UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

GABRIELA TORRES CRUVINEL

Estudo da biodegradação bacteriana do herbicida glifosato por microbiota de corpo hídrico
e por coleção laboratorial e análise da presença de glifosato em corpo hídrico do
município de Guaratinguetá/SP

Lorena

2019

GABRIELA TORRES CRUVINEL

Estudo da biodegradação bacteriana do herbicida glifosato por microbiota de corpo hídrico
e por coleção laboratorial e análise da presença de glifosato em corpo hídrico do
município de Guaratinguetá/SP

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências do
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Industrial na área de concentração de Conversão
de Biomassa.

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Cristina Brazil
de Paiva

Versão Corrigida

Lorena

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Cruvinel, Gabriela Torres

Estudo da biodegradação bacteriana do herbicida glifosato por microbiota de corpo hídrico e por coleção laboratorial e análise da presença de glifosato em corpo hídrico do município de Guaratinguetá/SP / Gabriela Torres Cruvinel; orientadora Teresa Cristina Brazil Paiva - Versão Corrigida. - Lorena, 2019.
136 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2019

1. Glifosato. 2. Ligação fosfônica. 3. Biodegradação. 4. Resposta severa. 5. (p)ppgpp. I. Título. II. Paiva, Teresa Cristina Brazil, orient.

Aos meus pais, por me ajudarem a construir a pessoa que sou hoje.

Aos meus irmãos, por serem meus companheiros de jornada.

Ao meu marido, por ser meu cais.

A Deus, por me abençoar com tantos corações de luz.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve presente e tocando meu caminho com tantas possibilidades e bênçãos.

Aos meus pais, por todo o apoio, educação e exemplos que me deram ao longo de toda a minha vida e, especialmente, pelo amor que me fez acreditar mais em mim e tornar essa jornada possível.

À minha querida irmã, que sempre me deu o suporte que eu precisei nos momentos mais difíceis e me confortou com sua confiança e amor por mim.

Ao meu irmão, que sempre encheu nossa casa de alegria e me mostrou muito do que o mundo tinha a oferecer.

Ao meu amado marido, que demorou para chegar em minha vida, mas que, em pouco tempo, transformou os sonhos em realidade.

À minha orientadora, Profa. Dra. Teresa Cristina Brazil de Paiva, por permitir que eu realizasse meu trabalho no Instituto de Ciências Biomédicas – ICB/USP.

Ao meu co-orientador (não oficial), Prof. Dr. Beny Spira, por me receber em seu laboratório de forma acolhedora e pelo constante auxílio nos experimentos, rumos do trabalho, ensinamentos, disponibilidade e interesse. Por ser um grande orientador e um amigo.

Aos meus colegas Luiz Gustavo de Almeida e Henrique Iglesias Neves, do ICB, por seu auxílio nos ensaios e nas dúvidas que surgiram, pela incansável disponibilidade em me ensinar, pelo companheirismo e pelas ótimas risadas que tornaram tudo bem mais fácil.

Aos meus colegas Lucas Gonçalves Queiroz e Luiz Eduardo Gomes, da EEL, por seu apoio e auxílios à distância, pelo suporte emocional e pelas conversas divertidas.

Aos técnicos de laboratório da EEL Lucinha e Kléber, sempre tão solícitos e atenciosos.

À empresa Monsanto do Brasil, por fornecer cordialmente o glifosato produto técnico, sem o qual a realização dos experimentos não seria possível, e pelas análises das amostras de água.

Ao financiamento concedido pela CAPES, indispensável para que eu pudesse realizar esse trabalho.

RESUMO

CRUVINEL, Gabriela Torres. **Estudo da biodegradação bacteriana do herbicida glifosato por microbiota de corpo hídrico e por coleção laboratorial e análise da presença de glifosato em corpo hídrico do município de Guaratinguetá/SP.** 2019. 136 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

O pesticida glifosato é o composto com ação herbicida mais utilizado em todo mundo. A carga anual de glifosato lançada sobre o solo é vultuosa e há evidências de que chegue aos reservatórios de água superficial e subterrânea. No ambiente, este herbicida tem demonstrado efeitos negativos agudos sobre as comunidades microbianas, espécies vegetais, animais invertebrados e vertebrados. A presença do herbicida nos reservatórios de água utilizados para abastecimento público e mesmo a contaminação de alimentos nos quais se aplicou glifosato, podem expor os seres humanos ao consumo crônico deste composto, cujas consequências ainda necessitam ser avaliadas. Nesse trabalho, foi investigada a biodegradação de glifosato por espécies bacterianas de laboratório e por bactérias obtidas a partir de amostras de água fluvial. A análise de glifosato nas amostras de água do rio Piaguí resultou em baixa concentração do herbicida em estudo ($< 0,01$ ppm). Ensaio de avaliação do uso de glifosato como única fonte de fósforo e de biodegradação do herbicida pelas cepas bacterianas, demonstraram que as células expostas não foram capazes de metabolizar o composto ou mesmo de reproduzir-se na presença do mesmo, sugerindo que a toxicidade de glifosato sobre as cepas avaliadas é preponderante. Este trabalho demonstrou, pela primeira vez, que glifosato induz a resposta severa por carência de aminoácidos aromáticos em cepas ambientais e em *Escherichia coli*. Nossos resultados evidenciaram a indução de uma resposta ao estresse de baixa severidade, mas com a peculiar característica de acúmulo apenas do nucleotídeo guanosina tetrafosfato e não de seu precursor, guanosina pentafofato, diferentemente do que é observado em outros casos de carência de aminoácidos. Cabe ressaltar, que a análise de nossos resultados também sugere que o glifosato possa produzir efeitos tóxicos secundários nas células expostas, além da inibição da via de biossíntese de aminoácidos aromáticos.

Palavras-chave: Glifosato; Ligação fosfônica; Biodegradação; Resposta severa; (p)ppGpp.

ABSTRACT

CRUVINEL, G. T. **Study of glyphosate bacterial biodegradation by water indigenous microbiota and laboratorial collection and glyphosate analysis in a water body of the municipality of Guaratinguetá/SP.** 2019. 136 p. Thesis (Doctoral of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

The pesticide glyphosate is the action-based herbicide compound most used worldwide. The annual load of glyphosate thrown in the soil is massive, but there is also evidence that it reaches the surface and groundwater water supplies. On the environment, this herbicide has been showed acute negative effects on microbial communities, vegetal species, vertebrate and invertebrate animals. On a yearly basis, multiple cases of acute intoxication by glyphosate are registered between rural workers or product handlers. The herbicide presence in water reservoirs used by water supply and even food poisoning where glyphosate was applied, can expose human beings to the chronic use of this compound, where consequences still need to be investigated. In this work, it was analyzed the glyphosate degradation by laboratorian bacteria species and by bacteria collected from samples of fluvial water. Analysis of glyphosate performed in the samples of the river Piaguí showed a low concentration of herbicide in the water (<0.01 ppm). Assays with glyphosate usage as a unique source of phosphate by bacterial strains, as well as biodegradation trial by bacterial consortium, showed that exposed cells were not capable of metabolizing the compound or even to reproduce itself on their presence, suggesting that the glyphosate toxicity over studied strains is preponderant. This study showed, for the first time, that glyphosate induces a stringent response by aromatic amino acid starvation in environmental bacterial strains and in *Escherichia coli*. Our results proved a low severity stress response induction but with a peculiar characteristic of accumulating of the nucleotide guanosine tetrphosphate but not of its precursor guanosine pentaphosphate, unlike what is observed in other cases of amino acid starvation. Noteworthy, our results also suggest that the glyphosate can produce secondary effects in the exposed cells, besides inhibition of aromatic amino acid biosynthesis pathway.

Keywords: Glyphosate; Carbon-Phosphorus bond; Biodegradation; Stringent response; (p)ppGpp.

LISTA DE SIGLAS

EPA-USA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América
POEA	Polioxietilenamina
AMPA	Ácido aminometilfosfônico
Pi	Fosfato inorgânico
ATP	Adenosina trifosfato
CIM	Concentração inibitória mínima
OMS	Organização Mundial de Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
rDNA	DNA ribossomal
LB	Meio Luria-Bertani
TGP	Meio mínimo (Tris – Glicose – Fosfato)
TGG	Meio mínimo (Tris – Glicose – Glifosato)
UFC	Unidade formadora de colônia
UNT	Unidades nefelométricas
OD	Oxigênio dissolvido
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
FT	Fósforo total
ST	Sólidos totais
SF	Sólidos fixos
SV	Sólidos voláteis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa da área geográfica da bacia hidrográfica do Paraíba do Sul.	22
Figura 2 - Esquema da via do shikimato para biossíntese de aminoácidos aromáticos em plantas.	27
Figura 3 - Organização proposta para os 14 polipeptídeos codificados pelo operon <i>phn</i> em <i>E. coli</i>	29
Figura 4 - Vias para a conversão do átomo de fósforo contido em glifosato e AMPA em ortofosfato.	30
Figura 5 - Esquema simplificado das possíveis vias de degradação de glifosato.	33
Figura 6 - Biossíntese de (p)ppGpp.	60
Figura 7 - Indução da síntese de (p)ppGpp em resposta à carência de aminoácidos.	62
Figura 8 - Regulação do metabolismo bacteriano por (p)ppGpp.	65
Figura 9 - Regulação transcricional mediada por (p)ppGpp.	67
Figura 10 - Efeito de glifosato sobre o rendimento de bactérias da cepa MG1655.	82
Figura 11 - Efeito de glifosato sobre o rendimento de bactérias selvagem e mutantes da cepa MG1655 e a cepa selvagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14.	83
Figura 12 - Efeito de glifosato sobre o rendimento de bactérias selvagem e mutantes da cepa MG1655.	84
Figura 13 - Reversão do efeito inibitório do glifosato sobre o crescimento das cepas MG1655 e MG1655 <i>phnCDE</i> ⁺	85
Figura 14 - Efeito da oferta de glifosato como única fonte de fósforo sobre o crescimento de bactérias das cepas MG1655, MG1655 <i>phnCDE</i> ⁺ e MG1655 <i>phn</i> ⁺ Δ <i>pst</i>	86
Figura 15 - Curvas de crescimento da cepa MG1655 na presença de glifosato.	87
Figura 16 - Curvas de crescimento das cepas MG1655 e MG1655 Δ <i>relA</i> na presença de glifosato.	88
Figura 17 - Ensaio de (p)ppGpp em presença de glifosato com as cepas MG1655 e MG1655 Δ <i>relA</i>	90
Figura 18 - Ensaio de (p)ppGpp na presença de glifosato ou de hidroxamato de L-serina (HS).	92
Figura 19 - Ensaio de (p)ppGpp com a cepa MG1655.	93
Figura 20 - Ensaio de (p)ppGpp com a cepa MG1655.	94
Figura 21 - Ensaios de evolução dirigida em resposta ao glifosato com a cepa MG1655 <i>phnCDE</i> ⁺	96
Figura 22 - Ensaios de evolução dirigida em resposta ao glifosato com a cepa MG1655 <i>phnCDE</i> ⁺	98
Figura 23 - Efeito de glifosato sobre o rendimento dos cultivos de 26 isolados obtidos nos experimentos de evolução dirigida.	101
Figura 24 - Curva de crescimento na presença de glifosato com os isolados dos ensaios de evolução dirigida.	103
Figura 25 - Ensaio de ppGpp em presença de glifosato com os isolados 1, 3, 16, 17 e 293 obtidos nos ensaios de evolução dirigida.	104
Figura 26 - Efeito de glifosato sobre o rendimento dos cultivos dos 18 isolados ambientais obtidos a partir de amostras de água fluvial.	105
Figura 27 - Curva de crescimento na presença de glifosato com os isolados de água fluvial e a cepa MG1655.	107
Figura 28 - Ensaio de (p)ppGpp na presença de glifosato com os isolados de água fluvial ATG 2, 5, 6, 8 e ALG 9.	108

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição dos meios de cultura usados nos experimentos.....	69
Quadro 2 - Descrição das cepas bacterianas utilizadas nos experimentos.....	69
Quadro 3 - Identificação em nível de gênero, por sequenciamento dos genes 16S rDNA, de cinco isolados obtidos a partir de amostra de água do rio Piaguí, Guaratinguetá/SP.....	108
Quadro 4 - Ensaio de biodegradação.....	111
Quadro 5 - Caracterização físico-química das amostras de água coletadas do rio Piaguí, localizado em Guaratinguetá/SP.....	112

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 Glifosato	24
2.2 Regulon PHO: operon phn	28
2.3 Vias de degradação de glifosato	31
2.4 Efeitos de glifosato	35
2.4.1 Efeitos sobre microrganismos	37
2.4.2 Efeitos sobre espécies animais não humanos	40
2.4.3 Efeitos sobre humanos	41
2.5 Contaminação ambiental	45
2.5.1 Glifosato no ambiente	47
2.5.2 Estudos sobre presença de glifosato nos compartimentos ambientais	48
2.6 Biodegradação	50
2.6.1 Evidências de biodegradação de glifosato	53
2.7 Indução de resposta severa	56
2.7.1 Ação de (p)ppGpp	63
3 OBJETIVOS	68
3.1 Objetivos específicos	68
4.1 Cepas, meios de cultura, solução-estoque de glifosato	69
4.1.1 Meios de cultura (Quadro 1)	69
4.1.2 Cepas (Quadro 2)	69
4.1.3 Glifosato	70
4.2 Coleta de água fluvial	70
4.3 Detecção e quantificação de glifosato nas amostras de água fluvial	71
4.4 Caracterização físico-química das amostras de água fluvial	71
4.4.1 Medida de pH	71
4.4.2 Turbidez	72
4.4.3 Oxigênio Dissolvido - Método químico de Winkler modificado pela azida sódica (APHA, 2012)	72
4.4.4 Demanda Bioquímica de Oxigênio (APHA, 2012)	73
4.4.5 Fósforo Total (FT) - Método do ácido ascórbico (APHA, 2012)	74
4.4.6 Série de sólidos (APHA, 2012)	74
4.4.7 Íons Nitrato, fosfato, sulfato, fluoreto, cloreto, brometo	75
4.5 <i>Screening</i> de microbiota bacteriana nas amostras de água fluvial	76
4.6 Identificação molecular das cepas isoladas	77
4.7 Ensaio de tolerância bacteriana ao glifosato	78

4.9	Curvas de crescimento	78
4.10	Ensaio de evolução dirigida na presença de glifosato	79
4.11	Ensaio de eficiência de biodegradação do glifosato	80
5	RESULTADOS	82
5.1	Tolerância ao glifosato	82
5.2	Reversão do efeito tóxico de glifosato por aminoácidos aromáticos	84
5.3	Glifosato como fonte de fósforo	85
5.4	Efeito do glifosato sobre a taxa de crescimento	86
5.5	Indução de resposta severa por glifosato	89
5.6	Ensaio de evolução dirigida	95
5.6.1	Seleção de mutantes em placa	99
5.7	Isolados dos ensaios de evolução dirigida	100
5.8	Isolados das amostras de água fluvial	104
5.9	Ensaio de biodegradação	110
5.10	Parâmetros físico-químicos das amostras de água do rio	112
6	DISCUSSÃO.....	115
7	CONCLUSÕES	124
	REFERÊNCIAS	126

1 INTRODUÇÃO

Desde a chamada Revolução Verde, iniciada no começo do século XX, o uso de agrotóxicos é parte inerente do sistema de produção agrícola, sendo a alta produtividade das culturas atribuída ao emprego intensivo destes compostos químicos (CARVALHO, 2006).

A Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989 (BRASIL, 1989), define agrotóxicos e afins como:

[...] os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos.

Os termos sinônimos agrotóxicos, defensivos agrícolas e pesticidas são utilizados genericamente para designar herbicidas, inseticidas, fungicidas, entre outras substâncias destinadas a pragas específicas, de acordo com sua forma de aplicação (ABIFINA, 2015) e serão usados neste texto de forma alternada a fim de evitar a excessiva repetição de palavras.

Na zona rural, os pesticidas são a principal carga de contaminação ambiental, pois são, em geral, de difícil degradação e cumulativos, comprometendo, ao mesmo tempo, água e solo, podendo ser volatilizados e dispersos pelo vento ou lixiviados pela água da chuva, alterando os componentes abióticos dos ecossistemas e impondo mudanças adaptativas aos componentes biológicos (FIGUEIRÓ, 2012).

Os agrotóxicos utilizados na agricultura têm causado contaminação dos recursos hídricos com potenciais prejuízos à saúde, sobretudo quando as águas são utilizadas para consumo humano (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014). O sistema de tratamento de água convencional, utilizado para remoção de resíduos e microrganismos das águas captadas de corpos d'água superficiais e subterrâneos não apresenta a eficácia necessária para eliminar das águas de abastecimento público os produtos sintéticos, elementos menores ou traços de substâncias nocivas à vida que frequentemente são encontrados nos mananciais que abastecem as regiões metropolitanas brasileiras (REBOUÇAS, 2006).

A área de estudo selecionada, a Região Metropolitana do Vale do Paraíba, abrange uma área de 16.192,67 km², com população total de 2.453.387 habitantes em 2010, de acordo com o 12º Censo demográfico produzido pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011). Parte dessa região é ocupada pela Bacia do Rio Paraíba do Sul, uma bacia hidrográfica federal, com área de 56.665 km², a qual drena uma das regiões mais

desenvolvidas do país, abrangendo parte do Estado de São Paulo, na região conhecida como Vale do Paraíba Paulista, parte do Estado de Minas Gerais, denominada Zona da Mata Mineira, e metade do Estado do Rio de Janeiro, ocupando em toda essa extensão 180 municípios (CEIVAP, 2006) (Figura 1).

Figura 1 - Mapa da área geográfica da bacia hidrográfica do Paraíba do Sul.

Fonte: CEIVAP (2006).

Nota: O círculo em vermelho destaca a área de coleta das amostras de água do rio Piaguí.

O desenvolvimento da bacia do rio Paraíba do Sul vem proporcionando a degradação da qualidade de suas águas e redução de sua disponibilidade hídrica, especialmente pela tendência de concentração populacional em áreas urbanas, um dos fatores responsáveis pelo aumento da poluição na bacia (CEIVAP, 2006).

O rio Paraíba do Sul é formado pela confluência dos rios Paraitinga e Paraibuna, e o seu comprimento, calculado a partir da nascente do Paraitinga, é de mais de 1.100 km, atravessando os estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo (CEIVAP, 2006). Os principais formadores da margem esquerda do rio Paraíba do Sul são os rios Paraibuna, Pomba e Muriaé, enquanto na margem direita os principais afluentes são os rios Pirai, Piabanha e Dois Rios (CEIVAP, 2006). Ao longo do curso do rio e de seus principais

afluentes, indústrias se instalaram e cidades cresceram, lançando efluentes em suas águas, na maioria das vezes sem qualquer tipo de tratamento (CEIVAP, 2006).

O rio Piaguí é um dos afluentes da margem esquerda do rio Paraíba do Sul, no trecho paulista; nasce no município de Campos do Jordão, na latitude 22°42'45" sul e longitude 45°25'28" oeste, e segue em direção Sudeste do estado de São Paulo, até o rio Paraíba do Sul, entre as cidades de Lorena e Guaratinguetá, próximo à rodovia BR-116 (CEIVAP, 2006), local onde foram feitas as coletas de amostras de água deste rio (Figura 1), margeado por cultivos de arroz irrigado, nos quais são aplicados vários pesticidas, dentre eles, glifosato.

O cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) ocupa cerca de 10% do solo agricultável do planeta (BARRIGOSSI; LANNA; FERREIRA, 2004). Existem três tipos principais de ecossistemas de arroz: terras altas, várzeas úmidas e irrigado por inundação, sendo este último responsável por 93% da produção mundial e 60% da produção brasileira deste cereal, cujos impactos ambientais são o comprometimento da quantidade e qualidade dos recursos hídricos por processos de assoreamento, eutrofização e contaminação por agrotóxicos, entre outros (BARRIGOSSI; LANNA; FERREIRA, 2004). O uso intensivo de herbicidas em campos de cultivo de arroz é uma prática comum, levantando questões sobre os prejuízos às espécies expostas como resultado dos potenciais efeitos deletérios destes compostos em processos biológicos do solo, organismos não-alvo e poluição de córregos e rios em razão da lavagem das plantações pela água da chuva e escoamento superficial (MONEKE; OKPALA; ANYANWU, 2010).

Este estudo avaliou a ocorrência do herbicida glifosato em concentração muito baixa em amostras de água fluvial receptora de efluentes dos cultivos de arroz irrigado da região de Guaratinguetá/SP, sugerindo que o composto não seja um contaminante abundante nas águas do rio Piaguí. Em nossos ensaios com bactérias de coleção laboratorial e ambientais demonstramos que glifosato pode ser tóxico para muitas dessas cepas, mesmo em concentração inferior àquelas aplicadas em campo, dificultando o processo de biodegradação do herbicida e sua consequente remoção do meio. Além disso, apresentamos, pela primeira vez, a indução de resposta severa em células bacterianas expostas a glifosato, elucidando um mecanismo intracelular do herbicida. Esse conhecimento é bastante útil para compreender como glifosato pode afetar as comunidades microbianas que exercem funções essenciais no equilíbrio dos compartimentos ambientais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Glifosato

O ingrediente ativo glifosato é usado como pesticida desde o início da década de 1970 (HOVE-JENSEN; ZECHEL; JOCHIMSEN, 2014), mas foi descrito como um composto químico 21 anos antes, quando foi usado como “droga de guerra” no Plano Colômbia para desfoliar campos de maconha no México e América do Sul (SZÉKÁCS; DARVAS, 2012).

O composto *N*-(fosfonometil)glicina foi sintetizado pela primeira vez em uma pequena empresa farmacêutica suíça, comprada pela Aldrich Chemical Co. (SZÉKÁCS; DARVAS, 2012). Dez anos mais tarde, o composto ganhou o interesse da empresa Monsanto, a qual desenvolvia pesquisas sobre um tipo de ácido fosfônico, usado como surfactante, a partir de substâncias relacionadas ao ácido aminometilfosfônico (AMPA), estendendo os testes a compostos com atividade herbicida. Na década de 1970, a Monsanto obteve a patente do produto e lançou o pesticida Roundup® (sal de isopropilamina glifosato acrescido de surfactante) (SZÉKÁCS; DARVAS, 2012).

A história do glifosato teve dois pontos marcantes: o primeiro, em 1991, quando a proteção da patente do herbicida foi renovada nos Estados Unidos com base em novidades nas formulações comercializadas; o segundo, quando as vendas de glifosato aumentaram consideravelmente na Europa pela disseminação das culturas geneticamente modificadas tolerantes ao herbicida (SZÉKÁCS; DARVAS, 2012).

A partir da década de 1990, glifosato se tornou o ingrediente ativo de herbicida mais vendido do mercado mundial (SZÉKÁCS; DARVAS, 2012). Com a quebra da patente nos anos 2000, muitas empresas passaram a produzir preparações genéricas do pesticida e, atualmente, muitas indústrias químicas chinesas estão ganhando uma parcela considerável deste mercado e já apresentam capacidade produtiva para suprir toda a demanda mundial (SZÉKÁCS; DARVAS, 2012). Entretanto, nos países onde as plantações de culturas resistentes a glifosato estão aumentando em volume, a ocorrência de ervas daninhas que apresentam resistência ao herbicida também vem crescendo, sendo possível prever que tais essas culturas demandarão pesticidas com ingredientes ativos diferentes de glifosato (SZÉKÁCS; DARVAS, 2012).

