

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

Efeito dos herbicidas ametrina e clomazone no sistema antioxidante bacteriano

Leila Priscila Peters

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

**Piracicaba
2011**

Leila Priscila Peters
Licenciada em Ciências Biológicas

Efeito dos herbicidas ametrina e clomazone no sistema antioxidante bacteriano

Orientador:
Prof. Dr. **RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO**

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

Piracicaba
2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Peters, Leila Priscila

Efeito dos herbicidas ametrina e clomazone no sistema antioxidante bacteriano / Leila Priscila

Peters. - - Piracicaba, 2011.

124 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.
Bibliografia.

1. Antioxidantes 2. Bactérias 3. Enzimas 4. Estresse oxidativo 5. Genética bioquímica
6. Herbicidas - Efeitos I. Título

CDD 589.9015
P482e

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

Aos meus amores...

Pai Odilon e mãe Dircéa;

Bethânia, Diogo, Danilo e Moisés.

E todas as outras pessoas que com um sorriso,

uma palavra ou um gesto amigo,

fizeram a minha caminhada mais fácil de ser percorrida...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder vida e saúde para realizar este trabalho e por iluminar o meu caminho;

A CAPES e FAPESP pela concessão das bolsas de estudo e no caso da FAPESP também pelo auxílio à pesquisa;

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, pela oportunidade de aprender, confiança e amizade;

A Gicka, não apenas por fazer parte diária na execução deste trabalho, mas pela linda amizade que temos desde infância, pela paciência, conselhos, companheirismo, alegrias e por toda ajuda. Eu lhe agradeço por tudo!

A Paula, pela amizade, conselhos, paciência, alegrias, ajuda no desenvolvimento deste trabalho e todos os momentos divertidos que tivemos juntas. Obrigada por tudo!

A Salete, pelas sugestões e contribuições no trabalho, pelos seus conselhos e pela sua sinceridade;

As minhas queridas amigas Aline e Dai, pelo conforto que me trazem com seus conselhos e amizade. Muito obrigada!

A Saly e Lia Maris, pela amizade e paciência;

Aos amigos do Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas, Milca, Mônica, Vanessa, Amerivan, Berenice, Lucas, Fernando, Rogério, Daniel e Sandra, pela convivência harmoniosa. Um agradecimento especial a Flávia, Priscila e Manuella pelo auxílio no desenvolvimento deste projeto.

Aos familiares e amigos que fazem parte da minha vida que, mesmo aqueles distantes, incentivaram de alguma forma. Em especial a minha madrinha Dirlei, Tia Christine e amigas: Janice, Gerusa, Georgia e Cristiane.

Ao Moisés, pelo amor, companheirismo, ajuda e paciência, fundamentais para esta conquista;

Aos meus pais amados, Odilon e Dircéa, que são exemplos de vida, amor, humildade, caráter e fé;

Aos meus irmãos queridos que amo muito, Bethânia, Diogo e Danilo, pelo amor, pelos momentos de alegrias e paz;

Aos meus amigos de Piracicaba, Carol, Mariana, Marco, Marise, Bruno, Sueli, Sâmala, Tiago e Victor;

Aos professores e funcionários do Programa;

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

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

"Quem decidir se colocar como juiz da verdade e do conhecimento é naufragado pela gargalhada dos deuses"

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Agrotóxicos, contaminação ambiental e danos aos seres vivos	17
2.2 Impactos dos pesticidas na microbiota do solo.....	22
2.3 Caracterização dos herbicidas ametrina e clomazone	23
2.3.1 Ametrina	23
2.3.2 Clomazone	25
2.4 Degradação dos herbicidas	26
2.5 Sistema antioxidante e estresse oxidativo	31
2.6 Sistema antioxidante bacteriano	33
2.6.1 Superóxido Dismutase (SOD).....	35
2.6.2 Catalase (CAT)	37
2.6.3 Glutathione (GSH)	40
2.6.4 Glutathione redutase (GR).....	41
2.6.5 Glutathione-S-Transferase (GST).....	42
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1 Coleta dos solos	45
3.2 Produtos químicos.....	45
3.3 Isolamento de bactérias tolerantes aos herbicidas	47
3.4 Seleção de bactérias tolerantes aos herbicidas.....	47
3.5 Crescimento bacteriano na presença dos herbicidas	48
3.6 Identificação das bactérias e árvore filogenética	49
3.6.1 Extração de DNA bacteriano	49
3.6.2 Amplificação do gene 16S DNAr	50
3.6.3 Purificação dos produtos de PCR.....	51
3.6.4 Sequenciamento	51
3.6.5 Identificação bacteriana através de análise filogenética.....	51
3.7 Análises bioquímicas.....	52
3.7.1 Coleta das células bacterianas.....	52
3.7.2 Determinação da peroxidação de lipídeos	53
3.7.3 Determinação dos níveis de peróxido de hidrogênio	54
3.7.4 Determinação dos níveis de glutathione – GSH/GSSG	54
3.7.5 Extração de proteínas	55
3.7.7 Determinação do perfil protéico em gel SDS-PAGE.....	55
3.7.8 Coloração com Prata para SDS-PAGE (falta referencia).....	56
3.7.9 Determinação das atividades das enzimas antioxidantes	56
3.7.10 Atividade da superóxido dismutase – SOD.....	57
3.7.10.1 Atividade em espectrofotômetro	57
3.7.10.2 Atividade em PAGE	57
3.7.10.3 Caracterização de isoenzimas de SOD	58
3.7.11 Atividade da Catalase – CAT	59
3.7.11.1 Atividade em espectrofotômetro	59

3.7.11.2 Atividade em PAGE	59
3.7.12 Atividade de glutathione redutase - GR	60
3.7.12.1 Atividade em espectrofotômetro	60
3.7.12.2 Atividade em PAGE	60
3.7.13 Atividade de glutathione-S-transferase – GST	61
3.7.13.1 Atividade em espectrofotômetro	61
3.8 Análise estatística.....	61
4 RESULTADOS.....	63
4.1 Isolamento de bactérias tolerantes aos herbicidas.....	63
4.2 Seleção de bactérias tolerantes aos herbicidas.....	64
4.3 Identificação bacteriana e árvore filogenética	65
4.4 Crescimento bacteriano na presença dos herbicidas	67
4.5 Avaliação da peroxidação lipídica pela determinação dos níveis de malondialdeído (MDA)	68
4.6 Determinação dos níveis de peróxido de hidrogênio	70
4.7 Determinação dos níveis de glutathione – GSH	71
4.8 Quantificação de proteínas e perfil protéico em SDS-PAGE.....	72
4.9 Superóxido Dismutase (SOD)	75
4.9.1 Atividade em espectrofotômetro	75
4.9.2 Atividade em PAGE.....	76
4.10 Catalase (CAT)	78
4.10.1 Atividade em espectrofotômetro	78
4.10.2 Atividade em PAGE.....	79
4.11 Glutathione Redutase (GR).....	80
4.11.1 Atividade em espectrofotômetro	80
4.11.2 Atividade em PAGE	82
4.12 Glutathione-S-transferase (GST)	83
4.12.1 Atividade em espectrofotômetro	83
5 DISCUSSÃO	85
6 CONCLUSÕES	101
REFERÊNCIAS.....	103

RESUMO

Efeito dos herbicidas ametrina e clomazone no sistema antioxidante bacteriano

Os herbicidas ametrina e clomazone são amplamente utilizados na cultura de cana-de-açúcar, apresentam degradação essencialmente microbiana e são considerados contaminantes de solos e águas. A exposição dos microrganismos a estes xenobióticos pode resultar em dano oxidativo devido ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Este trabalho teve como objetivo analisar respostas bioquímicas e fisiológicas de dois isolados bacterianos tolerantes aos herbicidas ametrina e clomazone. As bactérias foram isoladas de solos agrícolas e a partir de estudos fisiológicos, crescimento e formação de halo, foram selecionadas duas que apresentaram maior tolerância aos herbicidas. Esses microrganismos foram cultivados em meio de cultura ágar nutriente, a 30°C, por 14 horas na presença dos herbicidas ametrina (25 mM), clomazone (9 mM), e em meio composto pelos dois herbicidas: ametrina (20 mM) + clomazone (20 mM). Essas concentrações representam as dosagens utilizadas para o cultivo de cana-de-açúcar para a aplicação pré e pós-emergência. Por meio da análise filogenética baseada no gene 16S ribossômico, o isolado bacteriano CC07 mostrou-se próximo a *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto que o isolado 4C07 ficou próximo à *Pseudomonas fulva*. A peroxidação lipídica foi observada somente para o isolado CC07 na presença dos herbicidas em mistura. O perfil protéico foi avaliado em SDS-PAGE, o qual revelou a indução de uma nova proteína de aproximadamente 60 KDa para o isolado 4C07 na presença dos herbicidas, porém, não foram observadas diferenças significativas para o isolado CC07. A enzima superóxido dismutase (SOD) apresentou aumento significativo da atividade para ambos isolados quando expostos aos herbicidas, entretanto, diferenças na atividade da enzima catalase (CAT) não foram observadas. Para o isolado 4C07 na presença dos herbicidas foi observado aumento significativo no conteúdo de glutatona reduzida (GSH), o qual foi acompanhado pela indução de uma nova isoforma de GR (I), que respondeu especificamente ao clomazone e os herbicidas em mistura. A glutatona-S-transferase (GST) também apresentou acréscimos de atividade quando o isolado 4C07 foi exposto aos herbicidas. Porém, para o isolado CC07 as enzimas GR, GST, assim, como a GSH não apresentaram respostas significativas a presença dos herbicidas. Assim, foi possível observar que o isolado 4C07 possui um sistema antioxidante mais eficaz, quando comparado com o isolado CC07. Além disso, os resultados sugerem que as enzimas SOD, GR, GST e o composto GSH podem estar relacionados com o mecanismo de tolerância do isolado 4C07 aos herbicidas ametrina e clomazone, o que pode demonstrar uma provável adaptação aos ambientes estressantes.

Palavras-chave: Bactéria; Herbicidas; Estresse oxidativo; Enzimas antioxidantes

ABSTRACT

Effect of herbicides ametrina and clomazone on bacterial antioxidant system

The herbicides ametrina and clomazone are widely used in the sugar cane cultivation, showing essential microbial degradation, besides being considered contaminants of soil and water. The exposure of microorganisms to xenobiotics can result in oxidative damage due to increased production of reactive oxygen species (ROS). This study aimed to analyze biochemical and physiological responses of two bacterial strains tolerant to the herbicides ametrina and clomazone. The bacteria strains were isolated from agricultural soils and according to physiological studies, growth and halo formation, two of them with the most herbicide tolerance were selected. These microorganisms were grown in nutrient agar plates at 30 ° C for 14 hours in the presence of herbicides ametrina (25 mM), clomazone (9 mM), and in a medium composed by two herbicides: ametrina (20 mM) + clomazone (20 mM). These concentrations represent the concentrations used for growing sugar cane for pre and post-emergence. Through the phylogenetic analysis based on 16S ribosomal gene, the CC07 strain was close to *Pseudomonas aeruginosa*, while the 4C07 strain was close to *Pseudomonas fulva*. According to the results obtained, lipid peroxidation was only observed for CC07 strain in a medium composed by two herbicides. The protein profile was evaluated by SDS-PAGE, which revealed the induction of a new protein of approximately 60 kDa for 4C07 strain in the presence of the two herbicides, differently to that observed for CC07 strain. The activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD) increased significantly for both strains when exposed to the herbicides, however, no differences were observed for catalase (CAT) activity. The 4C07 strain showed increase in content of reduced glutathione (GSH) in the presence of the herbicides, which was accompanied by the induction of a new isoform of GR (I). Similarly, the 4C07 strain exhibited an increase in Glutathione-S-transferase (GST) activity to herbicides exposure. However, for the CC07 strain, the GR and GST enzymes, as well as the GSH content did not exhibit differences. Thus, we observed that the 4C07 strain may have an antioxidant system more effective when compared to the CC07 strain. Moreover, the results suggest that the enzymes SOD, GR, GST and GSH content may be related to the mechanism of tolerance of 4C07 strain to ametrina and clomazone herbicides, showing the tendency to deal better and adapt to stressful environments.

Keywords: Bacteria; Herbicides; Oxidative stress; Antioxidants enzymes

1 INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial trouxe um grande desafio para a agricultura moderna, o de manter e melhorar sua produtividade, porém, conservando o meio ambiente e diminuindo os seus impactos ambientais. O uso intensivo dos pesticidas, apesar de favorecer a produtividade agrícola, leva à transferência entre ecossistemas, acúmulo ao longo da cadeia alimentar e persistência no ambiente. Estes fatores acarretam na contaminação do solo, da água e do ar causando toxicidade ao ambiente e aos humanos. Diversos estudos evidenciam que a contaminação por agroquímicos causa alterações no metabolismo e na diversidade genética dos microrganismos, além de mudanças nos nutrientes do solo. A fertilidade deste depende de características físicas, químicas e biológicas, que em equilíbrio, são essências para a produtividade de um sistema agrícola sustentável.

Atualmente, o Brasil é o maior consumidor mundial de pesticidas e os herbicidas representam cerca de 56% do total comercializado no país. Deste total, aproximadamente 20% são utilizados no cultivo de cana-de-açúcar, hoje, a maior responsável pelo crescimento de área cultivada. Os herbicidas ametrina e clomazone são amplamente utilizados nesta cultura, apresentam mecanismo de ação relacionado com a geração de estresse oxidativo nas células vegetais, além de serem detectados como contaminantes de solos e de águas superficiais/subterrâneas.

Diversos estudos demonstram que os herbicidas quando em contato com os microrganismos nos solos podem levar a alterações no metabolismo celular intensificando a produção das espécies reativas de oxigênio (EROs). Esses produtos são tóxicos para muitos microrganismos e podem causar danos as proteínas, lipídeos, DNA e RNA. Em resposta ao aumento das EROs na presença de herbicidas, os microrganismos ativam mecanismos de defesa em combate ao estresse oxidativo. O estudo do estresse causado pela exposição de microrganismos a herbicidas visa compreender o mecanismo de transdução de sinais entre moléculas antioxidantes e xenobióticos, uma vez que este conhecimento é de grande importância para a melhor compreensão do sistema enzimático de biodegradação e posterior aplicação de técnicas biotecnológicas de desintoxicação ambiental, como a biorremediação.

Portanto, o objetivo desse trabalho foi analisar o efeito dos herbicidas ametrina e clomazone no metabolismo de bactérias isoladas de solos agrícolas, principalmente, por meio da análise da resposta do sistema antioxidante bacteriano.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Agrotóxicos, contaminação ambiental e danos aos seres vivos

No século XIX foram relatados os primeiros estudos científicos sobre o uso de compostos químicos, época em qual foram propostas diversas misturas inorgânicas para o controle de pragas agrícolas, como cal e enxofre, arsenito de cobre e arsenato de chumbo (BARBOSA, 2004). Subsequentemente diversas descobertas ocorreram e vários agrotóxicos foram formulados e começaram a ser utilizados em grande escala (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009). Durante a segunda guerra mundial, milhares de compostos químicos foram testados com intuito de desenvolver armas químicas e também como uma forma de encontrar novos inseticidas que pudessem proteger os soldados das pragas transmissoras de doenças. (BARBOSA, 2004).

Um marco importante que contribuiu expressivamente para a aplicação dos agrotóxicos foi a descoberta do inseticida DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), em 1944, quando mais de um milhão de pessoas em Nápoles (Itália) foram borrifadas com o inseticida para o controle de tifo e desta forma, a epidemia foi totalmente controlada (RUUS et al., 2010). Com esses resultados fantásticos no controle de insetos, empreendeu-se uma corrida pelas descobertas de novos pesticidas. Desde então, novas moléculas foram descobertas com características físico-químicas que propiciam funcionalidades diferenciadas e comportamentos ambientais distintos, com grandes alterações nos perfis toxicológicos e ecotoxicológicos (ARMAS et al., 2007).

Além disso, partir dos anos 60 a população mundial mais do que duplicou, de 3 bilhões passou a constar, atualmente, 6,8 bilhões de pessoas, aumentando, conseqüentemente, a demanda por alimentos e matéria-prima (DONALDSON, 2010). Seguindo-se essa tendência, ao longo desses anos, a agricultura mundial cresceu em produtividade e em área cultivada, acompanhado pelo uso de fertilizantes, técnicas de manejo e uso intensivo de agrotóxicos (ARMAS et al., 2007).

Em todo mundo estima-se que cerca de 2,27 milhões de toneladas de agrotóxicos são lançados anualmente no meio ambiente, sendo que 35% correspondem aos herbicidas (VERCRAENE-EAIRMAL et al., 2010). O setor de defensivos agrícolas no Brasil, em 2009, comercializou 725 mil toneladas de produtos formulados, dos quais a classe dos herbicidas

representou 59% desse total e aproximadamente 20% são utilizados no cultivo de cana-de-açúcar (SINDAG, 2009).

O estado de São Paulo é o maior consumidor brasileiro de agrotóxicos, local onde se destaca a cultura de cana-de-açúcar que consome 11,5% das vendas de agrotóxicos (ARMAS et al., 2007). Apesar da utilização de agrotóxicos na agricultura ter beneficiado a produtividade de culturas de importância econômica, surgiram algumas preocupações quanto ao efeito negativo dos pesticidas sobre os organismos não-alvos, incluindo microrganismos, plantas, animais e seres humanos (JIANG et al., 2008). Estudos relatam que apenas 0,1% dos pesticidas aplicados nas culturas atingem seus alvos e grande parte permanece no ambiente, solos, águas superficiais/subterrâneas e ar (PIMENTEL; LEVITAN, 1986; LOPEZ-PEREZ et al., 2006; SHARMA et al., 2010). Conforme observado por Schwarzenbach et al. (1995), entre estes compostos tóxicos, a maioria apresenta características como: hidrofobicidade elevada e baixa reatividade no meio ambiente. Essas características justificam a tendência desses compostos em se acumularem ou bioconcentrarem nos tecidos dos organismos vivos, assim, o impacto desses produtos sobre a biodiversidade ameaça todos os tipos de ecossistemas (HUERTAS et al., 2010).

Diversas pesquisas sobre contaminação ambiental por pesticidas são relatadas na literatura (PROCÓPIO et al., 2005; TRAN; HYNE; DOBLE, 2007; JACOMINI et al., 2009; HUERTAS et al., 2010). Os herbicidas da classe s-triazinas, os quais incluem ametrina, prometrina, atrazina, simazine, entre outros, são utilizados mundialmente e, são frequentemente detectados em amostras de solos e águas, possuindo alta resistência no ambiente, podendo permanecer anos no solo, nas águas e nos organismos (JACOMINI et al., 2009; WU et al., 2010). Estudos com águas superficiais e subterrâneas no Estado do Rio Grande do Sul – Brasil, detectaram a presença do herbicida atrazina e outros 18 pesticidas na lagoa Mirim, a qual é responsável por 97% da demanda hídrica que serve para irrigar as lavouras de arroz nessa região (CABRERA; COSTA; PRIMEL, 2008). Nos Estados Unidos, esse herbicida foi encontrado com alta incidência em águas superficiais e subterrâneas, sendo que as pesquisas incluíram 178 córregos e mais de 2700 poços (GILLIOM et al., 2006). Na Austrália, atrazina e seus subprodutos também foram detectados em baixas concentrações (sub L⁻¹ mg) em águas subterrâneas/superficiais em vários estados (KOOKANA et al., 2010).

Pesquisas com o herbicida prometrina indicaram que 20% do total desse herbicida, quando aplicado sobre a superfície do solo, permanece adsorvido (JURY et al., 1986), além disso,

encontrou-se 9,4% de prometrina entre 30 -50 cm de profundidade em solos que estavam sob repouso, em processos de rotação de cultura (GHODRATI; JURY, 1992). Recentemente, estudos demonstraram a sua presença em águas superficiais (PAPADOPOULOU-MOURKIDOU et al., 2004), e sua capacidade de ser acumulado pelas culturas, mesmo estando em pequenas concentrações no solo (JIANG; YANG, 2009).

No Brasil, um estudo desenvolvido pela SUREHMA (Superintendência dos Recursos Hídricos e Meio Ambiente) no estado do Paraná, no período de 1974 a 1976, constatou que 84%, de um total de 1825 amostras de águas colhidas nos rios apresentaram resíduos de pesticidas e que 78% destas amostras encontravam-se contaminadas mesmo depois dos tratamentos convencionais de águas (CHAVES, 2007). Monitoramentos realizados durante três anos (2000-2003) em dois rios brasileiros (Vacacaí e Vacacaí-mirim) no Estado do Rio Grande do Sul detectaram a presença dos herbicidas clomazone, em maior concentração, quinclorac e propanil (MARCHESAN et al., 2007). Pesquisas realizadas em 22 países europeus sobre a contaminação do ar revelaram a presença de pesticidas organoclorados, HCB, α -HCH, γ -HCH, ppDDT, ppDDE (JAWARD et al., 2004), e outros estudos detectaram os herbicidas atrazina e desetilatraxina em águas subterrâneas (BARTH et al., 2007).

Além dos efeitos ambientalmente indesejáveis da utilização de agrotóxicos, o uso desses compostos pode levar a contaminação de alimentos (JARDIM; ANDRADE ; QUEIROZ, 2009). Muitos estudos relataram a ocorrência de resíduos de pesticidas em frutas (HUSKOVA; MATISOVA; KIRCHNER, 2008; KNEZEVIC; SERDAR, 2009) e legumes (RIAL-OTERO et al., 2005; BHANTI; TANEJA, 2007) em níveis acima dos valores máximos recomendados pela União Européia (UE), Organização mundial da saúde (OMS) e Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) (SHARMA et al., 2010). Resíduos de pesticidas em frutas e legumes foram monitorados na cidade de São Paulo entre 1994 a 2001, e os dados mostraram que 32,6% possuíam um ou mais resíduos de pesticidas (GEBARA et al., 2005).

Desta forma, nos últimos anos, muitas pesquisas têm comprovado a toxicidade dos pesticidas aos seres vivos. Muitos deles são classificados como mutagênicos, carcinogênicos (CHEN et al., 2009; SARABIA; MAURER; BUSTOS-OBREGON, 2009; GASNIER et al., 2010), citotóxicos (WAGNER; MCMILLAN; PLEWA, 2005; GIORDANO et al., 2007), genotóxicos (ÇAKIR; SARIKAYA, 2005) e imunotóxicos (YEH et al., 2005). Além disso, podem provocar disfunção endócrina em espécies de vertebrados (HAYES et al., 2002), exemplo

disso, são alguns pesticidas organofosforados que interferem na reprodução de aves, especialmente do sexo masculino (RODRIGUEZ; BUSTOS-OBREGON, 2000). Estudos têm mostrado que os herbicidas da classe s-triazinas (ametrina) podem causar anormalidades sexuais em sapos; (HAYES et al., 2003; SULLIVAN; SPENCE, 2003), reduzir a produção de testosterona em ratos (TRENTACOSTE et al., 2001) e em níveis elevados, para humanos, pode causar náuseas, vômitos, diarreias, fraqueza muscular e câncer de próstata (MACLENNAN et al., 2002). O herbicida clomazone, assim como os organofosforados e carbomatos, são capazes de alterar a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7) (SANCHO; CERON; FERRANDO, 2000; ROEX; KEIJZERS; VAN GESTEL, 2003; CRESTANI et al., 2007). Esta enzima, encontrada em animais, é responsável por degradar o neurotransmissor acetilcolina, regulando seus níveis no sistema nervoso central e, a inibição desta enzima pode levar a diversos efeitos comportamentais, tais como hiperatividade, tremores, convulsões e morte, (ROEX; KEIJZERS; VAN GESTEL, 2003).

Outro fato referente a ação desses xenobióticos é a destruição de predadores benéficos de pragas, aumentando assim a virulência de várias espécies de pragas agrícolas (WILSON; TISDELL, 2001), bem como podem alterar a microbiota dos solos (CHAVES, 2007).

Diante do exposto, os herbicidas ametrina e clomazone foram selecionados para o desenvolvimento desta pesquisa, uma vez que apresentam grande potencial de contaminação de águas e solos (ROSSOTTI et al., 2010) e são usados intensivamente na cultura de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. Estudos referentes ao monitoramento da qualidade das águas da sub-bacia do rio Corumbataí, a qual abastece os municípios de Piracicaba, Analândia, Charqueada, Corumbataí, Ipeúna, Itiparina, Rio Claro e Santa Gertrudes - SP revelaram a presença dos herbicidas ametrina e clomazone acima do nível permitido pela OMS (ARMAS et al., 2006); esta bacia hidrográfica possui área de 170.775,60 ha, da qual, 132.420,85 ha estão ocupadas por plantios de cana-de-açúcar.

Neste mesmo trabalho, o autor demonstrou a capacidade desses xenobióticos percolarem no perfil do solo, bem como a ocorrência de escoamento superficial (*runoff*) para os rios, caracterizando a forma de contaminação dos herbicidas nestes ambientes. Outras pesquisas detectaram a contaminação desses herbicidas (ametrina e clomazone) em águas superficiais, com variação de 0,17-0,23 $\mu\text{g L}^{-1}$, no município de Ribeirão Preto - SP (CERDEIRA et al., 2005). No município de São Carlos – SP, em amostras de caldo de cana foram encontrados resíduos do

herbicida ametrina (ZUIN et al., 2006) e ainda, níveis elevados deste herbicida foram detectados em amostras de bivalves (*Corbicula fluminea*) do rio Mogi-Guaçu, no Estado de São Paulo (JACOMINI et al., 2009).

Estes herbicidas são comumente detectáveis no meio ambiente em outras regiões do Brasil, pois são utilizados, além da cana-de-açúcar, em diversas culturas como: arroz, tabaco, algodão e café. Santos et al. (2008) em um estudo realizado com águas superficiais próximas a áreas de cultivo de arroz, no Rio Grande do Sul, revelaram que 90% das amostras continham resíduos do herbicida clomazone. Bortoluzzi et al. (2006) verificaram a presença deste pesticida em águas adjacentes à plantações de tabaco. Em solo cultivado com cana, na região nordeste do pantanal mato-grossense, foram detectados resíduos de ametrina na maioria das amostras coletadas em águas de superfície, embora em baixas concentrações. Entretanto, em amostras de sedimentos, as concentrações foram superiores a $4,5 \mu\text{g kg}^{-1}$. A elevada frequência de detecção de ametrina, juntamente com sua alta concentração em algumas amostras, foi atribuída, conforme os autores, ao intenso cultivo de cana-de-açúcar no nordeste do pantanal, na qual utiliza-se o ametrina (LAABS et al., 2002).

A presença de ametrina e clomazone em amostras de águas e solos tem sido relatada na literatura não somente no Brasil, como também em outros países, tais como Espanha (NEVADO et al., 2007), Itália (ZAMBONIN; PALMISANO, 2000), China (LI et al., 2010), Uruguai (CARLOMAGNO et al., 2010), Estados Unidos (GUNASEKARA et al., 2009).

Os principais problemas dos agrotóxicos estão centrados em sua toxicidade seletiva, persistência no ambiente, mobilidade e potencial de bioacumulação (SILVA, 2004) e pela grande diversidade de compostos químicos, mais de 1000, que são aplicados às culturas agrícolas no mundo (ORTELLI; EDDER; CORVI, 2004). Deste modo, os efeitos ecotoxicológicos e toxicológicos a longo prazo são pouco conhecidos, pois os agrotóxicos pertencem a famílias de substâncias de estruturas químicas muito diferentes, o que dificulta a generalização dos efeitos, levando à necessidade de considerar cada caso particularmente (CABRERA; COSTA; PRIMEL, 2008). Conseqüentemente, a degradação dos pesticidas é dependente de condições ambientais (temperatura, umidade, solo, pH.), características dos pesticidas (pK_a/b , hidrofobicidade) e da comunidade microbiana do solo (VAN EERD et al., 2003). Assim, a compreensão das conseqüências do uso permanente de agrotóxicos é de importância mundial e a procura por

mecanismos eficazes que visam reduzir os impactos ambientais devem ser considerados como um dos maiores desafios a ser enfrentado na atualidade.

2.2 Impactos dos pesticidas na microbiota do solo

A aplicação dos herbicidas no solo pode tanto suprimir quanto induzir a proliferação de microrganismos, alterando a diversidade do ecossistema. Segundo Kozdrój et al. (2001) a complexidade genética de comunidades bacterianas pode diminuir em aproximadamente 60% em solos contaminados e até cerca de 90% em solos altamente contaminados. Atlas et al. (1991) relataram a redução na diversidade genética de comunidades bacterianas em solos expostos ao herbicida 2,4,5-T; mudanças significativas nas comunidades bacterianas também foram encontradas na presença dos herbicidas metsulfuron-metil (GIRVAN et al., 2004), atrazina (ROS et al., 2006), ametrina (CHAVES, 2007), glufosinato de amônio (PAMPULHA; FERREIRA ; OLIVEIRA, 2007), glifosato (WIDENFALK et al., 2008), 2,4 diclorofenoxiacético-ácido-metil-ester (ZHANG, C. P. et al., 2010), endosulfan (MANICKAM et al., 2010), mesotrione (CROUZET et al., 2010), acetochlor, terbutilazina (BARRIUSO; MARIN; MELLADO, 2010), butachlor, diuron e dinoterb (LO, 2010).

Além das alterações na diversidade microbiana, outras pesquisas relatam a interferência dos pesticidas nas reações bioquímicas dos solos realizadas pelos microrganismos, como na mineralização da matéria orgânica, nitrificação, desnitrificação, amonificação, solubilização de fosfato inorgânico e reações redox, incluindo as atividades enzimáticas (HUSSAIN et al., 2009); (NIEMI et al., 2009). Mudanças na atividade da enzima desidrogenase (DHA) de bactérias foram observada por Grenni et al. (2009) na presença do herbicida linuron. Esta enzima está associada com a atividade respiratória dos microrganismos, bem como, no potencial catabólico que envolve as transformações (metabolização) do carbono. Desta forma, a atividade da DHA na presença de pesticidas pode ser reduzida ou estimulada, gerando distúrbios na mineralização de diferentes fontes de carbono no solo (CYCÓN; PIOTROWSKA-SEGET; KOZDRÓJ, 2010). Outras enzimas, como por exemplo, fosfatases, oxidoredutases, monooxidases, hidrolases, também podem ser inibidas ou estimuladas na presença de pesticidas (SCOTT et al., 2008). Tironi et al. (2009) avaliaram os efeitos dos herbicidas ametrina e trifloxysulfuron-sodium no potencial de solubilização de fosfato inorgânico de solos cultivados com cana-de-açúcar. Os

resultados mostraram que a solubilização potencial de fosfato inorgânico decresceu com a aplicação de ametrina, porém, foi estimulada pelo trifloxysulfuron-sodium.

Diante deste contexto, os riscos de desaparecimento e/ou deslocamento de microrganismos dentro de seus nichos, assim como a influência nas reações bioquímicas nos solos devem ser considerados, pois eles sustentam processos básicos como os ciclos biogeoquímicos, cadeia alimentar (CHAVES, 2007), formação e estrutura dos solos (LUPWAYI et al., 2001), supressão de patógenos (JANVIER et al., 2007), reciclagem de nutrientes em plantas (LUPWAYI et al., 2006) e a degradação de pesticidas e de outros poluentes (ERMAKOVA et al., 2010; ZHANG, H. et al., 2010; ONNEBY; JONSSON; STENSTROM, 2010).

Deste modo, os microrganismos contribuem significativamente para a fertilidade dos solos, sendo, portanto, bons indicadores da sua qualidade, uma vez que são muito sensíveis a qualquer mudança no seu nicho ecológico (DORAN; ZEISS, 2000).

2.3 Caracterização dos herbicidas ametrina e clomazone

2.3.1 Ametrina

Pertencente à classe das s-triazinas, uma das classes de herbicidas mais utilizadas e estudadas no mundo, provavelmente devido ao excelente desempenho dos efeitos seletivos sobre as plantas daninhas (MANDELBAUM; SADOWSKY; WACKETT, 2008). O herbicida ametrina foi lançado na década de 50 (GAST; KNUSLI; GYSIN, 1955) para a aplicação em pré e pós emergência, no controle de plantas daninhas anuais (folhas estreitas e largas) associadas às culturas de cana-de-açúcar, milho, citrus, banana, entre outras (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005). Este herbicida é utilizado em mais de 45 países, sendo o Brasil é o maior consumidor, seguido por Tailândia, México, Chile e Cuba (HERI, 2008).

No Brasil, diversas marcas de herbicidas possuem ametrina como ingrediente ativo (i.a), conforme observado na tabela 1. Esse herbicida (Figura 1) é classificado como mediamente tóxico (classe toxicológica III), no entanto, pode ser fortemente adsorvido por colóides do solo, mantendo-se muitas vezes na camada superior ou em solos arenosos pode ser mediamente lixiviável (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005). Andrade et al. (2010) relataram que a lixiviação de ametrina depende das características químicas e físicas e do teor da matéria orgânica dos solos,

assim, em solos com maiores valores de pH, ocorreu maior lixiviação. Segundo Ferri et al. (2000), em condições de baixo pH do solo, próximos ao valor de pKa de herbicidas básicos, como do ametrina, pode ocorrer a protonação de suas moléculas, adquirindo assim cargas positivas. Estas cargas são potencialmente adsorvidas pelos colóides do solo, os quais apresentam, predominantemente, cargas negativas.

Em plantas, quando o ametrina é adsorvido pelas raízes, é facilmente translocado pelo xilema, por movimento acrópeto, acumulando-se nos meristemas; já a movimentação pelo floema é reduzida. Quando este herbicida atinge os meristemas apicais inibe a fotossíntese, bloqueando a cadeia transportadora de elétrons (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005).

Tabela 1 - Marcas de herbicidas registrados que contêm ametrina como i.a

Ingrediente ativo	Marca comercial
Ametrina	Gesapax-GrDa
	Ametrex
	Ametrina-Agripec
	Ametrina-Atanor
	Herbipak 500-BR
	Gesapax 500-Ciba-Geigy
	Metrimex 500-SC
Ametrina+diuron	Ametron
Ametrina+tifloxysulfuron	Krismat
Ametrina+clomazone	Sinerge
Ametrina+diuron+MCPA	Agrittrin SC

Fonte: (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005)

A meia vida do ametrina é estimada entre 50 e 120 dias no solo e cerca de 200 dias em água natural com pH 7,0 e temperatura variando de 5 a 29°C. O tempo de meia-vida das s-triazinas pode ser reduzido com o aumento da acidez, aumento da temperatura e diminuição da umidade (OLIVEIRA; KOSKINEN; FERREIRA, 2001). Esse herbicida apresenta baixa

volatilidade e é medianamente sensível à fotólise. Em contato com o solo, fica primariamente sujeita a degradação microbiana, porém pode ocorrer a degradação química por processo de oxidação e hidrólise (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005).

