Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Aspectos da regulação metabólica bacteriana em resposta a herbicidas: um enfoque ao sistema antioxidante

Paula Fabiane Martins

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

Piracicaba
2012

Paula Fabiane Martins
Bióloga

Aspectos da regulação metabólica bacteriana em resposta a herbicidas: um enfoque ao sistema antioxidante

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

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

Piracicaba
2012

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

Martins, Paula Fabiane
Aspectos da regulação metabólica bacteriana em resposta a herbicidas: um enfoque ao sistema antioxidante / Paula Fabiane Martins. - - Piracicaba, 2012.
152 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Antioxidantes 2. Bactérias 3. Biodegradação ambiental 4. Herbicidas I. Título

CDD 615.95299
M386a

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

Dedico à Deus, por me permitir concluir esta etapa...

À minha família, mãe, pai e Aly, por se fazerem presente em todos os momentos, e ao Rafa, pelo amor e companheirismo

AGRADECIMENTOS

Inicialmente expresso minha gratidão ao professor e amigo Ricardo Antunes de Azevedo, o qual me acolheu em seu laboratório e possibilitou o desenvolvimento deste projeto, bem como me ofereceu sua experiência e personalidade como exemplo de caráter e profissionalismo. Não tenho melhores palavras para expressar minha gratidão.

À Salete Gaziola, a qual me ofereceu sua experiência e apoio, em todas as fases deste projeto. Você é uma das amizades que mais fazem valer a pena.

Agradeço também aos professores Marcos Pileggi, Valdemar Tornisielo, Wellington L. de Araújo e, em especial ao Michael Ibba, que além de grandes incentivadores do projeto, também me auxiliaram no desenvolvimento deste, sempre com o respaldo de amizade.

Não poderia deixar de citar os funcionários e professores do Departamento de Genética, os quais estiveram presentes em todos os momentos, facilitando em muito meu caminho.

A minha família, (Martinha, Biguá, Alysson, Edson, Sônia, Carol e Rafa) que sempre me conforta e me reenergiza, sendo o núcleo da minha formação. É esta família, formada por muitas outras pessoas, e que me ensina o valor do viver, e aos poucos se molda ao tempo de minha vivência, me deixando ver pessoas queridas partirem, e outras chegarem... Tenham meu eterno reconhecimento.

Agradeço enormemente aos meus amigos, porém me reservo o direito de não citar nomes, para que minha gratidão não seja personalizada, e principalmente pelo medo de cometer erros ao não citar alguém. Mas gostaria de deixar aqui meu eterno reconhecimento por toda a ajuda que me ofereceram em tantos momentos que precisei durante toda minha caminhada para finalização deste ciclo.

Se guardo algo realmente especial deste tempo em que pude desfrutar da companhia de todos, é que a amizade é um sentimento que me torna mais forte, isso porque minhas fraquezas são compensadas pela virtudes daqueles que me ajudam. Sem vocês não conseguiria terminar este projeto, quem sabe não pela incapacidade de cumprir, mas pela frieza e solidão que descaracterizaria meu trabalho. Saibam que vocês me fazem deslumbra com a capacidade de pessoas em sempre ajudar, sem nunca pedir algo em recompensa.

E finalmente, agradeço à ESALQ/USP, por permitir que eu faça parte da sua gloriosa história, ao CNPq, CAPES e pela concessão das bolsas, e à FAPESP pelo apoio a pesquisa, e também concessão de bolsa.

Tenham certeza de que, para mim, tudo valeu a pena!!

Com intelectualidade pura cria-se invejosos,
com o coração cria-se amigos.”

Chico Xavier

SUMÁRIO

RESUMO....13
ABSTRACT....15
1 INTRODUÇÃO....17
2 UTILIZAÇÃO DIFERENCIAL DO HERBICIDA S-METOLACHLOR COMO FONTE DE CARBONO PELA BACTÉRIA *Enterobacter asburiae* SD1....23
Resumo....27
Abstract....29
2.1 Introdução....27
2.2 Materiais e Métodos....29
2.2.1 Herbicida e metabólitos....29
2.2.2 Condições de cultivo para isolado SD1....29
2.2.3 Identificação bacteriana....30
2.2.4 Análise do crescimento bacteriano em diferentes fontes de carbono....30
2.2.5 Análise residual do herbicida s-metolachlor em meio de cultura....31
2.2.6 Métodos analíticos....31
2.2.7 Análise estatística....32
2.3 Resultados....32
2.3.1 Identificação do isolado bacteriano SD1....32
2.3.2 Crescimento bacteriano foi menor quando o isolado bacteriano foi cultivado em meio mineral....34
2.3.3 Biodegradação do herbicida s-metolachlor ocorre de maneira característica dos compostos cloroacetanilidas....36
2.3.4 Os metabólitos s-metolachlor ESA e AO não foram passiveis de detecção em nenhum dos tratamentos analisados....39
2.4 Discussão....39
Referências....45
3 REGULAÇÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES BACTERIANAS DO ISOLADO *Enterobacter asburiae* SD1 EM RESPOSTA A DIFERENTES FONTES DE CARBONO....51
Resumo....51
Abstract....53
3.1 Introdução....55
3.2 Material e Métodos....56
3.2.2 Viabilidade celular após exposição aos tratamentos....58

3.2.3 Extração e determinação de proteínas solúveis 58
3.2.4 Variações nos padrões protéicos 59
3.2.5 Quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 60
3.2.6 Quantificação do produto MDA resultante da peroxidação lipídica 60
3.2.7 Análises das enzimas antioxidantes 61
3.2.7.1 Atividade da enzima SOD 61
3.2.7.1.1 Atividade da enzima SOD em espectrofotômetro 61
3.2.7.1.2 Atividade da enzima SOD em PAGE não desnaturante 61
3.2.7.1.3 Caracterização das isoenzimas de SOD 62
3.2.7.2 Atividade da enzima CAT 62
3.2.7.2.1 Atividade da enzima CAT em espctrofotômetro 62
3.2.7.2.2 Atividade da enzima CAT em PAGE não-desnaturante 63
3.2.7.3 Atividade da enzima glutationa-redutase (GR) 63
3.2.7.3.1 Atividade da enzima GR em espectrofotômetro 63
3.2.7.3.2 Atividade da enzima GR em PAGE 63
3.2.7.4 Atividade da enzima glutationa S-transferase (GST) 64
3.3 Resultados 64
3.3.1 Queda na viabilidade celular pode indicar adaptação da bactéria a nova condição do meio 64
3.3.2 A adaptação às diferentes constituições de meio de cultura pode ser explicada por baixos níveis de estresse oxidativo 66
3.3.3 A presença do herbicida s-metolachlor no meio de cultura causa alteração na expressão de proteínas 68
3.3.4 A enzima SOD apresenta uma nova isoforma induzida somente na presença do herbicida s-metolachlor 71
3.3.4 A enzima CAT apresenta maior atividade em meio rico e com 12 h de cultivo 74
3.3.5 A enzima GR apresentou alta variabilidade, apresentando 5 isoformas presentes em todos os tratamentos 78
3.3.6 A enzima GST apresentou aumento da atividade nos tratamentos CNH e MMH após longa exposição ao herbicida s-metolachlor 80
3.4 Discussão 82
Referências 94
4 ATIVIDADE DIFERENCIAL DAS ISOFORMAS DE CATALASE E SUPERÓXIDO-DISMUTASE DE *Escherichia coli* K-12, EXPOSTA AO HERBICIDA S-METOLACHLOR 99
Resumo 99
Abstract 101
4.1 Introdução 103

4.2 Material e Métodos 105
4.2.1 Linhagens bacterianas 105
4.2.2 Experimento e condições de cultivo 106
4.2.3 Curva de crescimento e sobrevivência das células na presença do herbicida 106
4.2.4 Quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 107
4.2.5 Quantificação de MDA (malondialdeído) 107
4.2.6 Atividade de enzimas antioxidantes 107
4.2.6.1 Atividade da enzima SOD em PAGE não desnaturante 107
4.2.6.3 Atividade da enzima CAT em espectrofotômetro 108
4.3 Resultados 108
4.3.1 A taxa de crescimento bacteriano é menor na presença do herbicida s-metolachlor 108
4.3.2 A deleção dos genes *katG, katE, sodA* e *sodB* induz desequilíbrio metabólico gerando estresse oxidativo, o que pode ser potencializado pela presença do herbicida s-metolachlor 111
4.3.3 A Mn-SOD (*sodA*) é a isoforma com maior contribuição na atividade total de SOD, e tem papel fundamental na resposta ao herbicida s-metolachlor 115
4.3.4 A atividade de catalase é induzida diferencialmente entre as linhagens mutantes de *E. coli* 117
4.5 Discussão 119
Referências 123
5 PAPEL DE EF-P, POXA E YJEK NA RESPOSTA ANTIOXIDANTE DE *Escherichia coli* AO HERBICIDA PARAQUAT 127
Resumo 127
Abstract 129
5.1 Introdução 131
5.2 Material e Métodos 132
5.2.1 Linhagens bacterianas 132
5.2.2 Experimento e condições de cultivo 133
5.2.3 Curva de crescimento e sobrevivência das células na presença do herbicida 133
5.2.4 Quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 134
5.2.5 Peroxidação lipídica 134
5.2.6 Análise de expressão diferencial de genes por Northernblot 134
5.2.6.1 Extração total de RNA 135
5.2.6.2 Desenho de sondas 135
5.2.6.3 Marcação da sonda com $\gamma[^{32}P]$-ATP 136

5.2.6.4 Transferência para membrana de náilon e condições de hibridização 136
5.3 Resultados 137
5.3.1 Efeito do herbicida paraquat no crescimento e sobrevivência celular de *E.coli* 137
5.3.2 *E. coli* mutantes apresentam alta taxa de peroxidação lipídica e H_2O_2 139
5.3.3 Expressão diferencial de enzimas antioxidantes em linhagens de *E. coli* em resposta ao paraquat 141
5.4 Discussão 143
Referências 148
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 151

RESUMO

Aspectos da regulação metabólica bacteriana em resposta a herbicidas: um enfoque ao sistema antioxidante

A contaminação ambiental por pesticidas é uma preocupação cada vez mais presente, como indicam estudos que detectam frequentemente estes compostos em água e solo, e visto a importância destes, faz-se necessário a compreensão do seu impacto em organismos não alvo. Dessa forma, o estudo da resposta adaptativa bacteriana a herbicidas vem de encontro com a necessidade descrita, além de fornecer novos dados a cerca da regulação metabólica na possível biotransformação destes compostos. Neste estudo, o sistema antioxidante foi alvo de análises para a compreensão de sua participação neste processo, além de evidenciar a regulação diferencial de isoenzimas em bactéria exposta à herbicida. Para tanto, inicialmente um estudo de biodegradação apontou que o isolado bacteriano *Enterobacter asburiae* SD1 é capaz de degradar s-metolachlor em cerca de 30% com 13 h de cultivo em meio mineral, na presença de 1,25 mM do herbicida. Porém, a biodegradação também ocorreu em meio de cultura com fonte de carbono alternativa ao s-metolachlor, o que juntamente com o crescimento diferencial entre os meios, sugeriu uma resposta fisiológica adaptativa à diferentes condições nas quais o herbicida estava presente. Conhecido em estudos de resposta global a estresse, o sistema antioxidante foi avaliado na presença do herbicida e em diferentes consituições de meio de cultura, o que culminou em vias preferenciais ativadas conforme as características dos meios. Na presença de somente s-metolachlor como fonte de carbono (meio mineral), a enzima glutation S-transferase foi ativada, mostrando prioridade no reconhecimento e metabolização do s-metolachlor. Já na presença de outras fontes de carbono, além do herbicida, as vias de combate ao estresse oxidativo, representadas pelas enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutationa redutase (GR), foram ativadas primeiramente. Além disso, foi possível também avaliar a ativação diferencial das isoenzimas de CAT e SOD frente ao s-metolachlor, sendo que a isoenzima Mn-SOD merece destaque pela importância na resposta adaptativa, visto que a deleção do gene *sodA* (Mn-SOD), causou danos a membrana e desequilíbrio no trabalho cooperativo enzimático no combate às ERO's (espécies reativas de oxigênio). Finalmente, a integração dos diferentes níveis de um metabolismo na resposta do sistema antioxidante bacteriano foi mostrado através do estudo com a via de controle traducional formada pela proteína EF-P (*elongation factor P*). Esta proteína atua na fidelidade do processo de síntese de proteína, e a deleção do gene *efp* que a codifica, bem como outras proteínas envolvidas na ativação desta via, resultou no desequilíbrio celular, gerando estresse oxidativo, potencializado pela presença do herbicida paraquat. Este trabalho reúne resultados bastante relevantes para a compreensão do papel do sistema antioxidante bacteriano, em condições de estresse gerado pela presença de herbicidas, e oferece dados importantes referentes a integração e regulação de vias bioquímicas na ativação do sistema antioxidante, bem como para uma eficiente resposta adaptativa deste sistema.

Palavras-chave: Sistema antioxidante; Bactéria; Herbicida; Biodegradação

ABSTRACT

Aspects of bacterial metabolic regulation in response to herbicides: an antioxidant system approach

The environmental contamination by pesticides is an increasing concern, as frequently showed in studies with detection of these compounds in water and soil. In fact, the understanding of pesticide effect on non-target organisms is necessary given the importance of pesticide and its sustentable use. The study of bacterial adaptive response to pesticide can show how the metabolic regulation happens, as well as provide new data about biotransformation of these xenobiotics. For this propose, firstly the biodegradation analyse showed the *Enterobacter asburiae* SD1 strain has capacity to degrade the s-metolachlor herbicide in around 30% of your initial concentration (1,25 mM), in 13 h of cultivation in mineral medium. However, the degradation was also observed on the presence of alternative carbon source, what suggests, together the differential growth, the bacteria can show an adaptive response to different conditions represented by the media constitution. The antioxidant system, a global sensor to stress, was evaluated in *E. asburiae* SD1 cultivated in different media, to see what is the effect of s-metolachlor herbicide in the antioxidant response. It was possible to observe preferential pathways activated according to medium characteristics, such as the activation of glutathione S-transferase in the presence of only s-metolachlor as carbon source. This result was explained by the bacterial need to recognize and metabolize a new molecule. On the other hand, in the presence of alternative carbon source, in addition to herbicide, the pathways to combat oxidative stress, as those constituted by catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione reductase (GR), were firstly activated. Besides this, the differential activation was observed among the isoenzymes of CAT and SOD, wich special attention to Mn-SOD, which one had an important role in the adptive responde to herbicide. This affirmation was justified when de delection of *sodA* gene (Mn-SOD) induced membrane damage and disruption in the cooperative work of antioxidant enzymes in bacteria exposed to s-metolachlor. Finally, the integration of different levels of metabolism in the antioxidant response was showed through study with a pathway envolved in the translational control which has the elongation factor-P (EFP) as one important protein. This enzyme acts in the fidelity during the protein synthesis, and its absence, caused by *efp* gene delection, as well others two protein important to activate the EFP, induced the oxidative stress, increased by the paraquat herbicide. The present work collects relevant results for understanding of the role of bacterial antioxidant system in the stress condition induced by herbicide presence, and also offers important data about integration and regulation of biochemical pathway in the antioxidant system activation for an efficient adaptative response.

Keywords: Antioxidant system; Bacteria; Herbicide; Biodegradation

1 INTRODUÇÃO

"Um homem não pode fazer o certo numa área da vida, enquanto está ocupado em fazer o errado em outra. A vida é um todo indivisível." (Mahatma Gandhi)

Os pesticidas representam uma solução para o aumento da produtividade agrícola, porém seu uso contínuo, e muitas vezes irregular, levou a contaminação de alimentos e ambientes naturais com substâncias tóxicas, e de maneira geral, persistentes. Atualmente, sabe-se que a falta de especificidade destes compostos caracteriza um risco para os organismos não alvos, os quais sofrem as consequências da exposição contínua.

Para reduzir o risco de contaminação ambiental, bem como, minimizar os efeitos não desejados dos pesticidas, é essencial compreender os fatores que afetam o comportamento destes no ambiente natural, buscando conhecer os diversos fenômenos que envolvem a persistência e a toxicidade, e assim possibilitar o desenvolvimento de técnicas viáveis de descontaminação, ou mesmo manejo sustentável.

O s-metolachlor, principal herbicida alvo deste estudo, é representante da classe cloroacetanilida, e possui toxicidade alta, mobilidade e é passível de sofrer lixiviação. Este conjunto de características torna o s-metolahclor um potencial contaminante ambiental, como apontam estudos com amostras de água e solo, freqüentemente relatados, não somente no Brasil (PARAÍBA et al., 2003; LAABS et al., 2002), como também em outros países, tais como Grécia, Itália, França e Estados Unidos (KOLPIN; BARBASH; GILLIOM, 2002; KONSTANTINOU et al., 2006; VRYZAS et al., 2011). Além disso, a amplitude da contaminação ambiental por pesticidas já alcança áreas rurais e urbanas (KOLPIN et al., 2002), o que torna o cenário ainda mais preocupante.

O equilíbrio de ecossistemas se dá através da manutenção das funções desempenhadas por organismos que caracterizam nichos especiais de um conjunto de biomas. Neste caso, os microorganismos representam um fator bastante importante, pois além de ocuparem os mais diversos habitats, ainda apresentam funções metabólicas particulares, e de extrema relevância para a ciclagem de

nutrientes. Inserido neste contexto, se encontra a microbiota do solo, a qual vem sendo alvo de estudos sobre processos de metabolização, conduzidos a fim de disponibilizarem compostos, antes presentes em moléculas complexas, como pesticidas. Foi baseado nisto, que surgiu a primeira hipótese deste trabalho.

Inicialmente, este estudo avaliou a capacidade de degradação do herbicida s-metolachlor por um isolado bacteriano identificado como *Enterobacter asburiae* SD1, oriundo de solos agrícolas com histórico de uso de s-metolachlor. Esta fase do estudo visou entender como se dá a resposta adaptativa do metabolismo quando exposto a um composto (herbicida), passível de ser utilizado como fonte de carbono, ou mesmo, nutrientes.

A influência de fontes alternativas de carbono na utilização do herbicida pelo metabolismo bacteriano foi avaliada, juntamente com as análises iniciais de crescimento. Dessa forma, os primeiros resultados mostram que o isolado bacteriano SD1 consegue atingir cerca de 30% de degradação de s-metolachlor em 13 h de crescimento, uma taxa bastante significativa para uma bactéria cultivada isoladamente. Além disso, foi possível verificar diferenças no crescimento conforme a constituição dos meios de cultura, caracterizando respostas adaptativas diferenciais.

Visando equilíbrio de ecossistemas, os organismos respondem às perturbações ambientais através de mudanças metabólicas, muitas vezes dirigidas pela variabilidade genética. Considerado uma força evolutiva, o fluxo de metabólitos, juntamente com a diversidade genética, pode interferir na construção de novas vias bioquímicas, caracterizadas pela presença de enzimas, capazes agora de reconhecer novos substratos e atuar em condições antes não encontradas no ambiente.

Na busca de compreender as mudanças fisiológicas adaptativas, representadas pelo crescimento diferencial bacteriano já citado, o estudo deu continuidade caracterizando o estresse oxidativo causado pela exposição ao herbicida, e analisando as possíveis vias bioquímicas utilizadas pela bactéria para sobrevivência nos diferentes meios de cultura. Neste caso, foi possível observar vias preferênciais do sistema antioxidante ativadas conforme a característica da fonte de carbono disponível no meio. Além disso, houve a indução de uma nova isoenzima de SOD na presença do s-metolachlor ou na ausência de fonte de carbono,

resultado que deu indícios para uma possível regulação diferencial de isoenzimas em resposta a presença do contaminante s-metolachlor.

Dessa forma, o capítulo seguinte à caracterização do estresse oxidativo, procurou focar nas duas principais enzimas do sistema antioxidamte bacteriano, catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), as quais mostraram atividade diferenciada quando o isolado *E. asburiae* SD1 foi submetido ao herbicida s-metolachlor. Porém, neste ponto o estudo deu prosseguimento com a bactéria modelo *Escherichia coli* K-12, a qual tem seu metabolismo bastante estudado, o que auxiliaria na compreensão de respostas induzidas por condições novas, ainda não testadas na literatura.

Em bactérias da família *Enterobacteriaceae*, o sistema antioxidante é organizado em duas respostas distintas, sendo caracterizadas pelo agente indutor. Primeiramente, a bactéria *E. coli* apresenta o locus genético sosR (*superoxide response*) regulando positivamente cerca de 40 proteínas, as quais são induzidas pela presença do anion superóxido, a nível transcricional (LUSHCHAK, 2011).

A regulação dos níveis de superóxido intracelular é realizado pela enzima SOD, que em *E. coli*, pode ser encontrada na forma de 3 isoenzimas, diferenciadas pelo cofator e localização celular. Além da Mn-SOD, codificada pelo gene *sodA* e sob controle de SoxR, esta bactéria também apresenta a outras duas isoenzimas: i) a Fe-SOD, também citosólica, codificada pelo gene *sodB* e possivelmente controlada pela proteína fur (*Ferric Uptake Regulator*), e a Cu/Zn-SOD, expressa pelo gene *sodC*, que apresenta atividade no periplasma na células.

Esta última isoforma de SOD (Cu/Zn), muitas vezes não é encontrada em microorganismos cultivados em laboratório, porque é responsável pela defesa de superóxido de origem exógena, situação geralmente encontrada em microorganismos patogênicos (KEITH; VALVANO, 2007). Foi baseado nesta justificativa, aliada a presença de somente Mn-SOD e Fe-SOD no isolado bacteriano *E. asburiae* SD1, que o estudo do papel diferencial das isoenzimas de SOD na resposta bacteriana ao s-metolachlor utilizou mutações simples somente dos genes *sodA* e *sodB*.

Por outro lado, a segunda resposta adaptativa do sistema antioxidante de *E. coli*, é ativada na presença do H_2O_2, é controlada pelo fator transcricional OxyR. Este por sua vez ativa proteínas relaciondas as mais diversas funções como defesa ao estresse (HPII), manutenção da homestotase redox (glutationa-redutase) e

proteção ao DNA (Dps: *DNA-binding protein*). Neste caso, a concentração de H_2O_2 é controlada através da atividade de peroxidases, que em *E. coli* são encontradas em dois grupos, sendo as catalases-peroxidases, compostas pelas hidroperoxidases (HP) e as peroxidases, as quais são dependentes de um cofator para degradação do peróxido de hidrogênio, representadas pela alquil-peroxidase (AhpC).

A HPI, codificada pelo gene *katG*, é expressa sob condições aeróbicas e anaeróbicas, está sob regulação do fator transcricional OxyR e sua síntese é induzida quando as células são expostas a concentrações subletais de peróxido hidrogênio (TRIGGS-RAINE et al., 1988). Já a HPII apresenta maior atividade durante a fase estacionária e em culturas aeróbicas (LOEWEN et al., 1996), pois seu controle é realizado pelo fator sigma *rpoS* (IVANOVA et al., 1994). Sendo assim, as mutações utilizadas em *E. coli* K-12 para estudo da atividade de CAT foram deleções simples nos genes *katG* (HPI) e *katE* (HPII).

Neste ponto do trabalho, a hipótese do papel diferencial das isoenzimas foi corroborado com resultados que apontam a importância das isoenzimas HPII e, principalmente, Mn-SOD para a manutenção de níveis de ERO's (espécies reativas de oxigênio) não tóxicos a célula. Estes resultados mostraram o trabalho cooperativo das enzimas, no qual as especificidades e particularidades de cada isoenzima constituem uma rede de resposta global, a qual apresenta uma diversidade de vias responsivas que podem se adaptar ao tipo de estresse gerado peo s-metolachlor.

Entretanto, muitos processos biológicos podem ser afetados pelo estresse oxidativo por diferentes caminhos, sendo uma delas através de alterações na regulação traducional (VEAL; DAY, 2011; GRANT, 2011). As ERO's podem apresentar função na sinalização celular, porém também podem causar danos celulares, como o comprometimento da ativação da desacilação da metionina, desencadeando mudanças programadas na fidelidade do tRNA, ainda na fase inicial do processo traducional (NETZER et al., 2009).

A eficiência e controle da síntese proteica são reconhecidamente de grande importância para a manutenção das funções celulares, bem como para a resposta adaptativa às mudanças impostas pelo ambiente. Neste processo, o fator de elongação-P (EFP) apresenta relevante papel, pois estimula a atividade peptiltransferase do complexo de iniciação 70S.

Considerando a importância da regulação de processos celulares para uma eficiente resposta antioxidante bacteriana, seja esta regulação a nível transcricional

ou traducional, o último capítulo do presente trabalho visou compreender a relevância do sistema antioxidante na via PYE de controle pós-transcricional para ativação do EF-P. Para isso, foram utilizadas três linhagens de *Escherichia coli* provindas da "KEIO Knockout Collection", as quais apresentam deleção dos genes *efp*, *poxA* e *yjeK*, genes estes que codificam enzimas chaves para a ativação EF-P. Através de ensaios bioquímicos, foi possível caracterizar níveis diferenciais de estresse oxidativo entre as linhagens, bem como a expressão diferencial de genes de enzimas antioxidantes, o que evidenciou o papel fundamental de EF-P na manutenção do estado redox da célula.

Finalmente, o conjunto de dados reunidos neste trabalho possibilita o melhor entendimento da complexidade que envolve a regulação do sistema antioxidante bacteriano, principalmente frente a fatores como disponibilidade de nutrientes e poluentes ambientais, como herbicidas.

A importância do sistema antioxidante na manutenção da homeostase celular, bem como, das funções biológicas de uma célula fica claro a partir de resultados que enfatizam a integralização de vias bioquímicas na resposta adaptativa ao herbicida.

O conjunto de dados indica que mais estudos são necessários para a visualização da resposta global do sistema antioxidante, talvez sob aspectos moleculares ou mesmo, bioquímicos, principalmente quando abordagens ambientais são consideradas. Além disso, o presente trabalho abre portas para a aplicação de alguns resultados em estudos sobre tolerância a herbicidas, principalmente quanto a ativação preferencial de isoenzimas que podem ser melhor estudadas quanto ao seu papel em plantas transformadas com genes de microorganismos e que adquirem tolerância a xenobióticos.

Referências

GRANT, C.M. Regulation of translation by hydrogen peroxide. **Antioxidants & Redox Signaling**, New Rochelle, v. 15, p. 191-203, 2011.

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

IVANOVA, A.; MILLER, C.; GLINSKY, G.; ELSENSTARK, A. Role of *rpoS* (*katF*) in *oxyR*-independent regulation of hidroperoxidase I in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, Salem, v.12, p.571-578, 1994.

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

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

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

LAABS, V.; AMELUNG, W.; PINTO, A.; ZECH, W. Fate of pesticides in tropical soils of Brazil under field conditions. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 31, p. 256-268, 2002.

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

LUSHCHAK, V.I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, Oxford, v. 153, p. 175-190, 2011.

NETZER, N., GOODENBOUR, J.M.; DAVID, A.; DITTMAR, K.A.; JONES, R.B.; SCHNEIDER, J.R.; BOONE, D.; EVES, E.M.; ROSNER, M;R.; GIBBS, J.S.; EMBRY, A.; DOLAN, B.; DAS, S.; HICKMAN, H.D.; BERGLUND, P.; BENNINK, J.R.; YEWDELL, J.W.; PAN, T. Innate immune and chemically triggered oxidative stress modifies translational fidelity. **Nature**, London, v. 462, p. 522-526, 2009.

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

TRIGGS-RAINE, B.; DOBLE, B.W.; MULVEY, M.R.; SORBY, P.A.; LOEWEN, P.C. Nucleotide sequence of *katG*, encoding catalase HPI of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, 4415-4419, 1988.

VEAL, E.; DAY, A. Hydrogen peroxide as a signaling molecule. **Antioxidants & Redox Signaling**, New Rochelle, v. 15, p. 147-151, 2011.

VRYZAS, Z.; ALEXOUDIS, C.; VASSILIOU, G.; GALANIS, K.; PAPADOPOULO-MOURKIDOU, E. Determination and aquatic risk assessment of pesticide residues in riparian drainage canals in northeastern Greece. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 74, p. 174-181, 2011.

2 UTILIZAÇÃO DIFERENCIAL DO HERBICIDA S-METOLACHLOR COMO FONTE DE CARBONO PELA BACTÉRIA *Enterobacter asburiae* SD1

Resumo

Em ambientes naturais, os microorganismos desempenham importante papel na degradação de contaminantes, função relacionada à resposta adaptativa desencadeada pelo metabolismo do organismo exposto ao xenobiótico. A adaptação à nova condição imposta pelo agente estressante, muitas vezes inibe funções metabólicas para indução de vias de reconhecimento e catálise do novo composto. O herbicida s-metolachlor, encontrado em amostras de água e solo, apresenta potencial de contaminação visto a estabilidade da molécula, além se ser considerado altamente tóxico para o ambiente. No presente estudo, o isolado bacteriano *Enterobacter asburiae* SD1, oriundo de solos contaminado por este herbicida, foi cultivado em meios de cultura rico (CNH), e mineral (MMH), sendo este também avaliado com a adição de 10% de dextrose (MMDH), na presença de 1,25 mM de s-metolachlor, visando a análise da capacidade de catabolizar o herbicida, mesmo na presença de fontes de carbono alternativas ao s-metolachlor. Foi possível observar através de análise residual do meio de cultura, que o isolado SD1 apresentou capacidade de degradação de cerca de 30% em 13 h de cultivo na presença do s-metolachlor, porém sem a capacidade de transformação total nas condições analisadas. Além disso, como encontrado em outros estudos, a degradação do herbicida foi observada tanto na presença de somente o s-metolachlor como fonte de carbono, como também na presença de fontes alternativas, como dextrose. A análise de crescimento mostrou uma fase de adaptação, a qual variou de duração conforme a constituição do meio de cultura, e até mesmo a queda da absorbância inicial, como provável estratégia de sobrevivência na presença do herbicida, visando a manutenção da viabilidade celular. Os dados do presente trabalho indicam que isolado bacteriano SD1 pode degradar o herbicida s-metolachlor, e mesmo com a transformação parcial, o s-metolachlor mostrou ser suficiente para manter o crescimento deste microorganismo através do fornecimento de carbono.

Palavras-chave: S-metolachlor; Fonte de carbono; Bactéria; Biodegradação

2 DIFFERENTIAL UTILIZATION OF S-MTOLACHLOR HERBICIDA BY STRAIN *Enterobacter asburiae* SD1, ISOLATED FROM CONTAMINATED SOIL

Abstract

In natural environment, microorganisms have an important role in the contaminant degradation, which is related to an adaptive response trigged by the metabolism of the organism exposed to xenobiotics. The adaptation to a new condition imposed by the stressor sometimes can inhibit growth functions to induce the pathways of compound recognition and degradation. The s-metolachlor herbicide is found in water and soil samples, and shows a potential of contamination because of its molecule stability and high toxicity. In the present study, the degradation capacity of bacterium strain *Enterobacter asburiae* SD1 to degrade s-metolachlor was analyzed in rich (CNH) and mineral media (MMH), which one also has an addition of 10% dextrose (MMDH), in the presence of 1,25 mM herbicide. The residual analyze in the media showed that the strain SD1 had removed around 30% of herbicide in 13 h of cultivation. However, the bacterium did not show total herbicide transformation in the conditions tested. As seen in other studies, the s-metolachlor degradation can be also observed in the presence of alternative carbon sources, such as dextrose. On the other hand, the bacterial growth in the presence of s-metolachlor showed an adaptation phase and a decrease in the absorbance in the initial growth, which one ranged according to medium composition. These data can indicate a survival strategy related to maintenance of cell viability when the bacterium was exposed to s-metolachlor. Finally, this work showed that the strain SD1 can degrade the s-metolachlor, and the herbicide can support the bacterial growth even with the partial degradation.

Keywords: S-metolachlor; Carbon source; Bacteria; Biodegradation

2.1 Introdução

S-metolachlor é um herbicida da classe cloroacetanilida, pré-emergente, utilizado no controle de daninhas de diversas culturas, entre elas soja, milho e cana-de-açúcar (STENERSEN, 2004). Sua fórmula apresenta uma estrutura cíclica e um átomo de cloro, característicos de sua toxicidade, como indicam estudos que relatam a relação do herbicida s-metolachlor com a incidência de câncer em humanos (ALAVANJAet al., 2004; RUSIECKY et al., 2006).

O uso sistemático e contínuo de herbicidas e outros químicos na agricultura, visando a minimização dos riscos de perda na produtividade, além de resultar na dissipação do contaminante no ambiente, acarretam efeitos danosos em organismos não alvos (VAN EERD et al., 2003).Caracterizado por relativa baixa sorção e moderada mobilidade em solo, o herbicida s-metolachlor apresenta alta persistência no ambiente, e pode ser classificado como potencial para contaminação de águas (DORES et al., 2008; YOUBIN et al., 2009).

Estudos relatam a determinação de s-metolachlor em amostras de água, confirmando rotas de dissipação e fatores que influenciam sua mobilidade (KURT-KARATUS et al., 2010; VRYZAS et al., 2011), sendo o Brasil um país de grande relevância e preocupação no cenário mundial de contaminação ambiental por pesticidas (DORES et al., 2008; LAABS et al., 2000).

A toxicidade do herbicida s-metolachlor está relacionada com a inibição da síntese de lipídeos, agindo sob enzimas responsáveis pela elongação de ácidos graxos na célula,como a Acyl-Coa, além de causar a inibição de enzimas que contém o grupo tiol em sua estrutura (BÖGER; MATTHES; SCHMALFUB, 2000). Devido a estes efeitos negativos no metabolismo, o herbicida s-metolachlor pode causar desequilíbrio da homeostase redox celular e, consequentemente, interferir em funções globais do organismo, como redução da taxa de crescimento (VALLOTTON et al., 2008).

Um dos mais importantes elementos envolvidos em pesquisas com efeitos tóxicos de pesticidas é a habilidade de um organismo em metabolizar este xenobiótico. A maioria dos microorganismos presentes no ambiente é essencial para a manutenção do funcionamento de ecossistemas. Características como alta diversidade e grau de especialização metabólica permitem que comunidades microbianas presentes no solo, eficientemente degradem muitos poluentes (URGUN-DERMITASet al., 2006). Dessa forma, a biodegradação é considerada um

importante mecanismo para transformação de poluentes orgânicos, vista como uma ferramenta de desintoxicação ambiental, e pode ser utilizada para redução da toxicidade do xenobiótico e reinserção de nutrientes em ciclos biogeoquímicos (MEER et al., 2006).

A degradação bacteriana de contaminantes tóxicos, transformando-os em substâncias menos e/ou não tóxicas tem se tornado foco de interesse de pesquisas (MOLINA et al., 2009; GINET et al., 2011), principalmente visando a aplicação de tecnologias como a biorremediação (VERMA et al., 2011).Para isto, a compreensão da utilização de pesticidas como fonte de carbono ou nutrientes por microorganismos é imprescindível para o delineamento de processos biotecnológicos que envolvam a biodegradação eficiente do contaminante. Além disso, a investigação do comportamento dos microorganismos exposto ao pesticida em condições que se assemelhem às ambientais podem ajudar na compreensão do metabolismo na variáveis ambientais que este se expõe quando em ambiente natural.

A principal via de degradação do herbicida s-metolachlor no solo é a transformação microbiana. A desalogenização é apresentada como reação inicial na biodegradação de compostos clorados (CUOZZO et al., 2009), a qual pode ser catalisada pela enzima glutationa S-transferase, através do ataque nucleofílico ao átomo de cloro, o qual é retirado, seguido da formação de um conjugado de glutationa com o pesticida (FIELD; THURMAN, 1996). Esta reação pode gerar ácidos orgânicos, como o ácido etanosulfônico (ESA) e ácido oxanílico (OA), os quais são frequentemente encontrados em amostras ambientais (HUNSTCHA et al., 2008; CHENG et al., 2010).

Bactérias da família *Enterobacteriales* são relatadas em artigos pela capacidade demetabolizar pesticidas (SINGH et al., 2004; MOLINA et al., 2009; YANG et al., 2010). Em estudo realizado por Wang et al. (2006), duas linhagens bacterianas isoladas de solo contaminado, sendo uma delas classificada como *Enterobacter cloacap* (linhagem WFX-2),quando aplicadas em solo na forma de consórcio microbiano, apresentaram taxa de degradação próxima de 100% após 8 dias de cultivo na presença do pesticida hexazinona.

Neste estudo, a bactéria isolada de solo contaminado *Enterobacter asburiae* SD1 teve analisado o potencial de biodegradação do herbicida s-metolachlor, através da análise residual do herbicida e seus metabólitos (ESA e AO) em meio de

cultura. Sendo previamente caracterizada como sendo tolerante ao s-metolachlor (MARTINS et al. 2011), o isolado SD1apresentou similaridade com *E. asburiae* na análise molecular para identificação, e mostrou taxas de biodegradação diferenciais, caracterizadas conforme constituição de meio de cultura.

Os resultados aqui obtidos sugerem que o isolado bacteriano apresenta vias preferenciais para utilização do herbicida como fonte de carbono, as quais podem estar relacionadas à respostas globais da célula a estresse, uma vez que pode ser observado a regulação do crescimento microbiano como resposta adaptativa à presença do herbicida.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Herbicida e metabólitos

O herbicida s-metolachlor [2-chloro-*N*-(2-ethyl-6-methylphenyl)-*N*-(methoxy-1-methylethyl)acetamide] e os metabólitos ácido etanosulfônico (ESA) (2-[(2-ethyl-6-methylphenyl)(2-methoxy-1-methylethyl) amino]-2-oxoethanesulfonic acid) e ácido oxanílico (OA) (2-[(2-ethyl-6-methylphenyl)(2-methoxy-1-methylethyl)amino]-2-oxoacetic acid) foram adquiridos na forma de produtos comerciais de alta pureza (Sigma Aldrich), bem como os demais reagentes utilizados para análise de cromatografia.

2.2.2 Condições de cultivo para isolado SD1

O experimento foi conduzido com 3 repetições, com tratamentos diferenciais quanto à composição do meio de cultura (diferentes fontes de carbono) e presença e ausência do herbicida s-metolachlor. Foram utilizados dois meios base para o experimento:

i) meio nutriente, contendo 5 g de peptona, 3 g de extrato de levedura e 5 g de NaCl;

ii) meio mínimo, contendo 2 g $(NH_4)_2SO_4$, 4 g KH_2PO_4, 6 g Na_2HPO_4, 0,2 g $MgSO_4.7H_20$,1 mg $FeSO_4.7H_20$, 10 ug de B (H_3BO_3), 10 ug de Mn ($MnSO_4$), 70 ug de Zn ($ZnSO_4$), 50 ug de Cu ($CuSO_4$), and 10 ug de Mo (MoO_3), por litro de cultura.

O isolado bacteriano SD1 foi cultivo 6 tratamentos compostos por: 1) meio rico, 2) meio rico com 1,25 mM de herbicida, 3) meio mínimo, 4) meio mínimo com 10%

de dextrose, 5) meio mínimo com 1,25 mM de herbicida e 6) meio mínimo com 10% de dextrose e 1,25 mM de herbicida.

O pré-inóculo foi obtido do cultivo do isolado bacteriano em frascos com 800 mL de meio nutritivo, à 30ºC com agitação de 120 rpm, até atingirem a fase log-média de crescimento (Densidade ótica ≈ 1,0). Em seguida, o inóculo foi centrifugado a 8000 rpm por 20 min e realizada 3 lavagens nas células com tampão PBS (tampão fosfato-salino) para retirar resíduos do meio nutritivo.

Finalmente, as células foram solubilizadas em meio mineral e divididas em alíquotas para inoculo nos tratamentos, os quais foram mantidos sob agitação de 130 rpm, a 30ºC, até o momento das análises.

2.2.3 Identificação bacteriana

A análise molecular do gene 16S ribossômico foi utilizado para identificação do isolado SD1.

A extração de DNA foi realizada conforme protocolo adaptado de Araújo et al. (2002) e a sequencia parcial do gene 16S foi amplificada com os primers1378R (HEUER et al., 1997) e P027F (LANE et al., 1985) para 16S rRNA (MegaBACE1000). As sequencias obtidas do isolado bacteriano foram comparadas com outras sequencias depositadas na base de dados do GenBank, e utilizadas para análise de alinhamento e filogenia (KONSTANDINIDIS; TIEDJE, 2005; SAITOU; NEI, 1987) com o programa MEGA v 4.0. (TAMURA et al., 2007) baseada no princípio da máxima parcimônia.

A sequencia parcial do gene 16S rRNA obtida para o isolado SD1 foi depositada no GenBank sob número de acesso HM229436.

2.2.4 Análise do crescimento bacteriano em diferentes fontes de carbono

O crescimento bacteriano foi analisado através de leitura e espectrofotômetro da densidade óptica (D.O.) em 600 nm. Conforme condições de cultivo já descritas, foram realizadas 7 leituras de D.O. em um total de 24 horas, a partir da exposição do isolado bacteriano aos tratamentos.

2.2.5Análise residual do herbicida s-metolachlor em meio de cultura

A biodegradação do s-metolachlor, bem como a detecção dos metabólitos ESA e OA, foi determinada através da análise residual do herbicida em meio de cultura líquido, através de experimento realizado em triplicatas.

