mecanismo muito eficiente para remover o peróxido de hidrogênio formado nas células sob condições de estresse (SCANDALIOS, 2005). É tão eficiente que não pode ser saturada por H_2O_2 em nenhuma concentração (LLEDÍAS et al., 1998).

Escherichia coli e outras espécies de bactérias expressam uma bifuncional catalase-peroxidase, denominada de hidroperoxidase I (HPI e *KatG*). Em *E. coli*, HPI é uma das duas enzimas com atividade catalítica, sendo a segunda monofuncional catalase HP II (*KatE*). A atividade da catalase é predominantemente ($< 95\%$) encontrada na porção citoplasmática (HILLAR et al., 1999; ICHISE et al., 2000). Em *E. coli*, HPI está presente durante o crescimento aeróbico e é transcricionalmente regulada em diferentes níveis e HP II é induzida durante a fase estacionária (CABISCOL et al., 2000).

Mutantes espontâneos da bactéria *Vibrio rumoiensis* S-4 (derivados da linhagem S-1) que apresentavam deficiência na produção de catalase, não sobreviveram na presença de 5 mM de

H₂O₂, resultado que sugere que a catalase é essencial para a sobrevivência desses microrganismos (ICHISE et al., 1999).

2.4.1.2 Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD (EC 1.15.1.1) foi isolada em eritrócitos bovinos em 1938, mas a função desta foi descrita por McCorde e Fridovick em 1969. Presente em organismos aeróbios e anaeróbios facultativos esta enzima caracteriza um grupo de metaloenzimas que catalisam a formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a partir de radicais superóxido (O₂^{-•}), consumindo-os, portanto, e assim, livrando as células do risco de oxidação por esses radicais. A SOD é a primeira enzima de defesa contra danos provocados por EAOs nas células (SCANDALIOS, 2005). Sua reação pode ser observada abaixo:

As SODs são as únicas enzimas cujas atividades interferem nas concentrações de O₂^{-•} e H₂O₂, os dois substratos da reação de Haber-Weiss que origina os radicais OH[•] e provavelmente por isso, as SODs representam o mecanismo de defesa central dos organismos vivos (ALSCHER et al, 1998).

Estas metaloenzimas multiméricas têm sido classificadas em quatro grupos de acordo com o metal de seu sítio ativo: cobre/zinco (Cu/Zn), manganês (Mn) ou ferro (Fe) e níquel (Ni). Cu/Zn-SODs são geralmente encontradas no citosol de células eucarióticas e em cloroplastos. Em procariotos, foram localizadas no periplasma ou ancoradas a membrana (BATTISTONI, 2003). As Mn-SODs (*sodA*) são encontradas em procariotos e mitocôndrias; Fe-SODs são geralmente encontradas em procariotos, em algas e em cloroplastos de algumas plantas superiores (SCANDALIOS, 2005). Em uma fração citosólica da bactéria do gênero *Streptomyces* foi identificada a enzima Ni-SOD (MATÉS, 2000;).

A importância biológica do Mn-SOD é demonstrada quando ocorre a inativação de seus genes em *Escherichia coli*, o que acarreta no aumento da frequência de mutações nesses microrganismos sob circunstâncias aeróbicas (MATÉS, 2000). Em ensaios realizados com ratos observou-se um aumento na susceptibilidade desses organismos ao herbicida paraquat na falta da

enzima Cu/Zn- SOD, além de redução da fertilidade em fêmeas e um aumento marcante na letalidade embrionária (HO et al., 1998).

Células de *Escherichia coli* foram transformadas com os genes da enzima Cu/Zn- SOD de *Drosophila*.. Observou-se uma superexpressão desse gene, evidenciado por níveis elevados dos polipeptídeos de Cu/Zn- SOD em extratos citosólicos bacterianos e aumento da resistência ao herbicida paraquat nas linhagens transformadas (GOULIELMOS et al., 2003). Também foram constatadas a expressão diferencial de isoformas de SOD em *E. coli* e *Bacillus subtilis* quando submetidas ao herbicida quinclorac (LÜ et al., 2004). Em *E. coli*, a falta de SOD foi associada ao aumento da sensibilidade ao cádmio, níquel e cobalto (GESLIN et al., 2001).

2.4.1.3 Glutathione Redutase (GR)

A glutathione reduzida (GSH), é um importante metabólito no combate às EAOs (especificamente $O_2^{\bullet -}$ e H_2O_2) via o ciclo Halliwell-Asada. Para a regeneração de glutathione reduzida, a partir da sua forma oxidada, a enzima chave é a Glutathione Redutase (GR) (GRATÃO et al., 2005). Essa enzima contém um grupo prostético flavina adenina dinucleotídeo (FAD), transferidor de elétrons que catalisa a redução dependente de NADPH da glutathione oxidada (GSSG) para glutathione reduzida (GSH) (CABISCOL et al., 2000), conforme a seguinte reação:

A enzima GR (E.C.1.6.4.2.) é de ocorrência quase universal, sendo amplamente distribuída entre procariotos e eucariotos, desde bactérias heterotróficas e fotossintetizantes até plantas e animais superiores (NOCTOR et al., 2002).

Em células de *Escherichia. coli*, a glutathione (GSH) tem papel central na desintoxicação de eletrófilos. Mutantes de *E. coli*, que apresentavam deficiência na via de biossíntese de glutathione, morreram na presença da droga metilglioxal (MATÉS, 2000).

Em estudo realizado com bactérias do gênero *Pseudomonas* isoladas de áreas onde foram aplicados herbicidas organoclorados, observou-se que 70% das amostras metabolizavam os resíduos do herbicida via conjugação com a glutatona (ZABLOTOWICS et al., 2001).

Estudos com linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e H_2O_2 foi demonstrado que com sucessivos aumentos desse agente estressante foi observado decréscimo na atividade da enzima GR (BAYLIAK et al. 2006). Em contraste com esses resultados, Geoffroy et al. (2002) observou aumento na atividade da GR em microalgas submetidas a doses crescentes dos herbicidas Oxifluorfen e Diuron.

2.4.1.4 Glutathione-S-transferase (GST)

GSH é a doadora de tiol para a enzima glutathione S-transferase (GST; EC 2.5.1.18), que catalisa a conjugação da glutathione a uma gama de substratos hidrofóbicos eletrofílicos (DIXON, 2002) e EAOs (RUSHMORE; PICKETT, 1993). As GSTs atuam como peroxidase na redução de hidroperóxidos a monohidroxi-álcool durante estresse oxidativo e no catabolismo de tirosina (DIXON, 2002).

A GST 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 especificidade do sítio G é alta, sendo que apenas a GSH e moléculas estruturalmente relacionadas servem como substrato. Ao contrário, a GST possui uma especificidade ampla para substratos eletrofílicos, possuindo um sinal químico, composto de ligações duplas conjugadas adjacentes a um grupo aceptor de elétrons. Em *E. coli* foi descrito que sete genes codificam para enzimas do tipo GST (KANAI et al., 2006). Por meio de técnicas de imunolocalização, foi demonstrado que essa enzima é preponderantemente localizada no compartimento periplasmático de bactérias (ALLOCATI et al., 1997).

Essa enzima catalisa a desintoxicação do metabolismo causado por xenobióticos, drogas, luz U.V., metais pesados e carcinogênicos e, protege assim as células do estresse oxidativo. Quando esses compostos são metabolizados, ocorre a geração de superóxido e eletrófilos, que se forem acumulados nas células causam danos no DNA, membrana, mutagenicidade, envelhecimento prematuro e morte (TALALAY et al., 1995; MATES; SÁNCHEZ-JÍMENEZ,

1999). Os genes que codificam para essa enzima são induzidos a uma alta expressão na presença dos compostos acima citados (RADJENDIRANE et al., 1997).

2.5 Biodegradação de herbicidas e biorremediação

Os sistemas biológicos têm a habilidade de crescerem e se multiplicarem com maior ou menor intensidade dependendo das suas características inerentes e das condições impostas pelo ambiente. A prática mundial do uso de agroquímicos por longos períodos, muitas vezes indiscriminada e abusiva, vem trazendo preocupações às autoridades públicas em consequência da contaminação ambiental. Além disso, os termos “reciclagem do uso da terra” e “desenvolvimento sustentável” estão cada vez mais presentes em nosso cotidiano.

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

A técnica de biorremediação pode ser definida como a eliminação, atenuação ou transformação de poluentes ou substâncias contaminantes pelo uso de processos biológicos (LYNCH; MOFFAT, 2005). Alguns parâmetros de avaliação são essenciais para a aplicação dessa técnica e devem ser avaliados, como o isolamento, caracterização e identificação dos microrganismos com habilidade ou atividade enzimática metabolizadora dos materiais químicos potencialmente tóxicos.

Estudos baseados no uso de microrganismos para degradar compostos químicos são descritos freqüentemente na literatura, bem como a degradação total ou parcial de pesticidas por populações microbianas naturais presentes em solos. Em estudos com herbicidas da classe cloroacetanilida foram selecionados e caracterizados microrganismos com capacidade de degradação dos herbicidas alachlor (SETTE et al., 2004), acetochlor (XU et al. 2006) e s-metolachlor (MARTINS et al., 2007). Todos os autores relatam que as linhagens selecionadas apresentam grande potencial para aplicação na biorremediação.

Outro trabalho investigou a biodegradação do herbicida acetochlor no solo no qual foi detectado dois metabólicos identificados como hidroxiaacetochlor e 2-metil-6-etilanilina decorrentes da quebra por biodegradação. Esses metabólitos foram identificados via HPLC/MS

(cromatografia líquida de alta resolução acoplada a espectrômetro de massa) (YE et al., 2002), sendo esse método bastante utilizado na detecção de herbicidas e seus metabólitos em águas superficiais e subterrâneas.

Atualmente, vários trabalhos citam a importância de vincular estudos de genômica e proteômica para a melhor compreensão dos mecanismos de biodegradação bacteriana. A proteômica pode fornecer informações importantes sobre o ciclo de vida, regulação, e modificações pós-traducionais de proteínas induzidas em condições específicas (IL KIM et al., 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP).

3.1 Material biológico

Foram utilizadas três linhagens bacterianas da espécie *Klebsiella oxytoca* para estudar o efeito do herbicida acetochlor. Essas linhagens foram isoladas pelo grupo do Prof. Marcos Pileggi, Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, durante o ano de 2001 a partir de solos agriculturáveis nos quais havia sido aplicado o herbicida em questão por três anos seguidos.

3.2 Meios de cultura

3.2.1 Meio Caldo Nutriente

Foi utilizado o caldo nutriente da Biobráz – Meios de Cultura, com a seguinte composição:

Cloreto de Sódio (NaCl).....	5,0 g
Extrato de carne.....	1,0 g
Extrato de levedura.....	2,0 g
Peptona de gelatina.....	5,0 g
Água destilada.....	1000 mL

O meio de cultura foi preparado de acordo com as instruções descritas no rótulo do produto. Foi dissolvido na proporção de 13 g de meio de cultura para 1000 mL de água destilada e esterilizado em autoclave a 121°C, 1 atm por 15 minutos.

