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

Análise da resposta antioxidativa bacteriana ao herbicida s-metolachlor

Paula Fabiane Martins

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

Piracicaba

2007

Paula Fabiane Martins
Bióloga

Análise da resposta antioxidativa bacteriana ao herbicida s-metolachlor

Orientador:

Prof. Dr. RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO

Dissertação apresentada para 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

Martins, Paula Fabiane

Análise da reposta antioxidativa bacteriana ao herbicida s-metachlor / Paula Fabiane
Martins. - - Piracicaba, 2007.
74 p. : il.

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

1. Bactérias – 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"

Dedico à...

**** ****
Deus *** mãe
pai aly gicka

****rafa****

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao Prof. Dr, Ricardo Antunes de Azevedo, pelas oportunidades, conselhos, e em especial à amizade.

À Gicka, pela amizade, confiança, companheirismo e atenção. Por todos os momentos que estivemos juntas, desde o planejamento ao alcance do objetivo. Em especial por sua compreensão!

Ao prof. Dr. Marcos Pileggi, pela ajuda, apoio e co-orientação no projeto.

À Salete, pela maravilhosa amizade e confiança, e por tudo que sua companhia me proporcionou. Obrigada por me ouvir e me aconselhar!

À Luciana pela amizade, apoio e confiança.

À Priscila pela amizade, apoio e colaboração.

Ao Léo, pela atenção e enriquecedoras discussões.

Aos amigos do laboratório, Bertha, Carla, Carol, Renata, Flávia, Léo, Fabrício e Vande, pela amigável convivência, em especial aos momentos de descontração.

Aos amigos Renato, Rico, Endson, Gustavo, Marise, Leandro, Luiz, Rafael pelos bons momentos compartilhados; e àqueles que não puderam estar presente em todos os momentos, mas que sempre me deram apoio incondicional, em especial a minha irmã Cami.

Aos meus pais, Paulo e Marta, pelo apoio incondicional, pelo amor infinito, e pelo rico exemplo de vida e inspiração. Ao meu irmão, Alysson, por todo o apoio, lealdade, orgulho e companheirismo. Todo meu amor a vc's!!

Ao Edson, Sônia e Carol, por me acolherem, e pela atenção e carinho dispensados.

Ao Rafael, pelo carinho e amor dispensado, em especial a sua atenção e companheirismo, que me incentivaram sempre.

Aos professores e funcionários do programa.

À ESALQ/USP por todo o apoio ao trabalho.

Ao CNPq e a FAPESP, pela concessão das bolsas.

À FAPESP pelo a apoio a pesquisa.

E a todos que de alguma forma estiveram presente na realização deste projeto.

SUMÁRIO

RESUMO	07
ABSTRACT	08
1 INTRODUÇÃO.....	09
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 Contaminação ambiental por pesticidas	10
2.2 Pesticidas e o impacto na microbiota do solo.....	11
2.3 S-metolachlor: características e vias de contaminação.....	12
2.4 Metabolismo de biotransformação do s-metolachlor	14
2.5 Sistema antioxidante de resposta.....	15
2.5.1 Sistema antioxidante em bactérias.....	16
2.5.1.1 Superóxido Dismutase (SOD)	17
2.5.1.2 Catalase (CAT)	19
2.5.1.3 Glutathione Redutase (GR)	20
2.5.1.4 Glutathione-S-transferase (GST).....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Material Biológico.....	24
3.2 Químico	24
3.3 Meio de cultura.....	24
3.4 Experimento	25
3.5 Identificação das espécies bacterianas.....	25
3.5.1 Extração de DNA.....	26
3.5.2 Protocolo de PCR para DNA ribossômico 16S	27
3.5.3 Purificação dos produtos de PCR	27
3.5.4 Sequenciamento e identificação do gene 16S DNA _r	28
3.6 Extração de proteínas.....	28
3.7 Determinação das proteínas.....	29
3.8 Variações nos padrões protéicos	29
3.9 Peroxidação de lipídios.....	30
3.10 Atividades das enzimas antioxidantes	30
3.10.1 Atividade da superóxido dismutase – SOD.....	31
3.10.1.1 Atividade em PAGE não desnaturante	31

3.10.1.2 Determinação das isoformas de SOD.....	32
3.10.2 Atividade da Catalase – CAT	32
3.10.2.1 Atividade em espectrofotômetro	33
3.10.2.2 Atividade em PAGE não desnaturante	33
3.10.3 Atividade de Glutathione redutase - GR	34
3.10.3.1 Atividade em espectrofotômetro	34
3.10.3.2 Atividade em PAGE	34
3.10.4 Atividade de Glutathione-S-transferase – GST	35
3.10.4.1 Atividade em espectrofotômetro	35
4 RESULTADOS	36
4.1 Identificação das espécies bacterianas.....	36
4.2 Quantificação de proteínas e variação do perfil protéico	36
4.3 Peroxidação lipídica	39
4.3.1 Quantificação de MDA em espectrofotômetro.....	39
4.4 Atividade de SOD em PAGE não desnatante	41
4.5 Atividade de CAT em espectrofotômetro e PAGE não desnaturante	43
4.6 Atividade de GR em espectrofotômetro e PAGE não desnaturante	46
4.7 Atividade de GST em espectrofotômetro	50
5 DISCUSSÃO.....	52
6 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXOS	72

RESUMO

Análise da resposta antioxidativa bacteriana ao herbicida s-metolachlor

O aumento da produção de espécies ativas de oxigênio (EAOs) é observado em resposta a uma variedade de agentes estressantes, incluindo herbicidas. Alguns estudos relacionam o sistema antioxidante com a proteção celular e a resistência aos agroquímicos. O s-metolachlor é um herbicida chloroacetanilida, de alta toxicidade e um dos agroquímicos mais frequentemente detectados em estudos de contaminação ambiental. Esse trabalho objetivou estudar a relação entre a toxicidade do herbicida e a resposta do sistema antioxidante em três bactérias isoladas de solo agrícola. Os microrganismos foram cultivados em meio nutritivo com doses crescentes de herbicida (0, 34 e 340 mM). Na maior dose de s-metolachlor, foi observada alta taxa de peroxidação lipídica, a qual reflete os danos causados pelo estresse oxidativo. O perfil protéico foi diferente entre as espécies bacterianas em análise de SDS-PAGE, porém não foi observada nenhuma diferença significativa entre as doses de s-metolachlor. As enzimas superóxido dismutase e catalase apresentaram indução da atividade na presença do herbicida a 34 mM, o que pode estar relacionado ao aparecimento de uma nova isoforma de CAT em análise de PAGE nativo. Para a enzima glutationa-redutase (GR), houve o aparecimento de novas isoformas na presença do herbicida, principalmente na concentração de 340 mM em PAGE. Já a atividade da glutationa S-transferase e da GR, em espectrofotômetro, refletiram a toxicidade do herbicida, apresentando queda em meio com maior dose de s-metolachlor. A variedade de respostas encontradas entre as bactérias foi muito maior do que o fator que produziu a resposta, sendo que esta diversidade pode condicionar o encontro de uma espécie bacteriana com vantagens na resistência ao herbicida. Os resultados sugerem que em baixas doses (34 mM), o herbicida pode induzir a atividade de algumas enzimas antioxidantes, porém, em doses maiores (340 mM) ele é tóxico para as bactérias.

Palavras - chave: S-metolachlor; Herbicida; Estresse oxidativo; Bactérias

ABSTRACT

Antioxidative response of bacteria to s-metolachlor herbicide

The increase of reactive oxygen species (ROS) production is observed in response to a variety of stressful agents, such as herbicides. Some studies can associate the antioxidant system with cell protection and resistance to agrochemicals. S-metolachlor is a chloroacetanilide herbicide of high toxicity and one of the most commonly detected agrochemicals in studies concerning environmental contamination. The objective of this work was to investigate the relation between the herbicide toxicity and the oxidative responses in three bacteria isolated from an agricultural soil. These microorganisms were cultivated in nutritive media in the presence of increasing herbicide concentrations (0 mM, 34 mM and 340 mM). At the high concentration of s-metolachlor, 340mM, lipidic peroxidation was observed, reflecting the damage caused by the oxidative stress. The protein profile was different among bacterial species in SDS-PAGE analyze, but no significant difference occurred between the different s-metolachlor dosages. The superoxide dismutase and catalase enzymes showed activity induction in the presence of 34 mM of s-metolachlor, which can be related to the emergence of a new CAT isoform in native PAGE analyze. In the case of glutathione-reductase (GR) it was also observed the induction of new isoforms in the presence of the herbicide, mainly in the 340 mM PAGE concentration. The activity of glutathione S-transferase and GR in spectrophotometer reflected the herbicide toxicity, it decreased in the media with the 340 mM of s-metolachlor. The variety of responses showed among the bacterias was much higher than the factor that induced the response. This diversity can lead to found bacterial species with advantages in herbicide resistance. The results suggest that at low doses (34 mM), the herbicide may induce the activity of some antioxidant enzymes, but in larger doses (340 mM) it is toxic to the bacteria.

Key-words: S-metolachlor; Herbicide; Oxidative stress; Bacteria

1 INTRODUÇÃO

A importância em se estudar herbicidas, deve-se ao aumento da contaminação ambiental por esses agentes, além de responderem a cerca de 50% da demanda de agroquímicos totais comercializados no mundo. Com a modernização da agricultura nos anos 60, houve um aumento no uso de pesticidas, fertilizantes e maquinaria para melhorar a produtividade do campo. Esta meta foi alcançada, embora o efeito colateral desta situação foi a intensa e abusiva utilização destes produtos químicos, o que gerou diferentes tipos de problemas. Um efeito deletério deste uso químico é o potencial para a contaminação de fontes de sistema hidrológico.

Para reduzir o risco da contaminação, é essencial compreender os fatores que afetam o comportamento dos pesticidas no ambiente natural, que envolve diversos fenômenos diferentes e frequentemente simultâneos. A biorremediação é um dos campos mais promissores da biotecnologia, e visa o emprego de microrganismos para degradar compostos tóxicos em metabólitos menos perigosos. Neste caso, o xenobiótico constitui uma fonte de energia bioquímica para o crescimento microbiano e os produtos deste metabolismo, de baixa toxicidade, podem entrar em ciclos biogeoquímicos.

O s-metolachlor é um herbicida representante da classe cloroacetanilida que possui toxicidade alta, mobilidade e é passível de sofrer lixiviação. Este conjunto de características pode permitir a contaminação da terra para a água e contribuem para uma maior frequência de detecção do herbicida em estudos de contaminação ambiental.

Em resposta ao contato com herbicidas, os microrganismos podem apresentar uma indução positiva na atividade de algumas enzimas antioxidantes, o que vem sendo relacionado à proteção celular contra as espécies ativas de oxigênio (EAOs) formadas na presença do xenobiótico. A indução do metabolismo antioxidante na presença de herbicida e diferenças no crescimento bacteriano podem ser melhor estudadas para compreendermos a degradação do herbicida sob vista da expressão gênica e regulação proteômica.

A maior parte do conhecimento sobre enzimas antioxidantes em bactérias é baseada em análises genômicas, havendo a necessidade de discriminar e determinar a função destas enzimas a nível bioquímico, principalmente quando estão relacionados a metabolismo de tolerância e desintoxicação de herbicidas

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Contaminação ambiental por pesticidas

O uso mundial de pesticidas tem aumentado substancialmente durante as últimas duas décadas, acompanhando as mudanças nas práticas agrícolas e na intensificação da produção de alimentos (KONSTANTINO et al. 2006).

Milhões de toneladas destas substâncias antropogênicas são aplicadas anualmente, contudo estima-se que menos de 5% desses produtos atinjam o organismo alvo (EERD et al., 2003). O remanescente pode ser depositado em solo, ser disseminado pelo ambiente através do movimento pelo ar ou água, ou ainda afetar adversamente organismos não-alvos (EERD et al., 2003; BALAGUÉ et al., 2000).

O uso dos pesticidas na agricultura, na indústria, e em aplicações domésticas, resulta na exposição crescente da população à estes produtos químicos (FERGUSON, 1999), trazendo novos desafios e preocupações associadas à saúde humana associado à exposição crônica a xenobióticos (MARONI et al., 2000).

Guilherme (1999) analisou a comercialização de pesticidas no Brasil, relatando que cerca de 60% do total de vendas foi representado pelos herbicidas. O uso de herbicidas em particular, aumentou substancialmente em decorrência do desenvolvimento de produtos mais específicos, da habilidosa comercialização por parte das indústrias químicas, da promoção ativa, da adoção dos métodos de preparo conservacionista da terra e do desenvolvimento de tecnologia de aplicação mais eficiente (FREEMARK; BOUTIN, 1995).

A aplicação abusiva de herbicidas e a alta persistência de muitos deles no ambiente, tem requerido um controle rigoroso na possibilidade de contaminação ambiental, principalmente em reservas de águas e em águas destinadas ao consumo humano (PARAÍBA et al., 2003).

Diversos estudos acerca de contaminação ambiental de pesticidas são relatados na literatura científica (FAVA et al., 2005; GUZELLA et al., 2006; HAARSTAD; LUDVIGSEN, 2007). Na distribuição de pesticidas, alguns pesticidas da classe cloroacetanilida são freqüentemente citados em estudos de contaminação, fato que geralmente está relacionado com o extensivo uso deles na agricultura (KONDA; PASZTOR, 2001; KOLPIN et al., 2002; LAABS et al., 2002; KONSTANTINO et al., 2006).

A presença do metolachlor, herbicida da classe cloroacetanilida, em estudos com amostras de água, tem sido freqüentemente citada na literatura não somente no Brasil (PARAÍBA et al., 2003; LAABS et al., 2002), como também em outros países, tais como Grécia, Itália, França e Estados Unidos (KONSTANTINOOU et al., 2006), nos quais sua representação alcança tanto áreas rurais como áreas urbanas (KOLPIN et al., 2002).