O isolado bacteriano SD1 foi cultivado em 3 tratamentos: CNH, MMH e MDH; na presença de 1,25mM de herbicida s-metolachlor, a 30ºC, sob agitação de 120 rpm, sendo as alíquotas retiradas em 4 tempos: 1h, 3h, 7h e 13h. Alíquotas dos meios de cultura foram diluídas 200 vezes e filtradas através de filtro 0,2 µm (Millipore), para posterior análise por cromatografia líquida, com detector de fluorescência, a 210 nm.

Foram realizados controles para análise de possível degradação do herbicida s-metolachlor através de condições não biológicas, nas quais os tratamentos foram dispostos. Para isso, para cada intervalo de análise, foi também coletado alíquotas de tratamentos não inoculados e realizada a comparação com a concentração inicial de s-metolachlor encontrada nos meios de cultura. Entretanto, no período e condições analisadas, não foi possível analisar degradação do herbicida s-metolachlor, não justificada pela presença do isolado bacteriano SD1.

2.2.6 Métodos analíticos

O equipamento utilizado para detecção do herbicida foi cromatógrafo líquido de alta eficiência com *detector* de arranjo de fotodiodos (HPLC-DAD) da *Agilent Technologies 1200 series.* Para separação dos analitos, foi utilizada coluna C18 fase reversa, 250 mm x 4,6 mm, com ODS de 2-5 µm (Waters Spherisorb) – Supelco INC.

Para detecção do herbicida s-metolachlor foi utilizada como fase móvel a solução binária composta por água ultrapura (solvente A) e acetonitrila (solvente B) (40:60) (v/v), fluxo de 1 mL/min e temperatura de 25ºC, sendo o tempo de corrida de 11 min (TRAN; HYNE; DOBLE, 2007).

Os metabólitos ESA e OA foram detectados em análise combinada, tendo como fase móvel a solução binária de Tampão Fosfato de Potássio 25 mM, pH 7,0 e acetonitrila (80:20, v/v), a temperatura de 60ºC, como proposto por Vryzas e colaboradores (2007). O fluxo da fase móvel foi de 1mL/min, com injeções de 50 µL. A análise combinada dos metabólitos foi possível porque apresentaram tempos de

retenção distintos, sendo 11,5 min. para o metabólito OA, enquanto o metabólito ESA apresentou 17,3 min.

2.2.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos como média ± EPM e analisados por meio do programa estatístico R (www.r-project.org). Também foi utilizado o teste *t* de Tukey para comparar as variáveis entre tratamentos dos meios de cultura. O critério de significância utilizado foi de $p < 0,05$.

2.3 Resultados

2.3.1 Identificação do isolado bacteriano SD1

Inicialmente foi realizada a identificação do isolado bacteriano através da construção de uma árvore filogenética. Youssef et al. (2009) reportou que fragmentos englobandoas regiões variáveis V6 e V7 do gene 16S rRNA são compatíveis com os dados obtidos em análises filogenéticas realizadas com a sequencia completa do gene.

Entretanto, análises de identificação de alguns isolados bacterianos através deste método combinado podem resultar em erros de classificação quando se realiza a comparação com sequencias depositadas no GenBank.Um estudo da família *Enterobacteriaceae* enfatizou que o gênero *Enterobacter* considerado um grupo polifilético (NHUNG et al., 2007). Sendo assim, um maior número de sequências e marcadores moleculares é necessário para que haja a obtenção de uma análise filogenética abrangente deste gênero (TORRES et al., 2008).

A árvore filogenética foi construída a partir de sequencias obtidas de linhagens tipo e sequencias depositadas no GenBank, as quais são intimamente relacionadas ao isolado estudado. Dessa forma, é possível observar que árvore deriva de*Pseudomonas* spp.,*Salmonella* spp., *Tatumella* spp. e *Leclercia* spp. Como *outgroup* foram utilizadas as sequencais de *Klebsiella pneumoniae*, *K. granulomatis* e *K. singaporensis* (Figura 2.1).

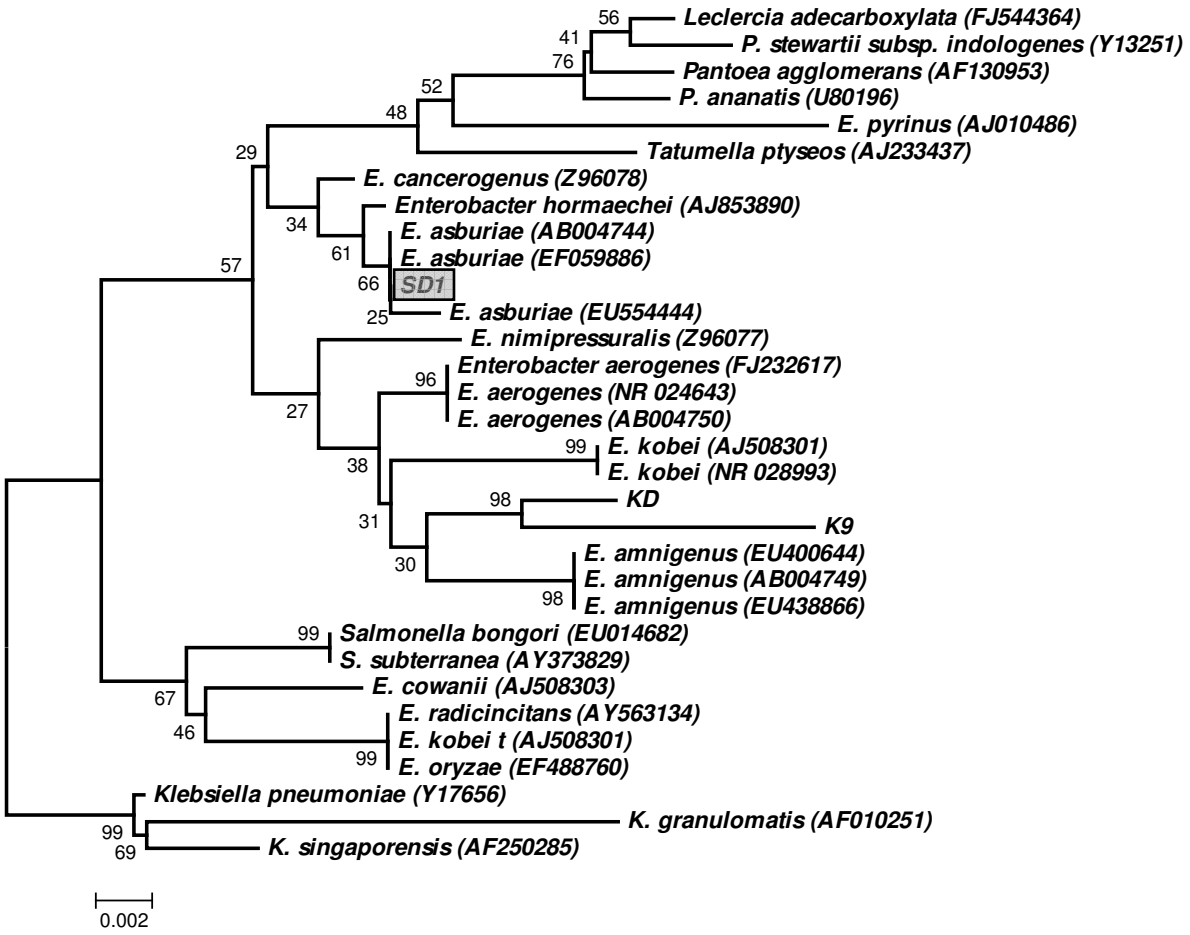


Figura 2.1 – Árvore filogenética construída por máxima parcimônia a partir do gene rRNA 16S. Fragmentos de sequênciascom 600 pb do genoma de *Enterobacter* spp. (disponível no banco de dados RDP) *versus Klebsiellapneumoniae, K. granulomatis* e *K. singaporensis*(usadas como *outgroup*). Barras indicam o número de passos evolutivos com sequências divergentes. Figura publicada por Martins et al., 2011, em artigo sobre isolados bacterianos (SD1, K9 e KD) tolerantes a herbicidas cloroacetanilidas

Através do sequenciamento do gene 16S rRNA, o isolado SD1 mostrou ser filogeneticamente relacionado a *Enterobacter asburiae*, com aproximadamente 89% de similaridade. A filogenia do grupo *Enterobacter/Patoea* é conhecida parcialmente (TORRES et al., 2008), e estudos prévios sugerem que uma revisão neste grupo é necessária para melhor identificação bacteriana e definição de grupos monofiléticos.

Por outro lado, diversos estudos têm reportado a identificação de bactérias da família *Enterobacteriales* com capacidade de degradação de contaminantes, como pesticidas (SINGH et al., 2004; MOLINA et al., 2009). A análise de crescimento diferencial do isolado SD1 em meio mineral com somente o herbicida como fonte de carbono poderia ser indício da capacidade deste isolado na degradar o s-metolachlor.

2.3.2 Crescimento bacteriano foi menor quando o isolado bacteriano foi cultivado em meio mineral

A bactéria *Enterobacter asburiae* SD1 apresentou crescimento diferencial, principalmente entre o meio rico e meio mineral. O gráfico apresentado na figura 2.2 mostra que no meio rico (CN), seja na presença ou ausência do herbicida s-metolachlor, o isolado bacteriano *E. asburiae* SD1 apresentou maior taxa de crescimento quando comparado com seu cultivo em meio mineral.

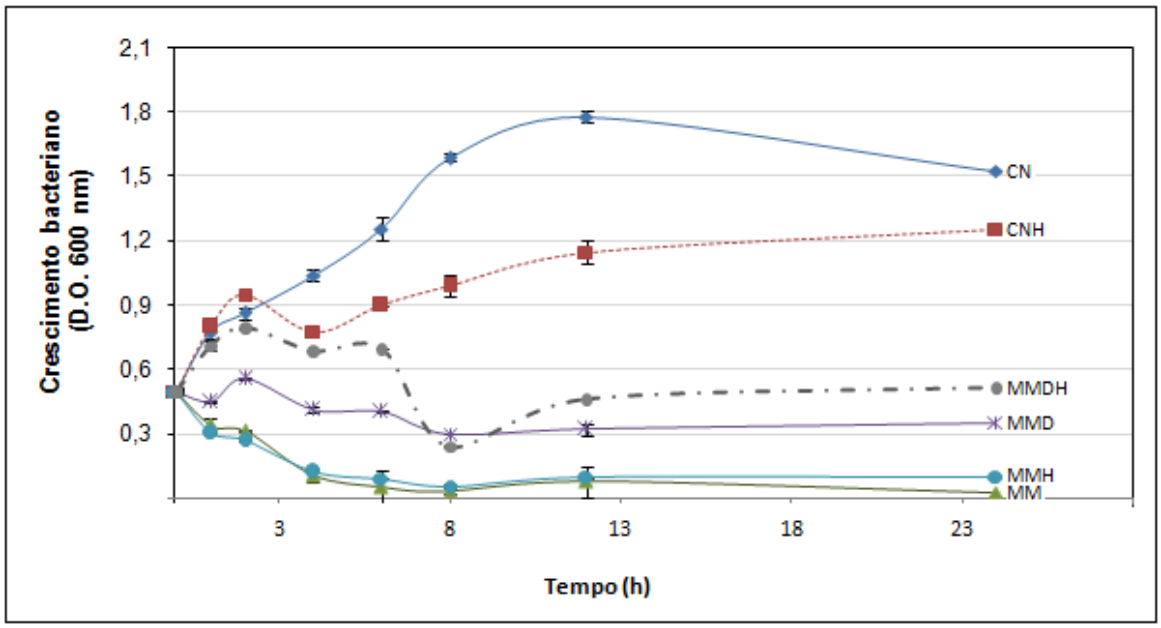


Figura 2.2 – Crescimento do isolado *Enterobacter asburiae* SD1 em meio de cultura com diferentes constituições

A presença do herbicida s-metolachlor inicialmente apresentou efeito negativo na taxa de crescimento do isolado bacteriano SD1 (Figura 2.2). Entretanto, após uma queda inicial de absorbância, o que pode estar relacionado a fase de adaptação metabólica (fase lag), o isolado bacteriano apresentou retomada de crescimento nos tratamentos CNH e MMDH. Neste caso, foi possível observar uma fase de adaptação (fase lag), sendo de aproximadamente 4 h e 8 h, para os tratamentos CNH e MMDH, respectivamente.

Por outro lado, o tratamento MMH, o qual apresentava como única fonte de carbono o herbicida s-metolachlor, apresentou uma das menores taxas de crescimento, sendo somente maior que o tratamento MM, considerado controle negativo por não conter nenhum composto que pode ser utilizado como fonte de

carbono. No tratamento MMH, a bactéria *E. asburiae* SD1 conseguiu manter o crescimento, após longa fase de adaptação, apesar da baixa taxa de divisão.

Para manutenção da taxa de crescimento, as células precisam fornecer constantemente nutrientes para serem convertidos nos constituintes necessários para a propagação celular. Essas necessidades suprem sistemas metabólicos funcionais como, mecanismos de metabolismo intermediário e de macromoléculas, e sistemas regulatórios da divisão celular (KOCH, 1997). Porém, essas condições são observadas geralmente em condições favoráveis de crescimento. Na presença de certas macromoléculas, como herbicidas, as células também necessitam ativar mecanismos especializados para reconhecimento, degradação ou mesmo excreção, o que pode representar o tempo de adaptação dos isolados na presença do herbicida.

Esta diferenciação das rotas de crescimento pode ser explicada pela presença de dextrose, seja no meio mineral ou rico, como fonte de carbono preferencial, sendo esta utilizada inicialmente para adaptação à presença do s-metolachlor nos meios de cultura. Além disso, a maior taxa de crescimento em meio rico pode ser decorrente também de nutrientes adicionais disponibilizados pelo meio que auxiliariam na manutenção de vias metabólicas secundárias.

A maioria dos ambientes naturais fornece aos microorganismos uma mistura de substratos, os quais podem controlar o crescimento microbiano não somente pela disponibilidade de um composto específico, mas pela disponibilidade de dois ou mais substratos simultaneamente. Em bactérias a utilização de compostos como fonte de carbono pode ser regulada pelo mecanismo de repressão do catabolismo do carbono, o qual refere se ao mecanismo que garante o controle da utilização sequencial de compostos, realizado principalmente pelo nível de indução de carboidratos (BRÜCKNER; TITGEMEYER, 2002).

Fontes simples e de fácil disponibilidade podem ser inicialmente metabolizadas e utilizadas como fonte de obtenção de energia para a preparação e ativação de vias necessárias para o reconhecimento de fontes complexas de carbono. Esta hipótese pode ser corroborada quando observado o crescimento maior no tratamento MMDH, quando comparado com MMH.

A queda da taxa de crescimento no tratamento MMH pode ser decorrente da dificuldade de reconhecimento da molécula do s-metolachlor, a qual pode ser classificada como fonte de carbono de metabolização complexa. Apesar da estrutura

química do herbicida ser constituída por um anel aromático, de difícil degradação, ela também apresenta grupos alquila, os quais podem ser mais facilmente acessados para obtenção de carbono, além dos átomos de nitrogênio e cloro (MARTINS et al., 2007).

A maioria dos ambientes naturais é citada por apresentar um estado de equilíbrio, embasado na oferta mínima de uma quantidade de nutrientes disponíveis para o crescimento microbiano (KOVÁROVÁ-KOVAR; EGLI, 1995). Entretanto, a introdução de quantidades consideráveis de poluentes pode modificar profundamente o crescimento microbiano, seja pela toxicidade do poluente, ou pela nova alternativa de substrato para crescimento. Dessa forma, a capacidade de tolerar e/ou metabolizar um poluente pode ser um fator limitante para o crescimento microbiano quando observada a oferta deste e sua relação com a competição na ocupação de novos nichos ecológicos (MERR, 2006).

2.3.3 Biodegradação do herbicida s-metolachlor ocorre de maneira característica dos compostos cloroacetanilidas

A presença de pesticidas no meio ambiente pode afetar negativamente a atividade da microbiota local. Neste cenário, alguns pesticidas apresentam degradação essencialmente microbiana, enquanto outros podem ser potencialmente recalcitrantes. O s-metolachlor esta no primeiro grupo, sendo a transformação por microorganismos sua principal via de degradação, como já observado em estudos realizados por Munoz et al. (2011) e Zhang et al. (2011).

O isolado SD1 foi cultivado na presença de 1,25 mM de s-metolachlor (353 µg/mL), em 3 diferentes meios de cultura que diferiram principalmente quanto a fonte de carbono. A capacidade de biodegradação foi detectada através da análise residual do herbicida em meio de cultura. Foram analisados 4 tempos diferentes nas primeiras 13 horas de crescimento (Figura 2.3).

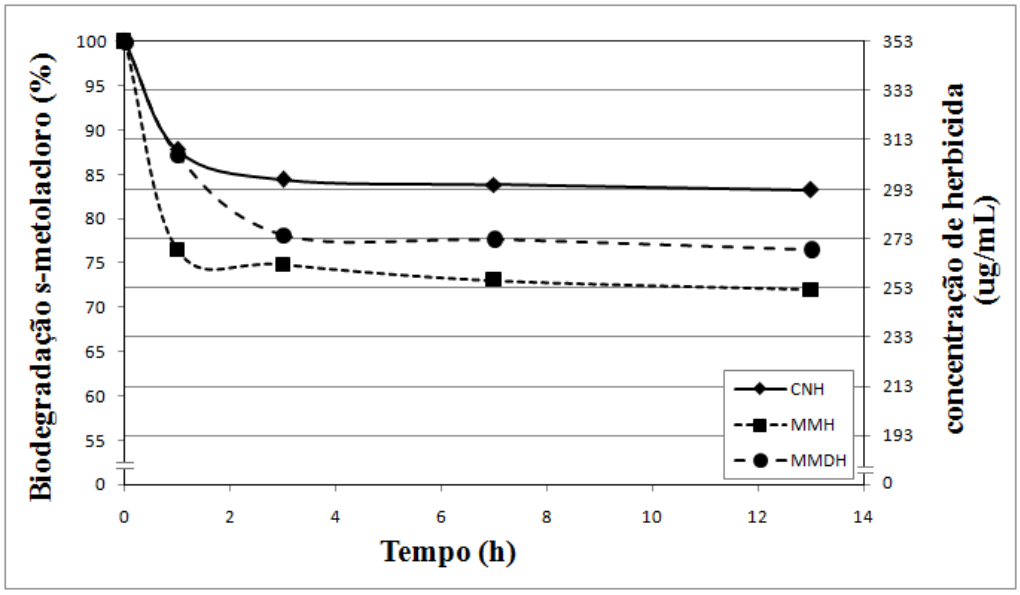


Figura 2.3 – Gráfico da análise residual do herbicida s-metolachlor em diferentes meios de cultura: meio rico (CNH), meio mínimo (MMH) e meio mínimo com 10% de dextrose (MMDH)

Os menores valores residuais de herbicida em meio de cultura foram encontrados quando a bactéria foi cultivada em meio mínimo (MMH e MMDH). Surpreendentemente, foi possível observar que as maiores quedas na concentração de herbicida no meio ocorrem nas primeiras horas de cultivo, sendo que possivelmente, após as 3 horas iniciais, a taxa de degradação se mantenha constante, como observado na figura 2.3, nas leituras após 3 horas de cultivo.

A diferença das taxas de degradação em um mesmo tratamento é uma característica observada para os compostos cloroacetanilidas. Liu e colaboradoes (1990), descrevem a biodegradação do herbicida metolachlor por *Streptomyces* sp., o qual também apresentam maior atividade metabólica de degradação nos tempos iniciais de exposição ao contaminante.

A tabela 2.1 mostra os valores de biodegradação em porcentagem, na qual a diferença entre os valores residuais de s-metolachlor nos tratamentos CNH e MMH chega a ser de cerca de 10%, sendo que a menor concentração residual de herbicida foi encontrada no meio com somente o s-metolachlor como fonte de carbono (MMH).

Tabela 2.1 – Dados de concentração residual do herbicida s-metolachlor em meio de cultura, dados em porcentagem, sendo 100% equeivalente a 353 ug/mL ou 1,25 mM de herbicida

tempo (h)	CNH (%)	MMH (%)	MMDH (%)
0	100	100	100
1	87.81	76.49	87.25
3	84.42	74.78	78.18
7	83.85	73.09	77.62

Na terceira hora de crescimento, foram encontradas taxas de biodegradação de 16,15%, 22,38% e 26,91% nos tratamentos CNH, MMDH e MMH, respectivamente, o que reflete a capacidade do isolado bacteriano SD1 em biodegradar o herbicida s-metolachlor, mesmo quando cultivado somente na presença do herbicida s-metolachlor como fonte de carbono. Após esse período, a taxa de degradação foi menor, porém constante, sendo ligeiramente mais alta para o tratamento MMH (Tabela 2.1).

A biodegradação de muitos substratos pode ser realizada através do processo de cometabolismo, ou seja, quando um composto de interesse para o metabolismo celular não apresenta função como substrato para crescimento (CRIDDLE, 1993). Dessa forma, a taxa de degradação do herbicida nos tratamentos CNH e MMDH pode estar relacionada a transformação do herbicida de maneira cometabólica.

Muitas são as vias de degradação de pesticidas, porém a principal se refere a desintoxificação metabólica pela conjugação da glutationa (VAN EERD, et al 2003). Para o herbicida s-metolachlor, dois produtos de degradação são geralmente encontrados em amostras de água ou solos, sendo que o metabólito ácido etanosulfônico metolachlor (ESA) já foi descrito como sendo produto da via de conjugação do herbicida com o composto glutationa (FIELD; THURMAN, 1996). Como foi possível observar queda na concentração residual do herbicida em meio de cultura cultivado com o isolado SD1, o próximo passo foi tentar a detecção de subprodutos da transformação do herbicida em meio de cultura.

2.3.4 Os metabólitos s-metolachlor ESA e AO não foram passiveis de detecção em nenhum dos tratamentos analisados

Os metabólitos ESA e OA estão entre os principais metabólitos encontrados em análises residuais de s-metolachlor em água, e possivelmente são os primeiros produtos formados da biodegradação de herbicidas cloroacetanilidas (KOLPIN et al., 2000; SPALDING et al., 2003). Entretanto, não foi possível a detecção dos metabólitos como resíduo em meio de cultura através do método empregado, e com limite de detecção de 0,1 ug/mL para ambos os analitos, metolachlor ESA e OA.

2.4 Discussão

A interferência antropogênica no ambiente tem sido destaque no cenário mundial devido às consequências advindas do desequilíbrio dos ciclos biogeoquímicos, muitas vezes causado pelo lançamento de compostos sintéticos em ecossistemas naturais. Com foco no aumento da produtividade de alimentos, uma necessidade cada vez mais urgente na atual sociedade, a atividade agrícola ainda negligencia a geração de resíduos, provocada muitas vezes pelo uso abusivo e indiscriminado de pesticidas.

Um dos mais importantes elementos envolvidos em estudos com efeitos de pesticida no ambiente é a habilidade de um organismo metabolizar este xenobiótico. Compreender o metabolismo de um pesticida é necessário para o desenvolvimento deste produto, bem como para o uso eficiente e a segurança no tratamento de resíduos. Além do mais, estratégias de biorremediação para descontaminação de solos e água são baseadas em estudos metabólicos e efeitos tóxicos dos pesticidas.

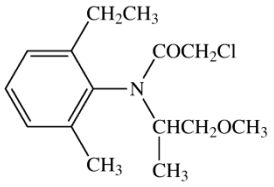
O herbicida s-metolachlor, é constantemente citado em artigos a cerca de contaminação ambiental, seja em amostras de água ou solo (RICE; ANDERSON; COATS, 2002, DORES et al., 2008; KURT-KARATUS et al., 2010; Vryzas et al., 2011), o que pode ser considerado reflexo de algumas de suas características, como ampla utilização e estabilidade da molécula.

A mineralização ou a transformação biológica de moléculas orgânicas em ambientes, como água ou solo, são em sua maioria consequências de atividade microbiana. Poucos mecanismos abióticos podem ser considerados relevantes para a conversão de compostos orgânicos de certa complexidade em produtos inorgânicos, e quando realizado naturalmente, não apresentam a mesma eficiência de uma transformação metabólica (ALEXANDER, 1981). No presente estudo, os

controles dos tratamentos com herbicida, os quais não foram inoculados, não apresentaram diferenças da concentração do herbicida nos tempos analisados (dados não mostrados), o que corrobora com estudos que apontam que a degradação do s-metolachlor esta fortemente correlacionada com atividade microbiana e é uma importante via de dissipação do contaminante no solo (RICE et al., 2002; YOUBIN et al., 2009).

O herbicida s-metolachlor, o qual apresenta 15 átomos de carbono e um átomo de nitrogênio, apesar de classificado como altamente tóxico, pode ser visto como potencial para servir de nutriente para crescimento microbiano (MUNOZ et al., 2011). Ao verificar a molécula deste herbicide (Tabela 2.2), é possível observar o átomo de Cloro, um anel aromático (de difícil de gradação) ligado a 3 radicais, e ainda 2 carbonos quirais, um deles responsáveis pela conformação do isômero utilizado no trabalho.

Tabela 2.2 – Características físico-químicas do herbicida s-metolachlor

	S-metolachlor
Nome químico	2-chloro-***N***-(2-ethyl-6-methylphenyl)-*N*-(2-methoxy-1-methylethyl) acetamide
Nome comum	s-metolachlor
Fabricante	Syngenta
Nome comercial	DUAL GOLD
Fomrulação agroquímica	960 g i.a. L^{-1}, EC
Fórmula molecular	$C_{15}H_{22}ClNO_2$
Peso molecular	283.80
Estrutura química	
K_{ow}	794
Solubilidade em água	480 mg L^{-1} à 25°C

A bactéria *Enterobacter asburiae* SD1, isolada de solo agrícola com histórico de aplicações de herbicida s-metolachlor, foi cultivada na presença do herbicida para análise do seu potencial de degradação. Além disso, a influência de nutrientes e

fonte preferencial de carbono na transformação do s-metolachlor foi analisada através de diferentes constituições de meio de cultura.

Um importante aspecto revelado no presente estudo esta na regulação do crescimento bacteriano em função do metabolismo de degradação. De maneira geral, foi possível observar dois tipos de resposta ao herbicida. A primeira está nos tratamentos que apresentaram, além do herbicida, uma fonte de carbono preferencial pela bactéria (CNH e MMDH), sendo a outra resposta encontrada no meio mineral com somente o herbicida como fonte de carbono (MMH).

Em ambos os tratamentos, CNH e MMDH, foi possível observar uma fase de adaptação à presença do s-metolachlor, sendo de 4 h e 8 h, respectivamente. A fase de lag, a qual correspondente ao período de adaptação a uma nova condição ambiental, pode não ser observada em alguns casos devido à limitação de crescimento bacteriano no meio de cultura, e ausência de uma fase de crescimento exponencial clara. Neste caso, é possível observar que o isolado bacteriano mostra uma fase lag melhor caracterizada no tratamento CNH, no qual a presença de dextrose e nutrientes ofereceu melhores condições para o crescimento do isolado.

Em ambiente natural, raramente os microorganismos encontram uma condição ideal para crescimento exponencial, permanecendo na maior parte do tempo, em condições limitantes de crescimento, como encontrado no meio mineral. No tratamento MMDH, a dextrose disponibilizada pelo meio pode ter sido utilizada pela bactéria para preparo e ativação de vias específicas de resposta ao herbicida, tornando possível a retomada do crescimento após a fase lag.

Entretanto, a resposta a limitação de nutrientes, ou mesmo a condições de estresse devido a presença de um composto tóxico, muitas vezes compromete esta fase inicial do crescimento bacteriano, na qual o metabolismo desempenha funções de varredura e adaptação metabólica. Nestes casos, quando a falta de nutrientes essenciais no meio é constatada, pode ocorrer um segundo estágio da adaptação fisiológica, a qual inclui a inibição do crescimento, visando sustentar a viabilidade celular. Este estágio adaptativo foi observado nos tratamentos MMDH e MMH, nos quais inicialmente houve a perda da viabilidade celular, mostrada pela queda na absorbância do meio, com conseqüente manutenção do crescimento após a resposta adaptativa estabelecida.

A queda na absorbância foi maior no tratamento MMH, o qual não ofereceu uma fonte de energia de simples composição, acarretando provavelmente a perda

inicial de viabilidade celular decorrente não somente da limitação de nutrientes imposta pelo meio, como também da dificuldade de metabolização do herbicida. Britos et al (2011) relataram que a limitação de nutrientes para bactéria *Caulobacter crescentus* desencadeia uma resposta adaptativa, na qual a regulação de sistemas de varredura, locomoção e crescimento podem ser negativa em função da sobrevivência no ambiente, enquanto vias de transporte e catabolismo tiveram indução na mesma condição limitante.

No presente estudo, é possível que vias de reconhecimento do herbicida e enzimas capazes de degradação foram ativadas preferencialmente a outras vias visando a obtenção de nutrientes no tratamento MMH, o que pode ter acarretado o desequilíbrio de algumas funções metabólicas. Como manutenção da homeostase redox, e conseqüente diminuição da viabilidade celular.

Por outro lado, a adaptação metabólica do isolado SD1 pode ser verificada pela capacidade de degradação do herbicida, a qual no tratamento MMH chegou a aproximadamente 29%, com 13 h de cultivo (Tabela 2.1). Apesar de não ser encontrada a degradação total do herbicida nas condições estudadas, as taxas encontradas em geral são maiores que em outros estudos com o herbicida s-metolachlor.

Xu et al. (2008), em um estudo realizado com uma comunidade microbiana isolada de solo contaminado com este herbicida, relatam taxas de degradação de 39% após 21 dias de incubação. Em artigo sobre a biodegradação por isolados bacterianos do gênero *Bacillus*, a espécie *Bacillus thuringiensis*, apresentou a melhor taxa de degradação do s-metolachlor, detectada pela análise residual do herbicida no meio, a qual mostrou 44% de resíduo do herbicida em meio de cultura após 108 dias de cultivo (WANG et al., 2008).

No entanto, a biodegradação de s-metolachlor foi observada também nos tratamentos que apresentaram fontes alternativas de carbono (CNH e MMDH), o que pode indicar a degradação do herbicida através de cometabolismo (co-oxidação). O processo de cometabolismo refere-se a qualquer reação, geralmente oxidação, de substancias sem a utilização da energia derivada da reação para suporte de crescimento. O crescimento do isolado bacteriano SD1 foi observado no tratamento MMD e CN, o que torna indispensável o herbicida para o crescimento. Porém, os tratamentos CNH e MMDH também apresentaram crescimento, bem como degradação do herbicida, o que pode caracterizar o cometabolismo.

A capacidade de um microorganismo em utilizar mais que um composto como fonte de carbono agrega vantagem adaptativa para responder a injúrias causadas por mudanças ambientais. Entretanto, a fonte de carbono é utilizada através de vias preferências em bactérias, as quais direcionam a célula para reconhecimento de compostos de fácil acesso e simples composição, como a dextrose, caracterizando uma hierarquia metabólica relacionada a utilização destes compostos como fonte de carbono (DEUTSCHER, 2008).

Em condições aeróbicas, alguns estudos anteriores relatam a biodegradação parcial do s-metolachlor realizada por bactérias (LIU; LU; BOLLAG, 1990); ZHANG et al.,2011), sendo este processo proposto em um modelo de degradação através do cometabolismo. Entretanto, a biodegradação do herbicida no presente estudo não parece ser realizada somente por cometabolismo, uma vez que ocorre na ausência de fontes preferências de carbono, como no tratamento MMH. Além disso, a transformação do s-metolachlor pelo isolado SD1 foi incompleta, o que pode refletir, parcialmente, a aparente persistência deste herbicida em ambientes naturais, como solo, corroborando com o observado por Munoz et al. (2011), em estudo com *Bacillus simplex*.

Ao analisar a curva de degradação do herbicida s-metolachlor produzida pelo experimento com *E. asburiae* SD1, as maiores taxas de degradação foram encontradas nos primeiros tempos de análise, 1 e 3 h, e também foi neste período que pode-se observar as maiores diferenças entre as curvas de degradação. Após 3 h de incubação, o processo de degradação de s-metolachlor continuou, porém em taxas menores, sendo aproximadamente constante para os 3 tratamentos. Em estudos realizados com herbicidas cloroacetanilidas, é possível observar que esta característica de metabolização é recorrente de compostos desta classe (LIU; LU; BOLLAG, 1990; XU et al., 2008; MUNOZ et al., 2011), e é relacionada a toxicidade e dificuldade de quebra do anel aromático presente nas moléculas dos pesticidas.

Zhang et al. (2011), relataram a biodegradação de herbicidas cloroacetamidas pela linhagem *Paracoccus* sp. FLY-8, e dentre os seis herbicidas analisados, o metolachlor apresentou a menor rota de transformação. Segundo autores, pode haver uma correlação negativa entre a biodegradabilidade de um herbicida cloroacetamida e o comprimento lateral do radical. Dessa forma, presença de um radical etil-alcoxi (Figura 2.4) poderia explicar a degradação mais demorada do herbicida metolachlor frente a outros compostos pertencentes à mesma classe,

como o alacloro, o qual apresenta um radical metil-alcoxi, de cadeia mais curta (Figura 2.4).

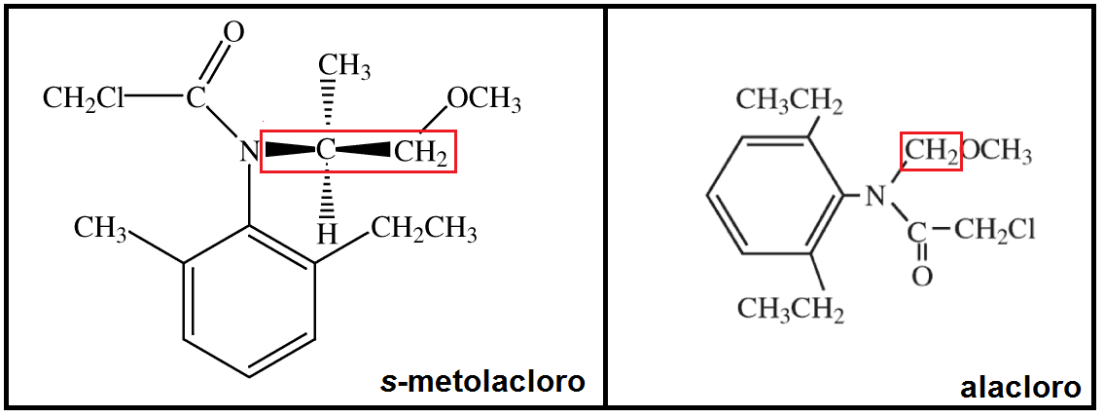


Figura 2.4 – Estruturas químicas dos herbicidas s-metolachlor e alacloro, ambos da classe cloroacetamida. O quadro em vermelho compara o radical alquila dos herbicidas

Segundo Van Eerd et al. (2003), o metabolismo de pesticidas pode envolver 3 fases: i) fase I: transformação das propriedades iniciais do composto parental, envolvendo reações oxi-redutivas; ii) fase II: reações sintéticas ou de conjugação do pesticida ou seu metabólito a um açúcar, aminoácido, ou glutationa e iii) fase III: estocagem de metabólitos em compartimentos celulares. A detecção dos metabólitos de s-metolachlor ESA e OA não foi possível com a metodologia empregada, no entanto, este resultado pode também estar relacionado a última fase do metabolismo de pesticida, refletindo a estocagem dos metabólitos nas células bacterianas e o que refletiria a ausência destes resíduos de metabólitos em meio de cultura.

Além disso, o acúmulo dos metabólitos oriundos da degradação do herbicida pode estar relacionado a diminuição da taxa de degradação após as 3 h iniciais de exposição de *E. asburiae* SD1 ao s-metolachlor, uma vez que os produtos de degradação do herbicida podem apresentar maior toxicidade que a molécula parental (OSANO et al., 2002).

Em conjunto, os resultados indicam que a bactéria *E. asburiae* SD1 tem a capacidade de catabolizar o herbicida s-metolachlor e utilizá-lo como uma única fonte de carbono para crescimento, o que difere da maioria dos trabalhos realizados com este herbicida.

Por outro lado, o isolado também apresenta capacidade de degradar o herbicida em exposição a outras fontes de nutrientes, mais fáceis de metabolização, como dextrose, tornando possível sua degradação em ambientes naturais, na presença de fontes alternativas de carbono e nutrientes. Além do mais, os dados de biodegradação de s-metolachlor pelo isolado bacteriano SD1 indicam que a transformação parcial do herbicida é suficiente para manter o crescimento deste microorganismo através do fornecimento de carbono.

Referências

ALAVANJA, M.C.R.; DOSEMECI, M.; SAMANIC, C.; LUBIN, J.; LYNCH, C.F.; KNOTT. C.; BARKER, J.; HOPPIN, J.A.; SANDLER, D.P.; COBLE. J.; THOMAS, K.; BLAIR, A. Pesticide and lung câncer risk in the agricultural health study cohort. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 160, p. 876-885, 2004.

ALEXANDER, M. Biodegradation of chemicals of environmental concern. **Science**, Danvers, v. 211, p. 132-138, 1981.

BÖGER, P.; MATTHES, B.; SCHMALFUB, J. Towards the primary target of chloroacetamides – new findings pave the way. **Pestand Management Science**, Sussex, v. 56, p. 497-508, 2000.

BRÜCKNER, R.; TITGEMEYER, F. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. **FEMS Microbiology Letters**, Amesterdan, v. 209, p. 141-148, 2002.

CHENG, X., SHI, H.; ADAMS, C.D.; TIMMONS, T.; MA, Y. Simultaneous screening of herbicida degradation by products in water treatment plants using high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, p. 4588-4593, 2010.

CRIDDLE, C.S. The kinetics of cometabolism. **Biotechnology and Bioengineering,** New York, v. 41, p. 1048-1056, 1993.

DEUTSCHER, J. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 11, p. 87-93, 2008.

DORES, E.F.G.C.; CARBO, L.; RIBEIRO, M.L.; DE-LAMONICA-FREIRE, E.M. Pesticide levels in ground and surface wates of Primavera do Leste region, MatoGrosso, Brazil. **Journal of Chromatographic Science**, Niles, v. 46, p. 585-590, 2008.

EGLI, T. The ecological and physiological significance of the growth of heterotrophic microorganisms with mixtures of substrates. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v.14, p.305–386, 1995.

FIELD, J.A.; THURMAN, E.M. Glutathione conjugation and contaminant transformation. **Environmental Science & Technology**, Washigton, v. 30, p. 1413-1418,1996.

HEUER, H.; KRESK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3233–3241, 1997.

HUNTSCHA, S. Input dynamics and fate in surface water of the herbicide metolachlor and of its highly mobile transformation product metolachlor ESA. **Environment and Science Technology**, Easton, v. 42, p. 5507-5513, 2008.

KOCH, A.L. Microbial physiology and ecology of slow growth. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 61, p. 305-318, 1997.

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

KONSTANDINIDIS, K.T.; TIEDJE, J.M. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. **Journal of Bacteriology**, Wasshington, v.187, p. 6258–6264, 2005.

KOVÁROVÁ-KOVAR, K.; EGLI, T. Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, p. 646-666, 1998.

KURT-KARAKUS, P.B.; MUIR, D.C.G.; BIDLEMAN, T.F.; SMALL, J.; BACKUS, S.; DOVE, A. Metolachlor and atrazine in the Great Lakes. **Environmental and Science Technology**, Easton, v. 44, p. 4678-4684, 2010.

LAABS, V.; AMELUNG, W.; PINTO, A.; ZECH, W. Leaching and degradation of corn and soybean pesticides in an Oxisol of the Brazilian Cerrados. **Chemosphere**, Oxford, v. 41, p. 1441-1449, 2000.

LANE, D.J.; PACE, B.; OLSEN, STAHL, D.A.; SOGIN, M.L., PACE, N.R. Rapid-determination of16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academic Science of United State of America**, Washington, v. 82, p. 6955–6959, 1985.

LIU, S.Y.; LU, M.H.; BOLLAG, J.M. Transformation of metolachlor in soil inoculated with a *Streptomyces* sp. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 1, p. 9-17, 1990.

MARTINS, P.F.; CARVALHO, G.; DOURADO, M.N.; GRATAO, P.L.; PILEGGI, M.; AZEVEDO, R.A. Effect of chloroacetanilide herbicides on antioxidant enzymes of soil isolated bacteria. **ProcessBiochemistry**, Oxford, v. 46, p. 1186-1195, 2011.

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

MEER, J.R. van der. Environmental pollution promotes selection of microbial degradation pathways. **Frontiers in Ecology and the Environmental**, Ithaca, v. 4, p. 35-42, 2006.

MOLINA, M.C. GONZALEZ, N.; BAUTISTA, L.F.; SANZ, R. SIMARRO, R.; SANCHEZ, I.; SANZ. J.L.Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. **Biodegradation**, Dordrecht, v, 20, p. 789-800, 2009.

MUNOZ, A. ; KOSKINEN, W.C. ; COZ, L. ; SADOWSKY, M.J. Biodegradation and mineralization of metolachlor and alachlor by *Candida xestobii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, p. 619-627, 2011.

NHUNG, P.H.; OHKUSU, K.; MISHIMA, N.; NODA, M.; SHAH, M.; SUN, M.; HAYASHI, M.; EZAKI, T. Phylogeny and species identification of the family *Enterobacteriaceae* based on *dnaJ* sequences. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 58, p.153-161, 2007.

OSANO, O.; ADMIRAAL, W.; KLAMER, H.J.C.; PASTR, D.; BLEEKER, E.A.J. Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides formamidines and their degradation products in *Vibrio fisheri* and *Chironomus riparius*. **Environmental Pollution**, Barking, v. 119, p. 195-202, 2002.