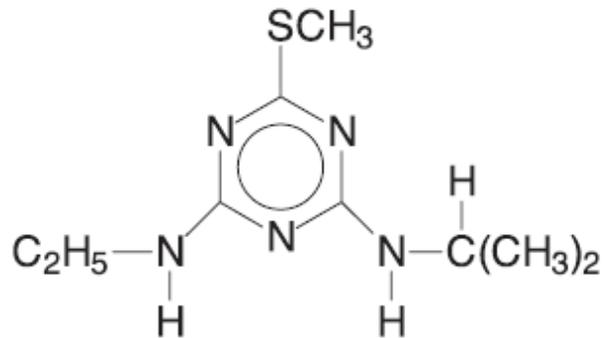


Figura 1 - Estrutura química do herbicida ametrina (ZUIN et al., 2006)

2.3.2 Clomazone

O herbicida clomazone (Figura 2), representante da classe isoxazolidinona, foi desenvolvido no início de 1980 para o controle de plantas daninhas com folhas largas e gramíneas (GUNASEKARA et al., 2009). É utilizado em várias culturas, como por exemplo, em cana-de-açúcar, arroz, tabaco, soja e algodão, com aplicação em pré e pós- emergência. No Brasil, é comercializado como Gamit (500 g/L) ou pode ser encontrado em mistura com ametrina (Sinerge-SE) (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005). É classificado como altamente tóxico (classe toxicológica II) e as perdas por fotooxidação e/ou volatilização são mínimas e, em contato com solo, é adsorvido pelos colóides, principalmente na presença de matéria orgânica. Cumming et al. (2002) detectaram resíduos de clomazone um ano após a aplicação em diferentes tipos de solos, no entanto, outro estudo relata a lixiviação da mistura ametrina e clomazone ao longo do perfil do solo de textura argilosa (MONQUERO et al., 2008).

A meia vida do clomazone no solo varia de 15 a 117 dias, dependendo do tipo do solo e das condições ambientais. A degradação deste herbicida, essencialmente microbiana, é mais rápida em condições anaeróbicas do que em condições aeróbicas (KIRKSEY et al., 1996).

O clomazone é preferencialmente absorvido pelas raízes das plantas e translocado via xilema para as folhas. A eficácia deste herbicida está relacionada ao seu modo de ação, pois inibe a síntese dos compostos isoprenóides precursores do pigmento fotossintético (LOCKE et al., 1996). Para isso, ocorre a formação dos metabólitos 5-cetoclomazone e 5-OH clomazone

(resultado da oxidação do clomazone), que por sua vez inibem a enzima deoxixilulose fosfato sintase (DXP sintase), enzima chave na síntese dos isoprenóides nos plastídios. Assim, quando os carotenóides estão ausentes e as plantas estão expostas a luz, o oxigênio singlet e a clorofila triplet dão início a peroxidação lipídica, devido a sua alta reatividade (YASUOR et al., 2008), uma vez que, os carotenóides possuem um papel importante na proteção da clorofila contra a fotooxidação (HESS, 2000). Desta forma, o modo de ação do produto torna-se bi-direcional, inibindo a produção de clorofila e a produção de pigmentos protetora da mesma. As plantas ficam brancas, por falta de clorofila, e morrem em pouco tempo (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005).

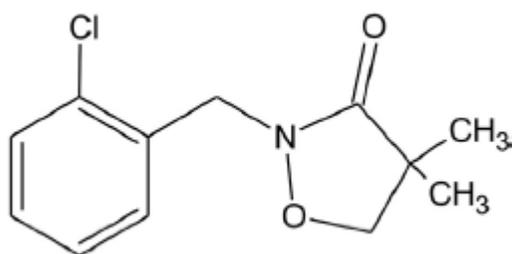


Figura - 2: Estrutura química do herbicida clomazone (SILVA et al., 2010)

2.4 Degradação dos herbicidas

A decomposição biológica dos pesticidas é a mais importante e a melhor forma de remover esses xenobióticos do ambiente (DABROWSKA; KOT-WASIK; NAMIESNIK, 2004). Os microrganismos têm a capacidade de interagir quimicamente e fisicamente com essas substâncias, levando a mudanças estruturais ou a completa degradação da molécula (RAYMOND et al., 2001). Dentro da comunidade microbiana, bactérias e fungos são os principais degradantes de pesticidas (DE SCHRIJVER; DE MOT, 1999). A biodegradação normalmente envolve o efeito interativo das comunidades mistas de microrganismos e conta com a versatilidade metabólica das bactérias e fungos (SILVA, 2004).

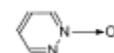
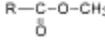
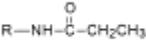
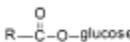
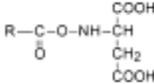
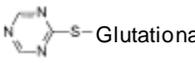
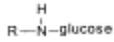
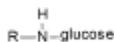
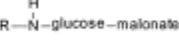
Nos solos, os microrganismos podem metabolizar os pesticidas orgânicos de forma aeróbica ou anaeróbica. Na maioria dos casos, as transformações podem ocorrer basicamente por catabolismo, processo em que os microrganismos degradam as moléculas e as utilizam como fonte de energia e nutrientes, ou por cometabolismo em que são necessárias outras fontes de carbono e de nutrientes para que ocorra a degradação (PENNY; VUILLEUMIER; BRINGEL, 2010), desta forma, o pesticida não é utilizado como fonte de energia para o crescimento do

microrganismo, mas sim metabolizado em conjunto com outros substratos (BRICEÑO et al., 2007).

Segundo Van Eerd et al. (2003), a metabolização dos pesticidas em microrganismos assim como em plantas pode envolver um processo composto de três fases, como apresentado na tabela 2. Na primeira fase as moléculas de origem (parentais) são transformadas por meio de reações de oxidação, redução ou hidrólise em produtos menos tóxicos e mais solúveis em água. A fase II envolve a conjugação do pesticida ou do seu metabólito gerado na fase I com moléculas de açúcares, aminoácidos ou com a glutatona, o que aumenta ainda mais a solubilidade em água e reduz a toxicidade comparada com a molécula parental. A terceira fase constitui novamente na conjugação do composto formado na fase II com outros metabólitos secundários existentes nas células, os quais são não tóxicos.

Muitos estudos têm reportado a via de degradação de atrazina em microrganismos, reportando enzimas e genes envolvidos nesse processo. Em *Pseudomonas* sp. ADP a via de degradação de atrazina é codificada por dois conjuntos gênicos: o primeiro, expresso por *atzA*, *atzB* e *atzC*, os quais codificam, respectivamente, as enzimas: atrazina clorohidrolase, hidroxiatrazina etilaminohidrolase, *N*-isopropilamida isopropilaminohidrolase, responsáveis pela transformação da atrazina em ácido cianúrico. O segundo conjunto gênico metaboliza o ácido cianúrico em NH_3 e CO_2 pela expressão do operon *atzDEF* e a produção das enzimas ácido cianúrico hidrolase, biureto hidrolase e alofanato hidrolase (SENE et al., 2010).

Tabela 2 - Três fases do metabolismo dos pesticidas em microrganismos e plantas, com exemplo de pesticidas e reações químicas não específica (VAN EERD et al., 2003)

Fase	reação	Exemplo de pesticida	exemplo não específico do esquema químico	
I	Oxidação		pesticida+O ₂	→ pesticida-O+H ₂ O
	aryl/alquil hidroxilação	chlortoluron		→ 
	O-desalquilação	etametsulfuron	R-OCH ₃	→ R-OH
	N-desalquilação	etametsulfuron	R-NHCH ₃	→ R-NH ₂
	desaminação oxidativa	metribuzin	R-NH-NH ₂	→ R-NH ₂
	sulfoxidação	prometrina	R-S-CH ₃	→ 
	oxidação nitrogênio	credazina		→ 
	Redução			
	nitro-redução	trifluralin	R-NO ₂	→ R-NH ₂
	Hidrólise			pesticida+ H ₂ O
éster		diclofop-metil		→ 
amida		propanil		→ R-NH ₂
nitrila		Cinazina	R-C≡N	→ R-C-O-NH ₂
II		Conjugação		pesticida + molécula/conjugada
	glucose			
	O-glucoside	metribuzin	R-OH	→ R-O-glucose
	N-glucoside	flumetsulam	R-NH ₂	→ R-N-glucose
	glucose ester	2,4-D		→ 
	aminoácido	2,4-D		→ 
	glutaciona	Atrazina		→ 
III	Conjugação Secundária		pesticida-conjugado + molécula conjugada	→ pesticida-conjugado-conjugado
	Glucose			
	malonato			
	Glucose	picloram-glucose		→ 
	malonato	metribuzin-glucose		→ 

Alguns estudos demonstram que microrganismos que apresentam essas enzimas também são capazes de mineralizar o herbicida ametrina, como é o caso de *Nocardioides* sp e *Arthrobacter aureescens* TC1 (STRONG et al., 2002; YAMAZAKI et al., 2008). Existem evidências de que estas enzimas evoluíram para atuar em herbicidas (SEFFERNICK; WACKETT, 2001) e são encontradas em diversos gêneros como: *Ralstonia*, *Agrobacterium*, *Pseudaminobacter*, *Chelatobacter*, *Stenotrophomonas* (STRONG et al., 2002).

A degradação de ametrina, radiomarcada nos carbonos do anel, em solo da classe areia quartzosa da região de Piracicaba-SP, foi estudada por Costa et al. (1997) sob condições de solo esterilizado e não esterilizado, com adição de folhas secas de cana-de-açúcar cultivada em solo tratado e não tratado com o mesmo herbicida nos três anos anteriores à coleta. Em solos esterilizados, praticamente não foi observado o desprendimento de $^{14}\text{CO}_2$. Com a adição do material vegetal oriundo de campos tratados e não tratados, a proporção de $^{14}\text{CO}_2$ desprendido foi respectivamente de 13 e 12 vezes maior do que em solo sem a adição de substrato, mostrando que a degradação da ametrina ocorre principalmente por cometabolismo. A adição de solo rizosférico da mesma cultura, com e sem os tratamentos anteriores do herbicida, também aumentou a degradação, com desprendimento de $^{14}\text{CO}_2$ de 3,5 e 1,7 vezes maior nos solos tratados e não tratados, respectivamente. Isto mostrou a ocorrência de seleção de microorganismos durante os três anos consecutivos de aplicação do herbicida no campo.

Mervosh et al. (1995) analisaram a atividade microbiana, temperatura e umidade do solo na presença do herbicida clomazone. Os resultados demonstraram que a degradação é dependente de microrganismos, sendo que após 84 dias da aplicação do herbicida 41% do clomazone foi mineralizado. Liu et al. (1996) estudaram a via de degradação do herbicida clomazone e seus metabólitos em microrganismos. Para as análises em HPLC foram utilizados 41 microrganismos de diferentes espécies capazes de metabolizar este herbicida (*Cunninghamella* spp., *Curvularia* spp., *Cylindrocarpon* spp., *Helicostylum* spp., *Mucor* spp., *Mycobacterium* sp., *Nocardia* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhizopus* spp., *Rhodococcus* spp., *Sepedonium* spp., *Streptomyces* spp. e *Syncephalastrum* spp.). A maioria das reações microbianas envolveu a hidroxilação do carbono metileno do anel isoxazolidona e a hidroxilação do grupo metil do anel oxazolidona e algumas rotas metabólicas incluíram dihidroxilações do clomazone no anel aromático, clivando a ligação carbono-nitrogênio (C-N) do anel isoxazolidona ou formando álcool clorobenzil.

Diante do descrito, percebe-se que todas as fases para a metabolização dos pesticidas são dependentes da maquinaria enzimática da célula. Em microrganismos, diversas enzimas de diferentes vias metabólicas são capazes de oxidar compostos nitroaromáticos; catalizar a polimerização de vários fenóis, mediar reações de desidratação, dimerização, desaminação, dehidrogenação e clivar as ligações entre os átomos de carbono (C-C) e nitrogênio (C=N). Nessas reações oxidativas estão envolvidas as peroxidases, lacases, fenoloxidasas e as reações do citocromo P450. Nas transformações hidrolíticas, as enzimas são responsáveis por adicionar ao substrato hidrogênio (H) ou hidroxila (OH) proveniente da água, além disso, possuem ampla especificidade de substratos, permitindo que ocorra a degradação de diversos pesticidas (VAN EERD et al., 2003; BRICEÑO; PALMA; DURAN, 2007). As reações de redução são importantes na degradação de numerosos xenobióticos, pois adicionam elétrons a essas moléculas. Outras enzimas estão envolvidas na conjugação dos pesticidas ou de seus metabólitos com compostos das células, como é o caso da glutatona-S-transferase, a qual promove a conjugação entre o grupo tripeptídeo da glutatona com o pesticida (STAMPER; TUOVINEN, 1998).

Entretanto, muitas pesquisas têm focado na toxicidade oxidativa induzida pelos pesticidas nos microrganismos e o papel das enzimas antioxidantes, pois a maioria dos pesticidas quando em contato com os microrganismos (principalmente em bactérias) podem interagir primeiramente com a membrana celular, inibindo enzimas envolvidas na respiração e na cadeia transportadora de elétrons, o que pode levar ao estresse oxidativo (KRAYL et al., 2003). No entanto, bactérias degradantes ou até mesmo tolerantes são capazes de aumentar a produção e/ou atividade de enzimas antioxidantes em defesa ao estresse gerado pela concentração ou pela ação do pesticida (LI et al., 2009). Estudos com *Pseudomonas putida* KT2440 expostas a pesticidas revelaram o aumento da produção de proteínas de defesa contra o estresse oxidativo, bem como o aumento de enzimas que estão diretamente envolvidas com a degradação desses xenobióticos (KRAYL et al., 2003; SANTOS; BENNDORF; SÁ-CORREIA, 2004). Além do equilíbrio metabólico microbiano, para que a degradação dos pesticidas ocorra eficientemente são necessárias determinadas condições favoráveis como a disponibilidade de nutrientes, condições de umidade, nível de aeração, temperatura e pH adequados. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito dos herbicidas no sistema antioxidante bacteriano e para isso as bactérias foram cultivadas em meio rico contendo os xenobióticos com temperatura controlada para eliminar qualquer outro tipo de estresse. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito dos herbicidas ametrina e

clomazone no sistema antioxidante bacteriano e, para isso, as bactérias foram cultivadas em meio rico contendo os xenobióticos, com temperatura controlada, evitando qualquer tipo de condição estressante.

2.5 Sistema antioxidante e estresse oxidativo

O oxigênio molecular (O_2) apareceu em quantidades significativas na atmosfera terrestre há mais de 2,2 bilhões de anos, grande parte devido à evolução da fotossíntese realizada por cianobactérias (GARG; MANCHANDA, 2009). O acúmulo de O_2 permitiu a evolução de uma grande variedade de organismos aeróbios que usam o O_2 como acceptor final de elétrons, proporcionando assim maior produção de energia na respiração, em comparação com metabolismo anaeróbio (SCANDALIOS, 2005). A participação do O_2 no metabolismo redox foi possível devido a sua estrutura química, uma vez que oxigênio molecular possui dois pares desemparelhados de elétrons (cada um oriundo de um dos átomos de oxigênio) e isso atribuiu ao O_2 baixa reatividade (HALLIWELL, 2006).

Entretanto, a ativação do O_2 nos sistemas biológicos pode ocorrer de duas maneiras: por fotodinâmica, formando principalmente como produto final o oxigênio *singlet* (1O_2) ou pela redução do O_2 (Figura 3), formando o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), seguido de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e finalizando com o radical hidroxil (OH^{\bullet}) (GARG; MANCHANDA, 2009).

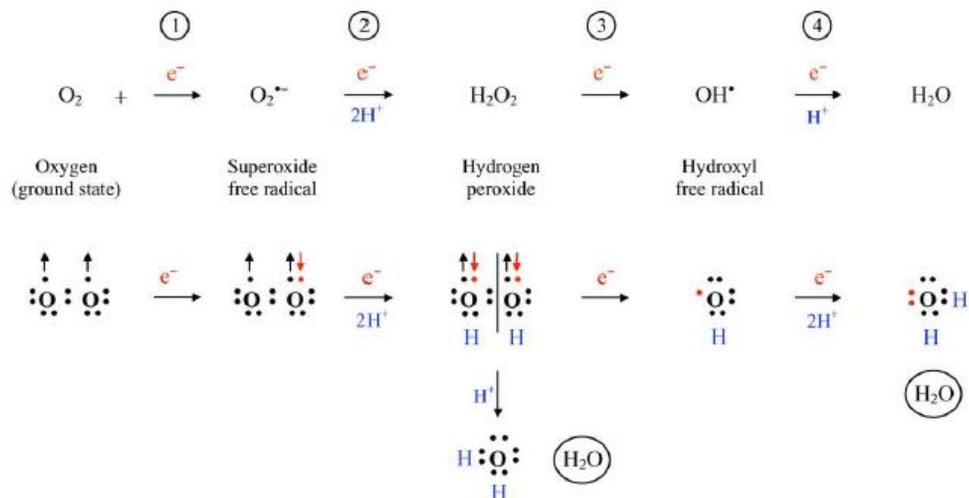


Figura 3 – Etapas da redução do oxigênio molecular e a produção das espécies reativas de oxigênio e de duas moléculas de água (EDREVA, 2005)

Estes produtos resultantes são altamente reativos e recebem a denominação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Em bactérias, a maioria dessas espécies é derivada da redução sequencial do O_2 catalisadas pelas enzimas da cadeia respiratória associada à membrana plasmática (LUSHCHAK, 2001). Dados experimentais indicam que, em *Escherichia coli*, a cadeia respiratória é responsável por cerca de 87% da produção total de H_2O_2 (GONZÁLEZ-FLECHA; DEMPLE, 1995). Em células eucariontes, como em plantas, as EROs são produzidas nas mitocôndrias e cloroplastos (BARTOLI et al., 2004) e são controladas por vias metabólicas constitutivas e induzidas, sendo que em situações normais das células o balanço redox é mantido pela ação da via constitutiva (AZEVEDO et al., 2011).

Contudo, em seres procariontes e eucariontes existem mecanismos antioxidantes capazes de prevenir as cascatas de oxidação nas células por meio da remoção das EROs (LUSHCHAK, 2001; GRATÃO et al., 2008). Estes mecanismos envolvem sistemas não enzimáticos e enzimáticos. As defesas não-enzimáticas incluem compostos com intrínseca propriedade antioxidante, as quais ajudam manter o ambiente redutor (CABISCOL et al., 2000), como o β -caroteno, α -tocoferol (vitamina E), glutathiona reduzida (GSH), ácido ascórbico, NADPH e NADH (SCANDALIOS, 2005). Já os mecanismos enzimáticos envolvem a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), peroxidases, Glutathiona Redutase (GR), Glutathiona S-Transferase (GST), dentre outras (SCANDALIOS, 2005).

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

Estas perturbações no metabolismo celular podem levar a um desequilíbrio entre o sistema antioxidante e a produção de EROs; quando os níveis intracelulares de EROs excedem a capacidade de defesa celular se tem o estresse oxidativo. Em altas concentrações essas moléculas podem causar danos nas macromoléculas de DNA, RNA, proteínas e lipídeos (CABISCOL et al., 2000). Esses danos acarretam na oxidação de proteínas, quebras na cadeia de DNA, distúrbios na

homeostase intracelular de íons cálcio livres e peroxidação de lipídeos da membrana celular (GEORGIEVA, 2005; GILL; TUTEJA, 2010).

Diversas pesquisas têm demonstrado que herbicidas, inseticidas e outros produtos tóxicos ambientais, direta ou indiretamente causam efeitos danosos aos microrganismos, via a geração de EROs e moléculas como malondeído (resultado da peroxidação lipídica) e grupos carbonilas (resultado da oxidação de proteínas). Muitos desses produtos metabólicos são utilizados como marcadores ambientais, revelando a toxicidade do composto (CHOW et al., 2010).

Algumas espécies bacterianas, como *Pseudomonas putida* e *Burkholderia cepacia* WZ1, podem apresentar uma indução positiva na atividade de algumas enzimas antioxidantes na presença de herbicidas (LI et al., 2009), ou em alguns casos podem apresentar novas isoformas, como em estudo com a bactéria *Escherichia coli* exposta ao herbicida quinclorac (LU; MIN; XIA, 2004).

Geralmente a indução positiva do metabolismo antioxidativo, exposto a herbicida, vem sendo correlacionada com a proteção contra os danos celulares causados por esses xenobióticos, tais como a redução da taxa de crescimento ou a inibição do crescimento bacteriano (BHATTACHARYA et al., 2004).

A maior parte do conhecimento de enzimas antioxidantes em bactérias é baseada em análises genômicas. Porém, a necessidade de discriminar e determinar a função destas enzimas a nível bioquímico, principalmente quando estão relacionados ao metabolismo de adaptação e desintoxicação de herbicidas (BRICEÑO; PALMA; DURAN, 2007).

2.6 Sistema antioxidante bacteriano

As enzimas de defesa estão presentes nas células a nível basal em concentrações suficientes para enfrentar baixos níveis de EROs (DUARTE; LATOUR, 2010). Em *E. coli*, por exemplo, as taxas da produção de O_2^{\bullet} e de H_2O_2 dependem do estágio de desenvolvimento. Na transição de crescimento, fase lag para fase exponencial, o H_2O_2 pode aumentar de 5-10 vezes, entretanto na fase estacionária a quantidade de H_2O_2 é estabilizada através do sistema antioxidante (GONZALEZFLECHA; DEMPLÉ, 1995). Sob condições de estresse oxidativo as bactérias ativam diversas funções para eliminar as EROs e reparar os danos celulares. Esta resposta adaptativa está sob o controle de fatores de transcrição, os quais são ativados ou

desativados em respostas às EROs (TOLEDANO et al., 2004). Os fatores de transcrição sensíveis ao aumento de EROs e a transdução de sinais fazem aumentar a expressão de genes envolvidos na defesa celular (DUARTE; LATOUR, 2010).

Estudos realizados com *E. coli* revelaram a presença de dois fatores transcricionais distintos, **SoxS** e **OxyR**, que respondem as variações das EROs. A resposta ao radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e óxido nítrico (NO^{\bullet}) é controlada pelo sistema SoxRS. Este fator transcricional é oxidado (complexo enxofre-ferro) e ativa o gene *soxS*, o qual induz a proteína SoxS e que por sua vez ativa um conjunto de genes incluindo *sodA* (superóxido dismutase), *acnA* (aconitase A), *nfo* (endonuclease IV), dentre outros (Figura 4) (PARK; CHUNG ; LEE, 2010).

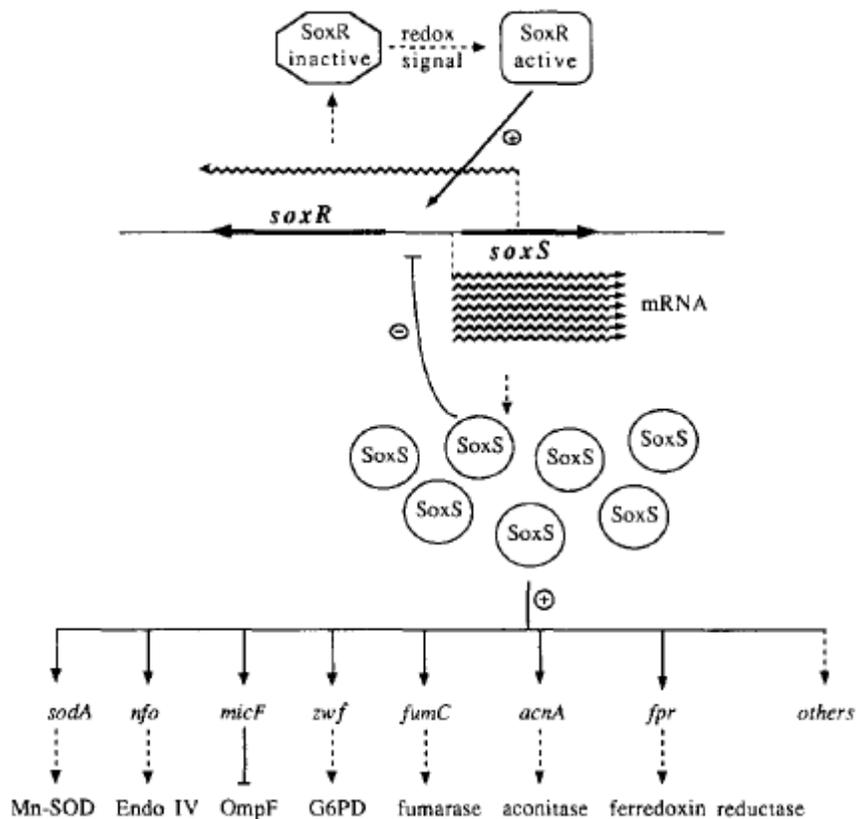


Figura 4 – Modelo da regulação redox do fator de transcrição SoxRS em *Escherichia coli* (DEMPLE, 1996)

A resposta ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é mediada pelo ativador transcricional OxyR. Este fator transcricional é produzido constitutivamente, ligando-se a regiões promotoras dos genes alvos e ativando a transcrição. Os genes ativados por esse fator transcricional codificam

para catalase (HPI-Hidroperoxidase I), glutaredoxina, glutationa redutase (GR), glutationa reduzida (GSH), dentre outros (CABISCOL et al., 2000).

Cada subunidade do tetrâmero OxyR contém dois resíduos de cisteína que formam pontes de dissulfeto quando expostos ao H_2O_2 (Figura 5). As pontes de dissulfeto são reduzidas pela glutationa (GSH), a qual é reduzida pela glutationa redutase (GR). A expressão dos genes das enzimas GR e glutaredoxina estão sob o controle transcricional OxyR, compreendendo assim um mecanismo de auto-regulação (POMPOSIELLO; DEMPLE, 2001).

Além de SoxS e OxyR, vários outros reguladores transcricionais modulam a expressão de genes que codificam antioxidantes em outras espécies bacterianas, indicando a complexidade e conectividade dos sistemas reguladores (SCANDALIOS, 2005).

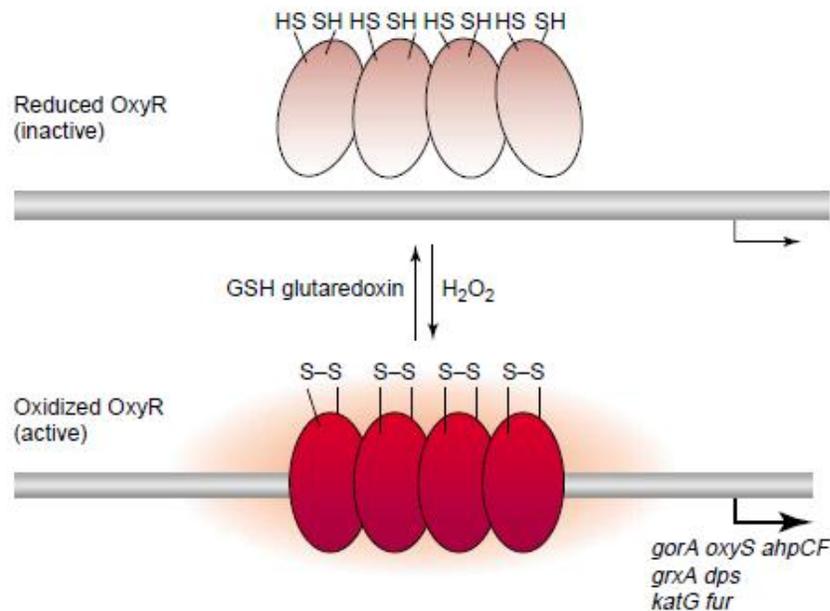
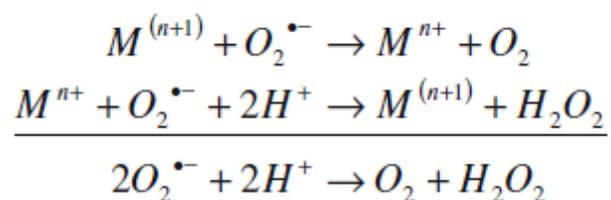


Figura 5 - Estresse Oxidativo ativa OxyR pela formação de pontes dissulfeto. OxyR desencadeia na expressão de enzimas antioxidantes (POMPOSIELLO; DEMPLE, 2001)

2.6.1 Superóxido Dismutase (SOD)

Esta enzima faz parte de um grupo de metaloproteínas que catalisam a formação de H_2O_2 a partir do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), sendo assim, é crucial para o mecanismo de defesa antioxidante (MALSTROM et al., 1975). Segundo Scandalios (2005) as SOD's compreendem a primeira linha de defesa contra EROs nas células. Até o presente momento, a SOD (EC 1.15.1.1) é a única enzima cuja atividade controla a concentração de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , os dois substratos da

reação de Haber-Weiss que origina os radicais OH^\bullet e provavelmente por isso, as SODs representam o mecanismo de defesa central dos organismos vivos (RYAN et al., 2010). As SODs estão presentes em bactérias aeróbias e anaeróbias (IMLAY, JAMES A., 2008) e são classificadas de acordo com o metal de seu sítio ativo: manganês (Mn) ou ferro (Fe), cobre/zinco (Cu/Zn) e níquel (Ni). Durante a catálise, o cofator metal-redox ativa ciclos entre os estados oxidados e reduzidos, que diferem por um elétron. As reações podem ser observadas abaixo.



As Mn-SODs em *Escherichia coli* são codificadas pelo gene *sodA* e são sensíveis ao estresse oxidativo endógeno (LUSHCHAK, 2001), no entanto, são responsáveis pela alta proteção contra os danos oxidativos ao DNA. Em contraste, a Fe-SOD (*gene sodB*) não é dependente das condições do crescimento bacteriano, sendo produzida constitutivamente. Estas duas isoenzimas são encontradas no citoplasma bacteriano (LYNCH; KURAMITSU, 2000).

Estudos com mutantes de *E. coli* para o gene *sodA* ou *sodB* revelaram uma pequena sensibilidade ao herbicida paraquat, enquanto que o duplo mutante exibiu um aumento de 1000 vezes a sensibilidade por esse herbicida, além disso, os mutantes de *sodA* e *sodB* apresentam dificuldades em sobreviver até fase estacionária (DUKAN; NYSTROM, 1999). A bactéria *Burkholderia cepacia* WZ1 quando exposta ao herbicida quinclorac aumentou a atividade da Fe-SOD e induziu a isoenzima Mn-SOD. Segundo o autor a Mn-SOD foi induzida para proteger esta espécie bacteriana da toxicidade do herbicida e sugeriu que a Mn-SOD tem um papel especial contra ação redox de quinclorac (LI et al., 2009).

As Cu/Zn-SODs (*sodC*) em bactérias geralmente são encontradas no periplasma ou ancoradas a membrana (BATTISTONI, 2003). Em cada subunidade de Cu/Zn-SOD contém um átomo de cada metal, o átomo de cobre é ciclicamente reduzido/oxidado e o átomo de zinco provavelmente confere estabilidade estrutural ao sítio ativo (BORDO; DJINOVIC; BOLOGNESI, 1994). Células de *Escherichia coli* que foram transformadas com os genes da enzima Cu/Zn-SOD de *Drosophila* apresentaram uma superexpressão desse gene, evidenciado

por níveis elevados dos polipeptídeos de Cu/Zn- SOD em extratos citosólicos bacterianos, o que os autores relacionaram com aumento da resistência ao herbicida paraquat nas linhagens transformadas (GOULIELMOS et al., 2003).

As Ni-SODs são encontradas em uma fração citosólica das bactérias do gênero *Streptomyces*, em actinomicetos, tais como *Micromonospora rosaria*, *Microtetraspora glauca*, *Kitasatospora griseola* e em algumas cianobactérias (KIM et al., 1996; KANTH; OH; SOHNG, 2010). A concentração de íons Ni (II) na célula, como em *Streptomyces seoulensis*, desempenham um papel regulador do gene *sodN* (Ni-SOD) e do processamento pós-traducional, combinando assim a disponibilidade de íons Ni (II) com a quantidade de Ni-SOD ativa (WUERGES et al., 2004).

2.6.2 Catalase (CAT)

As catalases (EC 1.11.1.6.) são amplamente distribuídas em organismos aeróbios e anaeróbios (facultativos ou não) e são consideradas componentes centrais de vias de detoxificação que impedem a formação do radical hidroxil (altamente reativo). Estas enzimas catalisam a conversão de duas moléculas de H₂O₂ em água e O₂ pela transferência de dois elétrons (ZENG et al., 2010), conforme mostra a reação abaixo:



A maioria das catalases são enzimas tetraméricas que contêm grupos heme em sua estrutura. Com base nas suas propriedades, as catalases bacterianas foram classificadas em três tipos: monofuncional contendo grupo heme, bifuncional contendo grupo heme (catalase-peroxidases) e catalases que não contêm o grupo heme (CHELIKANI; FITA; LOEWEN, 2004). As catalases monofuncionais são as mais difundidas entre os seres vivos e comumente apresentam duas etapas para a degradação do H₂O₂. No primeiro passo uma molécula de H₂O₂ oxida o grupo heme formando espécies oxiferril; essa oxidação equivale na remoção do ferro e de um anel de porfirina gerando um radical porfirina (cátion) (VLASITS et al., 2010), conforme a reação abaixo.



No segundo passo a molécula de H_2O_2 é utilizada como um redutor do composto I, regenerando o estado inicial da enzima e desta forma resultando na produção O_2 e H_2O (reação 3).



Muitas vezes as catalases monofuncionais atuam na presença de altas concentrações de substrato, decompondo o H_2O_2 tóxico a uma taxa extremamente rápida utilizando as reações catalíticas, as quais foram descritas acima (SCANDALIOS et al., 2005).

Apesar das diferenças nas sequências e estrutura química a reação global das catalases peroxidases ocorre da mesma forma que das catalases monofuncionais (reações 2 e 3). Entretanto, as catalases peroxidases apresentam outro nível de complexidade que envolve o uso de doadores orgânicos de elétrons (por exemplo, etanol, ácido ascórbico) para a redução do composto I e para restaurar o estado inicial da enzima pela transferência de um elétron (reação 4). Essas enzimas geralmente atuam em baixas concentrações ($<1\mu\text{M}$) de H_2O_2 (VLASITS et al., 2010).



As catalases que não apresentam o grupo heme (catalases não-heme), as quais foram encontradas somente em bactérias, possuem em sua estrutura química átomos de manganês. Acredita-se que essas enzimas não são amplamente difundidas devido à baixa especificidade com o substrato quando comparado com as outras catalases. As reações abaixo (5 e 6) são análogas as reações das catalases que contêm grupo heme, no entanto a diferença está no estado de oxidação do grupo manganês. As condições de 2,2 ($\text{Mn}^{\text{II}}\text{-Mn}^{\text{II}}$) e 3,3 ($\text{Mn}^{\text{III}}\text{-Mn}^{\text{III}}$) são igualmente estáveis, conseqüentemente não existe uma ordem para a oxidação e redução desses estágios. Quando o estado 2,2 é encontrado na célula o H_2O_2 é um oxidante e se o estado 3,3 é encontrado o H_2O_2 é um agente redutor.