Konstantinou et al. (2006), em um estudo de contaminação de água, distingue os pesticidas em dois grupos, o primeiro formado por agroquímicos que ocasionalmente aparecem em amostras de água, como o pesticida propanil. Já o segundo grupo, ao qual pertence o herbicida s-metolachlor, é constituído por pesticidas que usualmente são encontrados nas águas superficiais e que têm alta aplicação, uso mais generalizado e são de fácil lixiviação.

O metolachlor aparece em um estudo feito no Aquífero Guarani (em grande parte localizado em território brasileiro) como um dos agroquímicos que deve ter atenção especial em seu monitoramento, devido a sua polaridade e alta persistência nos solos (LAABS et al., 2002).

2.2 Pesticidas e o impacto na microbiota do solo

O pesticida ideal seria tóxico somente para o organismo alvo, biodegradável e não apresentaria mobilidade suficiente para atingir águas subterrâneas. Entretanto, este raramente é o caso de pesticidas utilizados na agricultura moderna (JOHNSEN et al., 2001).

É evidente que a comunidade bacteriana de solo em sua estrutura pode ser significativamente alterada pela presença de pesticidas, mesmo que o metabolismo total de nitrogênio e carbono apareça inalterado. Isso pode ocorrer porque alguns microrganismos podem ser reprimidos enquanto outros podem proliferar nos nichos ecológicos tornados vagos pela ação dos pesticidas. Por sua vez, sucessões na comunidade microbiana vão ocorrer e, conseqüentemente, as atividades também serão alteradas (FREEMARK; BOUTIN, 1995; JOHNSEN et al., 2001).

Em um estudo com bactérias cultiváveis, Nicholson e Hirsch (1998), encontraram diferença entre a composição da população microbiana, entre solo tratado com pesticidas e solo controle. Bactérias nitrificantes representam um papel chave no ciclo do nitrogênio no solo, e podem também ser afetadas por aplicação de pesticidas (JOHNSEN et al., 2001).

A magnitude do impacto também pode estar relacionada à constituição química do pesticida, e conseqüentemente a sua toxicidade. Em uma descrição do impacto de três herbicidas

da classe fenilurea (diuron, linuron e clorotoluron) feita em comunidade microbiana de solo tratado regularmente com esses pesticidas por mais de 10 anos, observou-se diferenças significativas apenas para o herbicida linuron. Essas diferenças envolviam certas espécies microbianas que foram eliminadas ou estimuladas na presença do pesticida, ou mesmo diferença no estudo de degradação entre microbiota de solo tratado e do solo controle (FANTROUSSI et al., 1999).

Através da alta diversidade e grau de especialização, comunidades microbianas presentes no ambiente eficientemente degradam muitos poluentes (URGUN-DEMIRTAS et al., 2006). A biorremediação utiliza esse recurso para descontaminação ambiental. Em definição, é uma biotecnologia que usa de organismos vivos, principalmente microrganismos, para degradar contaminantes ambientais em formas menos tóxicas (VIDALI, 2001).

Como demonstrado por Vancov et al. (2007) para o herbicida atrazina, esta prática já vem sendo utilizada para descontaminação ambiental de pesticidas. Neste estudo, foram testados métodos para aumentar a sobrevivência de células em cápsulas utilizadas para a semeadura de *Rhodococcus erythropolis* NI 86/21 em meio líquido e solos agricultáveis.

2.3 S-metolachlor: características e vias de contaminação

O s-metolachlor é um herbicida representante da classe cloroacetanilida, isômero mais ativo do metolachlor, que foi substituído no mercado brasileiro em 1998 (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005), e é citado entre os mais utilizados em diversos países (CARACCIOLO et al., 2005; FRIEDMAN et al., 2006; KONSTANTINOOU et al., 2006).

No Brasil, é comercializado como Dual Gold (960g/L) ou também pode ser encontrado em mistura com atrazina (Primaiz Gold e Primestra Gold), sendo registrado para controle de daninhas em pré-emergência, com mecanismo de inibição de divisão celular e biossíntese de diversos componentes tais como lipídeos, proteínas, isoprenóides e flavonóides (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005).

As culturas em que comumente é aplicado, cana, milho e soja, as quais representam uma parcela expressiva no mercado, uma vez em 2006 foram as três maiores culturas da produção agrícola brasileira (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2007). Esta relevância, juntamente com outros fatores, tais como método e sincronismo de aplicação, são importantes para contribuir

em uma maior frequência de detecção do herbicida em estudos de análises de água (KONDA et al, 2001; KONSTANTINO et al, 2006).

O s-metolachlor apresenta alta mobilidade (WEBER et al., 2006), alta toxicidade - classe I (Figura 1), adsorção moderada, baixa volatilização e possibilidade de sofrer lixiabilidade (HEBICIDE HANDBOOK, 1998; LAABS et al., 2002; RODRIGUES; ALMEIDA, 2005). Este conjunto de características, colocam-no nas vias de contaminação da terra para a água (LAABS et al., 2002). Propriedades físico-químicas de herbicidas, além de características do solo, são importantes para o conhecimento do comportamento destes no ambiente (WEBER et al., 2006).

Stajner et al. (2003, 2004), estudando a toxicidade do metolachlor em plantas, o relatou que sementes de feijão, alface e ervilha apresentam inibição de crescimento em concentrações altas do herbicida. Em plantas jovens a inibição da atividade de enzimas do sistema antioxidante de resposta, como catalase e superóxido dismutase, foi fortemente observada na presença do metolachlor. Esses resultados foram relacionados com o potencial de ação do herbicida que destrói componentes do aparelho fotossintético.

Figura 1 - estrutura atômica do herbicida s-metolachlor. Seta aponta átomo de Cloro o qual é altamente relevante para a toxicidade (MARTINS et al., 2007)

Além de sua alta propriedade toxicológica (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005), o s-metolachlor é classificado pelo EPA como Grupo C “possível carcinogênico humano”, sendo que sua carcinogenicidade está relacionada com a ativação de vias metabólicas complexas direcionadas a um metabólito DNA-reativo (imine alquilbenzoquinona) (COLEMAN et al., 2000).

Dados de toxicidade em humanos para metolachlor são escassos. Alavanja et al. (2004) relatou uma associação entre câncer de pulmão e exposição ao metolachlor, característica comumente encontrada em trabalhadores rurais.

2.4 Metabolismo de biotransformação do s-metolachlor

O s-metolachlor apresenta degradação essencialmente microbiana, o que é característica da classe desse composto (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005), sendo a principal via de dissipação deste no solo (VILLAREAL et al., 1991). Sua fórmula [2-cloro-N-(2-etil-6-metilfenil)-N-(2-metoxi-1-metiletil) acetamina] contém anel aromático que dificulta a degradação total pelos microrganismos (HERBICIDE HANDBOOK, 1994; LAABS et al, 2002).

O metabolismo microbiano de acetanilidas é iniciado tipicamente pela aril acetamidases (HAMMOND; SCAWEN, 1983), as quais quebram o pesticida para formar os ácidos orgânicos e derivados de anilina. Segundo Postle (2004), através da ação de microrganismos do solo, os herbicidas são primeiramente transformados em ácido etanosulfônico (ESA) e ácido oxanílico (OA) (Figura 2), o que provavelmente ocorre pela remoção do átomo de cloro (decloração) dos compostos parentais e subsequente adição do grupo funcional.

Figura 2 - Estrutura química do metolachlor e seus metabólitos ESA e AO

Esses metabólitos são facilmente metabolizadas por microorganismos, com exceção de fragmentos do anel aromático (LIU et al., 1989), porém em estudo de metabolismo do metolachlor fungo *Cunninghamella elegans* foi observado 81% de metabolização do herbicida e a formação concomitante de 6 metabólitos, sendo que o citocromo P-450 e conjugação de GSH geralmente estão associados com este processo celular de biotransformação (POTHULURI et al., 1997, MARTINS et al., 2007).

A exposição de microrganismos à agroquímicos, mesmo quando relacionada somente à tolerância, pode levar a uma resposta de indução ao stress oxidativo (KONDA; PÁSZTOR, 2001;

GOULIELMOS et al., 2003), o qual pode interferir no metabolismo celular bacteriano, inibindo algumas enzimas, como a ATPase (LU; MINUTO; XIA, 2004), ou mesmo diminuindo o crescimento (GRUBER et al., 1990).

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

Em diversos organismos, o fator principal de transformação de agroquímicos da classe cloroacetanilida é a desintoxicação pela enzima Glutathione S-transferase (GST). Esta enzima do sistema antioxidante promove a conjugação entre o grupo tripeptídico da Glutathione e o composto acetanilida (STAMPER; TUOVINEN, 1998). O conjugado glutathione - acetanilida é degradado por carboxipeptidases (WOLF et al., 1996), por transpeptidases do gama-glutamil e por cisteína beta-liases (YAO; MIN; LV, 2006). O papel da conjugação da glutathione em bactérias tem sido demonstrado no processo de dechlorinação nos herbicidas cloroacetanilidas, o que caracteriza um potencial para o uso de GST's bacterianas em processos de biorremediação (EERD, et al., 2003).

2.5 Sistema antioxidante de resposta

Os organismos aeróbicos usam oxigênio molecular (O_2) na respiração ou na oxidação de nutrientes para obtenção de energia. Durante os processos metabólicos, o O_2 é reduzido por univulência, através de reações sequenciais, que podem ocasionar a formação das espécies ativas de oxigênio (EAOs) (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000).

Esses produtos do metabolismo aeróbico são altamente reativos, como Radical Superóxido ($O_2^{\bullet-}$), Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) e o radical Hidroxila ($OH^{\bullet}$), e são gerados constantemente (YAO; MIN; LV, 2006), não somente durante o crescimento microbiano, mas também em diversas situações do ambiente (MAHALINGAM; FEDEROFF, 2003; YAO; MIN; LV, 2006).

O aumento na concentração de EAOs para níveis que excedem a capacidade de defesa celular caracteriza o estresse oxidativo, sendo que este pode ser induzido em respostas a fatores bióticos e abióticos (MAHALINGAM; FEDEROFF, 2003). Os alvos biológicos da alta reatividade das EAOs são DNA, RNA, proteínas e lipídeos, sendo os lipídeos os principais alvos

durante o estresse oxidativo. Radicais livres podem atacar diretamente os ácidos graxos das membranas e dar início a peroxidação lipídica (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000).

O sistema antioxidante é uma defesa celular que confere, direta ou indiretamente, proteção contra efeitos adversos da formação de EAOs. Este sistema é constituído por algumas moléculas que são presentes constitutivamente no ambiente celular, porém também por enzimas específicas que são reguladas transcricionalmente (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000).

2.5.1 Sistema antioxidante em bactérias

As bactérias possuem um sistema de defesa específico contra estresse oxidativo. Envolvidos nesta resposta, estão a defesa específica contra radicais peróxidos, mediado por um ativador transcricional OxyR (Figura 3), e outra defesa contra superóxido, controlado por dois estágios do sistema SoxRS (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000).

Figura 3 – Ativação do gene *oxyR* por estresse oxidativo

Em resposta a um elevado fluxo de peróxido, o fator de transcrição OxyR é convertido para sua forma oxidada, ativando assim a expressão do gene *oxyR*, este por sua vez, controla a

expressão de outros genes, como o da enzima HPI catalase (CAT) e glutathione redutase (GR) (FARR; KOGOMA, 1991; CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000).

Já o sistema (regulon) SoxRS, contém pelo menos 10 genes, incluindo os genes que codificam a enzima Mn-SOD (Mn- Superóxido Dismutase), uma das classes de enzimas SOD, as quais têm sua atividade correlacionada com mecanismos de sobrevivência a herbicidas (STAJNER et al., 2003/4).

Em resposta ao contato com herbicidas, os microrganismos podem apresentar uma indução positiva na atividade de algumas enzimas antioxidantes (Superóxido Dismutase -SOD e Catalase - CAT), ou mesmo podem apresentar novas isoformas, como em *Escherichia coli* tratada com o agroquímico quinclorac (LU; MINUTO; XIA, 2004). Vuilleumier e Pagni (2002) exploram em sua revisão o papel da enzima antioxidante Glutathione S-transferase de bactérias, e enfatizam o potencial natural apresentado por esta enzima na degradação de compostos recalcitrantes. Alguns elementos do sistema antioxidante vêm sendo citados como responsáveis pelas primeiras transformações de agroquímicos (ZABLOTOWICZ et al., 1995).

Geralmente a indução positiva do metabolismo antioxidativo, exposto a herbicida, vem sendo correlacionada com a proteção contra danos celulares causado por esses xenobióticos (GOULIELMOS et al., 2003; BHATTACHARYA et al., 2004), tais como redução na taxa de crescimento (BHATTACHARYA et al., 2004) ou a inibição do crescimento bacteriano (GRUBBER et al., 1990) e até mesmo repressão de fimbriação (BALAGUÉ et al., 2001).

A maior parte do conhecimento sobre enzimas antioxidantes em bactérias é baseada em análises genômicas. Há, porém, a necessidade de discriminar e determinar a função destas enzimas em nível bioquímico, principalmente quando estão relacionados ao metabolismo de tolerância e desintoxicação de herbicidas (EERD et al., 2003).

2.5.1.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A Superoxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1.) está presente em organismos aeróbios e anaeróbios facultativos, atuando na desintoxicação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) via reação de dismutação, gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 (McCORDE, 1969). É a primeira enzima de defesa contra danos provocados por EAOs nas células (ALSCHER, 1997), tendo sua atividade correlacionada com mecanismos de sobrevivência a herbicidas.

As SODs são metaloenzimas multiméricas, e são distinguidas por seu cofator metal e sua localização celular (KEITH; VALVANO, 2007). Essas enzimas têm sido classificadas em quatro grupos (MATÉS, 2000; OKAMOTO et al., 2001):

- manganês (Mn) SOD-A: presente na maioria das bactérias e em eucariontes tem importante papel na mitocôndria, vem sendo relacionada a proteção em bactérias infecciosas no organismo hospedeiro, é equivalente a Fe-SOD;
- ferro (Fe) SOD-B: localiza-se no citoplasma, é presente também em bactérias anaeróbicas;
- cobre/zinco (Cu/Zn) SOD-C: presente também no espaço periplasmático em bactérias, geralmente não é requerida para crescimento bacteriano em condições laboratoriais;
- níquel (Ni) SOD: encontrada em uma fração citosólica da bactéria do gênero *Streptomyces*, foi identificada mais um grupo da enzima (MATÉS, 2000; OKAMOTO et al., 2001; KEITH; VALVANO, 2007).