R Development Core Team. **R: A Language and Environment for Statistical Computing, Versão 2.13.2.** Vienna, 2009. Disponível em: <www.r-project.org>. Acesso em:3 out, 2011.

RICE, P. J.; ANDERSON, T. A.; COATS, J. R. Degradation and persistence of metolachlor in soil: effects of concentration, soil moisture, soil depth, and sterilization. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 21, p. 2640-2648, 2002.

RUSIECKI, J.A.; HOU, L.; LEE, W.L.; BLAIR, A.; DOSEMECI, M.; LUBIN, J.; BONNER, M.; SAMNIC, C.; HOPPIN, J.A.; SNADLER, D.P.; ALAVANJA, M.C.R. Cancer incidence among pesticide applicator exposed to metolachlor in the agricultural health study, **International Journal of Cancer**, New York, v. 118, p. 3118-3123, 2006.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biololgy and Evolution**, Oxford, v. 4, p. 406–425, 1987.

SINGH, B.K.; WALKER, A.; MORGAN, A.W. WRIGHT, D.J. Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter*strain B-14 and its use in bioremediation od contaminated soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 4855-4963, 2004.

SPALDING, R.F.; EXNER, M.E.; SNOW, D.D.; CASSADA, D.A.; BURBACH, M.E.; MONSON, S.J. Herbicides in ground water beneath Nebraska's mangement systems evalutaion area. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 32, p. 92-99, 2003.

STENERSEN, J. **Chemical pesticides:** mode of action and toxicology. Boca Raton: CRC Press; 2004. p. 276.

TAMURA, K.; DUDLEY, J. MASATISHI, N.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p.1596–1599, 2007.

TORRES, A.R.; ARAÚJO, W.L.; CURSINO, L.; HUNGRIA, M.; PLOTEGHER, F.; MOSTASSO, F.L.; AZAVEDO, J.L. Diversity of endophytic enterobacteria associated with different host plants. **The Journal of Microbiology**, Berlin, v. 46, p.373–379, 2008.

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, p. 944-953, 2007.

VALLOTTON, N.; MOSER, D.; EGGEN, R.I.L.; JUNGHANS, M.; CHÈVRE, N. *S*-metolachlor pulse exposure on the alga *Scenedesmus vacuolatus*: Effects during exposure and the subsequent recovery. **Chemosphere**, Oxford, v. 73, p. 395-400, 2008.

VAN EERD, L.L.; HAOGLAND, R.E.; HALL, J.C. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. **Weed Science**, Ithaca, v. 51, p. 472-495, 2003.

VERMA, A.; ALI, D. ; FAROOQ, M. ; PANT, A.B. ; RAY, R.S. ; HANS, R.K. Expression and inducibility of endosulfan metabolizing gene in *Rhodococcus* strain isolated from earthworm gut microflora for its application in bioremediation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, p. 2979-2984, 2011.

VRYZAS, Z.; ALEXOUDIS, C.; VASSILIOU, G.; GALANIS, K.; PAPADOPOULO-MOURKIDOU, E. Determination and aquatic risk assessment of pesticide residues in riparian drainage canals in northeastern Greece. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 74, p. 174-181, 2011.

VRYZAS, Z., TSABOULA, A.; PAPADOPOULO-MOURKIDOU, E. Determination of alachlor, metolachlor, and their acidic metabolites in soils by microwave-assisted extraction (MAE) combined with solid phase extraction (SPE) coupled qith GC-MS and HPLC-UV analysis. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 30, p. 2529-2538, 2007.

WANG, X.; ZHOU, S.; WANG, H.; YANG, S. Biodegradation of hexazinone by two isolated bacterial strains (WXF-1 and WXF-2). **Biodegradation**, Dordrecht, v. 17, p. 331-339, 2006.

WANG, Y.S.; LIU, J.C.; CHEN, W.C.; YEN, J.H. Characterization of acetanilide herbicides degrading bacteria isolates from tea garden soil. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, p. 435-443, 2008.

XU, J.; YANG, M.; DAI, J.; CAO, H.; PAN, C.; QIU, X.; XU, M. Degradation of acetochlor by four microbial communities. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, p. 7797-7802, 2008.

YANG, C.; LI, Y.; ZHANG, K.; WANG, X.; MA, C.; TANG, H.; XU, P. Atrazine degradation by a simple consortium of *Klebsiella* sp. A1 and *Comamonas* sp. A2 in nitrogen enriched medium. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 21, p. 97-105, 2010.

YOUBIN, S.; TAKAGI, A.; IWASAKI, A.; ZHOU, D. Adsorption, desorption and dissipation of metolachlor in surface and subsurface soils. **Pest Management Science**, Sussex, v. 65, p. 956-062, 2009.

YOUSSEF, N.; SHEIK, C.S.; KRUMHOLZ, L.R.; NAJAR, F.Z.; ROE, B.A.; ELSHAHED, M.S. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental survey. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.16, p. 5227–5236, 2009.

ZHANG, J.; ZHENG, J.W.; LIANG, B.; WANG, C.H.; CAI, S.; NI, Y.Y.; HE, J.; LI, S.P. Biodegradation of chloroacetamide herbicides by *Paracoccus* sp. FLY-8 in vitro. **Journal of Chemistry**, Easton, v. 59, p. 4614-4621, 2011.

3 REGULAÇÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES BACTERIANAS DO ISOLADO *Enterobacter asburiae* SD1 EM RESPOSTA A DIFERENTES FONTES DE CARBONO

Resumo

Na presença de alguns compostos xenobióticos, microorganismos podem apresentar aumento da produção de ERO's, caracterizando o estresse oxidativo, muitas vezes desencadeado pela toxicidade do contaminante. No ambiente de solo, a presença de pesticidas pode ser um fator estressante a microbiota, a qual desempenha um importante papel na manutenção do equilíbrio do ambiente. Porém a diversidade metabólica destes organismos pode desencadear uma resposta adaptativa na qual, além de desenvolver a tolerância, pode haver a formação de novas rotas bioquímicas para uso de pesticidas como fonte alternativa de carbono e nutrientes. O sistema antioxidante desempenha importante papel nesta resposta adaptativa como via bioquímica de estresse global, sendo muitas vezes ativadas juntamente com outras vias, e trabalhando de forma cooperativa a estas. No presente estudo, o isolado bacteriano *Enterobacter asburiae* SD1 teve seu sistema antioxidante analisado quando a bactéria foi cultivada em meios de cultura com diferentes constituições, sendo testadas fontes de carbono simples, como dextrose, e complexa, como o herbicida s-metolachlor. Este herbicida foi escolhido por apresentar alta toxicidade, ser amplamente utilizado e já ser citado em trabalhos de contaminação ambiental. O estudo do sistema antioxidante indicou vias bioquímicas reguladas pela disponibilidade de nutrientes em meio de cultivo, bem como mostrou a existência de vias preferenciais de ativação na presença do herbicida s-metolachlor. Quando cultivado em meio de cultura rico, o isolado bacteriano ativou as vias de resposta a estresse oxidativo concomitantemente a via de metabolização ao herbicida. Porém, em meio mineral, a presença do herbicida como única fonte de carbono afetou a enzima GST, a qual foi ativada anteriormente a via de estresse oxidativo, provavelmente visando reconhecimento e a metabolização do herbicida. Dessa forma, foi possível observar a ativação diferencial das vias estudadas, conforme regulação induzida pela fonte de carbono. A resposta adaptativa de *E. asburiae* SD1 às diferentes constituições de meio de cultura se deu através da regulação de funções globais do metabolismo bacteriano de forma integrada, visando a manutenção da homeostase celular.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; S-metolachlor; Fonte de carbono; Bactéria

2 REGULATION OF BACTERIAL ANTIOXIDANT ENZYME OF THE STRAIN *Enterobacter asburiae* SD1 IN RESPONSE TO DIFFERENT CARBON SOURCES

Abstract

In the presence of xenobiotics, microorganisms can show an increase of ROS (reactive oxygen species) production can lead to oxidative stress. This resulting state of the cell may be related to contaminant toxicity. In the soil, the pesticide presence can be a stress factor on microbial communities, which one has an important role in the environmental balance. However, the metabolic diversity found in microorganisms can triggered an adaptive response and developing a tolerance state, or can activate new biochemical pathway using the pesticide like an alternative carbon and nutrient source. The antioxidant system is essential for the adaptive state as a global stress response, and all most of the time it is activate together other pathways to work cooperatively. In the present work, the strain *Enteorbctaer asburiae* SD1 had analyzed his antioxidant system in culture media with different constitutions. It was tested carbon source with simple structure, as dextrose, and complex structure, as the herbicide s-metolachlor. This pesticide was choose because his high toxicity and global application, and because it is cited in environmental contamination studies. This work related biochemical pathways regulated for nutrient constitution in the culture media, and also showed the preferential pathways of enzymatic activation in the presence of herbicide. On rich medium, the bacteria strain activated both the pathways analyzed, the antioxidant response and the enzyme to recognize and metabolize the herbicide. However, in mineral medium, the presence of only s-metolachlor as carbono source had the GST enzyme activated firstly than the antioxidant response. As the results show, it was possible the preferential activation of specific pathway according to carbon source. The adaptive response of *E. asburiae* SD1 to different conditions of culture medium was done thought the integrated regulation of global functions in the bacterial metabolism, to keep the cell redox homeostasis.

Keywords: Oxidative stress; S-metolachlor; Carbon source; Bacterium

3.1 Introdução

A importância dos pesticidas para o sistema agrícola é indiscutível, pois estes constituem parte dos insumos básicos para esta prática. Milhões de toneladas de pesticidas são aplicadas anualmente, contudo estima-se que menos de 5% desses produtos atinjam o organismo alvo (VAN EERD et al., 2003). Vários destes compostos são aplicados diretamente ao solo, e podem ficar depositado neste ambiente, ou mesmo ser disseminado através do ar ou água (YOUBIN et al., 2009; VRYZAS et al., 2011), vindo a afetar adversamente organismos não-alvos.

A geração de espécies reativas de oxigênio (ERO's) é, inevitavelmente, uma característica de organismos aeróbicos, uma vez que são continuamente produzidas como sub-produtos de vias metabólicas, ou mesmo por sistemas específicos sob delicado controle celular (LUSHCHAK, 2011). Entretanto, em algumas situações específicas, como quando expostos a herbicidas (PETERS, 2011; MARTINS et al., 2011), alguns organismos podem apresentar um desequilíbrio entre a produção e eliminação de ERO's, levando ao estado conhecido como estresse oxidativo (IMLAY, 2008; LUSHCHAK, 2011).

A presença de ERO's no ambiente intra-celular pode acarretar diversos danos, principalmente relacionados a DNA, proteínas e fosfolipídeos (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000; IMLAY, 2008). Porém, mecanismos adaptativos estão sendo revelados em resposta a estresse oxidativo, principalmente em defesa a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido ($^{-\bullet}O_2$).

A bactéria *Escherichia coli* apresenta dois principais mecanismos de defesa, OxyR e SoxRS. O fator transcricional OxyR é ativado em resposta a H_2O_2 e está relacionado ao controle de expressão de pelo menos 8 genes, entre eles o *KatG* (hidroperoxidase I), *gorA* (glutationa-redutase) e *ahpCF* (alkil hidroperoxidase redutase) (MICHÁN et al., 1999). Já o sistema soxRS controla ao menos 10 genes, entre eles o que codifica a enzima superoxido-dismutase (Cu/Zn) (*sodA)*, e ocorre em dois estágios, sendo o primeiro a ativação da proteína SoxR, a qual vai elevar a transcrição de *soxS*, e, consecutivamente interferir na regulação da expressão de outros genes (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000; LUSHCHAK, 2011).

Em recente estudo com *Escherichia coli*, Rui et al. (2010) mostrou forte associação do sistema antioxidante, em especial o regulon SoxRS, com o metabolismo central de carbono. Neste estudo, mudanças específicas nos fluxos metabólicos de alguns compostos relacionados ao metabolismo de carbono

conduziram mudanças sistemáticas na célula, através da regulação da expressão de enzimas chaves ligados à energia e manutenção do estado redox da célula.

Respostas antioxidativas diferenciais de organismos expostos a herbicidas estão sendo relacionadas à adaptação e tolerância a estes contaminantes (CHIANG et al., 2008; DARKÓ et al., 2009; MARTINS et al., 2011). A limitação de nutrientes ou a presença de contaminantes podem ativar uma série de respostas adaptativas em bactérias (VOIGT et al., 2007), visando estimular a aquisição de nutrientes e otimizar o metabolismo destas novas moléculas (KUMAR; SHIMIZU, 2011). É importante compreender as respostas celulares às perturbações ambientais para que seja possível a aplicação de práticas como biorremediação, bem como desenvolvimento de estudos teóricos (KUMAR; SHIMIZU, 2011).

No presente estudo, foi avaliado o efeito do herbicida s-metolachlor no sistema antioxidante do isolado bacteriano *Enterobacter asburiae* SD01, quando cultivado em diferentes meios de cultivo. Inicialmente foi caracterizado o estado de estresse através da produção de peróxido e danos a membrana celular (peroxidação lipídica). Posteriormente, foi estudado o papel das enzimas do sistema antioxidante na defesa contra o estresse, sendo avaliado 4 enzimas: superóxido-dimutase, catalase, glutationa-redutase e glutationa S-transferase. Esta última, além do papel importante na defesa contra estresse oxidativo, também apresenta potencial para degradação de compostos recalcitrantes, e vêm sendo citadas como responsáveis pelas primeiras transformações de agroquímicos.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Condições de cultivo

O experimento foi conduzido com 4 repetições, seguindo delineamento inteiramente casualizado (DIC), com tratamentos diferenciais quanto à composição do meio de cultura (diferentes fontes de carbono) e presença e ausência do herbicida s-metolachlor.

A bactéria *Enterobacter asburiae* SD01 foi cultiva em meio líquido, a 30ºC, sob agitação de 130 rpm, e exposta a 6 tratamentos, tendo como base dois meios de cultura: i) meio rico, contendo 5 g de peptona e 3 g de extrato de levedura e ii) meio mínimo, contendo 2 g $(NH_4)_2SO_4$, 4 g KH_2PO_4, 6 g Na_2HPO_4, 0,2 g $MgSO_4.7H_20$,1

mg $FeSO_4.7H_20$, 10 µg de B (H_3BO_3), 10 µg de Mn ($MnSO_4$), 70 µg de Zn ($ZnSO_4$), 50 µg de Cu ($CuSO_4$), and 10 µg de Mo (MoO_3), por litro de cultura.

Os seis tratamentos foram compostos por: 1) meio rico, 2) meio rico com 1,25 mM de herbicida, 3) meio mínimo, 4) meio mínimo com 10% de dextrose, 5) meio mínimo adicionado 1,25 mM de herbicida e 6) meio mínimo com 10% de dextrose e 1,25 mM de herbicida.

Inicialmente, a bactéria foi cultivada em frascos com 800 mL de meio nutritivo, à 30ºC com agitação de 120 rpm, até atingirem a fase log-média de crescimento (Densidade ótica ≈ 1,0). Após atingir a fase log descrita, o inóculo foi centrifugado a 8000 rpm por 20 min para coleta de células e em seguida, foi realizada 3 lavagens com tampão PBS (tampão fosfato-salino) para retirar resíduos do meio nutritivo. Finalmente, as células foram solubilizadas em meio mineral e divididas em alíquotas para inóculo dos seis tratamentos.

A bactéria ficou exposta aos tratamentos durante 20 min e 12 horas, nas mesmas condições descritas para o pré-inóculo, e após esse período foi realizada nova centrifugação para coleta de células e extração de proteínas solúveis.

Foi realizado o controle do crescimento bacteriano em todas as etapas (Figura 3.1), quando possível através da mensuração da densidade ótica em 600 nm, ou também através da contagem direta de colônias em placas.

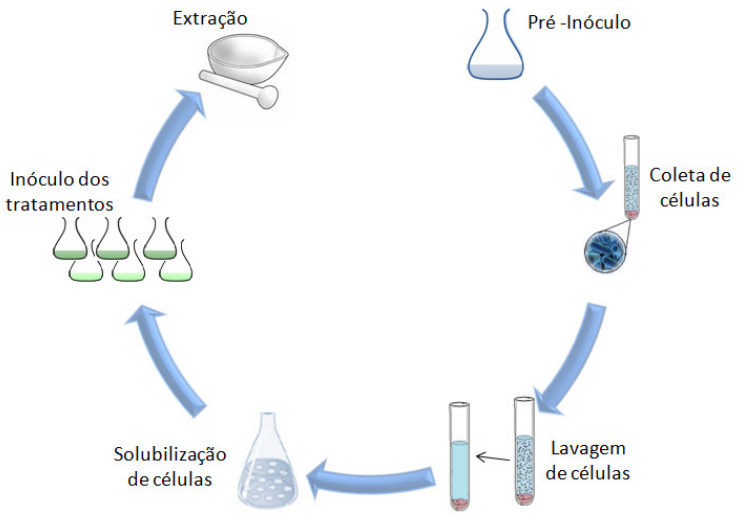


Figura 3.1 - Representação do experimento para as análises bioquímicas

Algumas enzimas do sistema antioxidante podem ser diferentemente induzidas. Por exemplo, as bactérias *Escherichia coli* possuem duas catalases, HPI e HPII,

codificadas respectivamente pelos genes *katG* e *katE*, que apresentam diferença na expressão e, conseqüentemente, no sistema que as controla. Neste caso, é possível observar que as isoformas de CAT apresentam a mesma função, porém são aplicadas de maneira diferente no meio intracelular (FARR; KOGOMA, 1991). Dessa maneira, todas as etapas de coletas de células foram realizadas na mesma fase de crescimento (log-média), para que a resposta encontrada correspondesse predominantemente a diferenças entre os tratamentos.

3.2.2 Viabilidade celular após exposição aos tratamentos

A viabilidade celular em forma de colônias, bem com a inferência quanto a sobrevivência da população do isolado bacteriano nos tratamentos, foi estimado nos dois tempos de exposição, 20 min e 12 h, através de contagem de U.F.C. (unidades formadoras de colônia) em placa.

Inicialmente, logo após o inóculo do isolado *E. asbiriae* SD01 nos tratamentos CN, CNH, MM, MMD, MMH e MMDH, foi realizada diluição seriada de 10^5 e 10^6 em tampão Salino-Fosfato (PBS), e ambas as diluições foram plaqueadas em meio LB Agar, para contagem do número de U.F.C. inicial. Todos os tratamentos tiveram o inóculo inicial analisado para controle e checagem do número de células inicialmente aplicado. Após 20 min e 24 h de incubação a 37 ºC, o número de U.F.C. foi novamente contabilizado através da técnica já descrita de diluição seriada, seguida de plaqueamento.

3.2.3 Extração e determinação de proteínas solúveis

A extração de proteínas foi realizada a 4ºC, conforme descrito por Gomes Júnior et al. (2007). As células bacterianas forma lisadas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, contendo 1 mM EDTA, 3mM DTT e 4% (w / v) de polivinilpirrolidona insolúvel.

Em seguida, as amostras foram centrifugados a 10000 rpm, durante 30 min, à 4ºC, e os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80ºC para análises posteriores. A concentração de proteína foi determinada conforme descrito por Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3.2.4 Variações nos padrões protéicos

As variações nos padrões protéicos foram analisadas por eletroforese em sistema desnaturante, utilizando SDS-PAGE (MARTINS et al., 2011) e corados com Comassie-Blue.

A eletroforese em sistemas SDS-PAGE é empregada em estudos de proteínas, o qual utiliza o agente dissociante dodecil sulfato de sódio (SDS) para desnaturá-las em subunidades. Além disso, a mistura de proteína com o tampão da amostra é aquecida para ocorrer a quebra de ligações dissulfeto.

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

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

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

Após polimerização, foram aplicados aos géis de SDS-PAGE os volumes das amostras correspondentes a concentração de 20 µg de proteína. O volume da amostra é aplicado juntamente com o tampão de amostra (3,0 mL de H_2O destilada, 1,0 mL de tampão de empacotamento, 1,6 mL de glicerol, 1,6 mL de SDS (10%), 0,4 mL de solução 0,5% de azul de bromofenol e 0,4 mL de mercaptoetanol), na proporção de 1:1.

As condições gerais de corrida foram definidas nos ensaios preliminares para obtenção de géis com alta resolução. Os géis foram corridos a uma corrente constante de 15 mA por placa, com tampão de eletrodo constituído por TRIS 250 mM, pH 8,3 acrescido de 1,92 M de glicina e 1% de SDS (10%). Posteriormente, os géis foram corados com Comassie-Blue.

3.2.5 Quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O H_2O_2 é considerado a principal ERO responsável por desencadear a reação da peroxidação lipídica e respostas celulares específicas, e foi quantificado segundo protocolo de Alexieva *et al.* (2001).

As amostras frescas foram maceradas com TCA 0,1% na relação de 1 g/10 mL (w:v). Após a completa homogeneização, foram transferidas para tubos e centrifugados a 10.000 rpm por 15 min, a 4ºC. Do sobrenadante, foi retirado 200 µL ao qual foi adicionado 200 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800 µL de solução 1 M de iodeto de potássio.

Os tubos com a reação foram colocados em gelo e permaneceram no escuro durante uma hora. Após este período, as amostras permaneceram no escuro por 20 min, porém em temperatura ambiente para estabilização da reação, e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40 a 390 nm. A quantidade de H_2O_2 foi expressa em µmol/g de tecido fresco.

3.2.6 Quantificação do produto MDA resultante da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é um processo através do qual as espécies reativas de oxigênio, principalmente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), reagem com os ácidos graxos insaturados da membrana celular, causando danos e liberando produtos tóxicos como aldeídos. Este processo foi determinado através da produção de malondialdeído (MDA), um metabólito reativo a ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), adaptado de Health e Packer (1968).

Amostras biológicas foram maceradas em TCA 0,1% na proporção de 0,1 g/450 µL de tampão, juntamente com 20% de PVPP. Após completa homogeneização, a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 min. Do sobrenadante, foi retirado 0,25 mL e transferido para outro tubo juntamente com 1,0 mL de solução contendo TCA 20% e TBA 0,5%. A mistura foi colocada em banho-seco por 30 min a 95ºC, e na seqüência, resfriada em gelo.

As amostras foram novamente centrifugadas por mais 10 min a 10.000 rpm, e, em seguida, foi realizada leitura em espectrofotômetro à 535 e 600 ηm. A quantidade de MDA foi expressa em µmol/g de tecido fresco.

3.2.7 Análises das enzimas antioxidantes

3.2.7.1 Atividade da enzima SOD

A enzima SOD é responsável pela desintoxicação intracelular do anion O_2^- via reação de dismutação gerando H_2O_2 e O_2. A atividade da enzima SOD foi avaliada em espectrofotômetro e em PAGE não-desnaturante.

3.2.7.1.1 Atividade da enzima SOD em espectrofotômetro

O protocolo para determinação da atividade da enzima SOD (superóxido-dismutase) foi padronizado conforme Giannopolitis & Ries (1977), no qual a atividade é medida pela habilidade da enzima em inibir a redução fotoquímica do composto cloreto de nitroblue tetrazólio (NBT).

A solução de reação (3 mL) foi constituída de 50 mM Tampão fosfato (pH 7.8), 75 µM NBT, 5 µM riboflavina, 13 mM metionina, 0,1 mM EDTA e 150 µl de extrato enzimático. A solução foi adicionada em tubos de vidro, e irradiada com luz branca (lâmpada fluorescente de 15 W) por 5 min. Após esse período de exposição, a solução foi analisada por espectrofotômetro a 560 nm.

3.2.7.1.2 Atividade da enzima SOD em PAGE não desnaturante

A atividade da SOD foi analisada em PAGE não desnaturante (12%), utilizando como padrão 2 unidades de SOD de fígado bovino (Sigma). Após a separação das proteínas por eletroforese, com corrente constante de 20 mA/placa, a atividade de SOD foi determinada como descrito por Beuchamp e Fridovich (1971).

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

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

3.2.7.1.3 Caracterização das isoenzimas de SOD

PAGE nativo foi utilizado para identificação das isoenzimas de SOD. Foi utilizado 200 µg de proteína total para caracterização. A eletroforese ocorreu nas mesmas condições anteriormente descritas para SOD.

Após a corrida, o gel foi dividido verticalmente em três partes. Uma delas foi mantida em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8. A segunda parte foi tratada com 100 mL do tampão fosfato de potássio contendo 0,0292 g de EDTA e 0,0130 g de KCN e a última parte foi imersa em uma solução do referido tampão acrescido de 0,0292 g de EDTA e 70 µL de H_2O_2 a 30%. Todas estas etapas foram realizadas no escuro para prevenir a fotoxidação.

Os géis permaneceram por 20 min nas soluções, e em seguida foram lavados ligeiramente com H_2O destilada e submetidos à revelação com NBT e riboflavina como descrito anteriormente.

Ao final da revelação, as bandas foram analisadas quanto à presença e ausência, 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 era resistente aos dois tratamentos.

3.2.7.2 Atividade da enzima CAT

A atividade da enzima CAT, foi determinada através de espectrofotometria e análise em PAGE não desnaturante (KRAUS et al., 1995; AZEVEDO et al., 1998).

3.2.7.2.1 Atividade da enzima CAT em espctrofotômetro

A atividade foi determinada em uma solução de reação formada por 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 0,025 mL de peróxido de hidrogênio (0,03 %). A reação foi iniciada com 25 µL de extrato protéico, sendo realizada a leitura a temperatura de 25°C, e a atividade determinada pela da decomposição de

peróxido de hidrogênio, através de alterações na absorbância a 240ηm. Os resultados foram expressos em μmol/min/mg de proteína.

3.2.7.2.2 Atividade da enzima CAT em PAGE não-desnaturante

A eletroforese foi realizada a 4°C e a corrente constante utilizada por placa foi de 15 mA. Para cada gel foram aplicadas amostras de padrão de CAT de fígado de boi (2 unidades) e 20 μg de proteína dos extratos das amostras (AZEVEDO et al., 1998).

Revelação: foi realizada a lavagem do gel por 45 min em água deionizada (3 x 15 min) e incubação do mesmo por 10 min em solução de 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 minutos em uma solução de $FeCl_3$ 1% (p/v) e $K_2Fe(CN_6)$ 1% (p/v) sempre com agitação suave. Em seguida, a solução foi retirada e o gel foi documentado.

3.2.7.3 Atividade da enzima glutationa-redutase (GR)

A atividade da enzima GR foi determinada através de espectrofotometria e análise em PAGE não desnaturante conforme proposto por Lee e Lee (2000).

3.2.7.3.1 Atividade da enzima GR em espectrofotômetro

A atividade da GR foi determinada pelo método de espectrofotometria e também em PAGE não-desnaturante. Inicialmente a atividade foi analisada a 30°C em uma mistura de reação consistindo de 1 mL tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), 0,5 mL de 5,5'-dithio-bis(2-ácido nitrobenzóico - DTNB) a 1 mM, 100 μL de glutationa oxidada (GSSG) 1 mM e 100 μL de NADPH 0,1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 50 μL de extrato e monitorada por 1 min através da redução de glutationa oxidada na absorbância de 412 ηm.

3.2.7.3.2 Atividade da enzima GR em PAGE

A revelação para atividade de GR em PAGE foi determinada utilizando como padrão uma unidade de GR de fígado bovino (Sigma Aldrich).

Revelação: o gel foi lavado 2x em água destilada por 15 min e incubado por 30 min a temperatura ambiente, em uma solução de 0,25 M de TRIS (pH 7.5); 10 mg de

MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-brometo de difeniltetrazol); 10 mg DPIP (diclofenol indolfenol); 2,4 mM GSSG e 0,5 mM NADPH para um volume final de solução de 50 mL. Depois de descartar esta solução, o gel foi lavado rapidamente em água deionizada e foi feita a fixação em solução de ácido acético 7%.

3.2.7.4 Atividade da enzima glutationa S-transferase (GST)

A atividade da enzima GST foi realizada por espectrofotometria, através do monitoramento da conjugação da glutationa ao composto CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno). O ensaio foi baseado inicialmente no método proposto por Anderson e Gronwald (1991), com adaptações de Zablotowicz et al. (1995).

O ensaio foi conduzido em um solução contendo 900 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), 25 µL de CDNB 40 mM e 50 µL de GSH 1 M, a qual foi incubada a 30°C. A reação foi iniciada com a adição de 25 µL do extrato de amostra, sendo monitorada por 3 min, a 340 nm.

A solução negativa do ensaio, a qual contém todos os reagentes menos a amostra, também teve sua atividade analisada, sendo este valor descontado da atividade da GST encontrada nos tratamentos. Isso se deve ao controle da reação para a taxa de conjugação espontânea da glutationa ao CDNB.

3.3 Resultados

3.3.1 Queda na viabilidade celular pode indicar adaptação da bactéria a nova condição do meio

A utilização de fontes de carbono por bactérias é realizada por vias específicas em resposta à disponibilidade de carboidratos ou outros compostos, gerando mecanismos que estabelecem certa hierarquia na utilização de compostos para geração de energia (BRÜCKNER; TITGEMEYER, 2002). A disponibilidade de compostos bem como a estrutura destes, podem interferir no metabolismo da bactéria, bem como em funções celulares como crescimento e viabilidade celular.

No presente estudo, a viabilidade das células bacterianas nos tratamentos de meio de cultura com diferentes composições, foi analisada através da contagem de U.F.C após 20 min e 12 h de cultivo, e mostrou-se afetada de diferentes formas pela constituição do meio, sendo geralmente maior no período inicial de cultivo, como mostrado na Figura 3.2. De maneira geral, os tratamentos com composição rica em

nutrientes (CN e CNH) apresentaram valores maiores de viabilidade celular, nos dois períodos analisados, quando comparado com os tratamentos com meio mineral.

A presença do herbicida s-metolachlor em meio rico afetou o crescimento da bactéria negativamente, apesar de ainda assim ser possível observar aumento na viabilidade celular em ambos os tratamentos CN e CNH. Entretanto, a condição de limitação de nutrientes imposta pelo meio mineral afetou drasticamente todos os tratamentos constituídos por este meio, independente da presença do herbicida e do período analisado.

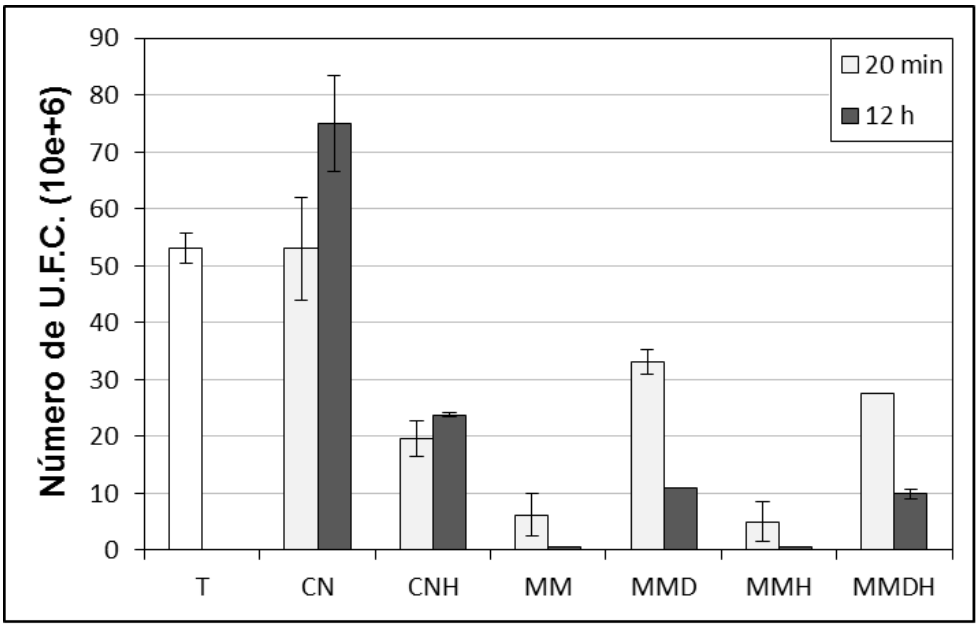


Figura 3.2 – Viabilidade das células do isolado bacteriano *E. asburiae* SD01 exposto a diferentes fontes de carbono. A barra referente ao tratamento "T" mostra o número inicial de células encontrado em todos os tratamentos

A bactéria *E. asburiae* SD01 foi cultivada inicialmente em meio nutritivo, e após iniciar a fase log média, foi transferida para os tratamentos. A mudança de constituição do meio de cultura, principalmente quando exposta aos tratamentos com meio mineral, pode ter levado a declínio da população bacteriana. As maiores diferenças de viabilidade celular após 12 h de cultivo foram encontradas nos tratamentos MM, MMD, MMH e MMDH, com respectivamente 91%, 77%, 91% e 64% de redução no número de U.F.C. Esta queda no número de células da população pode ser decorrente da adaptação à nova condição imposta pela constituição do meio de cultura, bem como a redução da taxa de crescimento.

A exposição de microrganismos a diversos tipos de estresse pode alterar a alocação de nutrientes e modificar algumas funções da célula de forma a amenizar os efeitos negativos da perturbação. Geralmente é possível observar uma interação entre microrganismo e agente causador do estresse, no qual organismos em crescimento ativo podem ser mais vulneráveis ao estresse, que organismos com baixa taxa metabólica. Muitas vezes, microrganismos submetidos a condições de estresse podem reduzir suas rotas de crescimento, buscando a adaptação a nova condição do ambiente, ou mesmo induzindo a tolerância ao estresse cruzado (SCHIMEL et al., 2007).

3.3.2 A adaptação às diferentes constituições de meio de cultura pode ser explicada por baixos níveis de estresse oxidativo

O aumento na concentração de produtos finais advindos da peroxidação lipídica é freqüentemente relacionado a organismos expostos a contaminantes ambientais (LIU et al., 2006; CHURRO et al., 2010; MONTEIRO et al., 2011). No caso de herbicidas da classe cloroacetanilida, esta relação entre contaminante e estresse oxidativo pode ser explicada pelo modo de ação destes pesticidas, a qual está relacionada à inibição de enzimas com grupos tiol e mudança na composição dos ácidos graxos da membrana celular (BÖGER; MATTHES; SCHMALFUB, 2000).

Os maiores níveis de MDA no período de 20 min de exposição foram encontrados nos tratamentos com constituição rica em nutrientes (CN e CNH) e MM, e foi também nestes tratamentos que ocorreram os maiores decréscimos do produto de peroxidação lipídica após longo período de cultivo. Entretanto, se a produção de H_2O_2 for analisada em conjunto, é possível observar a relação direta entre produção de H_2O_2 e dano a membrana (MDA), com exceção do tratamento CN. Neste caso, é importante citar que apesar do H_2O_2 ser uma das principais ERO's responsáveis pela peroxidação lipídica, ela não é a única capaz de causar este dano à membrana celular (HALLIWELL; CHIRICO, 1993).

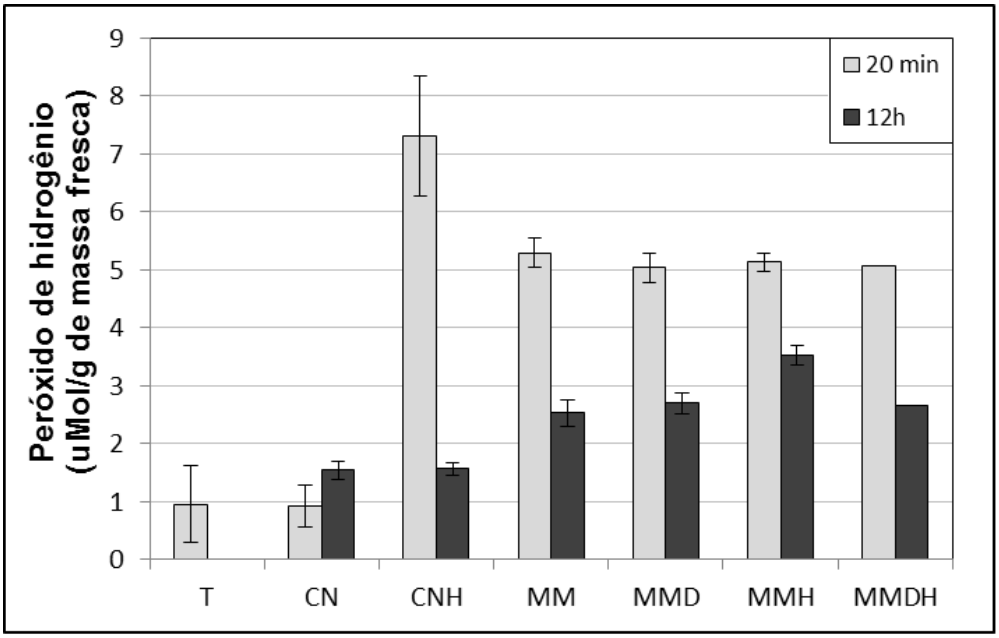


Figura 3.3 – Produção de peróxido de hidrogênio intracelular no isolado bacteriano *E. asburiae* SD01 exposto a diferentes fontes de carbono. A barra do tratamento "T" refere-se à condição inicial, antes da exposição do isolado aos tratamentos

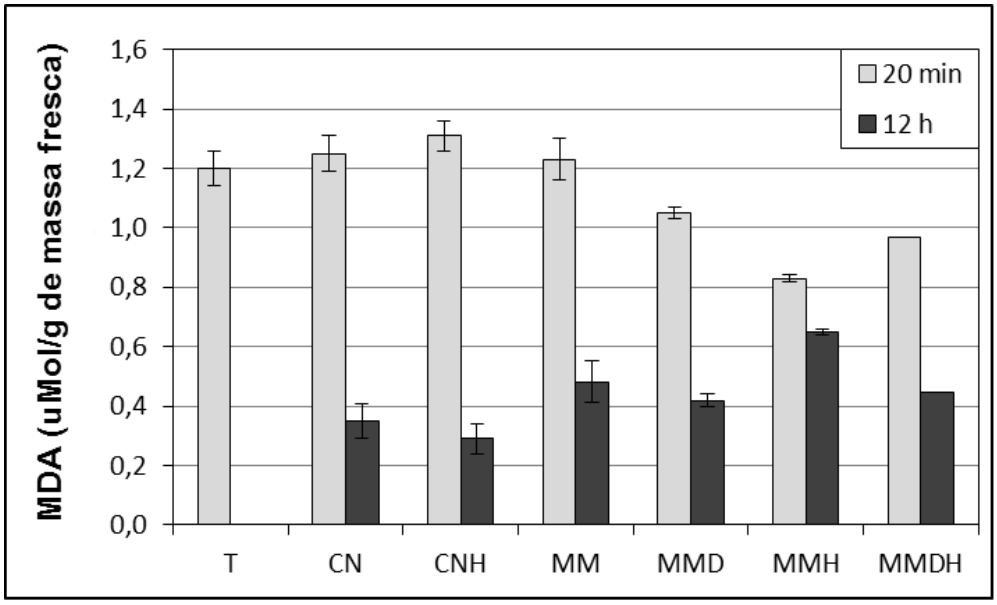


Figura 3.4 – Produção de MDA, inferindo nível de peroxidação lipídica no isolado bacteriano *E. asburiae* SD01 exposto a diferentes fontes de carbono. A barra do tratamento "T" refere-se à condição inicial, antes da exposição do isolado aos tratamentos

Os tratamentos com meio mineral e na presença do herbicida s-metolachlor apresentaram as menores taxas de decréscimo de MDA e H_2O_2 após 12 h de cultivo, como exemplo o tratamento MMH que apresentou redução de apenas 22% e 32%, respectivamente. Uma vez que este tratamento apresenta como única fonte de carbono, o herbicida s-metolachlor, e a utilização deste composto para obtenção de

energia pode estar acarretando danos a membrana. Esses dados contrastam com o tratamento CNH, com constituição rica, no qual a diminuição da produção de MDA e H_2O_2 foi em torno de 80%.

Além de serem considerados inibidores gerais de enzimas contendo grupos tióis, muitas delas envolvidas na resposta antioxidante celular, herbicidas cloroacetanilidas, como s-metolachlor, também induzem alterações na composição lipídica da membrana celular através de mudanças na proporção de ácidos graxos saturados e insaturados (BÖGER; MATTHES; SCHMALFUB, 2000). Neste caso, as alterações na estrutura da membrana celular podem induzir taxas maiores de produção de MDA, uma vez que pode aumentar a proporção de ácidos graxos insaturados da organela, e torná-la mais susceptível ao ataque de ERO's.

A viabilidade celular está relacionada à capacidade adaptativa da célula em administrar as vias metabólicas na obtenção de energia para manutenção das funções biológicas como crescimento, pois estes processos apresentam relação direta através da eficiência e complementaridade dos mesmos. A queda na produção de H_2O_2 intracelular, e conseqüentemente a diminuição dos danos causados por essa ERO à membrana, podem refletir a adaptação do aparato celular às diferentes constituições de meio de cultura. Esses dados, juntamente com a queda na viabilidade celular, podem inferir na busca da célula por balanço positivo energético, no qual o equilíbrio se faz entre a utilização de fontes de carbono para obtenção de energia e manutenção da taxa de crescimento.

Esses dois processos estão relacionados a uma trama de reações e vias bioquímicas, compatíveis com a complexidade das fontes de carbono disponíveis nos tratamentos testados. Entre estas vias se encontra aquelas relacionadas ao combate ao estresse oxidativo, o que além de ajudar a célula na manutenção da homeostase redox, ainda está relacionada à ativação de genes e vias específicas que podem acontecer em conjunto com a metabolização do herbicida.