A maioria das bactérias produzem uma ou mais catalases que respondem ao estresse oxidativo, além disso, essas enzimas podem estar presentes no citoplasma ou no espaço periplasmático. *Escherichia coli*, por exemplo, apresenta duas catalases: HPI (catalase peroxidase) codificada pelo gene *katG*, o qual é controlado pelo regulon OxyR e HPII (catalase monofuncional) codificada pelo gene *KatE*, sendo induzido pelo regulon σ^S durante a fase estacionária (LUSHCHAK, 2001).

Na espécie *Pseudomonas putida*, Hishinuma et al. (2006) relatam que o fator transcricional OxyR é responsável pelo controle da expressão de dois genes das maiores catalases, *katA* e *katB*. Já em *Pseudomonas aeruginosa* tem sido caracterizado três catalases monofuncionais codificadas pelos genes *katA*, *katB* e *KatE* e em algumas estirpes de *P. aeruginosa* possuem uma catalase não-heme adicional codificada pelo gene *katM* (SHIN; CHOI; CHO, 2008). A *katA* é a maior catalase sendo produzida em todas as fases de crescimento com aumento de sua atividade na fase estacionária. *KatB* é detectável somente quando as células são expostas à altas concentrações de H_2O_2 ou ao herbicida paraquat (BROWN et al., 1995).

Diversas bactérias quando expostas a xenobióticos aumentam a atividade de CAT para combater o estresse oxidativo. A bactéria *Comamonas terrigena* N3H é conhecida por sua ampla diversidade catabólica em degradar diferentes xenobióticos; isoladas de solos contaminados com hidrocarbonetos, *Comamonas terrigena* N3H apresentou alta atividade de catalase em relação a mesma espécie isolada de solos não contaminados (GODOCIKOVA et al., 2005).

Entretanto, as catalases são essenciais não somente para a proteção contra o estresse oxidativo, mas também são importantes por participarem de alterações metabólicas sobre substâncias tóxicas por meio das suas reações peroxidativas (BUCKOVA et al., 2010). A espécie *C. terrigena* N3H não possui a enzima chave (fenolhidroxilase) para a degradação de fenóis, no entanto, a peroxidação do fenol e a formação de produtos secundários foram atribuídas à ação de catalases-peroxidases (ZAMOCKY et al., 2001).

2.6.3 Glutationa (GSH)

A glutathiona (GSH) é um dos principais antioxidante não enzimático das células. Trata-se de um tripeptídeo formado por ácido glutâmico, cisteína e glicina (massa molecular de 307 Da) que possui dois grupos carboxílicos carregados negativamente e um grupo amino com carga positiva (Figura 6). O grupo tiol da cisteína é considerado o “sítio ativo”, pois serve como doador de elétrons e, assim, oferece propriedades redutoras à glutathiona e a capacidade de remover as EROs (SMIRNOVA; OKTYABRSKY, 2005).

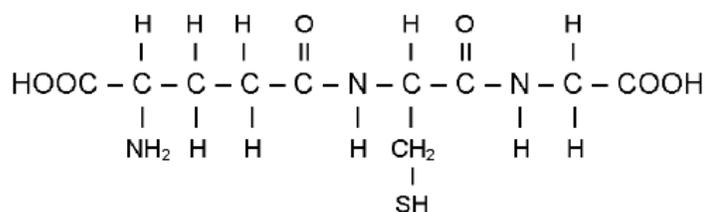


Figura 6 – Estrutura química da glutathiona

A glutathiona elimina as EROs, como H_2O_2 e o radical hidroxil, principalmente via cooperação de glutathiona-peroxidase. Além disso, é utilizada para detoxificação de xenobióticos, conjugação de metabólitos e mantém a homeostase celular (KULLISAAR et al., 2010). Durante suas funções biológicas a GSH é oxidada a um dissulfeto (GSSG-glutathiona oxidada) por meio da enzima glutathiona-peroxidase (EC 1.11.1.9, GPx). A GSH também pode reagir diretamente com um “radical livre” resultando na formação de um radical tiol, GS^\bullet , o qual reage com outro radical GS^\bullet formando a GSSG. A GSSG é rapidamente reduzida voltando à forma GSH pela ação da enzima glutathiona redutase (EC 1.6.4.2, GR) e NADPH, a fim de manter o balanço redox entre GSH/GSSG. Assim, o sistema glutathiona com seus componentes básicos, GSH, GSSG, GPx e GR, tem um elevado impacto na viabilidade das células.

Contudo, alguns estudos demonstram as diferenças existentes no sistema glutathiona entre seres eucariontes e procariontes. Em procariontes, por exemplo, a GSH é encontrada principalmente em bactérias gram-negativas, pois a maioria das bactérias gram-positivas, com exceção de algumas espécies de *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Lactobacillus*, possuem outros grupamentos tíois com baixo peso molecular que atuam com as mesmas funções da GSH.

Pesquisas realizadas com a bactéria *Lactobacillus fermentum* ME-3, bactéria gram positiva, revelaram a atividade da enzima glutationa peroxidase, assim como de glutationa redutase (KULLISAAR et al., 2010). Outras espécies gram-positivas são capazes de sintetizar ou consumir GSH a partir do meio de crescimento (VERGAUWEN et al., 2003). Muitos anaeróbios facultativos são caracterizados pela ausência de glutationa, porém possuem outros grupamentos tióis com baixo peso molecular que atuam com as mesmas funções (KULLISAAR, 2002).

Os níveis de glutationa em bactérias dependem do equilíbrio dinâmico entre sua síntese, decomposição, transporte, oxidação e redução, como também do estado e das condições ambientais em que se encontram (MASIP; VEERAVALLI; GEORGIOUI, 2006). Romero et al. (1991) observaram que os níveis de GSH diminuíram nas células de *Escherichia coli* quando foram expostas ao herbicida paraquat. Hultberg (1998) também observou um decréscimo na concentração de GSH quando a bactéria *Pseudomonas fluorescens* foi exposta ao metal pesado cádmio.

Entretanto, outros pesquisadores relataram o aumento na concentração de GSH em bactérias degradantes de herbicidas. A espécie *Pseudomonas* sp. HF-1 diante de diversos herbicidas utilizados no cultivo de tabaco teve acréscimos significativos nos níveis de GSH, assim como nos níveis da enzima glutationa redutase (SHAO et al., 2010).

A GSH além de proteger as células bacterianas do estresse oxidativo, tem papel fundamental na proteção contra o baixo pH, compostos contendo cloro e estresse osmótico (MASIP; VEERAVALLI; GEORGIOUI, 2006).

2.6.4 Glutationa redutase (GR)

A glutationa redutase (E.C.1.6.4.2.) faz parte do principal mecanismo para redução de GSSG, sendo assim, é considerada o elo fundamental para manter a homeostase entre os níveis de GSH/GSSG. Esta enzima contém um grupo prostético flavina adenina dinucleotídeo (FAD), transferidor de elétrons que catalisa a redução dependente de NADPH da glutationa oxidada (GSSG) para glutationa reduzida (GSH) (CABISCOL et al., 2000), conforme a seguinte reação:



A enzima GR é de ocorrência quase universal, sendo amplamente distribuída entre procariotos e eucariotos, desde bactérias heterotróficas e fotossintetizantes até plantas e animais superiores (NOCTOR et al., 2002). A expressão de GR, em *Escherichia coli* é realizada por meio do gene *gor*, sendo que a regulação é feita através do fator transcricional OxyR, o qual controla outros genes que codificam enzimas de defesa ao estresse oxidativo (Figura 5). Todas as GR's isoladas de diferentes origens apresentam homologia, possuindo elevada conservação durante a evolução (SMIRNOVA; OKTYABRSKY, 2005).

Estudos com linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e H₂O₂ foi demonstrado que com sucessivos aumentos desse agente estressante foi observado decréscimo na atividade da enzima GR (BAYLIAK et al. 2006). Estirpes da espécie *Klebsiella oxytoca* as quais foram expostas a concentrações de 62 mM e 620 mM do herbicida acetochlor e demonstraram queda gradativa e nas concentrações testadas, respectivamente (Carvalho, 2007). Em contraste com esses resultados, Azcon et al. (2010) observaram aumento na atividade da GR em *Bacillus cereus* quando foram cultivados em solos contaminados com os metais pesados cádmio, níquel e mercúrio.

2.6.5 Glutathione-S-Transferase (GST)

As Glutathione-S-Transferases (EC 2.5.1.18; GST) são amplamente distribuídas em eucariontes e procariontes e estão agrupadas em diversas classes. As GSTs bacterianas fazem parte de uma superfamília de enzimas que desempenham funções fundamentais na desintoxicação celular. Essas enzimas estão envolvidas em vários processos, como a biodegradação de xenobióticos, proteção contra estresse químico e oxidativo e resistência a antibióticos (ALLOCATI et al., 2009).

Uma característica comum a todas GSTs é a capacidade de catalisar a conjugação da glutathione a uma gama de substratos hidrofóbicos eletrofílicos, sendo que a GSH é a doadora de tiol para a enzima GST (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005), como mostra a figura a seguir:

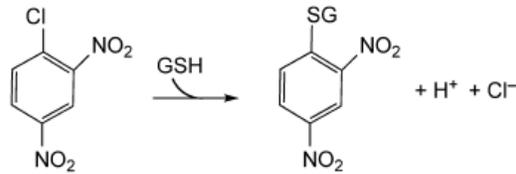


Figura 7 – Enzima GST via conjugação GSH com o substrato CDNB (1-cloro-2,4 dinitrobenzeno)

Esta enzima 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 ampla especificidade para substratos eletrofílicos, possuindo um sinal químico, composto de ligações duplas conjugadas adjacentes a um grupo aceptor de elétrons. Em *E. coli* foi descrito que sete genes codificam para enzimas do tipo GST (KANAI et al., 2006). Por meio de técnicas de imunolocalização, foi demonstrado que essa enzima é preponderantemente localizada no compartimento periplasmático de bactérias (ALLOCATI et al., 2009).

As GSTs atuam como peroxidase na redução de H_2O_2 a monohidroxi-álcool durante estresse oxidativo e no catabolismo de tirosina (DIXON, 2002). Estudos com a espécie *Proteus mirabilis* mostraram que a enzima GST contribui para proteger as células contra o estresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 . Aumentos nos níveis da transcrição de RNAm e na atividade das enzimas foram observadas quando as células bacterianas foram expostas ao H_2O_2 (ALLOCATI et al., 2003).

As GSTs são capazes de detoxificar diversas classes de pesticidas, incluindo a classe das s-triazinas, das células bacterianas. Estas enzimas estão envolvidas na primeira etapa da biodegradação do herbicida atrazina com a remoção do átomo de cloro a partir da conjugação atrazina-GSH (LABROU et al., 2005) (Figura 8). As transformações da molécula de atrazina podem ocorrer através de um consórcio microbiano ou somente por um único microrganismo, como em *Pseudomonas ADP*, a atrazina é metabolizada para ácido cianúrico passando por três etapas enzimáticas (DE SOUZA et al., 1998), como foi descrito no item 2.4.

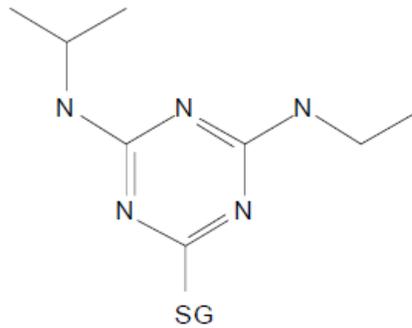


Figura 8 – Fórmula química do complexo atrazina-GSH (PRADE; HUBER; BIESELER, 1998)

As GSTs além de ter a função de proteger as células do estresse oxidativo e estão envolvidas na desintoxicação de xenobióticos, elas também são importantes para manter metabolismo basal das células bacterianas, participam da via de degradação de lignina e interagem com antibióticos (ALLOCATI et al., 2003).

Conforme descrito, as GSTs bacterianas estão envolvidas em diversos tipos de transformações químicas e, assim elas representam uma ferramenta versátil para a biotecnologia. Esta técnica, biorremediação, é uma alternativa econômica e mais eficaz para descontaminação de ambientes em relação aos métodos convencionais (químico-físico) (LIANG et al., 2010). Outro exemplo relacionado à biotecnologia utilizando enzimas, foi o trabalho desenvolvido por Yan et al. (2008) o qual consistiu em fusionar enzimas bacterianas como a SOD, glutationa-peroxidase e GST que possuem atividades distintas. Os resultados demonstraram alta eficiência na remoção das EROs evidenciando que esta abordagem pode ter aplicações ao meio ambiente, como também na área médica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta dos solos

As amostras dos solos foram coletadas na fazenda Areão, pertencente à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, município de Piracicaba - SP. O histórico da área indicou o cultivo de cinco anos da cultura de cana-de-açúcar e também o uso dos herbicidas ametrina e clomazone.

Foram coletadas amostras de solos em dois pontos com localizações diferentes, alto e baixo declive do solo. A amostragem foi feita com uma profundidade 0 - 10 cm, com auxílio de uma sonda de vaso, em 10 pontos diferentes para cada declive. As amostras foram acondicionadas em caixas térmicas e levadas ao laboratório para as análises químicas, físicas, microbiológicas e bioquímicas.

As análises químicas e físicas (Tabela 3) foram realizadas no Departamento de solos, segundo Camargo et al. (2009). As análises microbiológicas e bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas (Departamento de Genética), ambos na ESALQ/USP.

3.2 Produtos químicos

Foram utilizados os herbicidas ametrina (nome comercial *Gesapax*, fabricado pela empresa Syngenta Proteção de Cultivos LTDA) e clomazone (nome comercial *Gamit*, fabricado pela empresa FMC química do Brasil LTDA), isoladamente e em conjunto. Os cálculos para as concentrações dos herbicidas em meio de cultura foram baseados nas seguintes especificações dos produtos:

- ametrina: 5,0L do herbicida/200L (calda), corresponde a 25 mM.
- clomazone: 1,8L do herbicida/200L (calda), corresponde a 9 mM.
- ametrina+clomazone: ambos 5,0L do herbicida/200L (calda); corresponde, a 20 mM de ametrina e 20 mM de clomazone.

Essas dosagens são recomendadas para a cultura cana-de-açúcar para a aplicação pré e pós-emergência.

Tabela 3 - Atributos químicos e físicos dos solos

Solo	M.O	pH	P	K	Ca	Mg	Al	Textura			Classe textural
	g.Kg ⁻¹	Kcl	mg Kg ⁻¹	mmolc Kg ⁻¹			Areia%	Silte%	Argila%		
DA	7	4,9	83	3,7	15	8	0	94	1	5	arenoso
DB	7	3,6	30	2,3	12	6	5	91	1	8	arenoso

DA= declive alto do solo

DB = declive baixo do solo

M.O = matéria orgânica

P = fósforo

K = potássio

Ca = cálcio

Mg = magnésio

Al = alumínio

3.3 Isolamento de bactérias tolerantes aos herbicidas

O isolamento foi feito por diluição em série e plaqueamento em meio seletivo. Para isso, uma subamostra de 10 g de solo, de cada declive, foi suspensa em 150 ml de meio mineral (Tabela 4) + herbicidas ametrina e clomazone isolados.

Tabela 4 - Composição do meio mineral (quimioestático)

Componentes	Quantidades
K ₂ HPO ₄	2,75 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00 g
MgCl ₂	0,20 g
NaCl	0,10 g
FeCl ₃	0,02 g
CaCl ₂	0,01 g
Água de osmose	1000 mL

O meio mineral, sem os herbicidas, foi esterilizado em autoclave a 121 °C, 1 atm por 20 min. Os herbicidas foram adicionados ao meio de cultura somente quando este estava em temperatura ambiente, mantendo a integridade dos princípios ativos dos xenobióticos.

Em seguida a solução foi homogeneizada, permanecendo por 8 dias em agitador a 30 °C e a 150 rpm. Diluições em série até 10⁻⁴ g solo mL⁻¹ foram preparadas em solução salina (0,85% de NaCl). Uma alíquota de 100 µL de cada diluição foi plaqueada em meio mineral solidificado, e posteriormente as placas foram incubadas em estufa a 30°C até que as colônias puderam ser visualizadas (aproximadamente 5 dias). Com o crescimento bacteriano, procedeu-se a inoculação de colônias morfológicamente diferentes em 50 mL de meio mineral líquido, os quais foram mantidos no agitador a 30°C por 5 dias, sendo que posteriormente as colônias foram transferidas para novas placas de Petri com meio mineral sólido.

3.4 Seleção de bactérias tolerantes aos herbicidas

Para selecionar as bactérias tolerantes aos herbicidas foi realizado um teste, no qual os isolados bacterianos foram inoculados em meio completo ágar nutriente (AN) (Tabela 5) contendo os herbicidas isoladamente e em conjunto.

Tabela 5 - Composição do meio Ágar nutriente

Componentes	Quantidades
Ágar bacteriológico	15,0 g
Cloreto de sódio	8,0 g
Extrato de carne	3,0 g
Peptona de gelatina	5,0 g
Água destilada	1000 mL

Fabricado pela empresa Acumedia

O meio ágar nutriente foi dissolvido na proporção de 23 g de meio de cultura para 1000 mL de água destilada (especificações do produto) e esterilizado em autoclave a 121 °C, 1 atm por 20 min. Os herbicidas foram adicionados ao meio de cultura somente quando este estava em temperatura ambiente e antes de solidificar.

Os isolados que apresentaram o melhor crescimento e a formação de halo foram selecionados para as análises fisiológicas, genéticas e bioquímicas.

3.5 Crescimento bacteriano na presença dos herbicidas

Para avaliar o crescimento bacteriano foi utilizada a metodologia segundo Riffel et al. (2003). Cada isolado bacteriano foi inoculado em 50 mL de meio de cultura completo, nos quatros tratamentos, sendo eles denominados:

- a) Controle - caldo nutriente
- b) Ametrina - caldo nutriente + herbicida ametrina (25 mM)
- c) Clomazone - caldo nutriente + herbicida clomazone (9 mM)
- d) Mistura - caldo nutriente + herbicida ametrina (20 mM) + herbicida clomazone (20 mM)

Os tratamentos (triplicatas) foram mantidos a 30 °C, sob agitação de 150 rpm. O crescimento bacteriano foi monitorado durante 14 horas, com intervalos de 2 horas, uma vez que para contabilizar o número de colônias foi utilizada a técnica de diluição seriada, na qual as bactérias são suspendidas em soluções salinas (0,85% de NaCl), para posterior contagem de unidades formadoras de colônia (U.F.C.). Neste estudo, foi padronizada a diluição de 10^{-6} como a mais viável para contagem de U.F.C. Em seguida, foram plaqueados 20 uL da solução diluída (triplicatas) em placas com ágar nutriente, para posterior análise do crescimento. Essa

metodologia foi empregada devido ao fato de que os herbicidas deixam o meio líquido turvo, impedindo que a leitura do crescimento bacteriano seja avaliada por absorvância.

3.6 Identificação das bactérias e árvore filogenética

3.6.1 Extração de DNA bacteriano

O DNA bacteriano foi extraído com protocolo adaptado de Araújo et al. (2002). As bactérias tolerantes foram cultivadas, 7 mL, em meio líquido completo Caldo nutriente (Tabela 6) a 30 °C. Atendido 12 horas de crescimento, a suspensão bacteriana foi coletada em tubos de 1,5 mL e centrifugada à temperatura ambiente por 5 min a 9700 g.

Tabela 6 - Composição do meio Caldo nutriente

Componentes	Quantidades
Extrato de carne	1,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Peptona de gelatina	5,0 g
Água destilada	1000 mL

Fabricado pela empresa Himedia.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 500 µL de tampão de extração (TE) (Tabela7) e novamente centrifugado na mesma condição da etapa anterior.

Após centrifugação, o precipitado foi ressuspensionado em 500 µL de TE, no qual foi adicionado 60 µL de SDS 10% e aproximadamente 50 mg de sílica. Em seguida, a solução foi aquecida por 30 min a 80 °C, e colocado em vórtex por 1 min.

Tabelas 7 - Componentes do tampão de extração

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

Ao término da agitação, as amostras foram centrifugadas (temperatura ambiente) por 5 min a 9700 g e em seguida o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado 500 µL de clorofórmio/fenol/álcool isoamílico (24:25:1). Após homogeneização da mistura uma nova

centrifugação foi realizada (10 min por 9700 g), da qual a fase superior resultante foi utilizada para a etapa seguinte.

A esta fase, foram adicionados 50 µL de acetato de sódio 3 M, (pH 5,2), 500 µL de isopropanol e, após nova homogeneização, a mistura foi incubada à temperatura ambiente por 5 min. Após esse período, foi feita mais uma centrifugação (temperatura ambiente) a 5 min a 9.700 g, sendo o sobrenadante então descartado, e o precipitado (DNA) foi lavado com 100 µL de etanol 70% e centrifugado por 2 min a 9700 g.

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

Após a extração de DNA, foi montado um gel de agarose 1% para aplicação das amostras e confirmar a extração, e dar prosseguimento a amplificação do gene 16S ribossômico.

3.6.2 Amplificação do gene 16S DNAr

A reação de amplificação do DNAr 16S ocorreu em 50 µL de uma mistura que continha 1 µL (0,5–10,0 ng) do total de DNA, 0,1 µL de primer P027F - 0,2 µM (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 0,1 µL de primer 1378R - 0,2 µM (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG-3'), 4 µL de cada dNTP (2,5 mM/base), 3,75 µL de MgCl₂ (50 mM) e 0,5 µL de Taq DNA polimerase (5U/ µL) em Tris-HCl 20 mM contendo KCl. 50 mM. Além das amostras, 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, anelamento 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% com volume aplicado de 5 µL da mistura da reação de PCR e as bandas foram marcadas com brometo de etídio e visualizadas com luz ultravioleta.

3.6.3 Purificação dos produtos de PCR

A purificação foi feita com solução de PEG 8000. Esta solução foi preparada com 10 g de PEG 8000 e 7,3 g de NaCl solubilizados em 50 mL de água Milli-Q a 37°C, sob agitação. A reação foi iniciada em um tubo de 1,5 mL, no qual foi adicionado 50 µL do produto de PCR e 50 µL da solução de PEG, sendo a solução misturada com auxílio de uma pipeta e incubada por 15 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 precipitado, foi adicionado 125 µL de etanol 80% (4°C), 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 foram repetidos os dois últimos passos.

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

3.6.4 Seqüenciamento

O seqüenciamento foi realizado com o primer 1378R, utilizando o MegaBACE 1000, um sistema de análise de DNA de 96 capilares com a tecnologia GE Healthcare. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) e as seqüências foram analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12. As reações de seqüenciamento geralmente alcançam entre 500 e 600 bases com fidelidade de análise de 98,5%.

3.6.5 Identificação bacteriana através de análise filogenética

As seqüências foram verificadas e editadas a olho nu usando o Bioedit 7.0.9.1 (HALL, 1999). Somente foram utilizadas as regiões das seqüências consideradas de maior qualidade, sendo processadas para geração de novos arquivos FASTA.

As seqüências dos genes 16S bacterianos foram inicialmente comparadas às seqüências de DNAr 16S de organismos representados na base de dados do GenBank. Após de identificação de espécies próximas e relacionadas aos isolados bacterianos de interesse, seqüências de organismos tipo foram utilizadas para a análise filogenética (Ribossomal Database Project). A árvore filogenética foi construída por meio do método de neighbor joining (JUKES; CANTOR, 1969), usando o programa MEGA 4.0 (TAMARU et al., 2007).

3.7 Análises bioquímicas

Os parâmetros bioquímicos analisados compreendem a determinação da concentração da peroxidação lipídica, quantificação de H_2O_2 e GSSH/GSH, como também, a quantificação das proteínas solúveis, perfil protéico e a atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD, GR e GST.

3.7.1 Coleta das células bacterianas

Para realizar as análises bioquímicas o experimento foi feito em blocos ao acaso com 5 repetições. As bactérias foram cultivadas em meio ágar nutriente para a obtenção de colônias isoladas. Uma colônia de cada isolado bacteriano foi inoculada em 50 mL de caldo nutriente. Após 7 horas de crescimento (fase log) sob agitação de 150 rpm a 30°C, esse pré inóculo com $1,1 \mu\text{mol}$ de células bacterianas (leitura realizada em 600 nm), foi utilizado para inocular por estrias nas placas de Petri. Os isolados foram inoculados nos 4 tratamentos descritos e conforme a figura 9: a) controle - AN; b) AN + ametrina (25 mM); c) AN + clomazone (9 mM); d) AN + mistura (20 mM).

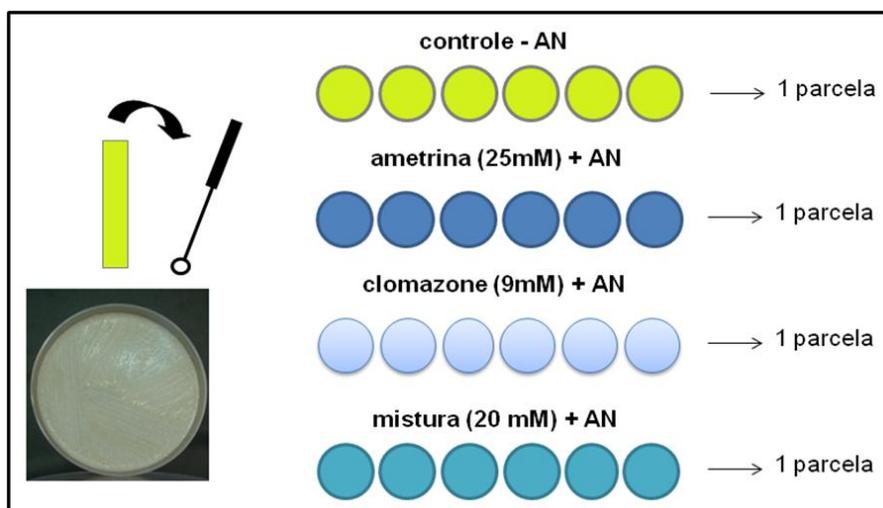


Figura 9 – Inóculo dos isolados CC07 e 4C07

Após 14 horas de crescimento a 30 °C, as colônias bacterianas foram coletadas para as análises posteriores.

3.7.2 Determinação da peroxidação de lipídeos

A peroxidação de lipídeos foi determinada através da produção de metabólitos reativos ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), principalmente o malondialdeído (MDA), segundo Heath e Packer (1968), com modificações. Amostras contendo 100 mg de células bacterianas foram maceradas em 1 mL de TCA (ácido tricloroacético) 0,1%, adicionando aproximadamente 10% de polivinilpirrolidona (PVPP). Após a completa homogeneização, foram transferidas para tubos e centrifugadas a 9700 g por 5 minutos.

Do sobrenadante, foram retirados 250 µL e transferidos para outros tubos juntamente com 1 mL de solução contendo TCA 20% e TBA 0,5%. O branco consistiu na mesma mistura descrita acima, porém, ao invés do sobrenadante da amostra, colocou-se 250 µL de TCA 0,1%. Os tubos com a reação foram colocados em banho-seco por 30 minutos, a 95°C e resfriados em banho de gelo, na sequência. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 9700 g.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Lambda 40, Perkin Elmer) a 535 e 600 nm. A concentração de MDA, em ηmol/g de massa fresca, foi calculada de acordo com o coeficiente de extinção da reação:

3.7.3 Determinação dos níveis de peróxido de hidrogênio

O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi determinado através da reação com iodeto de potássio (KI), segundo Alexieva et al. (2001). As amostras frescas (100 mg) foram maceradas com 1 mL de TCA 0,1%. Após a completa homogeneização, foram transferidas para tubos e centrifugados a 9700 g por 15 minutos, a 4°C.

Do sobrenadante, foram retirados 200 μ L aos quais foram adicionados 200 μ L de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800 μ L de solução de KI 1 M. O branco consistiu na mesma mistura descrita acima, porém, ao invés do sobrenadante da amostra, colocou-se 200 μ L de TCA 0,1%. Os tubos com a reação foram colocados em banho de gelo e permaneceram no escuro durante uma hora. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Lambda 40, Perkin Elmer) a 390 nm. A quantidade de H_2O_2 foi expressa em μ mol/g de tecido fresco utilizando-se curva de calibração com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio.

3.7.4 Determinação dos níveis de glutathiona – GSH/GSSG

A quantificação de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foi determinada segundo Israr et al. (2006) com modificações. As amostras bacterianas (100 mg) foram maceradas em 1,5 mL de ácido sulfosalicílico 0,1%. Após a completa homogeneização, foram transferidos para tubos e centrifugados a 9700 g por 20 min, a 4°C.

Do sobrenadante, foram retirados 250 μ L aos quais foram adicionados 1,75 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), contendo EDTA 0,5 mM (ácido etilenodiamino) e 100 μ L de DTNB 3 mM (5,5' dithio-bis- [ácido 2-nitrobenzóico]). Depois de 5 min, para a determinação da GSH, a reação foi lida a 412 nm, em espectrofotômetro (Lambda 40, Perkin Elmer). Após a leitura, na mesma reação foi adicionado 100 μ L de NADPH 0,4 mM e 2 μ L de glutathiona redutase, essa mistura permaneceu durante 20 min no escuro para posteriormente ser realizada a leitura a 412 nm, podendo assim, determinar a glutathiona total da amostra.

A quantidade de GSSG foi calculada pela diferença dos valores da glutathiona total com os da GSH. O branco consistiu nas mesmas misturas descritas acima, porém, ao invés do sobrenadante da amostra, colocou-se 250 μ L de ácido sulfosalicílico 0,1%. A quantidade de

GSH/GSSG foi expressa em nmol/g de tecido fresco utilizando-se curva de calibração com concentrações conhecidas da glutathiona.

3.7.5 Extração de proteínas

As amostras bacterianas foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, contendo EDTA 1 mM (ácido etilenodiamino) e DTT 3 mM (ditiotreitól) (AZEVEDO et al., 1998). O homogeneizado foi centrifugado à 9.700 g por 30 minuto à 4°C (J2-MC, Beckman). O sobrenadante foi coletado, aliqotado e estocado em freezer -80°C até o momento das análises.

3.7.6 Quantificação das proteínas

Para as determinações da concentração de proteínas totais foi utilizado o método de Bradford (1976), a 595 nm, utilizando-se o BSA (“bovine serum albumin”) como padrão. Foi utilizado o espectrofotômetro Beckman modelo J2-MC. O resultado da quantificação foi em mg/mL.

3.7.7 Determinação do perfil protéico em gel SDS-PAGE

A eletroforese em sistemas SDS-PAGE é empregada em estudos de proteínas, o qual utiliza um agente dissociante, dodecil sulfato de sódio (SDS), para desnaturá-las em subunidades. Os tampões de eletroforese e os géis foram preparados conforme descrito por Laemmli (1970). As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida 10% utilizando o sistema Mini Protean II (Bio-Rad), o qual apresentava espessura de 1,5 mm, altura de 6,5 cm e largura 7,3 cm. Para confecção do gel de resolução foram utilizados 2,5 mL de acrilamida 40% (SIGMA), 2,5 mL de tampão Tris-HCl 2,9 M, pH 8,9, 100 µL de SDS 10%, 19 µL de TEMED, 25 µL de persulfato de amônio 1% e 5 mL de água destilada.

Na confecção do gel de empacotamento foram usados 500 µL de acrilamida 40%, 1,25 mL tampão Tris-HCl 500 mM, pH 6,7, 50 µL de SDS 10%, 10 µL de TEMED, 50 µL de persulfato de amônio 1% e 2,75 mL de água destilada. O tampão de amostra para SDS-PAGE foi

preparado adicionando-se 3 mL de água destilada, 1 mL de tampão Tris-HCl 500 mM, pH6,7, 1,6 mL de SDS (10%), 400 µL da solução azul de bromofenol 0,5 % e 400 µL de mercaptoetanol.

As amostras foram preparadas adicionando-se tampão para SDS-PAGE na proporção 1:1 (amostra/tampão) e incubadas a 100 °C durante 5 minutos. Para cada gel foram aplicados 4 µg de padrão BenchMark – protein Ladder – Invitrogen e 6 µg de proteína por canaleta. O tampão de eletrodo consistiu de SDS 1%, TRIS 25 mM, pH 8,3 acrescido de 192 mM de glicina (5X concentrado, sendo diluído para 1X) e SDS 10%. A eletroforese foi conduzida a temperatura ambiente em corrente constante de 15 mA/placa.

3.7.8 Coloração com Prata para SDS-PAGE

Após a eletroforese o gel foi incubado por aproximadamente 12 horas em solução fixadora contendo etanol 40 % e ácido acético 10 %. O gel foi então transferido para 50 mL de solução contendo acetato de sódio 0,5 M, etanol 30 %, tiosulfato de sódio 20 mM e 260 µL de glutaraldeído 25 %, por 15 minutos. Em seguida foram realizadas três lavagens, de 15 minutos cada, em água destilada e adicionou-se 50 mL de solução contendo nitrato de prata 6 mM e 10 µL de formaldeído 37 %. O gel permaneceu nesta solução por 15 minutos e em seguida foi incubado em 50 mL de solução reveladora contendo carbonato de sódio 0,25 M e 5 µL de formaldeído 37 % até aparecerem as bandas. Visando parar a reação foi adicionada uma solução contendo EDTA 50 mM. Os géis foram documentados no Image Scanner – Amersham Biosciences.

3.7.9 Determinação das atividades das enzimas antioxidantes

As atividades específicas das enzimas antioxidantes foram determinadas quantitativamente por espectrofotometria para superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona redutase (GR) e glutathiona-S-transferase (GST) e qualitativamente, em gel de poliacrilamida não denaturante (PAGE) para SOD, CAT e GR, conforme as referências específicas para cada uma delas.

3.7.10 Atividade da superóxido dismutase – SOD

3.7.10.1 Atividade em espectrofotômetro

A atividade da SOD foi determinada como descrito por Giannopolitis e Ries (1977). A atividade da SOD, em espectrofotômetro (Lambda 40, Perkin Elmer), foi determinada pela adição de 50 µL do extrato enzimático bruto a 3 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, NBT 75 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM. A reação foi conduzida a 25 °C, numa câmara de reação, sob iluminação de lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. Após 5 minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e o composto blue formazana, produzido pela fotorredução do NBT, foi medido a 560 nm. Um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual período, serviu de branco e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação. Os resultados foram expressos em U SOD/mg de proteína.