3.2.2 Meio Ágar Nutriente

Foi utilizado o ágar nutriente da Biobráz – Meios de Cultura, com a seguinte composição:

Ágar Bacteriológico.....	15,0 g
Cloreto de Sódio(NaCl).....	8,0 g
Extrato de carne.....	3,0 g
Peptona de gelatina.....	5,0 g
Água destilada.....	1000 mL

O meio de cultura foi preparado de acordo com as instruções descritas no rótulo do produto. Foi dissolvido na proporção de 31 g de meio de cultura para 1000 mL de água destilada e esterilizado em autoclave a 121°C, 1 atm por 15 minutos.

3.3 Identificação das bactérias

As três bactérias foram cultivadas em meio caldo nutriente e após atingirem a fase LOG de crescimento (cerca de 12h) foram submetidas à extração de DNA. O gene 16S rDNA foi amplificado, sequenciado e utilizado para identificar as bactérias.

3.3.1 Extração de DNA bacteriano

A suspensão bacteriana foi aliquoteada em tubos com 1,5 mL de cultura e centrifugada por 5 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspendido em 500 µL de tampão de extração (TE).

Tampão de extração:

Tris HCl 1M – pH 7,5.....	10 mL
EDTA 0,5M – pH 8,0.....	2 mL
Água destilada.....	1000 mL

O material ressuspendido foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e novamente o precipitado foi ressuspendido em 500 µL de TE com a adição de 60 µL de SDS 10% e duas pás de sílica. Foi agitado no “bead beating” por 30 segundos (velocidade

de 40X por segundo). Após agitação, foi adicionado 500 µL de fenol saturado, homogeneizado e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. A fase superior foi transferida para um novo tubo, acrescentado 6 µL de RNase e incubado por 5 minutos a 37°C.

Solução de RNase:

Tris HCl 10 mM – pH 8,0

NaCl 15 mM

RNase 10 mg/mL

Duzentos µL de fenol e 200 µL de clorofórmio foram adicionados à suspensão, homogeneizada por inversão e centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionado 10% do volume de NaCl 5 M, 60% do volume de isopropanol e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado.

O DNA foi lavado com 400 µL de etanol 70% e centrifugado por 2 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi seco a 37°C. O DNA foi ressuspendido em 50 µL de água Milli-Q e estocado a – 20°C.

3.3.2 Amplificação do gene 16S rDNA

Após a extração do DNA das bactérias, procedeu-se à amplificação pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction – reação em cadeia da polimerase) utilizando a seguinte reação:

Água Milli-Q.....	31,8 (q.s.p.)
Buffer.....	5,0 µL
MgCl ₂ (25 mM).....	7,5 µL
dNTPs (2,5 mM).....	4,0 µL
Primer - P027F.....	0,1 µL
Primer - R1387.....	0,1 µL
Taq-polimerase.....	0,5 µL
DNA.....	1,0 µL
TOTAL.....	50,0 µL

Os primers utilizados foram os seguintes (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004):

R1387 – 5' CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG 3'

P027F – 5' GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'

O programa empregado no termociclador foi: [94 °C/4 min.- (94 °C/30 seg., 62,5 °C/1 min., 72 °C/1 min. – 35 ciclos) – 72 °C/7 min. – 10 °C/∞].

3.3.3 Purificação dos produtos de PCR

A purificação foi feita com solução de PEG 8000. Esta solução é preparada com 10 g de PEG 8000 e 7,3 g de NaCl solubilizados em 45 mL de água Milli-Q a 37°C, sob agitação. A solubilização leva em torno de 30 minutos e, ao final, o volume deve ser completado para 50 mL.

A reação foi iniciada em um tubo de 1,5 mL, no qual foi adicionado 50 µL do produto de PCR e 50 µL da solução de PEG, sendo a solução misturada com auxílio de uma pipeta e incubada por 15 minutos a 37°C. Em seguida, o tubo foi centrifugado a alta velocidade (14.000 rpm) por 15 minutos a temperatura ambiente. Com ajuda de uma pipeta, todo o sobrenadante foi retirado e descartado.

Ao “pellet”, foi adicionado 125 µL de etanol 80% gelado (de boa qualidade), escorrendo o líquido pela lateral do tubo, deixando a solução descansar por 1 min. a temperatura ambiente. Após esse tempo, foi retirado o sobrenadante com auxílio sempre de pipeta, e foi repetido os dois últimos passos.

Ao final, o restante do álcool foi deixado secar a 37°C por 15 min. e o produto foi dissolvido em 30 µL de tampão de extração ou água Milli-Q.

3.3.4 Seqüenciamento do gene 16S rDNA

Após confirmação da amplificação do fragmento de interesse (16S rDNA) de cada bactéria, o gene foi seqüenciado (seqüenciador ABI Prism 377 - Applied Biosystems Inc.). As seqüências obtidas foram analisadas pelo algoritmo BLAST no “GenBank database” (NCBI - National Center for Biotechnology Information) a fim de buscar alinhamentos significativos.

3.4 Experimento básico

As bactérias foram cultivadas em meio ágar nutriente para obtenção de colônias isoladas. Uma colônia de cada bactéria foi selecionada e inoculada em 10 mL de caldo nutriente. Após 12h de crescimento sob agitação (150 rpm) a 30°C, esse pré-inóculo foi utilizado para “riscar” as placas de petri, com o auxílio de alça de platina. A superfície do meio foi coberta em toda a sua área, para obtenção de maior massa (g) de bactérias por placa.

O herbicida é comercializado na concentração de 840g.L⁻¹ de ingrediente ativo, acetochlor, o qual possui massa molecular de 269,77 g.mol⁻¹. As diluições recomendadas para uso no campo são de 3 a 4L do herbicida comercial em 200 a 250L/ha.

Nesse trabalho optou-se pelo uso de duas concentrações de herbicida, uma correspondendo à aplicação de campo de 4L/200L/ha, e a outra, dez vezes mais concentrada, as quais foram obtidas com 20 e 200 mL de herbicida por L de meio de cultivo.

As três bactérias foram cultivadas em placas de petri com meio composto por ágar nutriente e 0, 62 mM e 620 mM, do ingrediente ativo acetochlor, que correspondem ao controle, concentração de campo e dez vezes a concentração de campo. As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 12 horas (Fase LOG).

3.5 Extração de proteínas

As amostras bacterianas foram coletadas da placa de petri com o auxílio de uma espátula. Posteriormente, foram colocadas em um mortar no qual foi adicionado N₂ líquido e feita a maceração até ficar com o aspecto de farinha. As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, (proporção de 4g amostra: 1 mL tampão), contendo 1 mM EDTA (ácido etileno diamino tetracético), 3 mM DTT (ditiotreitól) e 4% (p/v) PVPP (polivinilpolipirrolidona) de acordo com Gomes-Junior et al. (2007). O homogeneizado foi centrifugado à 10.000 rpm por 30 min à 4°C, utilizando uma centrífuga Beckman modelo J2-MC. O sobrenadante foi coletado, aliquoteado e estocado em freezer -80°C até o momento das análises.

3.6 Determinação de proteína

A concentração das proteínas totais foi determinada segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se o BSA (“bovine serum albumin”) como padrão. Foi utilizado o espectrofotômetro Beckman modelo J2-MC. O resultado da quantificação se deu em mg/mL.

3.7 Gel SDS-PAGE

A eletroforese em sistemas SDS-PAGE é empregada em estudos de proteínas, o qual utiliza um agente dissociante para desnaturá-las em subunidades. O agente dissociante comumente utilizado é o detergente iônico dodecil sulfato de sódio (SDS). A mistura de proteína é desnaturada pelo aquecimento, na presença do SDS e mercaptoetanol, cuja função é quebrar as ligações dissulfeto (LAEMMLI, 1970).

As proteínas das amostras bacterianas foram separadas utilizando o sistema Mini Protean II da Bio-Rad. A concentração do gel foi de 10% de poliacrilamida. Para a confecção de um mini gel foi utilizado 2,5 mL de uma solução 40% de acrilamida (Sigma), 2,5 mL de tampão TRIS 2,9 M, pH 8,9 e 5 mL de água e 100 µL de SDS 10%. Como catalisadores foram utilizados 19 µL de TEMED e 25 µL de persulfato de amônio (1%). Após a polimerização desse gel de resolução (cerca de 30 minutos), foi aplicado o gel de empacotamento segundo o protocolo: 500 µL de acrilamida, 1,25 mL tampão TRIS 500 mM, pH 6,7 e 2,75 mL de água e 50 µL de SDS 10%. Para a polimerização foram utilizados 10 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônio (1%).

A eletroforese foi conduzida a temperatura ambiente em corrente constante de 15 mA/placa. O tampão de corrida (5X concentrado) contém 25 mM TRIS, pH 8,3 acrescido de 192 mM de glicina e 1% de SDS 10%.

O tampão de amostra contém 3 mL de água destilada, 1 mL de tampão de empacotamento, 1,6 mL de SDS (10%), 400 µL de solução 0,5% de azul de bromofenol e 400 µL de mercaptoetanol.

Para cada gel foram aplicados 4 µL de padrão BenchMark - Protein Ladder – Invitrogen e 20 µg de proteína por canaleta. Os géis foram corados com uma solução de Comassie Blue (0,5g de Comassie Blue R-250 em 500 mL de solução descorante) por 12 horas e posteriormente repassados para a solução descorante (400 mL de Metanol p.a., 70mL de ácido acético glacial,

completando o volume para 1000mL de água destilada), até a perfeita visualização das bandas. Os géis foram documentados no Image Scanner – Amersham Biosciences.

3.8 Peroxidação de lipídeos

A peroxidação de lipídeos foi determinada através da produção de metabólitos reativos a ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), principalmente o malonaldeído (MDA), segundo Heath; Packer (1968) e Buege; Aust (1978). Amostras de bactérias pesando 0,1 g foram maceradas com 450 µL de TCA (ácido tricloroacético) (0,1%) juntamente com 20% de PVPP. Após a perfeita homogeneização, 1,4 mL foram transferidos para tubos e centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos. Do sobrenadante, foi retirado 250 µL ao qual foi adicionado 1 mL de TCA 20% e TBA 0,5%. A mistura foi colocada em banho seco por 30 minutos, a 95°C e resfriada em gelo, na sequência. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40 a 535 e 600 nm. A quantidade de MDA é expressa em mmol/mg de tecido fresco.

3.9 Atividade das enzimas antioxidantes

Para os ensaios enzimáticos foram utilizados extratos protéicos provenientes de amostras de bactérias cultivadas em meio ágar nutriente com 0, 62 e 620 mM de acetochlor com 12 horas de crescimento.

Foram realizados ensaios de atividade das enzimas Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione Redutase (GR) em géis não desnaturantes (PAGE) e atividade das enzimas CAT, GR e Glutathione-S-Transferase (GST) em espectrofotômetro.