Em *Eschechiria coli* têm sido descritas duas SODs: a Fe-SOD e a Mn-SOD, a qual é predominante durante o crescimento aeróbico, e cuja expressão é transcricionalmente regulada por no mínimo seis sistemas de controle. Existe ainda uma terceira atividade de SOD nesta bactéria, com propriedades semelhantes a Cu/Zn-SOD eucariótica, e que tem sido encontrada no espaço periplasmático (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000).

Em estudo com a bactéria *Burkholderia cenocepacia* esta proteína antioxidante periplasmática foi caracterizada como SOD C (cofator Cu/Zn), protegendo a bactéria de $O_2^{\bullet-}$ exógeno *in vitro* e contribuindo para resistência a morte por produtos oxidantes produzidos por macrófagos (KEITH; VALVANO, 2007).

A enzima Fe-SOD é considerada a mais importante para proteção citoplasmática de microrganismos contra o perigo do estresse oxidativo (GRUBBER et al., 1990), entretanto, quando uma bactéria foi transformada com o vetor de um gene de outra enzima SOD (Cu/Zn) de *Drosophila sp*, também houve um aumento na resistência e um crescimento diferenciado relacionados à sobrevivência em meio contendo o pesticida paraquat (GOULIELMOS et al., 2003).

Em estudo com bactérias *E. coli* e *Bacillus subtilis*, o aparecimento de isoformas da enzima SOD caracterizou o metabolismo de resposta ao estresse causado pelo quinclorac (LU; MINUTO; XIA, 2004) e acetamiprid (YAO; MIN; LV, 2006). E em relação a este último

pesticida, houve também um aumento da atividade da enzima para otimizar a resposta metabólica.

Diferenças na atividade de SOD em bactérias podem estar relacionadas com a degradação do xenobiótico. Yao et al. (2006) sugere que linhagens de *Pseudomonas* FH2 degradantes de pesticida acetamiprid apresentam atividade de SOD mais baixa que bactérias não degradante. O comportamento de metabolizar o pesticida implica que a bactéria pode reduzir algum estresse oxidativo.

2.5.1.2 Catalase (CAT)

A Catalase (CAT, EC.1.11.1.6.) tem um papel crucial na remoção do peróxido de hidrogênio gerado como produto da respiração aeróbica celular. Catalases bacterianas são classificadas em dois grupos, dependendo de suas propriedades enzimáticas e de homologia entre as seqüências de aminoácidos: catalases monofuncionais e catalase-peroxidases (NADLER et al., 1986).

Catalase-peroxidases (CP) exibem ambas as atividades catalítica e peroxidativa, ou seja, decompõem o H_2O_2 em água e oxigênio, reduzindo o peróxido em água utilizando redutores intracelulares (PAASARDI et al., 2007). Ao contrário das catalases monofuncionais que estão presentes em todos os organismos vivos, as CP's têm sido encontradas somente em bactérias e alguns fungos (NADLER et al., 1986).

A distribuição de catalases em bactérias é bastante variada. *Escherichia coli* produz duas catalases: HPI codificada pelo gene *katG* e HPII (catalase monofuncional) codificada pelo gene *katE*, os quais são induzidos independentes pelo gene *oxyR* e pelo gene *rpoS*, respectivamente (JUNG; KIN, 2003). Na espécie *Pseudomonas putida*, Hishinuma et al. (2006) relata que o gene *oxyR* é o responsável pelo controle da expressão de dois genes das maiores catalases, *katA* e *katB*. A CAT pode estar presente no citoplasma ou também no espaço periplasmático bacteriano (ICHISE, 2000) e pode apresentar variações de concentração conforme a espécie em questão (ICHISE et al., 1991).

Quando expostas a pesticida, certas bactérias aumentam a atividade de CAT para combater o estresse oxidativo (YAO; MIN; LV, 2006). Mais especificamente em herbicidas, estudos com células enriquecidas com catalase, mostram que elas apresentam uma maior sensibilidade na presença do paraquat (TAYLOR et al., 1993). Em estudos com eucariontes,

Stajner et al. (2003/4) verificou que sementes de plantas, tais como feijão e alface, respondem com decréscimo na atividade das enzimas CAT e SOD a presença de metolachlor, sendo a resposta foi proporcional ao aumento da concentração do xenobiótico.

2.5.1.3 Glutathione Redutase (GR)

A glutathione reduzida é um importante metabólito no combate às EAO's (especificamente $O_2^{\bullet}$ e H_2O_2) via o ciclo Halliwell-Asada. Membro da família de flavoproteínas oxiredutases, sua estrutura é constituída por um grupo prostético flavina adenina dinucleotídeo (FAD) transferidor de elétrons que catalisa a redução dependente de NADPH da glutathione oxidada (GSSG) para glutathione reduzida (GSH) (SCRUTON et al., 1987; MASIP et al., 2006).

A expressão da enzima glutathione-redutase é feita através do gene *gor*, sendo que a regulação é através do fator transcricional OxyR (MASIP et al., 2006), que controla por sua vez outros genes que codificam enzimas de defesa ao estresse oxidativo (figura 3) (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000). O gene *gor* é amplamente distribuído entre bactérias, fungos, plantas, protozoários e animais. Todas as GR's isoladas de diferentes origens apresentam homologia, possuindo elevada conservação durante a evolução (SMIRNOVA; OKTYABSKY, 2005).

Um importante ponto na resposta do gene *oxyR* ao estresse oxidativo por peróxido, é que a reação entre GSH:GSSG, catalisada pela enzima GR, pode influenciar a formação de pontes dissulfetos na ativação do gene *oxyR* (MASIP et al., 2006).

A ativação do gene *oxyR*, acarreta também a ativação da enzima GR e glutaredoxin, além da indução de enzimas como catalase e peroxidase, caracterizando uma resposta rápida para condições oxidativas (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000).

Em *E. coli*, o gene *gor* também está sob controle independente de *oxyR* por uma subunidade alternativa σ de RNA polimerase (RpoS), a qual é regulada por vários agentes estressantes, o que envolve a GR em um circuito regulatório global de adaptação bacteriana a várias condições de estresse (SMIRNOVA; OKTYABSKY, 2005).

Além disso, estas vias podem estar relacionadas com degradação de xenobióticos, como em estudo realizado com bactérias do gênero *Pseudomonas*, isoladas de áreas onde foram aplicados herbicidas organoclorados, no qual 70% das amostras metabolizavam os resíduos do herbicida via conjugação com a glutathione (FERGUSON, 1999). Também foi observado que em

E. coli a via principal de desintoxicação celular para produção de substâncias menos tóxicas é pela Glutathione (MASIP et al., 2006).

2.5.1.4 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). Diversas GSTs foram caracterizadas em animais, associadas a metabolização de compostos xenobióticos e toxinas. Além de participarem em processos de desintoxicação por formação de conjugados com GSH, as GSTs possuem papel no metabolismo de produtos secundários, incluindo a estabilização de flavonóides (MATTSON, 1998); pois 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.

A larga família de GST's é dividida em classes segundo a homologia entre as seqüências, sendo que na classe β estão as enzimas representantes bacterianas. A primeira GST bacteriana a ser caracterizada foi a diclorometano dehalogenase, seqüencial e funcionalmente (VUILLEUMIER; PAGNI, 2002).

Em estudo com a bactéria *Burkholderia cepacia* AC1100, o gene da enzima GST foi encontrado junto de outros genes relacionados à degradação do herbicida 2,4,5- ácido triclorofenoxiacético, como mostra a figura 4 do operon bacteriano (VUILLEUMIER; PAGNI, 2002).

Figura 4 - Operon de degradação do herbicida 2,4,5 T (U19883) da bactéria *Burkholderia cepacia*

A enzima GST está envolvida em um variável número de reações, e catalisa a desintoxicação do metabolismo alterado por xenobióticos, drogas, luz U.V., metais pesados e carcinogênicos, protegendo assim as células do estresse oxidativo (TALALAY et al., 1995). Em algumas bactérias, como as gram-negativas metilotróficas, as GST's são o elemento central do metabolismo de hidrocarbonetos clorados, assim como em diversos organismos. O fator principal de transformação de agroquímicos, como o metolachlor da classe acetanilida é a desintoxicação pela enzima Glutathione S-transferase (STAMPER; TUOVINEN et al., 1998).

Em um estudo com GST de planta de milho, Rossini et al. (1998) encontraram várias formas da glutathione complexada com herbicidas da classe acetamida, entre eles o metolachlor (Figura 5).

Zablutowicz et al. (1995) estudou a atividade da GST em bactérias de rizosfera comparando a atividade com substrato CDNB e o herbicida alachlor. Entre as espécies estudadas, a atividade da GST-CDNB foi alta em bactérias gram-negativas como *Pseudomonas putida* e *Klebsiella planticola*. Porém, quando analisada a enzima GST no ensaio apenas com o substrato alachlor, foram observados baixos valores na atividade da enzima e somente nas linhagens das famílias *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonaceae*.

Figura 5 - Fórmula química do complexo herbicida metolachlor-GSH

A localização celular de GST em bactéria foi reportada em um estudo de Tamburro et al. (2004), sendo encontrada tanto no citoplasma, próximo ao envelope celular, como no espaço periplasmático. Além de caracterizar a localização, o estudo mostrou um número maior de enzima GST em resposta a concentrações tóxicas de 4-clorofenol.

Estudos relacionados a investigação das funções e associações metabólicas da diversidade de GST's, apresentam, muito provavelmente, potencial para a futura aplicação biotecnológica desta enzima na desintoxicação ambiental (VUILLEUMIER; PAGNI, 2002).

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 testadas três espécies de bactérias gram-negativas de solos, isoladas e caracterizadas em estudos anteriores, realizados na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), pela orientação do prof. Dr. Marcos Pileggi. Duas espécies foram originadas de solo agricultável sob sistema de plantio convencional e uma de solo sem o contato com o herbicida testado (húmus de *Ascomycota*).

3.2 Químico

O herbicida s-metolachlor (283,8 g) foi adquirido comercialmente sob produto Dual Gold (960 g/L). A base para sua diluição em meio de cultura foi feita nas especificações do produto, como preparo da calda (2 L/200 L) e volume por hectare (2 L/ha), e de acordo com o descrito pelo Melo & Azevedo (1997), com sua concentração baseada nas recomendações para uso em campo.

Foram testadas três doses de s-metolachlor, meio controle com 0 mM, meio com concentração de utilizada em campo (34 mM) e meio com concentração de 10x a de campo (340 mM) (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005).

3.3 Meio de cultura

Foi utilizado meio de cultura completo, adquirido da Biobrás, contendo:

Ágar bacteriológico	15 g/L
Cloreto de sódio	8 g/L
Extrato de carne	3 g/L
Peptona de gelatina	5 g/L

O pH é $6,8 \pm 0,2$, não precisando de ajustes. O meio foi esterelizado em autoclave sob 1 atm por 20 min.

Para os tratamentos com herbicida, foi acrescido o s-metolachlor ao meio de cultura completo autoclavado em duas concentrações, 34 e 340 mM. O herbicida foi adicionado somente quando o meio de cultura estava em temperatura ambiente e antes de solidificar, portanto não sendo autoclavado, cuidado tomado para manutenção da integridade de suas características.

3.4 Experimento

O experimento foi composto por três tratamentos: controle (meio de cultura completo sem herbicida, 0 mM), tratamento com 34 mM de s-metolachlor e tratamento com 340 mM, concentrações baseadas nas recomendações para uso em campo.

Cada espécie bacteriana foi cultivada nos três tratamentos, na ausência de luminosidade e a 30°C, sendo que cada parcela foi formada por quatro placas de Petri. Estas condições foram otimizadas e se mostraram as melhores para cultivo destas bactérias em estudos.

O experimento foi feito em Delineamento Inteiramente Casualizado com três repetições e os tratamentos fatoriais foram as combinações entre três espécies bacterianas versus três tratamentos. Quando necessário, a análise de variância ainda foi constituída de desdobramento e os dados avaliados por Teste de Tukey.

3.5 Identificação das espécies bacterianas

As linhagens bacterianas estavam identificadas por ITS (por meio de amplificação de seqüências espaçadoras entre os genes codificantes de RNA ribossômico 16S e 23S), conforme Martins (2007). Entretanto, para confirmação da identificação e para dados mais confiáveis, foram novamente identificadas através de análise da seqüência do gene ribossômico 16S segundo SOBRAL et al.(2004).

3.5.1 Extração de DNA

O DNA bacteriano foi extraído com protocolo adaptado de Araújo et al. (2002). As soluções utilizadas para extração foram:

1. Tampão de extração (TE)

10 mL de Tris HCl 1 M, pH 7,5

2 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0

Água destilada q.s.p. 1000 mL

2. Solução de Rnase

Tris HCl 10 mM, pH 8,0

NaCl 15 mM

Rnase 10 mg/mL

As bactérias foram cultivadas em meio líquido completo (7 mL) a 30°C. Atingido 12 horas de crescimento, a suspensão bacteriana foi coletada em tubos eppendorf de 1,5 mL e centrifugada por 5 min. a 9.700 g.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 500 µL de tampão de extração (TE) e novamente centrifugado na mesma condição da etapa anterior. Após isso, o precipitado foi ressuspenso em 500 µL de TE, no qual foi adicionado 60 µL de SDS 10% e duas pás de sílica para ser feita agitação no “bead beating” por 30 segundos (40 vezes por segundo).

Ao término da agitação, foi adicionado 500 µL de fenol saturado e homogeneizada a solução, para realização de uma centrifugação (10 min. por 9.700 g), da qual a fase superior resultante foi utilizada para a etapa seguinte.