3.7.10.2 Atividade em PAGE

A atividade da SOD em PAGE foi determinada através de eletroforese em gel não desnaturante (12% de poliacrilamida) conforme descrito por Beauchamp e Fridovich (1971) e modificado por Azevedo et al. (1998) utilizando o sistema Mini Protean II (Bio-Rad). Para confecção do gel de resolução foram utilizados 3,0 mL de uma solução de poliacrilamida 40 % (SIGMA), 2,5 mL de tampão TRIS 3M, pH 8,9, 4,5 mL de água destilada e como catalisadores da reação foi utilizado 19 µL de TEMED e 25 µL de persulfato de amônio 1 %. O gel de empacotamento foi preparado utilizando-se 500 µL de poliacrilamida 40%, 1,25 mL tampão TRIS 500 mM, pH 6,7, 2,75 mL de água destilada, 10 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônio 1 %. A eletroforese foi realizada a 4°C em corrente constante de 15 mA/placa. O tampão de eletrodo era composto por TRIS 25 mM, pH 8,3 acrescido de 192 mM de glicina - 5X concentrado, sendo diluído para 1X e reutilizado até 3 vezes. Em cada gel foram aplicados 10 µL do padrão de SOD (SIGMA) e 60 µg de proteína dos extratos bacterianos.

Após a corrida eletroforética (aproximadamente 4 horas – corrente de 20 mA), os géis foram lavados rapidamente em água deionizada e incubados no escuro à temperatura ambiente

em uma mistura de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, EDTA 1 mM, riboflavina 0,05 mM, nitroblue tetrazolium 0,1 mM e TEMED 0,3%. Ao final de 30 minutos, a mistura de reação foi removida, os géis foram enxaguados com água deionizada e colocados sob iluminação por alguns minutos até o aparecimento de bandas brancas sob fundo roxo (GOMES-JUNIOR et al., 2006).

Nestas condições ocorre a fotoxidação do gel. A riboflavina, por fotólise, é reduzida na presença do TEMED (substância oxidante), em seguida, providencia um elétron para o O_2 , resultando no íon superóxido, O_2^- , o qual atua como redutor do composto NBT (incolor) para o blue formazana.

Com isto, ocorre a formação de uma coloração púrpura no gel e as bandas correspondentes à atividade de SOD – pela eliminação do radical superóxido -, permanecem sem coloração (ou sem se fotoxidar), promovendo uma revelação negativa. A fotoxidação foi interrompida mergulhando-se o gel em solução de ácido acético (7%) por 15 minutos. Os géis foram documentados no Image Scanner (Amersham Biosciences).

3.7.10.3 Caracterização de isoenzimas de SOD

Para a determinação das isoformas da SOD foi realizada uma eletroforese não desnaturante em gel de poliacrilamida (12%) com 300 μ g de proteína do extrato bacteriano nas mesmas condições descritas anteriormente para SOD (item 3.7.10.2). Ao final da eletroforese, o gel foi dividido verticalmente em três partes. A primeira parte foi mantida a 4°C em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8. A segunda foi imersa em 100 mL do mesmo tampão contendo KCN 2 mM e 0,0292 g de EDTA. A terceira, imersa em 100 mL do referido tampão contendo H_2O_2 5 mM e 0,0292 g de EDTA. Todos os passos descritos foram realizados no escuro.

Após 20 minutos de incubação nestas soluções, os géis foram submetidos à revelação com NBT e riboflavina, como citado anteriormente no item 3.7.10.2 para a identificação das isoformas ativas da SOD. Ao final da revelação, as bandas foram analisadas quanto à presença ou ausência de bandas, conforme o fator inibidor presente nas soluções de tratamento. As isoformas foram classificadas como (AZEVEDO et al., 1998):

- 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 se mostrou resistente aos dois tratamentos.

3.7.11 Atividade da Catalase – CAT

3.7.11.1 Atividade em espectrofotômetro

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

Em espectrofotômetro (Lambda 40, Perkin Elmer), a atividade da CAT foi determinada a $25^\circ C$ em solução de reação formada por 10 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 25 μL de peróxido de hidrogênio 1 mM preparada imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada para o isolado CC07 com a adição de 15 μL de extrato protéico e para o isolado 4C07 foi iniciada com 25 μL . Assim, a atividade enzimática foi determinada seguindo-se a decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por 1 min, através das alterações na absorbância a 240 nm em cubetas de quartzo. Os resultados foram expressos em $\mu mol/minuto/mg$ de proteína.

3.7.11.2 Atividade em PAGE

Foi realizada uma eletroforese em PAGE (12%) nas mesmas condições como descrito para SOD, no entanto, a duração foi de 25 horas (corrente-20 mA) e em cada gel foram aplicados 7 μL do padrão de CAT (SIGMA) e 40 μg de proteína dos extratos bacterianos.

A revelação para atividade de CAT foi realizada após a lavagem do gel por 45 minutos em água deionizada (3 x 15 minutos) e incubação do mesmo por 10 min em H_2O_2 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 $FeCl_3$ 1% e de $K_2Fe(CN_6)$ 1% sempre com agitação suave. Em seguida, a solução foi retirada e o gel lavado com água. A fixação foi realizada com uma solução de ácido acético 7% e posteriormente os géis foram documentados.

3.7.12 Atividade de glutaciona redutase - GR

3.7.12.1 Atividade em espectrofotômetro

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

Em espectrofotômetro (Lambda 40, Perkin Elmer), a atividade da GR foi determinada a 30°C em uma mistura de reação consistindo de 1 mL tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), 500 µL de DTNB 1 mM, 100 µL de GSSG 1 mM e 100 µL de NADPH 0,1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL do extrato protéico (para ambos isolados) à mistura de reação e monitorada por 1 min através da redução da glutaciona oxidada a 412 nm. A glutaciona reduzida, por sua vez, reduziu o composto DTNB, que representa cromóforo amarelo, dando a coloração característica do ensaio. Os valores de atividade da GR foram expressos em µmol/minuto/mg de proteína.

3.7.12.2 Atividade em PAGE

A revelação para atividade de GR foi determinada como descrito por (GRATÃO et al., 2008). Foi feita uma eletroforese em PAGE (12%) nas mesmas condições como descrito para CAT e SOD. Foi utilizado como padrão, 1 unidade de GR e foram aplicados 50 µL de extrato protéico dos isolados bacterianos. Após um tempo médio de 5h para eletroforese, o gel foi lavado em água destilada e incubado por 30 min à temperatura ambiente, em uma solução de TRIS 0,25 M (pH 7,5), MTT 0,5 mM, DPIP 0,7 mM, GSSG 3,4 mM e NADPH 0,5 mM. Após o aparecimento das bandas a solução foi retirada, sendo que para paralisar a revelação das bandas o gel foi incubado por 15 min em uma solução de ácido acético 7%, após a fixação o gel foi documentado.

3.7.13 Atividade de glutathione-S-transferase – GST

3.7.13.1 Atividade em espectrofotômetro

A atividade da GST foi determinada somente por espectrofotometria (Lambda 40, Perkin Elmer) seguindo o protocolo descrito por Zablutowicz et al. (1995) com modificações.

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 0,1 mM e 25 μL de amostra, em um volume total de 1 mL. A leitura foi monitorada durante 5 min, sendo iniciada a partir de 1 min, em comprimento de onda de 340 nm que monitora a conjugação de CDNB-GSH.

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

Desta forma, foram realizados testes com o protocolo, sendo que a reação foi iniciada com adição de GSH a solução de fosfato de potássio e CDNB correspondendo assim ao branco do ensaio (solução sem amostra), o qual teve analisado sua atividade. Portanto, o valor do branco foi utilizado para diminuir dos valores das leituras da atividade das soluções que continha as amostras, resultando assim em um controle da reação (ZABLOTOWICZ et al., 1995).

O monitoramento da absorbância foi feito durante 5 min e a atividade foi expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, utilizando o coeficiente de extinção de $9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.8 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com 5 repetições. Aos dados quantitativos foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Média (Teste de TUKEY), utilizando o software R (<http://www.r-project.org/>) a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento de bactérias tolerantes aos herbicidas

Para o estudo com cultura pura de microrganismos, o isolamento das bactérias foi realizado pela técnica de diluição em série (10^{-1} – 10^{-4} em triplicatas) das amostras de solos com baixo e alto declive e, posterior, plaqueamento em meio seletivo contendo os herbicidas ametrina e clomazone como única fonte de carbono.

Os resultados obtidos por meio da contagem de unidade formadora de colônia (UFC) estão representados na figura 10. Foi observada maior frequência de UFC para amostras de solo com alto declive, quando comparado com baixo declive. Esta maior frequência pode ser estendida aos resultados de contabilização de UFC de maneira independente entre os herbicidas estudados.

Apesar disso, foi possível observar diferença no número de UFC tolerantes dependendo do herbicida utilizado. O herbicida clomazone foi mais seletivo que o ametrina para as bactérias de solo, uma vez que foi observado menor número de colônias bacterianas.

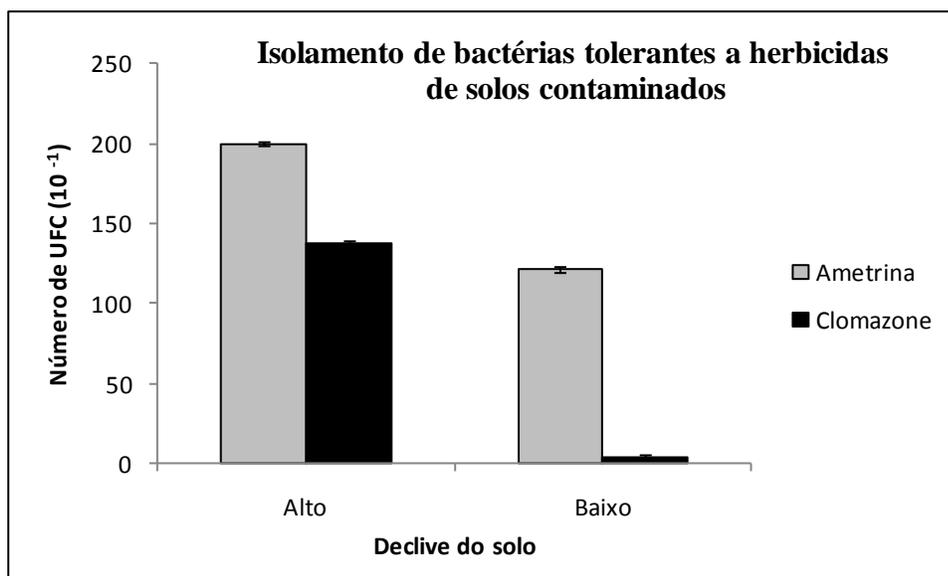


Figura 10 - Número de isolados bacterianos (UFC) tolerantes aos herbicidas ametrina e clomazone proveniente de amostras de solos com alto e baixo declive

4.2 Seleção de bactérias tolerantes aos herbicidas

Foram obtidos 11 isolados bacterianos a partir de testes baseados em diferenças morfológicas. A seleção dos isolados para as análises bioquímicas e genéticas consistiu em inocular as bactérias em meio completo (AN) contendo os herbicidas ametrina e clomazone em concentrações de 25 mM e 9 mM, respectivamente e, em mistura contendo 20 mM de cada herbicida. Os cálculos para as concentrações dos herbicidas em meio de cultura foram baseados nas especificações dos herbicidas (página 45) e essas dosagens são recomendadas para a cultura cana-de-açúcar para a aplicação pré e pós-emergência.

Dentre os 11 isolados foram selecionadas duas bactérias, as quais foram nomeadas de “4C07” e “CC07”. Estas bactérias apresentaram melhor crescimento nos meios de cultura contendo os herbicidas quando comparado aos outros isolados, além da observação da formação de halo de degradação ao redor das colônias, de acordo com o observado nas figuras 11 e 12.

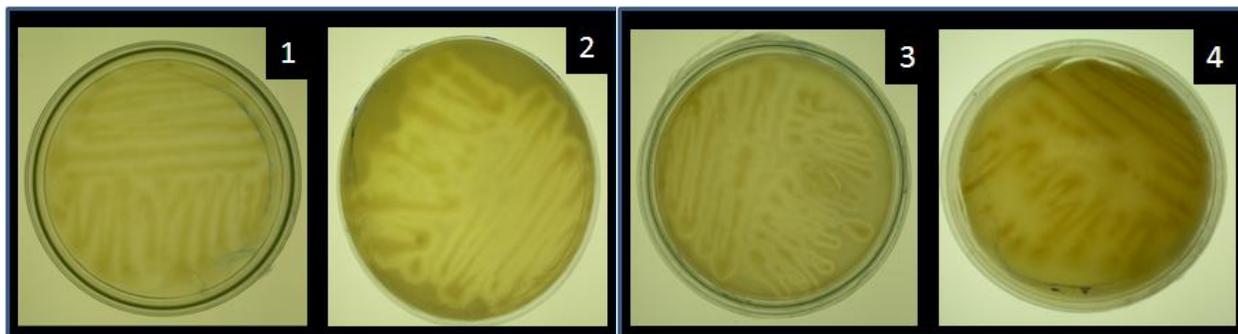


Figura 11 - Visualização do crescimento do isolado CC07 em placa de petri – (1) controle 0 mM, (2) ametrina 25 mM, (3) clomazone 9 mM, (4) mistura 20 mM

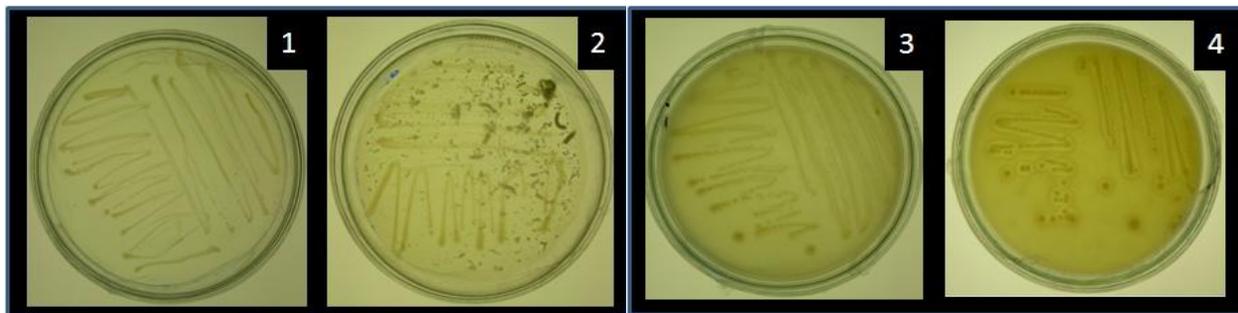


Figura 12 - Visualização do crescimento do isolado 4C07 em placa de petri – (1) controle 0 mM, (2) ametrina 25 mM, (3) clomazone 9 mM, (4) mistura 20 mM

Este é um resultado qualitativo que fornece o primeiro indício de degradação dos herbicidas por esses isolados.

4.3 Identificação bacteriana e árvore filogenética

Um fragmento de 1,5 Kb do gene 16S do RNAr dos isolados CC07 e 4C07 foi seqüenciado. Estas seqüências foram depositadas no banco de dados GenBank e os múltiplos alinhamentos obtidos indicaram que a bactéria CC07 apresentou 97% de similaridade com um isolado não cultivado e bactéria 4C07 apresentou 98% de similaridade com o gênero *Pseudomonas*, conforme mostra a tabela a seguir:

Tabela 8 - resultados da busca por similaridade no GenBank com o uso do programa BLAST

Isolado	Tamanho da seqüência (pb)	Alinhamento significativo	Similaridade
CC07	1462	Bactéria não cultivada	97%
4C07	1498	<i>Pseudomonas</i> sp.	98%

A fim de identificar a filogenia dos isolados, espécies diferentes foram escolhidas do banco de dados RDP Query para a construção da árvore filogenética, a qual foi baseada na seqüência parcial (500 pb) do gene 16S do RNAr.

Através do método Neighbour-Joining, o isolado CC07 mostrou-se próximo da espécie *Pseudomonas aeruginosa* com 83% de similaridade, e dentro do mesmo gênero *Pseudomonas* o isolado 4C07 foi alocado próximo da espécie *Pseudomonas fulva* com 68% de similaridade, conforme observado na figura 13.

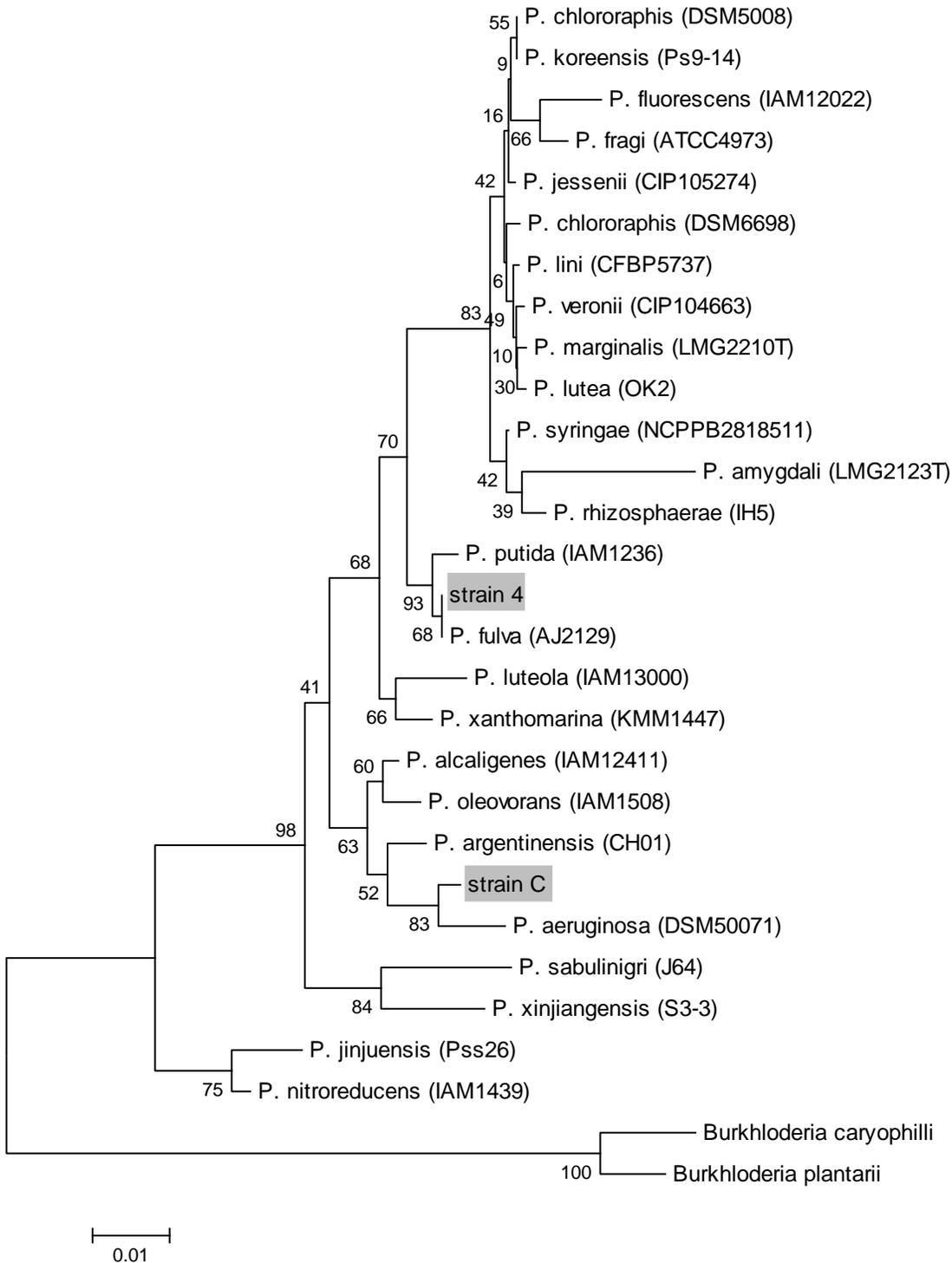


Figura 13 - A árvore filogenética foi construída pelo método Neighbor Joining, com sequências de 500 pb do gene 16S DNAr de bactérias isoladas de solo agrícola tolerantes aos herbicidas ametrina e clomazone. As espécies *Burkholderia caryophylli* e *B. plantarii* foram usadas como outgroup

4.4 Crescimento bacteriano na presença dos herbicidas

Cada isolado cresceu em 50 mL de meio caldo nutriente, a 150 rpm e 30°C. Foram monitoradas as primeiras 14 horas de crescimento, em intervalos de 2 horas.

Os resultados da viabilidade das células na presença dos herbicidas estão representados nas figuras 14 e 15. O isolado CC07 apresentou crescimento semelhante para os tratamentos ametrina e mistura em relação ao controle. No tratamento com clomazone, o isolado apresentou uma longa fase de adaptação (fase lag), porém, com 14 horas de crescimento alcançou número de células semelhante às observadas para os outros tratamentos. Além disso, o comportamento no tratamento mistura mostrou-se intermediário quando comparado com o crescimento na presença dos herbicidas isoladamente, como observado na figura 14. De acordo com esses resultados, foi possível observar que a bactéria CC07 apresentou menor crescimento quando exposta ao herbicida clomazone.

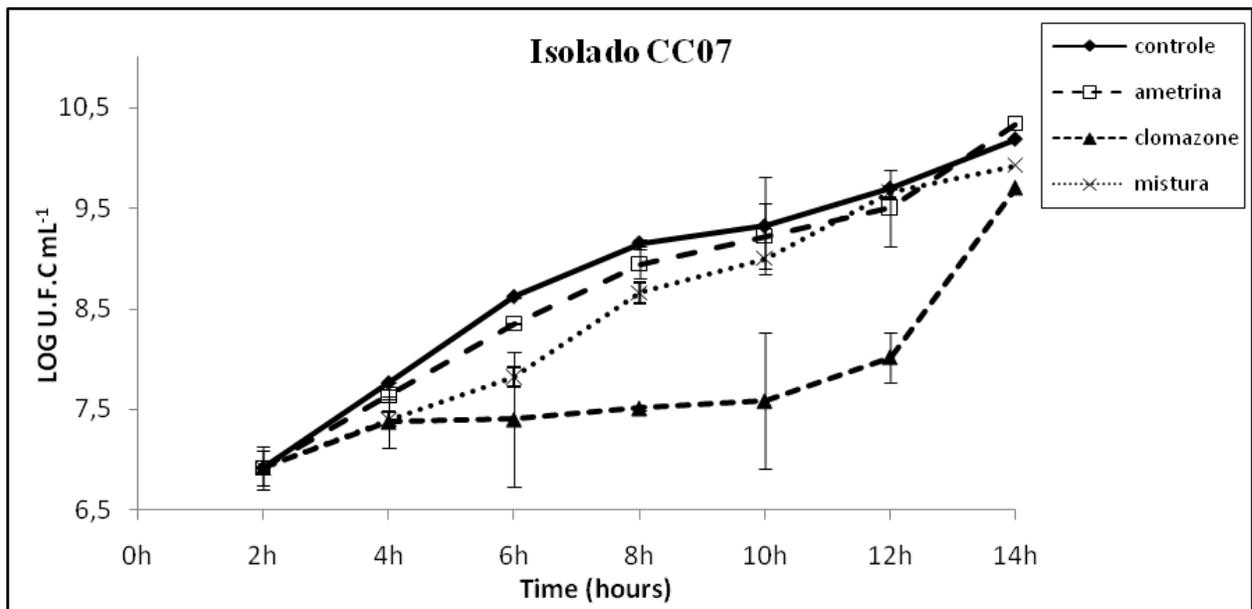


Figura 14- Curva de crescimento do isolado CC07 na ausência e presença dos herbicidas ametrina e clomazone nas respectivas concentrações: controle 0 mM, ametrina 25 mM, clomazone 9 mM e mistura 20 mM

A bactéria 4C07 apresentou crescimento diferencial entre os tratamentos. Pode-se observar uma grande fase de adaptação quando a bactéria foi exposta aos tratamentos clomazone e mistura, de acordo com o observado na figura 15, sendo constante em todo o tempo avaliado. O crescimento bacteriano nesses tratamentos foi limitado, pois durante as 14 horas de crescimento

não houve aumento significativo do número de células. Entretanto, o crescimento deste isolado na presença do herbicida ametrina foi semelhante ao controle, sendo que o número de células entre esses dois tratamentos foi praticamente o mesmo após 14 horas de crescimento. Além disso, foi possível observar que o herbicida clomazone foi o que mais interferiu no crescimento bacteriano, pois no tratamento mistura, a bactéria apresentou crescimento intermediário entre o observado para os tratamentos ametrina e clomazone, comportamento esse, semelhante ao encontrado para o isolado CC07.

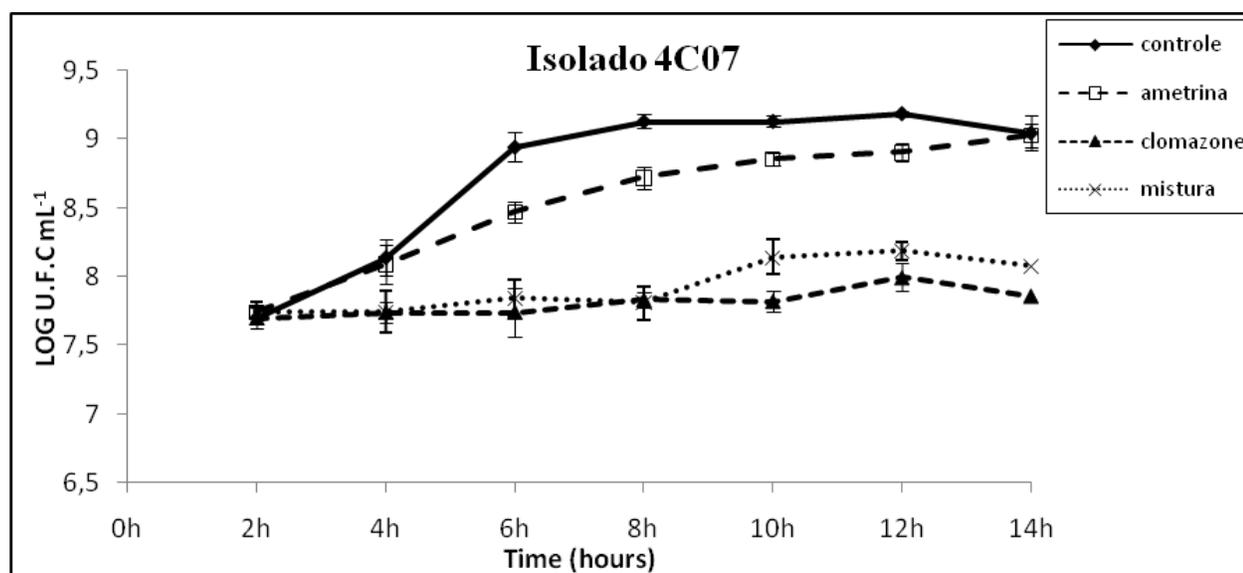


Figura 15- Curva de crescimento do isolado 4C07 na ausência e presença dos herbicidas ametrina e clomazone nas respectivas concentrações: controle 0 mM, ametrina 25 mM, clomazone 9 mM e mistura 20 mM

4.5 Avaliação da peroxidação lipídica pela determinação dos níveis de malondialdeído (MDA)

Para avaliar o efeito direto da toxicidade dos herbicidas ametrina e clomazone sob o sistema antioxidante, os isolados bacterianos tiveram valores de peroxidação lipídica avaliados através da determinação da concentração de MDA (nmol/g MF).

Os resultados obtidos para o isolado CC07 mostraram aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração de MDA para o tratamento mistura (20 mM) (Figura 16). Os demais tratamentos, ametrina e clomazone, não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) no conteúdo de MDA em relação ao controle. Já o isolado 4C07 não apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) independente do tratamento avaliado (Figura 17).

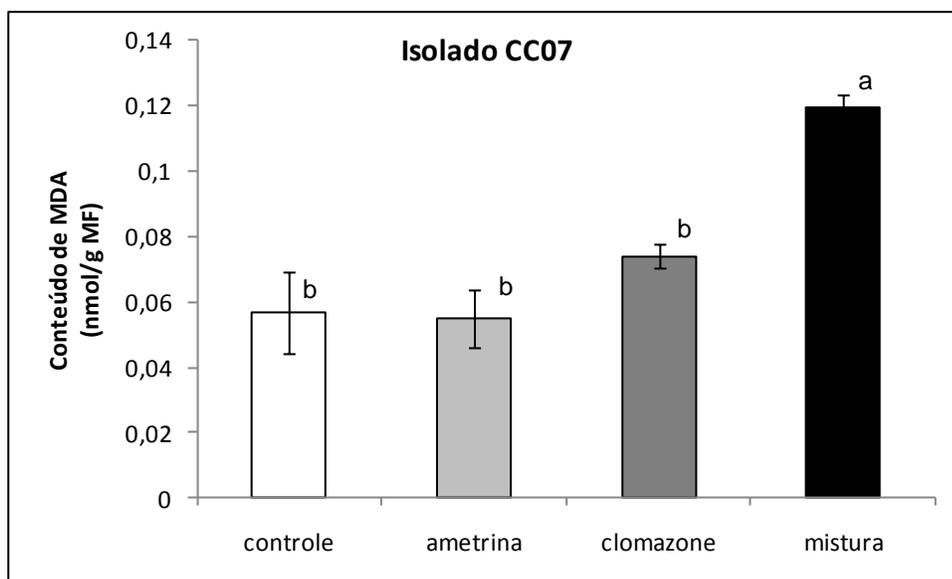


Figura 16 – Quantidade de MDA (nmol/g massa fresca) para o isolado CC07 submetido aos herbicidas ametrina e clomazone isoladamente e em conjunto, sendo representados os tratamentos controle 0 mM, ametrina 25 mM, clomazone 9 mM e mistura 20 mM

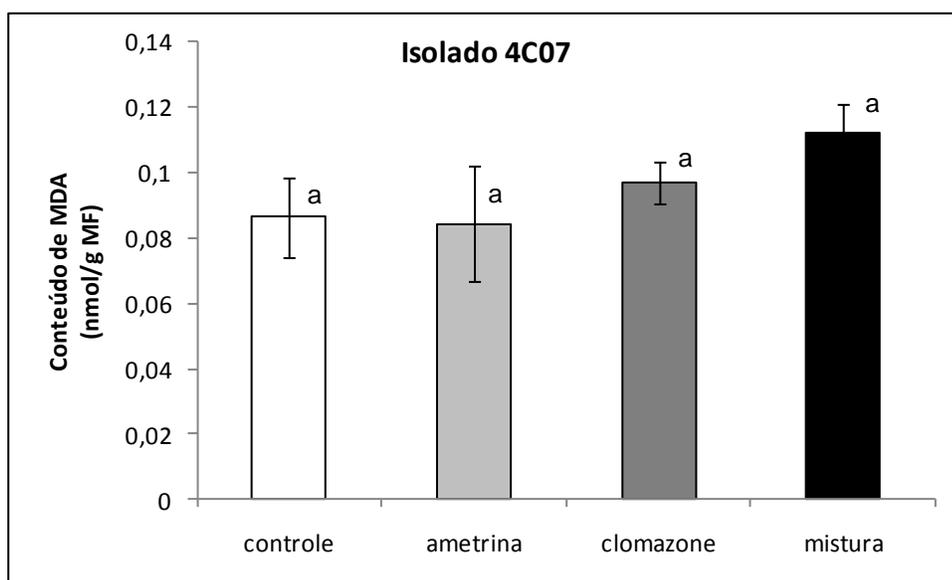


Figura 17 – Quantidade de MDA (nmol/g massa fresca) para o isolado 4C07 submetido aos herbicidas ametrina e clomazone isoladamente e em conjunto, sendo representados os tratamentos controle 0 mM, ametrina 25 mM, clomazone 9 mM e mistura 20 mM

4.6 Determinação dos níveis de peróxido de hidrogênio

Outra forma de avaliar o efeito da toxicidade dos herbicidas sob o sistema antioxidante é analisar os níveis de peróxido de hidrogênio nas células, pois o aumento de EROs pode levar ao estresse oxidativo.

Os resultados observados para os isolados CC07 e 4C07 não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) no conteúdo de peróxido de hidrogênio ($\mu\text{mol/g MF}$) entre o controle e os tratamentos com herbicidas (Figura 18 e 19). Entretanto, observou-se que a concentração de peróxido de hidrogênio no metabolismo do isolado CC07 é próximo do dobro da concentração encontrada no isolado 4C07, como mostram os gráficos a seguir.

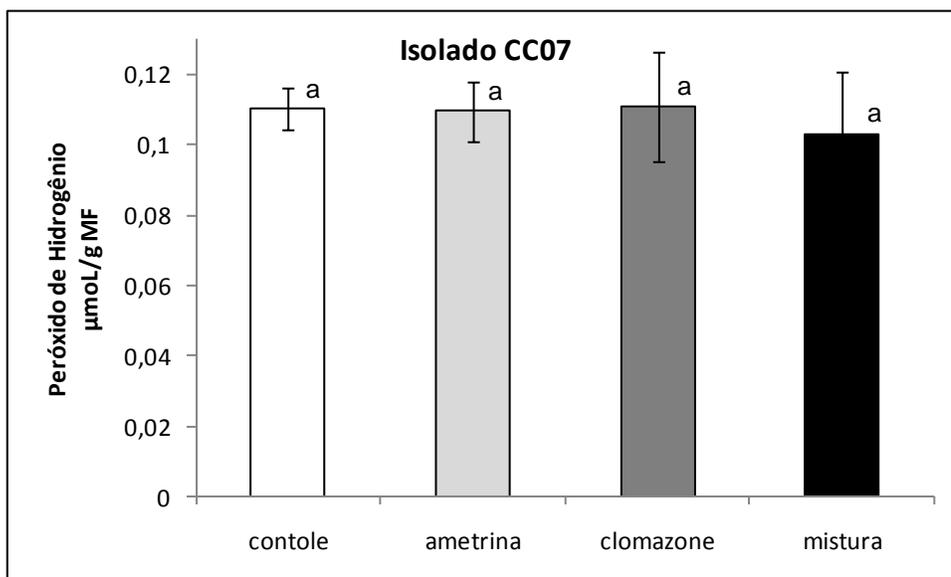


Figura 18 – Quantidade de Peróxido de hidrogênio ($\mu\text{mol/g}$ massa fresca) para o isolado CC07 submetido aos herbicidas ametrina e clomazone isoladamente e em conjunto, sendo representados os tratamentos controle 0 mM, ametrina 25 mM, clomazone 9 mM e mistura 20 mM

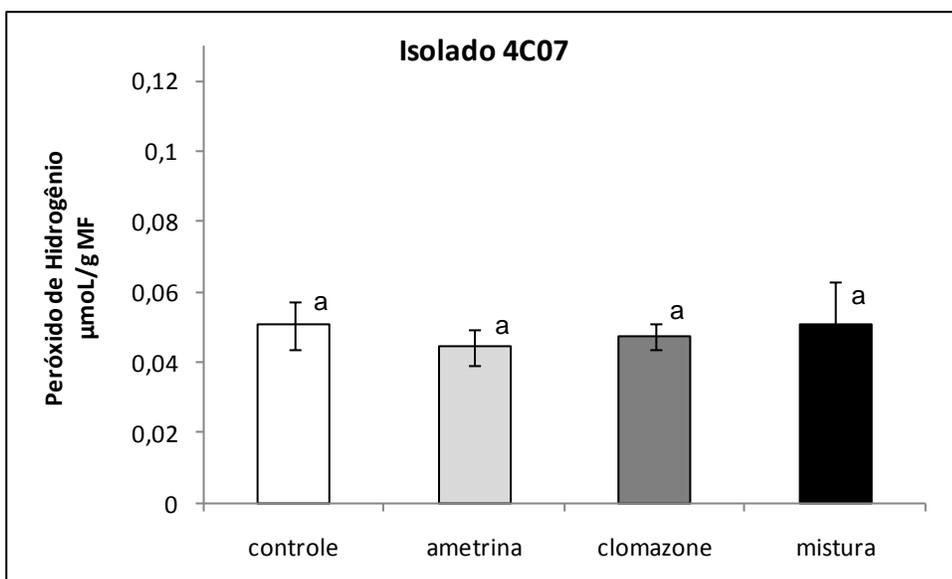


Figura 19 – Quantidade de Peróxido de hidrogênio ($\mu\text{mol/g}$ massa fresca) para o isolado 4C07 submetido aos herbicidas ametrina e clomazone isoladamente e em conjunto, sendo representados os tratamentos controle 0 mM, ametrina 25 mM, clomazone 9 mM e mistura 20 mM

4.7 Determinação dos níveis de glutathiona – GSH

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) apresentaram respostas distintas quando os isolado CC07 e 4C07 foram expostos aos diferentes herbicidas. Para o isolado CC07 pôde-se observar um decréscimo significativo ($p < 0,05$) na concentração de GSH nos tratamentos clomazone e mistura em relação ao controle, entretanto, na presença de ametrina ocorreu um acréscimo de GSH. Assim, foi possível observar que na presença do herbicida clomazone, ocorreu significativa diminuição nos níveis de glutathiona nas células avaliadas (Figura 20).