3.9.1 Atividade da CAT

A atividade da CAT foi determinada por espectrofotometria e em gel não desnaturante (PAGE).

3.9.1.1 Atividade em espectrofotômetro

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

Em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40, a catalase foi determinada a 25°C em solução contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 25 µL de peróxido de hidrogênio (solução de 0,25%) preparada imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada pela adição de 25 µL de extrato protéico e a atividade determinada seguindo-se a decomposição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 1 minuto, através das alterações na absorbância a 240nm. Os resultados foram expressos em µmol/minuto/mg de proteína.

3.9.1.2 Atividade em PAGE

A atividade de CAT em PAGE não desnaturante foi determinada através dos extratos bacterianos, cujas proteínas foram separadas por eletroforese em gel 12%. Foi utilizado o sistema Mini Protean II da Bio-Rad. O gel possui espessura de 1,5 mm, altura de 6,5 cm e largura 7,3 cm. Para a confecção de um mini gel foi utilizado 3,0 mL de uma solução 40% de acrilamida (Sigma), 2,5 mL de tampão TRIS 3 M (hidroximetil)-aminometano (pH 8,9) e 4,5 mL de água destilada. Como catalisadores foram utilizados 19 µL de TEMED e 25 µL de persulfato de amônio (1%).

Após a polimerização desse gel de resolução (cerca de 30 min.), foi aplicado o gel de empacotamento segundo o protocolo: 500 µL de acrilamida, 1,25 mL tampão TRIS 500 mM, pH 6,7 e 2,75 mL de água. Para a polimerização foram utilizados 10 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônio (1%).

A eletroforese foi realizada a 4°C em corrente constante de 15 mA/placa. O tampão de eletrodo foi TRIS 25 mM, pH 8,3 acrescido de 192 mM de glicina - 5X concentrado, sendo diluído para 1X e reutilizado até 3 vezes. Para cada gel foram aplicadas amostras de padrão de CAT de fígado de boi – Sigma (2 unidades) e 20 µg de proteína dos extratos bacterianos.

A revelação para a atividade de CAT foi realizada após a lavagem do gel por 45 minutos em água deionizada (3 x 15 minutos) e incubação do mesmo por 10 minutos em 0,003 % de H₂O₂, à temperatura ambiente, com agitação suave e constante. Após este período, o gel foi rapidamente lavado em água deionizada e colocado por 10 minutos em uma solução de FeCl₃.

1% (p/v) e $K_3Fe(CN)_6$ 1% (p/v) sempre com agitação suave. Em seguida, a solução foi retirada e o gel lavado com água. A fixação foi realizada com uma solução de ácido acético (7%) por 15 minutos. Os géis foram documentados no Image Scanner – Amersham Biosciences.

3.9.2 Atividade da SOD

A atividade da SOD foi determinada unicamente em gel não desnaturante (PAGE).

3.9.2.1 Atividade em PAGE

E eletroforese em PAGE (12%) foi realizada nas mesmas condições como descrito para CAT (item 3.9.1.2). Para cada gel foram aplicadas amostras de padrão de SOD de fígado de boi – Sigma (2 unidades) e 20 µg de proteína dos extratos bacterianos. Após a separação das proteínas por eletroforese, a atividade de SOD foi determinada de acordo com Gomes-Junior et al. (2006).

Os géis foram lavados rapidamente em água deionizada e incubados no escuro a temperatura ambiente em uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8, 1 mM EDTA, 0,05 mM riboflavina, 0,1 mM nitroblue tetrazolium (NBT) e 0,3% TEMED. Ao final de 30 min, a mistura de reação foi removida, os géis enxaguados com água deionizada e colocados sob iluminação por alguns minutos até o desenvolvimento de bandas brancas sob fundo roxo. Nestas condições ocorre a fotoxidação do gel, propiciando a formação de uma coloração púrpura e as bandas correspondentes à atividade de SOD permanecem sem se fotoxidar, promovendo uma revelação negativa, assim como para CAT. A fotoxidação foi interrompida mergulhando-se o gel em solução de ácido acético (7%) por 15 minutos. Os géis foram documentados no Image Scanner – Amersham Biosciences.

3.9.2.2 Determinação das isoformas de SOD

Para a determinação das isoformas de SOD foi realizada uma eletroforese com 100 µg de proteína da linhagem 3 cultivada em meio com 62 mM de acetochlor, nas mesmas condições descritas anteriormente para SOD (item 3.9.2.1). Ao final da eletroforese, o gel foi dividido verticalmente em três partes. A primeira parte foi mantida a 4°C em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8. A segunda foi imersa em 100 mL do mesmo tampão contendo 2 mM de KCN e

0,0292 g de EDTA. A terceira, imersa em 100 mL do referido tampão contendo 5 mM de H_2O_2 e 0,0292 g de EDTA. Todos os passos descritos foram realizados no escuro.

Após 20 minutos nestas soluções, os géis foram submetidos a revelação com NBT e riboflavina, como citado anteriormente no item item 3.9.2.1. Ao final da revelação, foi analisada a presença ou ausência de bandas no controle, e nos tratamentos com KCN e H_2O_2 . As isoformas foram então classificadas como Mn-SOD, Fe-SOD ou Cu/Zn-SOD. Mn-SOD é resistente a ambos inibidores (KCN e H_2O_2), Fe-SOD é resistente ao KCN e inibida por H_2O_2 e Cu/Zn-SOD é inibida por ambas as substâncias (AZEVEDO et al., 1998).

3.9.3 Atividade da GR

A atividade da GR foi determinada por espectrofotometria e em gel não desnaturante (PAGE).

3.9.3.1 Atividade em espectrofotômetro

A atividade da Glutathione Redutase foi determinada como descrito por Gomes-Junior et al. (2006), com algumas modificações.

Em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40, a glutathione redutase foi determinada a 30°C em uma mistura de reação consistindo de 1 mL tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de DTNB (2-ácido nitrobenzóico), 1 mM de GSSG (glutathione oxidada) e 0,1 mM NADPH. A reação foi iniciada pela adição de 30 μ L de extrato protéico. A atividade da GR foi estimada pela redução de glutathione oxidada acompanhada por monitoramento na alteração da absorbância a 412nm por 1 minuto. Os valores de atividade foram expressos em μ mol/minuto/mg de proteína.

3.9.3.2 Atividade em PAGE

Foi realizada a eletroforese em PAGE não-desnaturante (12%) nas mesmas condições como descrito para CAT (item 3.9.1.2). Para cada gel foram aplicadas amostras de padrão de GR de fígado de boi – Sigma (1 unidade) e 20 μ g de proteína dos extratos bacterianos.

Após a separação das proteínas por eletroforese, a atividade de GR foi determinada como descrito por Lee & Lee (2000). Após a corrida, os géis foram lavados em água deionizada (2 x 15 minutos) e incubados a temperatura ambiente por 30 minutos em uma solução de 0,25M de TRIS em pH 7,5, 10mg MTT; 10mg DPIP; 3,4mM GSSG (glutathione oxidada) e 0,5mM NADPH para 50 mL de água. O gel foi lavado rapidamente em água deionizada e a reação foi fixada em solução de ácido acético (7%) por 15 minutos. Os géis foram documentados no Image Scanner – Amersham Biosciences.

3.9.4 Atividade da GST

A atividade da GST foi determinada unicamente por espectrofotometria.

3.9.4.1 Atividade em espectrofotômetro

A atividade da Glutathione-S-Transferase foi determinada como descrito por Anderson (1995), com algumas modificações.

Em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40, a glutathione-S-transferase foi determinada a 30°C em uma mistura de reação contendo 900 µL de tampão fosfato de potássio (KH_2PO_4) 100 mM (pH 6,5), 25 µL de CDNB (40 mM), 100mM de GSH (glutathione reduzida) e 25 µL de amostra protéica. O monitoramento da absorbância foi feito de 0 a 8 minutos a 340 nm como um teste preliminar. A partir desse teste, pode-se constatar qual seria o melhor período para captar a cinética enzimática das amostras. A atividade foi monitorada de 0 a 3 minutos e foi expressa em µmol/ minuto/ mg de proteína.

3.10 Análise Densitométrica dos géis de atividade enzimática (PAGE)

Para os géis de atividade enzimática da CAT, SOD e GR, foi realizada análise densitométrica (intensidade) de cada banda, com o auxílio do programa Kodak Digital Science – 1D Image Analysis Software versão 3.0.1. O resultado da intensidade das bandas foi dado em pixels, porém, para uma melhor discussão, esses números foram transformados em porcentagem.

3.11 Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3 x 3), com três repetições, sendo cada parcela composta por 4 placas de petri. Aos dados quantitativos foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Média (TUKEY), utilizando o programa SAS (Statistical Analysis System – Proc GLM).

4. RESULTADOS

4.1 Identificação das linhagens bacterianas

Foram analisadas, através do programa BLAST (NCBI), as seqüências do gene 16S rDNA provenientes das três linhagens bacterianas. A partir da comparação com o banco de dados foi obtida a identificação das bactérias, sendo que o grau de similaridade foi superior a 98% para todas as linhagens comparadas, indicando confiabilidade dos resultados (Tabela 1).

Tabela 1 - Identificação das linhagens bacterianas por seqüenciamento do gene 16S (DNAr)

Linhagens	Número de Acesso	Identificação
1	AB053117	<i>Klebsiella oxytoca</i>
2	AB053117	<i>Klebsiella oxytoca</i>
3	AB053117	<i>Klebsiella oxytoca</i>

A análise de similaridade apresentou que as três linhagens bacterianas são pertencentes à mesma espécie, as quais foram denominadas de Linhagem 1, 2 e 3, para diferenciação no decorrer do texto.

4.2 Crescimento das linhagens em meio de cultivo

O crescimento das bactérias foi testado em meio ágar nutriente com concentrações de 0, 62 mM e 620 mM de acetochlor. Optou-se pelo estudo em meio sólido devido à interferência do herbicida nas leituras de crescimento em espectrofotômetro no comprimento de onda utilizado para monitorar a densidade bacteriana (600 nm). Na figura 3 pode-se observar o desenvolvimento das bactérias nas concentrações testadas.

Figura 3 – Crescimento das linhagens em meio ágar nutriente com 0 mM (1), 62 mM (2) e 620 mM (3) de acetochlor

Essa figura também representa como as bactérias foram cultivadas durante o experimento (Figura 3).

4.3 Proteínas

4.3.1 Quantificação de proteína em espectrofotômetro

Os teores de proteína (Tabela 2) não apresentaram diferenças significativas entre as linhagens, já para o fator meio e interação observou-se diferença significativa a 5% de probabilidade pelo teste F. A tabela 3 apresenta o desdobramento para o fator linhagem, na qual foi observada diferença significativa no teor de proteína para as linhagens 1 e 3 (5 e 1% de probabilidade, respectivamente) e não significativa para a linhagem 2, de acordo com a figura 4.