A esta fase, foi adicionado 6 µL da solução de Rnase e incubada por 30 min. a 37°C. Após esse período, foi feita mais uma centrifugação a 5 min. a 9.700 g com adição de 200 µL de fenol e 200 µL de clorofórmio ao volume total da suspensão.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi acrescentado 0,1 volume de NaCl 5 M e 0,6 volume de isopropanol, com uma nova etapa de incubação de 5 min. a temperatura

ambiente. O sobrenadante foi então descartado, depois da centrifugação por 10 min. a 9.700g, e o precipitado (DNA) foi lavado com 400 μ L de etanol 70% e centrifugado por 2 min. a 9.700 g.

Descartado o sobrenadante, o DNA (precipitado) foi secado a 37°C, ressuspendido em 50 μ L de água milli-Q e estocado a -20 °C.

3.5.2 Protocolo de PCR para DNA ribossômico 16S

A reação de amplificação do DNA_r 16S ocorreu em 50 μ L de uma mistura que continha 1 μ L (0,5 – 10,0 ng) do total de DNA, 0,2 μ M de primer P027F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 0,2 μ M de primer 1378R (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3'), 200 μ M de cada dNTP, 3,75 mM de MgCl₂ e 0,05 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) em 20 mM de Tris-HCl contendo 50 mM de KCl. Além das amostras em duplicatas, foi incluído um controle negativo (branco – mistura de PCR sem amostra de DNA) no experimento.

As condições de termociclagem foram: um ciclo inicial de 94°C por 4 min. seguidos de 25 ciclos intermediários de 94°C por 30s, anilamento a 63°C por 1 min. e extensão do primer a 72°C por 1 min., seguidos de uma extensão final a 72°C por 7 min. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% com volume aplicado de 5 μ L da mistura da reação de PCR e as bandas foram marcadas com brometo de etídio e visualizadas com luz ultravioleta.

3.5.3 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 min. e, ao final, o volume deve ser completado para 50 mL.

A reação foi iniciada em um tubo eppendorf de 1,5 mL, no qual foi adicionado 50 μ L do produto de PCR e 50 μ L da solução de PEG, sendo a solução misturada com auxílio de uma pipeta e incubada por 15 min. a 37°C. Em seguida, o tubo foi centrifugado a alta velocidade (~15000 g) por 15 min. a temperatura ambiente. Com ajuda de uma pipeta, todo o sobrenadante foi retirado e descartado.

Ao pelet, foi adicionado 125 μ L de etanol 80% gelado (de boa qualidade), correndo 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 μ L de tampão de extração ou água Milli-Q.

3.5.4 Seqüenciamento e identificação do gene 16S DNA_r

Para identificação, os produtos do PCR foram purificados usando GFX PCR DNA e kit para purificação de banda em gel (Amershan Bioscience).

O seqüenciamento foi usando o primer 1378R, e a análise das seqüências foi feita através do alinhamento com seqüências de dada-base do programa BLAST (Centro Nacional de informação biotecnológica, website: [HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)).

3.6 Extração de proteínas

As amostras foram coletadas através da raspagem de quatro placas (uma parcela) com auxílio de espátulas e foram colocadas em um mortar, no qual foi adicionado nitrogênio líquido. Em seguida as amostras foram maceradas até formar uma farinha e posteriormente, foi adicionado o tampão de extração. Todo o procedimento foi realizado a temperatura de 4°C, inclusive com uma maior atenção para as soluções adicionadas e frascos utilizados, para manutenção da integridade das proteínas, e consequentemente da atividade enzimática.

Os materiais foram homogeneizados no tampão de extração na proporção de 1g de amostra/ 4 mL de tampão e em seguida o homogeneizado foi centrifugado à 12.100 g por 30 min. à 4°C. O sobrenadante foi coletado e dividido em alíquotas para serem estocadas em freezer -80°C até o momento das análises (GOMES Jr et al., 2007).

- **Tampão de extração**

Tampão fosfato de potássio 100 mM (ph 7,5) contendo 1mM de EDTA, 3 mM de DTT e 4% (p/v) de PVPP).

3.7 Determinação das proteínas

Foi utilizado o método de Bradford (1976), para as determinações da concentração de proteínas totais, utilizando-se o BSA(“bovine serum albumin”) como padrão.

3.8 Variações nos padrões protéicos

As proteínas das amostras bacterianas foram inicialmente separadas por eletroforese em sistema desnaturante, utilizando SDS-PAGE (AZEVEDO et al., 1998) e, posteriormente, corados com Comassie-Blue.

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 empregado é o detergente iônico dodecil sulfato de sódio (SDS). A mistura de proteína com o tampão da amostra é aquecida para ocorrer a quebra de ligações dissulfeto.

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

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

Gel superior (de empilhamento): após a polimerização do gel de resolução, foi adicionado uma solução composta por 1 mL da solução 40% de acrilamida/bis-acrilamida (Sigma) citada anteriormente, 2,5 mL de Tampão TRIS 500 mM, pH 6,8, 100 µL de SDS (10%) e 5,5 mL de água. Para a polimerização foram utilizados 20 µL de TEMED e 100 µL de persulfato de amônio (1%).

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

As condições gerais de corrida foram definidas nos ensaios preliminares para obtenção de géis com alta resolução. Os géis foram corridos a uma corrente constante de 15 mA por placa,

com tampão de eletrodo constituído por TRIS 250 mM, pH 8,3 acrescido de 1,92 M de glicina e 1% de SDS (10%).

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

3.9 Peroxidação de lipídios

A peroxidação lipídica foi determinada através da produção de malonaldeído (MDA), um metabólito reativo a ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), adaptado de Health & Packer (1968).

Amostras biológicas foram maceradas em TCA (ácido tricloroacético) 0,1% na proporção de 0,1 g/450 µL de tampão, juntamente com 20% de PVPP (Polivinilpolipirrolidona). Após completa homogeneização, 1,4 mL de cada amostra foram transferidos para tubos eppendorf para centrifugação a 12.100 g por 5 min. Do sobrenadante, foi retirado 0,25 mL e transferido para outro tubo juntamente com 1,0 mL de solução contendo TCA 20% e TBA 0,5%. A mistura foi colocada em banho-seco por 30 min. a 95 °C, e na sequência, resfriada em gelo.

As amostras foram então centrifugadas por mais 10 min. a 12.100 g, e em seguida foi realizada leitura em espectrofotômetro à 535 e 600 nm. A quantidade de MDA é expressa em mmol/mg de tecido fresco.

3.10 Atividades das enzimas antioxidantes

As enzimas que tiveram a atividade analisada foram CAT, SOD, GST, e GR. As análises foram realizadas por atividade em géis não desnaturantes e por espectrofotometria, dependendo da enzima e de acordo com sua descrição.

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

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

Gel superior (de empilhamento): após a polimerização do gel de resolução, foi adicionado uma solução composta por 1 mL da solução 40% de acrilamida/bis-acrilamida

(Sigma), 2,5 mL de Tampão TRIS 500 mM, pH 6,8 e 5,5 mL de água. Para a polimerização foram utilizados 20 µL de TEMED e 100 µL de persulfato de amônio (1%).

O tampão de eletrodo para corrida do gel não desnaturante foi constituído por TRIS 250mM, pH 8,3 acrescido de 1,92 M de glicina.

Os géis não desnaturantes referentes a atividade das enzimas foram analisadas por densitometria através do programa Kodak Digital Science – ID Image Analysis Software, na versão 3.01.

3.10.1 Atividade da superóxido dismutase – SOD

A atividade da SOD foi medida em PAGE e também foi realizada a determinação das isoformas da enzima.

3.10.1.1 Atividade em PAGE não desnaturante

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

Revelação: após corrida, os géis foram enxaguados rapidamente em água deionizada e incubados no escuro, a temperatura ambiente, em uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8, 1 mM EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), 0,05 mM riboflavina, 0,1 mM nitroblue tetrazolium (NTT) e 0,3% TEMED.

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

	SOD	
	Presente	Ausente
Riboflavina + O ₂ →	O ₂ ⁻	O ₂ ⁻
Destruição catalítica do O ₂ ⁻	O ₂ + H ₂ O ₂	O ₂ ⁻
Redução do NTT por O ₂ ⁻	NTT (incolor)	Blue formazana (cor azul escura)

Esta reação é caracterizada pela fotoxidação do gel. A riboflavina, por fotólise, providencia um elétron para o O_2 , resultando em o íon superóxido, O_2^- , o qual atua como redutor no composto NTT. Nesta reação o TEMED é catalisador, e resulta na forma reduzida do NTT, o Blue formazana.

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

3.10.1.2 Determinação das isoformas de SOD

PAGE nativo foi utilizado para identificação das isoformas de SOD. O volume, relativo a concentração de proteína, colocado na única canaleta reservada para a amostra, foi definido em ensaios preliminares. Ficou estabelecido: 100 μ g para a bactéria não cultivada e 300 μ g para as outras duas bactérias, *Klebsiella* sp. e *Enterobacter cloacae*.

A eletroforese ocorreu nas mesmas condições anteriormente descritas para SOD. Após a corrida, o gel foi dividido verticalmente em três partes com auxílio da régua de cortar gel. Uma delas foi mantida em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8. A segunda parte foi tratada com 100 mL do tampão fosfato de potássio contendo 0,0292 g de EDTA e 0,0130 g de KCN (Cianeto de Potássio) e a última parte foi imersa em uma solução do referido tampão acrescido de 0,0292 g de EDTA e 70 μ L de H_2O_2 a 30%. Todas estas etapas foram realizadas no escuro para prevenir a fotoxidação.

Os géis permaneceram por 20 min. nas soluções, e em seguida foram lavados ligeiramente com H_2O destilada e submetidos a revelação com NBT e riboflavina como descrito anteriormente (ver item 3.10.1.1).

Ao final da revelação, as bandas foram analisadas quanto a presença e ausência, conforme o fator inibidor presente nas soluções de tratamento. As isoformas foram classificadas como:

- Cu/Zn-SOD quando inativada na presença de KCN e H_2O_2
- Fe-SOD se a banda foi inativada somente na presença de H_2O_2 , sendo resistente ao KCN
- Mn-SOD se a isoforma era resistente aos dois tratamentos.

Esta classificação foi baseada em Azevedo et al., 1998.

3.10.2 Atividade da Catalase – CAT

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

3.10.2.1 Atividade em espectrofotômetro

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

Em temperatura de 25°C, a atividade foi determinada em uma solução de reação formada por 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 0,025 mL de peróxido de hidrogênio (25%), a qual deve ser preparada no momento do ensaio.

A reação foi iniciada com 25 µL de extrato protéico, sendo a atividade determinada através da decomposição de peróxido de hidrogênio, monitorada por 1 min. através de alterações na absorbância a 240 nm.

Os resultados são expressos em µmol/min./mg de proteína para o meio.

3.10.2.2 Atividade em PAGE não desnaturante

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

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

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

o gel lavado novamente com água. A fixação foi realizada com uma solução de ácido acético (7%) por 15 min. e em seguida os géis foram documentados.

3.10.3 Atividade de Glutathione redutase - GR

A atividade da GR foi determinada pelo método de espectrofotometria e também em PAGE não-desnaturante.

3.10.3.1 Atividade em espectrofotômetro

A atividade de GR foi determinada como sugerido por Lee & Lee (2000). A atividade foi analisada a 30°C em uma mistura de reação consistindo de 1 mL tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), 500 µL de 5,5'-dithio-bis(2-ácido nitrobenzóico - DTNB) a 1 mM, 100 µL de glutathione oxidada (GSSG) 1 mM e 100 µL de NADPH 0,1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL de extrato e monitorada por 1min. através da redução de glutathione oxidada na absorvância de 412 nm. A glutathione reduzida, por sua vez, reduziu o composto DTNB (ácido nitrobenzóico), que representa cromóforo amarelo, dando a coloração característica do ensaio.

Os valores de atividade foram expressos em µmol/min./mg de proteína.

3.10.3.2 Atividade em PAGE

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

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

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

3.10.4 Atividade de Glutathione-S-transferase – GST

A atividade da GST foi determinada somente por espectrofotometria, com adaptação do protocolo descrito por Anderson et al. (1985).

3.10.4.1 Atividade em espectrofotômetro

O ensaio foi conduzido em uma mistura de reação contendo 900 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,5), 25 μL de CDNB (40 mM), ambos incubados a 30°C, 50 μL de GSH 0,1mM e 25 μL do extrato da amostra, em um volume total de 1mL. A leitura foi feita em 2 min., sendo iniciada a partir de 60s, em comprimento de onda de 340 nm que monitora a conjugação CDNB-GSH.

A GST é uma enzima que catalisa a conjugação nucleofílica da glutathione com diversos substratos eletrofílicos. Sendo assim, é comum no ensaio aparecer atividade não específica que pode influenciar ou mesmo, mudar os resultados obtidos.

Desta maneira, foram realizados testes no protocolo da atividade da GST para aperfeiçoar a leitura. Por isso, a reação foi iniciada com a adição da GSH a solução de tampão fosfato e CDNB, tido este como BRANCO (solução sem amostra), o qual também teve analisado sua atividade, para em seguida, este valor pudesse ser descontado da leitura da atividade das da solução que continha as amostras, resultando assim em um controle de reação (ZABLOTOWICZ et al., 1995).

O monitoramento da absorbância foi feito por 2 min. e a atividade foi expressa em $\mu\text{mol}/\text{min.}/\text{mg}$ de proteína, utilizando um coeficiente de extinção de $9,6 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

4 RESULTADOS

4.1 Identificação das espécies bacterianas

As linhagens estudadas tiveram suas seqüências de DNA_r dos genes 16S comparadas com seqüências de data-base do Genbank, e foi obtida a identificação das espécies bacterianas com alto valor de afinidade (98%). As espécies foram identificadas como linhagem Gama proteobactéria não cultivada (acesso nº AY510234), *Klebsiella* sp. LB-2 (acesso nº DQ831003) e *Enterobacter cloacae* (acesso nº AY787819).