A bactéria 4C07 apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) na concentração de GSH para os tratamentos com herbicidas em relação ao controle, como mostra a figura 21.

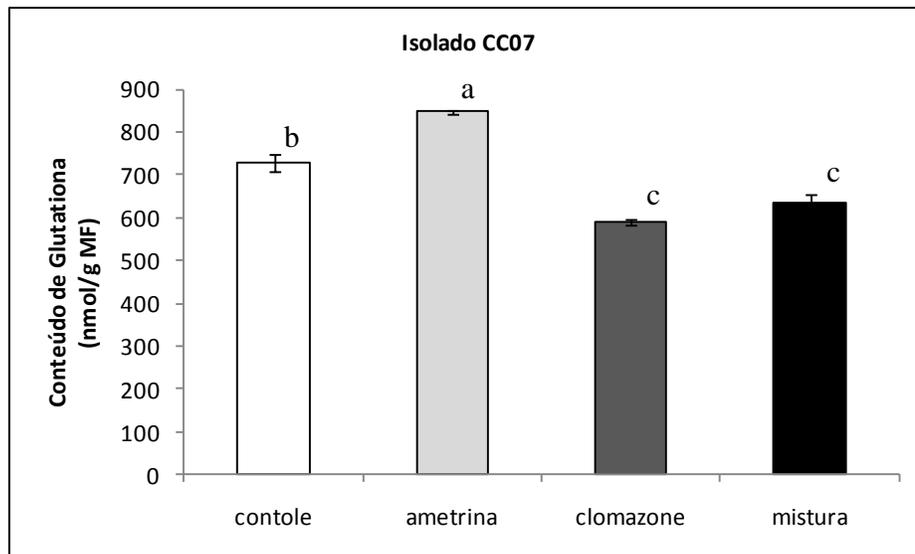


Figura 20 – Quantidade de glutatona reduzida (nmol/g massa fresca) para o isolado CC07 submetido aos herbicidas ametrina e clomazone isoladamente e em conjunto, sendo representados os tratamentos controle 0 mM, ametrina 25 mM, clomazone 9 mM e mistura 20 mM

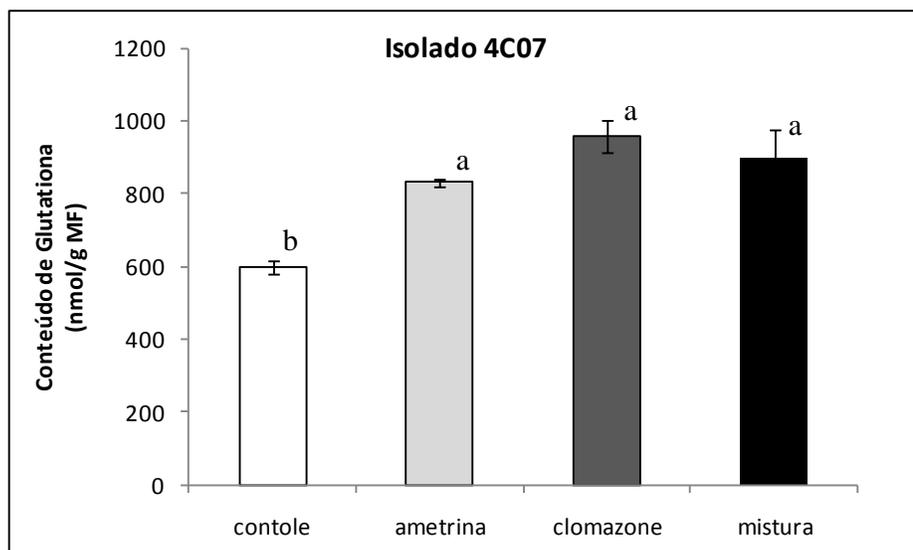


Figura 21 - Quantidade de glutatona reduzida (nmol/g massa fresca) para o isolado 4C07 submetido aos herbicidas ametrina e clomazone isoladamente e em conjunto, sendo representados os tratamentos controle 0 mM, ametrina 25 mM, clomazone 9 mM e mistura 20 mM

4.8 Quantificação de proteínas e perfil protéico em SDS-PAGE

Os teores de proteínas solúveis totais para os isolados, avaliados pelo método de Bradford (1976), não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controle e os demais tratamentos (Figuras 22 e 23).

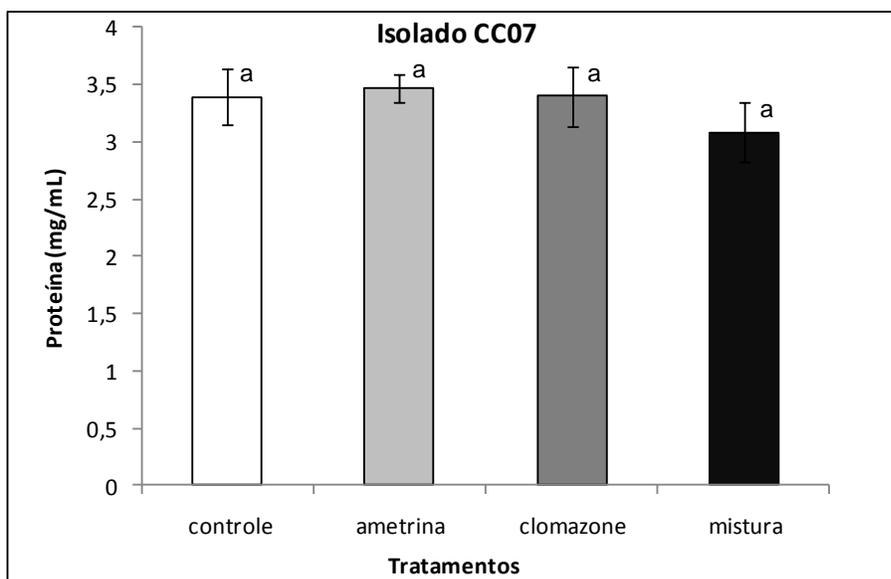


Figura 22 - Quantificação de proteínas solúveis (mg/mL), pelo método de Bradford, para o isolado CC07 submetido aos herbicidas ametrina e clomazone isoladamente e em conjunto, sendo representados os tratamentos controle 0 mM, ametrina 25 mM, clomazone 9 mM e mistura 20 mM

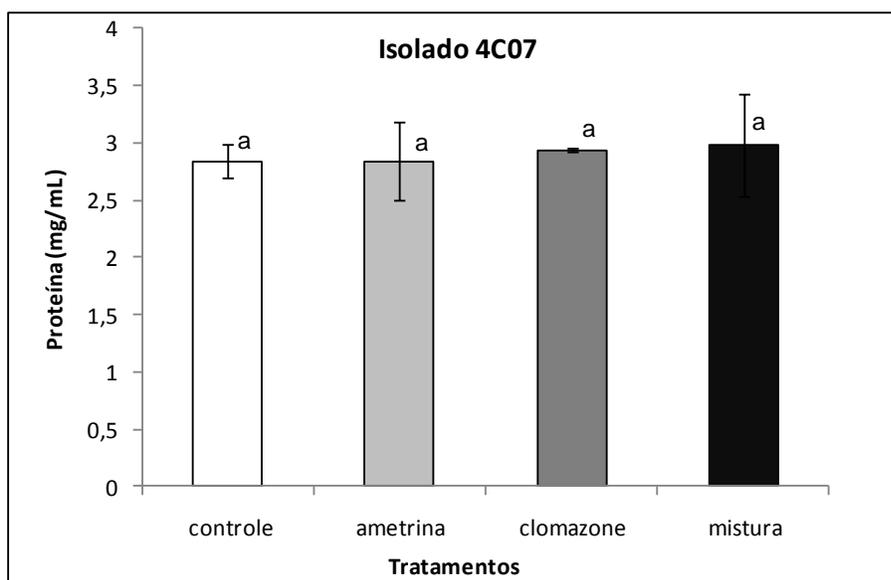


Figura 23 – Quantificação de proteínas solúveis (mg/mL) pelo método de Bradford, para o isolado 4C07 submetido aos herbicidas ametrina e clomazone isoladamente e em conjunto, sendo representados os tratamentos controle 0 mM, ametrina 25 mM, clomazone 9 mM e mistura 20 mM

Na análise do perfil protéico em gel SDS-PAGE (Figura 24) foram observadas mudanças nos tratamentos em relação ao controle. Tais diferenças estão relacionadas a alterações de intensidade e ausência/presença de bandas entre os tratamentos.

Comparando-se o perfil protéico entre os dois isolados, verificaram-se diferenças entre eles, apesar de ambos os isolados pertencerem ao mesmo gênero. Para o isolado CC07 o perfil de proteínas foi constante quanto à ausência e presença de bandas entre os tratamentos.

Entretanto, para o isolado 4C07 uma banda de aproximadamente 50 KDa (banda II) foi inibida somente na presença do herbicida clomazone e no tratamento mistura mostrou-se com menor intensidade. Também foi observado a indução de uma nova banda de aproximadamente 60 KDa (banda I) para os tratamentos contendo herbicidas, em relação ao controle. Outro dado interessante observado foi quando se comparou o perfil protéico do tratamento mistura (canaleta 4) do isolado CC07 com os demais tratamentos do isolado 4C07 (canaletas 5, 6, 7 e 8); esses resultados mostraram que o perfil de bandas é semelhante a todos esses tratamentos com exceção das bandas de aproximadamente 50 KDa (banda II) e 35 KDa (banda III).

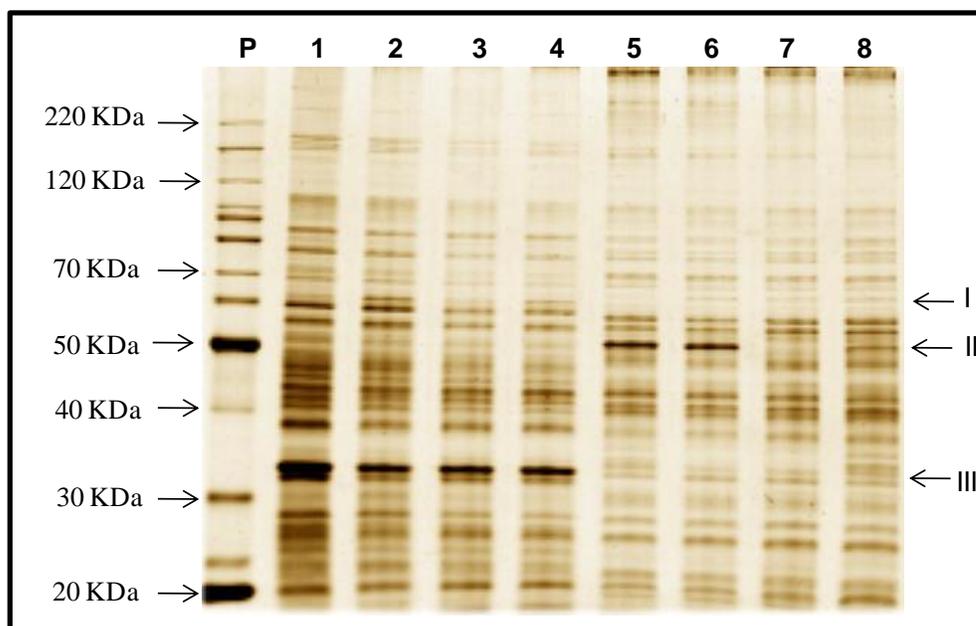


Figura 24 – Perfil protéico em gel SDS-PAGE. Padrão (P) BSA; 1, 2, 3 e 4 representam o isolado CC07 e 5, 6, 7 e 8 representam o isolado 4C07 nos respectivos tratamentos: controle 0 mM, ametrina 25 mM, clomazone 9 mM, mistura 20 mM

4.9 Superóxido Dismutase (SOD)

4.9.1 Atividade em espectrofotômetro

Os dois isolados apresentaram respostas diferentes quando analisada a atividade da enzima SOD em espectrofotômetro. Para o isolado CC07 foi observado aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade de SOD somente quando a bactéria foi exposta ao tratamento mistura, de acordo com a figura 25. No entanto, os níveis da atividade de SOD não foram alterados entre o controle e os tratamentos contendo os herbicidas ametrina e clomazone isoladamente.

O isolado 4C07, também apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade no tratamento mistura. Porém, os tratamentos com ametrina e clomazone apresentaram atividade em nível intermediário entre o controle e mistura, conforme a figura 26.

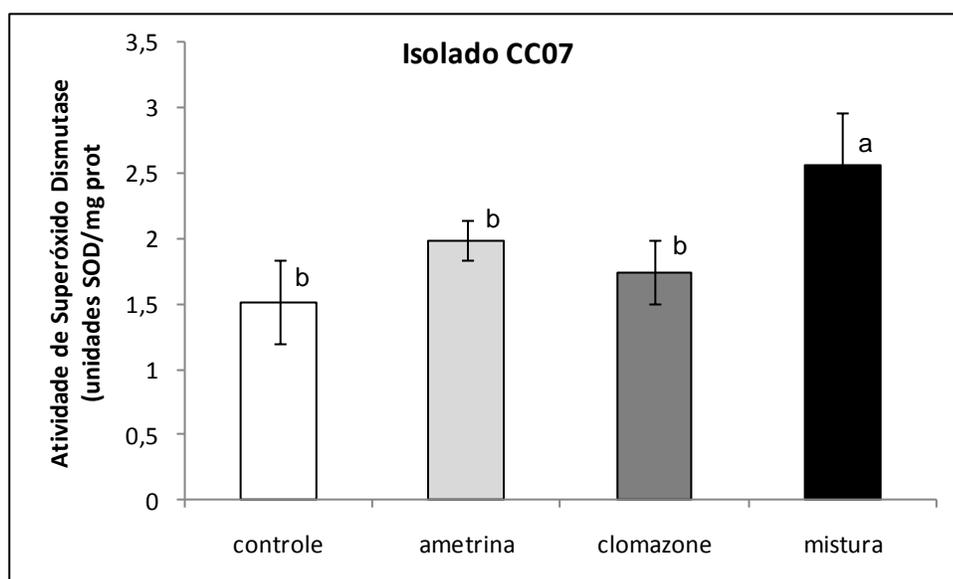


Figura 25 – Atividade de SOD (unidades de SOD/mg de proteína) em espectrofotômetro para o isolado CC07 submetido aos herbicidas ametrina e clomazone isoladamente e em conjunto, sendo representados os tratamentos controle 0 mM, ametrina 25 mM, clomazone 9 mM e mistura 20 mM

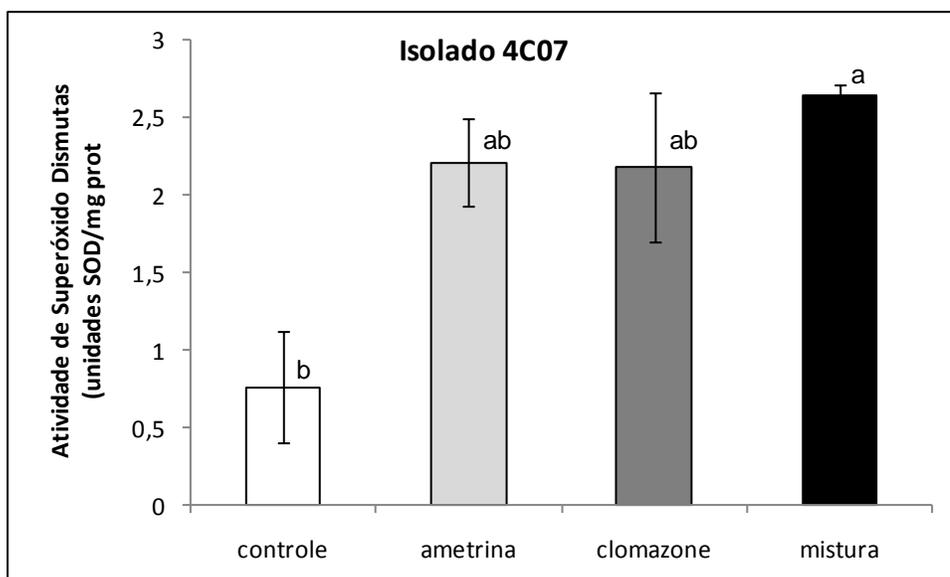


Figura 26 – Atividade de SOD (unidades de SOD/mg de proteína) em espectrofotômetro para o isolado 4C07 submetido aos herbicidas ametrina e clomazone isoladamente e em conjunto, sendo representados os tratamentos controle 0 mM, ametrina 25 mM, clomazone 9 mM e mistura 20 mM

4.9.2 Atividade em PAGE

Os resultados da atividade de SOD em PAGE demonstraram variações nos tratamentos com herbicidas. Duas isoformas ativas de SOD foram observadas para os dois isolados bacterianos em todos os tratamentos analisados (Figura 27). Para o isolado CC07 a isoforma I apresentou menor intensidade na presença do herbicida ametrina e no tratamento com ambos os herbicidas. Já a isoforma IV apresentou a intensidade constante nos quatros tratamentos.

Para o isolado 4C07 verificou-se diferenças na intensidade das isoformas nos tratamentos clomazone e mistura. Observou-se aumento de intensidade da isoforma II no tratamento com clomazone e, no tratamento mistura ocorreu um decréscimo na sua intensidade. Já para a isoforma III, notou-se apenas um pequeno decréscimo no tratamento com ametrina. Contudo, as diferenças observadas para atividade de SOD em PAGE para os dois isolados não interferiram na atividade total desta enzima.

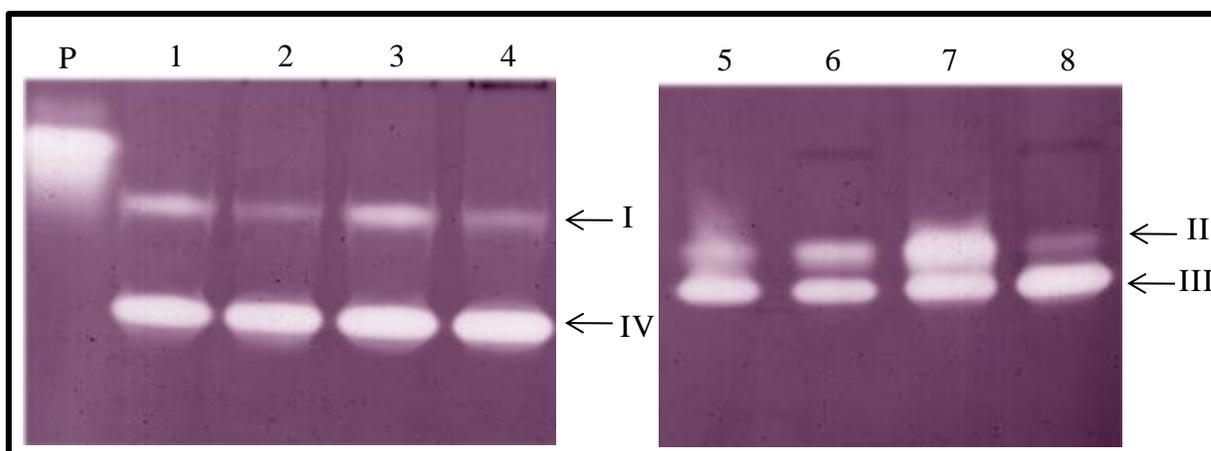


Figura 27 – Análise da atividade da SOD em PAGE, padrão (P) de SOD de fígado bovino; 1, 2, 3 e 4 representam o isolado CC07 e 5, 6, 7 e 8 representam o isolado 4C07 nos respectivos tratamentos: controle 0 mM, ametrina 25 mM, clomazone 9 mM, mistura 20 mM

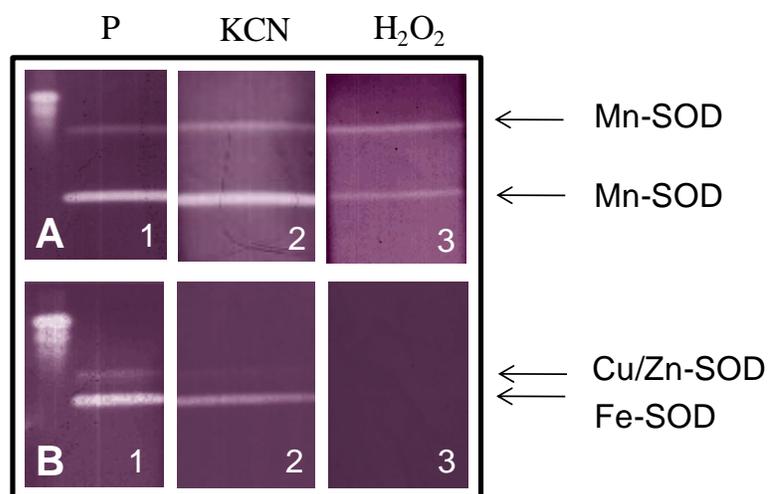


Figura 28 – Caracterização das isoformas de SOD em PAGE, 1: controle, 2: presença de KCN, 3: presença de H_2O_2 , **A** representa o isolado CC07 e **B** representa o isolado 4C07

As isoformas de SOD (Figura 28) foram caracterizadas por meio da inibição de KCN e/ou por H_2O_2 . As isoformas I e IV, as quais estão presentes no isolado CC07, foram caracterizadas como Mn-SOD (resistente a KCN e H_2O_2). Já as isoformas, II e III, encontradas na bactéria 4C07 possuem co-fator metálico diferentes e foram caracterizadas como Cu/Zn-SOD (sensível ao KCN e H_2O_2) e Fe-SOD (resistente a KCN e sensível ao H_2O_2), respectivamente.

4.10 Catalase (CAT)

4.10.1 Atividade em espectrofotômetro

Os níveis da atividade de CAT em espectrofotômetro para ambos os isolados não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controle e os tratamentos ametrina, clomazone e mistura (Figura 11). Comparando-se a atividade de CAT entre as duas bactérias do gênero *Pseudomonas* pode-se observar a diferença entre os níveis da atividade, sendo que o isolado CC07 apresentou a atividade enzimática em torno de 210 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, enquanto que o isolado 4C07 apresentou 120 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, como apresentado nas figuras 29 e 30.

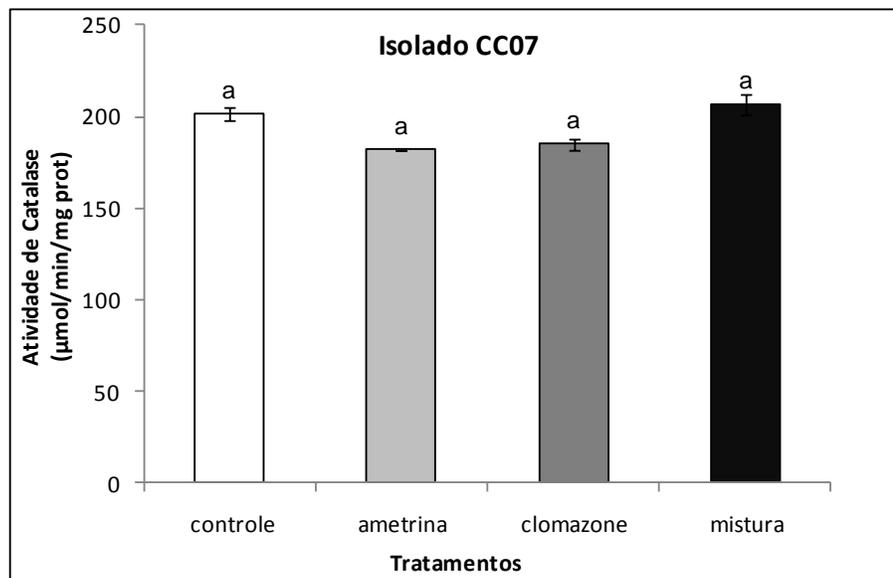


Figura 29 – Atividade de CAT ($\mu\text{mol}/\text{minuto}/\text{mg}$ de proteína) em espectrofotômetro para o isolado CC07 submetido aos herbicidas ametrina e clomazone isoladamente e em conjunto, sendo representados os tratamentos controle 0 mM, ametrina 25 mM, clomazone 9 mM e mistura 20 mM

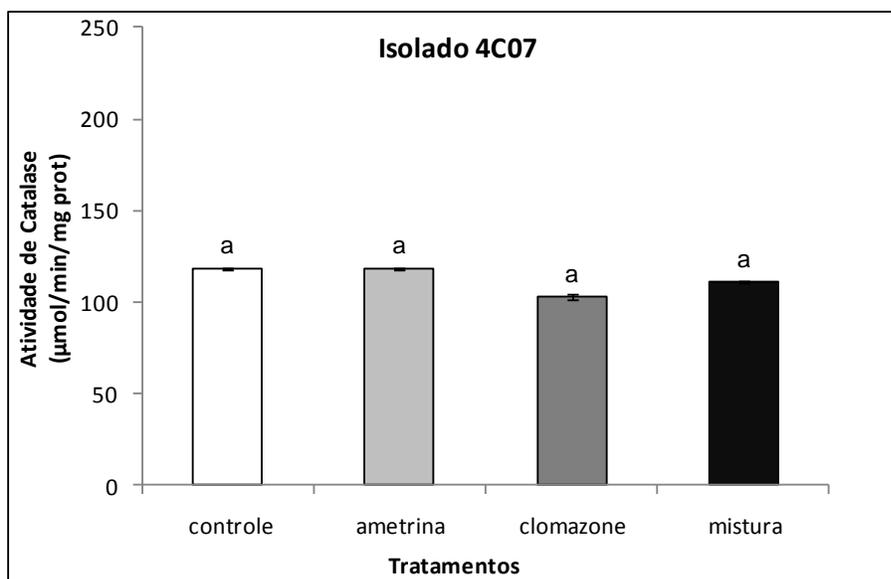


Figura 30 – Atividade de CAT ($\mu\text{mol}/\text{minuto}/\text{mg}$ de proteína) em espectrofotômetro para o isolado 4C07 submetido aos herbicidas ametrina e clomazone isoladamente e em conjunto, sendo representados os tratamentos controle 0 mM, ametrina 25 mM, clomazone 9 mM e mistura 20 mM

4.10.2 Atividade em PAGE

O perfil de isoformas de CAT no ensaio de atividade realizada em PAGE foi diferente entre as bactérias. O isolado 4C07 apresentou maior número de isoformas. Nos tratamentos controle, ametrina e clomazone esse isolado apresentou três isoformas ativas (bandas II, IV e V), sendo que a atividade da isoforma II foi induzida nos tratamentos clomazone e mistura. Já na presença dos dois herbicidas, ativou uma nova isoforma III (Figura 31). Este resultado da atividade de CAT não foi observado em espectrofotômetro, entretanto a ativação de uma nova isoforma foi necessária para manter o nível da atividade desta enzima.

Três isoformas ativas (bandas I, II, IV) de CAT foram visualizadas no isolado CC07. A isoforma I apresentou variações de intensidade na presença do herbicida ametrina e dos herbicidas ametrina + clomazone (Figura 31). Já a atividade das isoformas II e IV mostraram-se constantes em todos os tratamentos com herbicidas. Comparando-se o número de isoformas entre as duas espécies do gênero *Pseudomonas* constatou-se que as isoformas II e IV estão presentes nas duas bactérias.

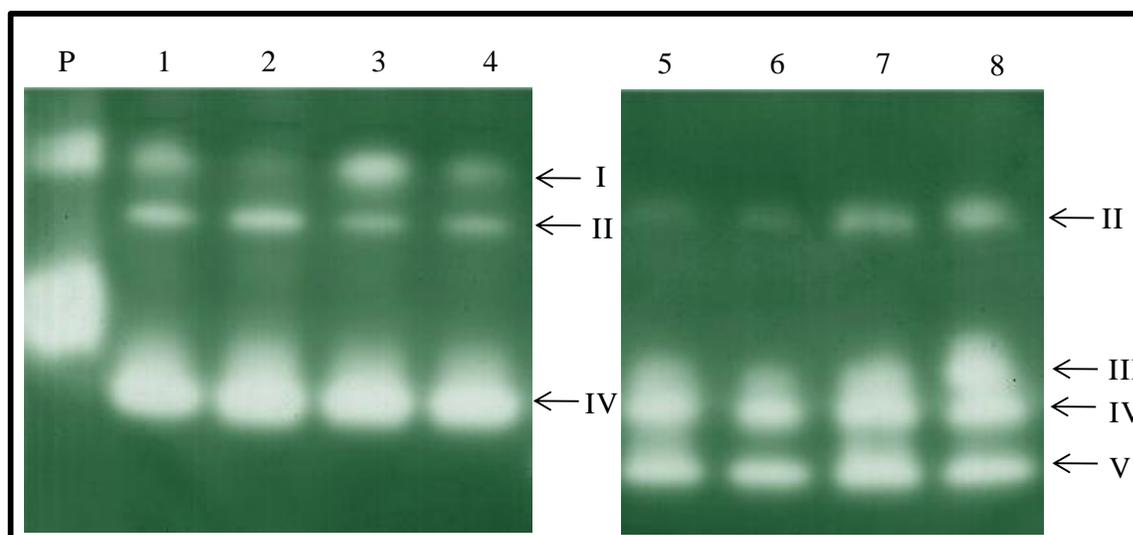


Figura 31 – Análise da atividade de CAT em PAGE, padrão (P) de CAT de fígado bovino; 1, 2, 3 e 4 representam o isolado CC07 e 5, 6, 7 e 8 representam o isolado 4C07 nos respectivos tratamentos: controle 0 mM, ametrina 25 mM, clomazone 9 mM, mistura 20 mM

4.11 Glutathione Redutase (GR)

4.11.1 Atividade em espectrofotômetro

A atividade de GR determinada nos ensaios espectrofotométricos mostrou-se variável entre as duas bactérias. Os níveis da atividade da GR em espectrofotômetro para o isolado CC07 não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controle e os tratamentos ametrina, clomazone e mistura (Figura 32). Já para o isolado 4C07 (Figura 33) verificou-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controle e o tratamento mistura.

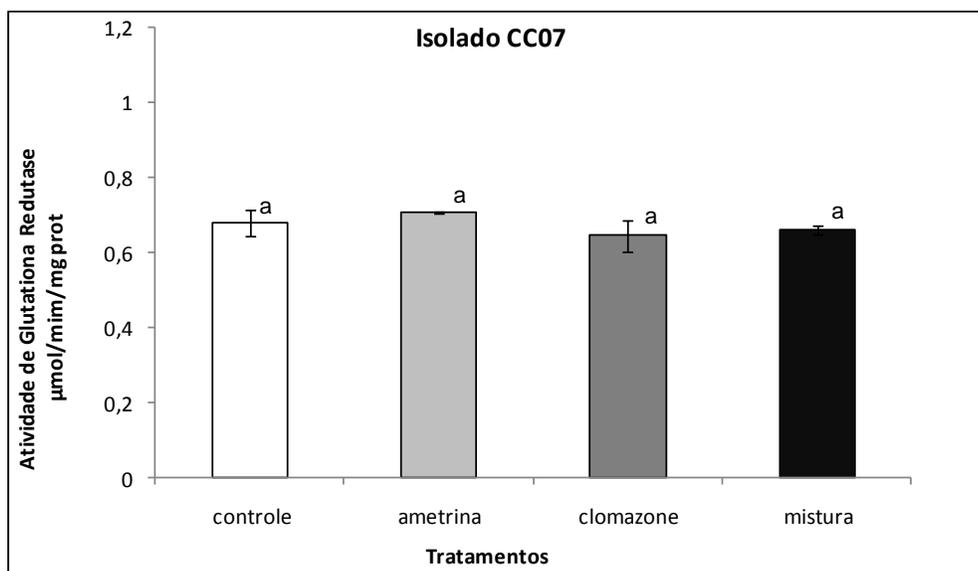


Figura 32 – Atividade de GR ($\mu\text{mol}/\text{minuto}/\text{mg}$ de proteína) para o isolado CC07 submetido aos herbicidas ametrina e clomazone isoladamente e em conjunto, sendo representados os tratamentos controle (0 mM), ametrina 25 mM, clomazone 9 mM e mistura 20 mM

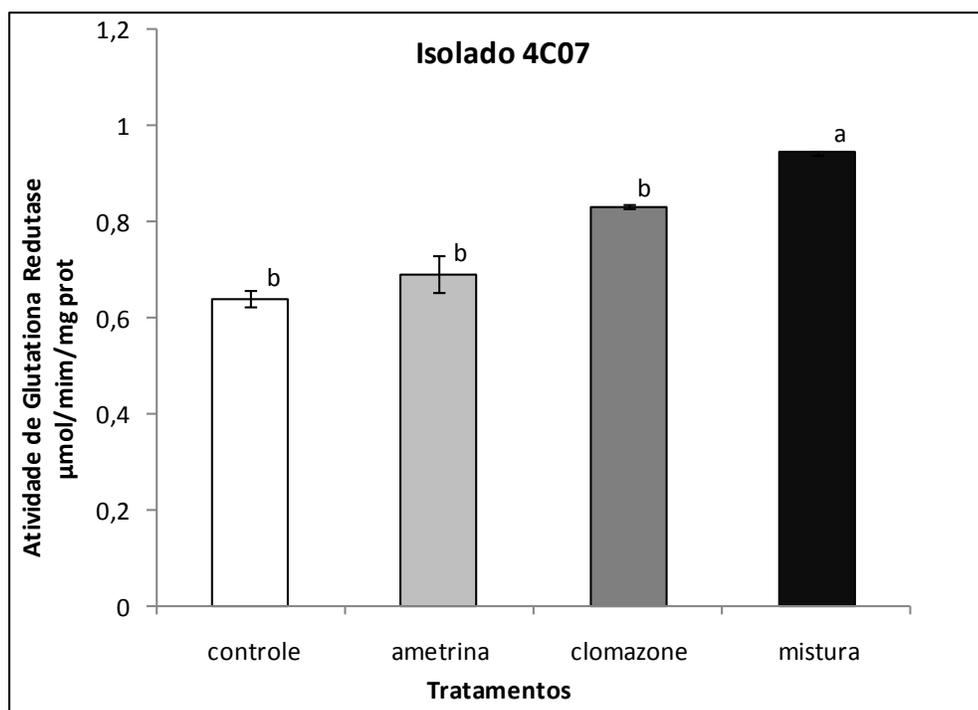


Figura 33 – Atividade de GR ($\mu\text{mol}/\text{minuto}/\text{mg}$ de proteína) para o isolado 4C07 submetido aos herbicidas ametrina e clomazone isoladamente e em conjunto, sendo representados os tratamentos controle (0 mM), ametrina 25 mM, clomazone 9 mM e mistura 20 mM

4.11.2 Atividade em PAGE

Para atividade de GR em PAGE observou-se que os dois isolados apresentaram diferentes perfis de isoformas. Na atividade de GR para o isolado CC07, foi observada a presença de seis isoformas (bandas III, VI, VII, VIII, IX e XI) (Figura 34). O padrão de atividade das isoformas apresentou-se praticamente constante entre o controle e os demais tratamentos, havendo pequenas variações na atividade da isoforma XI na presença dos herbicidas ametrina e clomazone isoladamente. Entretanto, estas pequenas variações não interferiram na atividade total de GR em espectrofotômetro, já que não apresentou diferenças de atividade entre o controle e os demais tratamentos a 5% de significância.