Herbicidas baseados em glifosato são atualmente registrados em mais de 130 países para controlar ervas daninhas anuais e perenes, arbustos e árvores agrícolas, usos industrial,

urbano e doméstico, em florestas e estufas (MINK *et al.*, 2012). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA-USA) e agências regulatórias de outros países registram este ingrediente ativo como um herbicida de amplo espectro para uso em cultivos de uso alimentar e não alimentar (MINK *et al.*, 2012).

No Brasil, onde glifosato é conhecido popularmente como “mata-mato”, são vendidos cerca de 250 milhões de litros ao ano do produto formulado (LONDRES, 2011), representando 76% das vendas da classe de uso de herbicidas (IBAMA, 2010). Glifosato é registrado no Brasil para uso em 26 diferentes tipos de culturas agrícolas, sendo comercializadas 71 marcas de produtos formulados à base de glifosato, por 20 diferentes empresas registrantes (IBAMA, 2010). Glifosato é utilizado em cultivos de arroz irrigado, cana-de-açúcar, café, citros, maçã, milho, pastagens, soja, fumo, uva, entre outros (AMARANTE JR.; SANTOS, 2002).

Todavia, o sucesso de glifosato no mercado de pesticidas sofre limitações por seu reconhecimento como um poluente aquático e pela emergência de ervas daninhas resistentes em todo o mundo (SZÉKÁCS; DARVAS, 2012).

O herbicida glifosato pertence ao grupo dos ácidos fosfônicos ou fosfonatos, os quais são similares a fosfoésteres, exceto pelo fato de que fosfonatos tem uma ligação direta carbono-fósforo (C-P), extremamente estável e resistente à degradação físico-química (SVIRIDOV *et al.*, 2012), o que contribui para sua persistência no ambiente e aumento do conteúdo total de fósforo nas águas superficiais (STUDNIK *et al.*, 2015). Glifosato é um derivado fosfometil do aminoácido glicina (SZÉKÁCS; DARVAS, 2012), pertencendo ao grupo químico glicina substituída (IBAMA, 2010).

Fosfonatos biogênicos são conhecidos desde 1959 (SVIRIDOV *et al.*, 2012), amplamente distribuídos nos ecossistemas terrestres e aquáticos (TIWARI *et al.*, 2015), comumente encontrados na forma de fosfolipídeos, e podem ser usados como inibidores de enzimas, antibacterianos, antivirais, agentes antitumorais e herbicidas (METCALF; WANNER, 1991). Nos ecossistemas oceânicos, os fosfonatos são o segundo principal componente de fósforos orgânicos dissolvidos (25%), depois dos fosfoésteres, o que, provavelmente, levou bactérias e cianobactérias a adotar estratégias para utilizar fosfonatos como fonte de fósforo (TIWARI *et al.*, 2015).

O ingrediente ativo glifosato é um ácido, mas é normalmente usado na forma de sal, especialmente sal de isopropilamina, cuja solubilidade é de 12 g/l (NOUROUZI *et al.*, 2011). As formulações comerciais consistem em sal de amônio, potássio, isopropilamina ou sódio de glifosato, suplementado com um surfactante polar, como o polioxietilenamina

(POEA) para aumentar sua solubilidade em água e absorção foliar pelas plantas (VILLARREAL-CHIU *et al.*, 2007).

Utiliza-se o termo glifosato para designar tanto o ingrediente ativo quanto seus sais derivados, pois todos os compostos são biologicamente equivalentes (YAMADA; CASTRO, 2004). As formulações comerciais contendo glifosato como ingrediente ativo disponíveis no mercado são de 3600 mg.L⁻¹ a 8400 mg.L⁻¹, sendo 7200 mg.L⁻¹ a concentração mais comum (MBANASO *et al.*, 2014).

O glifosato tem fórmula molecular C₃H₈NO₅P, massa molecular de 169 g.mol⁻¹ e mostra-se bastante estável na presença de luz (AMARANTE JR.; SANTOS, 2002). Assim como outros fosfonatos, glifosato tem forte interação com superfícies, como partículas de solo e folhas das plantas, e é imediatamente inativado quando adsorvido a componentes do solo, tendo sua eficiência significativamente reduzida, pois o composto é ativo apenas quando em solução (ZHOU *et al.*, 2006; VILLARREAL-CHIU *et al.*, 2007).

Glifosato possui uma alta solubilidade em água, algo incomum entre os agrotóxicos, que representa um grande problema em termos ambientais e ecotoxicológicos (SZÉKÁCS; DARVAS, 2012). A solubilidade aumentada do glifosato nas formulações comerciais pode permitir a lixiviação de glifosato para camadas mais profundas do solo (SZÉKÁCS; DARVAS, 2012).

Mercurio *et al.* (2014) verificaram que glifosato é moderadamente persistente em água marinha sob condições de baixa luminosidade (47 dias) e altamente persistente na ausência de luz (267 dias), indicando que a disponibilidade de luz afeta a persistência de glifosato no campo, um parâmetro de grande relevância nos ambientes aquáticos (MERCURIO *et al.*, 2014). Os produtos de degradação de glifosato, principalmente o metabólito AMPA, mostram maior persistência sob condições naturais (LUPI *et al.*, 2015).

Em campo, glifosato é aspergido na folhagem onde é absorvido e transportado para áreas de crescimento da planta em um esforço de inativação do herbicida pelas células vegetais (HOVE-JENSEN; ZECHEL; JOCHIMSEN, 2014). O herbicida deve entrar em contato com as folhas das plantas-alvo e se difundir através de diferentes barreiras de absorção para alcançar seu sítio-alvo subcelular (VILLARREAL-CHIU *et al.*, 2007). A absorção foliar de glifosato ocorre somente na fase líquida; uma vez na superfície da folha, o composto cristaliza e a absorção cessa, sem mais efeito biológico para a planta (VILLARREAL-CHIU *et al.*, 2007). Contudo, o pesticida fica exposto à lavagem pela água da chuva.

Desde a década de 1970 está bastante difundido o conhecimento de que glifosato inibe a biossíntese de aminoácidos aromáticos essenciais (fenilalanina, tirosina, triptofano), consequentemente bloqueando a síntese proteica e levando a planta à necrose (SZÉKÁCS; DARVAS, 2012).

Nas células vegetais e bacterianas, o alvo primário do glifosato é a enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (EPSP sintase) que atua na via de síntese do ácido shikímico, ausente em células animais (ARISTILDE *et al.*, 2017) (Figura 2). O herbicida é um inibidor competitivo linear em relação a fosfoenolpiruvato, ligando-se à EPSP sintase de forma duradoura, o que explica seu forte efeito sobre as plantas, e o acúmulo de intermediários da via não é capaz de desfazer a inibição causada por glifosato (BOOCOOCK; COGGINS, 1983). Há dois tipos de EPSP sintases: o tipo I está presente na maioria das plantas e bactérias, sendo naturalmente sensível a glifosato, e o tipo II é encontrada em bactérias tolerantes ao herbicida (CAO *et al.*, 2012).

Figura 2 - Esquema da via do shikimato para biossíntese de aminoácidos aromáticos em plantas.

Fonte: Aristilde *et al.* (2017).

Nota: A enzima alvo de glifosato, EPSP sintase, converte shikimato-3P e fosfoenolpiruvato (PEP) em 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato.

2.2 Regulon PHO: operon *phn*

Fósforo é um macronutriente essencial para todas as células vivas, compondo várias moléculas orgânicas, estruturais e funcionais, como os fosfolipídeos de membrana, ácidos nucleicos e adenosina trifosfato (ATP). Fosfato inorgânico (Pi) ou íon ortofosfato é a forma molecular mais comum em que o elemento fósforo se encontra no ambiente e é a forma preferencial para utilização pelas células bacterianas (METCALF; WANNER, 1991). Fósforo é o décimo primeiro elemento mais abundante na crosta terrestre, mas devido à sua alta reatividade, permanece indisponível aos microrganismos (TIWARI *et al.*, 2015).

Sendo o fósforo um elemento essencial para a nutrição e metabolismo celulares, bactérias podem assimilar vários compostos contendo fósforo para suprir suas necessidades, porém, a fonte preferencial é fosfato inorgânico, cuja entrada nas células depende de sua concentração no meio e ocorre através de vários sistemas de transporte (VERSHININA; ZNAMENSKAYA, 2002).

E. coli pode suprir sua necessidade por fósforo utilizando Pi, organofosfatos ou fosfonatos (WANNER, 1993). Os genes envolvidos na assimilação do fósforo pela célula bacteriana compõem o **regulon PHO**, um conjunto de 31 genes induzidos em escassez de fosfato ambiental, organizados em nove unidades transcricionais (HOVE-JENSEN; ZECHEL; JOCHIMSEN, 2014), incluindo o operon *phoBR*, o operon *pstSCAB-phoU*, o operon *phoA*, o gene *phoE*, o transportador *ugpBAEC* e o **operon *phn***, responsável pelo transporte e utilização fosfonatos (METCALF; WANNER, 1991; HOVE-JENSEN; ZECHEL; JOCHIMSEN, 2014).

A carência de fosfato nas células bacterianas induz os genes *psi* (do inglês, *phosphate starvation-inducible*), os quais fazem parte do regulon PHO, codificando proteínas envolvidas no transporte de Pi e outras moléculas contendo fósforo, presentes em bactérias, arqueobactérias, cianobactérias e leveduras (VERSHININA; ZNAMENSKAYA, 2002). Procariotos respondem à carência de fosfato produzindo fosfatase alcalina (codificada por *phoA*), uma enzima-chave do regulon PHO que regula o metabolismo de fósforo por liberar o fosfato de compostos organofosfatados complexos (TIWARI *et al.*, 2015).

Bactérias da espécie *E. coli* podem utilizar fosfonatos naturais ou sintéticos, os quais são utilizados como fonte de fósforo através da ação de C-P liases, enzimas capazes de clivar a ligação fosfônica destas moléculas (VERSHININA; ZNAMENSKAYA, 2002).

Em *E. coli*, os 14 genes envolvidos na captação e utilização de fosfonatos estão organizados no operon *phnCDEFGHIJKLMNOP* (VERSHININA; ZNAMENSKAYA, 2002). A expressão do operon *phn* requer a privação de ortofosfato, mas tal expressão é necessária somente quando algum fosfonato está presente no meio; na ausência de ortofosfato e de um fosfonato, o operon permanece inibido, indicando que fosfonatos podem ser indutores da expressão do operon *phn* (HOVE-JENSEN; ZECHEL; JOCHIMSEN, 2014). Os genes *psi* estão sob o mesmo controle regulatório do restante do regulon PHO, consistindo em um sistema de transdução de sinal de dois componentes, PhoB e PhoR em bactérias gram-negativas, sendo PhoR uma proteína quinase sensora de membrana que responde à concentração de Pi no meio e está envolvida na fosforilação e desfosforilação de reguladores transcricionais como PhoB, o qual se liga diretamente aos genes promotores do regulon PHO, induzindo sua expressão (VERSHININA; ZNAMENSKAYA, 2002).

A internalização dos ácidos fosfônicos ocorre por um sistema de transporte do tipo ABC, composto por uma proteína periplasmática de ligação ao fosfonato (codificada por *phnD* em *E.coli*), um polipeptídeo de ligação ao ATP (*phnC*) e um polipeptídeo transportador de membrana (*phnE*) (Figura 3) (HOVE-JENSEN; ZECHEL; JOCHIMSEN, 2014).

Figura 3 - Organização proposta para os 14 polipeptídeos codificados pelo operon *phn* em *E. coli*.

Fonte: Hove-Jensen, Zechel e Jochimsen (2014).

Nota: As letras C, D e E nos círculos vermelhos representam o sistema de transporte do tipo ABC; os círculos azuis com as letras G, H, I, J, M, N, O e P representam os polipeptídeos com função enzimática no catabolismo dos fosfonatos; o círculo verde com a letra F representa o repressor putativo da expressão do operon *phn*; e os círculos com as letras K e L e semi-círculos em preto representam polipeptídeos auxiliares sem uma função bioquímica reconhecida.

As reações que ocorrem desde a chegada do fosfonato no meio intracelular até o substrato da C-P liase, envolvendo as várias enzimas deste complexo proteico, podem ser consideradas como passos necessários para ativação do substrato (HOVE-JENSEN; ZECHEL; JOCHIMSEN, 2014). A enzima C-P liase é complexo proteico multisubunidade, PhnGHIJK, que não possui atividade enzimática demonstrada, mas análises *in vitro*

mostraram que o polipeptídeo PhnJ funciona como C-P liase (Figura 4) (HOVE-JENSEN; ZECHEL; JOCHIMSEN, 2014). Os polipeptídeos PhnN e PhnP são proteínas auxiliares, enquanto PhnF e PhnO são, provavelmente, proteínas com função regulatória (VERSHININA; ZNAMENSKAYA, 2002).

Figura 4 - Vias para a conversão do átomo de fósforo contido em glifosato e AMPA em ortofosfato.

Fonte: Hove-Jensen; Zechel e Jochimsen (2014).

Nota: (A) Conversão de glifosato: 1) glifosato; 2) 2,5'-trifosfo-α-D-ribosil 1'-(N-fosfonometilglicina); 3) 5'-fosfo-α-D-ribosil 1'-(N-fosfonometilglicina); 4a) N-metilglicina; 5) 5-fosfo-α-D-ribosil-1,2-fosfato cíclico; 6) α-D-ribosil 1,5-bifosfato; 7) 5-fosfo-α-D-ribosil-1-difosfato cíclico (PRPP); 8) ion difosfato (PPi); 9) ion fosfato (Pi). Phn I*, J*, M, N, O e P indicam as enzimas que catalizam cada uma das reações. APRTase e Ppa são enzimas não codificadas pelo operon *phn*, sendo a primeira escolhida aleatoriamente em um conjunto de 10 enzimas fosforibosiltransferases produzidas por *E. coli*.

(B) Conversão de AMPA: 10) AMPA; 11) N- acetamidometilfosfonato; 4b) N-metilacetamida.

A função bioquímica da maioria dos polipeptídeos do operon *phn* ainda não foi completamente estabelecida, mas todas são necessárias para a completa transformação das moléculas de fosfonato com consequente liberação de ortofosfato (HOVE-JENSEN; ZECHEL; JOCHIMSEN, 2014). Todavia, as enzimas especificadas por *phn* em *E. coli*, provavelmente, não convertem o fósforo do ácido fosfônico em ortofosfato (produzindo apenas um composto contendo fósforo – PRPP), cuja formação é realizada por enzimas não codificadas pelo operon *phn*, como as APRTases, de ocorrência em muitos microrganismos,

as quais estão presentes na célula todo o tempo (HOVE-JENSEN; ZECHEL; JOCHIMSEN, 2014).

O catabolismo de glifosato parece ser controlado por um duplo mecanismo composto pela ativação da transcrição do operon *phn* mediada por PhoB e pela repressão mediada por PhnF, e a utilização de glifosato depende da especificidade do sistema enzimático catabólico e dos polipeptídeos responsáveis pela internalização do composto: em *Arthrobacter* sp. GLP-1 e *Pseudomonas* sp. PG2982 demonstrou-se que o catabolismo funciona simultaneamente com o transporte e é afetado pela forma do composto (HOVE-JENSEN; ZECHEL; JOCHIMSEN, 2014).

2.3 Vias de degradação de glifosato

A degradação das moléculas de pesticidas se dá por meio de reações químicas, envolvendo água e compostos presentes no solo, ou pela ação da luz solar, e é facilitada quando estas moléculas se encontram aderidas às partículas do solo ou à matéria orgânica, assim como quando temperatura, umidade, aeração e teor de matéria orgânica do solo são elevados, ocorrendo, principalmente, nas camadas superficiais do solo. Porém, solos com concentrações excessivas de pesticidas tem sua capacidade de retenção e de degradação reduzidas (BARRIGOSSI; LANNA; FERREIRA, 2004).

Algumas reações de degradação mantêm intacta a metade ativa do composto parental (como no metabólito AMPA) e misturas dos compostos originais e dos produtos de transformação podem exercer efeitos aditivos (FENNER *et al.*, 2013). Ou ainda, tais reações podem gerar moléculas ecotoxicologicamente mais potentes, por serem menores e mais polares do que o composto parental, aumentando seu potencial para alcançar fontes de abastecimento público de águas superficiais e subterrâneas (FENNER *et al.*, 2013).

Nos ecossistemas aquáticos os pesticidas podem sofrer processos de hidrólise, fotólise, degradação biológica, bioacumulação ou biomagnificação, realizados por um grande número de microrganismos (SPADOTTO *et al.*, 2004). A consequente transformação das moléculas pode ser completa ou incompleta podendo resultar em compostos com persistência e toxicidade diferentes da molécula original, as quais são influenciadas por características do produto utilizado como o tipo de formulação, os solventes e surfactantes adicionados (CETESB, 2010).

Apesar da estabilidade da ligação fosfônica, fosfonatos são prontamente quebrados no ambiente por transformações bióticas e abióticas (WANNER, 1994), exceto por processos de degradação química (SZÉKÁCS; DARVAS, 2012). Possivelmente devido à presença de fosfonatos nos ambientes, muitas espécies microbianas adquiriram a capacidade de metabolizar fosfonatos como fonte de nutrientes para o crescimento, como fósforo, através da clivagem da ligação C-P (WANNER, 1994) e a habilidade de clivar a ligação fosfônica de fosfonatos naturais e antropogênicos parece ser amplamente distribuída entre as bactérias (DICK; QUINN, 1995a).

A capacidade microbiana em utilizar fosfonatos como fonte de fósforo exige a presença de enzimas que clivem a ligação C-P (METCALF; WANNER, 1991; SVIRIDOV *et al.*, 2012). A primeira evidência de clivagem biológica da ligação C-P foi observada em *E. coli*, a qual usa uma via alternativa para metabolizar fosfonatos pela mobilização de uma C-P liase ligada à membrana (STUDNIK *et al.*, 2015). Estudos posteriores da degradação de fosfonatos biogênicos identificaram quatro enzimas catabólicas principais e suas vias: C-P liase, fosfonoacetaldeído hidrolase (fosfonatase), fosfonoacetato hidrolase e fosfopiruvato hidrolase, sendo glifosato degradado apenas pela primeira (VILLARREAL-CHIU *et al.*, 2007). C-P liases e fosfonatases são as duas principais vias pelas quais moléculas de fosfonatos são metabolizados, sendo a primeira predominante entre os microrganismos (TIWARI *et al.*, 2015). C-P liases são as únicas enzimas com reconhecida capacidade de quebrar as moléculas de glifosato e AMPA (SVIRIDOV *et al.*, 2012).

Herbicidas fosfonatos, como glifosato, são considerados “seguros” em parte devido à sua rápida biodegradação no ambiente (WANNER, 1994), especialmente no solo, onde ocorre pronta remoção do herbicida por atividade microbiana, formando compostos contendo carbono, fósforo e nitrogênio que podem ser utilizados no metabolismo de microrganismos (HOVE-JENSEN; ZECHEL; JOCHIMSEN, 2014). Glifosato serve melhor como fonte de fósforo do que de carbono (MONEKE; OKPALA; ANYANWU, 2010) para os microrganismos, apesar de seu efeito inibitório sobre a síntese de aminoácidos aromáticos (DICK; QUINN, 1995b).

Quando se encontra livre no solo, glifosato é rapidamente degradado a CO₂, mas quando está adsorvido a partículas do solo ou a sedimentos em corpos hídricos, o herbicida é degradado mais lentamente ou permanece inalterado e inativo no ambiente por muitos anos (AMARANTE JR.; SANTOS, 2002). Os microrganismos autóctones do solo promovem uma dinâmica de degradação de glifosato composta por duas fases: na primeira

ocorre a utilização biológica do glifosato solúvel, com a consequente dessorção das moléculas aderidas à matriz do solo; na segunda, mais lenta, o herbicida agora em solução é biodegradado (ERMAKOVA *et al.*, 2010).

Após adsorção às partículas do solo através do ácido fosfórico, a mineralização do herbicida é possivelmente um processo co-metabólico, que ocorre sem uma fase *lag* e a taxa em que se processa varia significativamente entre diferentes tipos de solo (BORGGAARD; GIMSING, 2008).

A habilidade da célula bacteriana em usar glifosato depende da disponibilidade do sistema de transporte para captação do herbicida e da expressão de um sistema enzimático com afinidade para o composto (HOVE-JENSEN; ZECHEL; JOCHIMSEN, 2014). Em *E. coli*, a ligação de glifosato à proteína periplasmática PhnD é fraca, dificultando o transporte (HOVE-JENSEN; ZECHEL; JOCHIMSEN, 2014) e tornando-a incapaz de clivar a ligação C-P de glifosato (DICK; QUINN, 1995a).

Em bactérias são conhecidas duas vias enzimáticas de quebra de glifosato: a clivagem direta da ligação C-P (desfosforilação), produzindo sarcosina e ortofosfato por ação do complexo multienzimático da C-P liase e a clivagem da ligação C-N (descarboxilação), gerando glioxilato e AMPA (Figura 5) (DICK; QUINN, 1995b; MONEKE; OKPALA; ANYANWU, 2010; SZÉKÁCS; DARVAS, 2012; SVIRIDOV *et al.*, 2015). As duas vias ocorrem em plantas, na água e no solo, com AMPA como principal metabólito (PIPKE *et al.*, 1987; SZÉKÁCS; DARVAS, 2012), mas somente a via da C-P liase se mostrou capaz de realizar a completa mineralização de glifosato (VILLARREAL-CHIU *et al.*, 2007).

Figura 5 - Esquema simplificado das possíveis vias de degradação de glifosato.

Fonte: Fan *et al.* (2012).

Pela via da C-P liase, a porção metil da sarcosina é transferida para derivados do ácido tetrahidrofólico para metabolismo posterior através das vias de um carbono e com a formação simultânea de glicina ou, na presença de dioxigênio, a N-metilglicina pode ser convertida em peróxido de hidrogênio, formaldeído e glicina (HOVE-JENSEN; ZECHEL; JOCHIMSEN, 2014). Pela ação da oxidase, a clivagem da ligação carboximetileno-N resulta na formação de AMPA e glioxilato, utilizando dioxigênio como agente oxidante. O glioxilato é oxidado a CO₂ pelo ciclo do ácido glioxílico, enquanto AMPA depois é catalisado por acetilação seguida por clivagem da ligação C-P, através de reações, incluindo a C-P liase (HOVE-JENSEN; ZECHEL; JOCHIMSEN, 2014).

A predominância da via da C-P liase parece ser o padrão geral entre as espécies bacterianas estudadas (SVIRIDOV *et al.*, 2015), mas a via glifosato ou glicina oxidase/C-P liase atua sob condições de pressão seletiva para detoxificação de glifosato em ambientes contaminados com elevadas concentrações de glifosato ou outros ácidos fosfônicos (HOVE-JENSEN; ZECHEL; JOCHIMSEN, 2014).

A origem do complexo enzimático da C-P liase com especificidade para glifosato ainda não está clara (SVIRIDOV *et al.*, 2015). A habilidade em converter o herbicida em sarcosina também já foi observada em bactérias sem exposição prévia ao composto, sugerindo a existência de algum análogo natural de glifosato que sirva de substrato para esta via metabólica (SVIRIDOV *et al.*, 2015).

É importante considerar a biodegradação de glifosato e AMPA juntos (VILLARREAL-CHIU *et al.*, 2007), pois reações enzimáticas semelhantes ocorrem no catabolismo de ambos e AMPA também é um substrato para a via da C-P liase (HOVE-JENSEN; ZECHEL; JOCHIMSEN, 2014). A C-P liase envolvida na via da sarcosina é inibida pelo AMPA formado por ação da glifosato oxidorreductase sobre glifosato (ZHAO *et al.*, 2015).