Na figura 4 observa-se que a linhagem 1 apresenta aumento significativo no teor total de proteína apenas na concentração de 620 mM em relação as demais condições. Já para a linhagem 3 o aumento se deu na concentração de 62 mM e 620 mM quando comparado ao controle.

Tabela 2 – Análise de variância dos dados provenientes da quantificação de proteína em espectrofotômetro

FV	GL	QM	F
Tratamentos	8	2,4636	4,11**
Linhagem (L)	2	1,7652	2,94 ^{ns}
Meio (M)	2	3,0363	5,06*
LxM	4	2,5265	4,21*
Erro	18	0,5995	

**, * significativo a 1% e 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns} não significativo

$\bar{X} = 3,168$ e $CV(\%) = 24,44$

Tabela 3 – Análise de variância da Tabela 2 com desdobramento do fator Linhagem

FV	GL	QM	F
Linhagem 1	2	2,9252	4,88*
Linhagem 2	2	0,2916	0,62 ^{ns}
Linhagem 3	2	4,8725	8,13**

**, * significativo a 1% e 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns} não significativo

Figura 4 – Teor de proteína (mg/mL) para as linhagens 1, 2 e 3 de *Klebsiella oxytoca* submetidas as concentrações de 0 mM, 62 mM e 620 mM de acetochlor. Médias com a mesma letra dentro de cada linhagem não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

4.3.2 Perfil protéico em SDS-PAGE

Na análise do gel (Figura 5), foram observadas mudanças no perfil protéico em relação ao meio controle. Tais diferenças estão relacionadas a alterações de intensidade e ausência/ presença de bandas entre os materiais. Foi observado o surgimento das bandas I e III nas três linhagens quando submetidas ao herbicida, independente da concentração. Apenas para a banda I houve diferença gradativa de intensidade entre as concentrações 62 mM e 620 mM. Já a banda II surgiu especificamente na linhagem 2 na concentração de 620 mM de herbicida. O padrão entre as linhagens não variou.

Figura 5 – Proteína em gel SDS-PAGE para as linhagens de *Klebsiella oxytoca* submetidas ao tratamento com acetochlor. Padrão (P) BSA; 1, 2 e 3 representam as concentrações 0 mM, 62 mM e 620 mM para a linhagem 1; 4, 5 e 6 para a linhagem 2 e 7, 8 e 9 para a linhagem 3 nas mesmas concentrações. As setas representam as alterações observadas

4.4 Peroxidação lipídica

4.4.1 Quantificação de Malonaldeído (MDA) em espectrofotômetro

A quantificação de MDA (Tabela 4) possui diferença significativa a 1% de probabilidade pelo teste F, entre linhagens, meio e interação. Portanto, pelo menos uma linhagem apresenta produção de MDA diferente e para o fator meio pelo menos um deles contribui para diferenças na produção desse composto.

Desdobrando o fator linhagem dentro de meio (Tabela 5), observa-se que as três linhagens apresentam comportamento diferencial dentro dos meios.

Na figura 6, pode-se observar que a linhagem 1 e 2 apresentam aumento na produção de MDA nas condições com herbicida em relação ao controle. No entanto, a linhagem 3 só apresenta aumento significativo na concentração de 620 mM de acetochlor. Portanto, as linhagens 1 e 2 comportam-se semelhantemente para essa característica diferindo da linhagem 3.

Tabela 4 – Análise de variância dos dados provenientes da quantificação de MDA em espectrofotômetro

FV	GL	QM	F
Tratamentos	8	1,4448	36,38**
Linhagem (L)	2	0,9690	24,20**
Meio (M)	2	3,7698	94,93**
LxM	4	0,5201	13,30**
Erro	18	0,0397	

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

$\bar{X} = 3,267$ e $CV(\%) = 6,09$

Tabela 5 – Análise de variância da Tabela 4 com desdobramento do fator Linhagem

FV	GL	QM	F
Linhagem 1	2	2,8942	72,88**
Linhagem 2	2	1,1918	30,01**
Linhagem 3	2	0,7241	18,23**

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

Figura 6 – Quantidade de MDA (mmol/g amostra) para as linhagens 1, 2 e 3 de *Klebsiella oxytoca* submetidas as concentrações de 0 mM, 62 mM e 620 mM de acetochlor. Médias com a mesma letra dentro de cada linhagem não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

4.5 Atividade das enzimas antioxidantes

4.5.1 Atividade da CAT em espectrofotômetro e em PAGE

Os resultados da análise de variância da atividade enzimática da CAT estão apresentados na tabela 6. Verificam-se pelo teste F, valores significativos ($P < 0,0001$) para os fatores linhagem e meio, assim como para interação. Portanto, pelo menos uma linhagem apresenta atividade enzimática diferencial das demais e para o fator meio pelo menos um deles contribui para diferenças na atividade enzimática.

Uma vez que observou-se interação significativa entre linhagem e meio, procedeu-se com o desdobramento de linhagem dentro de meio (Tabela 7). Observa-se na tabela 7 que as três linhagens apresentam diferença significativa dentro dos meios. Este fato está de acordo com a figura 7.

Na figura 7 as três linhagens apresentaram comportamento distinto para os mesmos tratamentos. A linhagem 1 apresentou aumento significativo na concentração de 62 mM seguido de queda na concentração 620 mM, no entanto a atividade nos meios com herbicida foi superior ao controle. A linhagem 2 apresentou também aumento significativo na concentração de 62 mM em relação ao controle e queda brusca na concentração 620 mM. A linhagem 3 apresentou

aumento significativo apenas na condição de 62 mM, sendo a atividade no meio 620 mM estatisticamente semelhante ao controle.

A concentração de 62 mM de acetochlor apresentou, em média, a maior atividade detectada para a enzima nesse experimento.

Para a atividade da CAT em PAGE (Figura 8) foi observado a presença de três isoformas ativas. Os resultados da análise densitométrica (Tabela 8) revelaram a indução de uma nova isoforma (II) na condição 62 mM, perda da atividade de duas isoformas (I e II) e redução da isoforma III na condição 620 mM para a linhagem 2 (cerca de 68%). Essas observações estão de acordo com os dados obtidos em espectrofotômetro (Figura 7).

Tabela 6 – Análise de variância dos dados provenientes da atividade enzimática da Catalase em espectrofotômetro

FV	GL	QM	F
Tratamentos	8	101,0530	34,47**
Linhagem (L)	2	80,3686	27,41**
Meio (M)	2	242,7285	82,79**
LxM	4	40,5575	13,83**
Erro	18	2,9319	

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

$\bar{X} = 19,29$ e $CV(\%) = 8,87$

Tabela 7 – Análise de variância da Tabela 6 com desdobramento do fator Linhagem

FV	GL	QM	F
Linhagem 1	2	57,790	19,71**
Linhagem 2	2	191,693	65,38**
Linhagem 3	2	74,360	25,36**

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

Figura 7 – Atividade específica de CAT (umol/min/mg proteína) para as linhagens 1, 2 e 3 de *Klebsiella oxytoca* submetidas as concentrações de 0 mM, 62 mM e 620 mM de acetochlor. Médias com a mesma letra dentro de cada linhagem não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Figura 8 – Atividade específica de CAT em PAGE para as linhagens 1, 2 e 3 de *Klebsiella oxytoca* submetidas ao tratamento com acetochlor. Padrão (P) CAT bovino; 1, 2 e 3 representam as concentrações 0 mM, 62 mM e 620 mM para a linhagem 1; 4, 5 e 6 para a linhagem 2 e 7, 8 e 9 para a linhagem 3 nas mesmas concentrações. As setas representam as isoformas de CAT

Tabela 8 – Análise densitométrica para a atividade de CAT em PAGE para as linhagens 1, 2 e 3 de *Klebsiella oxytoca* submetidas as concentrações de 0 mM, 62 mM e 620 mM de acetochlor. Os valores tabulados correspondem à variação da intensidade em relação aos seus respectivos controles para cada isoforma

Isoenzimas	Linhagem 1		Linhagem 2		Linhagem 3	
	62 mM	620 mM	62 mM	620 mM	62 mM	620 mM
CAT I	- 6,40%	- 8,33%	- 2,46%	**	+ 21,82%	- 1,33%
CAT II	+ 26,61%	+ 8,41%	*	**	- 18,38%	- 42,15%
CAT III	- 5,30%	- 8,91%	- 5,76%	-16,37%	- 4,02%	- 9,93%

* surgimento de uma nova isoforma e ** ausência de isoforma

4.5.2 Atividade da SOD em PAGE

Foi observada a presença de duas isoformas ativas de SOD nas três linhagens, sendo que a isoforma I apresentou maior atividade em relação a II para todas as linhagens e meios (Figura 9).

A análise da atividade de SOD em PAGE demonstrou que as três linhagens apresentaram comportamento semelhante para essa enzima na condição de 62 mM. Foi observado pequena indução na atividade da isoforma I nas linhagens 1 e 2 , 10,23% e 14,81%, respectivamente e aumento para a linhagem 3 (cerca de 48%) em relação ao controle (Tabela 9).

Na condição de 620 mM observou-se queda na atividade da isoforma I para as linhagens 1 e 3. Porém, nessa concentração, a redução mais acentuada da atividade foi encontrada para a isoforma II que foi reduzida drasticamente em todas as linhagens (Figura 9 e Tabela 9).

A isoforma I foi caracterizada como Mn-SOD (resistente a presença de KCN e H₂O₂) e a isoforma II como Fe-SOD (resistente a KCN e inativada na presença de H₂O₂) como apresentado na figura 10.

Figura 9 – Atividade específica de SOD em PAGE para as linhagens 1, 2 e 3 de *Klebsiella oxytoca* submetidas ao tratamento com acetochlor. Padrão (P) SOD bovino; 1, 2 e 3 representam as concentrações 0 mM, 62 mM e 620 mM para a linhagem 1; 4, 5 e 6 para a linhagem 2 e 7, 8 e 9 para a linhagem 3 nas mesmas concentrações. As setas representam as isoformas de SOD

Tabela 9 – Análise densitométrica para a atividade de SOD em PAGE para as linhagens 1, 2 e 3 de *Klebsiella oxytoca* submetidas as concentrações de 0 mM, 62 mM e 620 mM de acetochlor. Os valores tabulados correspondem à variação da intensidade em relação aos seus respectivos controles para cada isoforma

Isoenzimas	Linhagem 1		Linhagem 2		Linhagem 3	
	62 mM	620 mM	62 mM	620 mM	62 mM	620 mM
SOD I	+ 10,23%	- 24,40%	+ 14,81%	+ 2,09%	+ 48,73%	-14,68%
SOD II	- 5,63%	- 12,23%	+ 7,17%	+ 2,92%	-1,72%	-24,75%

Figura 10 – Determinação das isoformas de SOD em PAGE. Padrão (P) SOD bovino; (1) linhagem 3 na condição 62 mM; (2) linhagem 3 na condição 62 mM + KCN e (3) linhagem 3 na condição 62 mM + H₂O₂

4.5.3 Atividade da GR em espectrofotômetro e em PAGE

A análise de variância da atividade enzimática da glutathione redutase está apresentada na tabela 10. Verificam-se pelo teste F, valores significativos ($P < 0,0001$) para os fatores linhagem e meio, assim como para interação. Portanto, pelo menos uma linhagem apresenta atividade enzimática diferencial das demais e para o fator meio pelo menos um deles contribui para diferenças na atividade enzimática.