3.3.3 A presença do herbicida s-metolachlor no meio de cultura causa alteração na expressão de proteínas

Em bactérias, a adaptação à presença de ERO's ocorre geralmente pelo controle da expressão de genes com funções relacionadas ao sistema antioxidante, reparo de DNA, e proteínas de manutenção da homeostase celular (MONGKOLSUK; HELMANN, 2002). Essas respostas são coordenadas por fatores transcricionais que

regulam especificamente genes alvo, e que sob condições de estresse, como exposição a substâncias tóxicas, podem ter sua expressão aumentada.

O isolado bacteriano *E. asburiae* SD01 apresentou diferenças na concentração de proteínas totais solúveis quando exposto a meios de cultura com diferentes fontes de carbono (Figura 3.5). Somente os tratamentos MM e MMDH não apresentaram diferenças na concentração de proteínas entre os tempos analisados, sendo que para os outros tratamentos, houve aumento na síntese protéica com 12 h de cultivo.

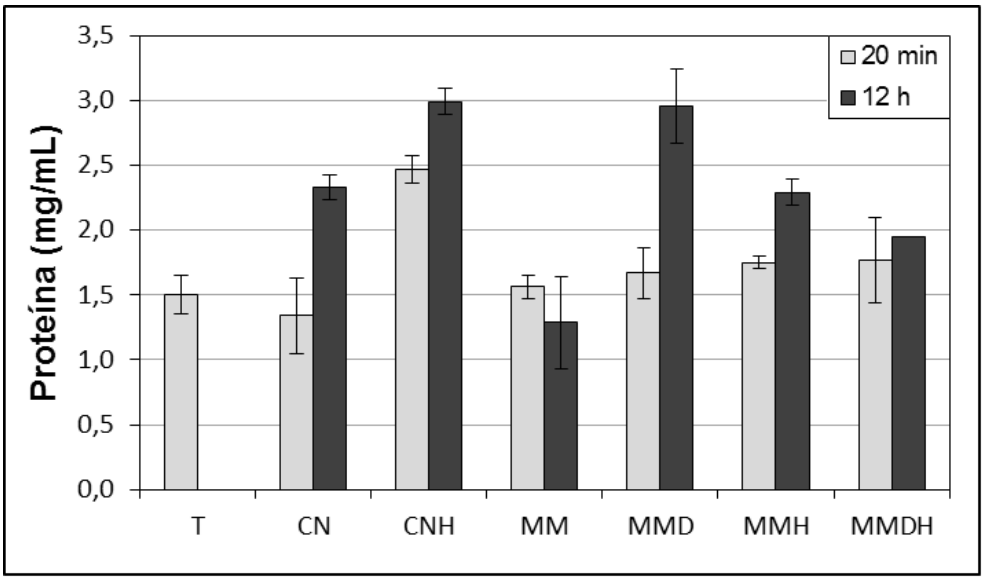


Figura 3.5 - Concentração de proteínas totais solúveis do isolado bacteriano *E. asburiae* SD01 exposto a diferentes fontes de carbono

Em estudo com a bactéria *Variovorax* sp. WDL1 exposta ao herbicida linuron e 3,4-dicloroanelida, pesquisadores mostraram através de análise proteômica (2D-PAGE), que proteínas com função de dobramento, transporte e degradação do herbicida, bem como algumas envolvidas na resposta a estresse, podem apresentar expressão diferencial na presença do contaminante (BREUGELMANS, et al. 2010).

Conforme a análise de SDS-PAGE (Figura 3.6), houve diferenças qualitativas significativas quanto à expressão diferencial de proteínas entre os tratamentos e períodos analisados, principalmente na presença do herbicida s-metolachlor.

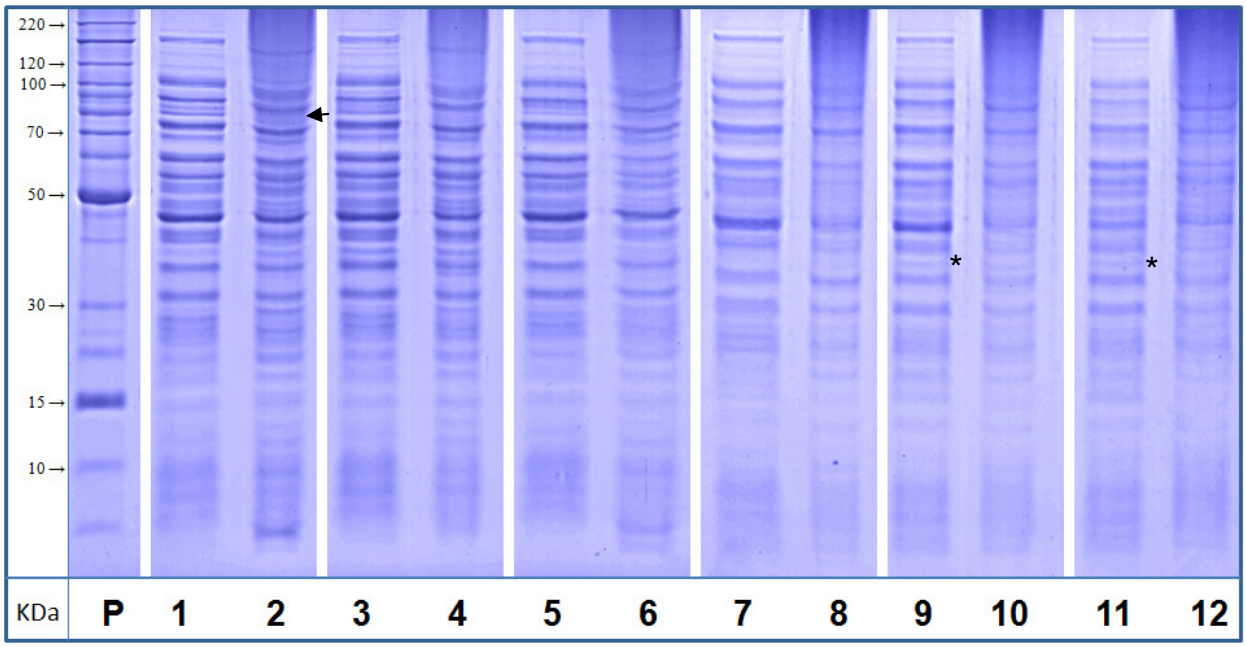


Figura 3.6 - SDS-PAGE, Padrão de massa molecular (P). Todos os tratamentos foram analisados em dois tempos de cultivo: 20 min e 12 h, sendo representados em canaletas consecutivas para a mesma amostra. As amostras de 1 a 4 representam *E. asburiae* em meio nutritivo: 1 e 2 na ausência de herbicida (CN), e amostras 3 e 4, na presença de 1,25 mM de herbicida (CNH). As amostras de 5 a 12 representam a bactéria cultivada em meio mineral, sendo 5 e 6, na ausência de fonte de carbono (MM), 7 e 8, com 10 % de dextrose (MMD), 9 e 10, com 1,25 mM de s-metolachlor (MMH) e 11 e 12 na presença de 10% de dextrose juntamente com 1,25 mM de herbicida (MMDH)

* Indução de nova banda

◄ Inibição de banda

O perfil protéico mostrou intensidades de bandas diferentes entre os meios de cultura em um mesmo tempo analisado (canaletas 1, 3, 5, 7, 9 e 11 para 20 min de exposição, ou 2, 4, 6, 8, 10 e 12 para 12 h de exposição). Houve também diferenças qualitativas causadas pela presença do herbicida s-metolachlor com o aparecimento de novas bandas nos tratamento MMH e MMDH (Figura 2.6, asteriscos) ou mesmo a inibição de proteínas, representada pela seta no tratamento CNH (Figura 3.6). Dominguez-Cuevas et al. (2006), trabalhando com a bactéria *Pseudomonas putida* KT2440 exposta ao tolueno, mostraram que algumas proteínas, como aquelas envolvidas com metabolismo energético, podem mostrar regulação negativa quando expostas a substâncias tóxicas.

Além das alterações citadas, foi possível observar que o padrão de expressão de proteínas entre os tempos difere (por exemplo, canaletas 1 e 2, ou 5 e 6, figura 3.6), caracterizando a fase de crescimento em que o isolado bacteriano se encontrava quando analisado nos dois períodos. Algumas enzimas, como a catalase em *Escherichia coli*, apresentam isoformas que atuam em períodos diferentes de

crescimento, as quais podem apresentar vias de regulação específicas e ativadas por fatores transcricionais que atuam de maneira independente para indução dos genes *KatE* e *KatG* (JUNG; KIM, 2003).

O metabolismo central de carbono é um mecanismo regulatório do fluxo global celular, visando a otimização da utilização de fontes de carbono disponíveis. Em bactérias expostas a diferentes fontes de carbono, o mecanismo de repressão do catabolismo de carbono direciona a célula para uso preferencial de uma das fontes, em geral glicose (DEUTSCHER, 2008). Este mecanismo tem sido estudado em associação com estresse oxidativo, resultando em uma análise de fluxo metabólico, no qual ajustes fisiológicos da célula ocorrem em resposta à fonte de carbono preferencialmente utilizada, juntamente com mudanças nas vias bioquímicas induzidas pelo estresse oxidativo (RUI et al., 2010).

A condição metabólica da fase de crescimento do período em que as células foram coletadas (tempo inicial - T) foi compatível com os padrões de resposta encontrados para o tratamento CN após 20 min de exposição ao tratamento, como foi possível observar nas análises iniciais de quantificação de peróxido de hidrogênio, proteínas e MDA, sendo dessa forma não representado nos ensaios enzimáticos descritos a seguir.

3.3.4 A enzima SOD apresenta uma nova isoforma induzida somente na presença do herbicida s-metolachlor

O anion superóxido é continuamente gerado por reações adversas de óxido redução de enzimas redox (IMLAY, 2008) ou mesmo pela atividade aeróbica do metabolismo. Estudos com a bactéria *E. coli* indicam que um nível basal da enzima SOD é expresso continuamente para manter a concentração de superóxido em níveis não tóxicos para a célula (GORT; IMLAY, 1998).

Uma vez que o superóxido não é capaz de atravessar membranas, a única situação que eleva a concentração deste anion no meio intracelular, bem como a indução da enzima SOD, são condições nas quais drogas com potencial redox induzem estresse oxidativo após serem transportadas para o interior da célula (HASSAN; FRIDOVICH, 1979). Sendo assim, o isolado bacteriano *E. asburiae* SD01 foi exposto ao herbicida s-metolachlor, bem como a diferentes composições de meio de cultura, para testar o potencial redox dessas condições de cultivo.

Conforme figura 3.7, a bactéria *E. asburiae* SD01 apresentou diferença no padrão de resposta da atividade total de SOD conforme a constituição do meio de cultura e período analisado. Quando cultivada em meio rico (CN e CNH), a bateria mostrou aumento na atividade após 12 h de cultivo, com valores em geral maiores na presença do herbicida s-metolachlor.

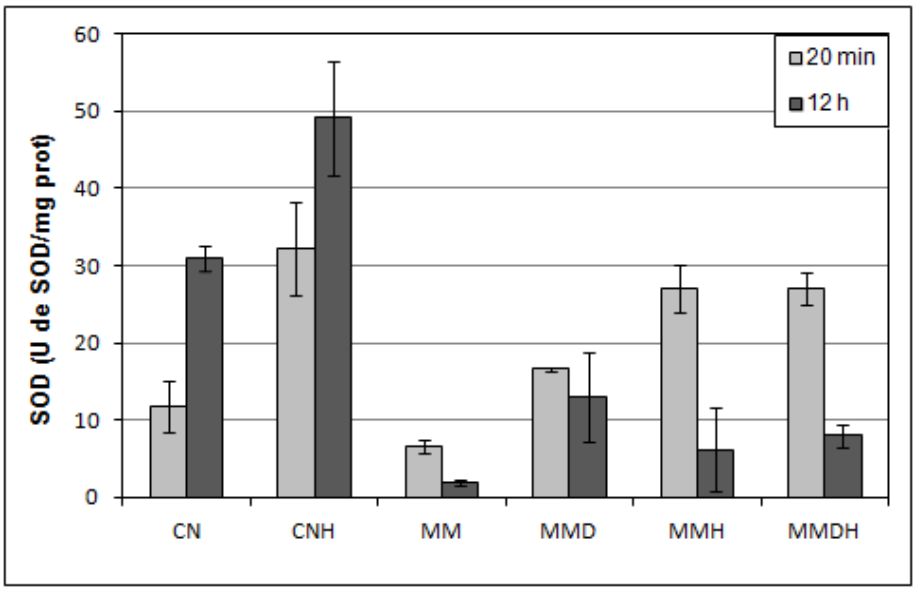


Figura 3.7 - Atividade total de SOD do isolado bacteriano *Enterobacter asburiae* SD01 exposto a diferentes fontes de carbono

Entretanto, quando a bactéria foi cultivada em meio mineral, o oposto foi observado. A atividade total da enzima SOD diminui após 12 h de cultivo, sendo esta resposta mais drástica quando o herbicida era constituinte do meio de cultura (Figura 3.7). Em exposição ao contaminante ambiental succinonitrila, a bactéria *Klebsiella oxytoca* apresentou indução da atividade da enzima SOD e GST (glutationa S-transferase) em resposta ao estresse oxidativo característico da toxicidade do composto (TANG et al., 2008). Esta indução da atividade de SOD foi relacionada ao combate ao estresse oxidativo, bem como a eficiência de bidegradação do contaminante succinonitrila.

Na análise em PAGE, o isolado bacteriano apresentou um total de 5 isoformas de SOD, entretanto somente 4 isoformas (I, III, IV e V) apresentaram expressão em todos os tratamentos (Figura 3.8). As isoformas representadas pelas bandas I, III e IV apresentaram atividade independente do período analisado, porém a isoforma V, apresentou variação de atividade entre os períodos, tendo maior atividade com 12 h de cultivo (Figura 3.8).

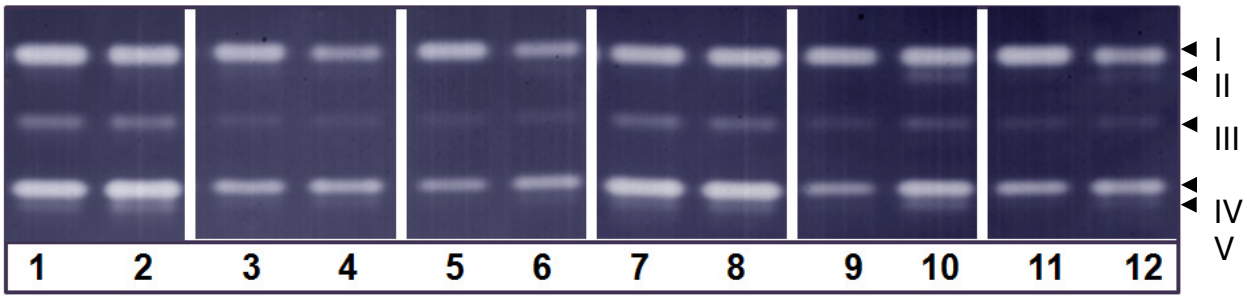


Figura 3.8 - SOD-PAGE. Todos os tratamentos foram analisados em dois tempos de cultivo: 20 min e 12 h, sendo representados em canaletas consecutivas para a mesma amostra. As amostras de 1 a 4 representam *E. asburiae* em meio nutritivo: 1 e 2 na ausência de herbicida (CN), e amostras 3 e 4, na presença de 1,25 mM de herbicida (CNH). As amostras de 5 a 12 representam a bactéria cultivada em meio mineral, sendo 5 e 6, na ausência de fonte de carbono (MM), 7 e 8, com 10 % de dextrose (MMD), 9 e 10, com 1,25 mM de s-metolachlor (MMH) e 11 e 12 na presença de 10% de dextrose juntamente com 1,25 mM de herbicida (MMDH)

A útlima isoforma descrita (banda II), merece atenção especial, pois foi induzida somente na presença do herbicida s-metolachlor, ou mesmo na ausência de fonte de carbono (Figura 3.8). Apesar da baixa atividade no meio CNH, ela esteve presentes nos dois períodos analisados, sendo que nos tratamentos com meio mineral, MMH e MMDH, a atividade só foi observada após 12 h de cultivo, conforme protocolo seguido.

Bactérias geralmente apresentam uma ou duas isoformas de SOD, sendo essas compostas pelos metais Mn ou Fe, localizadas no citosol da célula. Porém, ainda é possível observar outros dois tipos da enzima, a Cu/ZN-SOD, geralmente localizada no espaço periplasmático, e a Ni-SOD, recentemente isolada (IMLAY, 2008).

A figura 3.9 mostra a classificação das cinco isoformas de SOD do isolado bacteriano *E. asburiae* SD01. Duas isoformas apresentaram Mn em seu núcleo (Mn-SOD) (bandas I e II), sendo uma delas induzida somente na presença do herbicida (banda II), e 3 isoformas classificadas como Fe-SOD, representadas pelas bandas III, IV e V. Estudos relatam que em *E. coli,* a isoforma Mn-SOD, também conhecida como SodA, pode ser induzida na presença de xenobióticos, especialmente compostos aromáticos, uma vez que é regulada pelo sistema SoxRS, um regulon que controla cerca de 100 genes em bactérias, entre estes genes de metabolização de contaminantes (IMLAY, 2008).

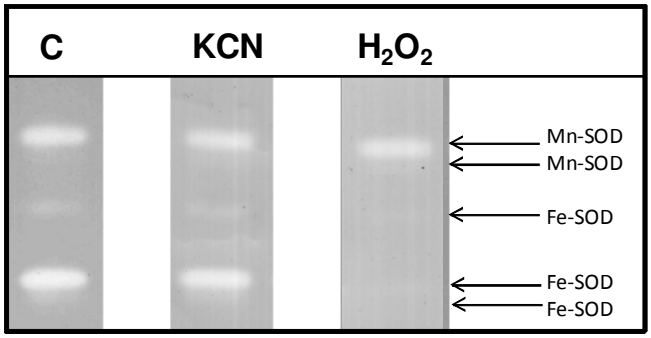


Figura 3.9 - Caracterização das isoformas de SOD em PAGE, conforme protocolo de Beuchamp e Fridovich (1971)

Em um estudo com o herbicida quinclorac, a bactéria *Burkholderia cepacia* WZ1 apresentou indução da atividade da enzima Mn-SOD quando exposta ao herbicida. Esta isoforma tem sido reportada por ter sua atividade modulada por estresse oxidativo, sendo que a Mn-SOD foi exclusivamente expressa quando a linhagem WZ1 foi cultivada na presença do quinclorac (LI et al., 2009). Esses dados, juntamente com os apresentados no presente trabalho, sugerem que a isoforma Mn-SOD tem papel especial contra o estresse oxidativo gerado por contaminantes.

3.3.4 A enzima CAT apresenta maior atividade em meio rico e com 12 h de cultivo

Peróxido de hidrogênio é prejudicial para quase todos os componentes da célula, e devido a isso, a eficiente remoção desta ERO é de importância essencial para os organismos (ZAMOCKY; FURTMÜLLER; OBINGER, 2008). Ele é formado naturalmente durante o crescimento celular aeróbico, como produto de reações redox, sendo as flavoproteínas apontadas como principais fontes de H_2O_2 no interior da célula. Essa constatação vem de estudos que mostram a abundância dessas proteínas e a características de serem passíveis de sofrer reação univalente da transferência de elétrons (MESSNER; IMLAY, 1999).

Apesar da AhpC (alquilhidroperoxidase redutase) ser considerada a primeira enzima de degradação de H_2O_2 em *E. coli*; a catalase HPI, codificada pelo gene *katG*, é responsável pela varredura de concentrações altas de H_2O_2 (SEAVER; IMLAY, 2001), sendo estas geralmente produzidas por substâncias tóxicas.

Como foi possível verificar altos níveis de H_2O_2 gerados pelos tratamentos nos quais o isolado bacteriano *Enterobacter asburiae* SD01 foi exposto, a atividade total

da enzima catalase foi analisada visando encontrar o papel desta enzima na resposta antioxidante às diferentes constituições dos meios de cultura testados.

Na análise em espectrofotômetro, a atividade total de CAT (Figura 3.10) apresentou variação significativa somente no meio nutritivo, sendo que em meio mineral (MM, MMD, MMH e MMDH) a diferença de atividade entre os períodos analisados ou tratamentos foi pouca ou ausente. Nos 20 min iniciais de exposição ao herbicida, a bactéria não apresentou diferenças significativas entre a atividade de CAT, apresentando níveis basais de atividade em todos os tratamentos.

Porém, quando a bactéria foi cultivada por longo período (12 h), a atividade da CAT aumentou significativamente nos tratamentos CN e CNH, apresentando leve queda no tratamento MMD, e mantendo os níveis de atividade nos demais tratamentos.

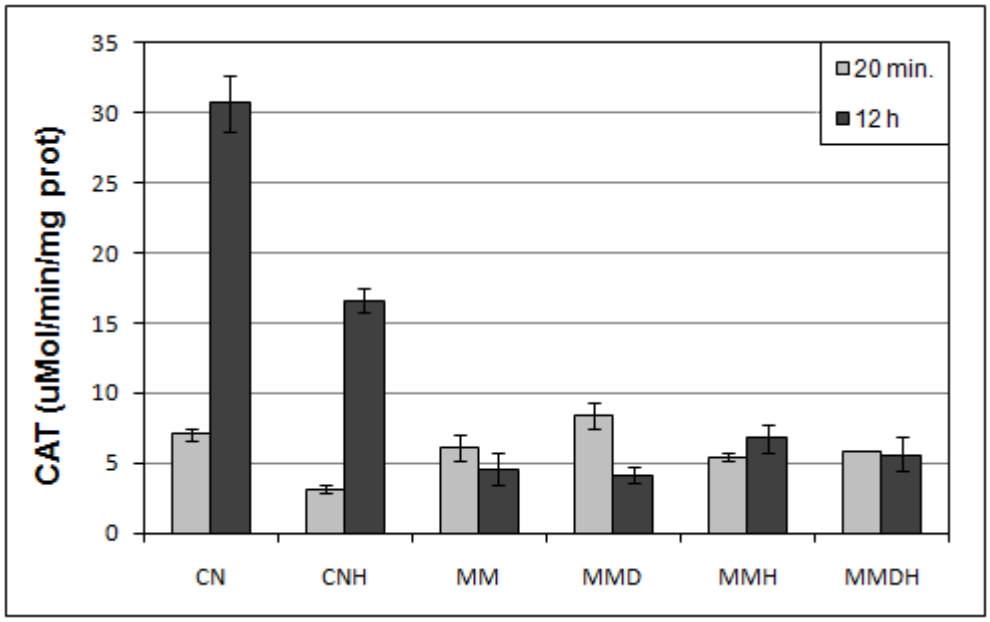


Figura 3.10 - Atividade total de CAT do isolado bacteriano *Enterobacter asburiae* SD01 exposto a diferentes fontes de carbono

O aumento da atividade de CAT no tratamento CNH pode ter sido induzido pela alta concentração de H_2O_2 observada com 20 min de cultivo do isolado bacteriano, como mostra a figura (Figura 3.3). A degradação da ERO, por sua vez, pode ter levado a diminuição da taxa de peroxidação lipídica (Figura 3.4), e conseqüente adaptação ao meio de cultura. Isolados bacterianos expostos aos herbicidas acetochlor e metolachlor, tiveram a atividade de CAT, bem como outras enzimas do sistema antioxidante, induzidas na presença dos contaminantes, o que os autores do

trabalho relacionaram ao estresse oxidativo causado pela presença dos contaminantes e a tolerância das bactérias aos herbicidas (MARTINS et al., 2011).

Entretanto, a diferença de padrão de resposta da atividade de CAT entre os tratamentos com meio nutritivo e mineral pode ter relação com o controle do metabolismo de carbono, bem como a ativação de vias específicas para adaptação às mudanças ambientais. Em trabalho publicado por Rui et al. (2010), as respostas celulares da bactéria *E. coli* ao estresse oxidativo gerado pelo herbicida paraquat foram moduladas pelo metabolismo de carbono. O estudo aponta uma rede coordenada de resposta, com fluxos metabólicos de carbono específicos para ajustes ao estado fisiológico da célula em determinada condição de cultivo.

As enzimas peroxidases e catalases são reguladas por vias bioquímicas diferentes em bactérias (IMLAY, 2008), controladas de acordo com a fase de crescimento e tipo de estresse. Dessa forma, no presente trabalho, as redes metabólicas que coordenam a indução das enzimas que combatem o H_2O_2 podem estar sendo ativadas de maneira diferenciada através do fluxo metabólico gerado pela adaptação ao meio de cultura.

A análise da CAT em PAGE (Figura 3.11) confirmou os resultados obtidos via espectrofotômetro, porém com dados qualitativos. Aos 20 min, duas bandas estavam sendo expressas em todos os tratamentos. Porém, com aumento do tempo de cultivo, a bactéria apresentou a indução de uma nova banda, provavelmente relacionada ao período de crescimento, uma vez que foi expressa em todos os tratamentos, independente da constituição (canaletas 2, 4, 6, 8, 10 e 12).

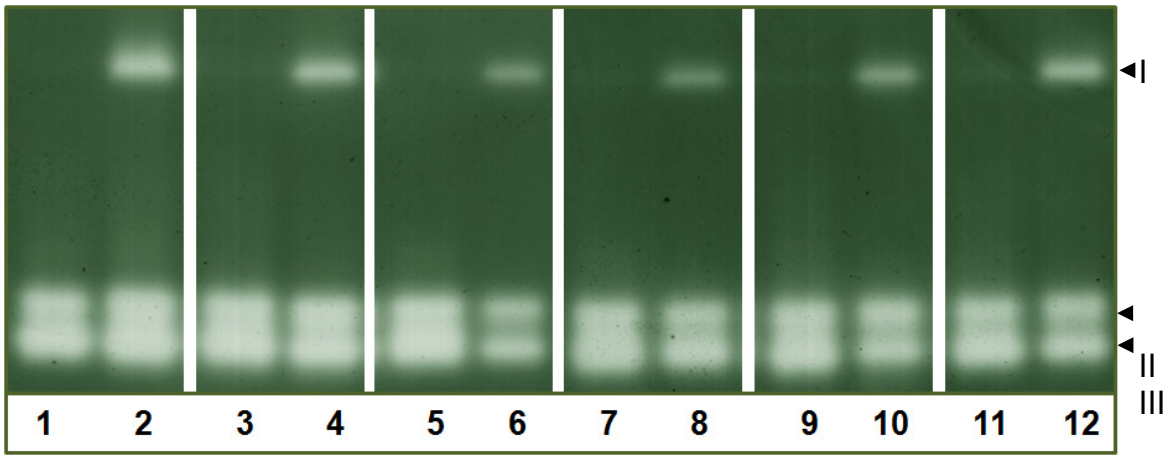


Figura 3.11 - CAT-PAGE. Todos os tratamentos foram analisados em dois tempos de cultivo: 20 min e 12 h, sendo representados em canaletas consecutivas para a mesma amostra. As amostras de 1 a 4 representam *E. asburiae* em meio nutritivo: 1 e 2 na ausência de herbicida (CN), e amostras 3 e 4, na presença de 1,25 mM de herbicida (CNH). As amostras de 5 a 12 representam a bactéria cultivada em meio mineral, sendo 5 e 6, na ausência de fonte de carbono (MM), 7 e 8, com 10 % de dextrose (MMD), 9 e 10, com 1,25 mM de s-metolachlor (MMH) e 11 e 12 na presença de 10% de dextrose juntamente com 1,25 mM de herbicida (MMDH)

O aumento da atividade total com 12 h de cultivo em meio nutritivo pode estar relacionado ao aumento da atividade das 3 isoformas de CAT de modo semelhante, uma vez que a indução de uma nova isoforma com 12 h não trouxe incremento da atividade nos tratamentos com meio mineral, e por isso esta não pode ser responsável pela diferença observada.

Além disso, o aumento da atividade de CAT no meio nutritivo (CN e CNH) após 12 horas de crescimento foi acompanhado do aumento na atividade da enzima SOD, no mesmo período. A justificativa pode estar no sincronismo entre as enzimas CAT e SOD, uma vez que um aumento da atividade de SOD pode induzir a atividade de CAT, devido à formação de H_2O_2 como produto de reação da primeira enzima.

Dessa forma, é possível compreender que o sistema antioxidante trabalha de maneira sistêmica, coordenando atividades de enzimas e proteínas visando o combate ao estresse e a manutenção da homeostase redox celular. Porém, além do efeito negativo das ERO's no metabolismo celular, estas também podem participar como sinalizadores celulares. Em bactérias, o H_2O_2 está envolvido na sinalização celular para ativação de regulons do sistema antioxidante, como o OxyR, um fator transcricional que atua no controle de enzimas para varredura de ERO's, importação de íons, ou mesmo na redução de compostos não enzimáticos.

Em *E. coli*, a catalase (HPI), juntamente com outras enzimas antioxidantes (IMLAY, 2008), são ativadas pelo regulon OxyR, de forma que o aumento do H_2O_2 no isolado bacteriano *E. asburiae* SD01 poderia também estar interferindo na atividade das enzimas controladas por esse regulon, como a glutationa redutase (GR).

3.3.5 A enzima GR apresentou alta variabilidade, apresentando 5 isoformas presentes em todos os tratamentos

Em procariotos, a glutationa é encontrada principalmente em bactérias gram-negativas, como *E. coli*, e é responsável, juntamente com outros componentes de baixo peso molecular do grupo tiol, pela manutenção da homeostase redox celular (SMIRNOVA; OKTYABRSKY, 2005). Pode ser encontrada na sua forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG), sendo que esta relação depende da dinâmica entre sua síntese, decomposição, transporte e reações redox, o que vão refletir o estado celular e condições ambientais que o organismos está exposto.

Mudanças nos níveis de glutationa podem ser observadas em condições normais de crescimento, entretanto, estresse, defeitos genéticos ou ação de algumas substâncias químicas podem causar mudanças nestes níveis. A redução da glutationa é realizada pela enzima glutationa-redutase (GR), a qual catalisa a transferência de equivalentes redutores do NADPH para GSSG.

Além dos aspectos já mencionados sobre importância da glutationa e GR para a célula, reações de conjugação da glutationa com pesticidas têm sido sugeridos como uma importante via bioquímica de transformação destes contaminantes (FIELD; THURMAN, 1996). Dessa forma, a enzima GR foi analisada visando compreender o efeito do pesticida, bem como das diferentes composições dos meios de cultura, na atividade desta enzima no isolado bacteriano *E. asburiae* SD01.

Inicialmente, é possível observar que todos os tratamentos partiram de um mesmo nível de atividade de GR (Figura 3.9), e que após 12 h de cultivo, o isolado bacteriano *E. asburiae* SD01 apresentou padrões diferentes de atividade de GR entre os tratamentos.

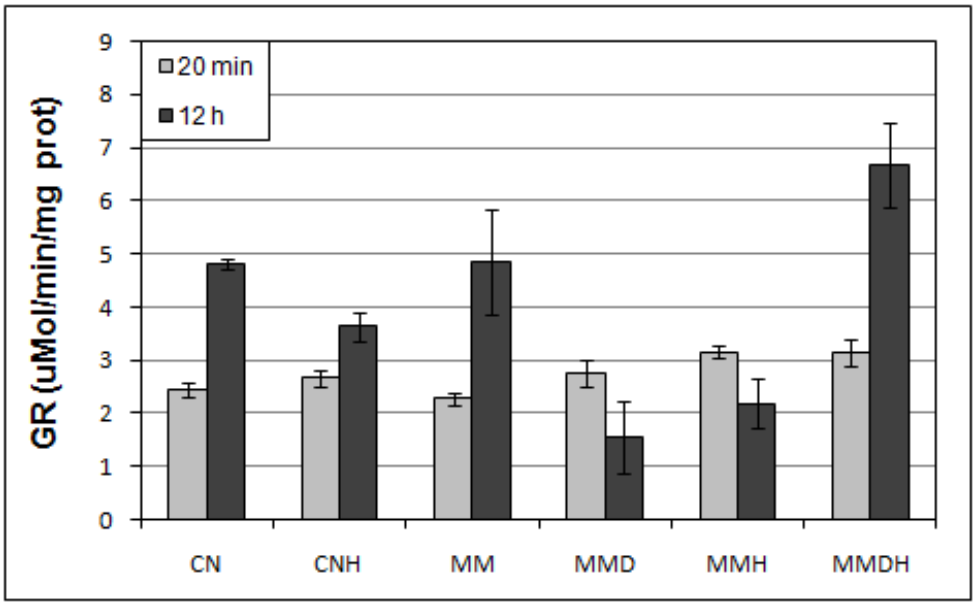


Figura 3.9 – Atividade total de GR analisada no isolado bacteriano *E. asburiae* SD01 em diferentes composições de meio de cultura. CN e CNH, meio nutritivo na ausência e presença do herbicida s-metolachlor, MM, MMD, MMH e MMDH, meio mineral na ausência de fonte de carbono (MM), com 10 % de dextrose (MMD), com 1,25 mM de s-metolachlor (MMH) e na presença de 10% de dextrose juntamente com 1,25 mM de herbicida (MMDH)

O longo período de crescimento da bactéria mostra uma tendência de aumento da atividade de GR nos tratamentos com meio nutritivo, além dos tratamentos MM e MMDH. A bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans*, mantida em contato com calcopirita, mostrou aumento da atividade de GR após 10 dias de cultivo, sendo que a análise da atividade enzimática em curto período de exposição, não mostrou diferença significativa na atividade da enzima (RODRIGUES et al., 2010).

Entretanto, a bactéria *E. asburiae* SD01 não apresentou aumento da atividade de GR em todos os tratamentos, uma vez que os tratamentos com única fonte de carbono, MMD e MMH, apresentaram queda na atividade desta enzima. O impacto do pesticida molinato em cianobactéria (*Nostoc muscorum*) foi reportado por Galhano e colaboradores (2011), de forma que após 72 h de exposição, a cianobactéria teve queda na atividade de GR, refletindo em baixos níveis de conversão da glutationa oxidada em reduzida. A depleção da atividade de GR também pode estar associada com a diminuição dos níveis de NADPH, uma manifestação secundária de estresse causado por radicais livres (LATIFI et al., 2009).

Já a análise da atividade de GR em PAGE (Figura 3.10) revelou 4 isoenzimas, presentes em todos os tratamentos. As bandas I e III mostraram maior atividade, sendo que as variações de atividade entre os tratamentos foram encontradas

principalmente nas bandas II e IV. O maior valor de atividade de GR foi encontrado no meio MMDH, após 13 horas de crescimento, o que pode ser visto também na análise em PAGE que refletiu em aumento da intensidade das bandas na canaleta 12, representativa do tratamento citado.

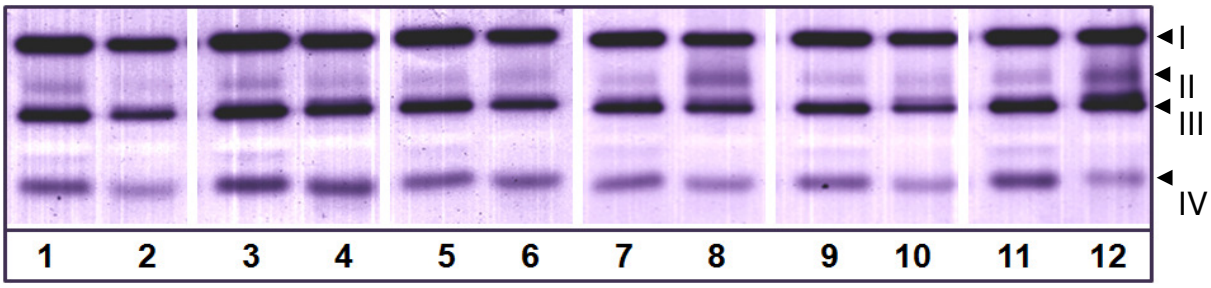


Figura 3.10 - CAT-PAGE. Amostras de 1 a 4 representam *E. asburiae* SD01 em meio nutritivo, sendo dois tratamentos analisados em dois tempos de cultivo, 20 min e 12 h: canaletas 1 e 2, na ausência (CN) e canaletas 3 e 4, na presença de 1,25 mM de herbicida (CNH. As amostras de 5 a 12 representam a bactéria em meio mineral, em 4 composições diferentes e analisados em dois tempos de cultivo 20 min e 12 h de cultivo: canaletas 5 e 6, ausência de fonte de carbono (MM), canaletas 7 e 8, com 10 % de dextrose (MMD), canaletas 9 e 10, com 1,25 mM de s-metolachlor (MMH) e canaletas 11 e 12, na presença de 10% de dextrose juntamente com 1,25 mM de herbicida (MMDH)

A enzima GR é codificada pelo gene *gor*, o qual apresenta alta homologia e mesmo sendo isolada de diferentes organismos, é possível observar regiões altamente conservadas da proteína. A bactéria *E. coli* com mutações no gene *gor*, mantém suas rotas normais de crescimento, bem como considerados níveis de glutationa reduzida (GREER; PERHAM, 1986).

Alguns trabalhos sugerem que existe uma via alternativa para redução da GSSG (glutationa oxidada), independente da enzima glutationa redutase (CARMEL-HAREL; STORZ, 2000). Porém, mesmo que a função de manutenção da homeostase celular redox possa ser mantida por outros componentes não enzimáticos, como glutaredoxina e tioredoxina, nenhum trabalho mostrou que a glutationa pode servir de substrato para outra enzima.

3.3.6 A enzima GST apresentou aumento da atividade nos tratamentos CNH e MMH após longa exposição ao herbicida s-metolachlor

Os valores encontrados para a atividade da enzima GST apresentaram variabilidade entre os tratamentos (Figura 3.11), e apesar dos baixos valores, estão de acordo com os publicados em trabalhos envolvendo este enzima e microrganismos (ZABLOTOWICZ et al., 1995; LIZIKA et al., 1989).

A glutationa reduzida (GSH) é doadora do grupo tiol para a enzima GST, a qual catalisa a conjugação deste grupo com uma gama de substratos hidrofóbicos eletrofílicos (DIXON; LAPTHORN; EDWARDS, 2002). Seu principal papel no metabolismo celular é a desintoxicação quando o organismo é exposto a contaminantes, porém outras funções podem ser encontradas para este enzima, como peroxidase (BARTLING, D. et al., 1993) e transporte vacuolar (MARRS et al., 1995).

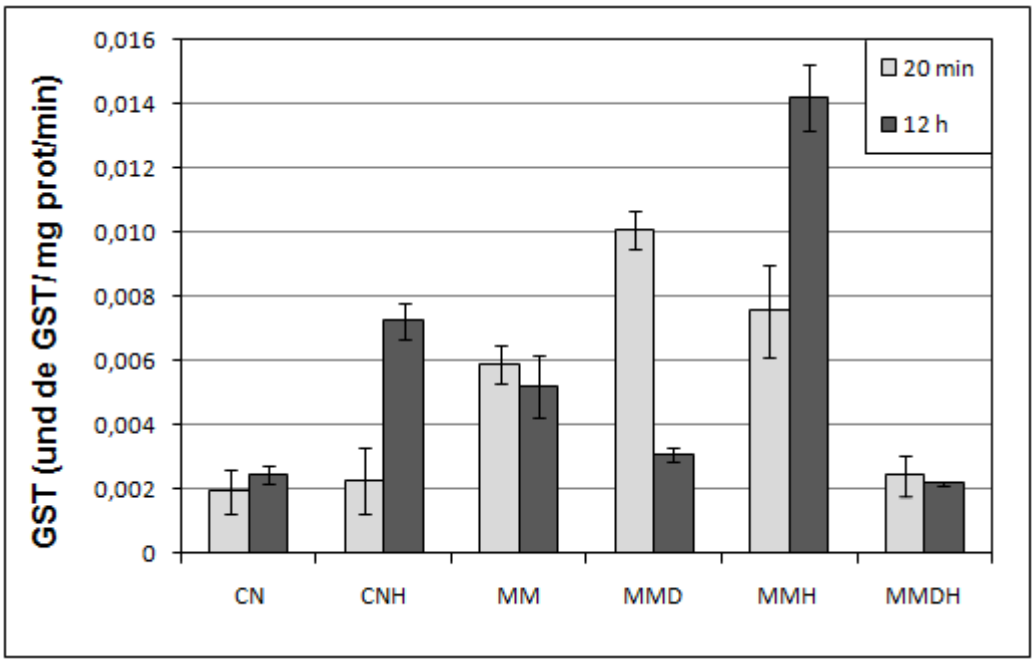


Figura 3.11 – Atividade total de GST analisada no isolado bacteriano E. asburiae SD01 em diferentes composições de meio de cultura. CN e CNH, meio nutritivo na ausência e presença do herbicida s-metolachlor, MM, MMD, MMH e MMDH, meio mineral na ausência de fonte de carbono (MM), com 10 % de dextrose (MMD), com 1,25 mM de s-metolachlor (MMH) e na presença de 10% de dextrose juntamente com 1,25 mM de herbicida (MMDH)

Existe um complexo de reações após a entrada de herbicidas na célula, o qual envolve vias de catabolismo de S-glutationalização, e que podem resultar tanto na desintoxicação metabólica como na bioativação de vias específicas de degradação de pesticidas (HICKS-BRAZIER et al., 2008). A presença do herbicida s-metolachlor em meio de cultura aumentou a atividade da GST no isolado bacteriano *E. asburiae* SD01 nos tratamentos CNH e MMH, após longo período de exposição. Já os tratamentos controles, CN, MM não apresentaram diferença na atividade de GST entre os períodos analisados, juntamente com o tratamento MMDH o qual também apresentava o herbicida em sua constituição. O aumento da atividade da GST pode

estar relacionado à metabolização do herbicida pela bactéria, uma vez que este comportamento somente foi encontrado quando o isolado bacteriano foi exposto ao contaminante.