A principal razão para a utilização de glifosato como fonte de fósforo é que a expressão genética da via da C-P liase depende fortemente das concentrações de fosfato inorgânico intra e extracelulares (DICK; QUINN, 1995b; KRYUCHKOVA *et al.*, 2014). Portanto, a biodegradação de glifosato pela C-P liase está diretamente relacionada ao estresse nutricional e a completa mineralização do herbicida pode ser limitada pela repressão exercida por nutrientes preexistentes no ambiente ou pelos produtos da degradação do composto, como ortofosfato (VILLARREAL-CHIU *et al.*, 2007). A relação com a concentração de fósforo parece eliminar a possibilidade de biodegradação bacteriana de

fosfonatos no ambiente natural, podendo assim serem considerados compostos recalcitrantes (STUDNIK *et al.*, 2015).

2.4 Efeitos de glifosato

Os pesticidas reduzem as perdas de produção no setor agrícola, contribuindo de forma relevante com o aumento de produtividade. Por outro lado, as consequências de seu uso são proporcionalmente importantes: envenenamentos (3 milhões de casos anuais resultando em milhares de mortes) e doenças em humanos, especialmente em países em desenvolvimento (NOUROUZI *et al.*, 2011), assim como toxicidade em organismos não-alvo e contaminação cumulativa dos solos, água, alimentos e ração animal.

Evidências científicas surgem a todo momento a respeito de novos efeitos nocivos, em concentrações cada vez menores, causados pelos agrotóxicos em contato com diferentes espécies de seres vivos (GOMES; BARIZON, 2014). Apesar de serem moléculas sintetizadas para um alvo molecular específico, alguns processos bioquímicos são comuns a todos ou a muitos seres vivos, tornando o efeito dos pesticidas mais abrangente do que o desejado, exercendo uma pressão seletiva artificial sobre os organismos e alterando a dinâmica funcional dos ecossistemas (SPADOTTO *et al.*, 2004).

Além dos compostos parentais ativos, os produtos de sua degradação podem ser igualmente (ou mais) prejudiciais aos seres vivos. Metabólitos ecotoxicologicamente relevantes são aqueles que impõem riscos maiores ou comparáveis aos do pesticida original, à biota do solo ou da água; nas águas subterrâneas são aqueles que, provavelmente, alcançam tais ambientes em concentrações acima de $0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$ e demonstram a mesma toxicidade do composto parental (FENNER *et al.*, 2013). Parece que a distinção entre metabólitos relevantes e não relevantes pode ter resultado em produtos de transformação móveis e persistentes que recebem pouca atenção em virtude de não serem geralmente considerados toxicologicamente relevantes, porém, tais produtos podem afetar significativamente a saúde humana e produzir efeitos ambientais (FENNER *et al.*, 2013). AMPA, o mais comum metabólito da biodegradação de glifosato, por exemplo, mantém a ligação C-P característica de fosfonatos, assim como o perfil tóxico e a recalcitrância do composto original (VILLARREAL-CHIU *et al.*, 2007).

Compostos xenobióticos presentes nas águas superficiais afetam tanto o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos quanto outros organismos que as utilizam como fonte de água para

consumo diário, incluindo seres humanos (SZÉKÁCS; DARVAS, 2012). Contudo, os relatos de intoxicação por pesticidas presentes na água de consumo humano ainda são escassos (MILHOME *et al.*, 2009). Cabe à sociedade lidar com a questão da ocorrência de produtos de transformação em recursos hídricos e como pesar os benefícios do uso dos respectivos pesticidas em detrimento da saúde humana e ambiental (FENNER *et al.*, 2013).

Glifosato tem suscitado intenso debate a respeito de seus potenciais efeitos nocivos sobre os seres vivos, baseado em diversos estudos recentemente publicados associando o uso deste composto com ocorrência de câncer e disfunção endócrina em humanos e toxicidade crônica e aguda em espécies aquáticas (SILVA *et al.*, 2018).

Considerando o grande volume de glifosato a ser aplicado nos cultivos em consequência do surgimento de pragas resistentes ao herbicida, será importante avaliar os riscos à saúde e a segurança da exposição a glifosato, especialmente em populações vulneráveis, como os trabalhadores rurais (VILLARREAL-CHIU *et al.*, 2007). Alguns herbicidas, incluindo glifosato, podem causar efeitos adversos aos organismos mesmo em concentrações da ordem de microgramas (SINGH; SINGH, 2016).

Os surfactantes, aditivos e diluentes presentes nas formulações de pesticidas são supostamente inertes, mas podem ser agentes ecotóxicos e agir de forma sinérgica com o ingrediente ativo, tornando os produtos comercializados mais tóxicos do que cada substância isoladamente (SZÉKÁCS; DARVAS, 2012). Essa questão impulsionou uma ação contra a Monsanto pelo Advocacia-Geral do Estado de Nova Iorque, em 1996, sob a alegação de que a empresa usava erroneamente no produto formulado Roundup® informações de toxicidade do ingrediente ativo e a empresa foi multada, tendo que retirar dos anúncios do produto as afirmações “ambientalmente amigável” e “biodegradável” (SZÉKÁCS; DARVAS, 2012).

Glifosato transportado para corpos hídricos através do escoamento superficial exibe toxicidade relativamente baixa sobre organismos marinhos não-alvo (MERCURIO *et al.*, 2014). Quando aplicado em águas superficiais para controle de ervas aquáticas, podem ser encontrados resíduos de glifosato na água potável (AMARANTE JR.; SANTOS, 2002). A aplicação de glifosato na agricultura por longo período de tempo aumenta a susceptibilidade das culturas a doenças (ARFARITA *et al.*, 2013) e promove a resistência de ervas daninhas (AMARANTE JR.; SANTOS, 2002).

2.4.1 Efeitos sobre microrganismos

Os organismos presentes nos solos desempenham funções essenciais nestes ecossistemas (SPADOTTO *et al.*, 2004), auxiliando também o pleno desenvolvimento dos cultivos agrícolas (ARISTILDE *et al.*, 2017); estas funções podem ser negativamente comprometidas pelo excesso de pesticidas aplicados nas culturas agrícolas, alterando também a quantidade, diversidade e composição de espécies microbianas (SPADOTTO *et al.*, 2004).

Após as primeiras aplicações de pesticidas em determinado solo, é possível observar um processo de seleção de microrganismos capazes de metabolizar determinado composto, com um aumento inicial do número de células, acompanhado de maior atividade de degradação, que se acentua à medida que maior volume do pesticida é aplicado (SPADOTTO *et al.*, 2004). Entretanto, a toxicidade do composto pode afetar a própria microbiota degradadora e contribuir para a ocupação de patógenos resistentes à contaminação daquele solo (SPADOTTO *et al.*, 2004).

Os efeitos potenciais de glifosato sobre microrganismos de solo e seus processos, como a manutenção da estrutura do solo e ciclagem de nutrientes são motivos de real preocupação (RATCLIFF; BUSSE; SHESTAK, 2006). Um dos surfactantes usados nas formulações comerciais, POEA, é considerado tóxico para espécies de bactérias e protozoários (RATCLIFF; BUSSE; SHESTAK, 2006). Glifosato pode alterar os ecossistemas naturais por afetar diferentes componentes da comunidade microbiana do solo (ERMAKOVA *et al.*, 2010), causando mudanças na população microbiana e sua atividade (ARAÚJO; MONTEIRO; ABARKELI, 2003), alterando as funções biológicas e a diversidade funcional deste ambiente (YU *et al.*, 2015). Glifosato tem sido relacionado à inibição da fixação anaeróbica de nitrogênio no solo (AMARANTE JR.; SANTOS, 2002).

Aristilde *et al.* (2017) realizaram um estudo sobre as respostas metabólicas e de crescimento de três espécies bacterianas de laboratório (*Pseudomonas putida* KT2440, *P. putida* S12 e *P. protegens* Pf-5) e uma espécie isolada de solo agrícola (*P. fluorescens* RA12) crescendo em meio com succinato e diferentes concentrações de glifosato. As taxas de crescimento de S12 e KT2440 foram reduzidas em 5 mM de glifosato, mas Pf-5 e RA12 não exibiram qualquer efeito adverso sobre crescimento, nas duas concentrações testadas, demonstrando diferenças de sensibilidade ao herbicida espécie e dose-específicas. O comprometimento da biossíntese *de novo* de aminoácidos aromáticos, em maior grau, triptofano, foi o principal responsável pelos efeitos sobre o crescimento nas diferentes

espécies de *Pseudomonas*. A adição de aminoácidos aromáticos ao meio de cultivo de S12 reverteu a completa inibição do crescimento observada nesta espécie, com taxa similar àquela do cultivo-controle. O perfil metabolômico demonstrou que a suplementação com aminoácidos aromáticos restaurou os níveis intracelulares de muitos metabólitos, além daqueles associados à via do shikimato, sugerindo que os níveis de aminoácidos aromáticos estão conectados ao balanço metabólico de outros aminoácidos e de metabólitos contendo aminoácidos.

Mbanaso *et al.* (2013), Charlesworth *et al.* (2014) e Mbanaso *et al.* (2014) realizaram estudos experimentais para determinar o efeito de herbicidas à base de glifosato (HBG) na retenção de hidrocarbonetos e nos processos de biodegradação que ocorrem em sistemas de pavimentação permeável (SPP), um tipo de sistema de drenagem sustentável. Os resultados indicaram que tais herbicidas prejudicaram a retenção de poluentes: apenas 9,3% dos hidrocarbonetos lançados nos sistemas foram retidos. Estudos anteriores haviam demonstrado que SPP contaminados com óleo mineral retiveram 98,7% dos óleos adicionados e biodegradaram este óleo *in situ* por muitas semanas. Nos sistemas experimentais onde um HBG foi adicionado foram liberados no efluente pelo SPP concentrações muito maiores de metais pesados, como chumbo, cobre e zinco. Os autores sugerem que HBG pode ter a capacidade de lavar substâncias tóxicas através das camadas do SPP, por um longo período de tempo, atingindo águas subterrâneas e colocando em risco o abastecimento público de água potável. Charlesworth *et al.* (2014) afirmam que o surfactante presente nas formulações de HBG pode formar uma emulsão com o óleo de motor facilitando a liberação de metais pesados (<0,01%) associados ao óleo puro. Em geral, o herbicida aumentou a atividade total das comunidades microbianas nos sistemas e teve um efeito estimulante do número de populações de fungos e bactérias, e atuou como fonte de nutrientes para a comunidade microbiana do sistema, especialmente, sustentando as populações bacterianas. Os protistas usados como organismos bioindicadores e também responsáveis pelos processos de biodegradação, foram inicialmente afetados de maneira severa pelo herbicida, mas demonstraram resiliência com rápida recuperação e aumento populacional (MBANASO *et al.*, 2013). Entretanto, a presença do herbicida foi associada com um declínio de riqueza de espécies de *taxa* protistas, contribuindo para a predominância de gêneros protistas mais robustos, cosmopolitas e ubíquos (MBANASO *et al.*, 2013). Os resultados sugerem um comprometimento das capacidades de retenção e biodegradação do SPP devido à aplicação de HBG, resultando em um funcionamento ineficaz do sistema.

O aumento da resistência aos antibióticos pode ser fisiológico ou transitório, ocorrendo como uma resposta adaptativa das espécies quando em ambientes que induzem significativas alterações na expressão gênica, mas que pode desaparecer caso o agente indutor seja removido (KURENBACH *et al.*, 2015). No uso clínico, porém, essa característica pode comprometer o tratamento, uma vez que nos antibiogramas realizados com a bactéria causadora da infecção no paciente, pode ser observada uma susceptibilidade que não se confirma durante a terapia antibiótica (KURENBACH *et al.*, 2015). Os usos urbano e agrícola dos pesticidas pode aumentar a chance de exposição de patógenos humanos a estes compostos, podendo induzir resistência cruzada (KURENBACH *et al.*, 2015). Neste contexto, Kurenbach *et al.* (2015) testaram se a exposição de *E. coli* e *Salmonella typhimurium* a três formulações comerciais de herbicidas, Kamba, 2,4-D e Roundup®, poderia induzir uma resposta alterada aos antibióticos ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, kanamicina e tetraciclina, focando nos efeitos subletais que os pesticidas poderiam causar nos microbiomas ambiental e humano. As respostas variaram de acordo com o herbicida, o antibiótico e a espécie bacteriana, mas apontavam para uma indução de bombas de efluxo e mudanças reversíveis na permeabilidade da membrana. Observou-se que, em alguns ensaios, as taxas de crescimento das cepas diminuíram na presença do herbicida e do antibiótico, mesmo em concentrações inferiores à Concentração Inibitória Mínima (CIM) estabelecida para cada formulação. Em *S. typhimurium*, glifosato aumentou a concentração de kanamicina necessária para atingir a dose letal, elevando também a resistência de *E. coli* à kanamicina, mas aumentou a susceptibilidade à cloranfenicol. As concentrações de antibióticos toleradas por *S. typhimurium* aumentaram em cerca de cinco vezes quando Roundup® foi combinado com ciprofloxacina ou com kanamicina, para o qual, a concentração tolerada aumentou de 6,9 para 40 µg/ml em presença de glifosato, dose normalmente utilizada em linhagens genotipicamente resistentes a kanamicina. Resultados similares foram obtidos com *E. coli*. A resposta ao antibiótico induzida pelo herbicida variou e chegou a ser mais de 3 vezes maior do que o CIM obtido na ausência do pesticida, sem necessidade de exposição prévia aos herbicidas, demonstrando, pela primeira vez, que bactérias expostas simultaneamente a herbicidas e antibióticos podem ter sua susceptibilidade aos antimicrobianos alterada.

Pesticidas que diminuem o CIM de um antibiótico o convertem em uma importante força seletiva em concentrações menores do que normalmente são, um efeito que pode ser mais concentrado em animais de fazenda por conta da pulverização dos herbicidas ou da cadeia alimentar e mais exposições para insetos, solo e microflora vegetal (KURENBACH

et al., 2015). Testar cada composto isoladamente e somente focando nos efeitos severos aos microrganismos, como atualmente são feitas as avaliações de herbicidas, pode subestimar sua função na emergência de fenótipos de resistência a antibióticos (KURENBACH *et al.*, 2015).

2.4.2 Efeitos sobre espécies animais não humanos

A onipresença de glifosato no ambiente devido às atividades antropogênicas e à recalcitrância do composto tem o potencial de afetar o comportamento animal e interferir em processos ecológicos (VILLARREAL-CHIU *et al.*, 2007). Glifosato demonstra atividade tóxica em muitos vertebrados e, por isso, foi classificado pela EPA-USA como classe toxicológica III (SZÉKÁCS; DARVAS, 2012).

Diferente de outros compostos organofosforados, glifosato não afeta o sistema nervoso de animais, mas há evidência de que poderia causar perda de funções enzimáticas em animais, exercendo efeitos adversos em alguns invertebrados do solo, incluindo ácaros (AMARANTE JR.; SANTOS, 2002) e toxicidade para benéficos artrópodes predadores (ARFARITA *et al.*, 2013).

Glifosato é o segundo ingrediente ativo de herbicida mais questionado devido aos seus efeitos deletérios sobre muitos animais, especialmente, anfíbios (SZÉKÁCS; DARVAS, 2012). Peixes e invertebrados aquáticos são os organismos mais sensíveis a glifosato e aos componentes presentes nas formulações comerciais, mas para mamíferos e pássaros a toxicidade é relativamente baixa (AMARANTE JR.; SANTOS, 2002). Contudo, Székács e Darvas (2012) citam uma longa lista de estudos, cujos resultados demonstram os efeitos de glifosato ou Roundup® sobre mamíferos e mesmo répteis.

Em estudo mais recente, uma síndrome chamada disgênese testicular tem sido relacionada a fatores ambientais, indicando que os testículos são um alvo sensível a compostos xenobióticos, obtidos via alimento, água ou ar (CLAIR *et al.*, 2012). Neste contexto, Clair *et al.* (2012) testaram o ingrediente ativo glifosato e sua formulação (Roundup®) em células testiculares (Leydig, Sertoli e células germinativas) maduras frescas de ratos, em concentrações de 1 a 1000 ppm. O pesticida demonstrou impacto endócrino em concentrações ambientais muito baixas, mas somente em alta concentração provocou uma toxicidade testicular aguda em ratos, com a ressalva de que a toxicidade crônica não foi suficientemente testada. Roundup® induziu um colapso das caspases 3/7 de todas as células

testadas, indicando processo de necrose com degradação de membrana, em geral, em um período de 24 horas e glifosato puro promoveu indução de caspases nas células germinativas e na associação destas células com células de Sertoli, provavelmente por uma maior taxa de penetração nas membranas das primeiras células. Demonstrou-se o efeito citotóxico de Roundup® na degradação da membrana celular em dose 1000 vezes menor do que aquela da formulação comercial baseada em glifosato, 10 vezes menor do que as menores diluições de aplicação agrícola e cerca de 8 vezes menor do que o nível máximo de resíduos deste herbicida permitidos na ração geneticamente modificada. Roundup® perturba a membrana celular de mamíferos, possivelmente, por uma redução na fluidez da membrana ou uma alteração do potencial de membrana, mas glifosato puro não o faz, provavelmente pela presença de adjuvantes. Os autores concluem que a sensibilidade geral de todas as células testadas a Roundup® pode ser explicada tanto pela ação combinada de glifosato com os adjuvantes quanto pela maior sensibilidade somente aos adjuvantes. Esses autores afirmaram que a presença de adjuvantes nas formulações comerciais testadas em seu estudo foi decisiva na indução dos efeitos colaterais atribuídos ao herbicida, os quais podem bioacumular nos tecidos vivos por causa destes adjuvantes, reafirmando a necessidade da realização de estudos de toxicidade crônica, pelos órgãos regulatórios, utilizando as formulações comercializadas e não apenas o ingrediente ativo glifosato, pois, em geral, apenas o ingrediente ativo é bem estudado, havendo pouca informação disponível sobre seus metabólitos ou os adjuvantes adicionados às formulações e sua toxicocinética.

Os resultados dos testes *in vitro* também levantaram a possibilidade de que herbicidas baseados em glifosato sejam disruptores endócrinos ambientais, uma vez que podem causar distúrbios nos níveis de testosterona (queda de 35%) e aromatase em células testiculares de ratos em concentrações não tóxicas entre 1 e 10 ppm (CLAIR *et al.*, 2012). Células de Leydig são expostas a doses semelhantes porque 1 ppm de glifosato já foi encontrado em amostras de urina humana e, assim, consequentemente, também em nível sérico, uma vez que tal população celular está muito próxima a vasos sanguíneos (CLAIR *et al.*, 2012).

2.4.3 Efeitos sobre humanos

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera o herbicida glifosato como de toxicidade aguda muito baixa para humanos (AMARANTE JR; SANTOS, 2002), devido ao fato de agir sobre uma via metabólica encontrada somente em plantas e procariotos, mas

sabe-se atualmente que pode impedir algumas funções enzimáticas nos animais (BRITO *et al.*, 2001). Segundo a Agência Química Europeia, glifosato não provou ser carcinogênico, mutagênico ou afetar negativamente a reprodução (redução de fertilidade ou ocorrência de malformações), mas pode causar sérios danos aos olhos e exerce toxicidade sobre a biota aquática, com efeitos de longo prazo (SILVA *et al.*, 2018). Entretanto, a opinião da agência não considera os níveis do pesticida nos diferentes compartimentos ambientais ou a probabilidade de exposição e os riscos associados aos humanos e à vida selvagem, além de não avaliar os efeitos do metabólito AMPA (SILVA *et al.*, 2018).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) classifica glifosato para uso agrícola e domissanitário como classe toxicológica IV e considera a ingestão diária aceitável de 0,042 mg/Kg de peso corporal (ANVISA, 2003), fazendo com que seja reconhecido pela população, especialmente agricultores, como “veneno fraquinho” (LONDRES, 2011). Todavia, esta categorização para os agrotóxicos é estabelecida somente com base nos danos à saúde causados pela exposição aguda aos compostos e não aos efeitos de longo prazo (LONDRES, 2011).

De acordo com a Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos da empresa Nortox, que comercializa herbicidas à base de glifosato, os efeitos agudos e crônicos para seres humanos são dermatite de contato e síndrome tóxica após a ingestão de doses elevadas (epigastria, ulceração ou lesão de mucosa gástrica, hipertermia, anúria, oligúria, hipotensão, conjuntivite, edema orbital, choque cardiogênico, arritmias cardíacas, edema pulmonar não-carcinogênico, pneumonite, necrose tubular aguda, elevação de enzimas hepáticas, aumento da quantidade de leucócitos, acidose metabólica e hipercalemia) (AMARANTE JR.; SANTOS, 2002).

A agência especializada em câncer pertencente à Organização Mundial de Saúde (IARC - *International Agency for Research on Cancer*) avaliou a carcinogenicidade de cinco pesticidas organofosforados, baseadas em abrangentes revisões da literatura científica e relatórios governamentais publicamente disponíveis (IARC, 2015). Como resultado, o herbicida glifosato foi classificado como “provável carcinogênico para humanos”, Grupo 2A, categoria usada quando há limitada evidência de carcinogenicidade em humanos e suficiente evidência de carcinogenicidade em animais experimentais (IARC, 2015). Por “limitada evidência”, compreende-se que uma associação positiva foi observada entre a exposição a um agente e a ocorrência de câncer, mas que outras explicações para as observações, como acaso, viés ou confusão, não podem ser descartadas (IARC, 2015). Segundo a IARC (2015), glifosato já foi detectado no ar durante a aspersão, na água e na

comida humana, sendo a população em geral exposta primariamente através do uso do herbicida em áreas próximas às residências, pelo uso doméstico e pela dieta, mas os níveis de exposição são geralmente baixos.

Conrad *et al.* (2017) analisaram glifosato e AMPA em amostras de urina de 24 horas crio-arquivadas, a fim de elucidar a exposição da população alemã em geral a glifosato e AMPA, ao longo do tempo. As amostras foram provenientes de pessoas de ambos os sexos, com idades entre 20 e 29 anos, sem qualquer exposição específica (ocupacional) a glifosato. Dentre as 399 amostras de urina analisadas, 31,8% continham concentrações de glifosato igual ou acima do limite de quantificação de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$. Para AMPA, 40,1% das amostras apresentou concentração semelhante. As frações de níveis quantificáveis de glifosato e AMPA por ano foram, em geral, maiores nos homens, mas os valores máximos de concentração na urina, de ambos os compostos, foram observados entre as mulheres. Os autores não oferecem uma explicação para o fenômeno, mas sugerem que pode haver diferença no padrão de exposição entre os gêneros ou diferenças nos determinantes fisiológicos de glifosato e AMPA na urina. Contra as expectativas dos autores, os níveis dos compostos não foram maiores na urina de participantes com dietas vegetarianas/vegas. A ingestão diária aceitável para glifosato é de $0,05 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, segundo a Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (ASAE) e considerando tal valor, nenhuma concentração do herbicida medida neste estudo é problemática para a saúde humana.

Acquavella *et al.* (2004) conduziram um estudo de biomonitoramento na Carolina do Sul e Minnesota, Estados Unidos, avaliando exposições a pesticidas, incluindo glifosato, entre trabalhadores rurais, suas esposas e filhos, antes, durante e depois da aplicação dos compostos. Os autores relataram que 60% dos trabalhadores rurais tiveram níveis detectáveis de glifosato em sua urina no dia da aplicação, com média geométrica cinco vezes maior em aplicadores que disseram não usar luvas para manusear o produto. Entre as crianças, 12% apresentaram níveis detectáveis de glifosato na urina, os quais auxiliaram seus pais na aplicação do produto. Contudo, todos os valores urinários encontrados foram inferiores às doses de referência permitidas pela EPA-USA. Os autores do estudo enfatizam a importância de incorporar nas caracterizações de exposição a duração e frequência do uso dos pesticidas, além do tipo de formulação do pesticida, pois propriedades físico-químicas específicas, formulações e práticas de aplicação de cada composto leva a diferentes propriedades toxicocinéticas, afirmando ainda que avaliações de exposições genéricas provavelmente conduzem a erros de classificação da exposição, mas que dados de biomonitoramento podem aumentar a validade das análises.