Foi realizado o desdobramento de linhagem dentro de meio (Tabela 11). Observou-se na tabela 11 que as três linhagens apresentam diferença significativa na atividade dessa enzima dentro dos diferentes meios. Este fato está de acordo com a figura 11.

Na figura 11 as três linhagens apresentaram comportamento semelhante, porém a linhagem 3 apresentou uma maior atividade total em relação as demais.

Observou-se que ocorreu diminuição gradativa e significativa da atividade a partir do meio controle até a condição de 620 mM de acetochlor. A condição controle apresentou, em média, a maior atividade detectada para a enzima nesse experimento.

Para a atividade da GR em PAGE (Figura 12) foi observado a presença de três isoformas (I, III e IV) na condição controle para as três linhagens, sendo a isoforma I mais ativa em relação às demais. Na condição de 62 mM, houve a indução da isoforma II nas linhagens 1 e 2 (Figura 12). Quanto à atividade total dessa enzima, as três linhagens responderam negativamente a presença do herbicida (Figura 12), ocorrendo um decréscimo gradativo na atividade com o respectivo aumento na dosagem de herbicida (Figura 11 e 12).

Essas observações estão de acordo com os dados obtidos em espectrofotômetro (Figura 11).

Tabela 10 – Análise de variância dos dados provenientes da atividade enzimática da glutatona redutase em espectrofotômetro

FV	GL	QM	F
Tratamentos	8	0,3965	538,40**
Linhagem (L)	2	0,0550	74,77**
Meio (M)	2	1,5204	2064,21**
LxM	4	0,0053	7,31**
Erro	18	0,0007	

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

$\bar{X} = 0,5523$ e $CV(\%) = 4,91$

Tabela 11 – Análise de variância da Tabela 10 com desdobramento do fator Linhagem

FV	GL	QM	F
Linhagem 1	2	0,5118	694,96**
Linhagem 2	2	0,4381	594,88**
Linhagem 3	2	0,5811	788,99**

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

Figura 11 – Atividade específica de GR (umol/min/mg proteína) para as linhagens 1, 2 e 3 de *Klebsiella oxytoca* submetidas as concentrações de 0 mM, 62 mM e 620 mM de acetochlor. Médias com a mesma letra dentro de cada linhagem não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Figura 12 – Atividade específica de GR em PAGE para as linhagens 1, 2 e 3 de *Klebsiella oxytoca* submetidas ao tratamento com acetochlor. Padrão (P) GR bovino; 1, 2 e 3 representam as concentrações 0 mM, 62 mM e 620 mM para a linhagem 1; 4, 5 e 6 para a linhagem 2 e 7, 8 e 9 para a linhagem 3 nas mesmas concentrações. As setas representam as isoformas de GR

Tabela 12 – Análise densitométrica para a atividade de GR em PAGE para as linhagens 1, 2 e 3 de *Klebsiella oxytoca* submetidas as concentrações de 0 mM, 62 mM e 620 mM de acetochlor. Os valores tabulados correspondem à variação da intensidade em relação aos seus respectivos controles para cada isoforma

Isoenzimas	Linhagem 1		Linhagem 2		Linhagem 3	
	62 mM	620 mM	62 mM	620 mM	62 mM	620 mM
GR I	- 21,70%	- 44,19%	- 21,61%	- 49,15%	- 15,17%	- 51,15%
GR II	*	**	*	**	**	**
GR III	- 59,55%	- 17,59%	-50,66%	+ 15,15%	- 14,26%	- 51,89%
GR IV	- 5,14%	- 25,06%	+ 2,39%	- 2,13%	+ 1,62%	- 12,99%

* surgimento de uma nova isoforma e ** ausência de isoforma

4.5.4 Atividade da GST em espectrofotômetro

A figura 13 mostra um teste realizado para determinação do melhor intervalo (minutos) de leitura da atividade da GST. De acordo com essa figura, foi estipulado que o intervalo ideal para a leitura das amostras é de 0 a 3 minutos, no qual existe uma variação crescente no decorrer do tempo, o que corresponde à cinética ideal da enzima com a amostra. Os minutos seguintes (4 a 8 minutos) não apresentaram linearidade na relação tempo/absorbância para a atividade dessa enzima nas amostras testadas.

Figura 13 – Variação da absorbância para o ensaio em espectrofotômetro da enzima GST para a linhagem 1 nas concentrações de 0 mM, 62 mM e 620 mM de acetochlor

A análise de variância da atividade enzimática da Glutathione-S-Transferase está apresentada na tabela 13. Verificam-se pelo teste F, valores significativos a 1% para os fatores linhagem e meio e para interação a 5%. Portanto, pelo menos uma linhagem apresenta atividade enzimática diferencial das demais e para o fator meio pelo menos um deles contribui para diferenças na atividade enzimática.

Foi realizado o desdobramento de linhagem dentro de meio (Tabela 14). Observou-se na tabela 13 que as linhagens 1 e 2 apresentaram diferença significativa na atividade dessa enzima

dentro dos diferentes meios, o que não foi observado para linhagem 3. Este fato está de acordo com a figura 14.

Na figura 14 as linhagens 1 e 2 apresentaram comportamento semelhante. Para essas linhagens, na condição de 62 mM, não houve diferença significativa na atividade quando comparado com o meio controle, entretanto, observou-se redução significativa na condição 620 mM de herbicida. A linhagem 3 apresentou comportamento uniforme nos três meios.

Tabela 13 – Análise de variância dos dados provenientes da atividade enzimática da Glutathione-S-Transferase em espectrofotômetro

FV	GL	QM	F
Tratamentos	8	0,00000602	13,03**
Linhagem (L)	2	0,00000630	13,62**
Meio (M)	2	0,00000150	32,53**
LxM	4	0,00000138	2,98*
Erro	18	0,00000046	

**, * significativo a 1% e 5% de probabilidade pelo teste F

$\bar{X} = 0,00489$ e $CV(\%) = 13,89$

Tabela 14 – Análise de variância da Tabela 13 com desdobramento do fator Linhagem

FV	GL	QM	F
Linhagem 1	2	0,00001161	25,14**
Linhagem 2	2	0,00000493	10,68**
Linhagem 3	2	0,00000124	2,69 ^{ns}

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

Figura 14 – Atividade específica de GST (umol/min/mg proteína) para as linhagens 1, 2 e 3 de *Klebsiella oxytoca* submetidas as concentrações de 0 mM, 62 mM e 620 mM de acetochlor. Médias com a mesma letra dentro de cada linhagem não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

5. DISCUSSÃO

Microrganismos são expostos aos efeitos tóxicos de fontes endógenas e exógenas estando sujeitos a vários tipos de estresse, tais como mudanças de temperatura, luz UV, condições do solo e ação de herbicidas (BLOCKHINA et al., 2003). Em exposição a herbicidas, esses microrganismos aumentam significativamente a geração de espécies ativas de oxigênio (EAOs) (STEVENS et al., 1995; ZABLOTOWICZ et al., 1995), causando estados de estresse oxidativo.

Dados de literatura sugerem que essas EAOs são continuamente geradas na presença de contaminantes ambientais como herbicidas, metais pesados e inseticidas (RISSO-DE et al., 2001; LEDIRACE et al., 2005). Entre os danos celulares causados por situações de estresse, pode-se citar a funcionalidade das proteínas, a qual pode ser afetada pelas EAOs tanto por oxidação das cadeias laterais dos aminoácidos, como por reações secundárias com produtos aldeídicos da peroxidação lipídica (SANDALIO et al., 2001).

Nesse estudo foram utilizadas três linhagens da bactéria *Klebsiella oxytoca* para analisar a resposta do sistema antioxidante na presença do herbicida acetochlor nas concentrações 0 (controle), 62 (concentração de campo) e 620 mM (dez vezes a concentração de campo). O experimento foi conduzido com o cultivo das bactérias em meio sólido. Optou-se por esse meio devido à observação de interferências no processo de extração protéica de bactérias cultivadas em meio líquido com herbicida, bem como em análises posteriores de atividade enzimática em PAGE.

A quantificação de proteínas totais foi determinada em espectrofotômetro nos tratamentos 0, 62 e 620 mM de herbicida para as três linhagens. Para a linhagem 2 não foi observada diferença no teor total de proteínas entre os tratamentos. Na linhagem 1, observou-se aumento somente na concentração de 620 mM e na linhagem 3, aumento nas duas concentrações com herbicida. O perfil protéico foi analisado em SDS-PAGE, no qual foi observado o surgimento de novas bandas apenas nas condições com herbicida.

A variação na quantidade de proteína, bem como a indução de novas bandas em SDS-PAGE está provavelmente relacionada com a resposta provocada pelo herbicida. Scandalios (2005) cita que a expressão de cerca de 30 proteínas diferenciais foi induzida em bactérias na presença de H_2O_2 , sendo que a expressão de cerca de 9 a 12 proteínas foi regulada pelo sistema OxyR. Guelfi (2001) estudando a resposta antioxidante de linhagens de fungo expostas ao metal pesado cádmio observou aumento na quantidade de proteínas na presença do metal, para a

linhagem CadG1. Em contraste, Pompeu (2005) observou descréscimo na quantidade de proteínas em células em suspensão de tabaco submetidas ao metal pesado níquel em relação ao controle.

Em bactérias existe um grupo de proteínas denominado de *usp* (bacterial universal stress protein). A produção dessas proteínas pode ser estimulada por uma variedade de condições, tais como a fase estacionária, falta de carbono, nitrogênio, fósforo, presença de metais e substâncias oxidantes (KVINT et al., 2003).

A alta produção de EAOs afeta diretamente os ácidos graxos polinsaturados de membranas desencadeando o processo de peroxidação lipídica. Esses ácidos graxos são degradados em uma grande variedade de produtos como aldeídos, porém, um dos mais intensivamente estudados é a produção de MDA (malonaldeído) (CABISCOL et al., 2000). Segundo Georgieva (2005), a peroxidação de lipídeos é um dos melhores preditores do nível de EAOs induzidas em situações de estresse.

Nesse estudo, danos nas membranas das linhagens de *Klebsiella oxytoca* foram estimados através da produção de metabólitos reativos ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), principalmente o malonaldeído (MDA), por espectrofotômetro, nas condições de 0, 62 e 620 mM do herbicida acetochlor.