Para o isolado 4C07 (Figura 34) encontraram-se 5 isoformas ativas (bandas I, II, IV, V e X). Três destas isoformas (bandas IV, V e X) não exibiram alterações na intensidade em resposta aos herbicidas, ou seja, foram similares ao controle. Em contraste, a banda II exibiu aumento de intensidade para os tratamentos clomazone e mistura e banda I foi induzida na presença de clomazone e ametrina. Este aumento na atividade está de acordo com os dados encontrados para a atividade em espectrofotômetro, em que foi possível observar um aumento gradativo na atividade total de GR para os mesmos tratamentos.

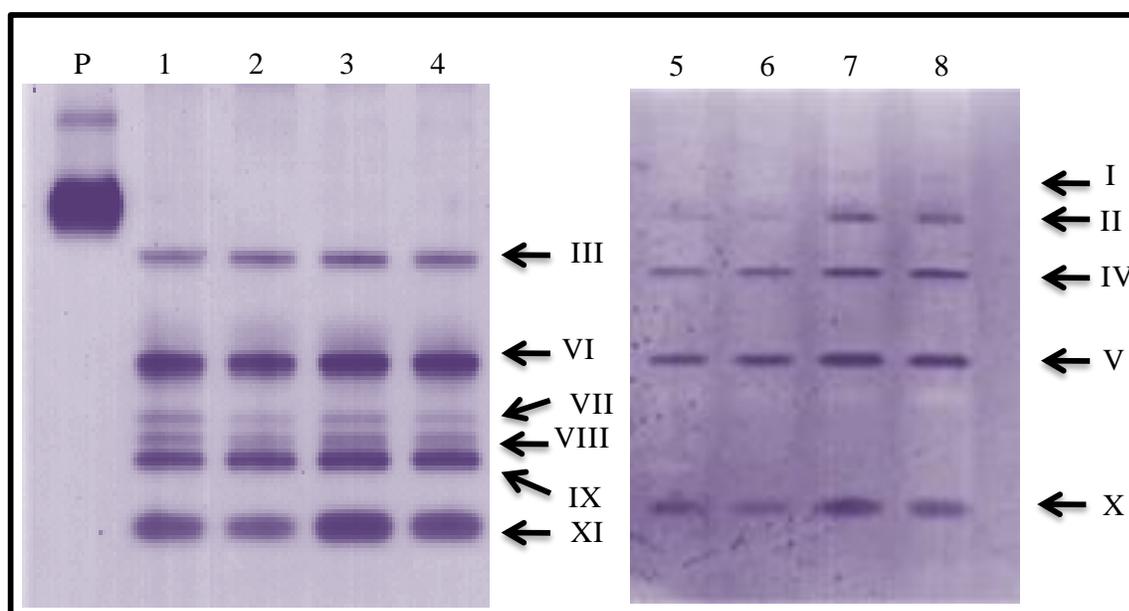


Figura 34 – Análise da atividade de GR em PAGE, padrão (P) de GR de fígado bovino; 1, 2, 3 e 4 representam o isolado CC07 e 5, 6, 7 e 8 representam o isolado 4C07 nos respectivos tratamentos: controle 0 mM, ametrina 25 mM, clomazone 9 mM, mistura 20 mM

4.12 Glutationa-S-transferase (GST)

4.12.1 Atividade em espectrofotômetro

A atividade da enzima GST em espectrofotômetro para os isolados CC07 e 4C07 apresentou respostas distintas quando foram expostos aos herbicidas isoladamente e em conjunto. A atividade de GST para a bactéria CC07 apresentou um decréscimo significativo ($p < 0,05$) nos tratamentos ametrina e clomazone, ou seja, estes herbicidas isoladamente podem ter levado a inibição desta enzima. Por outro lado, quando a bactéria foi exposta aos dois herbicidas simultaneamente ocorreu a ativação da enzima, sendo observado um acréscimo da atividade no tratamento mistura, o qual apresentou atividade semelhante ao controle (Figura 35).

Para a bactéria 4C07 observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade para os tratamentos com herbicidas em relação ao controle (Figura 36). Entretanto, houve diferenças significativas na atividade enzimática entre mistura e os tratamentos com herbicidas isoladamente. Assim, possivelmente este isolado quando exposto aos herbicidas induziu uma resposta positiva, elevando a atividade enzimática, principalmente no tratamento mistura, o qual possui a maior concentração de herbicidas.

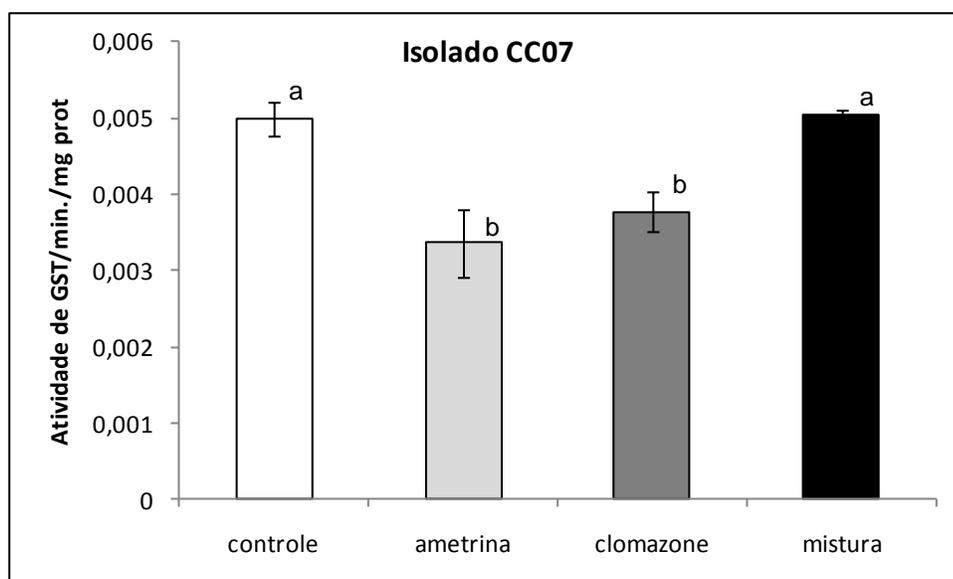


Figura 35 – Atividade de GST (Atividade de GST/min./mg de proteína) em espectrofotômetro para o isolado CC07 submetido aos herbicidas ametrina e clomazone isoladamente e em conjunto, sendo representados os tratamentos controle 0 mM, ametrina 25 mM, clomazone 9 mM e mistura 20 mM

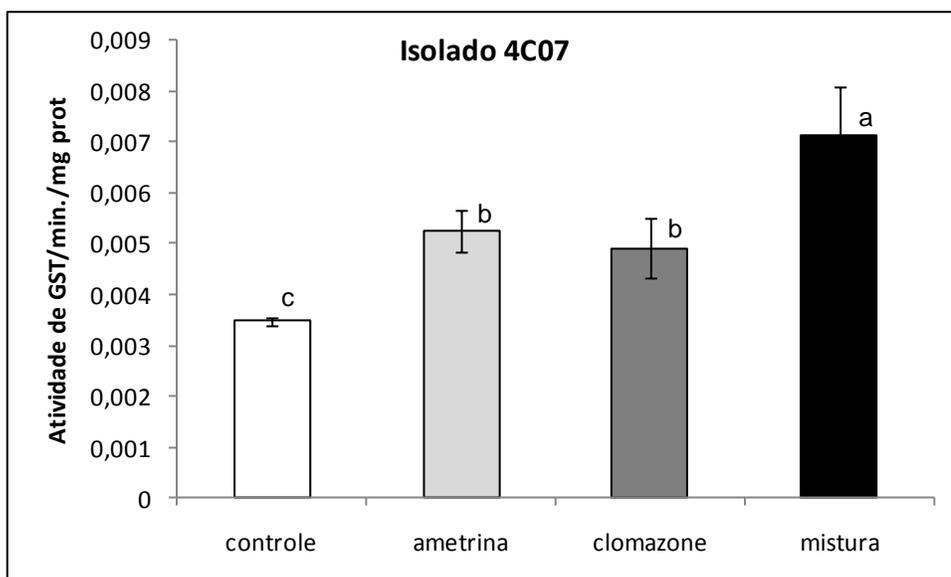


Figura 36 – Atividade de GST (Atividade de GST/min./mg de proteína) em espectrofotômetro para o isolado 4C07 submetido aos herbicidas ametrina e clomazone isoladamente e em conjunto, sendo representados os tratamentos controle 0 mM, ametrina 25 mM, clomazone 9 mM e mistura 20 mM

5 DISCUSSÃO

Os microrganismos presentes nos solos precisam se adaptar rapidamente a mudanças ambientais. Esta adaptação fisiológica e bioquímica desempenha um papel importante na sobrevivência microbiana, especialmente em condições estressantes. Portanto, muitos produtos químicos, como herbicidas, podem modular respostas fisiológicas e bioquímicas adaptativas e fazer com que alguns microrganismos se tornem mais resistentes aos ambientes contaminados (MONGKOLSUK; DUBBS; VATTANAVIBOON, 2005).

No entanto, estes microrganismos quando em contato com herbicidas ou com seus metabólitos (produtos da degradação) podem aumentar significativamente a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, conseqüentemente, podem induzir uma resposta positiva do seu sistema antioxidante. Estas alterações nos sistemas antioxidantes celulares, principalmente no sistema enzimático, são respostas importantes para adaptação ao estresse oxidativo induzido por pesticidas (BUCKOVA et al., 2010).

Neste estudo foi analisado o efeito dos herbicidas ametrina e clomazone em bactérias de solos, avaliando principalmente a resposta do sistema antioxidante bacteriano. As bactérias foram isoladas de solos agrícolas com alto e baixo declive, sendo que o histórico da área indicou o uso de cinco anos dos herbicidas ametrina e clomazone no cultivo da cultura de cana-de-açúcar. Estes herbicidas também são amplamente utilizados em outras culturas economicamente importantes como soja, milho e algodão (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005). Em plantas, a toxicidade de ametrina está relacionada com o bloqueio de elétrons pela cadeia transportadora ligando-se especificamente às proteínas D1 do fotossistema II, a qual compete com a plastoquinona e, desta forma, impede com que ocorra a fotossíntese (VIEIRA et al., 2010). Enquanto que o modo de ação do herbicida clomazone consiste em induzir a peroxidação lipídica nas células, bloqueando a síntese de carotenóides (YASUOR et al., 2008).

Muitos estudos têm demonstrado a contaminação de solos e de águas superficiais/subterrâneas por estes herbicidas (CUMMING; DOYLE; BROWN, 2002; LAABS et al., 2002; ARMAS, 2006). Além disso, ametrina e clomazone possuem toxicidade seletiva, apresentam mobilidade e potencial de bioacumulação. Contudo, a degradação destes xenobióticos é essencialmente microbiana, o que possibilita a biorremediação dos ambientes contaminados, sendo este um dos campos mais promissores da biotecnologia.

De acordo com os resultados de isolamento, foi possível observar que a declividade da área agrícola interferiu na quantidade de microrganismos, uma vez que o solo com alto declive apresentou maior número de colônias bacterianas quando comparado com o de baixo declive (Figura 10). Estes resultados podem indicar que no solo com baixo declive ocorreu maior pressão de seleção dos microrganismos devido a complexidade de misturas químicas existentes, como também a alta concentração dos xenobióticos. Provavelmente o acúmulo de pesticidas no baixo declive está relacionado ao escoamento superficial dos pesticidas no solo, pois este transporte é dependente da geografia da área, sendo que ele ocorre do solo de alto declive para o baixo (BONFLEUR, 2010). Além disso, os resultados do isolamento sugerem que os microrganismos cultiváveis que sobreviveram ao estresse gerado pelos pesticidas nos solos com alto e baixo declive apresentaram um metabolismo mais versátil e com melhor capacidade adaptativa ao estresse gerado pelos herbicidas ametrina e clomazone.

Manickam et al. (2010) encontraram resultados semelhantes quando isolaram microrganismos de solos contaminados próximos a indústrias de fabricação de pesticidas clorados. Os resultados indicaram que as comunidades bacterianas passaram por uma alta pressão de seleção devido a grande quantidade de hidrocarbonetos presente nos solos. As espécies bacterianas presentes nas amostras foram drasticamente diferentes nos locais de coleta, sendo que os solos contaminados com o inseticida endosulfan apresentaram bactérias degradantes deste pesticida, enquanto que nos solos contaminados com resíduos de HCH foram encontrados microrganismos metabolizantes deste outro xenobiótico.

Chaves (2007) estudou a diversidade microbiana em solos argilosos e arenosos na presença do herbicida ametrina. Os resultados mostraram que nos solos argilosos a comunidade microbiana passou por um rápido processo de seleção diante do estresse causado pela presença da ametrina. A pronta resposta da comunidade microbiana à presença de ametrina nos solos argilosos pode ser explicada pela sua maior biomassa microbiana e pela presença de espécies mais sensíveis aos fatores estressantes, devido a sua maior fertilidade. O autor ainda sugeriu que nos solos argilosos ocorreu a seleção natural de algumas espécies dominantes, uma vez que este solo apresenta atributos mais favoráveis ao desenvolvimento dos microrganismos, selecionando espécies mais robustas. Melo et al. (2011) estudaram o crescimento de soja em solos argilosos e arenosos na presença dos metais pesados cádmio e bário. Os autores observaram que o tipo de solo foi o que mais influenciou no crescimento das plantas e nas respostas antioxidantes, sendo o

que nos solos arenosos os efeitos dos metais sobre as plantas foram mais pronunciados devido a disponibilidade dos xenobióticos às plantas. De acordo com estes trabalhos e com os resultados de isolamento realizados nesta pesquisa fica evidente que o tipo de solo pode interferir nas comunidades microbianas, assim como no metabolismo das plantas.

Estudos demonstraram que alguns microrganismos como *Pseudomonas* spp., *Rhodococcus* spp. e *Cunninghamella* spp., presentes nos solos são capazes de metabolizar o herbicida clomazone, porém, existem microrganismos que quando expostos a este herbicida tem seu crescimento limitado ou inibido (LIU; SHOCKEN; ROSAZZA, 1996). Estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5073, SEMIA 5074, SEMIA 5079 e SEMIA 5080 foram cultivadas *in vitro* em diferentes doses do herbicida clomazone (0; 0,4; 0,8;1,6; 3,2 μ i.a. g^{-1}). Os resultados mostraram que o clomazone afetou drasticamente as estirpes de rizóbio, causando decréscimo significativo no crescimento e na sobrevivência, em função do incremento nas doses deste herbicida (ARRUDA; LOPES; MOURA, 2001).

Diversos trabalhos citam que herbicidas nos solos podem estimular o crescimento microbiano devido ao uso dos xenobióticos como fonte de nutrientes (principalmente carbono e nitrogênio) (DAS; DEBNATH; MUKHERJEE, 2003; ROS et al., 2006); porém, outras pesquisas mostram a redução na diversidade microbiana atribuída à toxicidade dos herbicidas aos microrganismos dos solos (EL FANTROUSSI et al., 1999; ARAÚJO; MONTEIRO; ABARKELI, 2003).

Outras pesquisas também relataram mudanças na comunidade bacteriana quando diferentes herbicidas foram adicionados ao solo: o dinoderb (ENGELEN et al., 1998); dinuron, dinuron + cloronuron (EL FANTROUSSI et al., 1999), atrazina (ROS et al., 2006), butachlor, glifosato, isoproturon, (LO, 2010), acetochlor e terbutilazina, (BARRIUSO; MARIN; MELLADO, 2010).

Algumas propriedades químicas das moléculas dos herbicidas como a estrutura, solubilidade em água e concentração podem interferir no crescimento bacteriano e estão relacionadas à toxicidade. As moléculas sintéticas geralmente contêm grupos funcionais e novos arranjos estruturais raramente encontrados na natureza, o que as leva a ter uma maior persistência no meio ambiente (AISLABIE; LLOYDJONES, 1995).

O clomazone é altamente solúvel em água (1100 mg/L) e possui em sua estrutura química um clorofenil e um anel isoxazolidinona (Figura 2) (TOMCO et al., 2010). Segundo Aislabie et

al. (1995) os herbicidas clorados são considerados mais tóxicos por aumentar a recalcitrância destes no ambiente. Já o herbicida ametrina apresenta um anel aromático (s-triazina), com um grupo CH_3S e baixa solubilidade em água (185 mg/L) (VIVIAN et al., 2007).

Neste estudo, com os resultados do isolamento foi possível observar que o herbicida clomazone, em relação ao ametrina, inibiu o crescimento de diversas bactérias (Figura 10). Isto pode estar associado a maior toxicidade da molécula (presença de cloro) do clomazone e de sua alta solubilidade em água, uma vez que este xenobiótico no meio de cultura teve maior contato com as células bacterianas.

Outra possível causa da agressividade do clomazone às bactérias pode ser atribuída ao seu mecanismo de ação, pois ele é inibidor da enzima deoxixilulose fosfato sintase (DXP sintase), a qual exerce função chave na biossíntese dos isoprenóides e, além disso, é necessária para formação das vitaminas B1 e B6 em procariontes. Em bactérias, os isoprenóides são importantes para a síntese de lipídios e de peptidoglicanos, assim, com a interferência na síntese destes compostos as células bacterianas sofrem danos oxidativos, podendo levar a morte celular (RODRIGUEZ-VILLALON; PEREZ-GIL; RODRIGUEZ-CONCEPCION, 2008). Matsue et al. (2010) observaram que o clomazone, assim como o seu metabólito cetoclomazone possuem atividade antibacteriana para *Escherichia coli* e *Haemophilus influenzae* por meio da inibição da enzima DXP sintase.

Santos et al. (2005) avaliaram a atividade microbiana nos solos após a aplicação do herbicida fomesafen e constataram que este xenobiótico é inibidor da atividade microbiana nos solos. Os autores sugeriram que este resultado está relacionado com o modo de ação do fomesafen, o qual consiste em inibir a enzima protoporfirinogênio oxidase (protox) (presente em microrganismos), fazendo com que haja acúmulo de protoporfirina em células tratadas com esse herbicida, ocasionando interação com o oxigênio para produção de formas reativas e, conseqüentemente, peroxidação dos lipídeos e morte celular.

Os isolados bacterianos CC07 e 4C07 selecionados para análises do sistema antioxidante foram provenientes das amostras dos solos com baixo declive, pois apresentaram rápido crescimento na presença dos herbicidas ametrina e clomazone e a formação de halo ao redor das colônias bacterianas (Figuras 11 e 12), indicando a possível degradação dos herbicidas. Resultados semelhantes foram encontrados por Martins et al. (2007) quando isolaram bactérias de solos agrícolas na presença do herbicida s-metolachlor.

As duas bactérias apresentaram genótipos divergentes, conforme os dados obtidos com a árvore filogenética, sendo que o isolado CC07 está filogeneticamente próximo à espécie *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto que o isolado 4C07 está próximo à *Pseudomonas fulva* (Figura 13).

Apesar de ser um patógeno oportunista para humanos, *P. aeruginosa*, é encontrada em muitos ambientes, principalmente nos solos e possui habilidades de se multiplicar em vários substratos, podendo degradá-los, como no caso dos herbicidas atrazina (MUTHUSELVAM; ARUNKUMAR, 2009) e isoproturon (DWIVEDI et al., 2011), além de outros pesticidas como: lindano, metilparation e carbofuran (KRISHNA; PHILIP, 2009). Esta bactéria produz diversos exo-produtos, proteases, hemolisinas, ramnolipídeos e piocinina, substâncias potencialmente citotóxicas, o que aumenta sua competitividade e sobrevivência em condições desfavoráveis ao seu crescimento (RANGEL-GARCIA et al., 2010).

Ahmed et al. (2010) relataram que a *P. fulva*, isolada de solos contaminados, com 6 horas de crescimento conseguiu degradar completamente o composto homocolina. Outra pesquisa revelou que esta espécie consegue tolerar altas concentrações de mercúrio (ADENIJI, 2004).

Assim, diversos estudos têm mostrado que vários membros do gênero *Pseudomonas* possuem o metabolismo versátil e com capacidade de degradar muitos herbicidas (ZABLOTOWICZ et al., 2001; MA et al., 2009; MORGANTE et al., 2010; CHANIKA et al., 2011; DWIVEDI et al., 2011). Karns (1999) reportou que a estirpe *Pseudomonas* sp. NRRLB-12227, por meio da enzima ácido cianúrico hidrolase, é capaz de clivar o anel aromático s-triazina do herbicida ametrina, assim como os outros herbicidas da classe s-triazinas, e utilizá-lo como fonte de nitrogênio. Matos e Thomas (1996) observaram que a *Pseudomonas fluorescens* cultivada em meio mineral degradou, em um período de 24 horas, o herbicida clomazone (concentração de 200 ppm).

De maneira geral, os herbicidas podem alterar o crescimento de bactérias degradantes ou tolerantes, podendo apresentar efeitos positivos, negativos ou nulos (TIRONI et al., 2009). O crescimento dos isolados CC07 e 4C07 apresentaram respostas semelhantes quando expostos aos herbicidas ametrina e clomazone isolados e em conjunto. O número de células bacterianas foi menor em todos os tratamentos em relação ao controle, porém, os dois isolados tiveram menor crescimento na presença de clomazone (Figuras 14 e 15). Estes resultados podem estar

relacionados com a alta solubilidade em água e a toxicidade da molécula do herbicida clomazone, bem como o seu mecanismo de ação, dados que corroboram com os resultados de isolamento.

Resultados similares foram encontrados por Lu et al. (2009) quando avaliaram o crescimento da bactéria *Stenotrophomas maltophilia* WZ2 em meio mineral na presença dos herbicidas bensulfuron-metil e quinclorac isoladamente e em conjunto. Os dados demonstraram que o crescimento bacteriano foi limitado com bensulfuron-metil, uma vez que este herbicida é considerado mais tóxico. Além disso, o crescimento de *S. maltophilia* WZ2 na mistura dos herbicidas foi intermediário ao crescimento na presença dos herbicidas isolados. Os autores sugeriram que sob esta condição a bactéria utilizou preferencialmente o herbicida quinclorac como fonte de carbono. Santos et al (2005) observou que isolados bacterianos tiveram o crescimento intermediário quando expostos à mistura dos herbicidas fluazifop-p-butil e fomesafen, sendo o fomesafen mais tóxico, onde o crescimento dos isolados foram limitado.

Esta característica do crescimento bacteriano na presença da mistura dos herbicidas também foi encontrada neste trabalho para os isolados CC07 e 4C07, uma vez que a concentração deste tratamento é muito acima das concentrações utilizadas nos outros tratamentos (ametrina 25 mM; clomazone 9 mM e mistura 20 mM de ambos herbicidas). Com este resultado sugere-se que os dois isolados bacterianos podem utilizar como fonte de nutrientes o herbicida ametrina, por um processo de cometabolismo, uma vez que foram cultivados em meio rico. Xie et al. (2011) relataram que a bactéria *Alcaligenes* sp., isolada de solos contaminados com o pesticida DDT, tem habilidades de cometabolizar este pesticida quando cultivada em meio rico, no entanto, a degradação do pesticida ocorreu somente quando as fontes de carbono do meio rico se esgotaram, significando uma adaptação “ambiental” por *Alcaligenes* sp.

Ortiz-Hernández e Sánchez-Salinas (2010) isolaram de solos agrícolas um consórcio bacteriano composto por: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Proteus vulgaris*, *Vibrio metschnikovii*, *Serratia ficaria*, *Serratia* spp. e *Yersinia enterocolitica*. O consórcio e as seis bactérias foram cultivados em meio mineral e em meio rico a fim de obter dados de degradação do pesticida tetraclorvinphos (TCV). Com base nos experimentos realizados foi observado que o consórcio bacteriano foi capaz de crescer em meio mineral, contendo como única fonte de carbono o TVC. Contudo, apenas um isolado foi capaz de remover este xenobiótico em meio mineral, enquanto que os outros isolados removeram o xenobiótico quando cresceram em meio rico.

As bactérias tolerantes ou degradantes a pesticidas, quando expostas a estes contaminantes, podem apresentar diversas respostas metabólicas a fim de manter o equilíbrio redox e a integridade celular. Estas respostas desenvolvem um papel importante para a adaptação bacteriana em ambientes contaminados, além de fazer com que as bactérias se tornem mais resistentes ao estresse oxidativo (MONGKOLSUK; DUBBS; VATTANAVIBOON, 2005).

A condição de estresse oxidativo devido ao excesso de EROs no meio intracelular pode ocasionar danos a lipídeos, DNA, RNA e proteínas, entretanto, os lipídeos são os principais alvos. Em bactérias, geralmente os radicais livres atuam diretamente nos ácidos graxos poliinsaturados da membrana plasmática, processo responsável pelo início da peroxidação lipídica. O efeito primário da peroxidação é diminuir a fluidez da membrana alterando as suas propriedades, além disso, pode ocorrer o desligamento de proteínas (CABISCOL et al., 2000).

A maioria dos ácidos graxos é degradado em uma grande variedade de produtos como aldeídos, porém, um dos mais intensivamente estudados é a produção de MDA (malonaldeído) (CABISCOL et al., 2000). Segundo Imlay (2008), a peroxidação de lipídeos é um dos melhores preditores do nível de EROs induzidas em condições de estresse e, de acordo com Shao et al. (2010) pode ser utilizada como um marcador para o estresse oxidativo.

O estresse oxidativo foi observado quando o isolado CC07 foi exposto à mistura dos herbicidas, sendo que o conteúdo de MDA dobrou em relação ao controle (Figuras 16 e 17). Este resultado sugere que a alta concentração (20 mM de ambos herbicidas) utilizada neste tratamento pode ter influenciado na ocorrência da peroxidação lipídica. Elevados níveis de MDA foram encontrados em estirpes de *Enterobacter asburiae* e *Enterobacter amnigenus* na presença da alta concentração dos herbicidas metolachlor e acetochlor, respectivamente (MARTINS et al., 2011). Isik et al. (2007) também relataram altos níveis de MDA em *Streptomyces* sp. M3004 quando expostos à H₂O₂ e ao herbicida paraquat. Os autores sugeriram que este aumento no conteúdo de MDA está relacionado com o decréscimo na atividade enzimática de SOD e CAT, sendo que estas enzimas atuam cooperativamente para proteger a membrana de EROs.

Além da maior concentração de herbicida utilizada no tratamento mistura, quando comparado com os demais tratamentos, outro fator que pode ter contribuído para a peroxidação lipídica é o efeito sinérgico dos herbicidas. Embora o mecanismo de ação de ametrina não esteja diretamente relacionado com a peroxidação lipídica, como é o caso do clomazone, ele pode levar a desestabilização dos elétrons na cadeia transportadora, aumentando a produção de EROs no

meio intracelular. Reis et al. (2008) observou que a ação sinérgica dos herbicidas ametrina e trifloxysulfuron-sodium elevou o nível de estresse de bactérias de solos, o que contribuiu para a redução da biomassa microbiana.

Todavia, para o isolado 4C07 não foram observados aumento significativo nos níveis de MDA na presença dos herbicidas isolados e em conjunto. Esse fato sugere que o isolado 4C07 pode ser menos sensível aos herbicidas e, além disso, apresentou uma resposta eficaz do sistema antioxidante para evitar os danos causados pelas EROs na membrana plasmática, indicando que o seu metabolismo é mais versátil e tolerante aos herbicidas. Martins (2007) observou que a bactéria *Klebsiella* sp. não apresentou diferenças no conteúdo de MDA quando exposta ao herbicida s-metalochlor nas concentrações de 34 mM e 340 mM. O autor sugeriu que o comportamento desta bactéria diante do herbicida está relacionado com o seu mecanismo eficiente de proteção contra as EROs.

Outra característica que pode ser encontrada em bactérias é a indução na resposta de reparo de membrana, sendo que a resposta a estresse causado por H₂O₂ 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).

A interação das EROs com as proteínas pode resultar na modificação de aminoácidos, como a oxidação dos grupos tióis de cisteína, metionina e dos anéis de histidina, tirosina, fenilalanina e triptofano, bem como alterar as cadeias laterais de outros aminoácidos. Por sua vez, estas modificações podem levar a mudanças funcionais que desequilibram o metabolismo celular (CABISCOL et al., 2000; LUSHCHAK, 2001).

A maioria dessas modificações é deletéria a célula, e podem também estar relacionada ao aumento da frequência 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 et al., 2000).

A análise do perfil protéico em gel SDS-PAGE revelou que o isolado CC07 na presença dos herbicidas apresentou apenas uma redução na concentração de proteínas devido ao decréscimo na intensidade de bandas, principalmente da banda III de 32 kDa (Figura 24). Para o isolado 4C07 foi observado que na presença do herbicida clomazone uma proteína de aproximadamente 50 KDa (banda II) desapareceu, no entanto, na presença da mistura dos

herbicidas a proteína reapareceu, porém com menor intensidade quando comparado com ametrina e o controle (Figura 24). Este resultado sugere que o herbicida clomazone pode alterar o processo da biossíntese ou de proteólise desta proteína, além de influenciar a regulação da expressão total quando em conjunto com herbicida ametrina. Isto também pode estar relacionado com comportamento fisiológico da bactéria, como por exemplo, o crescimento que foi limitado na presença de clomazone isoladamente ou em conjunto com ametrina.

Algumas proteínas importantes para a biossíntese de outras proteínas e que participam de vias metabólicas controladas por histidina fosfatase, como a ribossomal 50-S, chaperona DnaK, histidinol-fosfato, foram inibidas quando a bactéria *Burkholderia cepacia* WZ1 foi exposta a herbicida quinclorac (LI et al., 2009). Este mesmo autor observou a indução de novas proteínas para proteger as células bacterianas do estresse gerado pelo quinclorac, por exemplo, a proteína Hsp70 que auxilia no enovelamento de polipeptídeos nascentes e os transporta para o local correto para executarem suas funções biológicas e, além disso, pode atuar fornecendo proteínas danificadas ao sistema ubiquitina-proteossoma.

Uma proteína de aproximadamente 60 kDa (banda I) presente no isolado 4C07 parece ser especificamente induzida em resposta aos herbicidas ametrina e clomazone isolados e em mistura. Essa resposta pode indicar o envolvimento desta proteína para evitar os possíveis danos ocasionados pelas EROs ou também pode estar relacionada com outra via metabólica afetada pelos herbicidas, como de degradação destes compostos. Martins et al. (2011) observaram que estirpes de *Enterobacter amnigenus* quando expostas ao herbicida acetochlor induziram uma nova proteína de 57 KDa. Os autores sugeriram que esta nova proteína que respondeu especificamente ao acetochlor pode estar associada a resposta bacteriana ao estresse oxidativo causado pelo herbicida.

No entanto, para conseguir resultados mais completos se faz necessário o seqüenciamento das proteínas que apresentaram alterações na presença dos herbicidas. Assim, seria recomendável realizar a análise dos isolados, através da técnica de separação de proteínas por eletroforese 2D e, desta forma, identificar e caracterizar o papel fisiológico dessas proteínas no metabolismo celular e sua relação com o estresse.

Para manter as EROs sob níveis basais as bactérias apresentam um complexo sistema de defesa antioxidante, os quais, podem ser divididos em enzimáticos (envolvem a SOD, CAT, GR,

GST, dentre outras) e não-enzimáticos (envolvem a GSH, ácido ascórbico, NADPH e NADH) (SCANDALIOS, 2005).

Para responder o estresse oxidativo, as bactérias desenvolveram mecanismos moleculares para monitorar os níveis de substâncias oxidantes e ativar genes de defesa antioxidante. Em *E. coli*, como em outras bactérias, as variações na quantidade das EROs podem ativar os fatores transcricionais SoxS e OxyR. A resposta ao radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é controlada pelo sistema SoxRS. Entre os genes que são controlados pelo sistema SoxRS está o da enzima Mn-SOD (SOD A) (POMPOSIELLO; DEMPLE, 2001).

As SODs são um grupo de metaloenzimas que protegem as células do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e sua principal função é eliminá-los em diversos processos fisiológicos. Elas são classificadas de acordo com o metal de seu sítio ativo: manganês (Mn) ou ferro (Fe), cobre/zinco (Cu/Zn) e níquel (Ni) e sua atividade pode mudar em diversas condições de estresse, tais como: presença de herbicidas e metais pesados, poluição do ar, mudanças drásticas no pH e na temperatura (ISIK et al., 2007).

No presente estudo, os isolados apresentaram alterações significativas na atividade da SOD avaliada em espectrofotômetro (Figura 25 e 26). O isolado CC07 teve alta atividade somente no meio de cultura contendo a mistura dos herbicidas, enquanto que na presença de ametrina e clomazone o comportamento foi semelhante ao do controle. Este resultado sugere que o acréscimo observado na atividade de SOD no tratamento mistura não foi suficiente para evitar a peroxidação lipídica nas células bacterianas, uma vez que as enzimas CAT e GR não apresentaram uma resposta positiva diante aos herbicidas.