Gasnier *et al.* (2009) compararam as ações, em diferentes vias enzimáticas e “endpoints” celulares, em células hepáticas humanas da linhagem HepG2, de quatro formulações comerciais do herbicida Roundup, contendo 7,2, 360, 400 e 450 g.L⁻¹ de glifosato, além do próprio ingrediente ativo puro usado como controle. Os autores concluíram que herbicidas baseados em glifosato apresentam danos ao DNA e efeitos citotóxicos, mutagênicos e reprotóxicos em células e *in vivo*, e que, a ação direta de glifosato é provavelmente ampliada por vesículas formadas pelos adjuvantes ou substâncias similares a detergentes (os quais podem também estar presentes como contaminantes em corpos d’água) que permitem a penetração celular, estabilidade e possivelmente muda sua biodisponibilidade e, assim, seu metabolismo.

O efeito sinérgico de glifosato e dos surfactantes presentes nas formulações comerciais têm revelado atividade de disrupção endócrina e os maiores efeitos adversos potenciais foram reportados para as formulações comerciais de glifosato (THONGPRAKAISANG *et al.*, 2013). Já foram demonstrados efeitos sinérgicos entre glifosato e estrógeno (17 β -estradiol ou E2), os quais são mais frequentes com as formulações baseadas em glifosato do que com o ingrediente ativo puro (THONGPRAKAISANG *et al.*, 2013).

Thongprakaisang *et al.* (2013) avaliaram os efeitos estrogênicos de glifosato puro em várias concentrações, desde aquelas encontradas nas condições ambientais àquelas as quais humanos são expostos, investigando os efeitos estrogênicos e/ou antiestrogênicos de glifosato e comparando-os com o estrógeno endógeno em células humanas de câncer de mama dependentes de estrógeno T47D, além dos efeitos interativos de glifosato e genisteína, um fitoestrógeno encontrado na soja. Os resultados indicaram que glifosato possui atividade estrogênica em concentrações baixas e ambientalmente relevantes, sugerindo ainda a existência de um efeito estrogênico aditivo entre glifosato e genisteína. A habilidade de glifosato em estimular a regulação positiva da expressão proteica dos receptores de estrogênio sugere que o herbicida pode exercer efeitos estimulantes através de um mecanismo dependente de tais receptores, com os quais glifosato pode interagir em uma região polar do sítio de ligação. Os autores sugerem que o herbicida se comporta como um xenoestrógeno fraco, ativando os diferentes subtipos de receptores de estrógeno em momentos distintos, mas ressaltam que estudos *in vivo* com modelo animal são necessários para produzir evidências fisiológicas mais relevantes.

Mink *et al.* (2012) publicaram uma revisão da literatura epidemiológica a fim de avaliar se a exposição a glifosato está associada de forma causal com o risco de câncer em

humanos. Foram revisados sete estudos de coorte e 14 estudos de caso-controle, realizados a partir de dados da população do Estudo Agrícola de Saúde (EAS), dos Estados Unidos. Nenhum dos estudos de coorte ou de caso-controle do EAS relatados apresentou associações positivas estatisticamente significantes para exposição a glifosato e câncer em adultos e crianças, concluindo que dados epidemiológicos não apoiam relações causais sobre o uso do herbicida e esta doença, todavia, a validade de tais estudos depende em grande parte da habilidade em quantificar corretamente e classificar a exposição individual (MINK *et al.*, 2012). Contudo, todos os estudos epidemiológicos foram observacionais e propensos a vieses, confusão e/ou erros de medição, os quais são um problema comum neste tipo de estudo (MINK *et al.*, 2012). Além disso, a causalidade pode não ser inferida diretamente de estudos observacionais individuais e exige a consideração da literatura disponível; as potenciais associações entre glifosato e os vários tipos de cânceres tem sido estabelecidas em apenas um estudo, impossibilitando a determinação da consistência dos resultados através do cruzamento de vários estudos (MINK *et al.*, 2012).

2.5 Contaminação ambiental

Uma evidência impressionante da persistência ambiental generalizada dos pesticidas é que cerca de metade das substâncias detectadas foram retiradas do mercado há muito tempo e outros 10 a 20% delas são produtos de transformação estáveis (FENNER *et al.*, 2013). Resíduos de pesticidas são encontrados em concentrações relativamente altas em amostras de solo, atmosfera e ambiente aquático, especialmente os compostos organoclorados e organofosforados (CARVALHO, 2006), em concentrações da ordem de ng.L^{-1} ou $\mu\text{g.L}^{-1}$ (FENNER *et al.*, 2013). Estima-se que apenas 0,1% do volume de herbicidas aplicado cheguem até a espécie-alvo, ao passo que o restante do produto pode alcançar diferentes organismos e compartimentos ambientais (UETA; SHUHAMA; CERDEIRA, 2001).

Todas as atividades realizadas na superfície dos solos podem, potencialmente, afetar os reservatórios de água superficiais e subterrâneos, e o uso de agroquímicos é um fator de grande relevância para a contaminação das águas (BARRIGOSI; LANNA; FERREIRA, 2004).

O escoamento superficial pode transportar ativamente pesticidas móveis para reservatórios de água superficiais, tanto por processos erosivos ou em solução na água,

enquanto a lixiviação permite a infiltração destes compostos para reservatórios de água subterrâneos, possibilitando o fluxo constante dos mesmos para águas subterrâneas mesmo em locais distantes do ponto de aplicação (SPADOTTO *et al.*, 2004; BENNER *et al.*, 2013). Águas superficiais pertencentes a bacias hidrográficas com usos do solo agrícola e urbano contêm grande número de pesticidas e seus produtos de transformação, os quais colocam os organismos aquáticos em risco, mesmo em concentrações de ng.L^{-1} (MOSCHET *et al.*, 2014).

A contaminação de águas subterrâneas é um problema “escondido”, uma vez que os reservatórios não estão visualmente expostos, diferente dos solos, mas sua escala de importância merece consideração, pois mais de 2 bilhões de pessoas dependem diretamente dos aquíferos para abastecimento de água e 40% dos alimentos no mundo são produzidos com irrigação proveniente majoritariamente de águas subterrâneas (GILLESPIE; PHILP, 2013). Pesticidas têm sido frequentemente detectados em águas subterrâneas em concentrações superiores aos limites máximos estabelecidos pela União Europeia (MBANASO *et al.*, 2013).

O Brasil passou a utilizar agrotóxicos em larga escala a partir da década de 1970 e, desde 2008, o país atingiu o posto de maior mercado consumidor de agrotóxicos do mundo (GOMES; BARIZON, 2014). O Estado de São Paulo é o maior consumidor brasileiro de agrotóxicos, representando um quinto do faturamento total dos agrotóxicos vendidos no Brasil, em 2006, com a classe dos herbicidas contribuindo com 43,1% das vendas de pesticidas (CETESB, 2010).

O registro de agrotóxicos pelos órgãos reguladores brasileiros exige diversos dados físico-químicos, ambientais e toxicológicos que, todavia, não se mostram suficientes para dirimir todas as dúvidas acerca dos impactos dos pesticidas sobre a saúde humana e proteção do meio ambiente (GOMES; BARIZON, 2014). Países desenvolvidos, incluindo União Europeia, Estados Unidos e Canadá, possuem leis que restringem o uso de agroquímicos, exigindo mais testes toxicológicos e reduzindo os limites de tolerância dos resíduos nos alimentos e água, porém, países em desenvolvimento precisam aumentar sua produção agrícola e o uso de produtos químicos se apresenta como a alternativa de escolha (CARVALHO, 2006). Gomes e Barizon (2014) afirmaram que resíduos de agrotóxicos são frequentemente detectados nos monitoramentos realizados nas diferentes regiões do Brasil, ainda que encontrados em concentrações abaixo dos valores críticos estabelecidos por agências ambientais da Europa e Estados Unidos.

A legislação brasileira para qualidade da água potável define padrões toxicológicos individuais para um reduzido número de agrotóxicos, permitindo uma carga de até 1 mg.L⁻¹ de pesticidas nas águas de abastecimento público, o que equivale à presença de 22 moléculas em uma mesma amostra de água, desde que as concentrações individuais de cada uma delas não exceda os limites estabelecidos. Na Comunidade Europeia, o padrão de potabilidade permite a presença de até 0,1 µg.L⁻¹ por composto e 0,5 µg.L⁻¹ para a soma de todos os agrotóxicos (DE ARMAS *et al.*, 2007).

De acordo com o padrão de potabilidade europeu, os resíduos de agrotóxicos não são eficientemente removidos das águas de abastecimento público pelos processos convencionais de tratamento (DE ARMAS *et al.*, 2007). Existe uma clara necessidade de utilização de processos de tratamento avançado para ajudar a remover totalmente os micropoluentes das águas de abastecimento público, tais como técnicas de oxidação avançada ou adsorção, mais eficazes para alcançar os parâmetros de qualidade da água potável, mas que apresentam maior custo e não são ambientalmente sustentáveis (BENNER *et al.*, 2013).

2.5.1 Glifosato no ambiente

A estabilidade termodinâmica dos fosfonatos, derivada da presença da ligação C-P, torna estes compostos persistentes nos compartimentos ambientais, permitindo que efluentes de estações de tratamento de esgoto contendo fosfonatos cheguem aos corpos hídricos em grande quantidade (STUDNIK *et al.*, 2015). Uma combinação de toxicidade, persistência e ampla ocorrência tornam os fosfonatos um significativo perigo ambiental (SVIRIDOV *et al.*, 2012).

No ambiente, glifosato e seu metabólito AMPA são detectados em maiores concentrações no solo (AMARANTE JR.; SANTOS, 2002), no qual acumulam na camada superficial (10-15 cm), onde ele é acessível aos microrganismos degradadores (SVIRIDOV *et al.*, 2015). Porém, a intensidade de biodegradação de glifosato pela comunidade microbiana do solo é baixa, tornando a degradação natural do pesticida nos solos contaminados um processo longo e aumentando o risco de migração e acúmulo de glifosato para camadas mais profundas do solo (ERMAKOVA *et al.*, 2010), devido à ausência ou grande redução da população microbiana nestas camadas (SHUSHKOVA *et al.*, 2010; SVIRIDOV *et al.*, 2015). Considerar o destino de glifosato nos solos implica observar suas

taxas de adsorção, degradação e lixiviação (SZÉKÁCS; DARVAS, 2012), as quais variam significativamente a depender da composição e propriedades do solo exposto (BORGGAARD; GIMSING, 2008).

Os resíduos de glifosato presentes em águas de drenagem não necessariamente contaminam águas subterrâneas, porque pode haver degradação do herbicida em camadas mais profundas do solo, mas quando dissolvidos na água de drenagem correrão para as águas superficiais, somando-se aos resíduos transportados pelo escoamento superficial (possivelmente da mesma maneira que ocorre com o fosfato) (BORGGAARD; GIMSING, 2008).

De forma crescente, tem surgido evidências de movimentação de glifosato dentro dos ecossistemas aquáticos (VILLARREAL-CHIU *et al.*, 2007; MERCURIO *et al.*, 2014). Glifosato, seu adjuvante POEA e seu metabólito AMPA são os maiores contaminantes de águas superficiais e águas subterrâneas (CLAIR *et al.*, 2012).

2.5.2 Estudos sobre presença de glifosato nos compartimentos ambientais

Glifosato e AMPA podem viajar longas distâncias e serem lavados da atmosfera pela chuva (LUPI *et al.*, 2015). Quaghebeur *et al.* (2004), Chang *et al.*, (2011), Battaglin *et al.* (2014) e Silva *et al.* (2018) demonstraram a presença de glifosato e AMPA em amostras de ar e água de chuva coletadas em diferentes localidades, adsorvidos a partículas de solos movimentadas pelo vento ou pela água. Apesar de glifosato supostamente ser rapidamente degradado na atmosfera por oxidação fotoquímica, os resultados dos estudos citados demonstram que o herbicida e seu metabólito podem permanecer na atmosfera e serem redistribuídos na superfície terrestre pela chuva, possivelmente contaminando solos e corpos hídricos (SILVA *et al.*, 2018).

Kolpin *et al.* (2006) analisaram a ocorrência de glifosato e AMPA em amostras de água de 29 córregos e 11 estações de tratamento de esgotos (ETEs) coletadas em vários estados norte-americanos durante o ano de 2002. Os resultados demonstram uma aparente contribuição dos efluentes das ETEs nas concentrações de glifosato e AMPA detectadas nos córregos, com aumento de duas vezes na frequência de detecção entre as amostras coletadas a montante e a jusante das ETEs. AMPA e glifosato foram detectados em, respectivamente, 67,5% e 17,5% das amostras, porém em baixas concentrações, com poucas exceções. A fim de verificar a origem do glifosato encontrado nas amostras de água analisadas, os autores

também examinaram a presença do inseticida de uso urbano diazinon e do herbicida de uso agrícola atrazina nas mesmas amostras. Os resultados apontaram tendências de detecção comparáveis entre glifosato e AMPA e o inseticida diazinon, com 72,7% das detecções em amostras coletadas nas estações de tratamento de esgotos, demonstrando que o uso urbano contribui para a presença de glifosato em córregos nos Estados Unidos. Os autores afirmaram que AMPA tem maior mobilidade e é mais persistente do que glifosato e ambos apresentaram maior persistência e mobilidade em ambientes aquáticos do que havia sido demonstrado em estudos anteriores.

Struger; Van Stempvoort; Brown (2015) analisaram 52 amostras de água superficial coletadas em 10 córregos localizados ao sul de Ontário, Canadá, região na qual glifosato é amplamente usado como herbicida nos meios rural e urbano, onde ETEs estão presentes e frequentemente lançam seus efluentes em córregos e rios. Os resultados mostraram que 75% das amostras apresentaram concentrações detectáveis de glifosato e AMPA, na faixa de dezenas a centenas de ng.L^{-1} , indicando que as aplicações do herbicida em grandes centros urbanos e ao longo das linhas férreas e canteiros centrais das rodovias também contribuem para as concentrações relativamente altas de glifosato e AMPA em águas superficiais no Canadá.

Entre os pesticidas mais utilizados em território brasileiro, EMBRAPA (2007) avaliou 145 princípios ativos em relação ao potencial de lixiviação para reservatórios de águas subterrâneas e o potencial de transporte dos mesmos para águas superficiais e subterrâneas, associados ao sedimentos ou dissolvidos em água, utilizando o Índice de GUS (GUSTAFSON, 1989) e o Método de GOSS (GOSS, 1992), índices matemáticos utilizados internacionalmente em simuladores de sistemas. De acordo com tais índices, glifosato apresenta alto potencial de transporte em água, tanto dissolvido quanto associado ao sedimento, mas não sofre processo de lixiviação para águas subterrâneas.

Conclusões semelhantes foram obtidas por Britto *et al.* (2012) em estudo no rio Poxim, em Aracajú/Sergipe; por Brito *et al.* (2001) em culturas de coqueiros e eucaliptos no Nordeste brasileiro; por Marques *et al.* (2003) na região da represa de Boa Esperança, entre os estados do Maranhão e do Piauí, no Nordeste brasileiro; e por Rosa; Pinheiro; Silva (2007) nos cultivos agrícolas do Alto Vale do Itajaí, Santa Catarina. Tais autores concluíram que a qualidade da água nas bacias e sub-bacias hidrográficas estudadas está sendo influenciada pelo uso de herbicidas, ocorrendo um aumento nas concentrações dos mesmos encontrados na água superficial durante o período chuvoso, provavelmente decorrente do escoamento superficial. Afirmando ainda que o risco de contaminação dos corpos hídricos

por glifosato (em conjunto com outros compostos avaliados) não podem ser negligenciados e exigem programas de monitoramento.

Glifosato pode permanecer inalterado no solo por variados períodos de tempo em virtude de sua adsorção a partículas de argila e matéria orgânica presentes no solo, tornando-o persistente neste compartimento assim como nos sedimentos em leitos de rios e córregos (ARFARITA *et al.*, 2013).

2.6 Biodegradação

Existem diversos processos de tratamento para remoção de pesticidas dos compartimentos ambientais como a biodegradação, fotodegradação, oxidação, floculação e filtração, técnicas de adsorção e de membrana, dentre outras (NOUROUZI *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2015). Entretanto, a degradação é o único processo que de fato remove pesticidas do ambiente (FENNER *et al.*, 2013).

A biorremediação se refere ao uso de processos biológicos para limpeza de solos e águas contaminados, em geral, águas subterrâneas, configurando-se como uma tecnologia sustentável, indo muito além de abordagens genéticas ou enzimáticas, mas também fisiológicas e, especialmente, ecológicas (GILLESPIE; PHILP, 2013), que pode ser conduzida *in situ*, em uma área contaminada, ou *ex situ*, fora da área a ser remediada ou em biorreatores (ANGELIM *et al.*, 2013). A biorremediação de compostos tóxicos é uma tecnologia relativamente nova, com baixo custo relativo (DERBALAH; ISMAIL; SHAHEEN, 2013), atrativa no contexto da bioeconomia, mas que apresenta limitações em escala de campo, além da baixa aceitação por parte das autoridades regulatórias (COMPERNOLLE; VAN PASSEL; LEBBE, 2013; GILLESPIE; PHILP, 2013). Esta abordagem pode ser usada para ajudar a remover totalmente os micropoluentes das águas de abastecimento público pelo emprego de processos biologicamente ativos nas estações de tratamento de água usando linhagens isoladas ou consórcios microbianos com habilidade para degradar parcialmente ou mineralizar micropoluentes-alvo (BENNER *et al.*, 2013).

O processo de biodegradação consiste em tratamentos biológicos que empregam a capacidade metabólica dos microrganismos para transformar poluentes orgânicos em compostos inofensivos ou menos perigosos (NOUROUZI *et al.*, 2011) e é o termo recomendado para a biotransformação propriamente dita de um composto levando a perdas de algumas de suas propriedades químicas (biodegradação primária) ou formando produtos

reduzidos ou oxidado como dióxido de carbono e água (biodegradação final) (KOLVENBACH *et al.*, 2014).

Bactérias estão constantemente adaptando vias metabólicas preexistentes contra alvos móveis tanto para utilizá-los como fontes de carbono, energia e nutrientes quanto para detoxificá-los, explorando uma ampla variedade de mecanismos para este fim (KOLVENBACH *et al.*, 2014). Muitas linhagens bacterianas têm sido isoladas demonstrando capacidade de usar micropoluentes específicos como substrato para seu crescimento, convertendo tais compostos a biomassa, CO₂, água e substâncias inertes (BENNER *et al.*, 2013). Ainda não está claro quais são as funções fisiológicas originais das enzimas responsáveis pela transformação de compostos xenobióticos e como novas funções evoluem, a ponto de degradar substâncias químicas novas, recém-lançadas pela indústria (KOLVENBACH *et al.*, 2014).

A complexidade do ambiente impossibilita a predição precisa, *in situ*, da atividade metabólica, adaptabilidade e competência ecológica de microrganismos que apresentaram excelentes resultados de degradação de poluentes sob condições laboratoriais (ANGELIM *et al.*, 2013). A introdução de espécies bacterianas exógenas exige muito cuidado, pois tais microrganismos precisam encontrar um nicho onde possam se desenvolver neste novo ambiente, competindo com a comunidade já presente e buscando os nutrientes necessários para sua sobrevivência (KRYUCHKOVA *et al.*, 2014). Além disso, a aplicação prática de microrganismos requer um estudo rigoroso da regulação de sua atividade degradativa, pois fatores que afetam o metabolismo das espécies como fontes adequadas de nutrientes e condições de cultivo resultam em maior eficiência de degradação do poluente e acúmulo de biomassa ativa (SHUSHKOVA *et al.*, 2012).

As espécies microbianas utilizadas em processos de biorremediação precisam possuir propriedades fisiológicas e bioquímicas bastante específicas como baixa toxicidade, não ser patogênico, alta viabilidade logo após a introdução no ambiente contaminado, mas baixa taxa de sobrevivência a longo prazo, alta eficiência na degradação do composto poluente, independente das condições externas, sendo muito raro um organismo que apresente todas essas características simultaneamente (SVIRIDOV *et al.*, 2015).

Um pré-requisito essencial para avaliar o potencial de biodegradação de um compartimento ambiental é entender a composição da comunidade microbiana (HELBLING, 2015), cuja relevância em processos de biorremediação é bastante reconhecida (GILLESPIE; PHILP, 2013). A quantidade e diversidade de microrganismos são fundamentais para os processos metabólicos nos ambientes (DE ANDRÉA *et al.*, 2003).

Neste sentido, a biorremediação de locais contaminados é muito mais complexa do que o processo de biodegradação em si e não permite abordagens reducionistas, como um composto, uma linhagem ou uma via (GILLESPIE; PHILP, 2013). A extensão do processo de biodegradação dos pesticidas por organismos específicos é determinada por vários fatores, dentre eles, destacam-se a competição por tais substratos com a microbiota residente, mas mantendo sua atividade de biodegradação, e o rendimento metabólico de todos os organismos presentes no meio (HELBLING, 2015).

Até recentemente, o acúmulo de glifosato e AMPA nos compartimentos ambientais não era considerado um sério problema ecológico (SVIRIDOV *et al.*, 2015). Contudo, com o surgimento de evidências da toxicidade do herbicida para organismos vivos, estudos envolvendo a biorremediação dos ambientes contaminados passaram a ser desenvolvidos em grande número e a questão ganhou crescente relevância (SVIRIDOV *et al.*, 2015).

A degradação de glifosato está diretamente relacionada à biomassa e atividade metabólica dos microrganismos do solo (ARAÚJO; MONTEIRO; ABARKELI, 2003), pois o herbicida pode ser resistente a métodos físico-químicos como a degradação química, hidrolítica e fotolítica (YU *et al.*, 2015). Nos ambientes limnológicos, glifosato (e outros fosfonatos) pode sofrer ação da luz UV e ser convertido em AMPA, processo conhecido como fotodegradação, o qual, de fato, tem pouca importância na degradação do herbicida nos ambientes naturais (VILLARREAL-CHIU *et al.*, 2007). No caso de estações de tratamento de esgoto, processos de adsorção e precipitação são até mais eficazes para remover fosfonatos do que a degradação biológica, porém, tais processos físico-químicos não transformam tais moléculas, permitindo que estes compostos permaneçam inalterados no lodo ativado (STUDNIK *et al.*, 2015). Uma importante vantagem da biodegradação é a utilização completa de glifosato, evitando o acúmulo de AMPA, que é tóxico, ou outros intermediários (SVIRIDOV *et al.*, 2015).

Desde que passou a ser utilizado como herbicida, glifosato tem demandado muitos esforços para compreender as bases de sua biodegradação, através do isolamento de espécies que demonstrem essa habilidade e os primeiros relatos desse processo datam de meados da década de 1970 (WANNER, 1994). O sucesso comercial do herbicida impulsiona muitos estudos sobre sua biodegradação, especialmente por microrganismos do solo (ARFARITA *et al.*, 2013). Com raras exceções, até o fim da década de 1990, não haviam relatos de isolamento de uma cepa microbiana capaz de utilizar glifosato constitutivamente em culturas puras (FORLANI *et al.*, 1999). Atualmente, muitas linhagens bacterianas têm demonstrado habilidade em quebrar a ligação fosfônica de vários fosfonatos simples, como

o glifosato, contudo, a biodegradação é dependente da concentração do composto para sua absorção e metabolismo (STUDNIK *et al.*, 2015).