Observou-se que as linhagens 1 e 2 apresentaram aumento na produção de MDA na condição de 62 mM, permanecendo constante na concentração de 620 mM. Diferentemente, a linhagem 3 só apresentou aumento na condição de 620 mM, ou seja, a peroxidação da membrana só ocorreu na maior concentração do herbicida. Esse fato sugere que a linhagem 3 pode ser menos sensível ao herbicida, quando se refere ao nível de estresse oxidativo gerado, do que as demais, já que na concentração de 62 mM comportam-se como no controle. Nessa mesma condição, constatou-se que as atividades das enzimas CAT e SOD encontravam-se elevadas, o que indica que essas enzimas contribuíram efetivamente no combate as EAOs na linhagem 3.

Choudhary et al. (2007) estudando o efeito de metais pesados na cianobactéria *Spirulina platensis*-S5 constatou aumento na produção de MDA. O acréscimo na concentração de metais no meio foi acompanhado de aumento na produção de MDA, estes resultados são semelhantes aos encontrados nas linhagens 1 e 2 na concentração de 62 mM.

Oruç e Üner (2000) analisaram o efeito combinado do herbicida 2,4 D e do inseticida azinphosmethyl no peixe *Oreochromis niloticus* e constaram que tanto em conjunto como separadamente, os pesticidas não causaram aumento na peroxidação de lipídeos. O mesmo

resultado foi constatado por Parida et al. (2003) estudando a planta *Bruguiera parviflora* sob diferentes concentrações de NaCl.

No trabalho de Becerra et al. (2006) foi analisado os danos oxidativos em duas linhagens de *Staphylococcus aureus*, uma resistente outra sensível ao antibiótico ciprofloxacina. Foi observado diferença entre as linhagens, sendo que na resistente não houve aumento na produção de MDA nos diferentes tratamentos. Esse comportamento é similar ao encontrado na linhagem 3 na condição de 62 mM quando comparado ao controle.

Esse fato evidencia que existe variabilidade entre linhagens da mesma espécie tal como observado por Semchyshyn et al. (2005) estudando linhagens de *Escherichia coli* e sensibilidade ao oxigênio.

Com relação ao controle genético, foi constatado que a peroxidação de lipídeos é regulada pelo gene *oxyR* (YOON et al., 2002). Em estudos realizados com mutantes de *Escherichia coli* para o gene *oxyR*, foi verificado que essa deficiência aumentou a sensibilidade aos agentes indutores de peroxidação lipídica, quando comparado com linhagens normais. Estes resultados indicam o importante papel do regulon *OxyR* na proteção das células contra peroxidação de lipídeos mediada por estresse oxidativo (YOON et al., 2002).

Para neutralizar ou combater os efeitos danosos causados pela geração de EAOs os organismos desenvolveram mecanismos de defesa, os quais podem ser divididos em enzimáticos e não-enzimáticos. Os enzimáticos envolvem a CAT, SOD, GR, GST, GPX dentre outras (SCANDALIOS, 2005). Nesse estudo foi avaliada a atividade das enzimas CAT, SOD, GR e GST.

A CAT é uma enzima tetramérica, que contém grupos heme e é encontrada em todos os organismos vivos. Devido à sua ampla distribuição e capacidade de degradar rapidamente o peróxido de hidrogênio, foi proposto que a CAT desempenha um papel fundamental nos sistemas que capacitam os organismos a viverem em ambientes aeróbicos. Essa enzima reage com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para formar H_2O e O_2 molecular (MATÉS, 2000).

Para o estudo da CAT foi realizado ensaio de atividade enzimática em espectrofotômetro e PAGE. As três linhagens apresentaram aumento na atividade dessa enzima na concentração de 62 mM, inclusive com indução de uma nova isoforma na linhagem 2, seguida de queda quando submetidas a 620 mM. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Lü et al. (2004) no qual foi investigado o comportamento de três espécies bacterianas (*Burkholderia cepacia* WZ1, *Escherichia coli* K12 e *Bacillus subtilis*) expostas a doses crescentes do herbicida quinclorac (0 –

500 $\mu\text{g L}^{-1}$). Os resultados mostraram que a atividade da CAT foi induzida positivamente até uma concentração média de 330 $\mu\text{g L}^{-1}$ seguida de queda na concentração mais alta.

Para a atividade em PAGE foi observado que a linhagem 2 se mostrou mais sensível a concentração de 620 mM quando comparada com as demais. A atividade das isoformas I e II reduziram drasticamente. Isso novamente demonstra que, existe resposta diferencial entre as três linhagens da mesma espécie.

Geoffroy et al. (2002) submeteram a micro alga *Scenedesmus obliquus* a concentrações crescentes dos herbicidas oxyfluorfen (0 – 64 nM) e diuron (0 – 62 nM), assim como a mistura dos dois e obteve os seguintes resultados: aumento na atividade quando tratadas com oxyfluorfen e ligeiro decréscimo na atividade na maior concentração de diuron e na mistura foi observada queda, tal fato é atribuído ao efeito antagônico do diuron em relação ao oxyfluorfen.

Em outro trabalho gêneros de bactérias foram expostas a 100 mg L^{-1} do inseticida acetamiprid em diferentes intervalos de horas, observando-se aumento na atividade CAT no intervalo de zero a três horas e em seguida ocorreu decréscimo na atividade o qual se manteve até as 24 horas de exposição. Também observou que a atividade da enzima ATPase caiu desde o primeiro momento após a aplicação do pesticida, sugerindo que esse pesticida afeta o metabolismo de ATP e conseqüentemente a atividade dessa enzima (YAO et al., 2006).

Essas observações sugerem que em determinadas concentrações de agentes tóxicos, a atividade de algumas enzimas aumenta, porém em concentrações mais elevadas, a atividade pode reduzir drasticamente, como foi observada para linhagem 2 na concentração de 620 mM, indicando que essa linhagem foi mais afetada pelo herbicida do que as outras, nas mesmas condições.

As SODs são enzimas que contêm metais ligados a sua estrutura e catalisam a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 (SCANDALIOS, 2005), regulando assim os níveis de oxigênio singlet e H_2O_2 que são substrato da reação que origina os radicais $\text{OH}^\bullet$, representando por isso, um papel central no mecanismo de defesa antioxidante (ALSCHER et al., 1998).

Para o estudo da SOD foi analisado atividade em PAGE não desnaturante. As linhagens apresentaram duas isoformas ativas, as quais foram caracterizadas como Mn-SOD (I) e Fe-SOD (II). A identificação das duas isoformas encontradas está de acordo com o observado para a maioria das bactérias, já que a isoforma Cu/Zn-SOD foi identificada em pequeno número de microrganismos, principalmente em microrganismos patogênicos (BATTISTONI, 2003).

Para todas as linhagens e concentrações de herbicida a isoforma I apresentou maior atividade. Na concentração de 62 mM foi observado pequeno aumento na indução da atividade da isoforma I nas linhagens 1 e 2, 10,23 e 14,81%, respectivamente e para a linhagem 3 (cerca de 48%) em relação ao controle. Já na condição de 620 mM observou-se queda na atividade da isoforma I para as linhagens 1 e 3. Porém, nessa concentração, a redução mais acentuada da atividade foi encontrada para a isoforma II, em todas as linhagens.

O comportamento da linhagem 3 foi diferente das demais, o qual assemelha-se ao encontrado por Lü et al. (2004) que observou aumento na atividade de SOD na concentração de 165 $\mu\text{g L}^{-1}$ do herbicida quinclorac para a bactéria *Bacillus subtilis* seguido de queda nas concentrações de 330 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. No mesmo estudo analisou-se a linhagem *Escherichia coli* K12, a qual não apresentou diferença significativa na atividade de SOD com o incremento das doses de herbicida. Esse resultados estão de acordo com os obtidos para as linhagens 1 e 2 na concentração de 62 mM.

Geslin et al. (2001) expôs *Escherichia coli* a diferentes metais pesados e estudaram a resposta de bactérias mutadas para os genes de *sodA* e *sodB*. Mutantes para apenas um dos genes exibiram resistência aos metais quando comparadas as linhagens não mutadas, porém para mutação dupla as células exibiram hipersensibilidade a baixas concentrações dos metais testados.

Em outro estudo, a bactéria *E. coli* foi transformada com o gene da Cu/Zn-SOD de *Drosophila*. A superexpressão desse gene aumentou drasticamente os níveis de SOD nos extratos citosólicos o que conferiu maior resistência ao herbicida paraquat (GOULIELMOS et al., 2003). Esses relatos reforçam a importância da SOD no combate as EAOs, já que essa enzima é considerada a primeira defesa acionada em situações de estresse oxidativo.

Bayliak et al. (2006) estudaram o efeito do H_2O_2 na atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e detectou que a atividade dessas duas enzimas está altamente correlacionada. Ele sugere que a CAT pode proteger a SOD contra a inativação causada por estresse oxidativo e *vice versa*. Essa implicação está de acordo com o comportamento encontrado para as três linhagens, nas quais foi observado aumento significativo da CAT na condição de 62 mM e indução da atividade da isoforma Mn-SOD (I) na mesma condição, bem como a redução da atividade das duas enzimas na concentração de 620 mM de herbicida.

Estudos com o gênero *Pseudomonas* e degradação de naftaleno revelaram que tais bactérias apresentaram um aumento significativo na produção do ânion superóxido e nas

atividades das enzimas SOD e CAT. Esse aumento foi alto quando comparado com a atividade em meio controle rico em glicose (KANG et al., 2006). Sugere-se que, uma razão para os resultados encontrados para essas enzimas é que o herbicida causa determinado estresse oxidativo na concentração de 62 mM, porém o aumento na atividade das enzimas CAT e SOD conseguiram combater os danos induzidos pelo herbicida na linhagem 3, visto que já foi discutido que essa linhagem não sofreu peroxidação lipídica submetida a essa concentração. Outra sugestão é que a isoforma Fe-SOD (I) foi mais afetada do que isoforma Mn-SOD (II) na condição de 620 mM devido essa concentração ser mais tóxica para uma do que para outra isoforma.

A glutathiona é uma das moléculas mais abundantes entre os tióis em bactérias, a qual tem como função a de proteção celular contra a ação de baixo pH, compostos clorados e estresse osmótico e oxidativo. Uma resposta adaptativa a estresse oxidativo ocorre na ativação de OxyR que induz a expressão de numerosos genes, inclusive o da enzima GR (MASIP et al., 2006). A enzima GR é uma oxiredutase envolvida na proteção de estruturas e biomoléculas celulares contra os danos oxidativos (IKEDI OBI, 2004), mantendo equilibrado os níveis de GSH e GSSG, glutathiona reduzida e oxidada, respectivamente, utilizando como fonte redutora o NADPH (CABISCOL et al., 2000).

Para o estudo da GR foi analisada atividade em espectrofotômetro e em PAGE. Foi observado um decréscimo gradativo na atividade total com o respectivo aumento da concentração de herbicida para as três linhagens, apesar da indução de uma nova isoforma nas linhagens 1 e 2 na condição de 62 mM. Os dados obtidos por espectrofotômetro estão de acordo com o observado em PAGE. As três linhagens se comportaram identicamente para a atividade dessa enzima.