Em revisão publicada em 2011, Cummins et al. citam diversos estudos sobre o papel da GST na desintoxicação do metabolismo de plantas, inclusive com algumas rotas de biotransformação de herbicidas as quais contém vias de conjugação com compostos, como a glutationa. Além disso, os autores também descrevem a importância desta enzima para aplicações biotecnológicas, uma vez que esta participa da sinalização celular, combate ao estresse oxidativo e transporte de metabólitos secundários. Neste caso, além da relação com o herbicida, a enzima GST pode também estar envolvida no combate ao estresse oxidativo, e adaptação da bactéria às diferentes constituições de meio de cultura.

3.4 Discussão

A maioria dos microrganismos pode utilizar mais de um composto como fonte de carbono, e isso caracteriza, em grande parte, a reconhecida relevância ambiental que estes organismos apresentam, principalmente quando analisamos o equilíbrio de ciclos biogeoquímicos. A fonte de carbono pode ser utilizada através de vias preferenciais que direcionam a célula para compostos de fácil acesso e simples composição, ou mesmo, pode ser metabolizada paralelamente a outras vias, caracterizando o co-metabolismo.

A contaminação ambiental por pesticidas é uma questão preocupante desde a década de 70 e, atualmente, vários estudos estão sendo desenvolvidos no sentido de compreender as rotas de contaminação, o comportamento dos pesticidas no ambiente, bem como a degradação biológica destes.

Menos de 5% do total de pesticida aplicado em lavouras atinge organismos alvo, sendo que o restante afeta organismos não alvo (VAN EERD et al., 2003), como a microbiota do solo. Neste caso, os microrganismos têm importante papel na biodegradação e transformação destes contaminantes, uma vez que representam uma eficiente ferramenta para desintoxicação ambiental. Diversidade metabólica, transferência horizontal de genes, ciclo curto entre gerações, caracterizam um metabolismo versátil para a adaptação dos microrganismos a mudanças externas. No ambiente do solo, reconhecido por ser um ambiente pobre em nutrientes, a

habilidade de conseguir utilizar mais de uma fonte de carbono pode permitir ao microrganismo rápido crescimento e vantagem competitiva para evolução.

A regulação gênica para catabolismo de carbono em microrganismos muitas vezes engloba funções para uso de compostos secundários e a atividade de enzimas correspondentes geralmente são ativadas através de vias bioquímicas combinadas globais da célula (GÖRKE; STÜLKE, 2008). A presença de fontes de carbono alternativas à preferencial pode resultar na indução de novas rotas do metabolismo, e se tratando de herbicidas, pode também ativar vias de resposta a estresse, pois muitas vezes estas substâncias são tóxicas a célula.

O presente trabalho visou estudar o papel do sistema antioxidante no isolado bacteriano *Enterobacter asburiae* SD01, cultivado em diferentes meios de cultura que diferiram na disponibilidade de nutrientes. Um dos aspectos importantes deste trabalho está na utilização do herbicida s-metolachlor como fonte de carbono alternativa a glicose. Os tratamentos representados pelas diferentes constituições de meio de cultura englobaram desde rica disponibilidade em nutrientes, fornecida pelo meio de cultura nutriente (CN), até meio mínimo mineral com o herbicida s-metolachlor como única fonte de carbono, podendo esta ser considerada complexa (MMH).

Análises para caracterização do estresse oxidativo nos diferentes meios de cultura e em dois tempos de crescimento foram realizados para compreensão da capacidade do isolado bacteriano em responder ao estresse em tempo de exposição curto (20 min) e longo (12 h), e consequentemente adaptação ao ambiente. Os ensaios enzimáticos podem ser reunidos em duas vias principais de resposta antioxidante, sendo a primeira relacionada ao combate direto às espécies reativas de oxigênio, a qual engloba as enzimas SOD e CAT, e a segunda via ligada a manutenção da homeostase redox e desintoxicação celular, representada neste estudo por enzimas relacionadas ao grupo tiol, como a GR e a GST.

Inicialmente, foi observado aumento da síntese de proteínas na maioria dos tratamentos, com exceção do meio MM, após longo período de cultivo, o que pode ser relacionado ao tempo de exposição da bactéria aos tratamentos. Entretanto, a presença do herbicida nos tratamentos CNH e MMH causou aumento na síntese de proteínas com apenas 20 min de exposição e a resposta diferencial a esta fonte de carbono também pôde ser observada na análise em PAGE.

O controle diferencial de proteínas na presença do herbicida refletiu na indução de novas bandas, ou mesmo a repressão destas, principalmente com longa exposição ao contaminante. A bactéria *Pseudomonas putida* KT2440 quando exposta aos herbicidas 2,4D (2,4- ácido diclorofenoxyacético) e DCPP (2-(2,4-diclorophenoxy) ácido propanóico) mostrou diferentes padrões quanto à expressão de proteínas, sendo induzidas principalmente porinas e componentes do sistema de transporte ABC, como estratégia para adaptação a novos substratos para síntese de ATP (BENNDORF et al., 2006).

Variações na intensidade das bandas em análise em PAGE podem estar relacionadas também ao aumento da expressão do peptídeo, ou seja, mudanças nos níveis de transcrição dos genes, assim como relatado em estudo com a diversidade funcional microbiana de uma área contaminada com petróleo (LIANG et al., 2009). Neste trabalho, genes que codificam enzimas chaves para metabolização de compostos orgânicos tiveram sua expressão reprimida com a contaminação de petróleo, especialmente em alta condição de estresse causada pelo contaminante.

O aumento na síntese proteica, apesar de parecer um aspecto contrastante com a queda na viabilidade celular após 12 h de cultivo nos tratamentos com meio mineral, pode juntamente com resultados de peroxidação lipídica, inferir aspectos relacionados à adaptação bacteriana às diferentes constituições dos meios de cultura. Em culturas prolongadas da bactéria *E. coli*, a morte de grande parte da população pode ser utilizada como estratégia por alguns indivíduos para sobrevivência a partir do consumo dos resíduos e compostos liberados com a morte celular (FINKEL; KOLTER, 1999). Esta estratégia pode estar sendo utilizada pelo isolado bacteriano *E. asburiae* SD01 nos tratamentos que apresentaram baixa viabilidade celular, como exemplo aqueles constituídos por meio mineral, já que nestes tratamentos, foi possível observar a manutenção do crescimento bacteriano mesmo após 3 dias de cultivo (dados não mostrados).

Outro fator que também pode estar relacionado à adaptação aos tratamentos é a capacidade da bactéria em responder ao estresse gerado pela baixa disponibilidade de nutrientes, ou mesmo, a presença do herbicida s-metolachlor. As bactérias apresentam uma complexa rede de regulação gênica, muitas vezes controlada pela limitação de nutrientes, e permite ajustar a eficiência metabólica a novas condições ambientais (CHATTERJI; OJHA, 2001).

Em condições não estressantes de cultivo, os microrganismos apresentam metabolismo voltado para síntese proteica e expressão de genes estruturais, necessários para a manutenção e divisão da célula. Porém, quando expostos à condição de estresse, os microrganismos podem ativar vias bioquímicas diferenciais para realocação de nutrientes em processos de produção de moléculas específicas, as quais poderão proteger a célula e combater o agente causador do estresse.

Muitas vezes, a regulação de vias de defesa celular pode ser antagônica à regulação de genes estruturais, e neste caso, a ativação de vias de defesa visando à adaptação a nova condição imposta pelo ambiente pode ser caracterizada pela baixa taxa de crescimento ou mesmo a interrupção deste (SCHIMEL et al., 2007).

O aumento da concentração de peróxido de hidrogênio no meio intracelular (Figura 3.3) caracterizou o estresse oxidativo sofrido pelo isolado bacteriano, principalmente nos tratamentos CNH e aqueles constituídos por meio mineral. As ERO's podem ser prejudiciais à célula, mas também são encontradas como sinalizadores celulares para ativação de vias de defesa ao estresse (IMLAY, 2008). Sendo assim, o estudo do sistema antioxidante pode indicar vias bioquímicas reguladas pela disponibilidade de nutrientes, bem como inferir redes globais de resposta ao estresse gerado pela presença do herbicida s-metolachlor e adaptação às condições ambientais impostas ao isolado *E. asburiae* SD01.

Nos dados obtidos pelos ensaios bioquímicos foi possível distinguir dois padrões de resposta ao estresse, caracterizados pela diferença da constituição básica dos meios de cultura, e principalmente pela presença do herbicida s-metolachlor.

Em meio rico, com disponibilidade de nutrientes, a presença do herbicida (tratamento CNH) não induziu a peroxidação lipídica, apesar do aumento de H_2O_2 nos primeiros 20 min de exposição ao s-metolachlor. Este aumento pode estar relacionado com o papel de sinalizador celular do H_2O_2 na ativação de vias de defesa de combate a ERO's (LUSHCHAK, 2011), como o fator transcricional OxyR, importante componente do sistema antioxidante.

Essa hipótese pode ser corroborada com o aumento da atividade das enzimas analisadas após 12 h de cultivo no tratamento CNH. Nesta condição, todas as enzimas analisadas foram afetadas de maneira positiva, resultando então a adaptação do isolado bacteriano ao tratamento, refletido também pelo aumento da viabilidade celular (Figura 3.13).

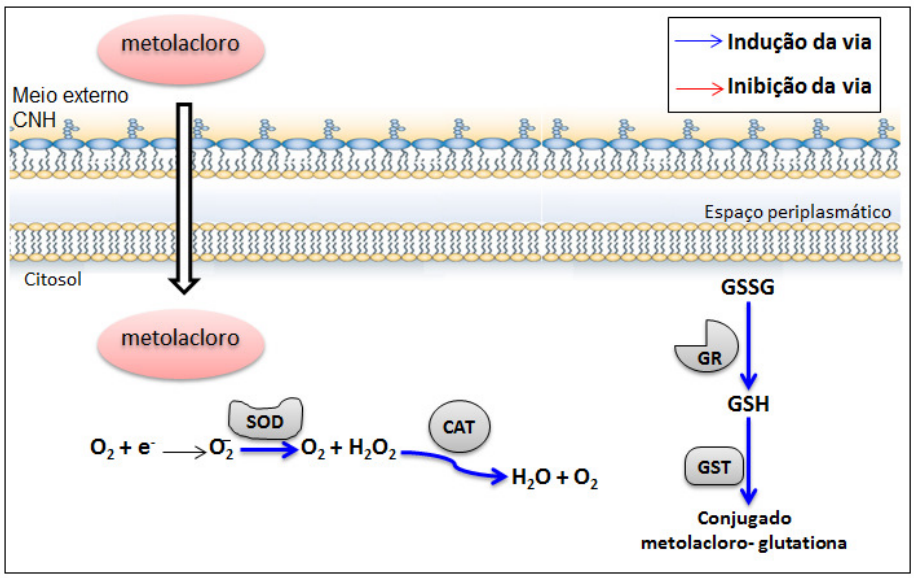


Figura 3.13 - Modelo de vias bioquímicas diferencialmente reguladas na presença do herbicida s-metolachlor em meio rico (CNH), após 12 h de exposição. Abreviações utilizadas: Perox. Lipídica (peroxidação lipídica), GSSG (glutationa oxidada), GSH (glutationa reduzida), GST (Glutationa S-transferase), SOD (superóxido dismutase) e CAT (catalase). As reações representadas não estão balanceadas, mas sim dispostas de maneira objetiva

Por outro lado, a regulação diferencial das vias bioquímicas na presença do s-metolachlor pode ter minimizado a toxicidade aguda (curto período) do herbicida, caracterizada pela alta concentração de H_2O_2. Isso pode ser reflexo da constituição rica do meio de cultura, pois a presença de nutrientes e fonte de carbono de fácil acesso no tratamento CNH pode ter auxiliado a bactéria na obtenção de energia e síntese de compostos que ajudaram na resposta inicial do metabolismo. Sendo as enzimas afetadas positivamente pela presença do herbicida, o trabalho cooperativo entre elas pode então ter revertido o efeito do estresse oxidativo inicial, e resultado na adaptação do isolado *E. asburiae* SD01 ao tratamento CNH.

É importante salientar, que todo o processo metabólico envolvido na resposta adaptativa ao herbicida no meio rico envolveu as duas vias de respostas analisadas, ou seja, o combate às ERO's foi realizado pelas enzimas CAT e SOD, e a manutenção da homeostase redox celular, representada pela enzima GR.

Além disso, a indução da atividade da enzima GST no tratamento CNH pode indicar a utilização do herbicida s-metolachlor em processo de co-metabolismo pela bactéria, uma vez que existe a presença de fonte de carbono preferencial no meio de cultura. Esta enzima é bastante citada em trabalhos de metabolização de

pesticidas, como responsável pelas primeiras transformações de xenobióticos (FIELD; THURMAN, 1996; VAN EERD et al., 2003, McGUINNESS et al., 2007).

Co-metabolismo é um importante fator para dissipação de herbicidas e outros compostos no ambiente, e envolve a disponibilidade de nutrientes e concentração do pesticida na área contaminada. Esses dois fatores interferem na atividade metabólica de microorganismos com capacidade de degradação, e podem induzir o uso do herbicida pelo metabolismo bacteriano sem a necessidade da utilização do composto como principal fonte de carbono (WANG et al., 2008).

Esse cenário reflete as condições encontradas no tratamento CNH, pois a presença do herbicida s-metolachlor como fonte alternativa de carbono poderia ser utilizada pelo isolado bacteriano de forma co-metabólica, havendo a degradação deste sem a utilização para obtenção de energia, sendo esta função exercida inicialmente pelos nutrientes disponíveis pelo meio de cultura.

Em contraposição ao meio de cultura rico em nutrientes, os tratamentos com meio mineral foram utilizados para representar um ambiente de limitação de nutrientes, semelhante àquele encontrado no solo. Constituído basicamente por sais, os tratamentos com meio mineral diferenciaram pela presença de fonte de carbono, sendo estas: glicose, herbicida s–metolachor ou a combinação destas duas fontes, glicose e herbicida.

O tratamento MMH apresentou somente o herbicida s-metolachlor como fonte de carbono, caracterizada por ser uma fonte complexa para metabolização (Figura 3.14). Apesar da estrutura química do herbicida ser constituída por um anel aromático, de difícil degradação, ela também apresenta alguns radicais (grupos alquila), os quais podem ser mais facilmente acessados para obtenção de carbono, além dos átomos de nitrogênio e cloro (MARTINS et al., 2007).

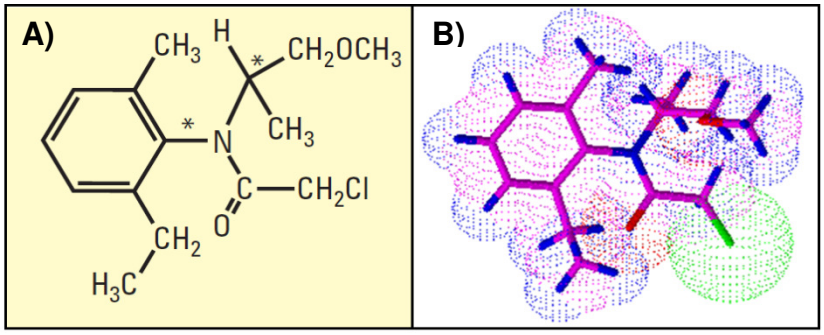


Figura 3.13 – Estrutura química do herbicida s-metolachlor. Os asteriscos indicam os centros quirais da molécula e a figura B representa as nuvens eletrônicas atômicas

A habilidade de GST's bacterianas em degradar poluentes ambientais sugere um potencial papel na biodegradação em processos de biorremediação ambiental (McGUINNESS et al., 2007). Esta enzima atua nas primeiras transformações em pesticidas cloroacetanilidas, pois media o processo de declorinação resultando na formação de metabólitos polares, mais facilmente metabolizados pelas bactérias (ZABLOTOWICZ et al., 1995).

O tratamento MMH apresentou a menor viabilidade celular e os maiores valores de H_2O_2, comparado com os outros tratamentos contendo ao menos uma fonte de carbono. Porém, o aumento da síntese de proteínas, bem como o aumento da atividade da enzima GST podem indicar que a resposta inicial do isolado bacteriano foi no combate à toxicidade aguda do herbicida. A figura 3.15 representa a regulação das vias enzimáticas analisadas no tratamento MMH, sendo possível observar que somente a enzima GST foi afetada positivamente pelo s-metolachlor.

A ausência de uma fonte de carbono de fácil metabolização no tratamento MMH pode ter reprimido o metabolismo microbiano, o qual reduziu o crescimento e ativou vias específicas para reconhecimento da molécula xenobiótica. Sendo assim, as enzimas que constituem as vias de defesa ao estresse, como CAT e SOD, tiveram sua atividade reprimida ou mesmo não diferiram do tratamento MMD, considerado controle.

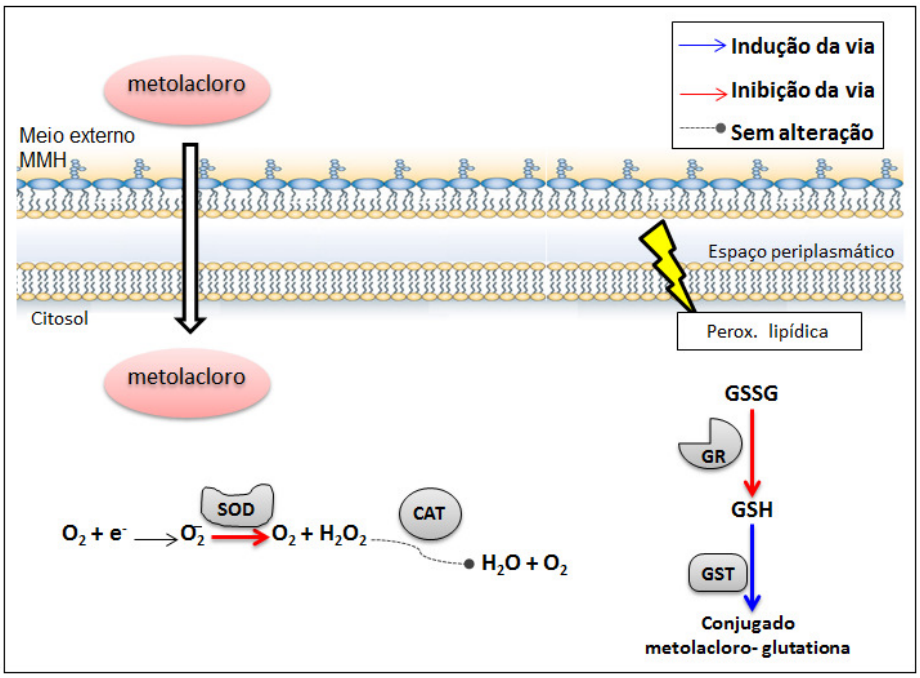


Figura 3.15 - Modelo de vias bioquímicas diferencialmente reguladas na presença do herbicida s-metolachlor em meio mineral (MMH) após 12 h de exposição. Abreviações utilizadas: Perox. Lipídica (peroxidação lipídica), GSSG (glutationa oxidada), GSH (glutationa reduzida), GST (Glutationa S-transferase), SOD (superóxido dismutase) e CAT (catalase). As reações representadas não estão balanceadas, mas sim dispostas de maneira objetiva

Apesar de outras enzimas também atuarem no combate ao estresse oxidativo (IMLAY, 2008), o comportamento das enzimas CAT e SOD no tratamento MMH refletiu nos danos celulares causados pela presença das ERO's, como aumento da peroxidação lipídica. Işik e colaboradores (2007), através de um estudo com *Streptomyces* sp. M3004, mostraram que o aumento dos níveis de MDA está relacionado ao cultivo da bactéria na presença de H_2O_2 e do herbicida paraquat, sugerindo que a peroxidação lipídica é um marcador de danos na membrana celular. Além disso, neste estudo, as enzimas CAT e SOD também exibiram correlação negativa com os níveis de MDA, o que sugere que o trabalho cooperativo destas enzimas protege a célula dos danos do estresse oxidativo.

O modo de ação de herbicidas da classe cloroacetanilida está relacionado à inibição da síntese de lipídeos, especificamente as vias de alongamento de ácidos graxos de cadeia longa C16 e C18 (BÖGER; MATTHES; SCHMALFUB, 2000), o que também pode estar interferindo na susceptibilidade da membrana ao ataque de H_2O_2. Bactérias são conhecidas por responderem a mudanças ambientais através de alterações na composição lipídica da membrana citoplasmática para manter ou mesmo ajustar a fluidez da bicamada fosfolipídica.

A bactéria *Klebsiella planticola* DSZ quando cultivada em meio mineral somente na presença do herbicida simazine, apresentou mudanças na estrutura da membrana celular visando a resposta adaptativa ao herbicida. Estas mudanças são relacionadas à composição dos ácidos graxos da membrana, o qual teve aumento da razão C18/C16 de ácidos graxos e a aumento da taxa de saturação destes (SÁNCHEZ et al., 2005). Entretanto, como a síntese de ácidos graxos pode ser afetada pelo herbicida s-metolachlor, esta resposta adaptativa fisiológica pode não ter sido ativada, o que levou o isolado *E. asburiae* SD01 a sofrer a longo prazo os danos causados pelas ERO's na membrana.

Apesar de ter sofrido estresse oxidativo no tratamento MMH, o isolado bacteriano pode ter considerado as vias relacionadas ao sistema antioxidante como vias de metabolismo secundária para a ativação, uma vez que a sobrevivência celular dependia inicialmente da obtenção de energia. Dessa forma, a ativação de vias de transformação do s-metolachlor iniciou-se pelo aumento da atividade da enzima GST, visando a metabolização do herbicida e obtenção de energia.

Outro ponto importante está relacionado à inibição da atividade da enzima GR no tratamento MMH, a qual pode ser considerada contrastante com o aumento da atividade de GST, uma vez que a GST necessita do substrato GSH para realizar a conjugação com o herbicida. Em bactérias mutantes para o gene *gor*, codificante da enzima GR, a ausência da enzima não trouxe alterações significativas no total da concentração de GSH para o total de glutationa. Os autores deste trabalho sugerem que a GSSG pode ser reduzida independentemente da presença da GR (TUGGLE; FUCHS, 1985).

Sendo a GR uma proteína com grupo tiol, ela pode ser alvo de inibição pela ação do herbicida s-metolachlor. Um considerado número de enzimas que apresentam em seu domínio catalítico uma região altamente conservada com um sítio ativo de cisteína, presumidamente pode ser alvo do ataque nucleofílico de um pesticida cloroacetanilida (BÖGER; MATTHES; SCHMALFUB, 2000). Neste caso, a reação de inibição do s-metolachlor se daria pelo átomo de carbono eletrofílico gerado através da liberação de um radical, como o átomo de cloro presente na estrutura do herbicida.

No entanto, a inibição da atividade de GR no presente trabalho pode não ter interferido nos níveis de redução da glutationa no meio intracelular, que, por conseguinte, não teria impacto negativo sobre a enzima GST. Além do mais, alguns

trabalhos citam outras enzimas atuando na homeostase redox celular, as quais apresentam vias que se sobrepõe às da enzima GR, e que poderiam estar desempenhando sua função para manutenção da homeostase (CARMEL-HAREL; STORZ, 2000).

Mesmo o solo sendo um ambiente pobre em nutrientes, dificilmente não apresenta fontes de carbono à microbiota do solo, sendo estas fontes geralmente apresentadas com baixa disponibilidade, ou mesmo, pouca diversidade de compostos. O tratamento MMDH apresentou além do herbicida s-metolachlor, uma fonte alternativa de carbono (glicose), porém sem a presença dos demais nutrientes presentes no meio nutritivo (CN).

De maneira geral, o comportamento do isolado bacteriano no tratamento MMDH após 12 horas de cultivo foi semelhante ao encontrado nos tratamentos controles, MMD e CN, mesmo este último sendo de diferente constituição (Figura 3.16). A viabilidade celular do tratamento MMDH, juntamente com as taxas de H_2O_2 e MDA, foi similar a encontrada no tratamento MMD em ambos os períodos analisados. Além do mais, se observada a presença de s-metolachlor no meio de cultivo, a análise de ativação das vias enzimáticas no tratamento MMDH difere dos outros tratamentos constituídos de herbicida s-metolachlor (CNH e MMH).

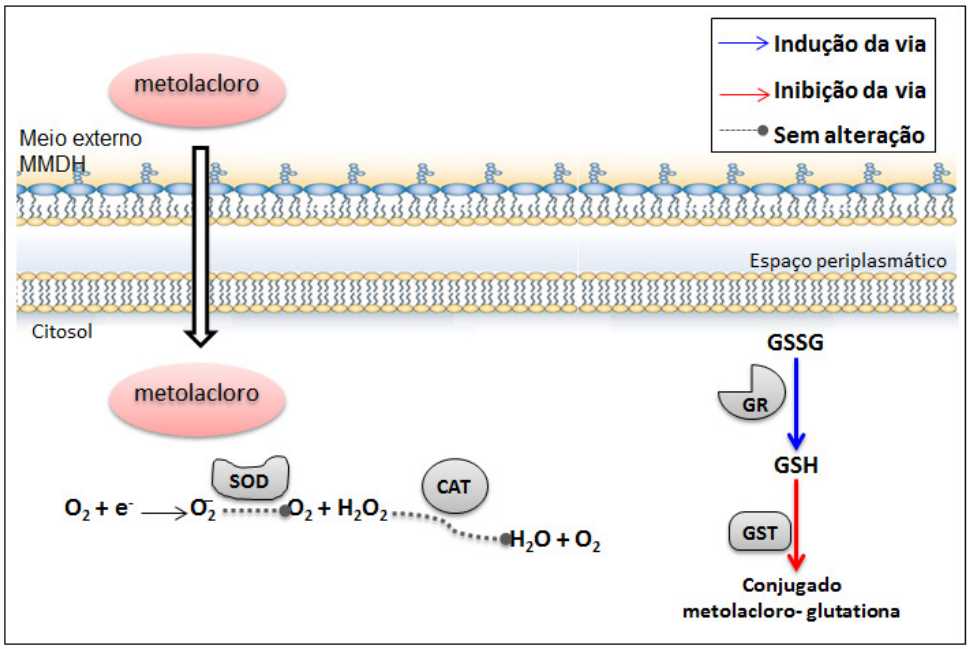


Figura 3.15 - Modelo de vias bioquímicas diferencialmente reguladas na presença do herbicida s-metolachlor em meio mineral (MMDH), após 12 h de cultivo. Abreviações utilizadas: Perox. Lipídica (peroxidação lipídica), GSSG (glutationa oxidada), GSH (glutationa reduzida), GST (Glutationa S-transferase), SOD (superóxido dismutase) e CAT (catalase). As reações representadas não estão balanceadas, mas sim dispostas de maneira objetiva

A representação das vias bioquímicas em MMDH mostra que somente a enzima GR foi afetada positivamente pela presença do herbicida após longo período de exposição. Porém, em 20 min de cultivo, a enzima SOD foi induzida e a atividade de CAT foi mantida nos níveis encontrados em 20 min de cultivo, o que pode significar que houve uma resposta adaptativa inicial de combate ao estresse, gerado pela exposição a uma nova constituição do meio. A condição de estresse neste caso pode ser observada quando comparada a concentração de H_2O_2 entre tratamento MMDH e a analise em tempo zero (Figura 3.3).

A presença de glicose no meio de cultivo, em alternativa ao herbicida s-metolachlor, pode ter auxiliado na resposta inicial da bactéria, a qual utilizou a fonte de carbono de fácil acesso para metabolização e obtenção de energia. O termo CCR se refere a metabolismo de repressão do catabolismo de carbono utilizado para descrever o fenômeno geral encontrado em microorganismos no qual a presença de uma fonte de carbono no meio pode reprimir a expressão de certo genes, dos quais os produtos gênicos são voltados para a utilização de fontes de carbono alternativas (BRÜCKNER; TITGEMEYER, 2002).

É possível que a presença da glicose tratamento MMDH tenha inibido a atividade da GST para reconhecimento do herbicida, e a constituição pobre do meio de cultura MMDH pode ter ativado vias específicas para aproveitamento da fonte de carbono e manutenção da homeostase redox celular, indispensável para o equilíbrio das funções celulares. Por outro lado, a queda na viabilidade celular após 12 h, aliada a diminuição dos níveis de H_2O_2 e MDA, pode indicar a adaptação de *E. asburiae* SD01 ao tratamento MMDH em longo prazo, uma vez que o efeito do estresse encontrado em curto período de exposição foi minimizado.

Os resultados do presente trabalho mostram que há regulação diferencial entre vias relacionadas ao estresse oxidativo conforme a constituição do meio de cultura em que o isolado bacteriano *E. asburiae* foi cultivado. Na presença de fonte de carbono de fácil metabolização, as vias de combate a ERO's podem ser ativadas inicialmente em resposta a possível mudança na condição de cultivo, ou mesmo pela regulação do metabolismo durante as diferentes fases de crescimento. Esta resposta inicial, em longo período de cultivo, pode se tornar em resposta adaptativa, resultando assim na reversão dos efeitos negativos que o estresse oxidativo pode causar.

Entretanto, quando o herbicida s-metolachlor esteve presente como fonte única fonte de carbono, a toxicidade deste direcionou a ativação de vias metabólicas de reconhecimento do contaminante, representadas aqui pela enzima GST. Entretanto, a presença de outra fonte de carbono, representada aqui pela glicose, provavelmente se torna preferencial para obtenção de energia para o isolado bacteriano *E. asburiae* SD01, assim como em outras bactérias *Enterobacteriacae*, e anula ou minimiza efeito do herbicida na regulação de vias metabólicas.

Finalmente, o presente trabalho mostrou que a regulação de vias metabólicas relacionadas ao metabolismo de carbono pode estar relacionada a ativação de vias específicas de combate ao estresse oxidativo. Além disso, vias preferenciais para uso de fontes de carbono, bem como a disponibilidade de nutrientes, podem regular funções básicas do metabolismo visando o encontro da resposta adaptativa ao ambiente.

Referências

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

ANDERSON, M.P.; GRONWALD, J.W. Atrazine resistence in a velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) biotype due to enhanced glutathione S-transferase activity. **Plant Physiology,** Minneapolis, p. 104-109, v. 96, 1991.

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

BARTLING, D.; RADZIO, R.; STEINER, U.; WEILER, E.W. A glutathione S-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*: molecular cloning and functional characterization. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 216, p. 579-586, 1993.

BENNDORF, D.; THIERSCH, M.; LOFFHAGEN, N.; KUNATH, C.; HARMS, H. *Pseudomonas putida* KT2440 responds specifically to chlorophenoxy herbicides and their initial metabolites. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, p. 3319-3329, 2006.

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

BÖGER, P.; MATTHES, B.; SCHMALFUB, J. Towards the primary target of chloroacetamides – new findings pave the way. **Pest and Management Science**, Sussex, v. 56, p. 497-508, 2000.

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.

BREUGELMANS, P.; LEROY, B.; BERS, K.; DEJONGHE, W. WATTIEZ, R.; MOT, R.D.; SPRINGAEL, D. Proteomic study of linuron and 3,4-dichloroaniline degradation by *Variovorax* sp. WDL1: evidence for the involvement of an aniline dioxygenase-related multicomponent protein. **Research in Microbiology**, Paris, v. 161, p. 208-218, 2010.

BRÜCKNER, R.; TITGEMEYER, F. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. **Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 209, p. 141-148, 2002.

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

CARMEL-HAREL, O.; STORZ, G. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. **Annual Review in Microbiology**, Palo Alto, v. 54, p. 439-461, 2000.

CHATTERJI, D.; OJHA, A.K. Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 4, p. 160-165, 2001.

CHIANG, Y.J.; WU, Y.Y.; CHIANG, M.Y.; WANG, C.Y. Role of antioxidative system in paraquat resistance of tall fleabane (*Conyza sumatrensis*). **Weed Science**, Champaign, v. 2008, p. 350-355, 2008.

CHURRO, C.; FERNANDES, A.S.; ALVERCA, E.; SAM-BENTO, F.; PAULINO, S.; FIGUEIRA, V.C.; BENTO, A.J.; PRABHAKAR, S.; LOBO, A.M.; MARTINS, L.L.; MOURATO, M.P.; PEREIRA, P. Effects of tryptamine on growth, ultrastructure, and oxidative stress of cyanobacteria and microalgae. **Hydrobiologia**, The Hague, v. 649, p. 195-206, 2010.

CUMMINS, I.; ANDON, N.L.; HAYNES, P.A.; PARK, M.; FISHER, W.H.; SCHUBERT, D. Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. **Drug Metabolism Review**, New York, v. 43, p. 266-280, 2011.

DARKÓ, É.; AMBURS, H.; FODOR, J.; KIRÁTLY, Z.; BARNABÁS, B; Enhaced tolerance to oxidative stress with elevated antioxidant capacity in doubled haploid maize derived from microspores exposed to paraquat. **Crop Science**, Madison, v. 49, p. 628-636, 2009.

DEUTSCHER, J. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 11, p. 87-93, 2008.

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

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

FIELD, J.A.; THURMAN, E.M. Glutathione conjugation and contaminant transformation. **Environmental Science & Technology**, Washigton, v. 30, p. 1413-1418, 1996.

FINKEL, S.E.; KOLTER, R. Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. **Proceedings of the National Academic Sciences of United States of America**, Washington, v. 96, p. 4023-4027, 1999.

GALHANO, V.; GOMES-LARANJO, J.; PEIXOTO, F. Exposure of the cyanobacterium *Nostoc muscorum* from Portuguese rice fields to Molinate (Ordram®): Effects on the antioxidant system and fatty acid profile. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 101, p. 367-376, 2011.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases, II Purification and quantitative relationship with water-soluble protein on seedlings. **Plant Physology**, Minneapolis, v. 59, p. 315-318, 1977.

GOMES Jr, R.A.; GRATÃO, P.L.; GAZIOLA, S.A.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 39, p. 449-456, 2007.

GÖRKE, B.; STÜLKE, J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 6, p. 613-624, 2008.

GORT, A.S.; IMLAY, J.A. Balance between endogenous superoxide stress and antioxidant defenses. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, p. 1402–1410, 1998.

GREER, S.; PERHAM, R. Glutathione reductase from *Escherichia coli:* cloning and sequence analysis of the gene and relationship to other flavoprotein disulfide oxidoreductases. **Biochemistry**, New York, v. 25, p. 2736-2742, 1986.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 57, p. 715-724, 1993.

HASSAN, H.M.; FRIDOVICH, I. Paraquat and *Escherichia coli*, mechanisms of production of extracellular superoxide radical. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 254, p. 10846-10852, 1979.

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

HICKS-BRAZIER, M.; EVANS, K.M.; CUNNINGHAM, O.D.; HODGSON, D.W.R.; STEEL, P.G.; EDWARDS, R. Catabolism of glutathione conjugates in *Arabidopsis thaliana*, role in metaboli reactivation of the herbicide safener fenclorim. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 283, p. 21102-21112, 2008.

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

IŞIK, K.; KAYALI, H.A.; SAHIN, N.; GUNDOGDU, E.O.; TARHAN, L. Antioxidant response of a novel *Streptomyces* sp. M3004 isolated from legume rhizosphere to H_2O_2 and paraquat. **Process Biochemistry**, Oxford, v.42, p.235–243, 2007.

JUNG, I.L.; KIM, I.G. Transcription of *ahpC, katG,* and *katE* genes in Escherichia coli is regulated by polyamines: polyamine-deficient mutant sensitive to H_2O_2-induced oxidative damage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 301, p. 915-922, 2003.

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

KUMAR, R.; SHIMIZU, K. Transcriptional regulation of mains metabolic pathway of *cyoA, CydB, fnr* and *fur* genes with knockout *Escherichia coli* in C-limited and N-limited aerobic continuous cultures. **Microbial Cell Factories**, London, v. 10, p. 1-15, 2011.

LATIFI, A. RUIZ, M.; ZHANG, C. C. Oxidative stress in cyanobacteria. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 33, p. 258-278, 2009.

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

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

LIANG, Y.; LI, G.; NOSTRAND, J.D.V.; HE, Z.; WU, L.; DENG, Y.; ZHANG, X.; ZHOU, J. Microarray-based analysis of microbial functional diversity along an oil contamination gradient in oil field. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam , v. 70, p. 324-333, 2009.

LIU, Y.; ZHANG, Y.; LIU, J.; HAUNG, D. The role of reactive oxygen species in the herbicide acetochlor-induced DNA damage on *Bufo raddei* tadpole liver. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 78, p. 21-26, 2006.

LIZYKA, M.; INOUE, Y.; MURATA, K.; KIMURA, A.Purification and some properties of glutathione S-trasnferase from *Escherichia coli* B. **Journal of Bacteriology**, Washington, p. 6039-6042, v. 171, 1989.

LUSHCHAK, V.I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, Oxford, v. 153, p. 175-190, 2011.

MARRS, K.A.; ALFNITO, M.R.; LIOYD, A.M.; WALBOT, V. A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2. **Nature**, London, v. 375, p. 397-400, 1995.

MARTINS, P.F.; CARVALHO, G.; DOURADO, M.N.; GRATAO, P.L.; PILEGGI, M.; AZEVEDO, R.A. Effect of chloroacetanilide herbicides on antioxidant enzymes of soil isolated bacteria. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 46, p. 1186-1195, 2011.

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

McGUINNESS, M.C.; MAZURKIEWICZ, V.; BRENNAN, E.; DOWLING, D.N. Dechlorination of pesticide by a specific bacterial glutathione S-transferase. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v.7, p. 611-615, 2007.

MESSNER, K.R.; IMLAY, J.A. The indentification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 274, p. 10119-10128, 1999.

MICHÁN, C.; MANCHADO, M.; DORADO, G.; PUEYO, C. In vivo transcription of the *Escherichia coli oxyR* regulon as a function of growth phase and in response to oxidative stress. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, p. 2759-2764, 1999.

MONGKOLSUK, S.; HELMANN, J.D. Regulation of inducible peroxide stress responses. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 45, p. 9-15, 2002.

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

PETERS, L.P. **Efeito dos herbicidas ametrina e clomazone no sitema antioxidante bacteriano.** 2011. 124 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

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

RUI, B.; SHEN, T.; ZHOU, H.; LIU, J.; CHEN, J.; PAN, X.; LIU, H.; WU, J.; ZHENG, H.; SHI, Y. A systematic investigation of *Escherichia coli* central carbon metabolism in response to superoxide stress. **BMC Systems Biology**, London, v. 4, p. 1-12, 2010.

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

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

SEAVER, L.C.; IMLAY, J.A. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, p. 7173-7181, 2001.

SMIRNOVA, G.V.; OKITABRSBY, O.N. Glutathione in bacteria. **Biochemistry**, New York, v. 70, p. 1459-1473, Nov. 2005.

TANG, P.; LIU, J.K.; CHOU, S.M.; HOR, L.I.; CHEN, W.J.; CHEN, S.C. A proteomic analysis of *Klebsiella oxytoca* after exposure to succinonitrile. **Processe Biochemistry**, Oxford, v. 43, p. 753-757, 2008.

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, p. 448-450, 1985.

VAN EERD, L.L.; HAOGLAND, R.E.; HALL, J.C. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. **Weed Science,** Ithaca, v. 51, p. 472-495, 2003.

VOIGT, B.; HOI, L.T.; JURGEN, B.; ALBRECHT, D.; EHRENREICH, A.; VEITH, B.; EVERS, S.; MAURER, K.H.; HECKER, M.; SCHWEDER, T. The glucose and nitrogen starvation response of *Bacillus licheniformis*. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, p. 413-423, 2007.

VRYZAS, Z.; ALEXOUDIS, C.; VASSILIOU, G.; GALANIS, K.; PAPADOPOULO-MOURKIDOU, E. Determination and aquatic risk assessment of pesticide residues in riparian drainage canals in northeastern Greece. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 74, p. 174-181, 2011.

WANG, Y.S.; LIU, J.C.; CHEN, W.C.; YEN, J.H. Characterization of acetanilide herbicides degrading bacteria isolated from tea garden soil. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, p. 435-443, 2008.

YOUBIN, S.; TAKAGI, A.; IWASAKI, A.; ZHOU, D. Adsorption, desorption and dissipation of metolachlor in surface and subsurface soils. **Pest Management Science**, Sussex, v. 65, p. 956-962, 2009.

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

ZAMOCKY, M.; FURTMÜLLER, P.G.; OBINGER, C. Evolution of catalases from bacteria to humans. **Antioxidants & Redox Signaling**, New Rochelle, v. 10, p. 1527-14548, 2008.