Por conta de sua toxicidade em organismos não-alvo, faz-se necessário descontaminar solos que receberam aplicações de glifosato e a biorremediação é uma ferramenta útil e eficaz, cujo sucesso depende do isolamento de microrganismos com capacidade de degradar o herbicida em ambientes em constante mudança (MONEKE; OKPALA; ANYANWU, 2010). A própria aplicação de glifosato nos ambientes rural e urbano pode produzir uma seleção artificial que estimula a sobrevivência de bactérias capazes de utilizar o herbicida em seu metabolismo (VILLARREAL-CHIU *et al.*, 2007; KRYUCHKOVA *et al.*, 2014).

2.6.1 Evidências de biodegradação de glifosato

Uma vez que os genes das vias de degradação de glifosato fazem parte do regulon PHO, acredita-se que o herbicida seja utilizado como uma fonte alternativa de fósforo prioritariamente em relação a outros macronutrientes (WANNER, 1994). Até o momento, os estudos de biodegradação têm demonstrado que glifosato é usado principalmente como fonte de fósforo (HOVE-JENSEN; ZECHEL; JOCHIMSEN, 2014), porém, há relatos do uso de glifosato como fonte de carbono (NOUROUZI *et al.*, 2011). A despeito de como possa ser utilizado pelos microrganismos, a liberação de nutrientes pela degradação do herbicida pode causar eventos de eutrofização quando os mesmos infiltram em aquíferos ou são liberados em águas superficiais (MBANASO *et al.*, 2014).

O primeiro relato de isolamento de uma bactéria, *Pseudomonas* sp. PG2982, capaz de crescer em glifosato como única fonte de fósforo data do início da década de 1980 (PIPKE *et al.*, 1987). Desde então, organismos como *Sinorhizobium meliloti*, *Ochrobactrum anthropi*, *Agrobacterium radiobacter*, *Burkholderia pseudomallei* e *Nostoc* sp. PCC7120 também se mostraram capazes de utilizar glifosato para o mesmo fim (HOVE-JENSEN; ZECHEL; JOCHIMSEN, 2014).

Muitos trabalhos já foram desenvolvidos no sentido de avaliar a capacidade de mineralização de glifosato por bactérias, em diferentes compartimentos ambientais, além de investigações sobre em que condições esse processo ocorre e quais as vias metabólicas requisitadas para degradação do herbicida.

Alguns estudos realizados demonstraram que glifosato pode ter um efeito positivo sobre a comunidade microbiana exposta aumentando sua atividade metabólica, especialmente para aquelas espécies com maior tempo de exposição ao herbicida. Araújo; Monteiro; Abarkeli (2003) avaliaram os efeitos de glifosato sobre a atividade microbiana em dois tipos de solo, com e sem histórico de aplicação do herbicida. Solos que haviam sido previamente expostos por muitos anos apresentaram uma resposta mais intensa na atividade microbiana, além de liberarem maior volume de CO₂, demonstrando que a microbiota do solo foi capaz de usar glifosato como fonte de carbono e a maior produção de CO₂ foi relacionada à decomposição de glifosato. Os autores afirmam que houve efeitos positivos diretos e indiretos de glifosato sobre a atividade microbiana, estimulando-a rapidamente. A contagem dos microrganismos mostrou um aumento do número de actinomicetos e fungos, sugerindo que estes organismos podem usar glifosato como uma fonte de nutrientes e energia, e uma leve queda na quantidade de bactérias, especialmente bactérias viáveis, cujo número diminuiu após aplicação de glifosato. AMPA foi detectado em todas as amostras de solo após 32 dias de incubação em quantidades cerca de 1,5 vezes maior em solos coletados a partir de locais previamente expostos ao herbicida.

Andrighetti *et al.* (2014) avaliaram a capacidade de biodegradação de glifosato pela microbiota de solos de pomares de macieira, em Vacaria/RS, sujeitos a diferentes períodos de exposição ao herbicida (1, 7, 15, 23, 29 anos e solos sem exposição). A maior taxa de degradação foi observada no solo com 1 ano de aplicação, onde 98,5 % do glifosato foi degradado, enquanto a menor taxa, 51,8%, foi observada no solo exposto ao herbicida há 29 anos, demonstrando a importância do tempo de contato com o herbicida em relação à atividade microbiana, mas que um longo período de aplicação de glifosato pode ter efeito deletério sobre a comunidade microbiana dos solos em termos de atividade metabólica. Glifosato promoveu queda na quantidade de bactérias ao longo do período de incubação, porém, nas amostras de solo exposto ao herbicida há 29 anos observou-se a manutenção da população bacteriana. De maneira geral, glifosato induziu um aumento significativo da atividade microbiana nas amostras de solo, mais evidente naquelas provenientes de solos expostos a glifosato antes da aplicação experimental, especialmente aqueles cujas aplicações se iniciaram há menos tempo.

Em oposição, Ermakova *et al.* (2010) observaram que glifosato exerceu efeito inibitório sobre o desenvolvimento da comunidade microbiana autóctone em solos contaminados, promoveu um declínio na atividade metabólica do complexo microbiano e redução significativa da biomassa de bactérias saprofíticas e, mais fortemente, de fungos.

De Andréa *et al.* (2003) avaliaram o efeito de repetidas aplicações de glifosato no solo sobre sua dissipação e sobre a comunidade microbiana. A concentração de ^{14}C -glifosato aplicada no solo foi imediatamente mineralizada desde a primeira aplicação, sugerindo que microrganismos do solo são capazes de utilizar o herbicida prontamente como fonte de carbono, mas a taxa de mineralização caiu significativamente com o aumento do número de aplicações. Glifosato mostrou pequena persistência no solo, mas a meia-vida de mineralização total do composto aumentou com o número de aplicações.

Lancaster *et al.* (2010) estudaram o efeito de 1 a 5 aplicações de glifosato sobre a composição da comunidade microbiana do solo. Foram observadas diferenças significativas entre amostras de solos tratados e não tratados com glifosato em relação à abundância da classe β -Proteobacteria e da ordem Burkholderiales. A média de recuperação de resíduos mineralizados foi de 85,4% em solos tratados com apenas uma aplicação do herbicida, indicando que um processo mais lento de mineralização ocorre à medida que mais doses de glifosato são utilizadas. Os resultados demonstraram que a degradação de glifosato pode estar relacionada ao metabolismo ligado ao crescimento e que os microrganismos foram mais hábeis em utilizar glifosato para este fim quando foram previamente expostos ao herbicida. Repetidas aplicações de um pesticida podem exercer grande impacto na comunidade microbiana do solo, ao contrário do que se observa com uma única aplicação (como se faz na maioria dos estudos), promovendo mudanças na dissipação e distribuição de glifosato, associada com alterações na composição da comunidade microbiana do solo, e um aumento na população das espécies capazes de metabolizar o herbicida (LANCASTER *et al.*, 2010).

Moneke; Okpala; Anyanwu (2010) isolaram bactérias que utilizam glifosato a partir de solos de cultivos de arroz. Concentrações crescentes do herbicida promoveram um declínio no crescimento dos isolados, os quais, foram capazes de tolerar doses de até 250 mg do herbicida.ml⁻¹. De acordo com os autores, a alta capacidade das linhagens em utilizar glifosato *in vitro* pode ser atribuída ao seu prévio contato com o composto nos campos de arroz ou ainda que os organismos tenham sofrido mutação genética aumentando sua adaptabilidade ao microambiente, sugerindo a presença de novos sistemas degradativos nos organismos.

Nourouzi *et al.* (2011) investigaram o potencial de degradação de glifosato por bactérias mistas isoladas em lodo ativado e em solos de plantações de óleo de palma, testando a capacidade de tais linhagens em utilizar glifosato como fonte de carbono, em meio aquático. Comparando os resultados obtidos com as bactérias oriundas do solo e do

lodo ativado, os autores concluíram que ambas foram capazes de converter quase todo glifosato (99,5%) em AMPA e apenas 2% deste metabólito foi convertido em outros produtos. Em cultivos isolados, cada linhagem mostrou-se capaz de utilizar glifosato como fonte de carbono. Os autores consideraram que a remoção de glifosato nos experimentos ocorreu sem uma significativa fase *lag*, ou aclimação, fato que pode ser atribuído à exposição prévia ao herbicida das bactérias oriundas das amostras de solo.

Yu *et al.* (2015) investigaram a capacidade de degradação de glifosato por *Bacillus subtilis* Bs-15 e seu uso potencial para biorremediação de solos poluídos com compostos organofosforados. Como resultado, observaram que a sobrevivência da linhagem diminuiu com o aumento da concentração de glifosato, mas foi capaz de tolerar uma dose de 40 g.L⁻¹ do herbicida em subculturas sucessivas, ou seja, de forma permanente. Ao final do experimento, a taxa de degradação medida foi de 66,35%, mas chegou a cerca de 72% quando Bs-15 foi adicionada a solos contendo a comunidade microbiana autóctone, demonstrando que a cepa introduzida foi capaz de aumentar a remoção do herbicida, mas o fez mais eficientemente na presença de outras espécies microbianas.

Zhao *et al.* (2015) investigaram a biorremediação, sob condições de laboratório, de solos contaminados com glifosato por linhagens bacterianas capazes de utilizar o herbicida como fonte de carbono, isoladas de solos expostos ao composto. *Pseudomonas* sp. linhagens GA07, GA09 e GA04 demonstraram alta eficiência de degradação de glifosato e elevada taxa de crescimento específico. A inoculação das três linhagens em amostras de solos contendo glifosato aumentou em 2 a 3 vezes a taxa de remoção do herbicida em relação às amostras não inoculadas, indicando que houve um efeito sinérgico positivo com a comunidade microbiana autóctone para degradação de glifosato. O desenvolvimento da comunidade microbiana do solo foi inibido após a adição do herbicida, causando uma redução de 50% na atividade metabólica dos microrganismos, que foi recuperada após o consumo de glifosato pelas bactérias introduzidas.

2.7 Indução de resposta severa

Para sobreviverem, os microrganismos precisam se adaptar a condições de estresse ambiental (CHATTERJI; OJHA, 2001) e as bactérias evoluíram múltiplos mecanismos celulares regulatórios (BRAEKEN *et al.*, 2006).

Quando a deficiência de nutrientes passa a limitar o crescimento das células de *E. coli*, são feitos ajustes na expressão gênica de forma a permitir prolongada sobrevivência na fase estacionária (TRAXLER *et al.*, 2008), recrutando a chamada **resposta severa**, a qual conserva energia e influencia uma cascata de eventos requeridos para a adaptação bacteriana à deficiência de nutrientes (CHATTERJI; OJHA, 2001). Os gatilhos precisos da resposta severa parecem variar de espécie para espécie e acredita-se que tais diferenças nos gatilhos reflitam adaptações aos distintos estilos de vida de cada espécie (HAURYLIUK *et al.*, 2015).

A resposta severa é uma resposta global ao estresse nutricional que interrompe os processos de crescimento e torna os recursos disponíveis para a célula remediar as consequências de tal estresse (TRAXLER *et al.*, 2008). Neste estado fisiológico, as células rapidamente inibem a síntese de RNA estável (ribossomal e de transferência), ribossomos e proteínas (POTRYKUS; CASHEL, 2008; DALEBROUX; SWANSON, 2012), realizando grandes ajustes tanto na expressão gênica, através de controle direto da reação de transcrição (CASHEL; GALLANT, 1969), quanto da atividade fisiológica (NYSTRÖM, 1994). A reestruturação metabólica leva a um fluxo metabólico reverso para a reassimilação do carbono previamente alocado em moléculas de forma a utilizá-los na síntese de nucleotídeos, ácidos graxos e aminoácidos (TRAXLER *et al.*, 2008).

A resposta severa causa uma regulação negativa em larga escala do aparato de tradução, uma vez que a expressão de genes de proteínas ribossomais é controlada pelos níveis de rRNA (TRAXLER *et al.*, 2008), limitando a excessiva síntese proteica durante o empobrecimento nutricional (POTRYKUS; CASHEL, 2008).

A maioria dos sistemas sensores bacterianos converte estímulos externos em mudanças na concentração celular de moléculas de mensageiros secundários, que funcionam como reguladores pleiotrópicos de alvos moleculares, sendo os três mais comuns entre as bactérias o AMP cíclico, o di-GMP cíclico e a guanosina tetrafosfato (ppGpp) e pentafofato (pppGpp) (HAURYLIUK *et al.*, 2015). Os últimos, genericamente aqui tratados como (p)ppGpp, são derivados, respectivamente, de GTP (guanosina trifosfato) e GDP (guanosina difosfato), e foram primeiramente identificados como “*spots mágicos*” visualizados em autoradiogramas (POTRYKUS; CASHEL, 2008).

A principal característica da resposta severa é o acúmulo de (p)ppGpp, os quais se ligam à RNA polimerase para regular a expressão gênica em determinados promotores (CHATTERJI; OJHA, 2001). Os alarmônios (p)pGpp são moléculas de grande importância na persistência de *E. coli* durante a parada no crescimento induzida pela carência de

nutrientes (NYSTRÖM, 1994) e é possivelmente o sinal primário usado por *E. coli* para ajustar seu potencial reprodutivo àquele definido por seu ambiente nutricional (TRAXLER *et al.*, 2008).

(p)ppGpp é um regulador global da expressão gênica, presente em muitas bactérias e cloroplastos de plantas superiores, causando um redirecionamento da transcrição e favorecendo genes de virulência e de proteção em detrimento daqueles responsáveis pelo crescimento e proliferação (MAGNUSSON; FAREWELL; NYSTRÖM, 2005), descartando atividades desnecessárias em células que não estão em crescimento (POTRYKUS; CASHEL, 2008).

Em diferentes espécies bacterianas, (p)ppGpp altera variados aspectos da biologia celular que sejam sensíveis a mudanças na disponibilidade de nutrientes, como crescimento, adaptação, metabolismo secundário, sobrevivência, persistência, divisão celular, motilidade, biofilmes, desenvolvimento, competência e virulência (POTRYKUS; CASHEL, 2008). Processos que requerem (p)ppGpp para sua indução incluem a resposta geral ao estresse, metabolismo central, catabolismo de nucleotídeos, beta oxidação de ácidos graxos e biossíntese/catabolismo de aminoácidos (TRAXLER *et al.*, 2008).

Durante o crescimento exponencial, (p)ppGpp se encontra em níveis basais e funciona como um dos principais moduladores da taxa de crescimento bacteriano e um “afinador” do metabolismo geral (HAURYLIUK *et al.*, 2015). O nível basal de (p)ppGpp é inversamente proporcional à taxa de crescimento celular e conteúdo de RNA estável das células (LAZZARINI; CASHEL; GALLANT, 1971). A ausência completa deste alarmônio em *E. coli* mantém a célula em um estado de crescimento invariável diante das condições ambientais, gerando características fenotípicas como requerimentos de múltiplos aminoácidos, baixa sobrevivência de culturas envelhecidas, divisão celular e morfologia anormais, imotilidade e paralisia em um modo de crescimento durante a entrada em carência nutricional (POTRYKUS; CASHEL, 2008).

Células de *E. coli* privadas de aminoácidos essenciais, em poucos segundos, começam a acumular (p)ppGpp, levando-as a reduzirem fortemente a síntese de RNA estável, ajustando, dessa forma, a atividade biossintética da célula a fim de manter a razão RNA:proteínas (CASHEL; GALLANT, 1969; LAZZARINI; CASHEL; GALLANT, 1971). Em células bacterianas, a resposta severa reduz a taxa de acúmulo de RNA sempre que a síntese proteica é limitada pela ausência de qualquer aminoácido requerido ou pela falha em ativar determinado aminoácido (CASHEL; GALLANT, 1969).

Na resposta severa induzida por carência de aminoácidos, *E. coli* acumula mais ppGpp do que pppGpp (CASHEL *et al.*, 1996): ppGpp celular sofre um aumento de 10 a 15 vezes a partir do nível basal, alcançando uma concentração equivalente a 30% da concentração intracelular de ATP, enquanto pppGpp chega a um platô em nível equivalente a 10-15% da concentração de ATP (SOMERVILLE; AHMED, 1979).

Na resposta severa induzida pela carência de aminoácidos, (p)ppGpp induz, em larga escala, operons de biossíntese de aminoácidos (TRAXLER *et al.*, 2008). Quando a condição de carência se refere à apenas um aminoácido, ocorre um padrão mais complexo de transcrição de genes metabólicos, incluindo a indução da biossíntese de uma variedade de aminoácidos e vias catabólicas, as quais permitem à célula para direcionar o fluxo metabólico na formação do aminoácido limitado (TRAXLER *et al.*, 2008).

Traxler *et al.* (2008) testaram a indução da carência do aminoácido isoleucina na cepa selvagem de *E. coli* e no mutante ppGpp⁰. O perfil do transcriptoma global revelou a expressão de genes de muitas vias metabólicas, expandindo seu repertório de vias ativas, trocando o estado anabólico primário destinado a gerar blocos de construção para produção de biomassa, para um estado catabólico que reassimila nucleotídeos e ácidos nucleicos não utilizados de volta ao metabolismo central. O consumo de glicose diminuiu, enquanto o consumo de fontes alternativas de carbono aumentou para produção de energia via fermentação. Tais eventos não foram observados na linhagem mutante, a qual apresentou habilidade reduzida em utilizar vias metabólicas que estavam ativas antes de iniciado o período de carência de isoleucina e foi significativamente impactada em sua habilidade de regular apropriadamente a expressão de genes envolvidos em quase todas as áreas do metabolismo.

Para se adaptar rapidamente ao ambiente, as bactérias regulam as enzimas que sintetizam e degradam (p)ppGpp (DALEBROUX; SWANSON, 2012). O acúmulo celular de (p)ppGpp é determinado por um balanço complexo das atividades total de sintetases e hidrolases, somadas às especificidades ao substrato de ambas as enzimas (MECHOLD *et al.*, 2013).

Sob carência de aminoácidos, a indução da síntese de (p)ppGpp é um produto da ação da enzima ppGpp sintetase I, codificada pelo gene *relA* (NYSTRÖM, 1994; SPIRA; SILBERSTEIN; YAGIL, 1995). Em células sob carência de fonte de carbono, ortofosfato inorgânico (Pi) ou fosfolipídeos, (p)ppGpp é sintetizado de forma dependente do gene *spoT* (SPIRA; YAGIL, 1998; DALEBROUX; SWANSON, 2012). Estes nucleotídeos são sintetizados pela fosforilação enzimática de GDP e GTP a ppGpp e pppGpp,

respectivamente, usando ATP como doador de fosfato (CHATTERJI; OJHA, 2001). A enzima GppA fosfatase converte pppGpp em ppGpp (MECHOLD *et al.*, 2013) (Figura 6).

Mechold *et al.* (2013) encontraram que, em *E. coli*, ppGpp funciona como um regulador mais efetivo do que pppGpp na inibição da taxa de crescimento (10 vezes mais potente), da transcrição de rRNA e da razão RNA/DNA (que varia inversamente com os níveis intracelulares de (p)ppGpp), entre outras ações, tanto em testes *in vivo* quanto *in vitro*. Em *E. coli*, a função de GppA pode ser a afinação da atividade regulatória mais potente. A indução gratuita de (p)ppGpp inibe o crescimento cerca de oito vezes mais severamente com ppGpp do que com pppGpp (POTRYKUS; CASHEL, 2008).

Entre as bactérias, as enzimas que sintetizam e degradam (p)ppGpp podem ser divididas em três grupos principais, cuja regulação diferencial permite às células responder diferentemente aos diversos estressores: proteínas homólogas a RelA/SpoT (RSH), pequenas sintetases e pequenas hidrolases (LIU; BITTNER; WANG, 2015).

Figura 6 - Biossíntese de (p)ppGpp.

Fonte: Haurlyliuk *et al.* (2015).

Nota: Na parte superior da figura, enzimas da família RSH produzem (p)ppGpp e AMP a partir de GTP/GDP + ATP, com destaque para as metades γ -fosfato das moléculas.

Na parte inferior, ilustra-se o metabolismo de (p)ppGpp em *E. coli*: RelA e SpoT sintetizam pppGpp a partir de GTP e ppGpp a partir de GDP, gerando AMP como um subproduto.

As linhas tracejadas mostram a conversão de pppGpp a ppGpp catalisada pela enzima GppA fosfatase e por GTPases traducionais.

SpoT catalisa a degradação de pppGpp e ppGpp para formar GTP e GDP, respectivamente.

A conversão de GDP em GTP é catalisada pela enzima quinase nucleosídeo difosfato (Ndk).

Bactérias Gram-positivas, em geral, e muitas outras espécies bacterianas não apresentam duas ppGpp sintetases/hidrolases, mas apenas uma proteína, chamada RSH (*RelA-SpoT homologue*) (SRIVATSAN; WANG, 2008), com ambas as funções de sintetase e hidrolase, cujas modulações dos níveis de (p)ppGpp ocorrem através de dois sítios ativos distintos, controlados por mecanismos regulatórios recíprocos (BRAEKEN *et al.*, 2006; POTRYKUS; CASHEL, 2008). As proteínas RelA e SpoT regulam os níveis de (p)ppGpp em γ - e β -proteobactérias (BRAEKEN *et al.*, 2006).

Em *E. coli*, as enzimas RelA e SpoT sintetizam (p)ppGpp em resposta a estresses ambientais e nutricionais (BRAEKEN *et al.*, 2006; SRIVATSAN; WANG, 2008). RelA e SpoT geram (p)ppGpp em distintos domínios subcelulares, de forma que cada proteína module a atividade de um conjunto de enzimas-alvo (DALEBROUX; SWANSON, 2012). Em condições favoráveis ao crescimento, o nível basal de (p)ppGpp é mantido no citosol pelas enzimas RelA, uma sintetase também conhecida como 3'-quinase (sua função hidrolase está inativa), e SpoT uma enzima bifuncional com atividade primária de hidrolase, mas também sintetase, sob certas condições (CHATTERJI; OJHA, 2001).

A enzima ppGpp sintetase I (RelA) catalisa a síntese de pppGpp, o qual é, em sequência, degradado a ppGpp pela enzima pppGpp 5'-fosfohidrolase (SPIRA; SILBERSTEIN; YAGIL, 1995). RelA se associa ao ribossomo em resposta, principalmente, a tRNAs descarregados que se acumulam em resultado à limitação de aminoácidos (BRAEKEN *et al.*, 2006), detectados pelo monitoramento direto da capacidade traducional da célula (HAURYLIUK *et al.*, 2015). A presença de tRNA deacilados no sítio A do ribossomo ativa a síntese de (p)ppGpp e AMP dependentes de RelA (BRAEKEN *et al.*, 2006) (Figura 7). O mutante *relA* gera uma **resposta relaxada**, caracterizada pelo acúmulo de rRNA durante a carência nutricional (MAGNUSSON; FAREWELL; NYSTRÖM, 2005).

A associação de RelA ao ribossomo é inversamente correlacionada com a síntese de (p)ppGpp, sugerindo que RelA é liberada depois da síntese dos nucleotídeos, passando para o próximo ribossomo bloqueado, repetindo o processo de forma que a produção de (p)ppGpp reflita o número de ribossomos bloqueados (BRAEKEN *et al.*, 2006). A ativação de RelA durante a carência de aminoácidos induz a dissociação de RelA do ribossomo, gerando múltiplos ciclos de síntese de (p)ppGpp fora do ribossomo, sugerindo uma “memória molecular” em RelA, a qual permaneceria em um estado ativo mesmo depois de dissociada do ribossomo (ENGLISH *et al.*, 2011).

Figura 7 - Indução da síntese de (p)ppGpp em resposta à carência de aminoácidos.

Fonte: Hauryliuk *et al.* (2015).