Em estudos com linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e H_2O_2 foi demonstrado que com sucessivos aumentos desse agente estressante foi observado decréscimo na atividade da enzima GR (BAYLIAK et al. 2006). Em contraste com esses resultados, Geoffroy et al. (2002) observou aumento na atividade da GR em microalgas submetidas a doses crescentes dos herbicidas Oxifluorfen e Diuron. Oruç e Üner (2000), estudando o efeito de herbicidas em peixes e Parida et al. (2003), estudando plantas expostas a concentrações crescentes de NaCl também observaram aumento significativo na atividade da GR. Entretanto, Carmel-Hadel; Storz (2000) cita que mutantes de *E. coli* para o gene *gor* (GR) conseguiram manter os níveis de GSH e GSSG inalterados em relação ao tipo selvagem e sugerem que a GSSG pode ser reduzida independentemente da Glutathiona Redutase (GR).

As concentrações de herbicida testadas mostraram um efeito maior na resposta mediada pela GR, particularmente para a isoforma I, a qual é claramente predominante entre as isoenzimas encontradas dessa enzima e foi drasticamente reduzida na situação de alta concentração (620 mM) de acetochlor. Esse fato contribuiu significativamente para a queda drástica da atividade da GR na concentração de 620 mM de herbicida. Baseado nesses eventos bem definidos para GR, neste estudo pode-se afirmar que o padrão de comportamento observado para essa enzima pode ser usado como indicador de toxicidade desse herbicida.

Sugere-se ainda que outros mecanismos podem estar envolvidos na manutenção dos níveis de GSH + GSSG, como respostas via glutaredoxinas, as quais são proteínas responsáveis pela redução de pontes dissulfeto de outras proteínas. Essa redução pode desencadear a ativação de outros mecanismos, como o OxyR.

A GST é outra enzima que apresenta atividade com glutathione. Sua função é conjugar a GSH a xenobióticos e eletrofílicos endógenos, por isso tem fundamental participação na desintoxicação, muitas vezes sendo o papel central nestas vias metabólicas (MASIP et al., 2006).

A atividade da enzima GST foi analisada em espectrofotômetro. As linhagens 1 e 2 apresentaram comportamento semelhante, na condição de 62 mM não houve diferença significativa na atividade quando comparado com o meio controle, entretanto, observou-se redução significativa na condição 620 mM de herbicida. Já a linhagem 3 apresentou comportamento uniforme nos três meios.

Apesar de ser um antioxidante enzimático vital, esta enzima não tem seu papel bem estabelecido celularmente em procariotos. Sabe-se que apresenta baixa especificidade, o que a possibilita de interagir com muitos substratos (DIXON et al., 2002). Geoffroy et al. (2002) estudaram a resposta do sistema antioxidante em microalgas submetidas aos herbicidas diuron e oxyfluorfen e observaram que alterações na atividade da GST são dependentes das concentrações de herbicida testadas. Para o oxyfluorfen foi observado aumento na atividade dessa enzima decorrente do aumento da concentração de herbicida, já para a resposta ao diuron, observou-se acréscimo na atividade seguido de queda na concentração mais alta. Em estudos realizados com peixes expostos a herbicidas e inseticidas, foi constatado que isoladamente ou em conjunto, os tratamentos não afetaram a atividade da GST (ORUÇ; ÜNER, 2000). Esses mesmos autores citam outros trabalhos em resposta a herbicidas, nos quais foram detectados aumento, diminuição ou nenhuma alteração na atividade da GST e finalizam com a sugestão de que a atividade da GST

é dependente da espécie, bem como do tipo, concentração e período de exposição a xenobióticos. Isso demonstra a ampla variedade de respostas encontradas para a atividade dessa enzima.

As três linhagens de *Klebsiella oxytoca* estudadas nesse trabalho foram isoladas de solos que possuíam sistema de cultivos distintos (direto e convencional). As linhagens 1 e 2 foram isoladas de solo sob sistema de plantio convencional e a linhagem 3 sob sistema de plantio direto. Estudos avaliaram a persistência do herbicida acetochlor no solo em função do sistema de manejo e os autores concluíram que a palha na superfície do solo (plantio direto) aumenta a persistência desse herbicida no solo (FERRI, VIDAL 2003).

Yu et al. (2006) estudou o impacto na população de fungos, bactérias e actinomicetos de solo depois de sucessivas aplicações do pesticida chlorothalonil. Observou que após a primeira aplicação, a população de microrganismos reduziu drasticamente. Porém, após a segunda e terceira aplicação, esse efeito negativo foi diminuído. Depois de 21 dias de aplicação, selecionou três linhagens bacterianas capazes de utilizar esse pesticida como fonte de carbono e sugeriu que a capacidade de degradação desses microrganismos “surgiu” durante o experimento.

Diante dessas observações, sugere-se que a linhagem 3 ficou exposta por um maior período ao herbicida acetochlor. Isso pode estar relacionado à resposta diferencial dessa linhagem ao herbicida. Estudos sugerem que microrganismos biodegradadores apresentam estresse oxidativo reduzido em comparação com outras linhagens não degradantes (YAO et al, 2006). Sugere-se que o estudo da resposta antioxidativa de organismos na presença de xenobióticos são importantes para a compreensão de mecanismos de tolerância, biodegradação bem como para aplicação na biorremediação de ambientes contaminados.

6. CONCLUSÕES

- 1 – Existe comportamento diferencial entre as linhagens da mesma espécie *Klebsiella oxytoca* em relação a resposta ao estresse oxidativo causado pelo herbicida acetochlor;
- 2 – A concentração de 620 mM do herbicida acetochlor foi tóxica para todas as linhagens bacterianas;
- 3 – As enzimas CAT e SOD se mostraram mais eficientes no combate ao estresse oxidativo causado pelo herbicida.

REFERÊNCIAS

- ALLOCATI, N.; ACETO, A.; CELLINI, L.; MASULLI, M; DRAGANI B.; PETRUZZELLI, R.; DI ILIO, C. Effect of anaerobic environment on the glutathione transferase isoenzymatic pattern in *Proteus mirabilis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 147, p. 157-162, Fev., 1997.
- ALSCHER, R.G.; DONAHUE, J. L.; CRAMER, C.L. In: Responses of plant metabolism to air pollution and global change. DE KOK, L.J. STULEN, I. (eds). Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers, p.233-240, 1998.
- ANDERSON, K.M.; ELLS, G.; BONOMI, P.; HARRIS, J.E. Free radical spin traps as adjuncts for the prevention and treatment of disease. **Medical Hypothesis**, Penrith,. v.52, n. 1, p. 53-57, Jan. 1999.
- ANDREI, E. (Ed.). **Compêndio de Defensivos Agrícolas**. Guia Prático de Produtos Fitossanitários para uso Agrícola. Organização Andrei Editora, 2005. 1141p.
- AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes too transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigationn, in the leaves and roots of wild-tipe and catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen. v. 104, p. 280-292, Oct. 1998.
- BAILIAK, M.; SEMCHYSHN, H.; LUSHCHAK, V. Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzyme activities in *Saccharomyces cerevisiae* is strain_specific **Biochemistry**, Moscow, v. 71, n. 9, p. 1013_1020, Apr. 2006.
- BATTISTONI, A. Role of prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutase in pathogenesis. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 1, p. 1326-1329, 2003.
- BECERRA, M.C.; PÁEZ, P.L.; LARÓVERE, L.E.; ALBESA, I. Lipids and DNA oxidation in *Staphylococcus aureus* as a consequence of oxidative stress generated by ciprofloxacin. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 285, n. 1-2, p. 29-34, Apr. 2006.
- BLOCKHINA, O; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K.V. Antioxidants, oxidative damage, and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, London, v. 91, p. 179-194, Jan. 2003.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-259, Jan. 1976.
- CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **International Microbiology**, Lleida, v. 3, p. 3-8, 2000.
- CARMEL-HADEL, O.; STORZ, G. Roles of the Glutathione – and Thioredoxin – Dependent Reduction Systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces Cerevisiae* Responses to Oxidative Stress. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 54, p. 439-461, Oct. 2000.

CASH, T.P.; PAN, Y.; SIMON, C. Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 43, p. 1219-1225, 2007.

CHOUDHARY, M.; JETLEY, U.K.; KHAN, M. A.; ZUTSHI, S.; FATMA, T. Effect of heavy metal stress on praline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 66, n. 2, p. 204-209, Feb. 2007.

CORBI, J.J.; STRIXINO, S.T.; SANTOS, A.; DEL GRANDE, M. Diagnóstico ambiental de metais e organoclorados em córregos adjacentes a áreas de cultivo de cana-de-açúcar (Estado de São Paulo, Brasil). **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 61-65, jan./fev. 2006.

DELORENZO, M.E.; SCOTT, G.I.; ROSS, P.E. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review, **Environmental Toxicology Chemistry**, New York, v. 20, p. 84-98, Jul. 2001.

DIXON, D. P.; LAPTHORN, A.; EDWARDS, R. Plant glutathione transferases. **Genome Biology**, London, v. 3, p. 1-10, Feb. 2002.

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

FERRI, M.V.W.; VIDAL, R.A. Persistência do herbicida Acetochlor em função de sistemas de preparo e cobertura com palha. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33. n. 3. p. 399-404. mai-jun. 2003.

GEOFFROY, L.; TEISSEIRE, H.; COUDERCHET, M.; VERNET, G. Effect of oxyfluorfen and diuron alone and in mixture on antioxidative enzymes of *Scenedesmus obliquus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 72, p. 178-185, Mar. 2002.

GEORGIEVA, N.V. Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems – a review. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, Stara Zagora, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2005.

GESLIN, C.; LLANOSB, J.; PRIEURA, D.; JEANTHONA C. The manganese and iron superoxide dismutases protect *Escherichia coli* from heavy metal toxicity. **Research in Microbiology**, Paris, v. 152, n. 10, p. 901-905, Dec. 2001.

GOMES-JUNIOR, R. A.; DELITE, F. S.; POMPEU, G. B.; GRATÃO, P. L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, n. 8, p. 1330-1337, Nov. 2006.

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

GOULIELMOS, G.N.; ARHONTAKI, K.; ELIOPOULOS, E.; TSERPISTALI, K.; TSAKAS, S.; LOUKAS, M. *Drosophila* Cu,Zn superoxide dismutase gene confers resistance to paraquat in *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 308, p. 433–438, Aug. 2003.

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

GUELF, A. **Resposta das enzimas antioxidantes em linhagens do fungo *Asoergillus* sp. na presença do metal pesado cádmio**. 2001. 60 p. Dissertação (M.S. em Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

GUVEN, K.; YOLCU, M.; GUL-GUVEN, R.; ERDOGAN, S.; DE POMERAI, D. The effects of organic pesticides on inner membrane permeability in *Escherichia coli* ML35. **Cell Biology and Toxicology**, Dordrecht, v. 21, p. 73-81, Apr. 2005.