4 ATIVIDADE DIFERENCIAL DAS ISOFORMAS DE CATALASE E SUPERÓXIDO-DISMUTASE DE E. coli K-12, EXPOSTA AO HERBICIDA S-METOLACHLOR

Resumo

A resposta metabólica à mudanças ambientais ocorre através da integração de vias bioquímicas e ativação diferencial de genes, visando a manutenção da homeostase celular. O sistema antioxidante bacteriano é bem caracterizado, principalmente quanto a rede de enzimas que trabalham cooperativamente no combate ao estresse oxidativo, muitas vezes causado pela presença de xenobióticos. Quanto a regulação a nível transcricional, pode-se distinguir principalmente duas vias sensoriais de combate a ERO's (espécies reativas de oxigênio): um sistema ativado pela presença de peróxido de hidrogênio (OxyR) e outro constituído por um regulon, induzido na presença do anion superóxido (sistema SoxRS). Em ambos os casos, é reconhecida a importância das enzimas catalase (CAT) e superóxido-dimutase (SOD) no controle dos níveis de ERO's intracelular. No presente trabalho, o papel diferencial das isoformas de CAT e SOD foi avaliado em linhagens de *E. coli* K-12, com deleções para genes *katG*, *katE*, *sodA* e *sodB*, frente ao estresse causado pelo herbicida s-metolachlor. Os resultados mostram que a isoenzima Mn-SOD, codificada pelo gene *sodA*, tem importante função na manutenção do equilíbrio celular, visto que a deleção do gene *sodA* provocou aumento nos níveis de peroxidação lipídica, bem como altos valores de peróxido de hidrogênio. Da mesma forma que, a indução da isoenzima Mn-SOD foi observada nas linhagens bacterianas wt, Δ*katG* e *ΔsodB* expostas ao s-metolachlor. Este estudo indica que existe ativação e participação diferencial das isoenzimas na resposta global ao estresse oxidativo causado pelo herbicida s-metolachlor. Além disso, os dados sugerem que outros estudos, como sob aspectos moleculares, são necessários para a compreensão da regulação entre as enzimas, bem como abre portas para a aplicação biotecnologica da isoenzima Mn-SOD em estudos de tolerância a herbicidas.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; Hidroperoxidase; Superóxido dismutase;Herbicida

4 DIFFERENTIAL ACTIVATION OF CATALASE AND SUPEROXIDE-DISMUTASE ISOENZYMES IN E. coli EXPOSED TO S-METOLACHLOR HERBICIDE

Abstract

Metabolic response to environmental changes happens through biochemical pathways and gene differential activation, aiming the maintenance of cellular homeostase. The antioxidant system in bacteria is well characterized, mainly by the enzyme network in which the enzymes work cooperatively to combat the oxidative stress, some time caused by xenobiotic exposition. When the transcriptional regulation is observed, we can distinguish two sensorial pathways against ROS (reactive oxygen species): the first one is activated by hydrogen peroxide (OxyR system), and the second one constituted by a regulon, it is induced in the presence of superoxide anion (SoxRS system). In both cases, it is recognized the importance of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in the control of ROS intracellular levels. In the present work, the differential role of CAT and SOD isoenzymes was evaluated in *E. coli* K-12 strains with deletions in the *katG*, *katE*, *sodA* and *sodB* genes and submitted to stress condition induced by s-metolachlor herbicide. The results show the Mn-SOD isoenzyme, codified by *soda* gene, has important function in the maintenance of cellular balance, since the *sodA* deletion generate increase in the lipid peroxidation levels, as well as high hydrogen peroxide concentration. On the other hand, the induction of Mn-SOD was observed in the wt, Δ*katG* and *ΔsodB* strains exposed to s-metolachlor. This study indicates an activation and participation differential can occur among the isoenzymes during the global response to oxidative stress induced by s-metolachlor herbicide. Beside this, the data also suggest that others studies, such as with molecular aspects, are necessary to understand the enzyme regulation, and can also extend perspectives for biotechnology application of Mn-SOD in herbicide tolerance studies.

Keywords: *Escherichia coli*; Hydroperoxidase;Superoxide dismutase; Herbicide

4.1 Introdução

Muitos compostos poluentes são tóxicos para microorganismos, e podem inibir sua atividade e reprodução em ambiente natural. Para adaptação a nova condição imposta pelo contaminante, o metabolismo microbiano deve iniciar o reconhecimento do composto, e concomitantemente ativar vias de defesa ao estresse (MEER van der, 2006).

Bactérias caracterizadas como tolerantes ou degradantes de xenobióticos são reveladas por possuírem novos modelos de vias metabólicas que compõe o conjunto da resposta adaptativa fisiológica (MEER van der, 2006). Em um aspecto metabólico, esta resposta é constituída por mudanças que podem ocorrer em vários níveis, desde mutações genéticas benéficas até mesmo, rearranjo de enzimas para a construção de uma nova via bioquímica (SPRINGAEL; TOP, 2004).

Neste cenário, as enzimas são peças chaves, sendo estas caracterizadas pela especificidade e catálise de reações individuais com reconhecida eficiência. Entretanto, para a adaptação a mudanças ambientais, muitas vezes se faz necessário o reconhecimento de novos substratos, o que em algum momento, pode parecer contrapor à função das enzimas (SCHMIDT et al., 2003). Considerada muitas vezes como força evolutiva, a diversidade genética pode dirigir o desenvolvimento de novas vias enzimáticas, e assim atuar para a adaptação metabólica à perturbações do meio ambiente (THAMMAVONGS et al., 2008).

Estudos de variabilidade genética e fisiológica geralmente são conduzidos através das superfamílias de proteínas, as quais são constituídas de proteínas de origem comum ou mesmo com homologia estrutural. Sendo estas enzimas, a variabilidade pode abranger particularidades na especificidade, ou mesmo, no controle de ativação (RANEA et al., 2006).

A resposta bacteriana ao estresse oxidativo tem sido estudada e pode ser considerada bem caracterizada a pelo menos 3 décadas, porém o papel das enzimas na resposta a estresse global, bem como a resposta adaptativa a agentes contaminantes, ainda carece de melhor caracterização. Durante estresse oxidativo, a bactéria *E. coli* apresenta duas vias de respostas bem caracterizadas, sendo uma em combate ao radical superóxido, e outra induzida na presença de peróxido de hidrogênio (LUSHCHAK, 2011). Em ambos os casos, é possível reconhecer enzimas chaves dos processos, como a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1.) e a catalase (CAT E.C. 1.11.1.6), respectivamente (Figura 4.1).

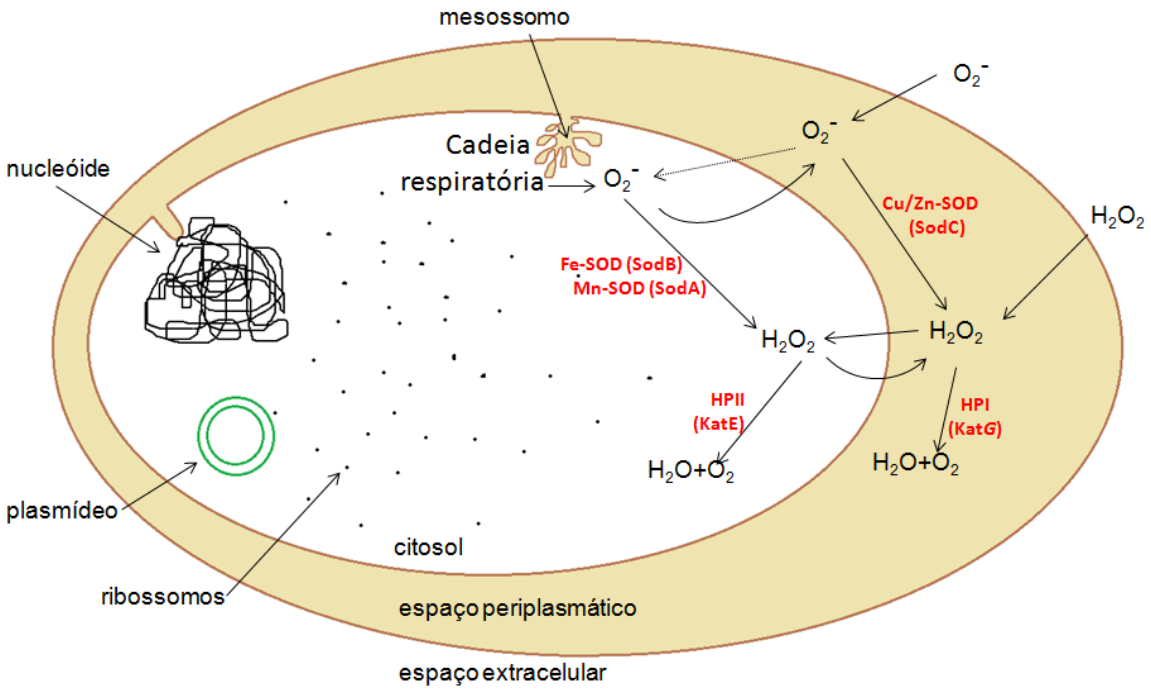


Figura 4.1 – Figura ilustrativa das reações envolvendo as enzimas CAT e SOD em *Escherichia coli*, mostrando as rotas de transporte de ERO's e as possíveis relações entre as enzimas, conforme a localização celular

A SOD é encontrada em *E. coli* K-12 sob forma de 3 isoenzimas, sendo estas caracterizadas pela localização celular e cofator metal presente na sua estrutura protéica (GREGORY; YOST; FRIDOVICH, 1973). No citosol da célula, a bactéria *E. coli* apresenta a manganês (Mn) SOD, codificada pelo gene s*odA* (TOUATI, 1983) e a ferro (Fe) SOD (SAKAMOTO; TOUATI, 1984), expressa por s*odB*, ambas sob controle do gene *fur* (ferric update regulon) e relacionadas ao combate do radical superóxido durante crescimento bacteriano (produzido endogenamente) (NIEDERHOFFFER et al., 1990). Já a isoenzima cobre/zinco (Cu/Zn) SOD, codificada pelo gene *SodC*, está presente no espaço periplasmático, e devido a isso, geralmente está associada ao combate de O_2^- de origem extracelular (BENOV; FRIDOVICH, 1994).

Como parte da resposta adaptativa ao estresse oxidativo, em especial aquele induzido por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a bactéria *E. coli* pode induzir duas hidroperoxidases, chamadas de HPI e HPII, as quais apresentam diferentes estruturas, bem como propriedades cinéticas (SHELLHORN, 1994).

A HPI é uma enzima codificada pelo gene *KatG* sob condições aeróbicas e anaeróbicas, e está relaciona ao combate de estresse gerado por condições subletais de H_2O_2 (TRIGGS-RAINE et al., 1988). Sob controle do fator transcricional

OxyR, a HPI é a menor hidroperoxidase encontrada em *E. coli*, quando observada a atividade total da enzima, porém é o determinante celular mais importante para resistência contra H_2O_2 (LOEWEN, 1996).

Por outro lado, a HPII, codificada pelo gene *KatE* (Von OSSOWSKI et al., 1991), está sob controle do fator transcricional *rpoS*, e dessa forma não responde diretamente à variações na concentração de H_2O_2 (JUNG; KIM, 2003). Esta hidroperoxidase apresenta níveis maiores de expressão quando a bactéria se encontra na fase exponencial de crescimento, o que mostra que sua regulação está intimamente ligada com o crescimento bacteriano (LOEWEN, 1996).

Em resposta a contaminantes ambientais, como herbicidas, as enzimas CAT e SOD podem apresentar variações na atividade, como caracterizado em estudo conduzido com bactérias *E. coli e Bacillus subtilis* em resposta ao estresse causado por quinclorac (LU; MINUTO; XIA, 2004) e acetamiprid (YAO; MIN; MEI LV, 2006). Estas diferenças de atividade podem estar relacionadas ao metabolismo de adaptação a toxicidade do xenobiótico, ou mesmo, à indução de vias de estresse global, como resposta cooperativa às vias de degradação do herbicida.

O presente estudo foi realizado visando encontrar a atividade diferencial das isoenzimas de CAT e SOD na resposta bacteriana ao estresse causado pelo herbicida s-metolachlor. Para isso, a bactéria *Escherichia coli* K-12 foi utilizada como modelo de estudo para observação do efeito da deleção dos genes responsáveis pelas enzimas HPI, HPII, Mn-SOD e Fe-SOD na resposta adaptativa ao herbicida s-metolachlor, reconhecido pela sua toxicidade e ação no desequilíbrio da homeostase redox celular.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Linhagens bacterianas

A linhagem selvagem da bactéria *Escherichia coli* BW25133, descrita também como derivada da linhagem K-12, e as linhagens com simples mutações, foram usadas da “KEIO Knockout Collection” (BABA et al., 2006), conforme tabela 4.1. As linhagens mutantes tiveram os respectivos genes substituídos por um gene que confere resistência à canamicina através do método “Red Swap” (DATSENKO; WANNER, 2000).

Tabela 4.1 - Linhagens mutantes de *Escherichia coli* oriundas da "KEIO Knockout Collection"

ECK	**JW**	**Gene**	**Descrição**
ECK3934	JW3914	*katG*	Catalase HPI
ECK1730	JW3914	*katE*	Catalase HPII
ECK3901	JW3879	*sodA*	Mn-SOD
ECK1652	JW1648	*sodB*	Fe-SOD

4.2.2 Experimento e condições de cultivo

As linhagens bacterianas foram cultivas em meio Luria-Bertani (LB) 50%, contendo 0,5% de triptona, 0,25% de extrato de levedura e 0,25% de NaCl (w:v). As culturas foram inoculadas usando a proporção de 1:100 de pré-inóculo advindo de 2-3 colônias bacterianas, incubado a 250 rpm e 37ºC, sendo que a densidade de células foi ajustada para 1,0 abs (600 nm).

O experimento foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 125 mL com volume de 50 mL, sendo 3 repetições biológicas, nas mesmas condições descritas anteriormente para o pré-inóculo. Foram testados dois tratamentos, sendo controle (meio LB 50%) e LB com s-metolachlor 2,5 mg/mL (Sigma-Aldrich), o qual foi adicionado ainda no preparo do meio de cultura. Após 5 h de cultivo nos tratamentos, ainda durante a fase log, as células bacterianas foram coletadas por centrifugação a 8.000 rpm por 7 min, à 4ºC, e mantidas a -80ºC para análises posteriores.

4.2.3 Curva de crescimento e sobrevivência das células na presença do herbicida

O crescimento bacteriano foi determinado na presença e ausência de s-metolachlor, através da leitura da densidade ótica (D.O.) a 600 nm, em intervalo de tempo de 1 h. Para contagem de células viáveis com 5 h de cultivo (tempo de coleta), as células bacterianas dos tratamentos controle (LB 50%) e s-metolachlor (LB 50% com 2,5 mg/mL do herbicida) foram diluídas a 10^5 e 10^6 em tampão Salino-Fosfato (PBS), e ambas as diluições foram plaqueadas em meio LB Agar. Após 24 h de incubação a 37 ºC, o número de U.F.C. foi contabilizado.

4.2.4 Quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

A concentração de H_2O_2 intracelular foi medida de acordo com protocolo proposto por Alexieva et al. (2001), no qual as células maceradas em nitrogênio líquido são homogeneizadas em 0,1% de ácido tricloroacético (TCA) (w:v), na proporção de 1:3 (w:v), e o extrato centrifugado a 10.000 rpm, por 30 min, a 4ºC.

Após centrifugação, o sobrenadante, foi coletado e a fração de 0,2 mL foi adicionada a mistura de reação contendo 0,2 mL de Tampão Fosfato 100 mM, pH 7,5 e 0,8 mL de solução 1M de KI. A mistura de reação foi mantida na ausência de luz, a 4ºC, durante 1 h, seguida de 20 min a temperatura ambiente. Ao final do processo, a concentração de H_2O_2 foi obtida por leitura da absorbância em 390 nm.

A concentração de H_2O_2 foi calculada utilizando uma curva padrão preparada com concentrações conhecidas de H_2O_2 e os resultados foram expressos em mMol de $H_2O_2/10^6$ U.F.C.

4.2.5 Quantificação de MDA (malondialdeído)

A peroxidação lipídica foi estimada através da produção de MDA (HEALTH; PACKER, 1968). As células bacterianas foram maceradas em TCA 0,1%, juntamente com 20% de PVPP, e centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min.

Do sobrenadante, 0,25 mL foi transferido para outro tubo juntamente com 1 mL de solução contendo TCA 20% e TBA 0,5%. A mistura foi aquecida por 30 min a 95ºC, e na sequencia, resfriada em gelo. A concentração de MDA foi calculada utilizando o coeficiente de extinção de 155 mM cm^{-1}, e os resultados expressos de acordo com o número de células contabilizado no tempo de coleta.

4.2.6 Atividade de enzimas antioxidantes

4.2.6.1 Atividade da enzima SOD em PAGE não desnaturante

A atividade da SOD foi analisada em PAGE não desnaturante (12%). Após a separação das proteínas eletroforeticamente, a atividade de SOD foi determinada como descrito por Beuchamp e Fridovich (1971).

Revelação: os géis foram enxaguados rapidamente em água deionizada e incubados no escuro, a temperatura ambiente, em uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8, 1 mM EDTA, 0,05 mM riboflavina, 0,1 mM nitroblue tetrazolium (NTT) e 0,3% TEMED. Ao final de 30 min, a mistura de

reação foi descartada, os géis foram mantidos em água deionizada e expostos a luz até o aparecimento de bandas brancas e coloração do gel.

4.2.6.2 Atividade da enzima CAT em espectrofotômetro

A atividade foi determinada em solução de reação formada por 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 0,025 mL de peróxido de hidrogênio (0,03 %). A reação foi iniciada com 25µL de extrato protéico, a 25°C, e a atividade determinada através da decomposição de peróxido de hidrogênio, por monitoramento da absorbância a 240nm. Os resultados foram expressos em µmol/min/mg de proteína.

4.3 Resultados

4.3.1 A taxa de crescimento bacteriano é menor na presença do herbicida s-metolachlor

A célula bacteriana pode ser vista como um estado contínuo e dinâmico, no qual respostas adaptativas devem ser tomadas de forma rápida para mudanças ambientais. A exposição a contaminantes, como herbicidas podem modificar a síntese de enzimas, limitar o crescimento microbiano, bem como modular o metabolismo de acordo com a disponibilidade de nutrientes (ROSZAK;COWELL, 1987).

No presente estudo, o crescimento bacteriano em exposição ao herbicida s-metolachlor foi analisado em linhagens bacterianas de *E. coli* K-12 que tinham deleções em genes não essenciais, como *katG, katE, sodA* e *sodB*. A figura 4.1 mostra as curvas de crescimento em um período de 7 h de cultivo, sendo que inicialmente todas as linhagens, inclusive a wt, apresentaram taxa menor de crescimento na presença do herbicida.

Se analisado o crescimento em meio controle, somente as linhagens com deleções nos genes que codificam isoenzimas de SOD apresentaram crescimento diferenciado, sendo este em menor taxa que a observada para linhagem wt e mutantes *ΔkatG* e *ΔkatE*. No entanto, a bactéria *E. coli* K-12 apresenta, além das hidroperoxidases HPI e HPII, a enzima alquil hidroperoxidase redutase (AhpC) que também atua no combate ao H_2O_2 (SEAVER; IMLAY, 2001). Dessa forma, o aumento de peróxido de hidrogênio no meio intracelular pode ser combatido através

do trabalho coordenado das peroxidases, o que poderia atenuar efeitos no crescimento bacteriano, o que não é possível para a enzima SOD, uma vez que esta é a única responsável pela dismutação do O_2^-, e a deleção de um gene pode afetar o combate a essa ERO (espécie reativa de oxigênio).

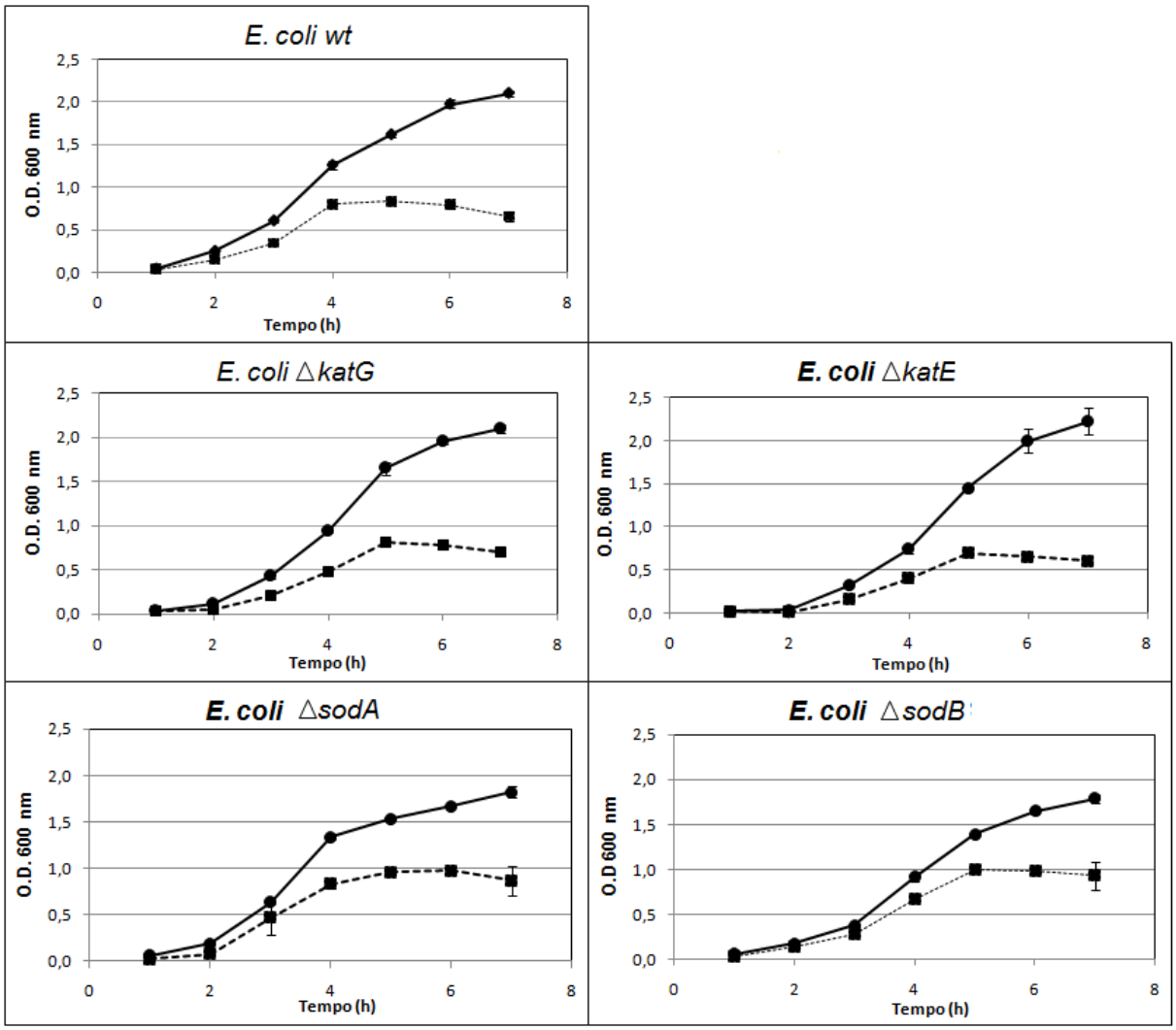


Figura 4.1 – Curvas de crescimento de linhagens bacterianas de *Escherichia coli* K-12, sendo estas representadas pela linhagem wt, e 4 linhagens com deleções simples nos genes *katG, katE, sodA* e *sodB*, as quais foram expostas ao herbicida s-metolachlor

Por outro lado, quando as linhagens foram expostas ao herbicida s-metolachlor, novamente as linhagens wt, *ΔkatG* e *ΔkatE* apresentaram queda similar na taxa de crescimento, o que não se observa nas linhagens *ΔsodA* e *ΔsodB*. Carlioz e Touati (1986), em trabalho com linhagens de *E. coli* com deleção para os genes *sodA* e *sodB,* mostraram que as taxas de crescimento entre as linhagens mutantes e a selvagem não mudaram quando cultivadas em meio rico. Porém,

quando na presença do herbicida paraquat, e em meio mínimo, as linhagens mutantes se mostraram mais sensíveis que a selvagem.

Apesar do menor crescimento na presença do s-metolachlor, as linhagens bacterianas com deleção de genes para *SodA* e *SodB* apresentaram crescimento ligeiramente maior após 7 h de cultivo (Figura 4.1 e 4.2).

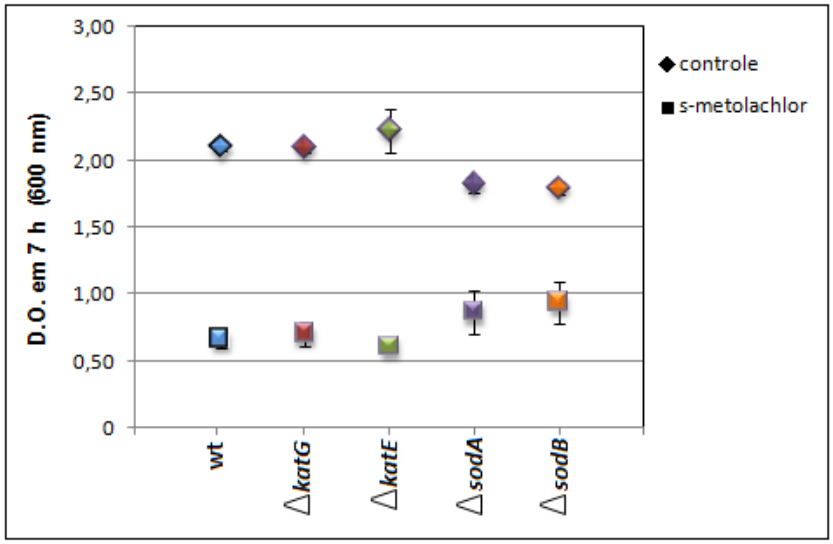


Figura 4.2 – Crescimento de *E. coli* mutantes para os genes *de* enzimas antioxidantes na presença do herbicida s-metolachlor

O aumento da taxa de crescimento das linhagens *ΔsodA* e *ΔsodB* pode estar relacionado à resposta inicial funcional à deleção do gene induzida pela exposição ao herbicida, e que de forma indireta, afetou também os ajustes metabólicos necessários para a adaptação à presença do s-metolachlor. Segundo Fong e Palsson (2004), variações nas rotas de adaptação podem ser diretamente relacionadas à quantidade de ajustes metabólicos necessários para compensar a deleção do gene. Neste caso, a condição específica de crescimento imposta pela presença do herbicida pode ter gerado aumento no fluxo do metabolismo, e assim, refletido na adaptação ao s-metolachlor das linhagens mutantes para SOD.

As mudanças nas taxas de crescimento podem ser resultado da indução do estresse oxidativo pela presença do herbicida s-metolachlor, além do desequilíbrio causado pela deleção de gene. Dessa forma, para entender o metabolismo antioxidante das linhagens, foi dado prosseguimento com a quantificação de H_2O_2 e MDA.

4.3.2 A deleção dos genes *katG, katE, sodA* e *sodB* induz desequilíbrio metabólico gerando estresse oxidativo, o que pode ser potencializado pela presença do herbicida s-metolachlor

As mudanças fisiológicas de *E. coli* em resposta a estresse oxidativo têm sido bastante elucidadas. Uma vez que o anion superóxido e o peróxido de hidrogênio são reconhecidos como elementos centrais na caracterização do estado de estresse oxidativo, pode-se assumir que as enzimas SOD e CAT apresentam importante papel na defesa antioxidante. Entretanto, vários fatores estão envolvidos na resposta ao estresse, do que a simples atividade de duas enzimas.

Inicialmente, em bactérias, as vias enzimáticas envolvidas na resposta a estresse e manutenção do estado redox celular estão sob controle de fatores transcricionais (IMLAY, 2008), os quais podem regular dezenas de proteínas quando ativados. Muitas dessas proteínas, como por exemplo, as peroxidases, podem ser representadas por isoenzimas, as quais, por sua vez, podem apresentar especificidades singulares (SEAVER; IMLAY, 2001). E finalmente, somado a este cenário, a concentração das ERO's no meio intracelular depende de uma séria de fatores, tais como rotas de influxo entre compartimentos, formação endógena, equilíbrio entre combate à ERO’s e efluxo (SEAVER; IMLAY, 2001).

As linhagens de *E. coli* K-12 cultivadas em exposição ao herbicida s-metolachlor, mostraram que a deleção de um gene, codante de enzima antioxidante, pode interferir negativamente no combate a ERO's (Figura 4.3), e , acarretar danos celulares advindos do estresse oxidativo (Figura 4.4).

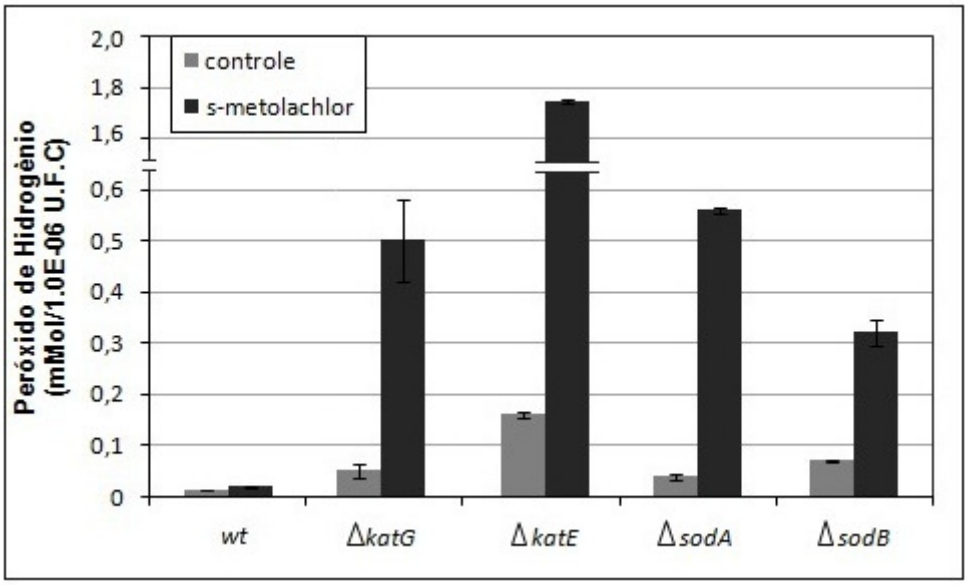


Figura 4.3 – Quantificação de peróxido de hidrogênio intracelular em linhagens de *E. coli* K-12 expostas ao herbicida s-metolachlor

A figura 4.3 mostra aumento na concentração de H_2O_2 no meio intracelular nas linhagens que tiveram deleção de gene, mesmo em meio controle (LB 50%), sendo que a deleção do gene *katE* foi mais prejudicial que a dos outros genes analisados. Este desequilíbrio causado pela deleção de *katE* também refletiu na alta sensibilidade da linhagem Δ*katE* ao herbicida s-metolachlor. Porém foi a deleção do gene *sodA* que apresentou maior aumento de H_2O_2 quando as linhagens foram cultivadas na presença do herbicida, sendo esta de 14 vezes, relativo ao meio controle.

Lü et al. (2009), em trabalho com as bactérias *E. coli* K-12 e *Stenotrophomonas maltophilia* WZ2, apresentam a importância das enzimas SOD e CAT na resistência microbiana a herbicidas. Porém, muitas vezes as análises de atividade enzimática refletem somente a atividade total das enzimas, não sendo possível distinguir o papel de cada isoforma no combate ao estresse oxidativo causado pelos contaminantes ambientais.

No presente estudo, é possível observar que cada isoforma atua de maneira particular no combate ao peróxido de hidrogênio. Entre as isoformas de catalase, as quais atuam diretamente na degradação de H_2O_2, a isoforma HPII (codificada pelo gene *katE*) apresenta papel determinante no combate ao H_2O_2. Já entre as isoformas de SOD, a concentração de peróxido foi maior quando o gene que expressa a isoenzima Mn-SOD foi deletado, sugerindo uma maior participação desta

enzima no controle indireto da produção de peróxido causado pela exposição ao herbicida s-metolachlor.

Caracterizando o estresse oxidativo induzido pelo herbicida s-metolachlor, a figura 4.4 apresenta os dados referentes a peroxidação lipídica, indicados pela produção de MDA. De forma geral, as linhagens que apresentaram deleção nos genes estudados, mostraram valores maiores de MDA quando comparados com a linhagem wt.

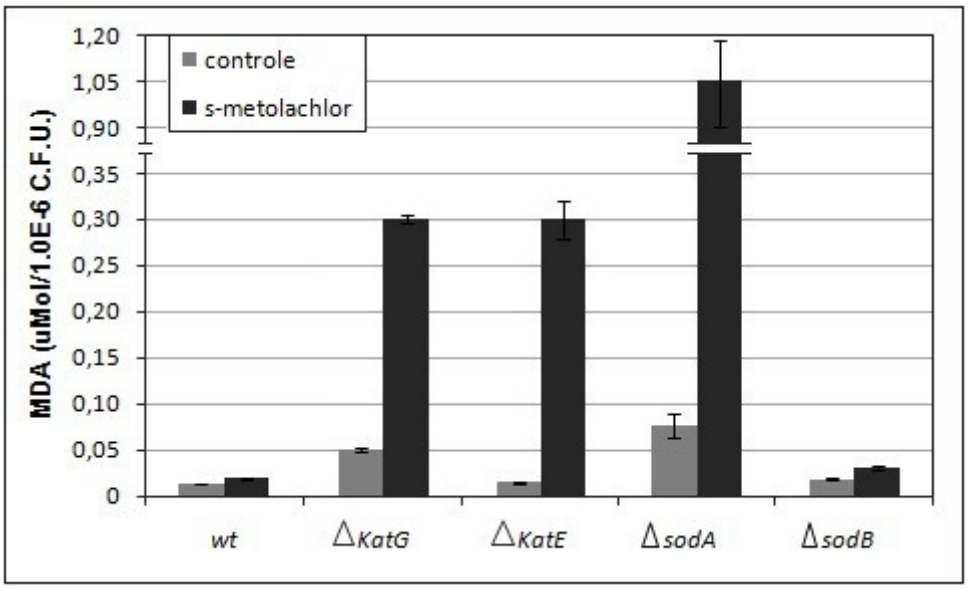


Figura 4.4 – Análise da peroxidação lipídica, através da quantificação de MDA, em linhagens de *E. coli* K-12 expostas ao herbicida s-metolachlor

Os dados de peroxidação lipídica (Figura 4.4) mostram que somente as linhagens com deleção nos genes *katE* e *sodA* apresentaram níveis de peroxidação lipídica maiores que a linhagem wt em meio controle. Porém, quando expostas ao herbicida s-metolachlor, a linhagem com deleção no gene *katG* também apresenta aumento significativo nos níveis de MDA, porém em menor intensidade. Neste caso, não foi possível relacionar diretamente a presença de H_2O_2 e níveis de peroxidação lipídica para todas as linhagens, sendo que possivelmente outros fatores estejam interferindo nesta correlação, como a atividade de outras enzimas antioxidantes, como alquil peroxidase.

Em *E. coli*, as isoenzimas de catalase apresentam localização celular específica, relacionada a sua função no combate a H_2O_2, dependendo da origem desta ERO's. A enzima HPI, codificada pelo gene *katG*, é encontrada no espaço

periplasmático de *E. coli*, e a HPII, expressa por *katE*, apresenta atividade no citosol da célula (IMLAY, 2008). Neste trabalho, o herbicida s-metolachlor tem a produção de ERO's como uma consequência indireta do desequilíbrio celular causado pela presença do contaminante no meio intracelular. Devido ao modo de ação dos cloroacetanilidas, a inibição de proteínas que contém o grupo tiol em sua estrutura (BÖGER; MATTHES; SCHMALFUB, 2000), como glutationa e tioredoxina, acarreta a quebra do ciclo de redução de compostos tamponantes do meio celular, o que consequentemente, origina alteração do estado redox da bactéria.

Dessa forma, a presença do herbicida no meio intracelular pode ter ocasionado danos a célula, através da inibição de proteínas, o que juntamente com a ausência da HPII (*katE*), pode ter levado ao aumento de 20x nas taxas de peroxidação lipídica, quando comparado com o cultivo da linhagem mutante para este gene no meio controle. Já para a linhagem Δ*katG*, o aumento da taxa de peroxidação lipídica quando cultivada em meio com s-metolachlor, foi de cerca de 6x, nas mesmas condições descritas para a linhagem anterior, o que pode indicar que também ocorre a indução da produção de H_2O_2 no espaço periplasmático.

Entre as linhagens mutantes para SOD, é significativo o papel da Mn-SOD na defesa do estresse oxidativo causado pelo herbicida s-metolachlor. Enquanto a linhagem Δ*sodB* apresentou aumento de 1,6x na peroxidação lipídica quando cultivada na presença do herbicida s-metolachlor, a linhagem mutante para o gene *sodA* mostrou aumento de 13,6x nas mesmas condições. Neste caso, apesar das duas isoenzimas estarem localizadas no citosol, o papel diferencial dessas no combate ao estresse induzido pelo s-metolachlor pode estar relacionado a particularidades da estrutura molecular das enzimas.

Os resultados obtidos para concentração de peróxido podem não ter explicado diretamente a indução da peroxidação lipídica nas linhagens bacterianas estudadas. Uma vez que a participação de cada isoenzima na atividade total, bem como características especiais como estrutura e afinidade pelo substrato, podem interferir diferencialmente no combate ao estresse oxidativo causado pelo herbicida s-metolachlor, é importante a avaliação da atividade enzimática relacionada aos genes deletados.

4.3.3 A Mn-SOD (*sodA*) é a isoforma com maior contribuição na atividade total de SOD, e tem papel fundamental na resposta ao herbicida s-metolachlor

A enzima SOD é citada em artigos sobre toxicidade de contaminantes ambientais como sendo uma enzima chave na resposta antioxidante ao estresse causado por estes agentes, como herbicidas e metais pesados (PANDEY et al., 2010, MARTINS et al., 2011, LÜ et al., 2009).

No presente estudo, a atividade de SOD em PAGE possibilitou mostrar a contribuição diferencial das isoenzimas na atividade total da enzima, além de indicar uma possível regulação conjunta destas. A figura 4.6A mostra que a bactéria *E. coli* K-12 induz, em condições normais de crescimento (meio LB, 37°C, 250 rpm), 3 isoenzimas de SOD, sendo estas caracterizadas como Mn-SOD (*sodA*), Cu/Zn-SOD (*sodC*) e Fe-SOD (*sodB*).

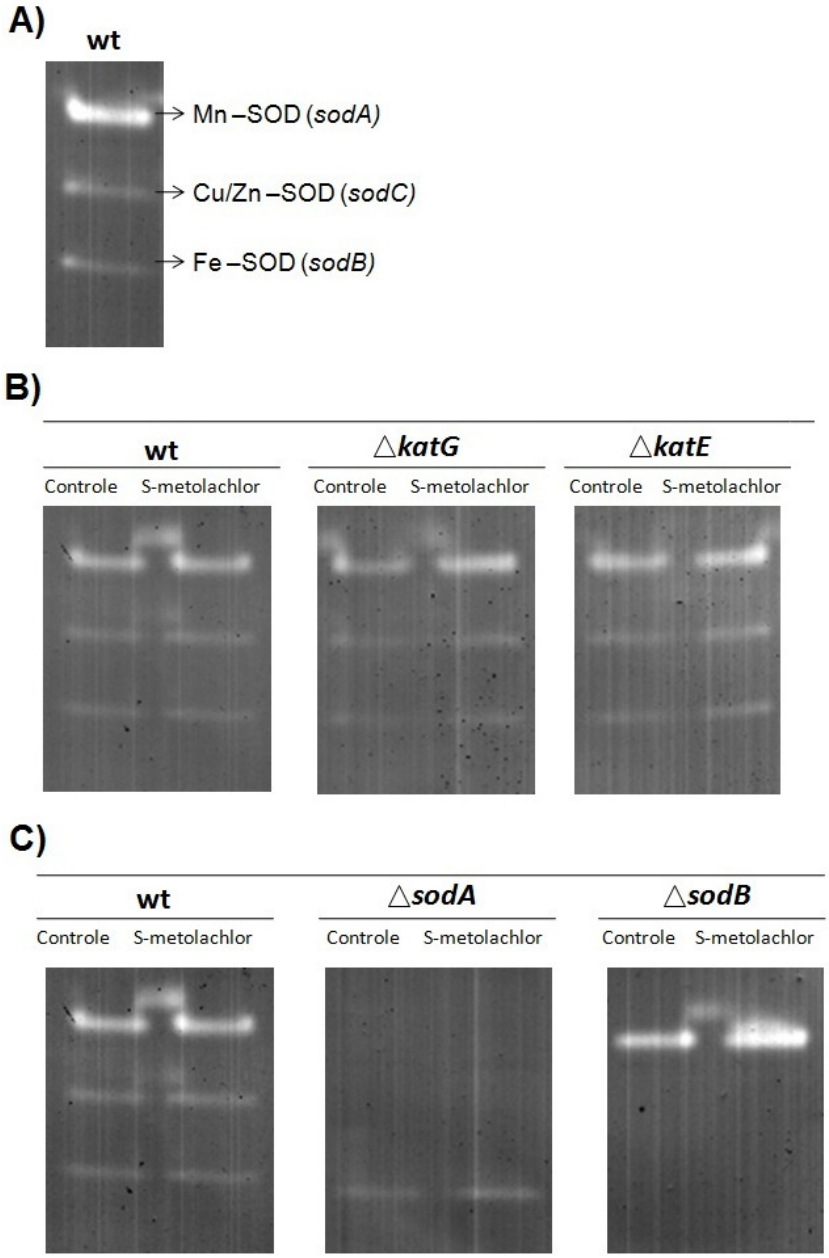


Figura 4.6 – Atividade de SOD em PAGE de linhagens de *Escherichia coli* K-12 expostas ao herbicida s-metolachlor

A presença do herbicida s-metolachlor induziu o estresse oxidativo no meio intracelular, assim como evidenciado pelo aumento de H_2O_2 (Figura 4.3), o que pode estar relacionado à atividade de SOD, uma vez que esta tem como produto final de reação o H_2O_2. Entretanto, através de análise em PAGE, a enzima SOD não apresentou diferenças significativas na atividade quando as linhagens wt, Δ*katG* e Δ*katE* (Figura 4.6B) foram expostas ao herbicida s-metolachlor.