4.2 Quantificação de proteínas e variação do perfil protéico

Os teores de proteína (Figura 6) possuem diferença significativa a 1% de probabilidade entre os tratamentos, entre as bactérias e também em relação a interação dos dois fatores (Tabela 1). Todas as bactérias diferiram na concentração de proteínas em pelo menos uma dose de herbicida (Figura 6 e Tabela 2).

As amostras com maior concentração de proteínas foram encontradas na bactéria *Klebsiella* sp., com 6,23 mg/mL de proteína em tratamento com 340 mM de s-metolachlor (Figura 6). O comportamento da bactéria não cultivada, para a concentração de proteínas em diferentes doses de herbicida, diferiu do comportamento das espécies *Klebsiella* sp. e *Enterobacter cloacae*. Entre os tratamentos controle e dose de 34 mM diferiram para todas as espécies bacterianas (consultar anexo Tabela 14).

Em análise de SDS-PAGE, todas as bactérias foram caracterizadas por perfis de proteínas diferentes (Figura 7). Neste caso, o comportamento de cada bactéria foi constante quanto a presença e ausência de bandas entre os tratamentos, porém foi possível observar diferenças na intensidade de determinadas bandas.

Figura 6 - Gráfico de quantificação de proteínas solúveis (mg/mL) – Método de Bradford, 1971

Figura 7 - Proteína em gel de SDS-PAGE. Padrão (Pa) BSA; 1,2 e 3 representam a bactéria não cultivada nos respectivos tratamentos: controle, 34 mM e 340 mM; 4,5 e 6 representam a bactéria *Klebsiella sp.* e 7,8 e 9, a bactéria *Enterobacter cloacae*, para os mesmos tratamentos

Tabela 1- Análise de variância com 2 fatores, bactérias e doses de herbicida, dos dados referentes a quantificação de proteínas (Programa SAS)

<i>Causa de Variação</i>	<i>G.L.</i>	<i>Q.M.</i>
Tratamento	8	6,07**
Bactéria (B)	2	11,86**
Dose de s-metolachlor (D)	2	5,93**
BxD	4	3,25**
Resíduos	18	0,07

** 1% de significância; C.V.% = 8,81; $\bar{X} = 3,14$

Tabela 2- Análise de variância da tabela 2, com desdobramento do fator bactéria

<i>Causa de Variação</i>	<i>G.L.</i>	<i>Q.M.</i>
Não cultivada	2	1,39**
<i>Klebsiella</i> sp.	2	8,53**
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	2,50**

** 1% de significância; C.V.% = 8,81; $\bar{X} = 3,14$

4.3 Peroxidação lipídica

4.3.1 Quantificação de MDA em espectrofotômetro

A quantificação de malonaldeído mostrou que existe diferença significativa a 1% de probabilidade entre os fatores analisados, bactéria e dose de herbicida (Tabela 3). Para as bactérias, a quantidade de MDA foi maior na concentração de 340 mM do herbicida (Figura 8).

O maior valor de MDA foi para a bactéria não cultivada no tratamento de 340 mM (4,26 mM/peso fresco), a qual diferiu de comportamento em pelo menos uma dose de s-metolachlor (Tabela 4). No caso da espécie *Enterobacter cloacae*, diferiu na concentração de MDA em todas as doses de herbicida (consultar anexo, Tabela 15), porém foi possível notar que o maior aumento ocorreu quando a bactéria foi exposta a concentração de 340 mM de s-metolachlor (Figura 8).

Entre os tratamentos, o controle e o tratamento com 34 mM diferiram em pelo menos uma espécie bacteriana, o que não foi observado para o tratamento com maior concentração de herbicida (consultar anexo, Tabela 15).

Figura 8- Quantidade de MDA (mMol/ peso fresco) em bactérias submetidas a diferentes doses do herbicida s-metolachlor

Tabela 3 - Análise de variância com 2 fatores, bactérias e doses de herbicida, dos dados referentes a quantificação de MDA (Programa SAS)

<i>Causa de Variação</i>	<i>G.L.</i>	<i>Q.M.</i>
Tratamento	8	0,13 ^{**}
Bactéria (B)	2	0,17 ^{**}
Dose de s-metolachlor (D)	2	0,29 ^{**}
BxD	4	0,04 ^{ns}
Resíduos	18	0,008

^{**} 1% de significância; ^{ns} não significativo; C.V.% = 3,78; $\bar{X} = 2,37$
 Dados transformados ($\log_{10}x$)

Tabela 4- Análise de variância da tabela 2, com desdobramento do fator bactéria

<i>Causa de Variação</i>	<i>G.L.</i>	<i>Q.M.</i>
Não cultivada	2	0,06 [*]
<i>Klebsiella</i> sp.	2	0,02 ^{ns}
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	0,28 ^{**}

^{**} 1% de significância; ^{*} 5% de significância; ^{ns} não significativo C.V.% = 3,78; $\bar{X} = 2,37$
 Dados transformados ($\log_{10}x$)

4.4 Atividade de SOD em PAGE não desnaturante

Os resultados em PAGE da superóxido dismutase demonstraram variações na atividade da enzima em relação aos fatores analisados, bactérias e doses de s-metolachlor. As três bactérias foram caracterizadas por diferentes perfis de isoformas (Figura 9). A bactéria não cultivada e a *Klebsiella* sp. apresentaram duas isoenzimas cada; I, II e III,V; respectivamente. Para a bactéria *Enterobacter cloacae*, foram observadas três isoformas, a I e II, observadas também na bactéria não cultivada, e a isoenzima IV, característica somente do seu perfil.

A maior atividade de SOD foi observada nos tratamentos com 34 mM de s-metolachlor (Figura 9). Porém, quando as bactérias foram expostas a uma dose maior do herbicida (340 mM), foi observada uma queda da atividade de SOD em pelo menos uma isoenzima de cada bactéria. Apesar da análise densitométrica (Tabela 5) não corroborar este comportamento, a observação da intensidade das bandas não deixa dúvidas em relação a atividade da enzima SOD nos tratamentos.

Na caracterização das isoformas (Figura 10), não foi observado o aparecimento de SOD com co-fator Cu/Zn, pois nenhuma banda foi inibida nas soluções com KCN e H₂O₂. Entretanto, os perfis das três espécies de bactérias foram caracterizados por isoformas Fe-SOD e a Mn-SOD, sendo que das três encontradas em *Enterobacter cloacae*, duas eram Mn-SOD (I e II) e somente uma era Fe-SOD (IV).

Figura 9 – Atividade de SOD em PAGE não desnaturante. Padrão (P) de SOD de fígado bovino; 1,2 e 3 representam a bactéria não cultivada nos respectivos tratamentos: controle, 34 mM e 340 mM; 4,5 e 6 representam a bactéria *Klebsiella* sp. e 7,8 e 9, a bactéria *Enterobacter cloacae*, para os mesmos tratamentos

Figura 10 - Caracterização das isoformas de SOD em PAGE não desnaturante, 1: controle, 2: presença de KCN e 3: presença de H₂O₂

Tabela 5 - Análise densitométrica da atividade de SOD em PAGE não desnaturante

	não cultivada		<i>Klebsiella sp.</i>		<i>Enterobacter cloacae</i>	
	34 mM	340 mM	34 mM	340 mM	34 mM	340 mM
I	-1%	17,15%			-2,44%	-16,37%
II	28,74%	7,57%			5%	34,64%
III			-9,34%	-3,68%		
IV					-5,66%	13,70%
V			19,31%	19,53%		

4.5 Atividade de CAT em espectrofotômetro e PAGE não desnaturante

A enzima CAT apresentou diferenças significativas na atividade entre os tratamentos com doses de herbicidas entre as bactérias e na interação dos fatores (Tabela 7). Dessa maneira, foi feito desdobramento, e o resultado foi apresentado na tabela 8, que mostra que as bactérias apresentam pelo menos um dos valores diferindo da média a nível de significância de 5%

Na concentração de 34 mM de s-metolachlor, a bactéria não cultivada e a *Enterobacter cloacae* apresentaram aumento na atividade, sendo mais proeminente na bactéria não cultivada (Figura 11). Para essa mesma espécie, a atividade da CAT em PAGE apresentou uma nova isoforma (IV) e um significativo aumento para a isoforma I (Figura 12).

Entretanto, para o tratamento com 340 mM de herbicida, houve uma queda na atividade para a bactérias não cultivada (Figura 11). Esta resposta foi bem acentuada, o que pode estar relacionado com a inibição da banda I na atividade em PAGE (Figura 12). A análise densitométrica também confirmou este resultado, e estendeu o comportamento também para as outras bactérias (Tabela 6).

O perfil de isoenzimas de CAT no ensaio de atividade em PAGE foi diferente entre as bactérias. A espécie não cultivada apresentou maior número de isoformas. No meio controle apareceram 3 isoformas, I, II e III, assim como o observado também no tratamento com 34 mM de s-metolachlor, com o aparecimento da nova isoforma IV (Figura 12), já citada. Entretanto, esta nova isoforma não se repetiu no tratamento com concentração a maior de herbicida, observando-se a inibição completa da isoforma I.

As outras duas linhagens bacterianas analisadas não apresentaram diferença nos padrões de bandas entre os tratamentos para a enzima CAT. A *Enterobacter cloacae* apresentou três isoformas (IV, VII e VIII) enquanto a *Klebsiella* sp. apresentou somente uma, e com pouca atividade (isoforma VI).

Figura 11 – Atividade de CAT em espectrofotômetro, para bactérias submetidas a diferentes doses do herbicida s-metolachlor

Figura 12 – Atividade de CAT em PAGE não desnaturante. Padrão (P) de CAT de fígado bovino; 1,2 e 3 representam a bactéria não cultivada nos respectivos tratamentos: controle, 34 mM e 340 mM; 4,5 e 6 representam a bactéria *Klebsiella* sp. e 7,8 e 9, a bactéria *Enterobacter cloacae*, para os mesmos tratamentos

Tabela 6 - Análise densitométrica da atividade de CAT em PAGE não desnaturante

	não cultivada		<i>Klebsiella</i> sp.		<i>Enterobacter cloacae</i>	
	34 mM	340 mM	34 mM	340 mM	34 mM	340 mM
I	35%	*				
II	-19,93%	-33,88%				
III	7,02%	-5,50%				
IV	**					
V			46,41%	-15,66%		
VI					-2%	-11,15%
VII					-7,02%	-41,96%
VIII					-3,95%	-36,14%

** aparecimento de nova isoforma

* inibição de isoforma

Tabela 7- Análise de variância com 2 fatores, bactérias e doses de herbicida, dos dados referentes a atividade de CAT (Programa SAS)

<i>Causa de Variação</i>	<i>G.L.</i>	<i>Q.M.</i>
Tratamento	8	997,39**
Bactéria (B)	2	1533,34**
Dose de s-metolachlor (D)	2	1304,16**
BxD	4	576,02**
Resíduos	18	5,99

** 1% de significância; C.V.% = 12,67; $\bar{X} = 19,32$

Tabela 8- Análise de variância da tabela 7, com desdobramento do fator bactéria

<i>Causa de Variação</i>	<i>G.L.</i>	<i>Q.M.</i>
Não cultivada	2	302,58**
<i>Klebsiella</i> sp.	2	56,77**
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	06,96**

** 1% de significância; C.V.% = 12,67; $\bar{X} = 19,32$

4.6 Atividade de GR em espectrofotômetro e em PAGE não-desnaturante

A atividade de GR apresentou diferenças significativas a 1% entre todas as causas de variação do delineamento, sendo que entre as bactérias, todas diferem em pelo menos um tratamento (Tabela 10 e 11).

O tratamento com 340 mM de s-metolachlor apresentou os menores valores de atividade para todas as bactérias analisadas (Figura 13). Em análise de atividade em PAGE (Figura 13), observou-se queda na atividade enzimática no tratamento com 340 mM de s-metolachlor, sendo maior para *Klebsiella* sp., além do aumento do número de isoformas no tratamento controle (2) e no meio com maior dose de herbicida (5).

O aparecimento de mais isoformas de GR, nos meios com herbicida para a bactéria *Klebsiella* sp e *Enterobacter cloacae*, não esteve relacionado necessariamente com o aumento na atividade enzimática. No tratamento de 34 mM, por exemplo, houve aparecimento de novas isoformas para as bactérias *Klebsiella* sp.(VII) e *Enterobacter cloacae* (XI e XII), mas somente no primeiro caso, pode estar relacionado com a aumento na atividade da enzima GR (Figura 13). A queda na atividade enzimática neste tratamento foi maior para a *Klebsiella* sp. a qual, em análise de atividade em PAGE (Figura 14), mostrou aumento do número de isoformas, de 2 no tratamento controle pra 5 no meio com maior dose de herbicida.

A figura 13 mostra que todas as bactérias não apresentaram diferença entre os primeiros tratamentos, controle e 34 mM, mas uma tendência de queda na atividade quando as bactérias foram expostas a concentração maior de s-metolachlor.

A análise densitométrica (Tabela 9) corrobora com o resultado encontrado na atividade da GR em espectrofotômetro para queda da atividade no terceiro tratamento (340 mM). Nesta análise, a diferença de atividade de isoforma na presença de 340 mM de s-metolachlor comparada ao controle chegou a ser de aproximadamente 76% para a bactéria *Klebsiella* sp.