Nota: A carência de aminoácidos leva ao acúmulo de tRNAs deacilados no citosol os quais se ligam ao sítio A ribossomal. Esse estado do ribossomo é reconhecido por RelA, a qual se liga à subunidade ribossomal 50S e adota uma conformação ativa, sintetizando (p)ppGpp e dissociando-se do ribossomo; neste estado, RelA catalisa vários ciclos de síntese de (p)ppGpp. As concentrações do alarmônio se elevam e os recursos metabólicos celulares são direcionados para a biossíntese de aminoácidos, os quais recompõem os níveis normais de tRNA aminoacilados e inibem a ligação de RelA ao ribossomo. de tRNA aminoacilados e inibem a ligação de RelA ao ribossomo.

A ligação direta do alarmônio a RelA também regula positivamente a síntese de (p)ppGp, aumentando significativamente a taxa de sua própria síntese por RelA através de um mecanismo de *feedback* alostérico positivo que não foi previamente descrito para qualquer outra enzima (HAURYLIUK *et al.*, 2015; LIU; BITTNER; WANG, 2015). Somente a presença de (p)ppGpp é insuficiente para induzir a máxima atividade catalítica de RelA, mas ela potencializa a ativação que é induzida pelo ribossomo e pela presença de tRNA deacilado no sítio A ribossomal (HAURYLIUK *et al.*, 2015).

SpoT é uma enzima citosólica bifuncional com atividade de sintetase e hidrolase, responsável pela degradação de ppGpp a GDP e de pppGpp a GTP (MECHOLD *et al.*, 2013), provavelmente regulando os níveis de (p)ppGpp em resposta a várias condições de carência nutricional (BRAEKEN *et al.*, 2006). Contudo, SpoT é especializada na hidrólise de (p)ppGpp e apresenta fraca atividade de sintase (POTRYKUS; CASHEL, 2008), a qual media o *turnover* de (p)ppGpp, determinando sua concentração intracelular (TRAXLER *et al.*, 2008). Para muitos patógenos bacterianos, a enzima SpoT também é fundamental para o processo de infecção (DALEBROUX; SWANSON, 2012).

Os níveis de ppGpp são específicos para cada linhagem de *E. coli* e *spoT* é particularmente importante na microevolução das linhagens, uma vez que estabelece o nível basal de (p)ppGpp em resposta das pressões seletivas por estresse e carência nutricional (BRAEKEN *et al.*, 2006).

2.7.1 Ação de (p)ppGpp

A diversidade na síntese e ação de (p)ppGpp se expressa entre as espécies e linhagens bacterianas, e mesmo dentro da mesma célula, com ampla variedade de alvos do alarmônio (BRAEKEN *et al.*, 2006; LIU; BITTNER; WANG, 2015). A função dos níveis basais de (p)ppGpp na determinação da taxa de crescimento envolve o controle de rRNA e difere dos efeitos inibitórios do crescimento induzidos por grandes quantidades de (p)ppGpp (POTRYKUS; CASHEL, 2008).

A função geral de (p)ppGpp é a alocação de recursos transcricionais de forma apropriada ao nível de estresse e à taxa de crescimento da bactéria, ativando a expressão de genes relacionados à resistência ao estresse e crescimento vegetativo (BRAEKEN *et al.*, 2006). Tais funções são essenciais em um ambiente com várias condições de estresse, mas prejudicam o crescimento vegetativo em situações de estresse mediano (BRAEKEN *et al.*, 2006).

Dados genéticos e bioquímicos indicam que o controle da expressão gênica por (p)ppGpp se dá em nível transcricional, mas também exerce influência sobre a replicação, recombinação e reparo do DNA (CHATTERJI; OJHA, 2001). (p)ppGpp regula a tradução indiretamente através da inibição da transcrição de genes de proteínas e RNA ribossomal, reduzindo assim a produção de blocos de construção para montagem de ribossomos; em *E. coli*, (p)ppGpp também se liga diretamente ao fator de iniciação da tradução, IF2, ao fator de alongação EF-G e ao fator de montagem ribossomal ObgE, regulando não somente a iniciação e a alongação da tradução, mas também a maturação do ribossomo durante o estresse (LIU; BITTNER; WANG, 2015). Em adição, (p)ppGpp inibe a replicação, retarda a alongação da transcrição e previne a formação de arranjos de RNA polimerase paralisada, eventos que podem facilitar o acoplamento transcrição-tradução e/ou minimizar os conflitos entre esses dois processos (LIU; BITTNER; WANG, 2015) (Figura 8).

Trabalhos conduzidos com diversas espécies bacterianas demonstraram a regulação de muitas funções celulares mediadas por (p)ppGpp como, por exemplo, crescimento termossensível, morte celular programada, competência, esporulação, produção de antibióticos e enzimas extracelulares, sobrevivência ao estresse (induzida por radiação Ultravioleta), diferenciação morfológica, desenvolvimento do corpo de frutificação, carência de nutrientes e oxigênio, redução da concentração celular em fase estacionária, osmotolerância durante o crescimento, resistência a ácidos, antibióticos e ácido nítrico, entre outras (CHATTERJI; OJHA, 2001; BRAEKEN *et al.*, 2006). Além disso, (p)ppGpp ainda

pode facilitar a mutagênese induzida por estresse e poderia favorecer a evolutibilidade em *Bacillus subtilis* (SRIVATSAN; WANG, 2008).

As proteínas RelA e SpoT, assim como seus homólogos bifuncionais, regulam muitos aspectos das interações patogênicas e simbióticas entre bactéria e hospedeiro (BRAEKEN *et al.*, 2006). Um crescente número de estudos relata que o envolvimento de (p)ppGpp em processos celulares afeta a patogenicidade das espécies bacterianas, mostrando que quando (p)ppGpp está ausente, a patogenicidade é comprometida por razões que variam de acordo com o organismo estudado (POTRYKUS; CASHEL, 2008). Efeitos inibitórios também podem ocorrer nas interações com o hospedeiro que aumentam a sobrevivência, invasividade e persistência do patógeno, e os exemplos incluem *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter jejuni*, *Brucella abortus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* e *Borrelia burgdorferi* (POTRYKUS; CASHEL, 2008). (p)ppGpp também está relacionado ao desenvolvimento de persistência, ou seja, um sub-grupo de bactérias em uma população que se mostra tolerante a agentes bactericidas (BRAEKEN *et al.*, 2006).

A sinalização célula-célula é um mecanismo essencial no comportamento social bacteriano, representado pelo *quorum sensing* (evento relacionado à virulência e infecção) ou pela formação de biofilmes, nos quais agregados celulares permanecem intimamente associados (BRAEKEN *et al.*, 2006). Altas densidades populacionais limitam a disponibilidade de nutrientes e levam as células a entrar em fase estacionária, fenômenos regulados pela concentração intracelular de (p)ppGpp (BRAEKEN *et al.*, 2006).

A distinção entre quais genes serão regulados negativa ou positivamente por (p)ppGpp depende de parâmetros cinéticos inerentes aos promotores de tais genes: os promotores de rRNA tem uma sequência específica rica em GC entre o elemento -10 e o sítio de início da transcrição, formando complexos abertos muito instáveis com a RNA polimerase durante a iniciação da transcrição, sobre os quais atua (p)ppGpp/DksA (co-fator DksA coadjuvante de (p)ppGpp); os promotores de genes da biossíntese de aminoácidos apresentam sequências ricas em AT, permitindo a formação de complexos abertos estáveis o suficiente para resistir à desestabilização por (p)ppGpp/DksA (SRIVATSAN; WANG, 2008; POTRYKUS; CASHEL, 2008).

Figura 8 - Regulação do metabolismo bacteriano por (p)ppGpp.

Fonte: Liu, Bittner e Wang (2015).

Nota: (p)ppGpp regula vários processos celulares importantes para permitir a sobrevivência e adaptação a estresses, tais como carência de aminoácidos e tratamento com antibióticos, os quais ativam ou regulam positivamente as sintetases de (p)ppGpp, produzindo o alarmônio. Através da interação direta com os alvos, (p)ppGpp regula a replicação, transcrição, tradução e o metabolismo para ajustar a fisiologia celular para sobrevivência e adaptação a condições adversas.

As linhas pontilhadas indicam que (p)ppGpp também modula indiretamente a replicação, tradução e metabolismo através de seus efeitos sobre a transcrição.

De acordo com POTRYKUS; CASHEL (2008), a ativação da transcrição por (p)ppGpp pode ocorrer de forma direta ou indireta. A ativação direta ocorre quando a RNA polimerase interage com efetores, como (p)ppGpp, DksA, ou ambos, para aumentar a transcrição de um dado promotor. É provável que promotores dependentes de σ^{70} e ativados por (p)ppGpp sejam afetados através de um mecanismo direto. Já a ativação indireta pelos efetores de um promotor depende da inibição de outros fortes promotores, levando a uma disponibilidade aumentada da RNA polimerase que ativa indiretamente a iniciação da transcrição. Alguns dos efeitos indiretos de (p)ppGpp se dão através de elevada expressão de fatores sigma alternativos (CASHEL *et al.*, 1996; BRAEKEN *et al.*, 2006). (p)ppGpp se posiciona em um canal secundário da RNA polimerase próximo ao centro catalítico (POTRYKUS; CASHEL, 2008), agindo como um regulador alostérico (LIU; BITTNER; WANG, 2015).

(p)ppGpp ativa a síntese do fator de transcrição σ^S , uma subunidade da RNA polimerase essencial para a transcrição de muitos genes induzidos na fase estacionária, e que coordena a “resposta geral ao estresse”, funcionando como um sinal para a célula se preparar para as condições de estresse nas quais ela se encontra (SPIRA; SILBERSTEIN; YAGIL, 1995). Linhagens de laboratório e isolados naturais de *E. coli* diferem em seus níveis de resistência a estresse devido a variações nos níveis do fator σ^S (ou RpoS), o principal controlador transcricional na resposta geral ao estresse (SPIRA; HU; FERENCI, 2008). Em *E. coli*, a função de RpoS é complementar àquela do alarmônio (p)ppGpp, cuja concentração também responde ao estresse e altera o padrão de transcrição do estado de crescimento vegetativo para o metabolismo de resistência ao estresse e (p)ppGpp está relacionado à regulação e função de *rpoS*, sendo necessário para obter altos níveis de expressão deste gene (BRAEKEN *et al.*, 2006).

A transcrição direcionada por fatores sigma alternativos também requer (p)ppGpp para ativação *in vivo* (MAGNUSSON; FAREWELL; NYSTRÖM, 2005). O modelo conhecido como ‘competição de fatores sigma’ propõe que (p)ppGpp altera a afinidade do fator σ^{70} ao núcleo da RNA polimerase, permitindo que outros fatores sigma se liguem à enzima. (p)ppGpp e/ou DksA não somente aumentam a disponibilidade de RNA polimerases livres pela inibição de fortes promotores dependentes de σ^{70} , mas também tornam o núcleo da RNA polimerase mais disponível para interações que afetam sua ligação com σ^{70} (BRAEKEN *et al.*, 2006; POTRYKUS; CASHEL, 2008; DALEBROUX; SWANSON, 2012). Além de inibir a síntese de rRNA, (p)ppGpp age como efector positivo da expressão de genes dependentes de σ^{70} , induzidos durante a carência nutricional, mas muitos genes dependentes de outros fatores σ também são total ou parcialmente dependentes de (p)ppGpp (MAGNUSSON; FAREWELL; NYSTRÖM, 2005).

De forma geral, a ligação de (p)ppGpp ao núcleo da RNA polimerase inibe a síntese de RNA estável, proteínas ribossomais, fatores de elongação, ácidos graxos e lipídeos, além da replicação do DNA, e estimula a biossíntese de proteínas universais de estresse e de aminoácidos, a proteólise e a transcrição de *rpoS*, o qual, via fator σ^S , estimula a glicólise e a transcrição de genes de sobrevivência estase, estresses oxidativo e osmótico (MAGNUSSON; FAREWELL; NYSTRÖM, 2005).

Em *E. coli*, a proteína DksA é necessária para a resposta severa e potencializa os efeitos de (p)ppGpp em promotores regulados positiva e negativamente pelos alarmônios (BRAEKEN *et al.*, 2006). DksA possui dois resíduos ácidos para os quais se propõe facilitar e estabilizar a ligação entre (p)ppGpp e RNA polimerase (POTRYKUS; CASHEL, 2008).

A interação tripartite entre (p)ppGpp, DksA e RNA polimerase é central para a regulação da transcrição não somente em *E. coli*, mas também em espécies bacterianas evolutivamente próximas (LIU; BITTNER; WANG, 2015). Em conjunto, (p)ppGpp e DksA exercem controle sobre a expressão gênica global através de múltiplos mecanismos, sendo um deles a indução de muitos genes pela mediação do balanço entre a RNA polimerase engajada na transcrição do aparato de tradução e na transcrição de todos os outros genes (TRAXLER *et al.*, 2008) (Figura 9).

Figura 9 - Regulação transcricional mediada por (p)ppGpp.

Fonte: Dalebroux; Swanson (2012).

Nota: Em resposta a determinadas condições de estresse, as enzimas SpoT e RelA catalizam a transferência de um grupo pirofosforil de ATP para GTP ou GDP para sintetizar pppGpp e ppGpp, respectivamente. Em conjunto, (p)ppGpp e DksA direcionam a iniciação da transcrição para determinados promotores de genes através da interação direta com a RNA polimerase e desta enzima com fatores sigma alternativos. Quando os precursores metabólicos são abundantes, SpoT degrada (p)ppGpp e o fator sigma de crescimento vegetativo, σ^{70} , direciona a RNA polimerase para genes que são essenciais para a replicação bacteriana. PPi = pirofosfato.

3 OBJETIVOS

Avaliação da presença do herbicida glifosato nas águas do rio Piaguí, localizado no município de Guaratinguetá/SP, e investigação do processo de biodegradação deste composto, utilizando cepas do banco de cultivo laboratorial e cepas ambientais isoladas a partir de amostras de água do mesmo rio.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliação da tolerância das cepas bacterianas ao glifosato adicionado ao meio de cultivo tanto das cepas isoladas a partir da amostra ambiental quanto das cepas da coleção de laboratório.
- Realização de ensaios de evolução dirigida a partir de cepas da coleção de laboratório para seleção de mutantes com tolerância aumentada ao glifosato e com capacidade de utilização do herbicida como fonte de fósforo.
- Indução de resposta severa bacteriana por carência de aminoácidos aromáticos, promovida pelo herbicida glifosato.
- Isolamento e identificação por sequenciamento do rDNA 16S de cepas bacterianas obtidas a partir de amostras de água bruta do rio Piaguí.
- Avaliação a eficiência de degradação do glifosato por consórcio bacteriano em escala laboratorial.
- Caracterização dos parâmetros físico-químicos das amostras de água do rio Piaguí.
- Detecção e quantificação da concentração do herbicida glifosato na água bruta do rio Piaguí.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepas, meios de cultura, solução-estoque de glifosato

4.1.1 Meios de cultura (Quadro 1)

Quadro 1 - Composição dos meios de cultura usados nos experimentos.

<i>Meio de cultura</i>	<i>Composição</i>
Lysogen Broth (LB)	10 g de Triptona, 5 g de Extrato de Levedura, 10 g de NaCl, dissolvidos em 1L de H ₂ O deionizada
Ágar-LB	Meio LB contendo 12 g de ágar para cada litro de H ₂ O deionizada
Meio TGP	0,468% (m/v) NaCl, 0,15% (m/v) KC, 0,108% (m/v) NH ₄ Cl, 1,452% (m/v) Tris-base, 0,02% (m/v) MgCl ₂ .6H ₂ O, 0,035% (m/v) Na ₂ SO ₄ , 0,2 ml CaCl ₂ (1 M), 02 ml FeCl ₃ (0,01M), 0,2 ml ZnCl ₂ (0,01M), 75 ml HCl (12 M); pH 7,5. A esta solução é adicionado 0,2% de glicose e concentrações variadas de KH ₂ PO ₄ .

Fonte: Autoria própria.

4.1.2 Cepas (Quadro 2)

Quadro 2 - Descrição das cepas bacterianas utilizadas nos experimentos.

	Cepas	Descrição	Fonte
<i>Escherichia coli</i> K12	MG1655	Cepa padrão selvagem	XIAO <i>et al.</i> , 1991
	MG1655 <i>phnCDE+</i>	Transdução a partir da cepa BL21 (<i>E. coli</i> B) – transportador de fosfonatos ativo	Coleção do laboratório
	MG1655 Δ <i>pst/phn+</i>	Deleção do operon <i>pstSCABU</i> e expressão ativa do transportador de fosfonatos	Coleção do laboratório
	MG1655 Δ <i>relA::Km</i>	Deleção do gene <i>relA</i> , resistência à kanamicina	XIAO <i>et al.</i> , 1991
	MG1655 Δ <i>gpp::Cm</i>	Deleção do gene <i>gpp</i> , resistência ao cloranfenicol	CRUVINEL; NEVES; SPIRA, 2018
	MG <i>spoT</i> 202	N99 <i>relA1 zib563::Tn10 spoT</i> 202	SARUBBI; RUDD; CASHEL, 1988
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA14	Cepa padrão selvagem	RAHME <i>et al.</i> , 1995
Isolados bacterianos ambientais	-	-	Amostras de água fluvial

Fonte: Autoria própria.

4.1.3 Glifosato

- Glifosato 95,5% - produto técnico Monsanto do Brasil
- Glifosato P.A. (padrão analítico) (Sigma-Aldrich)

Ambos foram preparados com adição de água deionizada de forma a atingir uma concentração de 80 mM, calculada a partir do dado de solubilidade de glifosato (1,01 g.100 ml⁻¹). Esta solução-estoque foi, então, filtrada em filtro estéril de 0,22 µm e mantida em temperatura ambiente sob abrigo de luz. Dentre os resultados relevantes apresentados neste trabalho, apenas no ensaio comparativo entre glifosato P.A. e glifosato 95,5% foi utilizada a primeira forma do ingrediente ativo; todos os outros ensaios foram realizados com uma solução estoque produzida a partir de glifosato produto técnico.

4.2 Coleta de água fluvial

A coleta das amostras foi realizada de acordo com o Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras (CETESB, 2011). Coleta das amostras do Rio Piaguí/Guaratinguetá-SP (22°44'44, 142°-S, 45°11'23, 742°-W), sob a ponte, na Estrada da Colônia, a jusante de vários cultivos de arroz por campo irrigado onde são utilizados vários pesticidas, dentre eles glifosato, segundo a cooperativa de agricultores da região. A coleta foi realizada em 20 de setembro de 2017, por volta das 16 horas, em período seco. Uma segunda coleta foi necessária (27 de setembro de 2017) somente para realização do isolamento de espécies bacterianas a partir das amostras de água, uma vez que o meio de cultivo no qual seriam inoculadas apresentou contaminação.

No mesmo ponto do rio duas amostras foram coletadas, sequencialmente, no mesmo horário: utilizou-se um balde plástico que foi imerso no rio, na região central, cerca de 15 centímetros de profundidade, a partir do qual foram retiradas as alíquotas necessárias para cada ensaio.

As amostras de água foram coletadas, em duplicata, nos seguintes recipientes: 1) frascos de vidro âmbar (2 L) contendo 2 ml de H₂SO₄ para quantificação de fósforo total; 2) frascos de vidro neutro com tampa esmerilhada para quantificação de oxigênio dissolvido (OD) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO); 3) frascos de vidro âmbar (2 L) para

análise dos outros parâmetros (item 4.4). Todos os frascos foram levados ao laboratório em bolsa térmica contendo gelo reutilizável.

4.3 Detecção e quantificação de glifosato nas amostras de água fluvial

Foram obtidas duas alíquotas de 500 ml de cada uma das duas amostras de água fluvial coletadas, acondicionadas em frascos plásticos e congeladas a -20°C até o momento da análise, quando foram descongeladas em temperatura ambiente e filtradas em membrana filtrante MS® MCE 0,45 µm. Alíquotas de 1 ml de cada amostra, em triplicata, foram acondicionadas em microtubo, mantidas em bolsa térmica com gelo reutilizável e levadas até a unidade de São José dos Campos/SP da empresa Monsanto do Brasil, onde as amostras foram analisadas (“às cegas”) pelo laboratório de Controle de Qualidade pelo método de separação por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e reação colorimétrica com leitura em espectrofotômetro a 660 nm.

4.4 Caracterização físico-química das amostras de água fluvial

A caracterização das amostras abrangeu os seguintes parâmetros: pH, turbidez, OD, DBO, fósforo total, sólidos totais (fixos e voláteis), íons sulfato, fosfato, fluoreto, cloreto, brometo e nitrato, população bacteriana (contagem de unidades formadoras de colônias – UFC). Também foram conduzidos cultivos de enriquecimento a fim de isolar bactérias presentes nas amostras de água fluvial.

4.4.1 Medida de pH

Para determinação do pH das amostras de água do rio Piaguí foi utilizado o método eletrométrico – pH-metro de bancada – que consiste em um potenciômetro, um eletrodo de vidro, um eletrodo de referência e um dispositivo de compensação de temperatura. Este método é o mais preciso para medir este parâmetro. Realizada no dia da coleta, em laboratório, parte da amostra foi transferida para um béquer no qual foi introduzido o eletrodo do equipamento, gerando o resultado em valor numérico, após alguns segundos.

4.4.2 Turbidez

A turbidez de uma amostra de água é determinada por métodos nefelométricos, como o turbidímetro, equipamento dotado de uma fonte de luz (filamento de tungstênio), que incide sobre a amostra, e um detector fotoelétrico capaz de medir a luz que é dispersa em um ângulo de 90° em relação à luz incidente, resultando em valores de unidades nefelométricas de turbidez (UNT) (PIVELI; KATO, 2005). No dia da coleta, em laboratório, após calibração do equipamento, uma pequena alíquota de cada amostra foi diretamente colocada na cubeta de leitura, gerando um valor numérico correspondente ao resultado.

4.4.3 Oxigênio Dissolvido - Método químico de Winkler modificado pela azida sódica (APHA, 2012)

Dois métodos distintos permitem medir a concentração de oxigênio dissolvido (OD) e amostras de água: o eletrométrico e o químico. O primeiro consiste em oxímetros ou medidores de OD, nos quais “a sonda do eletrodo possui uma membrana que adsorve seletivamente o oxigênio, tendo por base o seu raio de difusão molecular” (PIVELI; KATO, 2005). O segundo é o método químico de Winkler modificado pela azida sódica, no qual logo após a coleta da amostra, promove-se a fixação do OD contido na mesma com sulfato manganoso (MnSO_4) e uma solução álcali-iodeto-ázida (hidróxido de sódio (NaOH), iodeto de sódio (NaI) e azida sódica (NaN_3)): o iodo é liberado após reagir com o ácido sulfúrico concentrado adicionado à amostra e a coloração amarelada que se desenvolve é proporcional à concentração de OD contido na amostra. A titulação do iodo liberado é realizada com tiosulfato de sódio 0,025 N ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), indicada por uma solução de amido 1%, com viragem de azul para incolor. Os resultados são expressos em termos de $\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$, utilizando o equivalente-grama do oxigênio (mg), através da equação 1 (PIVELI; KATO, 2005):

$$\text{mg O}_2/\text{L} = \text{N (Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) \times \text{Volume (Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) \times 8000 / \text{Volume da amostra} \quad (1)$$

No momento da coleta, em campo, frascos de vidro transparente com tampa esmerilhada, em duplicata, foram “lavados” por três vezes na água coletada com o balde plástico e, em seguida, foram cuidadosamente imersos neste balde, permitindo a entrada de

forma lenta de cerca de 300 ml de amostra de água fluvial, aos quais foram adicionados 2 ml de MnSO_4 (solução 1) e 2 ml de solução álcali-iodeto-ázida (solução 2), ambas para fixar o O_2 contido na amostra; os frascos foram firmemente fechados e mais água do rio foi adicionada ao entorno da tampa a fim de evitar a entrada de O_2 externo (selo hídrico); agitou-se o frasco vigorosamente, deixou-se a amostra sedimentar por três minutos, aplicou-se nova agitação e acondicionou-se o frasco em bolsa térmica contendo gelo reutilizável (CETESB, 1984).