Já ao analisarmos as linhagens *ΔsodA* e *ΔsodB*, é possível observar que a deleção destes genes, indiretamente inibe na atividade da terceira isoforma Cu/Zn-

SOD (Figura 4.6C), presente na linhagem wt, porém ausente nas outras duas linhagens *ΔsodA* e *ΔsodB*. Por outro lado, entre as isoformas de SOD, a Mn-SOD é a isoenzima que mais contribui para a atividade total desta classe de enzimas, e é possível observar na linhagem mutante para o gene *sodB*, que a presença do herbicida s-metolachlor induz a atividade de Mn-SOD, conforme mostra a banda relativa a esta isoenzima.

À nível transcricional, a isoenzima Fe-SOD pode ser ativada pela presença de H_2O_2, de maneira indireta, uma vez que esta ERO pode induzir o fator transcricional Fur (*ferric uptake regulator*), o qual regula positivamente o gene *sodB* (VARGHESE et al., 2007). Entretanto, a resposta de SOD na bactéria *E. coli* K-12 não teve participação reconhecida pela isoenzima Fe-SOD (*sodB*), mesmo com aumento na concentração de H_2O_2 em resposta ao herbicida s-metolachlor.

Em estudo sobre expressão diferencial de proteínas na linhagem de *Burkholderia cepacia* WZ1 exposta ao quinclorac, Li et al. (2009) encontraram a isoenzima Mn-SOD exclusivamente expressa na presença do herbicida, o que levou os autores a relatar a importância desta para proteção contra a toxicidade do quinclorac.

A enzima superóxido dismutase, através da dismutação do anion superóxido, forma o peróxido de hidrogênio, como produto de reação, o qual pode servir de substrato para a enzima catalase. Dessa forma, ao avaliar a atividade de CAT, um panorama geral do fluxo de reações em resposta ao herbicida s-metolachlor pode ser observado, inclusive com a participação de cada isoenzima de forma independente.

4.3.4 A atividade de catalase é induzida diferencialmente entre as linhagens mutantes de *E. coli*

A atividade total de catalase em *Escherichia coli* é atribuída a duas enzimas, localizadas no periplasma (HPI) e no citosol da célula (HPII). Codificadas por genes diferentes e reguladas de maneira independente, as enzimas hidroperoxidases têm papéis específicos na defesa contra o estresse oxidativo (SEAVER; IMLAY, 2001).

A exposição ao herbicida s-metolachlor induziu diferentes respostas nas linhagens de *E. coli* K-12 (Figura 4.5), quando analisada a atividade total de catalase. Conforme mostrado anteriormente, a presença do herbicida aumentou a concentração de H_2O_2 intracelular nas linhagens mutantes, o que poderia causar

indução da maquinaria enzimática necessária para combate à ERO. Entretanto, esta resposta foi encontrada somente nas linhagens wt e *ΔsodA* (Figura 4.5).

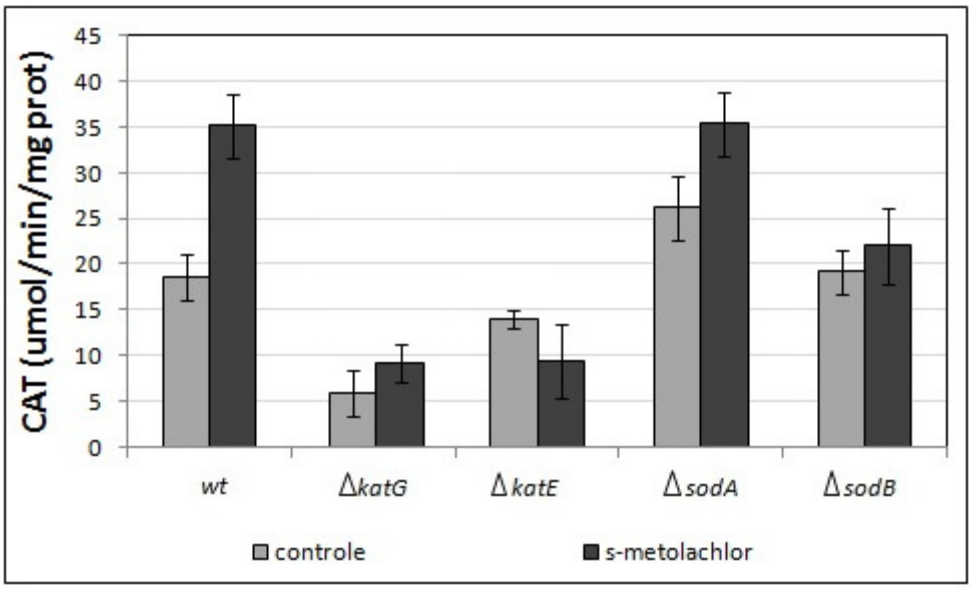


Figura 4.5 – Atividade total de catalase em linhagens de *Escherichia coli* K-12 expostas ao herbicida s-metolachlor

A deleção dos genes *katE* e *katG* mostrou que a participação das isoformas na resposta total de catalase é ocorre de maneira similar, e não representa o mesmo comportamento para resposta ao herbicida encontrado quando as duas isoformas estão ativas (linhagem wt). Com incremento de cerca de 88% na atividade total de catalase, a linhagem wt não apresentou aumento na concentração de H_2O_2, tão pouco nos níveis de peroxidação lipídica, o que indica que HPI e HPII trabalham conjuntamente na manutenção de níveis de peróxido de hidrogênio não tóxicos.

Entretanto, a atividade de CAT na linhagem com deleção do gene *sodA* corroborou com os resultados anteriores, os quais mostraram a importância desta isoenzima para a controle de um ambiente redutor intracelular. Esta hipótese vem do fato que a deleção do gene *sodA* acarretou aumento na concentração de H_2O_2 e níveis de peroxidação lipídica, mesmo que a atividade de CAT tenha sido mantida em níveis similares à encontrada na linhagem wt.

Já a ausência da isoforma Fe-SOD (*sodB*), não afetou significativamente as taxas de peroxidação lipídica, apesar de haver aumento da concentração de H_2O_2 e queda na atividade de CAT nos tratamentos testados.

A importância da atividade total de CAT em bactérias expostas a contaminantes ambientais pode ser observada no artigo publicado por Lü et al. (2009), no qual a bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* WZ2, cultivada na presença do herbicida quinclorac apresenta duas novas isoformas de CAT, resultado também observado para o herbicida bensulfuron-metil.

Porém, a regulação das isoformas estudadas pela deleção dos respectivos genes em *E. coli* K-12 vai além das vias interligadas a nível bioquímico, a qual culmina na resposta antioxidante que conecta a atividade das enzimas CAT e SOD. A especificidade das funções de cada isoenzima pode ser conjugada em um nível anterior, no qual a regulação a nível transcricional, realizada principalmente por fatores como OxyR, e SoxRS, realiza controle da expressão de genes, os quais podem estar sob regulação cruzada, seja pelo componente responsável pela indução, seja pelo produto da reação compartilhado.

4.5 Discussão

O metabolismo de resposta adaptativa bacteriana é notavelmente conhecido por ser constituído de elementos que controlam os níveis de ERO's de maneira integrada, seja pelo combate direto destas, seja por proteínas relacionadas a ajustes do potencial antioxidante e fluxo metabólico. Em uma visão global, é possível afirmar que o sistema antioxidante bacteriano é formado por mecanismos sensoriais baseados, principalmente, na ativação de proteínas com resíduos de cisteína ou [Fe, S (ferro-enxofre)], como exemplo de OxyR e SoxRS, respectivamente (LUSHCHAK, 2011).

As respostas dos sensores redox trabalham cooperativamente na resposta metabólica à perturbações do ambiente (CABISCOl; TAMARIT; ROS, 2000), porém, atualmente, já é reconhecida a participação de outros sistemas de regulação transcricional, como RpoS (fator sigma) e Fur (*Ferric Uptake Regulator*), os quais podem ativar proteínas que constituem a rede de vias bioquímicas que integram o sistema antioxidante (SHELLHORN et al., 1994; THOMPSON et al., 2002; LUSHCHAK, 2011).

Neste trabalho, linhagens de *E. coli* K-12, com deleções nos genes *katG, katE, sodA* e *sodB*, foram submetidas ao herbicida s-metolachlor com o objetivo de encontrar o papel destas isoformas na resposta antioxidante ao contaminante ambiental. Inicialmente, foi possível observar que as respostas diferenciais no

combate ao estresse foram, principalmente, acarretadas pela deleção da isoenzima Mn-SOD, codificada por *sodA*.

Inicialmente, as deleções realizadas nos genes *katG* e *katE* afetaram de maneira similar a resposta ao estresse oxidativo causado pelo herbicida. Apesar de ambas as hidroperoxidases serem induzidas pelo gene *fur*, o qual está sendo apresentado como um regulador de rede genética complexa em bactérias, existe também uma regulação diferencial e independente de cada hidroperoxidase que se interpôe a esta realizada pela proteína Fur. (HOERTER et al., 2005).

A HPI, regulada pelo fator OxyR, geralmente tem sua atividade associada à resposta antioxidante induzida pela presença de H_2O_2 (SCHELLHORN, 1994; JUNG; KIM, 2003). Por outro lado, a HPII é codificada pelo gene *katE*, é induzida, durante o crescimento bacteriano, na fase estacionária, uma vez que está sob controle do fator sigma (RpoS).

Dessa forma, é possivel afirmar que a participação das isoenzimas de CAT na resposta bacteriano ao herbicida não foi influenciada pelos fatores que poderiam induzir e assim diferenciar a contribuição de cada hidroperoxidase na condição estudada. Primeiramente, porque a produção de peróxido de hidrogênio não foi direta e/ou exclusiva, e sim consequencia do desequilibrio metabólico e provável inibição de enzimas que atuam na manutenção do estado redox (BÖGER; MATTHES; SCHMALFUB, 2000), e também porque as análise realizadas ocorreram ainda no final da fase exponensial de crescimento, sem grande influencia do fator sigma (rpoS).

Já os resultados obtidos para as linhagens mutantes de SOD apresentaram papel diferencial das isoenzimas analisadas no combate ao estresse oxidativo causado pelo herbicida s-metolachlor. Porém, para compreensão desta diferenciação na função de isoenzimas de SOD, primeiramente faz-se necessário o entendimento dos níveis de regulação aos quais estas proteínas estão submetidas no metabolismo de *E. coli.*

Em bactérias da família *Enterobacteriaceae*, o sistema antioxidante é organizado em duas vias bioquímicas distintas de combate ao estresse oxidativo, sendo caracterizadas pelo agente indutor. Além do sistema OxyR, ativado por H_2O_2, e no qual as hidroperoxidases têm papel bastante relevante, a bactéria *E. coli* também apresenta o locus genético sosR (*superoxide response*).

Este locus constitui o regulon SoxRS, cuja função no controle do anion superóxido é bastante reconhecida, bem como sua indução na presença desta ERO (LUSHCHAK, 2011). A regulação dos níveis de superóxido intracelular, é controlada pela enzima SOD, considerada chave pois somente ela atua na dismutações de O_2^-. Em *E. coli*, a SOD pode ser classificada em 3 isoenzimas: Mn-SOD (*sodA*), Fe-SOD (*sodB*) e a Cu/Zn-SOD (*sodC*), a qual muitas vezes não é encontrada em microorganismos cultivados em laboratório, porque é responsável pela defesa de superóxido de origem exógena, situação geralmente encontrada em microroganismos patogênicos (KEITH; VALVANO, 2007).

Sendo assim, na análise em das isoenzimas de SOD, este trabalho focou nas duas isoformas Mn-SOD e Fe-SOD, as quais também foram encontradas na bactéria *Enterobacter asburiae* SD1, degradante do herbicida s-metolachlor, conforme citado no capítulo 2 e 3 da presente tese. A bactéria *Escherichia coli* K-12 com deleção do gene *sodB* apresentou indução da atividade da isoforma Mn-SOD, como verificado na figura 4.6C. Por outro lado, o isolado bacteriano *E. asburiae* SD1, além de aumento de atividade total de SOD quando cultivada na presença do herbicida s-metolachlor em meio rico, também apresentou a indução de uma nova isoforma de SOD na defesa ao estresse oxidativo causado pelo herbicida s-metolachlor.

Em estudos que descrevem o sistema antioxidante de organismos expostos a contaminantes ambientais, a isoenzima Mn-SOD geralmente é encontrada induzida, o que vem relacionado ao seu importante papel na desintoxicação celular nestas condições. Martins et al. (2011), relatam que isolados bacterianos, oriundos de solos agrícolas e expostos aos herbicidas s-metolachlor e acetochlor, apresentaram aumento da atividade de SOD na presença do contaminantes. O aumento da atividade, justificado pelo incremento da intensidade da banda referente a Mn-SOD em técnica de PAGE, foi relacionada à tolerância dos isolados bacterianos aos herbicidas testados.

Em outro estudo, no qual avaliou o papel das enzimas antioxidantes na resistência bacteriana a ácidos orgânicos, a bactéria *E. coli* submetida a estresse ácido, teve suas isoformas Fe-SOD e Mn-SOD avaliadas indipendentemente. Os resultados deste estudo mostraram que a Fe-SOD não foi tão eficiente quanto a Mn-SOD na proteção do estresse oxidativo gerado pela condição ácido do meio de cultivo (BÁRCENA; AZCÁRATE; HASSAN, 2010).

Um ponto interessante da análise da atividade de SOD em PAGE no presente estudo, foi a ausência da isoforma Cu/Zn-SOD quando realizada a deleção dos genes que codificavam outras isoformas, Fe-SOD e Mn-SOD. Esta ausência pode ser devido a baixa atividade de Cu/Zn-SOD, o que torna a técnica em PAGE incapaz de reconhecer a atividade nas condições analisadas.

Em análise PAGE feita com a linhagem de *E. coli* K-12, mutante para o gene *sodC*, foi possível observar a ausência da banda correspondente a isoenzima Cu/Zn-SOD e a presença de outras duas bandas, referentes a Fe-SOD e Mn-SOD. Ou seja, a deleção de uma das isoformas, seja Fe-SOD ou Mn-SOD, influenciam na atividade da isoforma Cu/Zn-SOD, porém o oposto não é observado, ou seja, a deleção de Cu/Zn-SOD não interfere na atividade das outras duas isoformas.

Esses dados podem indicar uma possível regulação entre as isoenzimas de SOD. Neste caso, uma possibilidade é que a atividade da isoenzima Cu/Zn-SOD esteja, de alguma forma, sob regulação das outras duas isoenzimas, Mn-SOD e Fe-SOD, as quais por sua vez são reguladas de maneira independente.

Alguns estudos mostram que a isoenzima Cu/Zn-SOD geralmente é encontrada como a menor fração da atividade total de SOD presente *E. coli*, e que sua maior atividade é encontrada am bactérias cultivadas em condições anaeróbicas, durante a fase estacionária (BENOV; FRIDOVICH, 1994), uma vez que está sob controle do gene *rpoS* (GORT et al., 1999).

Entretanto, as análises realizadas com as linhagens mutantes de *E. coli* (Δ*sodA* e Δ*sodB*), bem como os realizados para linhgem wt, forma conduzidos durante a fase exponencial de crescimento (log tardia), e mostram claramente a presença desta isoforma da linhagem de *E. coli* wt. Dessa forma, a ausência da banda representativa da Cu/Zn-SOD nas linhagens Δ*sodA* e Δ*sodB* pode ser explicada em parte pela baixa atividade da isoenzima, porém ainda não justifica o comportamento diferencial desta isoenzima entre as linhagens wt e mutantes para os genes de SOD.

Apesar da integração entre vias bioquímicas na resposta adaptativa ao herbicida s-metolachlor, e a importância do sistema antioxidante neste contexto, este trabalho propõe que existe uma diferenciação da resposta entre enzimas, mesmo quando estas apresentam a mesma função. Entre as isoenzimas que tiveram a atividade analisada, a Mn-SOD mostrou ser bastante requerida para manunteção do equilibrio estado redox celular na bactéria *E. coli* K-12, quando submetida ao herbicida. A deleção do gene *sodA* causou aumento na concentração de peróxido de

hidrogênio, bem como nas taxas de peroxidação lipídicas, além de interferir nas atividade de enzimas relaciondas ao sistema antixodante, como catalase, ou mesmo Cu/Zn-SOD.

O conjunto de dados indica que mais estudos, com aspectos moleculares, são necessários para a compreensão da regulação entre as enzimas superóxido-dismutase, bem como a participação destas na resposta global ao estresse oxidativo causado por contaminantes ambientais. Além disso, abre portas para a aplicação desta isoenzima em estudos sobre tolerância a herbicidas, como em plantas transformadas com enzimas de microorganismos e que adquirem tolerância a xenobióticos.

Referências

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

BABA, T.; HASEGAWA, M.; TAKAI, Y.; OKUMURA, Y.; BABA, M.; DATSENKO, K.A.; TOMITA, M.; WANNER, B.L.; MORI, H. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. **Molecular Systems Biology**, Heidelberg, v. 2, p. 1-11, 2006.

BÁRCENA, J.M.B.; AZCÁRATE, M.A.; HASSAN, H.M. Role of antioxidant enzymes in bacterial resistance to organic acids. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.76, p. 2747-2753, 2010.

BENOV, L.T.; FRIDOVICH, I. *Escherichia coli* expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.269, p. 25310-25314, 1994.

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

BÖGER, P.; MATTHES, B.; SCHMALFUB, J. Towards the primary target of chloroacetamides – new findings pave the way. **Pestand Management Science**, Sussex, v. 56, p. 497-508, 2000.

CARLIOZ, A.; TOUATI, D. Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? **EMBO Journal**, Oxford, v.5, p. 623-630, 1986.

DATSENKO, K.A.; WANNER, B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy**

of Sciences of the United States of America, Washington,v. 97, p. 6640-6645, 2000.

FONG, S.S.; PALSSON, B. Ø. Metabolic gene-deletion strains of *Escherichia coli* evolve to computationally predicted growth phenotypes. **Nature Genetics**, New York, v. 36, p. 1056-1058, 2004.

GREGORY, E.M.; YOST, F.J.Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases of *Escherichia coli*: intracellular localization and functions. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 115, p. 987-991, 1973.

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

HOERTER, J.D.; ARNOLD, A.A.; WARD, C.S.; SAUER, M.; JOHNSON, S.; FLEMING, T.; EISENSTARK, A. Reduced hydroperidase (HPI and HPII) activity in the Δ*fur* mutant contributes to increased sensitivity to UVA radiation in *Escherichia coli*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 79, p. 151-157, 2005.

IVANOVA, A.; MILLER, C.; GLINSKY, G.; ELSENSTARK, A. Role of *rpoS* (*katF*) in *oxyR*-independent regulation of hidroperoxidase I in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 12, p. 571-578, 1994.

JUNG, I.L.; KIM, I.G. Transcription of *ahpC, katG,* and *katE* genes in Escherichia coli is regulated by polyamines: polyamine-deficient mutant sensitive to H_2O_2-induced oxidative damage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 301, p. 915-922, 2003.

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

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, p. 984-990, 2009.

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

LÜ, Z.; SANG, L.; LI, Z.; MIN, H. Catalase and superoxide dismutase activities in a *Stenotrophomonas maltophita* WZ2 resistant to herbicide pollution. **Ecotoxicoloy and Environmental Safety**, New York, v. 72, p. 136-143, 2009.

LÜ, Z.; MIN, H.; XIA, Y. The response of *Escherichia coli, Bacillus subtilis,* and *Burkholderia cepacia* WZ1 to oxidative stress of exposure to quinclorac. **Journal of Environmental Health Science**, New York, v. 39, p. 431-441, 2004.

LUSHCHAK, V.I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, Oxford, v. 153, p. 175-190, 2011.

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

MEER van der, J.R. Environmental pollution promotes selection of microbial degradation pathways. **Frontiers in Ecology and the Environment**, Ithaca, v. 4, p.35–42, 2006.

NIEDERHOFFFER, E.C.; NARANJO, C.M.; BRADLEY, K.L.; FEE, J.A. Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 172, p. 1930-1938, 1990.

PANDEY, S.; SAHA, P.; BARAI, P.K.; MAITI, T.K. Characterization of a Cd^{2+}-resistant strain of *Ochrobactrum* sp. Isolated from slag disposal site of an iron and steel factory. **Current Microbiology**, New York, v. 61, p. 106-111, 2010.

RANEA, J.A.G.; SILLERO, A.; THORNTON, J.M.; ORENGO, C.A. Protein superfamily evolution and the last universal common ancestor. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 63, p. 513-525, 2006.

ROSZAK, D.B.; COWELL. R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 51, p. 365-379, 1987.

SAKAMOTO, H.; TOUATI, D. Cloning of the iron superoxide dismutase gene (*sodB*) in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 159, p. 418-420, 1984.

SCHELLHORN, H.E. Regulation of hydroperoxidase (catalase) expression in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdan, v. 131, p. 113-119, 1994.

SCHMIDT, S.; SUNYAEV, S.; BORK, P. DANDEKAR, T. Metabolites: a helping hand for pathway evolution? **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 28 , p. 336-341, 2003.

SEAVER, L.C.; IMLAY, J.A. Alkyl hydroperoxidase reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, p. 7173-7181, 2001.

SPRINGAEL, D.; TOP, E.M. Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 12, p. 53-58, 2004.

THAMMAVONGS, B.; DENOUMM E.; MISSOUS, G.; GUÉGUEN, M.; PANOFF, J.M. Response to environmental stress as a global phenomenon in biology: the example of microorganisms. **Microbes and Environments**, Hokkaido, v. 23, p. 20-23, 2008.

THOMPSON, D.K.; BELIAEV, A.S.; GIOMETTI, C.S.; TOLLAKSEN, S.L.; KHARE, T.; LIES, D.P.; NEALSON, K.H.; LIM, H.; YATES, J.; BRANDT, C.C.; TIEDJE, J.M.; ZHOU, J. Transcriptional and proteomic analysis of ferric uptake regulator (Fur) mutant of *Shewanella oneidensis*: possible involvement of Fur in energy metabolism, transcriptional regulation, and oxidative stress. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.68, p. 881-892, 2002.

TOUATI, D. Cloning and mapping of the manganese superoxide dismutase gene (*sodA*) of *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 155, p. 1078-1087, 1983.

TRIGGS-RAINE, B.; DOBLE, B.W.; MULVEY, M.R.; SORBY, P.A.; LOEWEN, P.C. Nucleotide sequence of *katG*, encoding catalase HPI of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, 4415-4419, 1988.

VARGHESE, S.;WU, M.; PARK, S.; IMLAY, K.C.R.; IMLAY, J.A. Submicromolar hydrogen peroxide disrupts the ability of Fur protein to control free-ion levels in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 64, p. 822-830, 2007.

von OSSOWSKI, I. Nucleotide sequence of *Escherichia coli katE*, which encodes catalase HPII. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 514-520, 1991.

WEBER, H.; POLEN, T.; HEUVELING, J.; WENDISCH, V.F.; HENGEE, R. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigma S-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.187, p.1591–1603, 2005.

YAO, X-H.; MIN, H.; LV, Z-M. Response of Superoxide Dismutase, Catalase, and ATPase Activity in bacteria exposed to acetamiprid. **Biomedical and Environmental Sciences**, Orlando, v. 19, p. 309-314, 2006.

5 PAPEL DE EF-P, POXA E YJEK NA RESPOSTA ANTIOXIDANTE DE *Escherichia coli* AO HERBICIDA PARAQUAT

Resumo

Em condições normais de crescimento, as células apresentam uma rede de vias bioquímicas, trabalhando de forma cooperativa para a manutenção da homeostase redox celular. Porém, em situações de estresse, como quando expostas a xenobióticos, as células respondem de forma a ativar vias específicas buscando uma resposta adaptativa a perturbação sofrida.Certas condições, como estresse oxidativo, podem afetar processos biológicos, como a síntese de proteínas, através de inativação de enzimas, o que pode comprometer funções vitais da célula. O fator de elongação-P (EF-P) é uma proteína relacionada ao controle traducional, que atua na fidelidade do processo e no estímulo a elongação, e tem sua atividade relacionada a outras duas proteínas, PoxA e YjeK, envolvidas na síntese de tRNA e lisina, respectivamente. Ambas as enzimas são citadas por estudos envolvendo resistência a drogas e modulação de virulência em bactérias.A hipótese do presente estudo se baseia na relação entre as enzimas EF-P, PoxA e YjeK e a resposta antioxidante da bactéria *E. coli*. Linhagens com mutações nos genes que codificam as enzimas envolvidas no controle traducional mostraram respostas diferenciais do sistema antioxidante ao estresse causado pelo herbicida paraquat.A exposição prolongada ao paraquat foi bastante prejudicial ao crescimento da linhagem Δ*efp*, a qual apresentou baixos níveis de expressão do gene *sodA* e aumento da concentração de H_2O_2 e, consequentemente da peroxidação lipídica. Mutações nos genes *poxA*e *yjeK* também mostraram atenuação na resposta adaptativa bacteriana ao estresse oxidativo, porém sendo mais bem evidenciada na linhagem Δ*poxA*.Dessa forma, o EF-P mostrou ser um importante fator para o equilíbrio redox celular, por afetar a expressão de enzimas chaves do sistema antioxidante, como SodA. Além disso, o controle na ativação da via pós-transcricional PYE, através da atividade das enzimas PoxA e YjeK, foi também reconhecido através dos efeitos fisiológicos encontrados nas linhagens mutantes Δ*poxA* e Δ*yjeK*.

Palavras-chave: Fator de elongação-P; Controle traducional; Sistema antioxidante; *Escherichia coli*

5 THE ROLE OF EF-P, POXA AND YJEK IN THE ANTIOXIDANT RESPONSE OF *Escherichia coli* EXPOSED TO PARAQUAT HERBICIDE

Abstract

In normal growth condition, the cell shows network pathways, cooperatively working to keep the redox homeostasis. However, in stress condition, such as in bacteria exposed to xenobiotics, the cell actives specific pathways to find an adaptive response to perturbation.In certain stress conditions, some biological process can be affected by enzyme inactivation, and consequently, it can compromise some important function as protein synthesis.The elongation factor-P (EFP) is a protein related to translational control that is require for the fidelity and also stimulates the elongation process during translation. EF-P has activity related to other two enzymes, PoxA and YjeK, involved in the tRNA and lysine syntheses, respectively. Both enzymes are cited in studies with virulence and drug resistance in *Salmonella enterica*.The aim of this study is to understand the relation between the enzymes EF-P, PoxA, YjeK and the antioxidant response of *Escherichia coli*. Bacteria strains with deletions in the genes codified the enzymes involved in the translational control showed differential response of antioxidant system to stress caused by paraquat herbicide. The long exposition to herbicide was very harmful for Δ*efp* strain that had the growth affected and also showed lower levels of *sodA* expression and high H_2O_2 and concentrations. Mutations in the *poxA* and *yjeK*genes showed antioxidant response attenuated that interfered in the adaptation to stress condition.The EF-P is an important factor to maintenance of redox homeostasis in the cell because can affect negatively the some enzyme expression in the antioxidant system, such as SodA. Furthermore, the activation of the PYE pathway, a mechanism for the post-transcriptionalcontrol of gene expression, that has involved EF-P,PoxA and YjeK, showed importance for the antioxidant system through the negative physiologic effects in the mutant strains.

Keywords: Elongation factor-P; Translational control; Antioxidante system; *Escherichia coli*

5.1 Introdução

Estresse oxidativo tem sido observado em organismos expostos a contaminantes ambientais, como herbicidas e metais pesados (MARTINS et al., 2011; ROMANY et al., 2010), e pode estar relacionado com o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e a habilidade da célula em desintoxicar os intermediários reativos e/ou reparar os danos causados pelas ERO's (FREINBICHLER et al., 2011).

Muitos processos biológicos podem ser afetados pelo estresse oxidativopor diferentes vias, sendo uma delas através de alterações na regulação traducional (VEAL; DAY, 2011; GRANT, 2011). Por exemplo, a síntese de proteínas pode ser afetada durante condição de estresse pela redução da atividade de enzimas envolvidas no processo, as quais tiveram suas estruturas modificadas, ou pela degradação de tRNA, resultando na redução no número de cópias (CHAN et al., 2010).Além do mais, as ERO's podem também comprometer a ativação da desacilação da metionina, promovendo mudanças programadas na fidelidade do tRNAna fase inicial do processo traducional (NETZER et al., 2009).

Por outro lado, a eficiência e controle da síntese proteica são de grande importância para a manutenção das funções celulares, bem como para a resposta adaptativa às mudanças impostas pelo ambiente. Durante a síntese protéica, a fase de iniciação pode ser alvo de regulação quando as células precisam adaptar a expressão de genes às condições de estresse (GRANT, 2011). O fator de elongação-P (EFP) é uma proteína relacionada ao controle traducional, cujo papel está no estimulo da atividade peptiltransferase do complexo de iniciação 70S (AOKI et al., 1997).Este estímulo ocorre através da fidelidade traducional, pois auxilia a entrada do fMet-tRNA no sítio A do ribossomo,epela interaçãocom a subunidade maior do ribossomo, a qual estimula o processo de elongação durante a síntese protéica (AOKI et al., 2008).

Devido ao importante papel no processo traducional, a proteína EFP tem sido estudada e relacionada a processos fisiológicos, como resistência a drogas e modulação da virulência na bactéria *Salmonellaentérica*. Sua atividade foi observada junto a outras duas proteínas, PoxA e YjeK, as quais estão envolvidas na síntese detRNA e lisina, respectivamente, e constituem a via PYE de controle pós-transcrional para ativação do EF-P (NAVARRE et al., 2010).

Apesar da reconhecida função do EFP, as proteínas PoxA e YjeK também apresentam importância para a eficiência do processo traducional, e podem estar relacionadas a resposta antioxidante. Bactérias mutantes para os genes *poxA* e *yjeK* podem ter a expressãode algumas proteínas relacionadas ao sistema antioxidante afetada negativamente, como glutationa S-transferase (GST) e alquil hidroperóxidoredutase (BEARSON et al., 2011). Os autores deste estudo mostraram que o aumento da sensibilidade da bactéria *Salmonellaenterica*a diversos agentes, como paraquat, pode estar relacionada ao desequilíbrio do metabolismo celular de resposta ao estresse global causada pela deleção do gene *poxA*.

Paraquat é um herbicida globalmente utilizado, e tem sido conhecido por seu modo de ação, o qual induz a produção intracelular do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), desencadeando a produção de todas as outras ERO's. Os efeitos fisiológicos são conhecidos em diversos organismos, como desequilíbrio celular e conseqüente inibição de crescimento, como já caracterizado para a bactéria E*scherichia coli* (TKACHENKO, 2004).

No presente estudo, foram utilizadas três linhagens de *Escherichia coli* provindas da “KEIO Knockout Collection”, as quais apresentam deleção dos genes *efp*, *poxA* e *yjeK* (BABA et al., 2006) com o objetivo de analisar o papel da via de controle traducional relacionada a estes genes na resposta antioxidante bacteriana. Através de ensaios bioquímicos, foi possível caracterizar níveis diferenciais de estresse oxidativo entre as linhagens, bem como a expressão diferencial de genes de enzimas antioxidantes. Os resultados evidenciaram que o EF-P tem papel fundamental na manutenção do estado redox da célula, e que juntamente com as proteínas poxA e yjeK, podem estar relacionadas à expressão de enzimas chaves do sistema antioxidante.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Linhagens bacterianas

A linhagem selvagem da bactéria *Escherichia coli* BW25133, descrita também como derivada da linhagem K-12, e as linhagens com simples mutações, foram usadas da “KEIO Knockout Collection” (BABA et al., 2006), conforme tabela 5.1. As linhagens mutantes tiveram os respectivos genes substituídos por um gene que

confere resistência à canamicinaatravés do método “Red Swap” (DATSENKO; WANNER, 2000).

Tabela 5.1 - Linhagens mutantes de *Escherichia coli* oriundas da “KEIO Knockout Collection”

ECK	JW	Gene	Descrição
ECK4141	JW4107	*efp*	Fator de elongação – P
ECK4151	JW4116	*poxA*	Aminoacil-tRNAsintetase
ECK4140	JW2174	*yjeK*	Proteína da famíliaKamA

5.2.2 Experimento e condições de cultivo

As linhagens bacterianas foram cultivas em meio Luria-Bertani (LB), contendo 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura e 0,5% de NaCl (w:v). As culturas foram inoculadas usando a proporção de 1:100 de pré-inóculo advindo de 2-3 colônias bacterianas, incubado a 250 rpm e 37ºC, sendo que a densidade de células foi ajustada para 1,0 abs (600 nm).

O experimento foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 125 mL com volume de 50 mL com 3 repetições biológicas, nas mesmas condições descritas anteriormente para o pré-inóculo. Foram testados dois tratamentos, sendo controle (meio LB) e paraquat 250 µM (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinio) (Sigma), o qual foi adicionado no início da fase exponencial de crescimento. Devido a diferenças de taxa de crescimento entre as linhagens estudadas, a adição do paraquat ao meio de cultura teve tempos diferentes ajustados conforme curva de crescimento de cada linhagem.

Após 20 min de exposição ao herbicida, as células bacterianas foram coletadas por centrifugação a 8.000 rpm por 7 min, à 4ºC, e mantidas a -80ºC para análises posteriores.

5.2.3 Curva de crescimento e sobrevivência das células na presença do herbicida

O crescimento bacteriano foi determinado na presença e ausência de paraquat, através da leitura da densidade ótica (D.O.) a 600 nm, em intervalo de tempo de 30 min, num total de 450 min. Para experimento de sobrevivência de células. Após 20 min de exposição ao herbicida, as células bacterianas dos tratamentos controle e paraquat foram diluídas a 10^5 e 10^6 em tampão Fosfato Salino (PBS), e ambas as

diluições foram plaqueadas em meio LB Agar. Após 24 h de incubação a 37 ºC, o número de U.F.C. foi contabilizado.

5.2.4 Quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

A concentração de H_2O_2 intracelular foi medida de acordo com Alexieva et al. (2001), com base na reação com iodeto de potássio (KI). As células foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizada em 0,1% de ácido tricloroacético (TCA) (w:v), na proporção de 1:3 (w:v), sendo o extrato centrifugado a 10.000 rpm, for 30 min a 4ºC.

O sobrenadante, resultante da centrifugação foi coletado e a fração de 0,2 mL foi adicionada a mistura de reação contendo 0,2 mL de Tampão Fosfato 100 mM, pH 7,5 e 0,8 mL de solução 1M de KI. A reação foi realizada na ausência de luza 4ºC, durante 1h, seguida de 20 min a temperatura ambiente. Após este período, a absorbância foi medida em 390 nm.

A concentração de H_2O_2 foi calculada utilizando uma curva padrão preparada com concentrações conhecidas de H_2O_2 e os resultados foram expressos em mMol de $H_2O_2/10^6$ U.F.C.

5.2.5 Peroxidação lipídica

Conforme protocolo descrito por Health e Packer (1968), a peroxidação lipídica foi determinada pela estimativa da concentração de MDA (Malondialdeído) intracelular. O MDA é um produto secundário da peroxidação lipídica e comumente utilizado como marcador para danos causados pelas ERO's na membrana celular. A concentração de MDA foi calculada utilizando o coeficiente de extinção de 155 mM cm^{-1}.

5.2.6 Análise de expressão diferencial de genes por Northernblot

A análise da expressão diferencial dos genes *sodA*, *katG* e *katE* em *E. coli* foi realizada através da técnica de Northernblot. As linhagens bacterianas foram crescidas em meio LB, na presença e ausências do herbicida paraquat (250 µM), como anteriormente descrito, e a expressão dos genes foi analisada após 20 min de exposição ao herbicida. As enzimas escolhidas para análise estão diretamente relacionadas à defesa ao estresse gerado pelo herbicida paraquat, como mostrado na figura 5.1, adaptada de Blanchardet al. (2007).

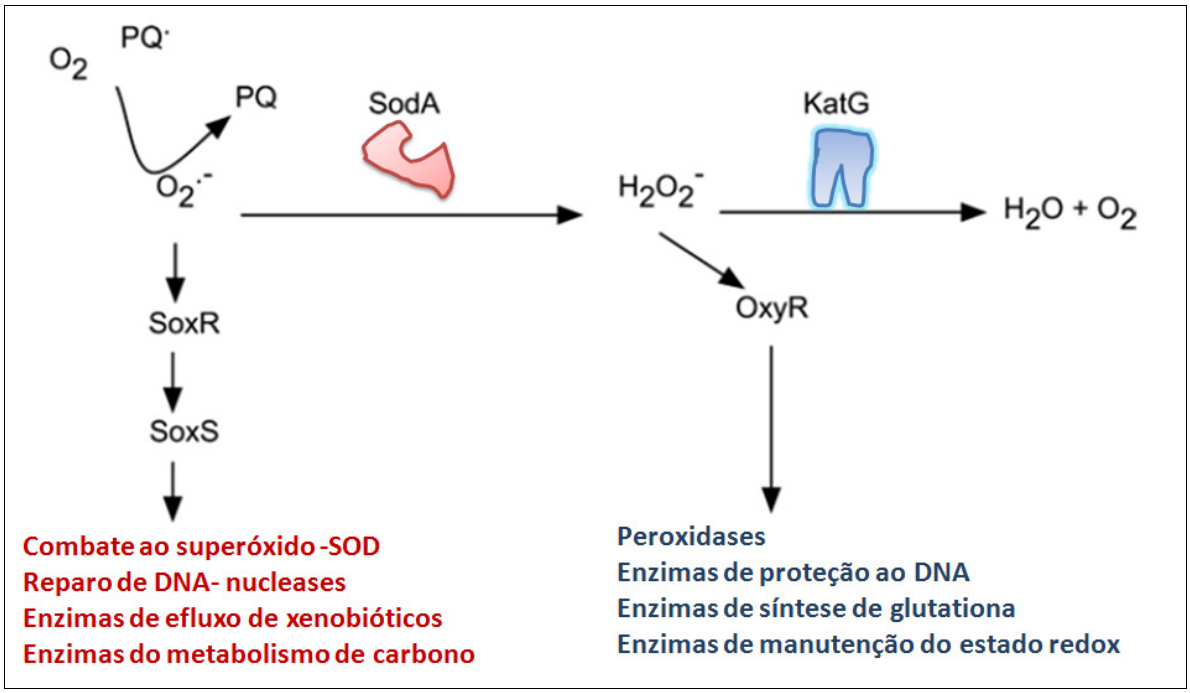


Figura 5.1 - Cascata metabólica e transcricional induzidas em bactérias expostas ao paraquat

5.2.6.1 Extração total de RNA

RNA total foi isolado e purificado a partir do kit RNeasy®Midi Kit (Qiagen), conforme especificações do fabricante. A concentração de RNA das amostras foi analisada usando micro-espectrofotômetro(NanoDrop Technologies), e a qualidade verificada através de gel de agarose 1%. Todas as amostras foram mantidas a temperatura de -80℃ até momento de uso.

5.2.6.2 Desenho de sondas

As sequências dos genes necessárias para desenho das sondas foram obtidas do banco de dados GenBank™(www.ncbi.nlm.nih.gov), sob numero de acesso AP009048. As sequências foram utilizadas para criar assondas de DNA com sequência reversae complementar (tabela 5.2), a qual teve a região referente à sonda selecionada a partir de parâmetros avaliados pelo software Primer Design (**NetPrimer**;PremierBiosoftInternational, Palo Alto, Calif.), sendo também testadas contra o banco de dadosGenBank™através da ferramentaBLAST para avaliar a especificidade das sondas.

Tabela 5.2 - Sequências das sodas de oligonucleotídeos utilizadas para técnica de Northernblot

Gene alvo	Sequência da sonda
sodA	TTCCAGAACTCTTTAATGTAGTCCGGACG
katE	GTTTAAGGTGTTTGTAGGCTTCCATCAGGTAGTA
katG	TTTAACAAACTTCTCGTGGGCATCGCTA

5.2.6.3 Marcação da sonda com $\gamma[^{32}P]$-ATP

As sondas foram marcadas na extremidade 5' usando $\gamma[^{32}P]$-ATP. A mistura de reação contendo 10 µM de oligonucleotideo, 4 µL de tampão 10x PNK (Polinucleotídeoquinase), 1,5 µL de enzimas polinucleotídeoquinase T4, 32 µL da água DEPC (dietilpirocarbonato) e 2 µL de $\gamma[^{32}P]$-ATP foi incubada a 37ºC por 40 min. Após esse período, a reação foi parada através da transferência do tubo para banho-seco a 70ºC por 10 min, seguido de centrifugação a 15.000 rpm a temperatura ambiente.

A sonda marcada foi então isolada usando coluna G-25 (AmershanMicrospin), como descrito o protocolo do fabricante, e armazenada a -20ºC.

5.2.6.4 Transferência para membrana de náilon e condições de hibridização

A técnica de Northernblot foi conduzida de acordo com as instruções do kit NorthernMax-Gly (Ambion). O RNA total (5 µg) foi eletroforeticamente separado em gel de agarose 1%, com formaldeído, e em seguida transferido para membrana de náilon Hybond N^+ (Amershan). Após aproximadamente 2 h (tempo de transferência), a membrana foi exposta a 80°C durante 1 h, em forno convencional, para fixação do RNA à membrana, a qual foi armazenada a -20°C.