Figura 13 – Atividade de GR em espectrofotômetro, para bactérias submetidas a diferentes doses do herbicida s-metolachlor

Figura 14 – Atividade de GR em PAGE não desnaturante. Padrão (P) de GR; 1,2 e 3 representam a bactéria não cultivada nos respectivos tratamentos: controle, 34 mM e 340 mM; 4,5 e 6 representam a bactéria *Klebsiella sp*. e 7,8 e 9, a bactéria *Enterobacter cloacae*, para os mesmos tratamentos

Tabela 9 - Análise densitométrica da atividade de GR em PAGE não desnaturante

	não cultivada		<i>Klebsiella</i> sp.		<i>Enterobacter cloacae</i>	
	34 mM	340 mM	34 mM	340 mM	34 mM	340 mM
I	-3%	-40,75%				
II	-14,47%	-44,62%				
III	30,64%	26,71%				
IV			4,22%	-71,47%		
V				**	46,76%	-30,00%
VI				**		
VII			**	-48,60%		
VIII			-76,84%	-76,43%		
					-	
IX					19,46%	-47,70%
X					7,66%	-26,38%
XI						**
XII						**

** aparecimento de nova isoforma

* inibição de isoforma

Tabela 10- Análise de variância com 2 fatores, bactérias e doses de herbicida, dos dados referentes a atividade de GR (Programa SAS)

<i>Causa de Variação</i>	<i>G.L.</i>	<i>Q.M.</i>
Tratamento	8	0,27**
Bactéria (B)	2	0,12**
Dose de s-metolachlor (D)	2	0,79**
BxD	4	0,08**
Resíduos	18	0,008

** 1% de significância; ^{ns} não significativo; C.V.% = 5,05; $\bar{X}$ = 1,76Dados transformados ($\log_{10}x+100$)

Tabela 11- Análise de variância da tabela 10, com desdobramento do fator bactéria

<i>Causa de Variação</i>	<i>G.L.</i>	<i>Q.M.</i>
Não cultivada	2	6,07 ^{ns}
<i>Klebsiella</i> sp.	2	78,46 ^{**}
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	35,82 ^{**}

^{**} 1% de significância; ^{ns} significativo; C.V.% = 12,67; $\bar{X} = 1,76$

4.7 Atividade de GST em espectrofotômetro

A atividade de GST apresentou variações significativas para as bactérias e para a interação entre bactérias e com as doses de herbicida (Tabela 12). No desdobramento, foi observado que as bactérias *Klebsiella* sp. e *Enterobacter cloacae* diferiram de comportamento entre os meio com diferentes concentrações de herbicida (Tabela 13).

A *Klebsiella* sp. não apresentou diferença entre os tratamentos controle e 34 mM, porém houve uma queda em sua atividade na alta do se do herbicida. Já a bactéria *Enterobacter cloacae*, apresentou a maior atividade enzimática no tratamento controle, decrescendo a atividade no meio 340 mM e 34 mM, respectivamente (Figura 15).

De modo geral, foi observado baixos valores de atividade de GST, mas isso se deve ao desconto da atividade inespecífica no valor da atividade final, ou seja, os dados da reação controle foram incluídos nos resultados (ZABLOTOWICZ et al., 1995).

Figura 15 – Atividade de GST em espectrofotômetro, para bactérias submetidas a diferentes doses do herbicida s-metolachlor

Tabela 12- Análise de variância com 2 fatores, bactérias e doses de herbicida, dos dados referentes a atividade de GST (Programa SAS)

<i>Causa de Variação</i>	<i>G.L.</i>	<i>Q.M.</i>
Tratamento	8	0,26 [*]
Bactéria (B)	2	0,19 [*]
Dose de s-metolachlor (D)	2	0,16 ^{ns}
BxD	4	0,33 ^{**}
Resíduos	18	0,10

^{**} 1% de significância; ^{*} 5% de significância; ^{ns} não significativo; C.V.% = 5,72; $\bar{X} = 2,57$
 Dados transformados ($\log_{10}x+10000$)

Tabela 13- Análise de variância da tabela 10, com desdobramento do fator bactéria

<i>Causa de Variação</i>	<i>G.L.</i>	<i>Q.M.</i>
Não cultivada	2	0,15 ^{ns}
<i>Klebsiella</i> sp.	2	0,22 [*]
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	0,47 ^{**}

^{**} 1% de significância; ^{*} 5% de significância; ^{ns} não significativo; C.V.% = 5,72; $\bar{X} = 2,57$
 Dados transformados ($\log_{10}x+10000$)

5 DISCUSSÃO

A exposição de microrganismos à agroquímicos, mesmo quando relacionada somente a tolerância, pode levar a uma resposta de indução ao estresse oxidativo (KONDA; PÁSZTOR, 2001; GOULIELMOS et al., 2003). Este estresse pode interferir no metabolismo celular bacteriano, podendo causar a inibição de algumas enzimas (LU; MINUTO; XIA, 2004).

O aumento na produção de espécies ativas de oxigênio é observado em resposta a uma variedade de agentes estressantes, sejam eles bióticos ou abióticos (MAHALINGAM; FEDOROFF, 2003). O sistema antioxidante é uma defesa celular que confere proteção contra os efeitos adversos da formação de EAOs (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000).

O s-metolachlor é um herbicida altamente tóxico, com potencial carcinogênico, freqüentemente encontrado em estudos ambientais (KOLPIN et al., 2002; LAABS et al., 2002; PARAÍBA et al., 2003; KOSTANTINOU et al., 2006). Sua degradação essencialmente microbiana (RODRIGUES, 2005), possibilita a aplicação da biorremediação, um dos campos mais promissores da biotecnologia (FAY et al., 1997). No presente estudo, três bactérias com potencial para degradação de s-metolachlor foram caracterizadas pela resposta antioxidativa ao herbicida.

A presença de EAOs, em ambiente intracelular, causa grande perigo a macromoléculas. Entre os maiores efeitos estão as interações com proteínas que levam a oxidação da estrutura dos peptídeos (FARR; KOGOMA, 1991). Essas alterações resultam em modificações nas cadeias laterais dos aminoácidos, e conseqüentemente, a estrutura da proteína é alterada. Por sua vez, estas modificações, como oxidação de grupo sulfidril e redução de pontes dissulfetos, podem levar a mudanças funcionais que desequilibram o metabolismo celular (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000).

A maioria dessas modificações é deletéria a célula, e podem também estar relacionada ao aumento da freqüência de proteólise. A remoção de proteínas danificadas é necessária para prevenir o acúmulo, o qual pode comprometer o metabolismo da célula (FARR; KOGOMA, 1991; CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000).

Diversas classes de danos causados a proteínas são documentados, porém a oxidação de proteínas tem sido pouco caracterizada. Técnicas como Western blot, SDS-PAGE e análise 2D estão sendo aplicadas para analisar a susceptibilidade de proteínas a modificações causadas por estresse oxidativo (FARR; KOGOMA, 1991; CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000).

Em condição de estresse, na presença de 0,05 mM de Cádmio, foi observado alteração nos teores de proteína totais em fungos *Aspergillus* sp.(GUELF, 2002). Para o herbicida s-metolachlor, também foi possível observar mudanças na concentração de proteína. A bactéria não cultivada apresentou aumento no teor de proteína em resposta à alta concentração de metolachlor (340 mM), o que pode estar relacionado com o aumento do metabolismo celular voltado para a biotransformação do herbicida.

Porém, as outras duas bactérias, *Klebsiella* sp. e *Enterobacter cloacae*, tiveram comportamento contrário, diminuindo a concentração de proteína nos tratamentos com herbicida. Em células de *Escherichia coli*, quando crescidas na presença de agentes estressantes como H₂O₂, foi verificado que proteínas envolvidas em diferentes processos celulares sofreram oxidação, e algumas delas foram fortemente inativadas. Este processo foi considerado um passo crucial para as células cessarem o crescimento e conseqüentemente minimizarem o perigo celular (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000).

Entre os diversos danos biológicos que as EAOs podem causar, os lipídios são os maiores alvos. As bactérias geralmente apresentam ácidos graxos com ligações saturadas ou monoinsaturadas em suas membranas. Radicais livres podem atacar os ácidos graxos insaturados da membrana e iniciar a peroxidação lipídica. A taxa de peroxidação de ácidos graxos é diretamente proporcional ao número de ligações insaturadas, sendo o primeiro efeito deste processo, a diminuição da fluidez da membrana (FARR; KOGOMA; 1991).

Alterações nas propriedades da membrana, como mudança em sua propriedade e desligamento de proteínas, podem agir como efeitos amplificadores, pelos quais mais radicais são formados e, conseqüentemente, mais ácidos graxos são degradados em uma variedade de produtos. Entre os produtos que são formados, alguns aldeídos são conhecidos por reagirem com DNA (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000).

Neste estudo, a indução ao estresse oxidativo também foi observada através da peroxidação lipídica realizada pela quantificação do produto final estável malonaldeído, o qual é reativo ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (HEALTH; PACKER, 1968).

A peroxidação foi constatada nas espécies não cultivada e *Enterobacter cloacae*, as quais apresentaram concentrações elevadas de MDA no tratamento com maior dose de herbicida (340 mM). Porém, somente a *Enterobacter cloacae* diferiu de comportamento entre os três tratamentos, apresentando um aumento gradativo de MDA proporcional a concentração do s-metolachlor.

Balagué et al. (2000) relataram que, em células de *E. coli* na presença do herbicida 2,4-D, o envelope celular bacteriano sofria peroxidação lipídica. Essa reação pode alterar a estrutura e função da membrana, modificando interações durante o processo de infecção.

Já a terceira espécie estudada, *Klebsiella* sp., não apresentou diferença na produção de MDA entre os meios. Este comportamento sugere que não houve estresse oxidativo que levasse a peroxidação lipídica devido a um mecanismo eficiente de proteção celular contra EAOs. Entretanto, pode também ser possível que o herbicida não tenha causado estresse oxidativo ao ponto de induzir peroxidação lipídica.

Em bactérias da espécie *Escherichia coli*, pode haver uma indução na resposta de reparo de membrana, sendo que a resposta a estresse causado por peróxido pode ser requerida para a recuperação da função da membrana. Neste caso, é possível que o gene *oxyR* tenha um papel importante na indução do reparo da membrana celular, assim como genes que são controlados por ele (FARR; KOGOMA; 1991).

Além disso, as células bacterianas podem apresentar um mecanismo que restaura a homeostase redox no citosol, quando este desequilíbrio é considerado reversível, eliminando o perigo oxidante pela ativação do fator de transcrição OxyR e do sistema SoxRS. Quanto a resposta causada por alto nível de $O_2^{\bullet-}$, são conhecidas pelos menos seis proteínas estimuladas pelo anion superóxido que são reguladas pelo produto dos genes, *soxR* e *soxS* (FARR; KOGOMA; 1991). Entre os genes que são controlados pelo sistema *SoxRS* está o gene da enzima Mn-SOD (SOD A).

A enzima SOD é responsável pela desintoxicação intracelular do anion $O_2^{\bullet-}$ via reação de dismutação gerando H_2O_2 e O_2 . Lee e Gu (2003) relatam que existe resposta diferente ao estresse oxidativo, dependendo do agente químico testado. Neste caso, o herbicida paraquat induziu uma resposta primária dependente de *sodA* (Mn-SOD) em linhagens de *E. coli*.

As SODs são metaloenzimas multiméricas, e são distinguidas por seu cofator metal e sua localização celular (KEITH; VALVANO, 2007). Existem quatro classes de SOD baseadas no íon metal ligado a estrutura, Fe-SOD, Mn-SOD, Cu/Zn-SOD e Ni-SOD. É a transição do metal, em cada isoenzima de SOD, que facilita a transferência de elétron durante a reação com o superóxido (FARR; KOGOMA; 1991). Em *Escherichia coli*, são encontradas três isoformas de SOD, A FE-SOD e a Mn-SOD, localizadas no espaço citoplasmático e a Cu/Zn-SOD presente no espaço periplasmático, as quais além de diferirem em posição, também apresentam diferenças temporais de expressão gênica (BENOV; FRIDOVCH, 1996)

No presente estudo, as bactérias sofreram alterações significativas com relação a atividade em PAGE de SOD, indicando que houve indução e inibição diferencial entre os tratamentos. O herbicida s-metolachlor induziu a atividade da enzima SOD no tratamento com 34 mM. Porém, quando a dose do herbicida foi elevada a 340 mM, houve uma queda na atividade em pelo menos uma isoforma para cada bactéria.

Esses dados revelam que as bactérias são sensíveis em detectar o s-metolcholor na concentração de 34 mM, e por isso, apresentam indução na atividade enzimática. A dose maior de herbicida, aparentemente poderia ser considerada tóxica para as células, o que explicaria a queda na atividade de SOD neste tratamento.

Em estudo com herbicida quinclorac, alterações similares também foram observadas na atividade da enzima SOD. Em concentração de até 165 µg/L, as bactérias *E. coli* e *Bacillus subtilis* tiveram aumentadas as atividades de SOD. Porém, quando a dose foi elevada para 330 µg/L, as atividades da enzima foram reduzidas (LÜ; MIM; XIA, 2004). Nestas mesmas condições, a bactéria *Burkholderia cepazia* WZ1 teve a atividade de SOD aumentada, indiferente da concentração do quinclorac. Os autores sugeriram que o potencial de degradação da bactéria *B. cepazia* WZ1 poderia adaptá-la a altas concentrações do herbicida. Alteração no padrão de atividade da enzima é bastante variável e pode ser dependente da espécie, tecido, fase de desenvolvimento de plantas, além das próprias particularidades das isoformas (AZEVEDO et al., 1998).

As três bactérias estudadas apresentaram somente isoformas de Mn-SOD e Fe-SOD (SOD B) (KEITH; VALVANO, 2007). Estas isoenzimas são encontradas em frações de membrana e no citosol, respectivamente. A terceira isoforma Cu/Zn-SOD (SOD C), a qual não foi encontrada, está presente no espaço periplasmático de bactérias, e está sendo relacionada com a proteção de O_2^- de origem exógena, principalmente em processos de infecção (KEITH; VALVANO, 2007). Estudos prévios têm mostrado que a maioria de proteínas SOD C não são requeridas para o crescimento bacteriano em condições controladas de laboratório (KEITH; VALVANO, 2007).

Bactérias expostas ao pesticida acetamiprid mostraram elevada atividade de SOD e CAT, e também induziram o aparecimento de novas isoformas de SOD (YAO et al., 2006). Yao et al. (2006) relataram que há diferença de resposta do sistema antioxidante entre espécies de bactérias e tempo de exposição ao acetamiprid, e que o aparecimento de nova isoforma pode estar relacionada a tentativa de antagonizar os efeitos do estresse oxidativo.