A atividade de SOD apresentou acréscimos quando o isolado 4C07 foi cultivado na presença de ametrina e clomazone isoladamente e em conjunto. Este fato evidenciou que a SOD tem um importante papel de defesa antioxidante em resposta aos herbicidas estudados. Lin et al. (2009) analisando atividade das enzimas SOD, CAT e ATPase nas bactérias *Bacillus subtilis* B19, *B. megaterium* e *E. coli* K12 em resposta ao herbicida bensulfuron-metil, observaram que a alta atividade da SOD e CAT foi primordial para a sobrevivência das células. Kang et al. (2006) estudando bactérias do gênero *Pseudomonas* degradantes de naftaleno relataram o aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$ e na atividades da enzima SOD e CAT, assim, os autores sugeriram que o estresse oxidativo gerado pelo naftaleno e a indução positiva do sistema de defesa desenvolveram funções importantes para o metabolismo deste xenobiótico. Em contraste, baixos níveis na

atividade de SOD foram observados por Martins et al. (2011) em estirpes de *Enterobacter asburiae* e *Enterobacter amnigenus* tolerantes aos herbicidas metolachlor e acetochlor, respectivamente.

Na análise da atividade de SOD em gel não denaturante pode-se observar que os isolados apresentaram duas isoformas ativas, as quais foram classificadas como Mn-SOD (bandas I e IV) para o isolado CC07 e como Cu/Zn-SOD (banda II) e Fe-SOD (III) para o isolado 4C07. De acordo com Lushchak (2001) as Fe-SOD e Mn-SOD estão presentes no citoplasma bacteriano, sendo as Mn-SOD mais sensíveis ao estresse oxidativo endógeno, porém, são responsáveis pela alta proteção contra os danos oxidativos ao DNA. Estudos com mutantes de *E. coli* revelaram que a Cu/Zn-SOD, presente no periplasma, aumentou a resistência das bactérias ao herbicida paraquat (GOULIELMOS et al., 2003). Assim, a presença de Cu/Zn-SOD no isolado 4C07, em comparação com CC07, pode ter favorecido sua resposta antioxidante ao aumento de O_2^{\bullet} gerado pela presença dos herbicidas ametrina e clomazone.

Em *Pseudomonas aeruginosa* geralmente encontram-se Mn-SOD e Fe-SOD, porém, muitos estudos demonstram que a indução destas isoformas é dependente do meio de cultura ou do ser vivo que ela tenha infectado, exemplo disto é o seu crescimento em alta concentração de ferro, condição que induz somente a isoforma Fe-SOD (BRITIGAN et al., 2001). Além disso, os mesmos autores constataram uma nova isoforma Mn-SOD em sangue de humanos infectados por esta bactéria. Parvatiyar et al. (2005) observaram que a Mn-SOD e Fe-SOD, em *Pseudomonas aeruginosa*, estavam envolvidas na defesa de grupos sulfidrilas sensíveis ao O_2^{\bullet} gerados na presença de arsenito.

As catalases bacterianas estão envolvidas na proteção de estresse oxidativo causado por H_2O_2 , via proteínas reguladas pelo gene *oxyR* (CHOI et al., 2007). A atividade específica de CAT, neste estudo, não apresentou aumento significativo para os isolados bacterianos quando expostos aos herbicidas isolados e em mistura. Este resultado está de acordo com os dados obtidos da quantificação dos níveis de H_2O_2 , sendo que não houve alteração nos tratamentos contendo os herbicidas.

A atividade de CAT em PAGE para os dois isolados apresentaram algumas alterações na intensidade das bandas, no entanto, estas mudanças não interferiram na quantificação total da atividade enzimática. O isolado CC07 apresentou três isoformas ativas (bandas I, II e IV) com pequeno decréscimo na intensidade da banda I nos tratamentos ametrina e mistura (Figura 31).

Segundo Brown et al. (1995) em *Pseudomonas aeruginosa* geralmente encontram-se três isoformas de catalase, KatA, KatB e KatE (KatC). A KatA é considerada a maior catalase, a qual é produzida em todas as fases de crescimento com aumento de sua atividade na fase estacionária. Já a KatB é produzida quando as células são expostas a agentes estressantes como altas concentrações de H₂O₂ ou do herbicida paraquat, porém, a KatE pode ser induzida por altas temperaturas (SHIN; CHOI; CHO, 2008).

O isolado 4C07 também apresentou três isoformas ativas (bandas II, IV e V), porém, na presença dos herbicidas em mistura ocorreu a indução de uma nova banda (III). Este resultado pode estar associado com a sensibilidade bacteriana na presença dos dois herbicidas, desta forma, a geração de uma nova isoforma contribuiu para manter o nível padrão da atividade de CAT (Figura 30). Martins (2007) reportou que a bactéria, identificada como não cultivada, isolada de solos agrícolas, apresentou uma nova isoforma quando exposta ao herbicida s-metalochlor na concentração de 34 mM. O autor sugeriu que a indução de uma nova isoforma está relacionada com sensibilidade bacteriana com o herbicida.

De acordo com os resultados da atividade de CAT e SOD pode-se sugerir devido ao aumento da atividade na presença dos herbicidas isolados e em mistura, que a enzima SOD desenvolveu um papel mais importante na defesa antioxidante que a catalase, principalmente para o isolado 4C07 que não apresentou peroxidação lipídica. Resultados semelhantes foram encontrados por Lu et al. (2009) quando submeteram as bactérias *Stenotrophomas maltophilia* WZ2 e *E. coli* aos herbicidas bensulfuron-metil e quinclorac isolados e em conjunto. Os dados da atividade de SOD e CAT na fase log e estacionária revelaram que para as duas bactérias a enzima SOD apresentou alta atividade na presença dos herbicidas e, conseqüentemente apresentou papel importante de defesa aos danos oxidativos comparado a CAT.

As bactérias podem apresentar 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, o metabólito GSH e a enzima GR também apresentam funções importantes neste processo.

A GSH é o tiol mais abundante presente nas células e sua principal função é manter o estado redox do citoplasma em equilíbrio, sendo esta uma condição importante para a

sobrevivência das células, além de contribuir para a adaptação aos diversos estresses. (MASIP; VEERAVALLI ; GEORGIUI, 2006; KULLISAAR et al., 2010).

No presente estudo, o isolado CC07 apresentou aumento significativo no conteúdo de GSH na presença de ametrina, no entanto, quando este isolado foi exposto ao herbicida clomazone observou-se a diminuição nos níveis deste composto (Figura 20). Assim, este fato provavelmente evidenciou que o conjunto de resposta antioxidante não foi suficiente para impedir a ocorrência de peroxidação lipídica na presença desse herbicida. Hultberg (1998) observou decréscimos na concentração de GSH quando a bactéria *Pseudomonas fluorescens* foi exposta a cádmio. O autor correlacionou estas alterações com a toxicidade do metal e sugeriu que a GSH pode ser utilizada como marcador da intensidade do estresse ambiental.

Em contraste, os níveis de GSH para o isolado 4C07 aumentaram significativamente na presença dos herbicidas (Figura 21). Este resultado sugere a participação direta da GSH na detoxificação das EROs, principalmente dos radicais O_2^{\bullet} e OH^{\bullet} e, desta forma, contribuindo para a proteção deste isolado contra o estresse oxidativo. Em bactérias gram-negativas, incluindo as *Pseudomonas*, a concentração de GSH geralmente é alta (VEREMEENKO; MAKSIMOVA, 2010) e de acordo com Smirnova e Oktyabrsky (2005) a GSH pode reagir diretamente com um “radical livre” resultando na formação de um radical tiol, GS^{\bullet} , o qual reage com outro radical GS^{\bullet} formando a GSSG. Altos níveis de GSH foram observados em bactérias *Herminiimonas arsenicoxydans* quando expostas ao semimetal arsênio. Os autores sugeriram que a GSH está associada à detoxificação das células, pois pode quelar o semimetal e removê-lo, além de proteger as células contra os danos oxidativos (CLEISS-ARNOLD et al., 2010). Em plantas, a glutathiona também apresenta papel fundamental na defesa contra estresse oxidativo, exemplo disso, são estudos realizados com *Sesbania drummondii* (ISRAR et al., 2006) e *Thlaspi caerulescens* (FREEMAN et al., 2004), as quais são consideradas bioacumuladoras de mercúrio e níquel, respectivamente. Neste trabalho os autores descreveram que os níveis de GSH aumentaram para a detoxificação das EROs.

Em muitas condições de estresse intracelular a concentração de GSSG aumenta devido a oxidação da GSH, entretanto, a alta taxa de GSH/GSSG é necessária para manter o papel da GSH como antioxidante e como agente redutor (FOYER et al., 1997), assim, a GR serve como elo fundamental entre os dois metabólitos redox para a célula (MASIP; VEERAVALLI; GEORGIUI, 2006).

Neste estudo, a atividade total de GR manteve-se inalterada para o isolado CC07 na presença dos herbicidas (Figura 32). O mesmo foi observado para a atividade em PAGE, no qual foram encontrados seis isoformas ativas (bandas II, V, VI, VII, VIII e X) (Figura 34). Estes dados sugerem que outra enzima bacteriana como a tioredoxina redutase pode estar envolvida na manutenção dos níveis de GSH/GSSG, sendo que houve variações na concentração de GSH na presença dos herbicidas. Mutantes de *E. coli* para o gene *gor* (codifica a GR) conseguiram manter as concentrações de GSH por meio da enzima tioredoxina redutase, a qual possui função análoga com a GR (TUGGLE; FUCHS, 1985).

Já o isolado 4C07 apresentou uma correlação positiva entre a atividade de GR e a concentração de GSH quando exposto aos herbicidas isolados e em mistura (Figuras 33 e 21). Veremeenko e Maksimova (2010) estudaram a resposta antioxidante em duas estirpes de *Pseudomonas aurantiaca* produtoras do antibiótico fenazina, o qual inibe o crescimento de fungos e de diversas bactérias gram-positivas e negativas. Os resultados mostraram que as bactérias iniciando a fase estacionária e na presença de altas concentrações de antibiótico, diminuíram a atividade da enzima SOD. Contudo, para evitar o estresse oxidativo, ocorreu o aumento significativo da GSH e da atividade de GR, sendo este outro mecanismo para eliminar as EROs do meio intracelular.

Neste estudo, o aumento na atividade total de GR na presença dos herbicidas está associado ao acréscimo na intensidade das isoformas II e IV. Além disso, uma nova isoforma, banda I, foi induzida na presença de clomazone e da mistura dos herbicidas (Figura 34). Estes dados sugerem que as isoformas, I, II e IV, possuem papel mais específico na resposta antioxidante, sendo este o resultado chave para a tolerância do isolado 4C07 aos herbicidas. Baseado nos dados deste trabalho é possível observar que o isolado 4C07 conseguiu evitar a peroxidação lipídica por meio do aumento da atividade de GR, que por sua vez catalisou a reação GSSG para a GSH, a qual pode reagir diretamente com as EROs.

Martins et al. (2011) reportou que quando a bactéria *Enterobacter asburiae* foi exposta ao herbicida s-metolachlor (34 mM) duas novas isoformas de GR foram induzidas em resposta ao estresse oxidativo e pode estar envolvidas na tolerância ao herbicida. Estas respostas também foram encontradas em células de plantas, mais especificamente em cultura de células de café sujeitas a estresse oxidativo induzido por metal pesado (GOMES-JUNIOR et al., 2006; GOMES-JUNIOR et al., 2007). As células foram expostas aos metais selênio, cádmio e níquel e induziram

uma nova isoforma de GR, a qual pode ser utilizada como marcador de estresse para esta espécie vegetal.

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

O isolado CC07 apresentou decréscimo significativo na atividade da GST na presença dos herbicidas ametrina e clomazone isolados, entretanto, na mistura a atividade foi semelhante ao controle (Figura 35). Em contraste, o isolado 4C07 apresentou aumento significativo na atividade de GST em todos os tratamentos contendo herbicidas (Figura 36). Este acréscimo observado na atividade de GST pode estar relacionado com o aumento da concentração de GSH e, além disso, este resultado sugere o possível envolvimento dos herbicidas ametrina e clomazone no metabolismo celular atuando na detoxificação da célula ou até mesmo contra o estresse oxidativo. Fabra et al. (1998) observaram que na bactéria *Bradyrhizobium* sp. USDA 3187 quando exposta ao pesticida mancozeb ocorreu aumento significativo nos níveis de GSH e na atividade de GST. Os autores relacionaram estes dados com a proteção contra o estresse oxidativo ocasionado pela toxicidade do pesticida. Labrou et al. (2005) demonstrou que a enzima GST está envolvida na primeira etapa da biodegradação do herbicida atrazina (pertencente ao grupo do ametrina) com a remoção do átomo de cloro a partir da conjugação atrazina-GSH.

Nesta pesquisa, foi possível observar que o isolado 4C07 apresentou indução positiva da GSH e GR como a principal resposta para evitar os danos oxidativos causados pelas EROs na membrana plasmática, apesar da SOD e GST também ter contribuído para evitar esses danos. Já o isolado CC07 apresentou somente alta atividade para enzima SOD, sendo neste caso relatada a ocorrência de peroxidação lipídica.

Desta forma, sugere-se que o isolado 4C07, por apresentar alterações positivas no seu sistema antioxidante, conseguiu se adaptar ao ambiente estressante o que proporcionou a tolerância aos herbicidas ametrina e clomazone isolados e em mistura. Portanto, pode-se indicar o isolado 4C07 para a biorremediação de ambientes contaminados pelos herbicidas analisados e que o estudo da resposta antioxidativa de organismos na presença de xenobióticos são importantes para a compreensão de mecanismos de tolerância, biodegradação bem como para a sua aplicação na biorremediação de ambientes contaminados.

6 CONCLUSÕES

1. O herbicida clomazone é mais tóxico aos microrganismos do solo nas condições deste estudo;
2. Os dois isolados do gênero *Pseudomonas* são tolerantes aos herbicidas ametrina e clomazone e apresentam respostas antioxidantes distintas;
3. O metabolismo redox da bactéria 4C07 é menos sensível aos herbicidas testados, indicando que esta bactéria pode ser utilizada para a biorremediação;
4. As enzimas SOD, GR, GST e o composto GSH para o isolado 4C07 se mostraram mais eficientes no combate ao estresse oxidativo causado pelos herbicidas.

REFERÊNCIAS

- ADENIJI, A. **Bioremediation of arsenic, chromium, lead, and mercury**. 1 ed. Ed. U.S Environmental Protection Agency: Washington, 2004. p. 43.
- AHMED, I. A. M.; ARIMA, J.; ICHIYANAGI, T.; SAKUNO, E.; MORI, N. Isolation and characterization of homocholine-degrading *Pseudomonas* sp strains A9 and B9b. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 8, p. 1455-1464, 2010.
- AISLABIE, J.; LLOYDJONES, G. A review of bacterial-degradation of pesticides. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 33, n. 6, p. 925-942, 1995.
- ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 24, p. 1337-1344, 2001.
- ALLOCATI, N.; FAVALORO, B.; MASULLI, M.; ALEXEYEV, M. F.; DI ILIO, C. *Proteus mirabilis* glutathione S-transferase B1-1 is involved in protective mechanisms against oxidative and chemical stresses. **Biochemical Journal**, London, v. 373, p. 305-311, 2003.
- ALLOCATI, N.; FEDERICI, L.; MASULLI, M.; DI ILIO, C. Glutathione transferases in bacteria. **Febs Journal**, Oxford, v. 276, n. 1, p. 58-75, 2009.
- ALSCHER, R.G.; DONAHUE, J. L.; CRAMER, C.L. In: **Responses of plant metabolism to air pollution and global change**. DE KOK, L.J. STULEN, I. (Ed). Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers, p.233-240, 1998.
- ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of mayse seedings. **Plant Physiology**, Washington, v. 109, p. 1247-1257, 1995.
- ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in Enzymology**. New York, v.113, p.548-554, 1985.
- ANDRADE, S. R. B.; SILVA, A. A.; LIMA, C. F.; D'ANTONINO, L.; QUEIROZ, M. E. L. R.; FRANÇA, A. C.; FELIPE, R. S.; VICTORIA FILHO, R. Lixiviação do ametryn em Argissolo Vermelho-Amarelo e Latossolo Vermelho-Amarelo, com diferentes valores de pH. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, p. 655-663, 2010.
- ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R.; ABARKELI, R. B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. **Chemosphere**, Oxford, v. 52, n. 5, p. 799-804, 2003.
- ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.Jr.; DIRK VAN ELSAS, J.; VUURDE VAN, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xilella fatidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, 2002.

- ARMAS, E. D. D.; MONTEIRO, R. T. R.; ANTUNES, P. M.; SANTOS, M. A. P. F. D.; CAMARGO, P. B. D.; ABAKERLI, R. B. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1119-1127, 2007.
- ARMAS, E.D. **Biogeoquímica de herbicidas utilizados em cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) na sub-bacia do rio Corumbataí**. 2006. 187 p. Tese (Doutorado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- ARRUDA, J. S.; LOPES, N. F.; MOURA, A. B. Behavior of Bradyrhizobium japonicum strains under different herbicide concentrations. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 19, n. 1, p. 111-117, 2001.
- ATLAS, R. M.; HOROWITZ, A.; KRICHEVSKY, M.; BEJ, A. K. RESPONSE OF MICROBIAL-POPULATIONS TO ENVIRONMENTAL DISTURBANCE. **Microbial Ecology**, New York, v. 22, n. 3, p. 249-256, 1991.
- AZCON, R.; PERALVAREZ, M. D.; ROLDAN, A.; BAREA, J. M. Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Bacillus cereus, and Candida parapsilosis from a Multicontaminated Soil Alleviate Metal Toxicity in Plants. **Microbial Ecology**, New York, v. 59, n. 4, p. 668-677, 2010.
- AZEVEDO, R.; CARVALHO, R.; CIA, M.; GRATÃO, P. Sugarcane Under Pressure: An Overview of Biochemical and Physiological Studies of Abiotic Stress. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 11, p. 1-10, 2011.
- AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, n. 2, p. 280–292, 1998.
- BAILIAK, M.; SEMCHYSHN, H.; LUSHCHAK, V. Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzyme activities in *Saccharomyces cerevisiae* is strain-specific **Biochemistry**, Moscow, v. 71, n. 9, p. 1013-1020, Apr. 2006.
- BARBOSA, C.A. **Os pesticidas, o homem, o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004. p. 215.
- BARRIUSO, J.; MARIN, S.; MELLADO, R. P. Effect of the herbicide glyphosate on glyphosate-tolerant maize rhizobacterial communities: a comparison with pre-emergence applied herbicide consisting of a combination of acetochlor and terbuthylazine. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 1021-1030, 2010.
- BARTH, J. A. C.; STEIDLE, D.; KUNTZ, D.; GOCHT, T.; MOUVET, C.; VON TUMPLING, W.; LOBE, I.; LANGENHOFF, A.; ALBRECHTSEN, H. J.; JANNICHE, G. S.; MORASCH, B.; HUNKELER, D.; GRATHWOHL, P. Deposition, persistence and turnover of pollutants: First results from the EU project AquaTerra for selected river basins and aquifers. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 376, n. 1-3, p. 40-50, 2007.

BARTOLI, C. G.; GOMEZ, F.; MARTINEZ, D. E.; GUIAMET, J. J. Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 403, p. 1663-1669, 2004.

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

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

BHANTI, M.; TANEJA, A. Contamination of vegetables of different seasons with organophosphorous pesticides and related health risk assessment in northern India. **Chemosphere**, Oxford, v. 69, n. 1, p. 63-68, 2007.

BHATTACHARJEE, S. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. **Current Science**, Bangalore, v. 89, n. 7, p. 1113-1121, 2005.

BHATTACHARYA, J.; GHOSHASTIDAR, K.; CHATTERJEE, A.; MAJEE, M.; MAJUMDER, A. L. Synechocystis Fe superoxide dismutase gene confers oxidative stress tolerance to *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 316, n. 2, p. 540-544, 2004.

BONFLEUR, E.J. **Comportamento da associação entre os herbicidas glifosato e atrazina em um latossolo vermelho-escuro do bioma cerrado brasileiro**. 2010. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciências. Área de concentração: Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

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

BORTOLUZZI, E. C.; RHEINHEIMER, D. D. S.; GONÇALVES, C. S.; PELLEGRINI, J. B. R.; ZANELLA, R.; COPETTI, A. C. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 4, p. 881-887, 2006.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRICEÑO, G.; PALMA, G.; DURAN, N. Influence of organic amendment on the biodegradation and movement of pesticides. Critical Reviews in **Environmental Science and Technology**, Boca Raton, v. 37, n. 3, p. 233-271, 2007.

BRITIGAN, B. E.; MILLER, R. A.; HASSETT, D. J.; PFALLER, M. A.; MCCORMICK, M. L.; RASMUSSEN, G. T. Antioxidant enzyme expression in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of an atypical form of manganese superoxide dismutase. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 12, p. 7396-7401, 2001.

- BROWN, S. M.; HOWELL, M. L.; VASIL, M. L.; ANDERSON, A. J.; HASSETT, D. J. Cloning and characterization of the katB gene of *Pseudomonas aeruginosa* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase - purification of katB, cellular-localization, and demonstration that it is essential for optimal resistance to hydrogen-peroxide. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, n. 22, p. 6536-6544, 1995.
- BUCKOVA, M.; GODOCIKOVA, J.; ZAMOCKY, M.; POLEK, B. Screening of Bacterial Isolates from Polluted Soils Exhibiting Catalase and Peroxidase Activity and Diversity of their Responses to Oxidative Stress. **Current Microbiology**, New York, v. 61, n. 4, p. 241-247, 2010.
- CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **International Microbiology**, Lleida, v. 3, p. 3-8, 2000.
- CABRERA, L.; COSTA, F. P.; PRIMEL, E. G. Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região sul do estado do RS. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 8, p. 1982-1986, 2008.
- ÇAKIR, S.; SARIKAYA, R. Genotoxicity testing of some organophosphate insecticides in the Drosophila wing spot test. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 443-450, 2005.
- CAMARGO, O.A.; MONIZ, A.C.; JORGE, J.A.; VALADARES, J.M.A.S. Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do instituto agrônomo de Campinas. **Instituto agrônomo**, Campinas, v. 106, p. 77, 2009.
- CARLOMAGNO, M.; MATHO, C.; CANTOU, G.; SANBORN, J. R.; LAST, J. A.; HAMMOCK, B. D.; ROEL, A.; GONZALEZ, D.; GONZALEZ-SAPIENZA, G. A Clomazone Immunoassay To Study the Environmental Fate of the Herbicide in Rice (*Oryza sativa*) Agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 7, p. 4367-4371, 2010.
- CARVALHO, G. **Estudo da resposta antioxidativa de linhagens bacterianas na presença do herbicida acetochlor**. 2007. 70p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- CERDEIRA, A. L.; DORNELAS-DESOUZA, M.; BOLONHEZI, D.; QUEIROZ, S. C. N.; FERRACINI, V. L.; LIGO, M. A. V.; PESSOA, M.; SMITH, S. Effects of sugar cane mechanical harvesting followed by no-tillage crop systems on leaching of triazine herbicides in Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 75, n. 4, p. 805-812, 2005.
- CHANIKA, E.; GEORGIADOU, D.; SOUEREF, E.; KARAS, P.; KARANASIOS, E.; TSIROPOULOS, N. G.; TZORTZAKAKIS, E. A.; KARPOUZAS, D. G. Isolation of soil bacteria able to hydrolyze both organophosphate and carbamate pesticides. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 3, p. 3184-3192, 2011.

- CHAVES, A.C.O. **Comportamento ambiental da ametrina e suas influências sobre a biodiversidade da comunidade microbiana dos solos**. 2007. 83 p. Dissertação (Mestrado em ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 61, n. 2, p. 192-208, 2004.
- CHEN, F.; ZENG, L.; ZHANG, Y.; LIAO, X.; GE, Y.; HU, X.; JIANG, L. Degradation behaviour of methamidophos and chlorpyrifos in apple juice treated with pulsed electric fields. **Food Chemistry**, London, v. 112, n. 4, p. 956-961, 2009.
- CHOI, Y. S.; SHIN, D. H.; CHUNG, I. Y.; KIM, S. H.; HEO, Y. J.; CHO, Y. H. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes crucial for hydrogen peroxide resistance. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 1344-1352, 2007.
- CHOW, K.; MAK, N.; WONG, M.; ZHOU, X.; LIANG, Y. Generation of reactive oxygen species and oxidative stress in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by a novel semiconductor catalyst. **Journal of Nanoparticle Research**, Berlin, v. 116-126, p. 1-11, 2010.
- CLEISS-ARNOLD, J.; KOECHLER, S.; PROUX, C.; FARDEAU, M. L.; DILLIES, M. A.; COPPEE, J. Y.; ARSENE-PLOETZE, F.; BERTIN, P. N. Temporal transcriptomic response during arsenic stress in *Herminiimonas arsenicoxydans*. **Bmc Genomics**, New York, v. 11, p. 10, 2010.
- COSTA, M. A.; MONTEIRO, R. T. R.; TORNISIELO, V. L. Influência da adição de palha de cana-deaçúcar na degradação de ¹⁴C-ametrina em solo areia quartzosa. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. 3, p. 117-122, 1997.
- CRESTANI, M.; MENEZES, C.; GLUSCZAK, L.; MIRON, D. D.; SPANEVELLO, R.; SILVEIRA, A.; GONCALVES, F. F.; ZANELLA, R.; LORO, V. L. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. **Chemosphere**, Oxford, v. 67, n. 11, p. 2305-2311, 2007.
- CROUZET, O.; BATHISSON, I.; BESSE-HOGGAN, P.; BONNEMOY, F.; BARDOT, C.; POLY, F.; BOHATIER, J.; MALLET, C. Response of soil microbial communities to the herbicide mesotrione: A dose-effect microcosm approach. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 42, n. 2, p. 193-202, 2010.
- CUMMING, J. P.; DOYLE, R. B.; BROWN, P. H. Clomazone Dissipation in four Tasmanian Topsoils. **Weed Science**, Champaign, v. 50, n. 3, p. 405-409, 2002.
- CYCÓN, M.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; KOZDRÓJ, J. Dehydrogenase activity as an indicator of different microbial responses to pesticide-treated soils. **Chemistry and Ecology**, London, v. 26, n. 4, p. 243-250, 2010.

- DABROWSKA, D.; KOT-WASIK, A.; NAMIESNIK, J. The importance of degradation in the fate of selected organic compounds in the environment. Part II. Photodegradation and biodegradation. **Polish Journal of Environmental Studies**, Olsztyn, v. 13, n. 6, p. 617-626, 2004.
- DAS, A. C.; DEBNATH, A.; MUKHERJEE, D. Effect of the herbicides oxadiazon and oxyfluorfen on phosphates solubilizing microorganisms and their persistence in rice fields. **Chemosphere**, Oxford, v. 53, n. 3, p. 217-221, 2003.
- DE SCHRIJVER, A.; DE MOT, R. Degradation of pesticides by actinomycetes. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 25, n. 2, p. 85-119, 1999.
- DE SOUZA, M. L.; SEFFERNICK, J.; MARTINEZ, B.; SADOWSKY, M. J.; WACKETT, L. P. The atrazine catabolism genes atzABC are widespread and highly conserved. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, n. 7, p. 1951-1954, 1998.
- DEMPLE, B. Redox signaling and gene control in the Escherichia coli soxRS oxidative stress regulon -- a review. **Gene**, Amsterdam, v. 179, n. 1, p. 53-57, 1996.
- DIXON, D. P.; LAPTHORN, A.; EDWARDS, R. Plant glutathione transferases. **Genome Biology**, London, v. 3, p. 1-10, 2002.
- DONALDSON, C. Feed the world. **Perspectives in Public Health**, New York, v. 130, n. 4, p. 154-155, 2010.
- DORAN, J. W.; ZEISS, M. R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 3-11, 2000.
- DUARTE, V.; LATOUR, J. M. PerR vs OhrR: selective peroxide sensing in Bacillus subtilis. **Molecular Biosystems**, Cambridge, v. 6, n. 2, p. 316-323, 2010.
- DUKAN, S.; NYSTROM, T. Oxidative stress defense and deterioration of growth-arrested Escherichia coli cells. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 274, n. 37, p. 26027-26032, 1999.
- DWIVEDI, S.; SINGH, B. R.; AL-KHEDHAIRY, A. A.; MUSARRAT, J. Biodegradation of isoproturon using a novel Pseudomonas aeruginosa strain JS-11 as a multi-functional bioinoculant of environmental significance. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 185, n. 2-3, p. 938-944, 2011.
- EDREVA, A. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. **Agriculture Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 106, n. 2-3, p. 119-133, 2005.
- EL FANTROUSSI, S.; VERSCHUERE, L.; VERSTRAETE, W.; TOP, E. M. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 3, p. 982-988, 1999.

ENGELEN, B.; MEINKEN, K.; VON WINTZINTGERODE, F.; HEUER, H.; MALKOMES, H. P.; BACKHAUS, H. Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 8, p. 2814-2821, 1998.

ERMAKOVA, I. T.; KISELEVA, N. I.; SHUSHKOVA, T.; ZHARIKOV, M.; ZHARIKOV, G. A.; LEONTIEVSKY, A. A. Bioremediation of glyphosate-contaminated soils. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 88, n. 2, p. 585-594, 2010.

FABRA, A.; ANGELINI, J.; DONOLO, A.; PERMIGIANI, M.; CASTRO, S. Biochemical alterations in *Bradyrhizobium* sp USDA 3187 induced by the fungicide Mancozeb. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, New York, v. 73, n. 3, p. 223-228, 1998.

FARR, S. B.; KOGOMA, T. Oxidative stress responses in *Escherichia-coli* and *Salmonella-typhimurium*. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 561-585, 1991.

FERRI, M. V. W.; VIDAL, R. A.; MEROTTO JR., A.; FLECK, N. G. Atividade dos herbicidas flumetsulam e trifluralin em diferentes valores de pH e densidade do solo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 11-15, 2000.

FOYER, C.H.; LOPEZ-DELGADO, H.; DAT, J.F.; SCOTT, I.M. Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. **Physiology Plant**, Berne, v. 100, p. 241-254, 1997.

FREEMAN, J. L.; PERSANS, M. W.; NIEMAN, K.; ALBRECHT, C.; PEER, W.; PICKERING, I. J.; SALT, D. E. Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. **Plant Cell**, Berlin, v. 16, n. 8, p. 2176-2191, 2004.

GARG, N.; MANCHANDA, G. ROS generation in plants: Boon or bane? **Plant Biosystems**, London, v. 143, n. 1, p. 81-96, 2009.

GASNIER, C.; BENACHOUR, N.; CLAIR, E.; TRAVERT, C.; LANGLOIS, F.; LAURANT, C.; DECROIX-LAPORTE, C.; SERALINI, G.-E. Dig1 protects against cell death provoked by glyphosate-based herbicides in human liver cell lines. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, Berlin, v. 5, n. 1, p. 29, 2010.

GAST, A.; KNUSLI, E.; GYSIN, H. UBER Pflanzenwachstumsregulatoren - chlorazin, eine phytotoxisch wirksame substanz. **Experientia**, Basel, v. 11, n. 3, p. 107-108, 1955.

GEBARA, A. B.; CISCATO, C. H. P.; FERREIRA, M. D.; MONTEIRO, S. H. Pesticide residues in vegetables and fruits monitored in São Paulo City, Brazil, 1994-2001. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 75, n. 1, p. 163-169, 2005.

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

GHODRATI, M.; JURY, W. A. A field study of the effects of soil structure and irrigation method on preferential flow of pesticides in unsaturated soil. **Journal of Contaminant Hydrology**, Amsterdam, v. 11, n. 1-2, p. 101-125, 1992.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Washington, v. 59, p. 309-314, 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GILLIOM, R.J. et al. The Quality of Our Nation's WatersdPesticides in the Nation's Streams and Ground Water, 1992 e 2001. Virginia: **Geological Survey**, 2006. p. 172.

GIORDANO, G.; AFSHARINEJAD, Z.; GUIZZETTI, M.; VITALONE, A.; KAVANAGH, T. J.; COSTA, L. G. Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 219, n. 2-3, p. 181-189, 2007.

GIRVAN, M. S.; BULLIMORE, J.; BALL, A. S.; PRETTY, J. N.; OSBORN, A. M. Responses of active bacterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 5, p. 2692-2701, 2004.

GODOCIKOVA, J.; BOHACOVA, V.; ZAMOCKY, M.; POLEK, B. Production of catalases by *Comamonas* spp. and resistance to oxidative stress. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 50, n. 2, p. 113-118, 2005.

GOMES-JUNIOR, R. A.; GRATAO, P. L.; GAZIOLA, S. A.; MAZZAFERA, P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 34, n. 5, p. 449-456, 2007.

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

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

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

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

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

GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; ANTUNES, A. M.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, R. A. Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 153, n. 3, p. 321-333, 2008.

GRENNI, P.; CARACCILO, A. B.; RODRIGUEZ-CRUZ, M. S.; SANCHEZ-MARTIN, M. J. Changes in the microbial activity in a soil amended with oak and pine residues and treated with linuron herbicide. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 2-7, 2009.

GUNASEKARA, A. S.; DELA CRUZ, I. D. P.; CURTIS, M. J.; CLAASSEN, V. P.; TJEERDEMA, R. S. The behavior of clomazone in the soil environment. **Pest Management Science**, Sussex, v. 65, n. 6, p. 711-716, 2009.

HALL, T.A.; BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, Carolina do Norte, ser. 41, p. 95-98, 1999.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, Washington, v. 141, n. 2, p. 312-322, 2006.

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

HAYES, T. B.; COLLINS, A.; LEE, M.; MENDOZA, M.; NORIEGA, N.; STUART, A. A.; VONK, A. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 8, p. 5476-5480, 2002.

HAYES, T.; HASTON, K.; TSUI, M.; HOANG, A.; HAEFFELE, C.; VONK, A. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and field evidence. **Environmental Health Perspectives**, Washington, v. 111, n. 4, p. 568-575, 2003.

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

HERI, W; PFISTER, F; CARROLL, B; PARSHLEY, T. Production, Development, and Registration of Triazine Herbicides. In: LEBARON, M.H; McFARLAND, J.E; BURNSIDE, O.C. **The triazines herbicides: 50 years revolutionizing agriculture**. San Diego: Elsevier, 2008. chap. 3, p. 31-43.

HESS, F. D. Light-dependent herbicides: an overview. **Weed Science**, Champaign, v. 48, n. 2, p. 160-170, 2000.

HISHINUMA, S.; YUKI, M.; FUJIMURA, M.; FUKUMORI, F. OxyR regulated the expression of two major catalases, KatA and KatB, along with peroxiredoxin, AhpC in *Pseudomonas putida*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 12, p. 2115-2124, 2006.