HERBICIDE handbook. 7th ed. USA: Weed Science Society of America, 1994. 352p.

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

HO, Y.; GARGANO, M.; CAO, J.; BRONSON, R. T.; HEIMLER, I.; HUTZI, R. J. Reduced fertility in female mice lacking Copper-Zinc Superoxide Dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, n. 13, p. 7765–7769, Mar.1998.

ICHISE N.; MORITA N.; KAWASAKI K.; YUMOTO I.; OKUYAMA H. Gene cloning and expression of the catalase from the hydrogen peroxide-resistant bacterium *Vibrio rumoiensis* s-1 and its subcellular localization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 90, n. 5, p. 530-534, Nov. 2000.

ICHISE, N.; MORITA, N.; HOSHINO, T.; KAWASAKI, K.; YUMOTO, I.; OKUYAMA, H. A mechanism of resistance to hydrogen peroxide in *Vibrio rumoiensis* S-1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 1, p. 73-79, Jan. 1999.

IKEDIABI, C.O.; BADISA, V.L.; AYUK-TAKEM, L.T.; LATINWO, L.M.; WEST, J. Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in CRL-1439 normal rat liver cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 14, n. 1, p. 87-92, Jul. 2004.

IL KIM, S.; CHOI, J.S.; KAHNG, H.Y. A proteomics strategy for the analysis of bacterial biodegradation pathways. **Omics – A Journal of Integrative Biology**, v. 11, n. 3, p. 280-294, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em:
<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/04112004ids.shtm>. Acesso em: 10 nov. 2007.

JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E.S.; KRUATRACHUE, M.; SAHAPHONG, S.; VICHASRI-GRAMS, S.; POKETHITIYOOK, P. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Toxicology**, New York, v. 18, p. 260-267, Jul. 2003.

KANAI, T.; TAKAHASHI, K.; INOUE, H. Three Distinct-Type Glutathione S-Transferases from *Escherichia coli* Important for Defense against Oxidative Stress. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 140, p. 703-711, Oct. 2006.

KANG, Y.S.; KIM, Y.J.; JEON C.O.; PARK, W. Characterization of naphthalene-degrading *Pseudomonas* species isolated from pollutant-contaminated sites: Oxidative stress during their growth on naphthalene. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 16, n. 11, p. 1819-1825, 2006.

KOLPIN, D.W.; BARBASH, J.E.; GILLIOM, R.J. Atrazine and Metolachlor occurrence in shallow ground water of the United States, 1993 to 1995: Relations to Explanatory Factors. **Journal of the American Water Resources Association**, Herndon, v. 38, p. 301-311, Feb.2002.

KOLPIN, D.W.; THURMAN, E.M.; LINHART, S.M. Finding minimal herbicide concentrations in ground water? Try looking for their degradates. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 248, n. 2-3, p. 115-122, Apr. 2000.

KOLPIN, D.W.; THURMAN, E.M.; LINHART, S.M. The environmental Occurrence of Herbicides: The Importance of Degradates in Ground Water. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 35, p. 385-390, 1998.

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

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

KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 12, p. 1244–1251, Dec. 2004.

KVINT, K.; NACHIN, L.; DIEZ, A.; NYSTROM, T. The bacterial universal stress protein: function and regulation. **Current opinion in microbiology**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 140-145, Apr. 2003.

LAABS, V., AMELUNG, W., PINTO, A., ZECH, W. Fate of pesticides in Tropical Soils of Brazil under Field Conditions. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 31, p. 256-268, Feb. 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Alexandria, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEDIRACE, N.; ANTHERIEU, S.; D'UBY, A. D.; CARON, J. C.; RAHAMANI, R. Effects of organochlorine insecticides on MAP kinase pathways in human HaCaT keratinocytes: key role of reactive oxygen species. **Toxicology. Science**, Orlando, v. 86, p. 444-452, Aug. 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 Sciences**, Chicago v. 159, p. 75-85, Oct. 2000.

LIU, S.R.; MINARD, R.D.; BOLLAG, J.M. Soil-catalyzed complexation of the pollutant 2,6-diethylaniline with syringic acid. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 16, p. 48-53, Jan. 1987.

LLEDIAS, F.; RANGEL, P.; HANSBERG, W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, n. 17, p. 10630-10637, Apr. 1998.

LU, Z.; MIN, H.; XIA, Y. The response of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Burkholderia cepacia* WZ1 to oxidative stress of exposure to quinclorac. **Journal of Environmental Science and Health. Part B—Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, New York, v. B39, n. 3, p. 431-441, Jan. 2004.

LÜ, Z.; MIN, H.; XIA, Y. The response of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Burkholderia cepacia* WZ1 to oxidative stress of exposure to quinclorac. **Journal of Environmental Science and Health. Part B—Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, New York, v. B39, n. 3, p. 431-441, Jan. 2004.

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

MALLICK, N.; MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 157, n. 2, p. 183-193, Aug. 2000.

MANO, E.B.; PACHECO, E.B.A.V.; BONELLI, C.M.C. **Meio Ambiente, Poluição e Reciclagem**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005. 1 ed. 182 p.

MARTINS, P.F.; MARTINEZ, C.O.; CARVALHO, G.; CARNEIRO, P.I.B.; AZEVEDO, R.A.; PILEGGI, S.A.V.; MELO, I.S.; PILEGGI, M. Selection of microorganisms degrading S-metolachlor herbicide. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 1, p. 153-159, Jan. 2007.

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

MONSANTO DO BRASIL. **Manual de Produtos da Monsanto do Brasil Ltda.** São Paulo, 2000. 8 p.

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

ORUÇ, E.Ö.; ÜNER, N. Combined effects of 2,4D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, New York v. 127, p 291-296, Dec. 2000.

PARAÍBA, L.C.; CERDEIRA, A.L.; SILVA, E.F.; MARTINS, J.S.; COUTINHO, H.C. Evaluation of soil temperature effect on herbicide leaching potential into groundwater in the Brazilian Cerrado. **Chemosphere**, Oxford ,v. 53, p. 1087-1095, Dec. 2003.

PARIDA, A.K.; DAS, A.B.; MOHANTY, P. Defense potentials to NaCl in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 161, p. 531-542, Nov. 2004.

POMPEU, G.B. **Análise da resposta oxidativa de células *in vitro* de fumo *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetidas ao metal pesado níquel.** 2001. 60 p. Dissertação (M.S. em Ecologia de Agroecossistemas. Área de concentração: Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

RADJENDIRANE, V., JOSEPH, P., JAISWAL, A.K., In: CADENAS, E., FORMAN, H.J. (Eds.), **Oxidative stress and signal transduction**. Chapman and Hall, New York, p. 441–469. 1997.

RISSO-DE, C. F.; DEVAUX, A; LAFAURIE, M; GIRARD, J. P; BAILLY, B; RAHMANI, R. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygene species, **Aquatic. Toxicology**, Amsterdam, v. 53, p. 65–76, Jun. 2001.

ROBERTS, T.R. (Ed.); HUSTON, D.H. **Metabolic Pathways of Agrochemicals**. Part one: Herbicides and Plant Growth Regulators. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2 ed., 1998. 849p.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de Herbicidas**. Londrina: IAPAR, 1998. 648p.

RUSHMORE, T.H.; PICKETT, C.B. Glutathione S-transferases, structure, regulation, and therapeutic implications. **The Journal Of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 268, n. 16, p. 11475-11478, Jun. 1993.

SANDALIO, L.M.; DALURSO, H.C.; GÓMEZ, M; ROMERO-PUERTAS, M.C.; DEL RIO, L.A. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 364, p. 2115-2126, Nov. 2001.

SATTIN, M., BERTI, A., ZANIN, G. Agronomic Aspects of Herbicide Use. In: VIGH, M.; FUNARI, E. (Ed.) **Pesticides Risk in Groundwater**, Boca Raton: Lewis Publishers, 1995. p. 45-70.

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

SCRIBNER, E.A.; THURMAN, E.M.; ZIMMERMAN, L.R. Analysis of selected herbicide metabolites in surface and groundwater of the United States. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 248, p. 157-167, Apr. 2000.

SEMCHYSHYN, H.; LUSHCHAK, V.; STOREY, K. Possible reasons for difference in sensitive to oxygen of two *Escherichia coli* strains. **Biochemistry**, Moscow, v. 70, n. 4, p. 424-431, Apr. 2005.

SETTE, L.D.; COSTA, L.A.M.A.; MARSAIOLI, A.J.; MANFIO, G.P. Biodegradation of alachlor by soil streptomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, p. 712-717, 2004.

STAMPER, D.M., TAINA, S.J., TOUVINE, O.H. Biodegradation of the Acetanilide herbicides alachlor, metolachlor and propachlor. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 24, p. 1-22, Mar. 1998.

TALALAY, P.; FAHEY, J.W.; HOLTZCLAW, W.D.; PRESTERA, T.; ZHANG, Y. Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 82/83, p. 173-179, Dec. 1995.

TOMLIN, C. (Ed.). **The pesticide Manual: Incorporating the agrochemicals handbook**. Surrey: BritishCrop Prot. Publish, 1994. 10 ed. 1341 p.

TSUI, M.T.; CHU, L.M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere**, Oxford, v. 52, p. 1189-1197, May. 2003.

VILLARREAL, D.T., TURCO, R.F., KONOPKA, A. Propachlor degradation by a soil bacterial community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 2135-2140, Aug. 1991.

VIRÁG, D.; NAÁR, Z.; KISS, A. Microbial Toxicity of Pesticide Derivatives Produced with UV-photodegradation. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 79, n. 3, p. 356-359, Sep. 2007.

XU, J.; QIU, X.; DAI, J.; CAO, H.; YANG, M.; ZHANG, J.; XU, M. Isolation and characterization of a *Pseudomonas oleovorans* degrading the chloroacetamide herbicide acetochlor. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 17, p. 219-225, 2006.

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

YE, C.M.; WANG, X.J.; ZHENG, H.H. Biodegradation of acetanilide herbicides acetochlor and butachlor in soil. **Journal Environmental Science**, v. 14, n. 4, p. 524-529, Oct. 2002.

YOON, S.J.; PARK, J.E.; YANG, J.H.; PARK, J.W. *OxyR* Regulon controls lipid peroxidation-mediated oxidative stress in *Escherichia coli*. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Kangnan-gu Seoul, v. 35, n. 3, p. 297-301, 2002.

YU, Y.L.; SHAN, M.; FANG, H.; WANG, X.; CHU, X.Q. Responses of soil microorganisms and enzymes to repeated applications of chlorothalonil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 26, p. 10070-10075, Dec. 2006.

ZABLOTOWICS, R.M.; LOCKE, M.A.; HOAGLAND, R.E., KNIGHT, S.S.; CASH, B. Fluorescent *Pseudomonas* isolates form Mississippi Delta oxbow lakes: In vitro herbicide biotransformations. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 9-19, Jan. 2001.