Variações nas atividades das enzimas SOD e CAT, mostraram estar relacionadas com peroxidação lipídica em *Streptomyces* sp (IŞIK et al., 2007). Foi observado no estudo, que a alta atividade de CAT e SOD podem reduzir o perigo a membrana, e que as enzimas trabalham cooperativamente para proteção da membrana contra EAOs.

A enzima CAT está envolvida na proteção de estresse oxidativo causado por H₂O₂, via proteínas reguladas pelo gene *oxyR*. CATs bacterianas são classificadas em dois grupos, dependendo de suas propriedades enzimáticas e de homologia entre as seqüências de aminoácidos: catalases monofuncionais e catalase-peroxidases (CPs). Ao contrário das catalases monofuncionais que estão presentes em todos os organismos vivos, as CPs têm sido encontradas somente em bactérias e alguns fungos (NADLER et al., 1986).

A atividade da enzima CAT, neste estudo, foi determinada através de espectrofotometria e análise em PAGE não desnaturante. Novamente, foi observado o comportamento diferencial das bactérias entre os meios. A bactéria não cultivada apresentou os maiores valores de atividade e o comportamento mais variado. Ela diferiu de comportamento nos três meios. No tratamento com 34 mM, sua atividade foi estimulada pelo herbicida, porém quando analisada no meio com 340 mM, apresentou uma significativa queda na atividade.

Estas alterações na atividade de CAT, entre meios com concentrações diferentes de herbicidas, apresentaram similaridade com a literatura. Por exemplo, em estudo com bactérias expostas ao quinclorac, os autores relataram que doses até 165 µg/L do pesticida induziram a atividade enzimática da CAT, porém em doses maiores, como 330 µg/L, a atividade foi reprimida (LÜ; MIN; XIA, 2006), como observado de forma similar ao observado para SOD.

Já em *Streptomyces* sp., o herbicida paraquat foi testado em doses de 1 mM e 3 mM, e reproduziram o mesmo efeito já citado para a enzima CAT. Neste caso, os autores mencionaram que a variação na atividade entre as concentrações de paraquat indicam que ocorre uma indução limitada na atividade da CAT pelo herbicida, uma vez que esta enzima pode ser reprimida por excesso de estresse oxidativo (IŞIK et al., 2007).

Quanto a análise em PAGE, o aumento da atividade no meio com 34 mM de s-metolachlor para a bactéria não cultivada foi acompanhada da indução de uma nova isoforma, o que pode estar relacionada com a indução da sensibilidade a presença do herbicida. Neste tratamento, a bactéria apresentou o maior número de isoformas de CAT (quatro). Porém, o comportamento na concentração de 340 mM, sugere que o herbicida em doses maiores foi tóxico para a bactéria, uma vez que além de diminuir a atividade, também houve o desaparecimento de duas isoformas.

Quando analisadas as isoformas em PAGE da enzima CAT, os números variaram entre as espécies estudadas. A bactéria *Enterobacter cloacae* apresentou três isoformas, porém foram observadas apenas mudanças na intensidade das bandas. Já a bactéria *Klebsiella* sp. apresentou somente uma isoforma e com baixa atividade em todos os tratamentos.

A bactéria *Escherichia coli* possuem duas CATs, HPI e HPII, codificadas respectivamente por *katG* e *katE*, que apresentam diferença na expressão e, conseqüentemente, no sistema que as controla. A expressão da KatG esta sob o controle OxyR (sistema de resposta a estresse) e a expressão da KatE, a qual não é induzida por H₂O₂, é regulada pelo sistema KatF, que varia a expressão dependendo da fase do crescimento bacteriano. Dessa maneira, podemos observar que as isoformas de CAT apresentam a mesma função, porém são aplicadas de maneira diferente no meio intracelular (FARR; KOGOMA; 1991).

A baixa atividade da enzima CAT para a bactéria *Klebsiella* sp. sugere que não houve alteração significativa na geração de H₂O₂ ou que outro sistema de defesa relacionado esteja ativado. Porém, existe a possibilidade de que outros mecanismos estejam envolvidos, através de outras enzimas como peroxiredoxina, as quais também podem regular os níveis de H₂O₂ (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000).

As bactérias apresentam uma resposta complexa e global ao estresse oxidativo, seja ele causado pelo metabolismo normal ou em condições de estresse, como na presença de xenobióticos. Os dois sistemas envolvidos nesta resposta, OxyR e SoxRS, regulam a expressão de muitas enzimas, dentre elas as já citadas CAT e SOD. Entretanto, outra enzima com papel importante neste processo é a enzima GR, a qual também é chave no processo de combate às EAO's (especificamente O₂^{•-} e H₂O₂) via o ciclo Halliwell-Asada.

Membro da família de flavoproteínas oxiredutases, a GR catalisa a redução dependente de NADPH da glutathiona oxidada (GSSG) para glutathiona reduzida (GSH) (SCRUTON et al., 1987; MASIP et al., 2006).

Em *E. coli*, o gene *gor* codifica a enzima GR e também está sob controle independente de *oxyR* por uma subunidade alternativa σ de RNA polimerase (RpoS). Esta subunidade é regulada por vários agentes estressantes, o que envolve a GR em um circuito regulatório global de adaptação bacteriana a várias condições de estresse (SMIRNOVA; OKTYABSKY, 2005).

A manutenção do estado redox do citoplasma é uma condição importante para a vida normal da célula, e a GSH é considerada o principal fator tamponante redox. Por isso a

manutenção de altas atividades de GR se torna necessária para que, conseqüentemente, a GSH também se encontre em altos níveis (SMIRNOVA; OKTYABSKY, 2005).

Guelfi (2001) mostrou que o fungo *Aspergillus* sp., na presença do metal pesado cádmio, apresenta aumento da atividade de GR e CAT, o que poderia estar relacionado a uma maior produção de H₂O₂ induzida pelo xenobiótico. Outros estudos com este metal pesado, como em células de fumo (*Nicotiana tabacum* cv BY-2), também revelam aumento na atividade da enzima, o que neste caso, além de manutenção dos níveis de GSH, a atividade foi relacionada com produção de fitoquelatina (GRATÃO, 2003).

No presente estudo, as bactérias apresentaram o mesmo comportamento entre os tratamentos. Não houve diferença de atividade entre os meios controle e com 34 mM de s-metolachlor, o que indica que as bactérias não estão sensibilizadas para induzir a atividade enzimática nesta concentração de herbicida. Isto pode ser devido a participação de outras enzimas no processo de redução de GSSG. Esta função pode ser executada por outras enzimas bacterianas e compostos celulares como glutaredoxina e thioredoxina, proteínas também envolvidas na resposta antioxidante (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000).

Mutantes de *E. coli* para o gene *gor*, apresentaram crescimento normal e mantiveram os altos níveis de glutathiona reduzida, o que corrobora com a possibilidade da existência de um caminho de redução de GSSG independente da enzima GR (SMIRNOVA; OKTYABSKY, 2005). Porém, no tratamento em que a bactéria foi exposta a uma concentração maior do s-metolachlor (340 mM), houve uma queda na atividade da GR, o que mais uma vez sugere que em alta concentração o herbicida se torna tóxico às bactérias.

Os resultados em PAGE não desnaturante apresentaram grande variação em diversidade e número de isoformas. A *Klebsiella* sp., a qual apresentou a maior diferença entre os valores dos meios controle e 34 mM em relação a atividade do meio com 340 mM, apresentou cinco isoformas da enzima no último tratamento. Porém o aumento do número de isoenzimas não correspondeu a atividade em espectrofotômetro, o que indica que a bactéria está iniciando um processo de resposta ao estresse oxidativo causado pela presença de alta dose do herbicida, entretanto não está sendo suficiente para aumentar a atividade enzimática.

A glutathiona, além de participar de processos de desintoxicação celular de moléculas reativas formadas pelo processo oxidativo, está envolvida também na desativação de substâncias tóxicas. A GSH pode reagir com uma variedade de componentes eletrofílicos para produção de

conjugados de GSH. A reação de conjugação pode ser espontânea ou ser catalisada pela enzima GST (SMIRNOVA; OKTYABSKY, 2005).

Estudos já mostraram a forma complexada do herbicida metolachlor com a GSH em plantas de milho, resposta envolvida na desintoxicação metabólica (ROSSINI et al., 1996). Em algumas bactérias, como as gram-negativas metilotróficas, as GST's são o elemento central do metabolismo de hidrocarbonetos clorados, assim como em diversos organismos. O fator principal de transformação de agroquímicos, como o metolachlor da classe acetanilida é a desintoxicação pela enzima Glutathione S-transferase (STAMPER et al., 1998).

Em bactérias, como *Escherichia coli*, sete genes que codificam proteínas homólogas com atividade de GST já foram encontradas no espaço citoplasmático: *yfcF*, *yfcG*, *yibF*, *yliJ*, *yncG*, *yghU* e *sspA*. Entre estes produtos de gene, três enzimas foram importantes para a resposta a estresse oxidativo, entre elas YfcF, YfcG e GST B1-1 (KANAI et al., 2006). Em condições de estresse causado por compostos aromáticos, a bactéria *Ochrobactrum anthropi* apresentou aumento da atividade da enzima GST, o que foi relacionado com um mecanismo de defesa contra condições de estresse oxidativo particular (TAMBURRO et al., 2004). Entretanto, no presente trabalho, a bactéria *Klebisella* sp não apresentou diferenças de atividade de GST entre os meios com 0 e 34 mM e na dose maior de s-metolachlor houve a queda na atividade. Esta queda também foi observada para a bactéria *Enterobacter cloacae*, o que sugere que para esta enzima, a dose maior de metolachlor foi tóxica para as células.

Em um estudo com o efeito dos pesticidas oxufluorfem e diuron, Geoffroy et al. (2002) mostrou que, dependendo da concentração do pesticida e se há mistura entre os compostos, a enzima GST pode apresentar atividade com tanto efeitos aditivos, como de queda. As diferenças nas respostas foram relacionadas a desintoxicação celular via glutathione.

A resposta de algumas enzimas, como CAT e SOD, em geral foram altas no tratamento com 34 mM de s-metolachlor, o que pode estar relacionado uma indução da atividade. Como relatado por IŞik et al. (2007), o aumento da atividade de enzimas pode estar relacionado a sensibilidade das bactérias ao efeito das EAOs produzidos na presença de herbicida. Neste estudo, a resposta global de enzimas pode estar ajudando a diminuir os danos causados por EAOs no processo de peroxidação lipídica.

A hipótese de hormesis é definida com uma resposta adaptativa a baixos níveis de estresse ou perigo, o qual resulta na aprimoração de algum sistema fisiológico por um período finito de tempo (CALABRESE; BALDWIN, 2001). Esta hipótese pode ser aplicada em algumas

respostas encontradas neste estudo, assim como já foram encontradas em respostas de bactérias ou outros organismos a compostos xenobióticos (GRATÃO, 2003; LÜ; MIM; XIA, 2004; IŞIK et al., 2007).

A variedade de respostas encontradas foi muito maior do que o fator que produziu a resposta, tornando difícil a determinação de um padrão comportamental. Entretanto, as análises podem mostrar diferenças entre as respostas específicas de cada enzima, o que pode condicionar a encontrar uma espécie que apresente vantagens na resistência ao herbicida s-metolachlor.

A diversidade encontrada na resposta ao estresse pode ser relacionada a estudos de investigação das funções e associações do sistema antioxidativo, e apresentar muito provavelmente um potencial para a futura aplicação biotecnológica destes organismos na desintoxicação ambiental.

6 CONCLUSÕES

- 1- O herbicida s-metolachlor gerou estresse oxidativo, independente da espécie bacteriana, principalmente na maior concentração testada (340 mM), conforme observado nas taxas de peroxidação lipídica;
- 2- As enzimas CAT e SOD, apresentaram indução da atividade em exposição a concentração de 34 mM de s-metolachlor para todas as bactérias;
- 3- A concentração de 340 mM de herbicida foi tóxica para as bactérias, e inibiu a atividade das enzimas antioxidantes.

REFERÊNCIAS

ALAVANJA, M.C.R. et al. Pesticides and lung cancer risk in the agricultural health study cohort. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 160, p. 876-885, Nov. 2004.

ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2006. 627 p.

ALSCHER, R.G.; DONAHUE, J.L.; CRAMER, C.L. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v.100, p. 224-233, Jun. 1997.

ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STEWART, C.R. Changes in isoenzymes profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of mayse seedings. **Plant Physiology**, Washington, v. 109, p. 1247-1257, Dec. 1985.

ARAÚJO, W.L. et al. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 4906-4914, Oct. 2002.

AZEVEDO, R.A. et al. Response of antioxidant to transfer from elevated carbon dioxide air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, p. 280-292, May.1998.

BALAGUÉ, C. et al. Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid herbicide on *Escherichia Coli* growth, chemical composition, and cellular envelope. **Environmental Toxicology**, New York, v.16, p. 43-53, Feb. 2001.

BENOV, L.; FRIDOVICH, I. The rate of adaptive mutagenesis in *Escherichia coli* is enhanced by oxygen (superoxide). **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amesterdan, v. 357, p. 231-236. Oct. 1996.

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

BHATTACHARYA, J. et al. Synechocystis Fe superoxide dismutase gene confers oxidative stress tolerance to *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 316, p. 540-544, Apr. 2004.

BRADFORD, M.M. **Analytical Biochemistry**, 72:248-259, 1976.

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

CALABRESE, E.J.; BALDWIN, L.A. Hormesis: a generalizable and unifying hypothesis. **Critical Reviews in Toxicology**, Limerik, v. 31, p. 353-424, Oct. 2001.

CARACCIOLO, A.B. et al. Degradation and leaching of the herbicides metolachlor and diuron: a case study in an area of Northern Italy. **Environmental Pollution**, London, v. 134, p. 525-534, Apr. 2005.

COLEMAN, S. et al. Comparative metabolism of chloroacetamide herbicides and selected metabolites in human and rat liver microsomes. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 108, p. 1151-1157, Dec. 2000.