Em laboratório, foram adicionados 2 ml de H_2SO_4 concentrado a cada frasco e homogeneizou-se as amostras. Posteriormente, 100 ml da amostra foram transferidos para um balão volumétrico, aos quais foi adicionado 1 ml de solução de amido (indicador), homogeneizando a mistura. Esta mistura foi transferida para um erlenmeyer de 250 ml e conduziu-se a titulação com tiosulfato de sódio 0,025 N, em triplicata.

4.4.4 Demanda Bioquímica de Oxigênio (APHA, 2012)

Tecnicamente, a DBO é definida como a “fração biodegradável dos compostos presentes na amostra, que é mantida por cinco dias a uma temperatura constante de 20°C ” (PIVELI; KATO, 2005). Durante o período de incubação, o oxigênio dissolvido consumido será a medida indireta da concentração de matéria orgânica biodegradável contida na amostra. O percentual de remoção de matéria orgânica nos cinco dias de incubação é calculado pela diferença entre os valores de OD final e inicial dividido pelo valor de OD inicial multiplicado por 100. A DBO da amostra é calculada pela diferença entre os valores final e inicial de OD multiplicada pela razão entre o volume do frasco de coleta e o volume de amostra titulado. O resultado é expresso em kg/dia, através das equações 2 e 3 (PIVELI; KATO, 2005).

$$\% \text{ redução OD} = (\text{OD}_i - \text{OD}_f) / \text{OD}_i \times 100 \quad (2)$$

$$\text{DBO} = (\text{OD}_i - \text{OD}_f) \times \text{Vol frasco (300 ml)} / \text{Vol amostra (100 ml)} \quad (3)$$

No momento da coleta, em campo, frascos de vidro transparente específico, em duplicata, foram cuidadosamente imersos no balde de coleta, permitindo a entrada de forma lenta de cerca de 300 ml de amostra; os frascos foram firmemente fechados e mais água do rio foi adicionada ao entorno da tampa a fim de evitar a entrada de O_2 externo e acondicionou-se o frasco em bolsa térmica contendo gelo reutilizável.

Em laboratório, os frascos foram incubados a 20°C por um período de 5 dias na ausência de luz, ao fim dos quais foram adicionados, a cada amostra, 2 ml de MnSO_4 , 2 ml de solução alcalina de iodeto e azida sódica e 2 ml de H_2SO_4 concentrado e homogeneizou-se as amostras. Posteriormente, conduziu-se o mesmo procedimento de titulação descrito na seção 4.4.3.

4.4.5 Fósforo Total (FT) - Método do ácido ascórbico (APHA, 2012)

A determinação do fósforo total em amostras de água é feita por espectrofotometria. Inicialmente, os fosfatos orgânicos sofrem prévia digestão com ácidos sulfúrico e nítrico. Em seguida, os íons ortofosfato se combinam com uma solução de ácido ascórbico, molibdato de amônio e tartarato de antimônio e potássio, formando um complexo azul, analisado em espectrofotômetro a 880 nm. A soma dos dois valores obtidos corresponde ao fósforo total presente na amostra (PIVELI; KATO, 2005).

Esta análise foi realizada 7 dias depois da coleta das amostras que até este momento foram mantidas em geladeira a 4°C. Toda a vidraria utilizada é exclusiva para análise de fósforo total em amostras ambientais. Para o procedimento, foram transferidos 50 ml das amostras, em triplicata, para um balão volumétrico (50 ml), aos quais foram adicionados 1 ml de H_2SO_4 concentrado e 5 ml de HNO_3 e levados ao banho-maria a 90°C por uma hora. Após resfriamento em temperatura ambiente, as amostras foram neutralizadas com NaOH 6,5 N, adicionaram-se 3 gotas de fenolftaleína e avolumou-se a solução com água destilada em um balão volumétrico de 100 ml. Em seguida, obteve-se 25 ml desta solução aos quais foram adicionados 8 ml da solução desenvolvedora de cor (100 ml ácido sulfúrico 5 N; 10 ml de solução de tartarato misto de antimônio e potássio hemihidratado (1,3715 g para 100 ml de água destilada) e 60 ml da solução de molibdato de amônio (20 g para 500 ml de água destilada); e 60 ml de ácido ascórbico 0,1 mol.L⁻¹ (1,76 g para 100 ml de água destilada) e realizada leitura em espectrofotômetro (Dynamica Halo DB-20) a 880 nm em até 4 horas após a adição da solução desenvolvedora de cor. As concentrações de FT foram obtidas pela equação gerada a partir da curva padrão utilizando uma solução KH_2PO_4 219,0 mg.L⁻¹.

4.4.6 Série de sólidos (APHA, 2012)

Sólidos presentes em uma amostra de água podem ser definidos como “toda matéria orgânica que permanece como resíduo, após evaporação, secagem ou calcinação da amostra

a uma temperatura preestabelecida durante um tempo fixado.” São consideradas diversas frações de sólidos presentes em uma amostra de água: totais, em suspensão, dissolvidos, fixos e voláteis, para os quais o método de determinação é gravimétrico (PIVELI; KATO, 2005).

Neste estudo, determinou-se a fração de sólidos totais (ST), definidos como “resíduo que resta na cápsula após evaporação em banho-maria de uma porção da amostra e sua posterior secagem em estufa a 103-105°C até peso constante”. O valor de ST é calculado pela subtração do valor obtido na pesagem da cápsula vazia do valor da massa da cápsula contendo o resíduo seco (P_1), dividido pelo volume de amostra utilizado (100 ml) (PIVELI; KATO, 2005).

As amostras foram mantidas a 4 °C até o momento da análise, 14 dias após a coleta. O procedimento para determinação de sólidos totais na amostra de água consistiu na prévia lavagem da cápsula de porcelana em água destilada, calcinação em forno mufla a 550-600°C por uma hora e armazenamento da mesma em dessecador com sílica-gel até a pesagem da cápsula vazia (P_0). Um volume de 100 ml da amostra, em triplicata, foi homogeneizado e colocado na cápsula, a qual foi mantida em banho-maria a 80 °C (utilizando água destilada) até evaporação da amostra e levada à estufa a 103-105°C para secagem completa do material e, após uma hora, cada cápsula foi pesada novamente e levada ao forno mufla (550-600°C) por 60 minutos. Após esse período de tempo, as cápsulas foram novamente pesadas.

As frações de sólidos foram calculadas da seguinte forma:

- a) sólidos totais (ST): representado pelo valor da diferença entre a pesagem inicial da cápsula e aquela obtida após o banho-maria e secagem em estufa;
- b) sólidos fixos (SF): representado pelo valor da diferença entre a pesagem após o banho-maria e secagem em estufa e o valor obtido após a secagem em forno mufla;
- c) sólidos voláteis (SV): representado pela diferença entre os valores de sólidos totais e sólidos fixos.

4.4.7 Íons Nitrato, fosfato, sulfato, fluoreto, cloreto, brometo

Uma alíquota de 500 ml de cada amostra coletada foi transferida para garrafas plásticas, as quais foram identificadas e mantidas a -20°C até o momento da análise. Após descongelamento das amostras em temperatura ambiente, foi realizada filtragem em membrana filtrante MS[®] MCE 0,45 µm. Para quantificação dos íons presentes nas amostras

foi utilizada a cromatografia de ânions com detecção de condutividade depois de supressão química, nas seguintes condições:

- Eluente: solução de NaHCO_3 (1,0 mMol.L⁻¹): Na_2CO_3 (3,2 mMol.L⁻¹) - 2% acetona - NaHCO_3 : Na_2CO_3 (1,0 mMol.L⁻¹) - 2% acetona e isopropanol 5%;
- Condutividade a supressão química: aproximadamente 13 $\mu\text{S.cm}^{-1}$;
- Fluxo: 0,6 ml.min⁻¹;
- Pressão: 7,45 MPa;
- Loop: 20 μl (injeção);
- Tempo de análise: 20 minutos;
- Polaridade positiva;
- Supressor: agente de regeneração: H_2SO_4 a 50 mmol.L⁻¹ e água ultrapura alimentados continuamente com mudança automática dos canais de supressão, regeneração e lavagem
- Coluna: 6.1006.530 Metrosep A Supp 5-150/4.0;
- Temperatura: 30 °C.

4.5 *Screening* de microbiota bacteriana nas amostras de água fluvial

O isolamento das cepas bacterianas foi realizado por enriquecimento em meio de cultivo. As amostras foram coletadas em frascos Shott esterilizados, em duplicata, os quais, em campo, foram abertos e preenchidos com água do rio, fechados e acondicionados em bolsa térmica com gelo reutilizável. Em laboratório, alíquotas de 10 ml de cada amostra foram inoculadas em 190 ml de meio de cultivo esterilizado totalizando 200 ml em erlenmeyer de 1 litro.

Cada amostra foi inoculada em três diferentes meios: meio LB, meio LB acrescido de glifosato 25 mM e meio mínimo TGP acrescido de glifosato 25 mM. A incubação foi conduzida em shaker a 30 °C, 150 rpm, por 7 dias.

Paralelamente, no mesmo dia da coleta, foram plaqueados 10 μl , 50 μl , 100 μl e 200 μl de amostra em ágar LB, incubadas a 30 °C por cerca de 40 horas, a fim de realizar a contagem de população bacteriana viável por meio do número de unidades formadoras de colônias por placa.

Ao final do período de incubação, os cultivos foram transferidos para tubos Falcon 50 ml, somando quatro tubos para cada cultivo, centrifugados a 6.000 rpm por 5 minutos, após o qual os sobrenadantes foram descartados e o material centrifugado de cada cultivo foi reunido em um único tubo onde foram adicionados 3 ml de meio LB, incubado a 30 °C

por cerca de 18 horas. Após a incubação, uma alíquota de 800 µl foi retirada de cada cultivo, acrescida de 200 ml de glicerol 20% e congelada a -80°C, e uma alíquota de 200 µl de cada cultivo foi plaqueada em ágar LB, em duplicata, e incubada a 30 °C por 72 horas. Após esse período, foram realizados repiques sequenciais das colônias observadas, em ágar LB, até que foram obtidas placas com um único organismo em colônias puras. Cada diferente isolado obtido foi, então, cultivado *overnight* em meio LB para manutenção em glicerol 20%, a -80°C.

4.6 Identificação molecular das cepas isoladas

Os isolados preservados a -80 °C foram reativados por cultivo *overnight* em ágar LB. O 16S rDNA foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando Kit Wizard® GoTaq (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Para cada reação, uma colônia de cada isolado foi diluída no conteúdo dos microtubos. Os oligos utilizados nas reações de PCR foram: P27F (5'-GACAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e R1387 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3'). As condições de reação foram temperatura de anelamento de 52 °C, tempo de extensão de 2 minutos, por 35 ciclos. Os produtos da amplificação continham cerca de 1000 bases e foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1x, por 50 minutos, a 100V, utilizando o marcador Thermo Scientific GeneRuler 100bp Plus Ladder #SM0321. Os segmentos de DNA separados pelo gel de agarose foram recortados do mesmo e purificados utilizando o Kit Wizard® de purificação de DNA genômico (Promega Corporation), de acordo com as recomendações do fabricante. O sequenciamento das amostras foi realizado no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, Instituto de Biociências/USP, para o qual 5 µl de cada amostra foram enviados para sequenciamento, contidos em microtubos de 0,2 ml, misturados com 2,5 µl dos primers, na concentração de 5 µM, descritos acima. Os produtos de PCR obtidos a partir dos isolados de amostras de água do rio Piaguí foram sequenciados utilizando o ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies – Applied Biosystems), um sistema de análise de 48 capilares; as reações de sequenciamento foram feitas utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, alcançando, em média, 600 a 650 bases; as corridas foram feitas em capilares de 36 cm utilizando o polímero POP7; as sequências foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando o Base Caller KB (CPGHCT, 2019).

4.7 Ensaio de tolerância bacteriana ao glifosato

Os isolados das amostras ambientais e as cepas laboratoriais foram cultivados em meio LB e meio mínimo TGP, sob agitação a 150 rpm, a 37 °C, por 24 horas (ou intervalos de tempo maiores), ao fim das quais foram tomadas medidas de DO_{600nm}. Os ensaios de tolerância foram realizados nas seguintes condições: cultivo em meio rico LB suplementado com diferentes concentrações de glifosato (100 µM, 1 mM e 10 mM); cultivo em meio mínimo TGP suplementado com diferentes concentrações de glifosato (100 µM, 1 mM e 10 mM) e adição de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina) em 100 µg.ml⁻¹ cada; cultivo em meio mínimo TG suplementado com diferentes concentrações de glifosato (100, 500, 750 µM, 1 e 2,5 mM) como única fonte de fósforo e adição de aminoácidos aromáticos em 100 µg.ml⁻¹ cada. Foram realizados três ensaios independentes, com cada um deles contendo três réplicas biológicas, para as três condições propostas (meio LB, meio TGP e adição de aminoácidos aromáticos).

4.8 Determinação colorimétrica de fosfato – microdeterminação (CHEN; TORIBARA; WARNER, 1956)

O ensaio se inicia pelo preparo da solução de trabalho composta por ácido sulfúrico (1V), molibdato de amônio 2,5% (1V), ácido ascórbico 10% (1V) e água deionizada (2V). Após cinco minutos de descanso, 1 ml desta solução foi usada em três diferentes diluições da solução-estoque de glifosato a ser testada (pura, 10x e 100x), em volume de 1 ml; as misturas foram homogeneizadas e incubadas por 60 minutos a 37°C, após os quais foi tomada medida de DO a 820 nm. Os valores obtidos foram aplicados em uma equação obtida a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de fosfato.

4.9 Curvas de crescimento

As cepas testadas foram cultivadas *overnight* em meio mínimo TGP, sob agitação a 150 rpm, a 37°C. Após 24 horas, foi medida a DO_{600nm} de cada cultura e alíquotas foram inoculadas em 10 ml de meio TGP fresco de forma a obter DO inicial de cada cultivo igual de $1,0 \cdot 10^8$ células.ml⁻¹. Os cultivos foram incubados sob agitação a 37 °C, com DO_{600nm} medida em intervalos de 60 minutos, a partir do ponto zero, até o final do experimento. Após 3 horas de incubação – ou assim que a cultura atingisse DO_{600nm} igual a $3,0$ a $5,0 \cdot 10^8$

células.ml⁻¹ - foram adicionados 5 ou 10 mM de glifosato e após 60 minutos, aminoácidos aromáticos 100 µg.ml⁻¹ cada. Foram mantidos ao menos três cultivos de cada cepa: um controle contendo apenas TGP (controle positivo), um contendo meio TGP suplementado com glifosato e um contendo meio TGP suplementado com glifosato e aminoácidos aromáticos. Variações deste experimento foram conduzidas utilizando uma solução de 17 aminoácidos “não aromáticos” 100 µg.ml⁻¹ cada, solução de 20 aminoácidos (casaminoácidos 0,2%) 100 µg.ml⁻¹.

4.10 Ensaios de evolução dirigida na presença de glifosato

As cepas laboratoriais MG1655 e MG *phnCDE*⁺ foram cultivadas em 100 ml de meio mínimo TGP em frasco erlenmeyer de 250 ml, com inóculo inicial de 1,0.10⁸ células da cepa utilizada (para as condições **a** e **b**), sob agitação a 150 rpm, a 37 °C, por 14 dias, com medida de DO_{600nm} e contagem de UFC sendo realizadas em intervalos de 24 horas, nas seguintes condições:

- a) Cultivo fechado em meio líquido das cepas em concentrações diferentes de glifosato (500 µM e 1 mM) como única fonte ou fonte complementar de fosfato e adição de aminoácidos aromáticos na concentração final de 40 µg.ml⁻¹;
- b) Cultivo aberto em meio líquido (trocas de meio em intervalos de 48 horas) das cepas em concentrações diferentes de glifosato (500 µM e 1 mM) como única fonte ou fonte complementar de fosfato e adição de aminoácidos aromáticos na concentração final de 40 µg.ml⁻¹;
- c) Cultivo em placa de ágar TGP ou ágar TGG (glifosato como única fonte de fosfato) em diferentes concentrações de glifosato (1, 5 e 10 mM) com semeadura de 1,0.10⁹ células por placa da cepa utilizada;
- d) Cultivo em placa de ágar TG suplementado com glifosato como única fonte de fosfato ou de carbono em diferentes concentrações (1, 5 e 10 mM) ou ácido aminoetilfosfônico como fonte de fósforo (1 mM), com ou sem adição de aminoácidos aromáticos 40 µg.ml⁻¹, com semeadura de 1,0.10⁹ células por placa da cepa utilizada.

Todos os inóculos iniciais são obtidos a partir de medida da densidade óptica dos cultivos *overnight* em espectrofotômetro com leitura em comprimento de onda de 600 nm. Alíquotas destes cultivos foram diluídas em série até a obtenção do número de células desejado.

4.11 Ensaio de eficiência de biodegradação do glifosato

Para este ensaio foram selecionados os isolados que apresentaram os melhores resultados nas curvas de crescimento conduzidas anteriormente: ATG 2, ATG 5, ATG 6, ATG 8, ALG 9 (ambientais) e Isol1, Isol3, Isol16, Isol17, Isol293 (laboratório).

Foram preparados 210 ml de meio LB suplementado com glifosato 25 mM, volume suficiente para todos os cultivos realizados. Após a distribuição do meio nos frascos erlenmeyer (250 ml), foram obtidas alíquotas de 1 ml a partir de cada frasco para realização de ensaio de quantificação de glifosato (inicial), as quais foram congeladas a -20°C até o momento da análise.

Para o inóculo inicial, todos os isolados foram cultivados *overnight* em meio LB (2 ml), a 30 °C, 150 rpm, a partir dos quais foi medida a DO a 600 nm em espectrofotômetro, realizada diluição seriada e obtidas alíquotas de $1,0 \cdot 10^8$ células de cada um dos cinco isolados que comporiam cada consórcio; tais alíquotas foram inoculadas nos frascos contendo meio LB suplementado com glifosato 25 mM. Foram preparados quatro tipos de cultivo, em triplicata: **1) Isolados ambientais:** os 5 isolados selecionados foram inoculados, em conjunto; **2) Isolados de laboratório:** os 5 isolados selecionados foram inoculados, em conjunto; **3) Controle negativo:** sem inóculo bacteriano para avaliar a degradação espontânea do pesticida; **4) Controle positivo:** cada isolado foi inoculado, separadamente, em vials contendo 2 ml de meio LB suplementado com glifosato 25 mM, em DO_{600nm} inicial de $1,0 \cdot 10^7$ células.

Todos os cultivos foram mantidos a 30 °C, 150 rpm, por 7 dias. Diariamente, foram realizados medida de DO_{600nm} e plaqueamento de alíquotas de 100 µl de cada cultivo em consórcio em ágar LB para contagem de UFC (cada placa foi mantida em estufa a 30 °C por 24 horas). No sétimo dia, o conteúdo total dos cultivos em frascos erlenmeyer (isolados ambientais e de laboratório e controle negativo) foi centrifugado (6.000 rpm, 5 minutos) e alíquotas de 1 ml foram obtidas a partir do sobrenadante (congeladas a -20°C até o momento da análise) para realização de ensaio de quantificação de glifosato (final). Para os cultivos em vial, ao final do período de 7 dias, foi medida DO_{600nm} .

Os ensaios de quantificação de glifosato (“às cegas”) nas amostras dos cultivos (inicial e final) foi realizada pelo laboratório de Controle de Qualidade da empresa Monsanto do Brasil (São José do Rio Preto/SP).

4.12 Indução da resposta severa – ensaio de (p)ppGpp (SPIRA; SILBERSTEIN; YAGIL, 1995)

As bactérias testadas foram cultivadas *overnight* em meio mínimo TGP (Tris 1x, Glicose 0,2%, KH_2PO_4 1mM). No dia seguinte, as culturas foram diluídas em meio TGP fresco para uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,1, incubadas sob agitação, a 37 °C, até alcançar a $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,5. Neste ponto, as bactérias foram inoculadas em 400 μl de meio TGP contendo 0,2 mM de KH_2PO_4 suplementado com 100 $\mu\text{Ci} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ de ^{32}P . Tais cultivos foram incubados em banho a 37 °C, sob agitação, por 60 minutos; após esse período, foi retirada uma alíquota de 20 μl do cultivo (ponto zero), a qual foi transferida a um microtubo contendo 10 μl de ácido fórmico 11 M. À cultura, foi adicionado glifosato (5 ou 10 mM) ou serina hidroxamato (0,01, 0,05, 0,1, 0,5 e 1 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) e novas alíquotas de 20 μl foram retiradas após 15, 30, 60, 75, 90 e 120 minutos, e adicionadas a 10 μl de ácido fórmico 11M.

Variações desse experimento foram realizadas adicionando ao cultivo, 60 minutos após a adição de glifosato, solução de aminoácidos aromáticos (100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ cada) ou solução de 17 aminoácidos não aromáticos (100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ cada) ou solução de 20 aminoácidos (100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ cada). As amostras foram congeladas a -80°C e descongeladas em gelo por duas vezes seguidas, centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e 5 μl do sobrenadante obtido foram aplicados sobre uma placa de POLYGRAM®CEL 300 PEI (Macherey-Nagel) e os nucleotídeos foram separados por cromatografia utilizando KH_2PO_4 1,5M, pH 3,4 como solvente. Uma vez terminada a cromatografia, a placa foi seca em temperatura ambiente.

A radioatividade emitida pelas amostras foi revelada por varredura a laser no equipamento Phosphor-imager (Cyclone-Perkin Elmer) que faz a leitura do ^{32}P , gerando imagens de *spots* contendo o material radioativo incorporado aos nucleotídeos, convertendo a tonalidade das bandas em valores numéricos. Para quantificar o acúmulo dos nucleotídeos nas amostras, utiliza-se o cálculo da razão entre a quantidade de (p)ppGpp pela soma das quantidades de (p)ppGpp e GTP.

5 RESULTADOS

5.1 Tolerância ao glifosato

O herbicida glifosato interfere no metabolismo bacteriano, provocando carência nutricional (aminoácidos aromáticos), que, por sua vez, inibe o crescimento bacteriano e pode, finalmente, vir a ser letal. Neste sentido, é necessário testar a tolerância das cepas em estudo em relação ao glifosato, a fim de avaliar o crescimento bacteriano na presença do herbicida, bem como definir as concentrações limitantes para o crescimento. Para tanto, foram realizados cultivos *overnight* das cepas de interesse em meio mínimo TGP e meio rico LB suplementados com concentrações crescentes de glifosato.

Inicialmente, foram conduzidos testes comparativos em relação aos dois tipos de glifosato utilizados, puro (Sigma-Aldrich) e produto técnico (95,5% de teor do ingrediente ativo), em meio mínimo TGP, avaliando seu efeito sobre o crescimento da cepa selvagem *E. coli* MG1655 (Figura 10). Na concentração de 1 mM, o glifosato técnico não afetou o rendimento da cultura, enquanto que o glifosato puro diminuiu em dois terços a turbidez final das culturas. Quando foi utilizada a concentração de 10 mM, ambas as fontes de glifosato inibiram completamente o crescimento das bactérias. Por limitações de custo, quase todos os ensaios descritos neste trabalho foram realizados com glifosato técnico.