Após o período de pré-hibridização de 30 min a 42°C em 10 mL de solução ULTRAhyb, a sonda marcada foi adicionada a concentração de 10^6 com por mL de solução, e a membrana exposta a condições específicas de cada sonda, conforme tabela 5.3. Após o tempo de hibridização, a membrana foi lavada em solução de baixa adstringência (2 x Solução fosfato salino com EDTA e 0,1% de SDS), e a membrana foi mantida em filme plástico para ser exposta ao sistema PhosphorImage. A normalização foi realizada através dos genes 16S e 23S.

Tabela 5.3 - Condições de hibridização e lavagem das sondas de DNA

Sonda	Hibridização		Lavagem	
	Tempo (h)	Temperatura (ºC)	Tempo (min)	Temperatura (ºC)
sodA	16	42	10	40
katE	14	42	6	43.5
katG	20	42	7	40

5.3 Resultados

5.3.1 Efeito do herbicida paraquat no crescimento e sobrevivência celular de *E.coli*

As curvas de crescimento foram realizadas em meio LB e o herbicida paraquat foi adicionado no início da fase exponencial, para concentração de 250 µM para observar a resposta ao estresse causado pelo herbicida (Figura 5.2). As linhagens wt e Δ*yjek* mostraram taxas similares de crescimento entre os tratamentos controle e paraquat, apesar de apresentarem leve queda na absorbância na presença do herbicida.

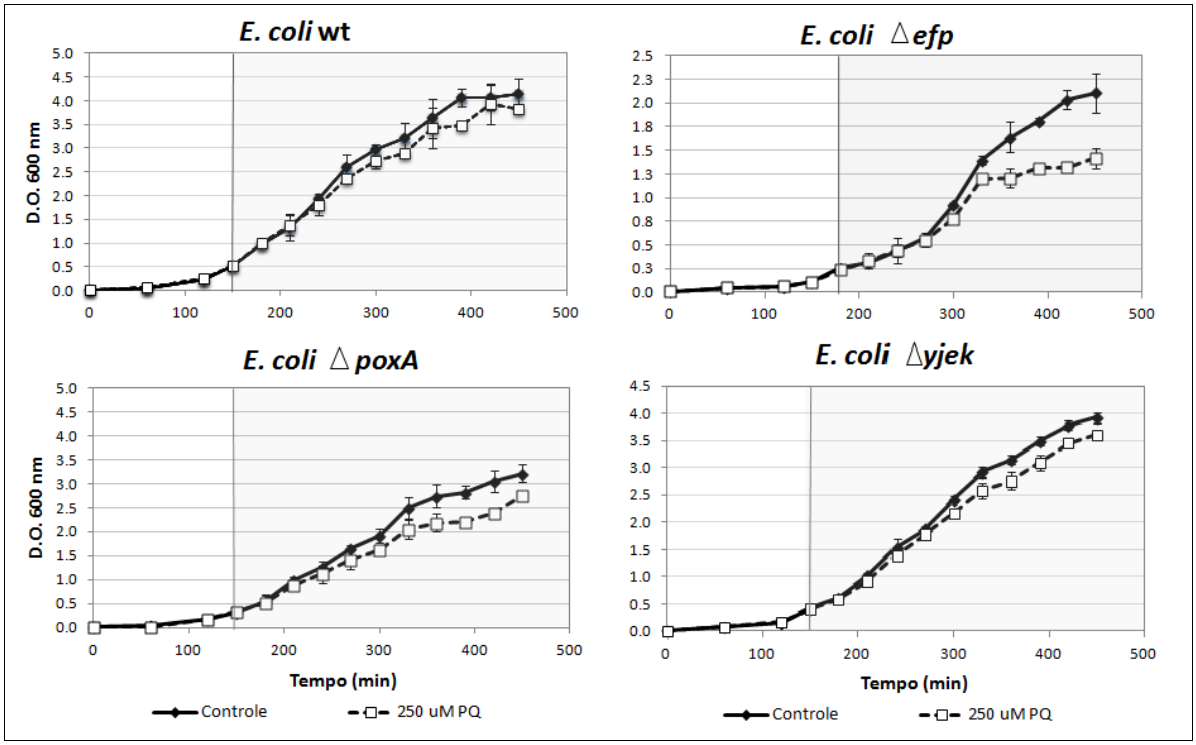


Figura 5.2 - Curvas de crescimento das linhagens wt, Δ*efp*, Δ*poxA*and Δ*yjeK* na presença e ausência de paraquat (250 µM PQ). O experimento foi conduzido em triplicata, a 37°C, a 250 rpm, sendo a caixa cinza representando o período de exposição ao herbicida

Entretanto, as linhagens Δ*efp* e Δ*poxA* mostraram significante decréscimo na taxa de crescimento após a adição do herbicida paraquat, principalmente após 400 min de exposição. Cabe ressaltar, que a linhagem Δ*efp*apresentou crescimento diferencial mesmo quando cultivada em meio controle (LB), com uma fase de adaptação (lag) mais longa quando comparada com a linhagem wt ou Δ*yjeK*, o que influenciou também quando a bactéria foi exposta ao herbicida.

A viabilidade das populações bacterianas para formar colônias (U.F.C.- unidades formadoras de colônias) foi avaliada através da sobrevivência das células depois de 20 min de exposição ao paraquat. Inicialmente, foi possível observar diferenças no número de U.F.C. (unidades formadoras de colônias) entre as linhagens bacterianas inicialmente cultivadas no meio controle (LB). Neste tratamento, as linhagenswt e Δ*yjeK* tiveram maior número de U.F.C. que as linhagensΔ*efp* e Δ*poxA*, as quais mostraram cerca de 20% do número total de células da linhagem wt.

Por outro lado, a perda da viabilidade na presença do herbicida paraquat foi observada somente para as linhagens mutantes, sendo o decréscimo de 15.8%,

35.2% e 28.6% da população inicial para as linhagens Δ*efp*, Δ*poxA* e Δ*yjeK*, respectivamente (Figura 5.3). Apesar das mutantes Δ*efp* e Δ*poxA* apresentarem um número menor de células na população controle, foram as linhagens Δ*poxA* e Δ*yjeK* as mais sensíveis nos primeiros 20 min de exposição ao paraquat.

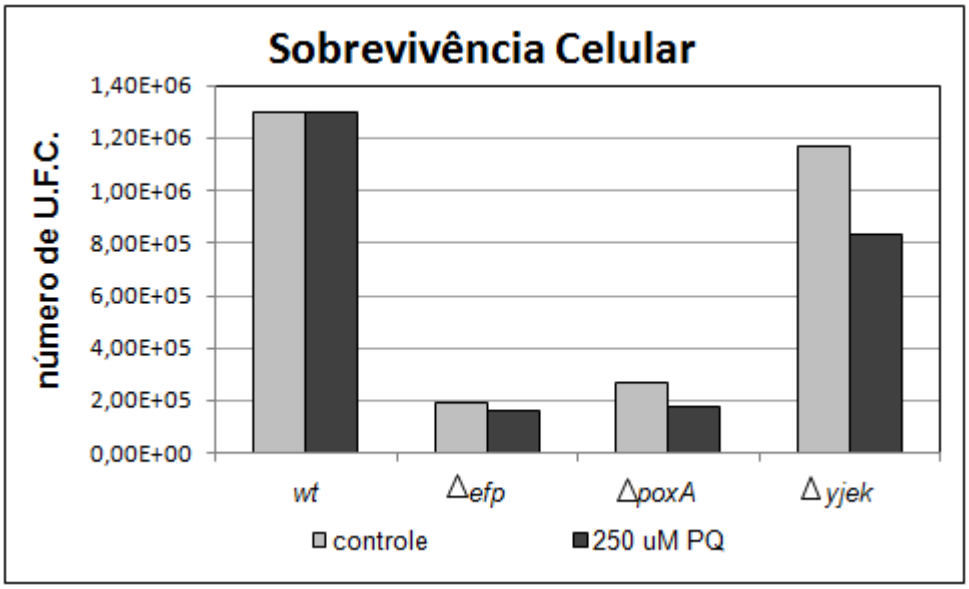


Figura 5.3 – Sobrevivência celular das linhagens de *E. coli* após 20 min de exposição ao herbicida paraquat

5.3.2 *Escherichia coli* mutantes apresentam alta taxa de peroxidação lipídica e H_2O_2

Apesar das ERO's serem produzidas endogenamente como um produto natural da respiração aeróbica, o herbicida paraquat pode catalisar a formação desses produtos, iniciando através do anion superóxido, e desencadeando a formação das outras ERO's. Para avaliar o estresse gerado pela presença de paraquat, foi medida a concentração de H_2O_2 intracelular (Figura 5.4).

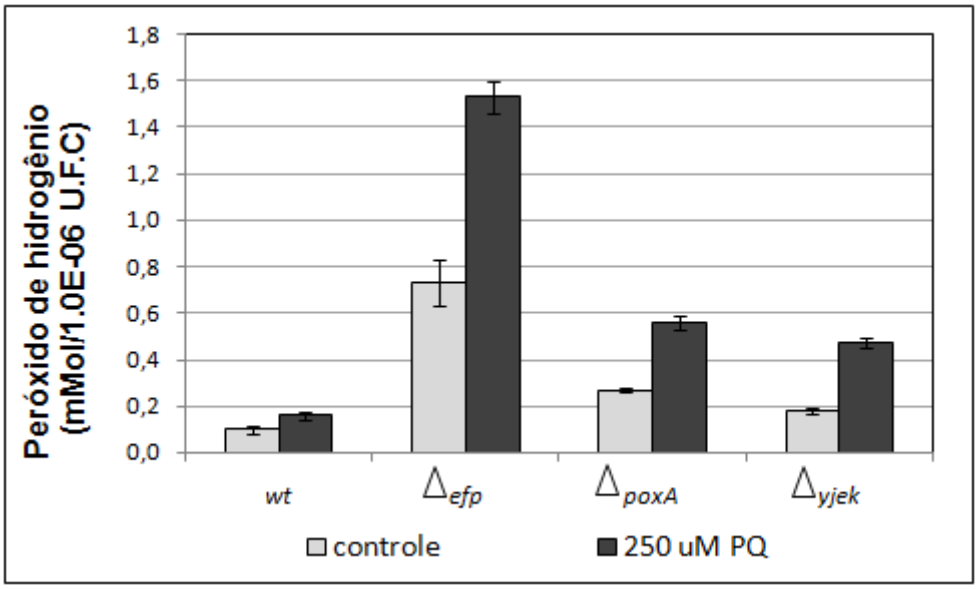


Figura 5.4 - Concentração de peróxido de hidrogênio intracelular em linhagens de *E. coli* após 20 min de exposição ao herbicida paraquat

Quando a concentração de H_2O_2 é analisado no meio controle, é possível observar que a linhagem Δ*efp* mostrou maior taxa de H_2O_2, com cerca de 73% de aumento de H_2O_2 comparado com a linhagem wt,provavelmente relacionado a deleção do gene *efp.* Entretanto, o estresse oxidativo foi claramente induzido após a adição do herbicida paraquat para todas as linhagens, sendo que as linhagens mutantes exibiram os maiores níveis de peróxido. Enquanto a linhagem wt teve aumento de 1.5 vezes a concentração de H_2O_2 na presença do herbicida, as linhagens mutantes apresentaram aumento de até 2 vezes.

A presença de altos níveis de H_2O_2 no meio celular pode trazer danos para o equilíbrio do metabolismo, pois é tóxico e pode causar danos a célula como peroxidação lipídica. A produção de MDA foi analisada nas linhagens bacterianas (Figura 5.5), para estimar os níveis de peroxidação, e corroborar com os resultados da produção de H_2O_2 os quais mostram aindução do estresse oxidativona presença paraquat para as linhagens mutantes de *E. coli.*

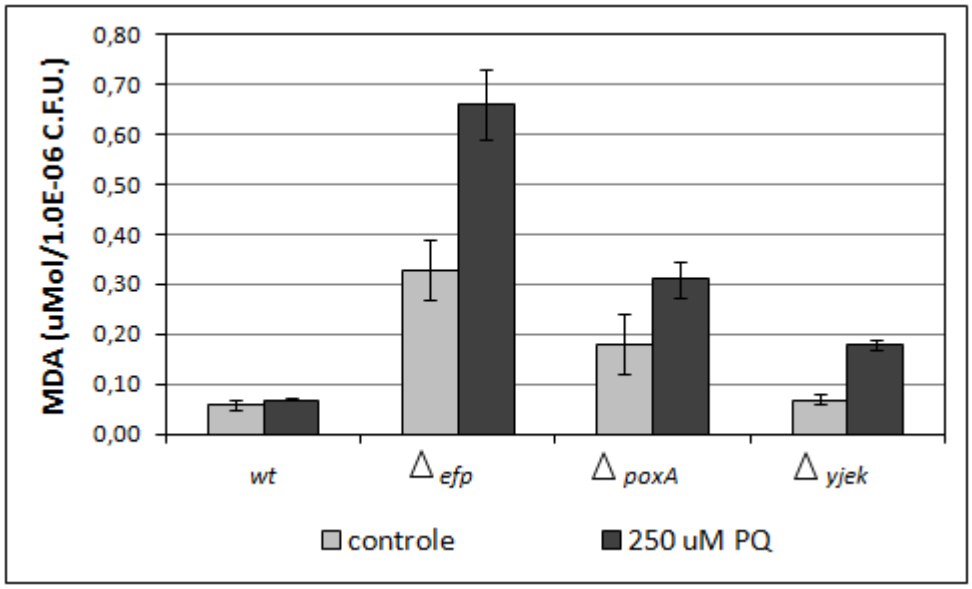


Figura 5.5 - Concentração de MDA em linhagens de *E. coli* após 20 min de exposição ao herbicida paraquat

A linhagem mutante para o gene*efp* apresentou as maiores concentrações de MDA em ambos os tratamentos, condição que também foi observada na análise de H_2O_2.

Porém, comparando o comportamento das linhagens entre os tratamentos é possível observar que a linhagem Δ*yjeK* foi mais sensível à presença de paraquat nos primeiros 20 min, pois mostrou aumento de 61% de MDA no meio com herbicida, enquanto as linhagensΔ*efp*e Δ*poxA* mostraram aumento de 50% e 41% na mesma condição.O aumento da produção de MDA para a linhagem Δ*yjeK* pode estar relacionada a baixa viabilidade das células na presença do herbicida (Figura 5.3).

Por outro lado, a linhagem wt apresentou comportamento diferencial às outras linhagens mutantes quando levado em consideração os resultados até aqui obtidos. Com aumento na produção de peróxido, porém baixa relação deste com o nível de peroxidação lipídica e viabilidade celular, a linhagem wt mostra resultados que evidenciam a participação do sistema antioxidante trabalhando cooperativamente para proteção da membrana dos danos das ERRO's.

5.3.3 Expressão diferencial de enzimas antioxidantes em linhagens de *E. coli* em resposta ao paraquat

A técnica de Northernblot revelou diferenças na expressão dos genes *sodA, katE* e *katG,* relacionados ao sistema antioxidante, principalmente entre a linhagem

wt e as mutantes (Figura 5.6). Embora o gene *sodA* foi fortemente induzido na presença de paraquat para todas as linhagens, foi possível observar diferenças no nível de expressão entre as linhagens. Enquanto o gene *sodA* foi induzido 18,6 vezes na linhagem wt quando esta foi exposta ao herbicida, a linhagem Δ*efp* teve aumento de 11 vezes na expressão do mesmo gene no mesmo tratamento.

Já os genes das enzimas HPI e HPII (*katG* e *katE*, respectivamente), apresentaram diferença no padrão de expressão. Ambos os genes apresentaram baixo nível de expressão quando comparados com *sodA*, porém *katE* apresentou pouca ou nenhuma diferença de expressão entre as linhagens, mas sim com pequenas mudanças nos níveis de expressão relativa entre os tratamentos.

Por outro lado, o gene *katG* apresentou muita variação nos níveis de expressão entre as linhagens, principalmente entre as linhagens com mutações nos genes *efp* e *poxA*, revelando uma possível regulação do gene pelo sistema de controle traducional estudado.

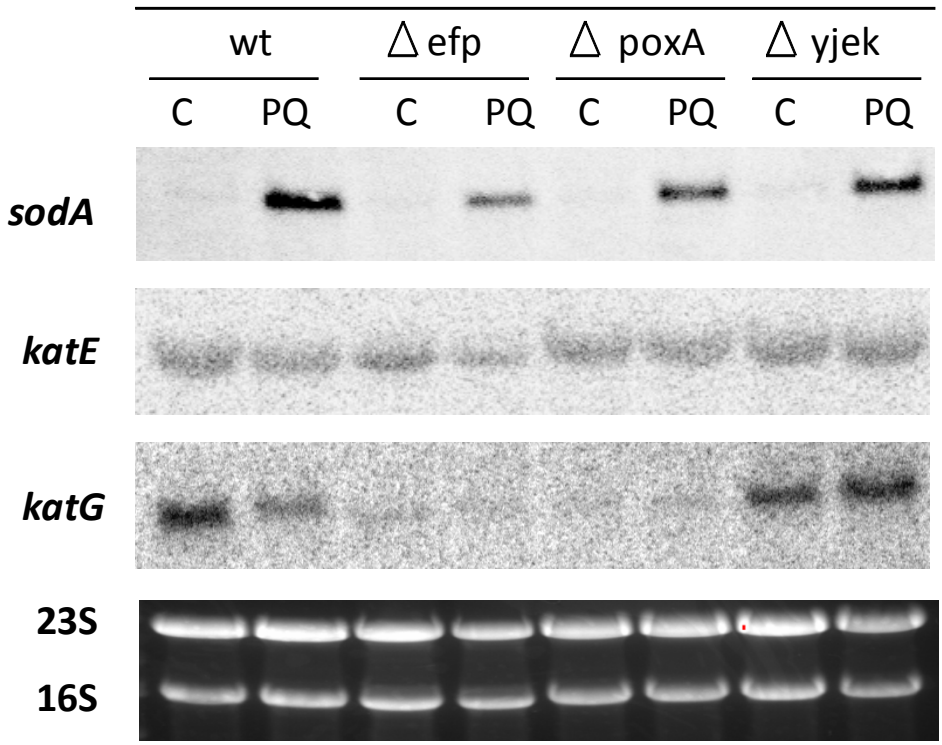


Figura 5.6 - Análise da expressão diferencial através da técnica de Northernblot em linhagens de *E. coli* após 20 min de exposição ao herbicida paraquat. Os genes 23S e 16S foram usados para normalização

Se a expressão relativa entre os tratamentos, controle e paraquat, é analisada para cada linhagem bacteriana, é possível observar que a integração das enzimas

acontece de maneira diferente entre as linhagens wt e mutantes, e que a deleção dos genes *efp*e *poxA* pode afetar a resposta antioxidante em *E. coli.*

As linhagens wt e Δ*yjeK* tiveram aumento na expressão de *sodA* (18,6 e 8 vezes) com a adição de paraquat, mas mostraram repressão dos genes *katE* e *katG,*sendo maior para a linhagem wt, a qual teve redução de 48% e 59% enquantoa linhagem Δ*yjeK* teve apenas 10% e 2% de repressão para *katE* e *katG*, respectivamente.

Por outro lado, apesar da linhagem Δ*efp* também mostrar indução de *sodA* pelo herbicida paraquat, ela não mostrou diferença na expressão de *katG*, e somente uma pequena indução de 5% para o gene *katE*, o que corrobora com o aumento de peróxido como mostrado na figura 5.4. Já a deleção de *poxA* também acarretou aumento de peróxido, em maior proporção que para linhagem Δ*efp*, o que pode estar relacionado a queda na expressão de *katG.*

5.4 Discussão

Em repostas a mudanças ambientais, as células podem induzir vários mecanismos regulatórios, como fatores envolvidos no controle transcricional e traducional, os quais são necessários para adaptações à condição de estresse. Em *E. coli*, fatores chaves podem desencadear sistemas especiais envolvidos na resposta antioxidante, sendo estes necessários para a manutenção da homeostase celular na maioria das perturbações metabólicas (DEMPLE, 1996; IMLAY, 2008).

E. coli apresenta um sistema específico em resposta a presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), mediado pelo fator transcricionalOxyR, e outro sistema de 2 estágios (SoxRS), o qual é ativado por agentes redox cíclicos, como o herbicida paraquat, os quais geram o anion superóxido($O_2^{\bullet-}$) (DEMPLE, 1996; IMLAY, 2008).

Poucos estudos têm relatado o papel do sistema antioxidante no controledo processo de traducional, embora a resposta bacteriana a agentes oxidantes seja conhecida em detalhes a nível transcricional. No presente trabalho, três genes – *efp, poxA* e *yjeK* – envolvidos com controle traducional, foram estudados em condição de estresse para avaliar o papel destes na resposta antioxidante de *E. coli.* O fator de elongação P (EF-P) é descrito por sofrer modificações pós-traducionais em um resíduo de lisina conservado (AOKI et al., 2008). Essas modificações ocorrem em uma via comum, na qual a enzima PoxA catalisa a ligação da lisina, através de uma reação dependente de ATP, e outra enzima, conhecida como YjeK, promove a

conversão do substrato lisina para (R)-β-lisina, provavelmente antes da adição deste resíduo ao EF-P (NAVARRE et al., 2010).

Para a proposta do trabalho, foram utilizadas linhagens bacterianas com deleções nos genes de interesse, as quais, juntamente com a linhagem selvagem, foram expostas, ao herbicida paraquat (250 µM), e tiveram a resposta antioxidante avaliada através de parâmetros como, produção de (H_2O_2), danos a membrana e expressão diferencial de enzimas antioxidantes.

O herbicida paraquat induz o aumento da produção de superóxido no meio intracelular (LIOCHEV; FRIDOVICK, 1991), e induz uma cascata metabólica de defesa contra ERO's.Estudos prévios revelam que a exposição de células bacterianas aoherbicida paraquat pode afetar diversas funções biológicas, incluindo enzimas de biosíntese, reparo de DNA e enzimas de dismutação de superóxido (BLANCHARD et al., 2007). No presente estudo foi possível observar a importância do equilíbrio e eficiência do processo traducional para manutenção de sistemas globais de resposta a estresse em *E.* coli.

A exposição prolongada ao paraquat foi bastante prejudicial ao crescimento da linhagem Δ*efp* (Figura 3.2), mesmo com a indução do gene *sodA*. A importância da enzima SOD para o sistema antioxidantefoi mostrada em estudo com *E. coli*, no qual a deleção do gene *sodA*, que codifica a isoenzima Mn-SOD, aumentou a sensibilidade da bactéria mutante ao herbicida paraquat (CARLIOZ; TOUATI, 1986). Em resposta a estresse ambiental causado por metais, como cádmio e niquel, as bactérias *E.* coli e *Bacillussubtilis*com mutações nos genes que codificam as enzimas Mn-SOD e Fe-SOD tiveram crescimento afetado na presença dos metais e, conseqüentemente, apresentaram baixa resistência a estes poluentes (GESLIN et al., 2001).A sensibilidade da linhagem Δ*efp* pode ser explicada pelos baixos níveis de expressão do gene *sodA*, que pode estar relacionado ao desequilíbrio da homeostase celular devido ao aumento da concentração de H_2O_2 e altos níveis de peroxidação lipídica.

A significante diferença na taxa de crescimento observada entre a bactéria mutante *efp* e as outras linhagens bacterianas (Figura 3.2), pode indicar o importante papel do EF-P na manutenção do estado redox em condições normais de crescimento, se estendendo também ao tratamento com paraquat. Alguns estudos com fatores ambientais, como exposição ao contaminante selênio e variação de temperatura, mostraram aumento na síntese de fatores de elongação, os quais

foram associados com aumento da expressão de enzimas antioxidantes(BEBIEN et al., 2001; VENDITTIS et al., 2008). Os resultados encontrados com a análise de Northernblot mostraram que o EF-P pode estar envolvido no controle traducional de algumas proteínas antioxidantes, como *sodA,* uma vez que foi possível observar que a deleção do gene *efp* afeta a expressão desta enzima diferencialmente nas linhagens wt e *efp*.

A enzima SOD é conhecida por realizar a dismutação do anion $O_2^{\bullet-}$, resultando na formação de outra ERO, o peróxido de hidrogênio, que por sua vez pode participar da ativação do fator transcricionalOxyR. Porém, em altas concentrações intracelulares, o H_2O_2deixa de ser um sinalizador celular e passa a sertóxico, tendo a célula desenvolvido enzimas com função de controlar os níveis de H_2O_2, as conhecidasperoxidases. No presente estudo, foram encontradas diferenças na concentração do H_2O_2 entre as linhagens de *E. coli* no meio controle e na presença de paraquat, que poderia resultar na indução da atividade de peroxidases nas células bacterianas.

Porém, os dados mostraram pouca ou nenhuma mudança na expressão dos genes que codificam enzimas catalases em *E. coli.*Corroborando com esse resultado, as linhagens apresentaram aumento na taxa de peroxidação lipídica, evidenciada pelo aumento de MDA encontrado principalmente para a linhagem mutante *efp* na presença do herbicida paraquat. Churro et al. (2010), em estudo com cianobactérias, encontrou na espécie*Aphanizomenongracile* submetida a triptamina (alcalóidemonoamínicobiotivo) aumento de H_2O_2 e conseqüentemente alto nível de peroxidação lipídica quando a atividade da ascorbatoperoxidase (APX) não foi elevada suficiente para combate das ERO's. Além disso, a alta concentração de MDA deste estudo foi consistente com sinais de danos ultraestruturais encontrados especialmente em membranas, como desorganização e vacuolização.

Por outro lado, as linhagens Δ*poxA*eΔ*yjeK*foram também sensíveis nos primeiros 20 min de exposição ao herbicida, com aumento dos níveis de H_2O_2 e peroxidação lipídica, que afetou a sobrevivência celularna presença de paraquat. Entretanto, a taxa de crescimento teve maior diferença entre os tratamentos e com longo período de exposição para a linhagem Δ*poxA*, o que pode estar relacionado aos baixos níveis de expressão gênica, também encontrado para a linhagem Δ*efp*.

O herbicida paraquat pode afetar a bactéria principalmente de duas maneiras: pela produção do anion superóxido e pela depleção dos equivalentes redutores,

como NADPH. Em *E. coli*, a resposta dos genes dependentes do sistema SoxRS é resultado direto da ativação pelo $O_2^{\bullet-}$. Porém, a ativação do fator transcricionalOxyR só vai ocorrer com a geração do H_2O_2, geralmente produto da atividade de SOD. Dessa maneira, a pequena variação encontrada na expressão das enzimas catalases pode estar relacionada ao tempo de exposição analisado, sendo este curto (20min), e assim não suficiente para ativação de outros sistemas, que não o SoxRS, os quais são dependente de outras ERO's, ou mesmo de equivalente redutores, como é o caso de OxyR (BLANCHARD et al., 2007).

A resposta antioxidante é eficiente quandoa maquinaria enzimática é capaz de coordenar a indução de genes responsáveis pela ativação de rotas específicas ao estresse. As deleções estudadas mostraram um desequilíbrio na resposta de *E. coli* ao estresse causado pelo herbicida paraquat. Apesar do aumento encontrado na concentração de peróxido de 1,6x e a baixa indução na expressão dos genes de catalase, a linhagem wt mostrou baixos níveis de peroxidação lipídica na presença do herbicida, o que pode ser atribuído a ativação de outras peroxidases, mesmo em curto tempo de exposição.

Cartronet al. (2007) descreveu um modelo estrutural para a proteína YcdB em *E. coli*, a qual foi estruturalmente definida como membro da superfamília de peroxidases dependentes de ferro, a qual poderia estar associada a defesa do metabolismo celular contra estresse gerado pelo paraquat. Outro estudo também com *E. coli*, descreve uma nova peroxidase, chamada de Tpx (tioredoxinaperoxidase), a qual foi revelada pela sua função na defesa contra H_2O_2 (LAURA; BAKER; POOLE, 2003). Dessa forma, a habilidade de controle da célula em processos como regulação gênica e síntese protéica podem resultar na eficiência da manutenção do estado redox, resultando na inibição do efeito tóxico das ERO's na célula.

Neste trabalho, a adição de paraquat no meio LB induziu o estresse oxidativo, avaliado em tempo curto de exposição, o qual pode ser relacionado coma expressão global de reguladores e ativadores de genes que coordenam a resposta bacteriana ao estresse, como já citados SoxRS e OxyR (POMPOSIELLO et al., 2007). Entretanto, a linhagem mutante *efp* mostrou alto nível de estresse oxidativo, mesmo em condições normais de crescimento (meio LB), o que corrobora com estudos que mostram a importância de fatores de elongação na manutenção do estado redox celular (OLAREWAJU et al., 2001; CUMMING et al., 2004).

O EF-P é citado em estudos como componente de um novo sistema regulatório pós-transcricional PYE, encontrado em *Salmonellaenterica*, uma bactéria patogênica (NAVARRE et al., 2010; BEARSON et al., 2011). Nesta via, as enzimas poxA e YjeK têm papel fundamental na marcação de EF-P através do aminoácido conservado lisina. Mutações nos genes *efp, poxA*e *yjeK* mostraram atenuação na habilidade da bactéria patogênica em responder a fatores ambientais relacionados ao metabolismo de estresse e virulência.

No presente estudo, as diferenças encontradas na resposta antioxidante entre a linhagem wt e as linhagens mutantes podem ser resultado do desequilíbrio nas vias metabólicas de controle pós-transcricionais que ativam a via PYE, responsável pela estabilização e fidelidade do processo traducional das proteínas que são sintetizadas a partir do iniciador fMet-tRNA. As deleções nos genes da via PYEafetaram diferencialmente a expressão dos genes para SOD e CAT analisados, dentro das condições de crescimentos nas quais a bactéria *E. coli* foi submetida. Finalmente, o EF-P apresenta-se como um importante fator para o equilíbrio redox celular, mesmo em condições normais de crescimento, e que o torna importante na sobrevivência celular quando as células são submetidas ao estresse oxidativo. Além disso, a proteína PoxA também pode ser considerada importante para o equilíbrio do sistema antioxidante, pois a deleção deste causou danos à célula de maneira semelhante, porém menos drástica, que o observado para a linhagem Δ*efp.*

A compreensão do papel sistema antioxidante no desequilíbrio metabólico causado pelas deleções gênicas analisadas pode ser mais bem estudadas através de análises estruturais dos genes (bioinformática) e do entendimento do mecanismo de ativação da via PYE, na qual as enzimas EF-P, PoxA e YjeK estão envolvidas através do controle pós-transcricional que estas se relacionam . Desta forma, estes resultados auxiliaram no entendimento da resposta diferencial entre as linhagens mutantes, além de trazer indícios da importância do fator de elongação-P para a ativação de sistemas reguladores antioxidantes.

Referências

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

AOKI, H.; XU, J.; EMILI, A.; CHOSAY, J.G.; GOLSHANI, A.; GANOZA, M.C. Interactions of elongation factor EF-P with the *Escherichia coli* ribosome. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 275, p. 671–681, 2008.

BABA, T.; HASEGAWA, M.; TAKAI, Y.; OKUMURA, Y.; BABA, M.; DATSENKO, K.A.; TOMITA, M.; WANNER, B.L.; MORI, H. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. **Molecular Systems Biology**, Heidelberg, v. 2, p. 1-11, 2006.

BEARSON, S.M.D.; BEARSON, B.L.; BRUNELLE, B.W.; SHARMA, V.K.; LEE, I.S. A Mutation in the *poxA* gene of *Salmonella entericaSerovarTyphimurium* alters protein production, elevates susceptibility to environmental challenges, and decreases swine colonization. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 8, p. 725-732, 2011.

BEBIEN, M.; CHAUVIN, J.P.; ADRIANO, J.M; GROSSE, S.; VERMÉGLIO, A. Effect of selenite on growth and protein synthesis in the phototrophic bacterium *Rhodobactersphaeroides*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4440-4447, 2001.

BLANCHARD, J.L.; J.L.; WHOLEY, W.Y.; CONLON, E.M.; POMPOSIELLO, P.J. Rapid changes in gene expression dynamics in responde to superoxide reveal SoxRS-dependent and independent transcriptional networks. **PLos One**, San Francisco, v. 11, p. 1-13, 2007.

CARLIOZ, A.; TOUATI, D. Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? **EMBO Journal**, Oxford, v.5, p.623-630, 1986.

CARTRON, M.L.; MITCHELL, S.A.; WOODHALL, M.R.; ANDREWS, S.C.; WATSON, K.A. Preliminary x-ray diffraction analysis of *YcdB* from *Escherichia coli*: a novel haem-containing and Tat-secreted periplasmic protein with a potential role in iron transport. **ActaCrystallographica**, Copenhagen, v. 63, p. 37-41, 2007.

CHAN, C.T.Y.; DYAVAIAH, M.; DEMOTT, M.S.; TAGHIZADEH, K.; DEDON, P.C.; BEGLEY, T.J. A quantitative systems approach reveals dynamic control of tRNA modifications during cellular stress. **PLoS Genetics**, San Franscico,v. 12, p. 1-9, 2010.

CHURRO, C.; FERNANDES, A.S.; ALVERCA, E.; SAM-BENTO, F.; PAULINO, S.; FIGUEIRA, V.C.; BENTO, A.J.; PRABHAKAR, S.; LOBO, A.M.; MARTINS, L.L.; MOURATO, M.P.; PEREIRA, P. Effects of tryptamine on growth, ultrastructure and oxidative stress of cyanobacteria and microalgae cultures.**Hydrobiologia**, Hague, v. 649, p. 195-206, 2010.

CUMMING, R.C.; ANDON, N.L.; HAYNES, P.A.; PARK, M.; FISCHER, W.H.; SCHUBERT, D. Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress.**The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, p. 21749–21758, 2004.

DATSENKO, K.A.; WANNER, B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** Washington,v. 97, p. 6640-6645, 2000.

DEMPLE, B. Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* SoxRSoxidative stress regulon- a review. **Gene**, Amsterdam v. 179, p. 53-57, 1996.

FREINBICHLER, W. et al. Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions. **CMLS: Cellular and Molecular Life Science**, Basel, v. 68, p. 2067-2079, 2011.

GESLIN, C.; LLANOS, J.; PRIEUR, D.; JEANTHON, C. The manganese and iron superoxide dismutases protect *Escherichia coli* from heavy metal toxicity. **Research in Microbiology**, Paris, v. 152, p. 901-905, 2001.

GRANT, C.M. Regulation of translation by hydrogen peroxide.**Antioxidants & Redox Signaling**, New Rochelle, v. 15, p. 191-203, 2011.

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

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

LAURA, M.S.; BAKER, L.M.S.; POOLE, L.B. Catalytic mechanism of thiol peroxidase from *Escherichia coli*, sulfenic acid formation and overoxidation of essential CYS^{61}.**The Journal of Biological Chemistry**,Baltimore,v.278, p. 9203–9211, 2003.

LIOCHEV, S.I.; FRIDOVICK, I. Effects of overproduction of superoxide dismutase on the toxicity of paraquat toward *Escherichia coli*.**The Journal of Biological Chemistry**,Baltimore,v. 266, p. 8747-8760, 1991.

MARTINS, P.F.; CARVALHO, G.; DOURADO, M.N.; GRATAO, P.L.; PILEGGI, M.; AZEVEDO, R.A. Effect of chloroacetanilide herbicides on antioxidant enzymes of soil isolated bacteria. **Process Biochemistry**,Oxford,v. 46, p. 1186-1195, 2011.

NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Nucleotide databases. **GENBANK:** coleção de sequências de nucleotídeos disponíveis publicamente. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Acesso em: 3 abril 2011.

NAVARRE, W.W.; ZOU, S.B.; ROY, H.; XIE, J.L.; SAVCHENKO, A.; SINGER, A.; EDVOKIMOVA, E.; PROST, L.R.; KUMAR, R. IBBA, M.; FANG, F.C. PoxA, YjeK, and Elongation Factor P coordinately modulate virulence and drug resistance in *Salmonella enterica.* **Molecular Cell**, Cambridge, v. 39, p. 209–221, 2010.

NETZER, N., GOODENBOUR, J.M.; DAVID, A.; DITTMAR, K.A.; JONES, R.B.; SCHNEIDER, J.R.; BOONE, D.; EVES, E.M.; ROSNER, M;R.; GIBBS, J.S.; EMBRY, A.; DOLAN, B.; DAS, S.; HICKMAN, H.D.; BERGLUND, P.; BENNINK, J.R.; YEWDELL, J.W.; PAN, T. Innate immune and chemically triggered oxidative stress modifies translational fidelity. **Nature**, London, v. 462, p. 522-526, 2009.

OLAREWAJU, O.; ORTIZ, P.A.; CHOWDHURY, W.Q.; ISHITA, C.; KINZY, T.G. The translational Elongation Factor eEF1B plays a role in the oxidative stress responde pathway.**RNA Biology**, Austin, v. 1, p. 89-94, 2004.

POMPOSIELLO, P.J.; BENNIK, M.H.J.; DEMPLE, B. Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate.**Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, p. 3890-3902, 2001.

ROMANY, N.N.; ABSKHARON, A.; HASSAN, S.H.A.; KABIR, M.H.; QADIR, S.A.; SANAA, M.F.; WANG, M.H. The role of antioxidants enzymes of *E. coli* ASU3, a tolerant strain to heavy metals toxicity, in combating oxidative stress of copper. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 26, p. 241-247, 2010.

TKACHENKO, A.G. Mechanisms of protective functions of *Escherichia coli* polyamines against toxic effect of paraquat, which causes superoxide stress. **Biochemistry**, Whashingtonv.69, p. 188-194, 2004.

VEAL, E.; DAY, A. Hydrogen peroxide as a signaling molecule.**Antioxidants & Redox Signaling**, New Rochelle, v. 15, p. 147-151, 2011.

VENDITTIS, E.D.; CASTELLANO, I.; COTIGNO, R.; RUOCO, M.R.; RAIMO, G.; MASULLO, M. Adaptation of model proteins from cold to hot environments involves continuous and small adjustments of average parameters related to aminoacid composition. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 250, p. 156-171, 2008.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em ecossistemas, o papel desempenhado pelos microorganismos na ciclagem de nutrientes, principalmente considerando a biotransformação de contaminantes ambientais, como os pesticidas, é bastante relevante. Neste processo, a diversidade metabólica, oriunda muitas vezes da diversidade genética e da capacidade de rearranjo de vias enzimáticas, pode representar a vantagem para a utilização de novos compostos como fonte de nutrientes. Neste cenário, o metabolismo microbiano precisa desenvolver uma resposta adaptativa à nova condição imposta pelo ambiente.

Dessa forma, a proposta deste trabalho foi compreender o papel do sistema antioxidante na resposta adaptativa de bactérias expostas à herbicidas, sendo este estudo conduzido em sob diversos enfoques.

O capítulo 2 mostrou que o isolado bacteriano *E. asburiae* SD1 apresenta capacidade de degradar o herbicida s-metolachlor, mesmo na presença de fontes alternativas de carbono, e taxas de crescimento diferenciadas podem representar a resposta adaptativa a metabolização de fontes de carbono complexa, com o s-metolachlor. As taxas de degradação encontradas no presente trabalho (cerca de 30% em 13 h de cultivo em meio mineral na presença de 1,25 mM de s-metolachlor) são bastante expressivas, pois comparadas com outros artigos, apresentam duas particularidades: curto tempo de cultivo e cultura pura bacteriana. Estes resultados abriram perspectiva para a avaliação do sistema antioxidante neste processo adaptativo.

Neste caso, pode se sugerir que a ativação de vias bioquímicas em resposta a presença de herbicida é caracterizada conforme a fonte de carbono disponível no meio (capítulo 3). Quando o metabolismo pode inicialmente metabolizar fontes simples de carbono, como a dextrose, e obter energia, a proteção contra o estresse gerado pelo s-metolachlor se deu pela integração de enzimas relacionadas à defesa contra ERO's e manutenção da homeostase celular. Entretanto, na ausência de fontes de carbono simples, como no meio mineral na presença do herbicida, o metabolismo prioriza a ativação de vias para o reconhecimento da molécula complexa, representadas pela atividade da glutationa S-transferase.

Além disso, foi possível observar a ativação diferencial das isoenzimas, como mostrado para família da superóxido dismutase no capítulo 4, pode ser característica

da construção de vias bioquímicas específicas para determinados tipos de estresse. Esta hipótese foi corroborada pelos resultados oriundos da deleção do gene *sodA* em *Escherichia coli* K-12, os quais apresentam os danos causados ao metabolismo celular e o desiquilibrio na atividade cooperativa de enzimas antioxidantes, na ausência da isoforma Mn-SOD.

A importância do sistema antioxidante para o metabolismo bacteriano também foi mostrado no último capítulo, com enfoque em uma via de controle traducional, formada pela proteína EF-P (*elongation factor-P*), o qual está relacionado a fidelidade no processo de síntese de proteína. Esse trabalho apontou o EF-P como importante fator para o equilíbrio redox celular, mesmo em condições normais de crescimento, e que o torna importante na sobrevivência celular quando as células foram submetidas ao estresse oxidativo.

O conjunto de dados reunidos nesse trabalho mostra os diversos níveis de interferência que as ERO's podem ter em um metabolismo celular, além de enfatizar a importância do sistema antioxidante para a resposta adaptativa bacteriana a compostos tóxicos, como os herbicidas.

Alguns resultados são bastante expressivos, e poder ser utilizados em estudos futuros relacionados a processos de desintoxicação ambiental, como a biorremediação, bem como incentivar trabalhos com tolerância a herbicidas envolvendo enzimas do metabolismo bacteriano.