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

EERD, L.L van. et al. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. **Weed Science**, Ithaca, v. 51, p. 472-495, Jul-Aug. 2003.

FANTROUSSI, S. el. et al. Effect of phenyurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 982-988, Mar. 1999.

FAR, S.B.; KOGOMA, T. Oxidative stress in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 55, p. 561-585, Dec. 1991.

FAVA, L. et al. Pesticides metabolites as contaminants of groundwater resources: assessment of the leaching potential of endosulfan sulfate, 2,6-dichlorobenzoic acid, 3,4-dichloroaniline, 2,4-dichlorophenol and 4-chloro-2-methylphenol. **Microchemical Journal**, New York, v. 79, p. 207-211, Jan. 2005.

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

FREEMARK, K.; BOUTIN, C. Impacts of agricultural herbicide use on terrestrial wildlife in temperate landscapes: a review with special reference to North America. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 52, p. 67-91, Feb. 1995.

FRIEDMAN, C.L.; LEMLEY, T.; HAY, A. Degradation of chloroacetanilide herbicides by anodic fenton treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, p. 2640-2651, Apr. 2006.

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

GOMES Jr, R.A. et al. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 39, p. 449-456, May. 2007.

GOULIELMOS, G. N. et al. Drosophila Cu, Zn superoxide dismutase gene confers resistance to paraquat in *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 308, p. 433-438, Aug. 2003.

GRATÃO, P.L. **Análise da resposta antioxidativa de células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetidas ao cádmio**. 2003. 109 p. Dissertação (MS em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

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

GUELF, A. **Análise de enzimas antioxidantes em linhagens do fungo *Aspergillus* sp. na presença do metal pesado cádmio.** 2001. 60 p. Dissertação (MS em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

GUILHERME, L.R.G. Poluição do solo e qualidade ambiental. In: Congresso Brasileiro de Ciência do solo, 27, 1999, Brasília. **Anais.** Brasília: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 1999. 1 CD-ROM.

GUZZELLA, L.; POZZONI, F.; GIULIANO, G. Herbicide contamination of surficial groundwater in Northern Italy. **Environmental Pollution**, London, v. 142, p. 344-353, Jul. 2006.

HAARSTAD, K.; LUDVIGSEN, G.H. Ten years of pesticide monitoring in Norwegian ground water. **Ground Water monitoring & remediation**, Dublin, v. 27, p.75-89, Sum. 2007.

HAMMOND, P. M.; SCAWEN, M. D. Purification and Properties of aryl Acylamidase from *Pseudomonas fluorescens* ATCC 39004. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 132, p. 651-655, May. 1983.

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

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

HISHINUMA, S. et al. OxyR regulated the expression of two major catalases, KatA and KatB, along with peroxiredoxin, AhpC in *Pseudomonas putida*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.8, p. 2115-2124, Dec. 2006.

ICHISE, N. et al. A mechanism of resistance to hydrogen peroxide in *Vibrio rumoiensis* S-1. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 73-79, Jan. 1999.

ICHISE, N. et al. Gene cloning and expression of the Catalase from hydrogen peroxide-resistant bacterium *Vibrio rumoiensis* S-1 and its subcellular localization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 90, p. 530-534, Nov. 2000.

IŞIK, K. et al. Antioxidant response of a novel *Streptomyces* sp. M3004 isolated from legume rhizosphere to H₂O₂ and paraquat. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 235-243, Feb. 2007.

JOHNSEN, K. et al. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural – a review. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 33, p. 443-453, Jun. 2001.

JUNG, I.L.; KIM, I.G. Transcription of *ahpC*, and *katE* genes in *Escherichia coli* is regulated by polyamines: polyamine-deficient mutant sensitive to H₂O₂-induced oxidative damage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 301, p. 915-922, Feb. 2003.

KANAI, T.; TAKAHASHI, K.; INOUE, H. Three distinct-type glutathione S-transferase from *Escherichia coli* important for defense against oxidative stress. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 140, p. 703-711, Oct. 2006.

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

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.

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

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

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

- LAABS, V. et al. Fate of pesticides in tropical soils of Brazil under field conditions. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 31, p. 256-268, Jan-Feb. 2002.
- LEE, D.H.; LEE, C.B. Chilling stress induced changes of antioxidants enzymes in the leaves of cucumber. In gel enzyme activity assays. **Plant Science**, Limerik, v.159, p. 75-85, Oct. 2000.
- LEE, H.J.; GU, M.B. Construction of a *sodA::luxCDABE* fusion *Escherichia coli*: comparison with a *katG* fusion strain through their responses to oxidative stresses. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 60, p. 577-580, Jan. 2003.
- LIU, S.Y. et al., Sorption and metabolism of metolachlor by a bacterial community. **Applied and Environmental Biology**, Baltimore, v. 55, p. 733-740, Mar. 1989.
- LÜ, Z.; MIN, H.; XIA, Y. The response of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Burkholderia cepacia* WZ1 to oxidative stress of exposure to quinclorac. **Journal of Environmental Health Science**, New York, v. 39, p. 431-441, Jan. 2004.
- MAHALINGAM, R.; FEDOROFF, N. Stress response, cell death and signaling: the many faces of reactive oxygen species. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 119, p. 56-68, Sep. 2003.
- MARONI, M. et al. Introduction. **Toxicology**, Amsterdam, v. 143, p. 5-8, Feb. 2000.
- MARTINS, P.F. et al. Selection of microorganisms degrading s-metolachlor herbicide. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, p. 153-159, Jan. 2007.
- MASIP, L.; VEERAVALLI, K.; GEORGIU, G. The many faces of glutathione in bacteria. **Antioxidants & Redox signaling**, New Rochelle, v. 8, p. 753-762, May-Jun. 2006.
- MATÉS, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, Amsterdam, v. 153, p. 83-104, Nov. 2000.
- MATTSON, M.P. Answering the old age question. **Chemistry & Industry**, London, v. 20, p. 843-848, Oct. 1998.
- MCCORDE, J M; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases: an enzymatic function for erythrocytes (emocuprien). **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 244, p.6049-6055, Nov.1969.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 17 nov. 2007.

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

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Acesso em: 28 mar. 2006.

NICHOLSON, P.S.; HIRSCH, P.R. The effects of pesticides on the diversity of culturable soil bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, p. 551-558, May. 1998.

OKAMOTO, O. K. et al. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 40, p. 18-24, Jan. 2001.

PARAÍBA L.C. et al. Evaluation of soil temperature effect on herbicide leaching potential into groundwater in the Brazilian Cerrado. **Chemosphere**, Oxford, v. 53, p. 1087-1095, Dec. 2003.

PASSARDI, F. et al. Phylogenetic distribution of catalase-peroxidases: Are there patches of order in chaos? **Gene**, Amsterdam, v. 397, p. 101-113, Aug. 2007.

POMPEU, G.B. **Análise da resposta antioxidativa de células *in vitro* de fumo (*Nicotiana tabacum* cv BY-2) submetidas ao metal pesado níquel**. 2005. 97 p. Dissertação (MS em Ecologia de Agrossistemas)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

POSTLE, J.K. et al. Chloroacetanilide herbicide metabolites in Wisconsin groundwater: 2001 survey results. **Environmental Science and Technology**. Washington, v. 38, p. 5339-5343, Oct. 2004.

POTHULURI, J.V. et al. Metabolism of Metolachlor by the fungus *Cunninghamella elegans*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 32, p. 117-125, Feb. 1997.

- PRADE, L.; HUBER, R.; BIESELER, B. Structures of herbicides in complex with their detoxifying enzyme glutathione S-transferase – explanations for the selectivity of the enzyme in plants. **Structure**, London, v. 6, p. 1445-1452, Nov. 1998.
- RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. 5. ed. Londrina: B.N Rodrigues, 2005. 592 p.
- SANYAL, D.; KUHLSHRESTHA, G. Degradation of metolachlor in soil inoculated with a mixed fungal culture. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 38, p. 253-256, Aug. 2003.
- SCRUTTON, N.S.; BERRY, A.; PERHAM, R.N. Purification and characterization of glutathione reductase encoded by a cloned and over-expressed gene in *Escherichia coli*. **Biochemical Journal**, London, v. 245, p. 875-880, Aug. 1987.
- SMIRNOVA, G.V.; OKITABRSBY, O.N. Glutathione in bacteria. **Biochemistry**, New York, v. 70, p. 1459-1473, Nov. 2005.
- SOBRAL, J.K.; et al. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**. Oxon, v.6, p. 1244-1251, dec. 2004.
- ŠTAJNER, D.; POPOVIĆ.; ŠTAJNER, M. Herbicide induced oxidative stress in lettuce, beans, pea seeds and leaves. **Biologia plantarum**, Praha, v. 47, p. 575-579, Dec. 2003/4.
- STAMPER, D.M.; TUOVINEN, 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. et al. Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 82-83, p. 173-179, Dec. 1995.
- TAMBURRO, A. et al. Expression of glutathione S-transferase and peptide methionine sulfoxide reductase in *Ochrobactrum anthropi* is correlated to the production of reactive oxygen species caused by aromatic substrates. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 241, p. 151-156, Dec. 2004.

TAYLOR, S. et al. Glutathione peroxidase protects cultured mammalian cells from the toxicity of adriamycin and paraquat. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 305, p. 600-605, Sep. 1993.

URGUN-DEMIRTAS, M.; STARK, B.; PAGILLA, K. Use of genetically engineered microorganisms (GEMs) for the bioremediation of contaminants. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 26, p. 145-164, Jul-Sep. 2006.

VANCOV, T. et al. Enhancing cell survival of atrazine degrading *Rhodococcus erythropolis* NI86/21 cells encapsulated in alginate beads. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 102, p. 212-220, Jan. 2007.

VIDALI, M. Bioremediation. An Overview. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 73, p. 1163-1172, Jul. 2001.

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

VUILLEUMIER, S.; PAGNI, M. The elusive roles of bacterial glutathione S-transferases: new lessons from genomes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 58, p. 138-146, Feb. 2002.

WEBER, J. B.; TAYLOR, K.A.; WILKERSON, G.G. Soil and herbicide properties influenced mobility of atrazine, metolachlor and primisulfuron-methyl in field lysimeters. **Agronomy Journal**, Madison, v. 98, p. 8-18, Jan-Feb. 2006.

WOLF, A.E.; DIETZ, K.J.; SCHRODE, P. Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 384, p. 31-34, Apr. 1996.

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**, Orlando, v. 19, p. 309-314, Aug. 2006.

YU,P. Enhancing survival of *Escherichia coli* by increasing the periplasmic expression of Cu,Zn superoxide dismutase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 76, p. 867-871, Sep. 2007.

ZABLOTOWICZ, R.M. et al. Glutathione-S-transferase activity and metabolism of glutathione conjugates by rhizosphere bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. Baltimore, v. 61, p. 1054-1060, Mar. 1995.

ANEXOS

Tabela 14 – Valores médios das concentrações de proteínas para os tratamentos: bactérias e s-metolachlor

	Não cultivada	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Enterobacter cloacae</i>
controle	1,72 Bc	6,23 Aa	4,21 Ab
34 mM	1,47 Bc	3,34 Ba	2,69 Bb
340 mM	2,76 Aab	3,27 Ba	2,57 Bb

C.V. %= 8,81

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); as letras minúsculas comparam as médias de concentração de proteínas dentro do mesmo tratamento de s-metolachlor (linhas) e as maiúsculas comparam as médias para cada bactéria (colunas)

Tabela 15 – Valores médios de MDA para os tratamentos: bactérias e s-metolachlor

	Não cultivada	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Enterobacter cloacae</i>
controle	2,20 Ba	2,33 Aa	0,93 Cb
34 mM	2,87 Ba	2,61 Aa	1,54 Bb
340 mM	4,26 Aa	3,42 Aa	3,48 Aa

C.V. %= 3,78

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); as letras minúsculas comparam as médias de concentração de proteínas dentro do mesmo tratamento de s-metolachlor (linhas) e as maiúsculas comparam as médias para cada bactéria (colunas)

Dados transformados ($\log_{10}x$)

Tabela 16 – Valores médios das atividade de CAT para os tratamentos: bactérias e s-metolachlor

	Não cultivada	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Enterobacter cloacae</i>
controle	37,15 Ba	5,78 Ac	16,38 Bb
34 mM	55,34 Aa	8,73 Ac	29,33 Ab
340 mM	1,26 Cb	1,64 Bb	18,31 Ba

C.V. %= 12,67

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); as letras minúsculas comparam as médias de concentração de proteínas dentro do mesmo tratamento de s-metolachlor (linhas) e as maiúsculas comparam as médias para cada bactéria (colunas)

Dados transformados ($\log_{10}x$)

Tabela 17 – Valores médios da atividade de GR para os tratamentos: bactérias e s-metolachlor

	Não cultivada	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Enterobacter cloacae</i>
controle	1,90 Aa	3,48 Aa	2,84 Aa
34 mM	1,97 Ac	3,66 Aa	2,90 Ab
340 mM	1,23 Ba	0,81 Bb	1,04 Ba

C.V. %= 12,67

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); as letras minúsculas comparam as médias de concentração de proteínas dentro do mesmo tratamento de s-metolachlor (linhas) e as maiúsculas comparam as médias para cada bactéria (colunas)

Dados transformados ($\log_{10}x+100$)

Tabela 18 – Valores médios da atividade de GR para os tratamentos: bactérias e s-metolachlor

	Não cultivada	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Enterobacter cloacae</i>
controle	0,0056 Bb	0,0032 Bb	0,0118 Aa
34 mM	0,0094 Aa	0,0055 Aa	0,0021 Bb
340 mM	0,0032 Bb	0,0017 Bb	0,0063 Ba

C.V. %= 5,72

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); as letras minúsculas comparam as médias de concentração de proteínas dentro do mesmo tratamento de s-metolachlor (linhas) e as maiúsculas comparam as médias para cada bactéria (colunas)

Dados transformados ($\log_{10}x+10000$)