HUERTAS, I. E.; ROUCO, M.; LOPEZ-RODAS, V.; COSTAS, E. Estimating the capability of different phytoplankton groups to adapt to contamination: herbicides will affect phytoplankton species differently. **New Phytologist**, Cambridge, v. 188, n. 2, p. 478-487, 2010.

HULTBERG, M. Rhizobacterial glutathione levels as affected by starvation and cadmium exposure. **Current Microbiology**, New York, v. 37, n. 5, p. 301-305, 1998.

HUSKOVA, R.; MATISOVA, E.; KIRCHNER, M. Fast GC-MS Pesticide Multiresidue Analysis of Apples. **Chromatographia**, New York, v. 68, p. S49-S55, 2008.

HUSSAIN, S.; SIDDIQUE, T.; SALEEM, M.; ARSHAD, M.; KHALID, A.; DONALD, L. S. Chapter 5 **Impact of Pesticides on Soil Microbial Diversity, Enzymes, and Biochemical Reactions** **Advances in Agronomy**: Academic Press, 2009. p. 159-200.

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

IMLAY, J. A. How obligatory is anaerobiosis? **Molecular Microbiology**, Salem, v. 68, n. 4, p. 801-804, 2008.

ISIK, K.; KAYALI, H. A.; SAHIN, N.; GUNDOGDU, E. O.; TARHAN, L. Antioxidant response of a novel *Streptomyces* sp M3004 isolated from legume rhizosphere to H₂O₂ and paraquat. **Process Biochemistry**, London, v. 42, n. 2, p. 235-243, 2007.

ISRAR, M.; SAHI, S.; DATTA, R.; SARKAR, D. Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sebania drummondii*. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, p. 591-598, 2006.

ISRAR, M.; SAHI, S.; DATTA, R.; SARKAR, D. Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, n. 4, p. 591-598, 2006.

JACOMINI, A. E.; DE CAMARGO, P. B.; AVELAR, W. E. P.; BONATO, P. S. Determination of Ametryn in River Water, River Sediment and Bivalve Mussels by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 107-116, 2009.

JANVIER, C.; VILLENEUVE, F.; ALABOUVETTE, C.; EDEL-HERMANN, V.; MATEILLE, T.; STEINBERG, C. Soil health through soil disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators? **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 1, p. 1-23, 2007.

- JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. D. A.; QUEIROZ, S. C. D. N. D. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - Um enfoque às maçãs. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.
- JAWARD, F. M.; FARRAR, N. J.; HARNER, T.; SWEETMAN, A. J.; JONES, K. C. Passive air sampling of PCBs, PBDEs, and organochlorine pesticides across Europe. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 38, n. 1, p. 34-41, 2004.
- JIANG, L.; HUANG, J.; LIANG, L.; ZHENG, P. Y.; YANG, H. Mobility of Prometryne in Soil As Affected by Dissolved Organic Matter. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 24, p. 11933-11940, 2008.
- JIANG, L.; YANG, H. Prometryne-induced oxidative stress and impact on antioxidant enzymes in wheat. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 72, n. 6, p. 1687-1693, 2009.
- JUKES, T.H.; CANTOR, C.R. Evolution of protein molecules (In Munro HN). **Mammalian Protein Metabolism**, New York, v. 33, p. 21-132, 1969.
- JURY, W. A.; ELABD, H.; CLENDENING, L. D.; RESKETO, M. Evaluation of pesticide transport screening models under field conditions. **Acs Symposium Series**, Washington, v. 315, p. 384-395, 1986.
- KANAI, T.; TAKAHASHI, K.; INOUE, H. Three Distinct-Type Glutathione S-Transferases from *Escherichia coli* Important for Defense against Oxidative Stress. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 140, p. 703-711, 2006.
- KANG, Y. S.; KIM, Y. J.; JEON, C. O.; PARK, W. Characterization of naphthalene-degrading *Pseudomonas* species isolated from pollutant-contaminated sites: Oxidative stress during their growth on naphthalene. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 16, n. 11, p. 1819-1825, 2006.
- KANTH, B. K.; OH, T. J.; SOHNG, J. K. Identification of Two Superoxide Dismutases (FeSOD and NiSOD) from *Streptomyces peucetius* ATCC 27952. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Korea, v. 15, n. 5, p. 785-792, 2010.
- KARNS, J. S. Gene sequence and properties of an s-triazine ring-cleavage enzyme from *Pseudomonas* sp strain NRRLB-12227. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 8, p. 3512-3517, 1999.
- KIM, E. J.; KIM, H. P.; HAH, Y. C.; ROE, J. H. Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 241, n. 1, p. 178-185, 1996.
- KIRKSEY, K. B.; HAYES, R. M.; KRUEGER, W. A.; MULLINS, C. A.; MUELLER, T. C. Clomazone Dissipation in Two Tennessee Soils. **Weed Science**, Champaign, v. 44, n. 4, p. 959-963, 1996.

KNEZEVIC, Z.; SERDAR, M. Screening of fresh fruit and vegetables for pesticide residues on Croatian market. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 4, p. 419-422, 2009.

KOOKANA, R.; HOLZ, G.; BARNES, C.; BUBB, K.; FREMLIN, R.; BOARDMAN, B. Impact of climatic and soil conditions on environmental fate of atrazine used under plantation forestry in Australia. **Journal of Environmental Management**, London, v. 91, n. 12, p. 2649-2656, 2010.

KOZDRÓJ, J.; VAN ELSAS, J. D. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 43, n. 3, p. 197-212, 2001.

KRAUS, T.E., MCKERSIE, B.D., FLETCHER, R.A. Paclobutrazol induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 145, n. 4, 570-576, 1995.

KRAYL, M.; BENNDORF, D.; LOFFHAGEN, N.; BABEL, W. Use of proteomics and physiological characteristics to elucidate ecotoxic effects of methyl tert-butyl ether in *Pseudomonas putida* KT2440. **Proteomics**, Weinheim, v. 3, n. 8, p. 1544-1552, 2003.

KRISHNA, K. R.; PHILIP, L. Biodegradation of mixed pesticides by mixed pesticide enriched cultures. **Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes**, New York, v. 44, n. 1, p. 18-30, 2009.

KULLISAAR, T. Z., M.; MIKELSAAR, M.; VIHALEMM, T. Two antioxidative lactobacillus strains as promising probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 72, p. 215-224, 2002.

KULLISAAR, T.; SONGISEPP, E.; AUNAPUU, M.; KILK, K.; AREND, A.; MIKELSAAR, M.; REHEMA, A.; ZILMER, M. Complete Glutathione System in Probiotic *Lactobacillus fermentum* ME-3. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 46, n. 5, p. 481-486, 2010.

LAABS, V.; AMELUNG, W.; PINTO, A. A.; WANTZEN, M.; DA SILVA, C. J.; ZECH, W. Pesticides in surface water, sediment, and rainfall of the northeastern Pantanal basin, Brazil. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 31, n. 5, p. 1636-1648, 2002.

LABROU, N. E.; KARAVANGELI, M.; TSAFTARIS, A.; CLONIS, Y. Kinetic analysis of maize glutathione S-transferase I catalysing the detoxification from chloroacetanilide herbicides. **Planta**, Berlin, v. 222, n. 1, p. 91-97, 2005.

LAEMMLI, U. K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LI, Y. N.; WU, H. L.; QING, X. D.; LI, Q. A.; LI, S. F.; FU, H. Y.; YU, Y. J.; YU, R. Q. Quantitative analysis of triazine herbicides in environmental samples by using high performance liquid chromatography and diode array detection combined with second-order calibration based on an alternating penalty trilinear decomposition algorithm. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 678, n. 1, p. 26-33, 2010.

- LI, Z.; SHAO, T.; MIN, H.; LU, Z.; XU, X. Stress response of *Burkholderia cepacia* WZ1 exposed to quinclorac and the biodegradation of quinclorac. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 41, n. 5, p. 984-990, 2009.
- LIANG, B.; LI, R.; JIANG, D.; SUN, J. Q.; QIU, J. G.; ZHAO, Y. F.; LI, S. P.; JIANG, J. D. Hydrolytic Dechlorination of Chlorothalonil by *Ochrobactrum* sp CTN-11 Isolated from a Chlorothalonil-Contaminated Soil. **Current Microbiology**, New York, v. 61, n. 3, p. 226-233, 2010.
- LIN, X.; XU, X.; YANG, C.; ZHAO, Y.; FENG, Z.; DONG, Y. Activities of antioxidant enzymes in three bacteria exposed to bensulfuron-methyl. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 72, n. 7, p. 1899-1904, 2009.
- LIU, S. Y.; SHOCKEN, M.; ROSAZZA, J. P. N. Microbial transformations of clomazone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 1, p. 313-319, 1996.
- LO, C. C. Effect of pesticides on soil microbial community. **Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes**, New York, v. 45, n. 5, p. 348-359, 2010.
- LOCKE, M. A.; SMEDA, R. J.; HOWARD, K. D.; REDDY, K. N. Clomazone volatilization under varying environmental conditions. **Chemosphere**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 1213-1225, 1996.
- LOPEZ-PEREZ, G. C.; ARIAS-ESTEVEZ, M.; LOPEZ-PERIAGO, E.; SOTO-GONZALEZ, B.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GANDARA, J. Dynamics of pesticides in potato crops. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 5, p. 1797-1803, 2006.
- LU, Z. M.; MIN, H.; XIA, Y. The response of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Burkholderia cepacia* WZ1 to oxidative stress of exposure to quinclorac. **Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes**, New York, v. 39, n. 3, p. 431-441, 2004.
- LU, Z. M.; SANG, L. Y.; LI, Z. M.; MIN, H. Catalase and superoxide dismutase activities in a *Stenotrophomonas maltophilia* WZ2 resistant to herbicide pollution. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 72, n. 1, p. 136-143, 2009.
- LUPWAYI, N. Z.; ARSHAD, M. A.; RICE, W. A.; CLAYTON, G. W. Bacterial diversity in water-stable aggregates of soils under conventional and zero tillage management. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 16, n. 3, p. 251-261, 2001.
- LUPWAYI, N. Z.; CLAYTON, G. W.; O'DONOVAN, J. T.; HARKER, K. N.; TURKINGTON, T. K.; SOON, Y. K. Nitrogen release during decomposition of crop residues under conventional and zero tillage. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 86, n. 1, p. 11-19, 2006.
- LUSHCHAK, V. I. Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. **Biochemistry-Moscow**, Easton, v. 66, n. 5, p. 476-489, 2001.

- LYNCH, M.; KURAMITSU, H. Expression and role of superoxide dismutases (SOD) in pathogenic bacteria. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, n. 10, p. 1245-1255, 2000.
- MA, J. P.; WANG, Z.; LU, P.; WANG, H. J.; ALI, S. W.; LI, S. P.; HUANG, X. Biodegradation of the sulfonyleurea herbicide chlorimuron-ethyl by the strain *Pseudomonas* sp LW3. **Fems Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 296, n. 2, p. 203-209, 2009.
- MACLENNAN, P. A.; DELZELL, E.; SATHIAKUMAR, N.; MYERS, S. L.; CHENG, H.; GRIZZLE, W.; CHEN, V. W.; WU, X. C. Cancer incidence among triazine herbicide manufacturing workers. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, Baltimore, v. 44, n. 11, p. 1048-1058, 2002.
- MALSTROM, B., ANDREASSON, L., REINHAMMAER, B., 1975. In: Boyer, P. (Ed.), **In the Enzymes**, vol XIIB. Academic, New York, p. 533.
- MANDELBAUM, R.T; TIQVA, P; SADOWSKY, M.J; WACKETT, L.P. Microbial Degradation of s-Triazine Herbicides. In: LEBARON, M.H; McFARLAND, J.E; BURNSIDE, O.C. **The triazines herbicides: 50 years revolutionizing agriculture**. San Diego: Elsevier, 2008. chap.22, p. 231-253.
- MANICKAM, N.; PATHAK, A.; SAINI, H. S.; MAYILRAJ, S.; SHANKER, R. Metabolic profiles and phylogenetic diversity of microbial communities from chlorinated pesticides contaminated sites of different geographical habitats of India. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 109, n. 4, p. 1458-1468, 2010.
- MARCHESAN, E.; ZANELLA, R.; DE AVILA, L. A.; CAMARGO, E. R.; MACHADO, S. L. D.; MACEDO, V. R. M. Rice herbicide monitoring in two Brazilian rivers during the rice growing season. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 2, p. 131-137, 2007.
- MARTINS, P. F.; CARVALHO, G.; GRATÃO, P. L.; DOURADO, M. N.; PILEGGI, M.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, R. A. Effects of the herbicides acetochlor and metolachlor on antioxidant enzymes in soil bacteria. **Process Biochemistry**, London, v. 46, n. 5, p. 1186-1195, 2011.
- MARTINS, P. F.; MARTINEZ, C. O.; DE CARVALHO, G.; CARNEIRO, P. I. B.; AZEVEDO, R. A.; PILEGGI, S. A. V.; DE MELO, I. S.; PILEGGI, M. Selection of microorganisms degrading S-Metolachlor herbicide. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 1, p. 153-159, 2007.
- MARTINS, P.F. **Análise da resposta antioxidativa bacteriana ao herbicida s-metolachlor**. 2007. 76p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- MASIP, L.; VEERAVALLI, K.; GEORGIQUI, G. The many faces of glutathione in bacteria. **Antioxidants & Redox Signaling**, New York, v. 8, n. 5-6, p. 753-762, 2006.

MATSUE, Y.; MIZUNO, H.; TOMITA, T.; ASAMI, T.; NISHIYAMA, M.; KUZUYAMA, T. The herbicide ketoclozazole inhibits 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway and shows antibacterial activity against *Haemophilus influenzae*. **J Antibiot**, Tokyo, v. 63, n. 10, p. 583-588, 2010.

MATTOS, M. L. T.; THOMAS, R. Degradation of the herbicide clomazone by *Pseudomonas fluorescens*. In: SAND, W. (Ed.). **Biodeterioration and Biodegradation**. Weinheim: V C H Verlagsgesellschaft, 1996. p. 623-630. (Dechema Monographs).

MERVOSH, T. L.; SIMS, G. K.; STOLLER, E. W. Clomazone fate in soil as affected by microbial activity, temperature, and soil-moisture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, n. 2, p. 537-543, 1995.

MONGKOLSUK, S.; DUBBS, J.; VATTANAVIBOON, P. Chemical modulation of physiological adaptation and cross-protective responses against oxidative stress in soil bacterium and phytopathogen, *Xanthomonas*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 32, n. 11, p. 687-690, 2005.

MONQUERO, P. A.; BINHA, D. P.; AMARAL, L. R.; SILVA, P. V.; SILVA, A. C.; INACIO, E. M. Lixiviação de clomazone + ametryn, diuron + hexazinone e isoxaflutole em dois tipos de solo. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 3, p. 685-691, 2008.

MORGANTE, V.; LOPEZ-LOPEZ, A.; FLORES, C.; GONZALEZ, M.; GONZALEZ, B.; VASQUEZ, M.; ROSSELLO-MORA, R.; SEEGER, M. Bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. strain MHP41 promotes simazine attenuation and bacterial community changes in agricultural soils (vol 71, pg 114, 2009). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 72, n. 1, p. 152-152, 2010.

MUTHUSELVAM, M.; ARUNKUMAR, S. Biological Degradation of Herbicide (Atrazine) using *Pseudomonas aeruginosa* and *Trichoderma viridae*. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, New York, v. 3, n. 2, p. 661-666, 2009.

NEVADO, J. J. B.; CABANILLAS, C. G.; LLERENA, M. J. V.; ROBLEDO, V. R. Sensitive SPE GC-MS-SIM screening of endocrine-disrupting herbicides and related degradation products in natural surface waters and robustness study. **Microchemical Journal**, New York, v. 87, n. 1, p. 62-71, 2007.

NIEMI, R. M.; HEISKANEN, I.; AHTIAINEN, J. H.; RAHKONEN, A.; MANTYKOSKI, K.; WELLING, L.; LAITINEN, P.; RUUTTUNEN, P. Microbial toxicity and impacts on soil enzyme activities of pesticides used in potato cultivation. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 41, n. 3, p. 293-304, 2009.

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

OLIVEIRA, R. S.; KOSKINEN, W. C.; FERREIRA, F. A. Sorption and leaching potential of herbicides on Brazilian soils. **Weed Research**, Oxford, v. 41, n. 2, p. 97-110, 2001.

ONNEBY, K.; JONSSON, A.; STENSTROM, J. A new concept for reduction of diffuse contamination by simultaneous application of pesticide and pesticide-degrading microorganisms. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 21, n. 1, p. 21-29, 2010.

ORTELLI, D.; EDDER, P.; CORVI, C. Multiresidue analysis of 74 pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 520, n. 1-2, p. 33-45, 2004.

ORTIZ-HERNANDEZ, M. L.; SANCHEZ-SALINAS, E. Biodegradation of the organophosphate pesticide tetrachlorvinphos by bacteria isolated from agricultural soils in Mexico. **Revista Internacional de Contaminacion Ambiental**, Ciudad de Mexico, v. 26, n. 1, p. 27-38, 2010.

PAMPULHA, M. E.; FERREIRA, M.; OLIVEIRA, A. Effects of a phosphinothricin based herbicide on selected groups of soil microorganisms. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 47, n. 4, p. 325-331, 2007.

PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E.; KARPOUZAS, D. G.; PATSIAS, J.; KOTOPOULOU, A.; MILOTHRIDOU, A.; KINTZIKOGLU, K.; VLACHOU, P. The potential of pesticides to contaminate the groundwater resources of the Axios river basin in Macedonia, Northern Greece. Part I. Monitoring study in the north part of the basin. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 321, n. 1-3, p. 127-146, 2004.

PARK, S. J.; CHUNG, H. Y.; LEE, J. H. Rapid in vivo screening system for anti-oxidant activity using bacterial redox sensor strains. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, n. 4, p. 1217-1225, 2010.

PARVATIYAR, K.; ALSABBAGH, E. M.; OCHSNER, U. A.; STEGEMEYER, M. A.; SMULIAN, A. G.; HWANG, S. H.; JACKSON, C. R.; MCDERMOTT, T. R.; HASSETT, D. J. Global analysis of cellular factors and responses involved in *Pseudomonas aeruginosa* resistance to arsenite. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, n. 14, p. 4853-4864, 2005.

PENNY, C.; VUILLEUMIER, S.; BRINGEL, F. Microbial degradation of tetrachloromethane: mechanisms and perspectives for bioremediation. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 74, n. 2, p. 257-275, 2010.

PIMENTEL, D.; LEVITAN, L. Pesticides: Amounts Applied and Amounts Reaching Pests. **BioScience**, Washington, v. 36, n. 2, p. 86-91, 1986.

POMPOSIELLO, P. J.; DEMPPE, B. Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 109-114, 2001.

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 with Folding & Design**, London, v. 6, n. 11, p. 1445-1452, 1998.

- PROCÓPIO, S. O.; SANTOS, J. B.; SILVA, A. A.; PIRES, F. R.; RIBEIRO JÚNIOR, J. I.; SANTOS, E. A. Potencial de espécies vegetais para a remediação do herbicida trifloxysulfuron-sodium. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, n. 1, p. 9-16, 2005.
- RANGEL-GARCIA, M. D.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, J.; GARZA-GARCIA, Y.; MARTINEZ-HERNANDEZ, J. L. Optimization of iron ions to eliminate pyocyanine in the degradation reaction of toluene, benzene and phenol by pseudomonas aeruginosa. **Agrociencia**, Montevideo, v. 44, n. 2, p. 235-247, 2010.
- RAYMOND, J. W.; ROGERS, T. N.; SHONNARD, D. R.; KLINE, A. A. A review of structure-based biodegradation estimation methods. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 84, n. 2-3, p. 189-215, 2001.
- REIS, M. R.; SILVA, A. A.; GUIMARÃES, A. A.; COSTA, M. D.; MASSENSINI, A. M.; FERREIRA, E. A. Ação de herbicidas sobre microrganismos solubilizadores de fosfato inorgânico em solo rizosférico de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, p. 333-341, 2008.
- RIAL-OTERO, R.; ARIAS-ESTEVEZ, M.; LOPEZ-PERIAGO, E.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GANDARA, J. Variation in Concentrations of the Fungicides Tebuconazole and Dichlofluanid Following Successive Applications to Greenhouse-Grown Lettuces. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 11, p. 4471-4475, 2005.
- RIFFEL, A.; LUCAS, F.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 179, n. 4, p. 258-265, 2003.
- RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia dos herbicidas**. Londrina: instituto agrônomo do Paraná, p. 592, 2005.
- RODRIGUEZ, H.; BUSTOS-OBREGON, E. An in vitro model to evaluate the effect of an organophosphoric agropesticide on cell proliferation in mouse seminiferous tubules. **Andrologia**, Berlin, v. 32, n. 1, p. 1-5, 2000.
- RODRIGUEZ-VILLALON, A.; PEREZ-GIL, J.; RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. Carotenoid accumulation in bacteria with enhanced supply of isoprenoid precursors by upregulation of exogenous or endogenous pathways. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 135, n. 1, p. 78-84, 2008.
- ROEX, E. W. M.; KEIJZERS, R.; VAN GESTEL, C. A. M. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 64, n. 4, p. 451-460, 2003.
- ROMERO, M. J. M.; CANADA, A. T. The evaluation of *Escherichia coli* as a model for oxidant stress in mammalian hepatocytes: Role of glutathione. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 111, n. 3, p. 485-495, 1991.

ROS, M.; GOBERNA, M.; MORENO, J. L.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C.; INSAM, H.; PASCUAL, J. A. Molecular and physiological bacterial diversity of a semi-arid soil contaminated with different levels of formulated atrazine. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam v. 34, n. 2-3, p. 93-102, 2006.

ROSSOTTI, M. A.; CARLOMAGNO, M.; GONZALEZ-TECHERA, A.; HAMMOCK, B. D.; LAST, J.; GONZALEZ-SAPIENZA, G. Phage Anti-Immunocomplex Assay for Clomazone: Two-Site Recognition Increasing Assay Specificity and Facilitating Adaptation into an On-Site Format. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 82, n. 21, p. 8838-8843, 2010.

RUUS, A.; GREEN, N. W.; MAAGE, A.; AMUNDSEN, C. E.; SCHØYEN, M.; SKEI, J. Post World War II orcharding creates present day DDT-problems in The Sørfjord (Western Norway) - A case study. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 60, n. 10, p. 1856-1861, 2010.

RYAN, K. C.; JOHNSON, O. E.; CABELLI, D. E.; BRUNOLD, T. C.; MARONEY, M. J. Nickel superoxide dismutase: structural and functional roles of Cys2 and Cys6. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, Berlin, v. 15, n. 5, p. 795-807, 2010.

SANCHO, E.; CERON, J. J.; FERRANDO, M. D. Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 46, n. 1, p. 81-86, 2000.

SANTOS, F. M.; MARCHESAN, E.; MACHADO, S. L. O.; AVILA, L. A.; ZANELLA, R.; GONÇALVES, F. F. Persistência dos herbicidas imazethapyr e clomazone em lâmina de água do arroz irrigado. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 4, p. 875-881, 2008.

SANTOS, J. B.; JAKELAITIS, A.; SILVA, A. A.; VIVIAN, R.; COSTA, M. D.; SILVA, A. F. Atividade microbiana do solo após aplicação de herbicidas em sistemas de plantio direto e convencional. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, p. 683-691, 2005.

SANTOS, P. M.; BENNDORF, D.; SÁ-CORREIA, I. Insights into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol-induced stress by quantitative proteomics. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, n. 9, p. 2640-2652, 2004.

SARABIA, L.; MAURER, I.; BUSTOS-OBREGON, E. Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on the mouse testis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 72, n. 3, p. 938-942, 2009.

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

SCHWARZENBACH, R.P; GSCHWEND, P.M; IMBODEN, D.M. **Environmental Organic Chemistry**. New Jersey: Wiley-Interscience, 1995. p. 18-1328.

SCOTT, C.; PANDEY, G.; HARTLEY, C. J.; JACKSON, C. J.; CHEESMAN, M. J.; TAYLOR, M. C.; PANDEY, R.; KHURANA, J. L.; TEESE, M.; COPPIN, C. W.; WEIR, K. M.; JAIN, R. K.; LAL, R.; RUSSELL, R. J.; OAKESHOTT, J. G. The enzymatic basis for pesticide bioremediation. **Indian Journal of Microbiology**, Ranchi, v. 48, n. 1, p. 65-79, 2008.

SEFFERNICK, J. L.; WACKETT, L. P. Rapid evolution of bacterial catabolic enzymes: A case study with atrazine chlorohydrolase. **Biochemistry**, Easton, v. 40, n. 43, p. 12747-12753, 2001.

SENE, L.; CONVERTI, A.; SECCHI, G. A. R.; SIMAO, R. D. G. New Aspects on Atrazine Biodegradation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 2, p. 487-496, 2010.

SHAO, T. J.; YANG, G. Q.; WANG, M. Z.; LU, Z. M.; MIN, H.; ZHAO, L. Reduction of oxidative stress by bioaugmented strain *Pseudomonas* sp HF-1 and selection of potential biomarkers in sequencing batch reactor treating tobacco wastewater. **Ecotoxicology**, New York, v. 19, n. 6, p. 1117-1123, 2010.

SHARMA, D.; NAGPAL, A.; PAKADE, Y. B.; KATNORIA, J. K. Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: A review. **Talanta**, London, v. 82, n. 4, p. 1077-1089, 2010.

SHIN, D. H.; CHOI, Y. S.; CHO, Y. H. Unusual properties of catalase A (KatA) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 are associated with its biofilm peroxide resistance. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 190, n. 8, p. 2663-2670, 2008.

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

SILVA, M. D. S.; COCENZA, D. S.; MELO, N. F. S. D.; GRILLO, R.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 9, p. 1868-1873, 2010.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA A DEFESA AGRÍCOLA-SINDAG. <http://www.sindag.com.br/upload/compimp0105.xls>, acesso em 20 de fev. 2009.

SMIRNOVA, G. V.; OKTYABRSKY, O. N. Glutathione in bacteria. **Biochemistry-Moscow**, Moscow, v. 70, n. 11, p. 1199-1211, 2005.

STAMPER, D. M.; TUOVINEN, O. H. Biodegradation of the acetanilide herbicides alachlor, metolachlor, and propachlor. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 24, n. 1, p. 1-22, 1998.

STRONG, L. C.; ROSENDAHL, C.; JOHNSON, G.; SADOWSKY, M. J.; WACKETT, L. P. *Arthrobacter aurescens* TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 12, p. 5973-5980, 2002.

SULLIVAN, K. B.; SPENCE, K. M. Effects of sublethal concentrations of atrazine and nitrate on metamorphosis of the African clawed frog. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 22, n. 3, p. 627-635, 2003.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

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

TOLEDANO, M. B.; DELAUNAY, A.; MONCEAU, L.; TACNET, F. Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 29, n. 7, p. 351-357, 2004.

TOMCO, P. L.; HOLSTEGE, D. M.; ZOU, W.; TJEERDEMA, R. S. Microbial Degradation of Clomazone under Simulated California Rice Field Conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 6, p. 3674-3680, 2010.

TRAN, A. T. K.; HYNE, R. V.; DOBLE, P. Determination of commonly used polar herbicides in agricultural drainage waters in Australia by HPLC. **Chemosphere**, Oxford, v. 67, n. 5, p. 944-953, 2007.

TRENTACOSTE, S. V.; FRIEDMANN, A. S.; YOUKER, R. T.; BRECKENRIDGE, C. B.; ZIRKIN, B. R. Atrazine effects on testosterone levels and androgen-dependent reproductive organs in peripubertal male rats. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 22, n. 1, p. 142-148, 2001.

TUGGLE, C. K.; FUCHS, J. A. Glutathione reductase is not required for maintenance of reduced glutathione in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 162, n. 1, p. 448-450, 1985.

VAN EERD, L. L.; HOAGLAND, R. E.; ZABLOTOWICZ, R. M.; HALL, J. C. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. **Weed Science**, Champaign, v. 51, n. 4, p. 472-495, 2003.

VERCRAENE-EAIRMAL, M.; LAUGA, B.; SAINT LAURENT, S.; MAZZELLA, N.; BOUTRY, S.; SIMON, M.; KARAMA, S.; DELMAS, F.; DURAN, R. Diuron biotransformation and its effects on biofilm bacterial community structure. **Chemosphere**, Oxford, v. 81, n. 7, p. 837-843, 2010.

VEREMEENKO, E. G.; MAKSIMOVA, N. P. Activation of the Antioxidant Complex in *Pseudomonas aurantiaca*-Producer of Phenazine Antibiotics. **Microbiology**, New York, v. 79, n. 4, p. 439-444, 2010.

VERGAUWEN, B.; PAUWELS, F.; VANECHOUTTE, M.; VAN BEEUMEN, J. J. Exogenous glutathione completes the defense against oxidative stress in *Haemophilus influenzae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, n. 5, p. 1572-1581, 2003.

VIEIRA, V. C.; ALVES, P.; PICCHI, S. C.; LEMOS, M. V. F.; SENA, J. A. D. Molecular characterization of accessions of crabgrass (*Digitaria nuda*) and response to ametryn. **Acta Scientiarum-Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 255-261, 2010.

VIVIAN, R.; GUMARAES, A. A.; QUEIROZ, M.; SILVA, A. A.; REIS, M. R.; SANTOS, J. B. Adsorption-desorption of trifloxysulfuron-sodium and ametryn in Brazilian soils. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 97-109, 2007.

VLASITS, J.; JAKOPITSCH, C.; BERNROITNER, M.; ZAMOCKY, M.; FURTMULLER, P. G.; OBINGER, C. Mechanisms of catalase activity of heme peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 500, n. 1, p. 74-81, 2010.

WAGNER, E. D.; MCMILLAN, S. M.; PLEWA, M. J. Cytotoxicity of organophosphorus ester (OP) insecticides and cytotoxic synergism of 2-acetoxyacetylaminofluorene (2AAAF) in Chinese hamster ovary (CHO) cells. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 75, n. 2, p. 329-334, 2005.

WIDENFALK, A.; BERTILSSON, S.; SUNDH, I.; GOEDKOOOP, W. Effects of pesticides on community composition and activity of sediment microbes - responses at various levels of microbial community organization. **Environmental Pollution**, London, v. 152, n. 3, p. 576-584, 2008.

WILSON, C.; TISDELL, C. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 39, n. 3, p. 449-462, 2001.

WU, Q. H.; LI, Z.; WU, C. X.; WANG, C.; WANG, Z. Application of ultrasound-assisted emulsification microextraction for the determination of triazine herbicides in soil samples by high performance liquid chromatography. **Microchimica Acta**, Vienna, v. 170, n. 1-2, p. 59-65, 2010.

WUERGES, J.; LEE, J. W.; YIM, Y. I.; YIM, H. S.; KANG, S. O.; CARUGO, K. D. Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 23, p. 8569-8574, 2004.

XIE, H.; ZHU, L. S.; XU, Q. F.; WANG, J.; LIU, W.; JIANG, J. H.; MENG, Y. Isolation and degradation ability of the DDT-degrading bacterial strain KK. **Environmental Earth Sciences**, Heidelberg, v. 62, n. 1, p. 93-99, 2011.

YAMAZAKI, K.; FUJII, K.; IWASAKI, A.; TAKAGI, K.; SATSUMA, K.; HARADA, N.; UCHIMURA, T. Different substrate specificities of two triazine hydrolases (TrzNs) from *Nocardioide*s species. **Fems Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 286, n. 2, p. 171-177, 2008.

YAN, F.; YANG, W. K.; LI, X. Y.; LIN, T. T.; LUN, Y. N.; LIN, F.; LV, S. W.; YAN, G. L.; LIU, J. Q.; SHEN, J. C.; MU, Y.; LUO, G. M. A trifunctional enzyme with glutathione S-transferase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, Amsterdam, v. 1780, n. 6, p. 869-872, 2008.

YASUOR, H.; TENBROOK, P. L.; TJEERDEMA, R. S.; FISCHER, A. J. Responses to clomazone and 5-ketoclomazone by *Echinochloa phyllopogon* resistant to multiple herbicides in Californian rice fields. **Pest Management Science**, Sussex, v. 64, n. 10, p. 1031-1039, 2008.

YEH, S.-P.; SUNG, T.-G.; CHANG, C.-C.; CHENG, W.; KUO, C.-M. Effects of an organophosphorus insecticide, trichlorfon, on hematological parameters of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Aquaculture**, London, v. 243, n. 1-4, p. 383-392, 2005.

ZABLOTOWICZ, R. M.; LOCKE, M. A.; HOAGLAND, R. E.; KNIGHT, S. S.; CASH, B. Fluorescent *Pseudomonas* isolates from Mississippi Delta oxbow lakes: In vitro herbicide biotransformations. **Environmental Toxicology**, New York, v. 16, n. 1, p. 9-19, 2001.

ZABLOTOWICZ, R.M.; HOAGLAND, M.A.; HICKEY, W.J. Glutathione-S-transferase activity and metabolism of glutathione conjugates by rhizosphere bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1054-1060, 1995.

ZAMBONIN, C. G.; PALMISANO, F. Determination of triazines in soil leachates by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 874, n. 2, p. 247-255, 2000.

ZAMOCKY, M.; GODOCIKOVA, J.; KOLLER, F.; POLEK, B. Potential application of catalase-peroxidase from *Comamonas terrigena* N3H in the biodegradation of phenolic compounds. Antonie Van Leeuwenhoek International **Journal of General and Molecular Microbiology**, Berlin, v. 79, n. 2, p. 109-117, 2001.

ZENG, H. W.; CAI, Y. J.; LIAO, X. R.; QIAN, S. L.; ZHANG, F.; ZHANG, D. B. Optimization of catalase production and purification and characterization of a novel cold-adapted Cat-2 from mesophilic bacterium *Serratia marcescens* SYBC-01. **Annals of Microbiology**, Milan, v. 60, n. 4, p. 701-708, 2010.

ZHANG, C. P.; LIU, X. G.; DONG, F. S.; XU, J.; ZHENG, Y. Q.; LI, J. Soil microbial communities response to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid butyl ester. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 46, n. 2, p. 175-180, 2010.

ZHANG, H.; ZHANG, X. H.; MU, W. H.; WANG, J. X.; PAN, H. Y.; LI, Y. Biodegradation of Chlorimuron-ethyl by the Bacterium *Klebsiella jilinsis* 2N3. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides* **Food Contaminants and Agricultural Wastes**, New York, v. 45, n. 6, p. 501-507, 2010.

ZUIN, V. G.; SCHELLIN, M.; MONTERO, L.; YARIWAKE, J. H.; AUGUSTO, F.; POPP, P. Comparison of stir bar sorptive extraction and membrane-assisted solvent extraction as enrichment techniques for the determination of pesticide and benzo[a]pyrene residues in Brazilian sugarcane juice. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1114, n. 2, p. 180-187, 2006.