Figura 10 - Efeito de glifosato sobre o rendimento de bactérias da cepa MG1655.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Bactérias foram cultivadas *overnight* em meio mínimo TGP e avaliadas em relação ao rendimento (turbidez medida em 600 nm) das culturas.

As barras representam a média ± DPM (desvio padrão da média) de 5 culturas de cada categoria.

Os ambientes naturais, ou mesmo artificiais, como os sistemas de tratamento de esgotos, apresentam alta carga de matéria orgânica de fácil assimilação pelo metabolismo bacteriano, com a qual o composto xenobiótico deve “competir” para ser utilizado como substrato para o crescimento celular (HELBLING, 2015). Neste contexto, foram realizados cultivos *overnight* em meio rico (LB) suplementados com glifosato (Figura 11). Nesse experimento, foram testadas a cepa selvagem de *E. coli* MG1655, a cepa MG1655 *phnCDE*⁺ (revertente que possui o sistema de captação de fosfonatos PhnCDE ativo), a cepa MG1655 *phn*⁺ Δ *pst*, que expressa o transportador PhnCDE de forma constitutiva e a cepa selvagem de *Pseudomonas aeruginosa* PA14.

Figura 11 - Efeito de glifosato sobre o rendimento de bactérias selvagem e mutantes da cepa MG1655 e a cepa selvagem de *Pseudomonas aeruginosa* PA14.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Bactérias foram cultivadas *overnight* em meio LB suplementado com concentrações crescentes do herbicida e avaliadas em relação ao rendimento das culturas.

As barras representam a média $\pm$ DPM de 3 culturas de cada categoria.

Quando cultivadas em meio LB, todas as cepas testadas demonstraram tolerância ao herbicida, apresentando rendimentos semelhantes aos cultivos controle (sem adição de glifosato). Para avaliar o efeito de diluição de 12,5% no meio LB causado pela adição de glifosato 10 mM (a solução estoque de glifosato é de 80 mM), à cultura controle, foi adicionado um volume equivalente de água estéril. A alta concentração de nutrientes presente no meio de cultivo, em especial aminoácidos, mitigou o efeito tóxico do herbicida sobre as células observado em meio mínimo. Essa diferença ocorre, provavelmente, porque

uma vez que o meio LB possui aminoácidos aromáticos, a inibição da síntese desses aminoácidos pelo glifosato não teria grande impacto.

O efeito de glifosato sobre o rendimento bacteriano em meio mínimo também foi avaliado. Verificou-se que 100 μM de glifosato não afetaram significativamente o rendimento de nenhuma das cepas testadas. A partir de 1 mM, todas as cepas tiveram seu crescimento fortemente inibido (Figura 12). Nos testes de tolerância ao glifosato em meio mínimo TGP, optamos por não utilizar a cepa *P. aeruginosa* PA14 por não apresentar bom crescimento neste meio.

Figura 12 - Efeito de glifosato sobre o rendimento de bactérias selvagem e mutantes da cepa MG1655.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Bactérias foram cultivadas *overnight* em meio mínimo TGP suplementado com concentrações crescentes do herbicida e avaliadas em relação ao rendimento das culturas.

As barras representam a média $\pm$ DPM de 3 culturas de cada categoria.

5.2 Reversão do efeito tóxico de glifosato por aminoácidos aromáticos

Conforme descrito anteriormente, glifosato inibe a síntese de aminoácidos aromáticos. Portanto, a adição de aminoácidos aromáticos ao meio de cultivo aliviará os efeitos negativos do herbicida sobre as células. Para testar essa hipótese, a cepa selvagem MG1655 e a cepa MG1655 *phnCDE+* foram cultivadas *overnight* em meio mínimo TGP suplementado com 1 ou 10 mM de glifosato, na presença de aminoácidos aromáticos (40 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ cada), ou somente com adição de glifosato.

A Figura 13 mostra que, na ausência do herbicida, a adição de aminoácidos aromáticos não alterou o rendimento das culturas não tratadas com glifosato. Porém, reverteu completamente a inibição causada por 1 mM de glifosato em ambas as cepas. Já em bactérias tratadas com 10 mM de glifosato, a reversão da inibição foi parcial na cepa MG1655 (53% em relação ao controle) e quase nula em MG1655 *phnCDE*⁺.

Esses resultados confirmam que o alvo principal de glifosato é a biossíntese de aminoácidos aromáticos, mas também demonstram a existência de um possível efeito secundário do herbicida em maiores concentrações, uma vez que a adição dos aminoácidos não foi suficiente para reverter completamente o efeito de 10 mM glifosato.

Figura 13 - Reversão do efeito inibitório do glifosato sobre o crescimento das cepas MG1655 e MG1655 *phnCDE*⁺.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Bactérias foram cultivadas *overnight* em meio mínimo TGP com adição de glifosato em diferentes concentrações e aminoácidos aromáticos (aas) na concentração final de 40 µg.ml⁻¹.

As barras representam a média ± DPM de 3 culturas de cada categoria.

5.3 Glifosato como fonte de fósforo

O objetivo principal do processo de biodegradação de um composto xenobiótico é a sua utilização como substrato primário por microrganismos. Glifosato contém em sua estrutura átomos de fósforo que podem ser incorporados ao metabolismo bacteriano, caso a cepa seja capaz de quebrar a ligação fosfônica. Para verificar a resposta das cepas de *E. coli* ao uso de glifosato como única fonte de fósforo foram realizados cultivos *overnight* em meio mínimo TG, sem adição de KH₂PO₄, substituído por glifosato em diferentes concentrações finais (Figura 14).

Com base nas DO_{600nm} obtidas após a incubação, houve um crescimento limitado na presença de glifosato como fonte de fósforo, seja na concentração de 100 μM , que não inibe o crescimento (vide Figura 12), ou em concentrações maiores. Entretanto, observou-se que, embora o rendimento tenha sido muito baixo, houve maior crescimento nos cultivos com maiores concentrações de glifosato adicionadas ao meio, sugerindo a necessidade de maiores concentrações do herbicida para uso como fonte de fósforo. Alternativamente, é possível que o glifosato técnico esteja contaminado com fosfato.

Figura 14 - Efeito da oferta de glifosato como única fonte de fósforo sobre o crescimento de bactérias das cepas MG1655, MG1655 *phnCDE*⁺ e MG1655 *phn*⁺ Δ *pst*.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Bactérias foram cultivadas *overnight* em meio mínimo TG suplementado com glifosato em concentrações crescentes e avaliadas em relação ao rendimento das culturas.

As barras representam a média $\pm$ DPM de 2 ensaios independentes, em triplicata.

Para dirimir a dúvida sobre a presença de fosfato contaminante no produto técnico um ensaio de microdeterminação de Pi no glifosato técnico foi realizado. De fato, foi observada a presença de 1% de fosfato contaminante na solução de glifosato técnico. Esse fosfato é, provavelmente, responsável pelo pequeno rendimento observado na Figura 14 nas três cepas testadas.

5.4 Efeito do glifosato sobre a taxa de crescimento

A exposição das células bacterianas ao glifosato induz a carência de aminoácidos aromáticos por inibição da via de biossíntese. Tal carência induz modificações no metabolismo celular de forma a reduzir a síntese proteica e promover a entrada da célula em

fase estacionária, ambas sinalizadas pelo nucleotídeo (p)ppGpp, sintetizado pela enzima RelA. Sob tais premissas, foram conduzidas curvas de crescimento com MG1655 e cepas derivadas, a fim de verificar o efeito de glifosato sobre a taxa de crescimento.

Inicialmente, realizamos curvas de crescimento apenas com a cepa selvagem MG1655, em meio mínimo TGP suplementado com glifosato 5 mM (Figura 15A) e 10 mM (Figura 15B), adicionando soluções de aminoácidos aromáticos e casaminoácidos.

Figura 15 - Curvas de crescimento da cepa MG1655 na presença de glifosato.

Fonte: Autoria própria.

Nota: **Gráfico superior:** Cultivo em meio mínimo TGP com adição de glifosato na concentração final 5 mM após 3 horas de incubação (seta) e adição de aminoácidos aromáticos (AAs) na concentração final de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ou casamoniácidos (Casaas.) na concentração final de 0,2% após 4 horas de incubação (seta).

Gráfico inferior. Cultivo em meio mínimo TGP com adição de glifosato na concentração final 10 mM após 3 horas de incubação (seta) e adição de aminoácidos aromáticos (AAs) na concentração final de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ou casamoniácidos (Casaas.) na concentração final de 0,2% após 4 horas de incubação (seta).

As barras representam a média $\pm$ DPM de 3 culturas de cada categoria, em duplicata.

A adição de glifosato 5 mM inibiu o crescimento das bactérias. Na presença de glifosato 10 mM observamos uma resposta semelhante a 5 mM, porém, o efeito do herbicida sobre o crescimento é mais acentuado. Em ambas as concentrações, a adição de aminoácidos aromáticos às culturas de MG1655 produziu a reversão da inibição causada por glifosato.

Adicionalmente, com as cepas MG1655 e MG $\Delta relA$ foram realizadas curvas de crescimento com medida de DO_{600nm} acompanhada de contagem de UFC, em intervalos de 60 minutos, mostrando resultados similares aos citados acima confirmados pela viabilidade das células em placa de ágar LB (Figura 16).

Figura 16 - Curvas de crescimento das cepas MG1655 e MG1655 $\Delta relA$ na presença de glifosato.

Continua

Fonte: Autoria própria.

Nota: **A.** Cultivo da cepa MG1655 em meio mínimo TGP com adição de glifosato nas concentrações finais de 1 a 5 mM após 3 horas de incubação (seta).

B. Contagem de UFC do cultivo da cepa MG1655 mostrado em A. **C.** Cultivo da cepa MG1655 $\Delta relA$ em meio

mínimo TGP com adição de glifosato nas concentrações finais de 1 a 5 mM após 3 horas de incubação (seta).

D. Contagem de UFC do cultivo da cepa MG1655 $\Delta relA$ mostrado em C.

CT = controle.

Os resultados das curvas conduzidas anteriormente nos levaram a estabelecer a concentração de 5 mM de glifosato como aquela que nos permitiria avaliar o efeito do herbicida sobre as células de forma acentuada, mas sem inibir 100% o rendimento das culturas; essa concentração foi utilizada em ensaios descritos adiante.

5.5 Indução de resposta severa por glifosato

A principal ação do herbicida glifosato em células vegetais e bacterianas é ligar-se à enzima EPSP sintase, competindo com seu substrato natural fosfoenolpiruvato, levando as células a um estado de carência nutricional, sinalizada pelo acúmulo do alarmônio (p)ppGpp e configurando uma resposta severa à exposição a esse pesticida.

Os primeiros ensaios de (p)ppGpp realizados neste trabalho objetivaram avaliar o acúmulo de (p)ppGpp em resposta ao efeito inibitório de glifosato sobre a biossíntese de aminoácidos aromáticos na cepa selvagem MG1655 e no mutante MG1655 $\Delta relA$, incapaz de sintetizar o nucleotídeo sob esta condição de carência nutricional. Ambas as cepas foram expostas a glifosato 5 mM, na presença de ³²P, e mantidas em incubação a 37 °C por 60 minutos após a adição do herbicida (Figura 17). O gráfico mostra os valores médios obtidos por três ensaios independentes.

Figura 17 - Ensaio de (p)ppGpp em presença de glifosato com as cepas MG1655 e MG1655 $\Delta relA$.

Fonte: Autoria própria.

Nota: **A.** Gráfico mostrando os níveis de ppGpp das cepas expostas a glifosato 5 mM.

B. TLC (*Thin-Layer Chromatography*) representativa de um dos ensaios realizados: os spots 1 a 4 são amostras de MG1655 nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos, respectivamente. Os spots 5 a 8 são amostras de MG1655 $\Delta relA$ nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos, respectivamente.

O gráfico e a TLC mostrados na Figura 17 se completam para confirmar a hipótese inicial de que glifosato induz a carência de aminoácidos aromáticos em células bacterianas, levando-as a uma condição de estresse que culmina no acúmulo de ppGpp no meio intracelular, de forma dependente da enzima RelA. Após 15 minutos de exposição ao pesticida, o nível do alarmônio na cepa selvagem eleva-se mais de cinco vezes a partir do valor basal, mantendo-se por, pelo menos, mais 45 minutos; ao mesmo tempo, na cepa mutante, nenhuma alteração significativa na concentração de ppGpp pôde ser observada.

O fato de glifosato induzir a síntese de ppGpp era esperado, mas não havia sido demonstrado. Este é um caso típico de conclusões corroborando o que a teoria havia previsto. Porém, um fato inédito nos chamou a atenção: a ausência do nucleotídeo guanosina pentafofato (pppGpp), normalmente observado em indução de resposta severa por deficiência de aminoácidos. Em todos os ensaios realizados, em qualquer concentração de glifosato (de 1 a 10 mM), na cepa selvagem ou nas cepas mutantes, não pudemos verificar a presença deste nucleotídeo.

A síntese de pppGpp se dá a partir de GTP, que é, em seguida, clivado pela enzima GppA para produzir ppGpp (MECHOLD *et al.*, 2013). O mutante $\Delta gppA$ sintetiza pppGpp na presença de glifosato, mas em menor concentração em relação a ppGpp. Todavia, o mesmo não se observa com a cepa selvagem e há várias possíveis explicações para esta ocorrência. Uma delas é de que o herbicida induziria a síntese de (p)ppGpp diretamente a partir de GDP, produzindo ppGpp quase exclusivamente. Contudo, a concentração relativamente baixa deste precursor nas células poderia ser um fator limitante ao rápido acúmulo de (p)ppGpp em resposta à exposição a glifosato.

Neste contexto, decidimos deletar o gene *gppA* da cepa selvagem MG1655, expondo o mutante ao herbicida para avaliar a resposta em relação ao acúmulo dos nucleotídeos guanosina tetra e pentafofato. Os procedimentos de construção do nocaute foram conduzidos pelo colega de laboratório Henrique Iglesias Neves. Além deste novo mutante, foi incluído nos ensaios seguintes um agente tradicionalmente utilizado como indutor de resposta severa em bactérias, hidroxamato de L-serina (HS), o qual promove um significativo acúmulo de pppGpp e ppGpp nas células expostas (Figura 18).

A presença de pppGpp nos ensaios conduzidos com o mutante $\Delta gppA$ demonstra que a síntese de ppGpp induzida por glifosato ocorre via pppGpp. Dessa forma, a hipótese mais provável é que o herbicida induz uma resposta não muito severa via RelA, que sintetiza lentamente pppGpp (a partir de GTP). A ação catalítica de GppA é mais rápida do que a de RelA resultando na conversão imediata de todo o pppGpp em ppGpp, que se acumula, em detrimento de seu precursor.

Figura 18 - Ensaio de (p)ppGpp na presença de glifosato ou de hidroxamato de L-serina (HS).

Fonte: Autoria própria.

Nota: **A.** Gráficos mostrando os níveis de (p)ppGpp das cepas MG1655 e MG Δ gppA.

B. TLC representativa de um dos ensaios realizados: os spots 1 a 4 são amostras de MG1655 tratadas com glifosato 5mM e os spots 5 a 8 são de amostras tratadas com HS 1 mg.ml⁻¹, nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos. Os spots 9 a 12 são amostras de MG Δ gppA tratadas com glifosato e os spots 13 a 16 são de amostras tratadas com HS, nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos.

As barras representam a média $\pm$ DPM de 3 culturas de cada categoria.

Uma vez que diferentes concentrações de glifosato foram testadas sem que pudessem ser visualizados os *spots* de pppGpp, optamos por avaliar se concentrações de HS inferiores a 1 mg.ml^{-1} poderiam produzir um efeito semelhante ao do herbicida, ou seja, ausência de pppGpp, na cepa selvagem MG1655 (Figura 19).

Figura 19 - Ensaio de (p)ppGpp com a cepa MG1655.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Bactérias foram cultivadas em meio mínimo TGP (Pi $0,2 \text{ mM}$) com adição de concentrações crescentes de hidroxamato de L-serina (HS) (0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1 mg.ml^{-1}), para quantificação dos nucleotídeos ppGpp (esquerda) e pppGpp (direita).

As barras representam a média $\pm$ DPM de 3 culturas de cada categoria, exceto para as concentrações finais de 0,05 e 0,5 mg/ml de HS incluídos em apenas um dos ensaios.

Os resultados indicam que, a partir da concentração $0,05 \text{ mg.ml}^{-1}$ - 20 vezes menor do que aquela padronizada para os ensaios de extração de (p)ppGpp – já se observa o acúmulo dos nucleotídeos pppGpp e ppGpp nas células expostas a HS, em valores próximos aqueles obtidos em 1 mg.ml^{-1} . Dessa forma, parece razoável afirmar que a inexistência de pppGpp na resposta severa induzida por glifosato é uma característica exclusiva deste composto (em vista do que se sabe atualmente sobre essa resposta celular), independente da concentração a que são submetidas as cepas.

Em sessões anteriores, foram apresentados os resultados de reversão do efeito inibitório de glifosato pela adição de aminoácidos aromáticos às culturas bacterianas. Neles, foi possível verificar que tal adição após algumas horas de incubação na presença de glifosato permitiu a retomada de crescimento pelas populações das cepas testadas. Neste contexto, o passo seguinte nos ensaios de (p)ppGpp foi avaliar se a resposta severa induzida pelo herbicida também poderia ser revertida, em termos de diminuição do nível de ppGpp acumulado pelas células. A cepa selvagem MG1655 foi exposta a glifosato 5 mM em três

diferentes condições: adição dos 3 aminoácidos aromáticos, de 17 aminoácidos “não aromáticos” ou de todos os 20 aminoácidos (Figura 20).

Figura 20 - Ensaio de (p)ppGpp com a cepa MG1655.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Bactérias foram cultivadas em meio mínimo TGP (Pi 0,2 mM) com adição de glifosato 5 mM (a partir do tempo zero) e adição de aminoácidos (após 60 minutos de incubação).

A. Gráficos mostrando os níveis de (p)ppGpp da cepa MG1655. 3 aas = aminoácidos aromáticos na concentração final de 100 µg.ml⁻¹ cada, 17 aas = aminoácidos “não aromáticos” na concentração final 100 µg.ml⁻¹ cada, 20 aas = solução de 20 aminoácidos na concentração final 100 µg.ml⁻¹ cada.

B. TLC representativa de um dos ensaios realizados: os *spots* 1 a 7 são amostras de MG1655 tratadas com glifosato, nos tempos 0, 15, 30, 60, 75, 90 e 120 minutos, os *spots* 8 a 11 são amostras de MG1655 tratadas com glifosato nos tempos 0, 15, 30, 60 minutos, e os *spots* 12 a 14 são as mesmas amostras após adição de aminoácidos aromáticos 100 µg.ml⁻¹ cada, nos tempos 75, 90 e 120 minutos.

As barras em A representam a média ± DPM de 3 culturas de cada categoria.

A Figura 20A mostra que na ausência de glifosato nenhum acúmulo expressivo de (p)ppGpp pôde ser observado; entretanto, na presença do herbicida, rapidamente a concentração de ppGpp se eleva em cerca de quatro a cinco vezes em relação ao nível basal, mas decai também de forma rápida para valores próximos aqueles dos cultivos sem glifosato, quando são adicionados ao cultivo aminoácidos aromáticos ou, principalmente, a solução de 20 aminoácidos, cujo efeito foi o mais significativo. Na placa de TLC representativa, pode-se observar que os *spots* de ppGpp no cultivo com glifosato são visualizados até a amostra de 120 minutos, porém, os *spots* desaparecem a partir da amostra de 75 minutos em resposta à adição de aminoácidos aromáticos, tornando clara a completa reversão da resposta severa em nível celular.

5.6 Ensaios de evolução dirigida

Os ensaios descritos nas seções anteriores demonstraram que as cepas de *E. coli* K12 têm seu crescimento inibido pelo glifosato, e não utilizam este composto como fonte de fósforo, portanto, expor tais células ao herbicida constitui uma situação adversa para o crescimento.

Com o objetivo de obter mutantes com capacidade metabólica favorável ao uso de glifosato como substrato para o crescimento, foi conduzido um ensaio de evolução dirigida utilizando a cepa MG1655 *phnCDE+*, mantendo **cultivos fechados**, em incubação sob agitação, a 37 °C, por 13 dias, em duplicata, em três diferentes condições: 1) meio mínimo TGP suplementado com 50 µM (KH₂PO₄) e 1 mM de glifosato (Figura 21A); 2) meio mínimo TG sem adição de fosfato, contendo 500 µM de glifosato (Figura 21B); 3) meio mínimo TG sem adição de fosfato, contendo 1 mM de glifosato e uma solução de aminoácidos aromáticos na concentração final de 40 µg.ml⁻¹ cada (Figura 21C). Diariamente, ao longo do período de incubação, foi medida a turbidez de cada cultivo.

Figura 21 - Ensaios de evolução dirigida em resposta ao glifosato com a cepa MG1655 *phnCDE*⁺.

Fonte: Autoria própria.

Nota: **A.** Ensaio em cultivo fechado meio mínimo TGP suplementado com 50 μ M (KH_2PO_4) e 1 mM de glifosato. Controle: meio mínimo TGP com KH_2PO_4 50 μ M.

B. Ensaio de evolução em cultivo fechado meio mínimo TG sem adição de fosfato, contendo 500 μ M de glifosato. Controle: meio mínimo TGP com KH_2PO_4 1 mM.

C. Ensaio de evolução em cultivo fechado meio mínimo TG sem adição de fosfato, contendo 1 mM de glifosato e uma solução de aminoácidos aromáticos na concentração final de 40 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ cada.

Controle: meio mínimo TG (sem KH_2PO_4) e adição de aminoácidos aromáticos na concentração final de 40 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Os resultados apresentados na Figura 21A indicam que os cultivos contendo meio mínimo com fosfato em baixa concentração suplementado com glifosato não alcançaram

valores de DO_{600nm} significativamente diferentes daqueles valores obtidos com o controle (sem glifosato). Aparentemente, nenhuma das duas culturas deu origem a mutantes com capacidade de utilização de glifosato como fonte de fósforo. A Figura 21B confirma os resultados dos ensaios anteriormente apresentados: as células não foram capazes de usar glifosato como fonte de fósforo, mantendo uma DO_{600nm} da ordem de 10^7 células.mL⁻¹ e, provavelmente, não houve surgimento de mutantes capazes de utilizar glifosato, haja vista a manutenção da DO em valores similares ao longo do período de incubação. A figura 21C se assemelha à anterior, mas apresenta valores de DO_{600nm} superiores, da ordem de 10^8 células.mL⁻¹, para os cultivos contendo glifosato. A presença de aminoácidos promoveu um incremento no rendimento das culturas, mas, possivelmente, esse aumento seja devido a uma maior concentração de fosfato contaminante (no glifosato) em relação aos cultivos apresentados na Figura 21B. Sob essa terceira condição também não foi possível verificar o surgimento de mutantes capazes de utilizar glifosato, durante o período de incubação.

Uma observação a ser ressaltada é a de que até o final do período de incubação, os cultivos sob todas as condições, não apresentaram queda nos valores de DO_{600nm} , contrariando o que seria esperado para um cultivo fechado prolongado. Sugere-se uma possível contribuição do glifosato para a manutenção das células em fase estacionária em virtude do acúmulo do nucleotídeo ppGpp, desencadeando a resposta severa, como foi visto na seção 5.5.

Um segundo ensaio de evolução foi conduzido também com a cepa MG1655 *phnCDE*⁺, mantendo **cultivos abertos**, em incubação sob agitação, a 37 °C, por 14 dias, nas três condições descritas acima: 1) TGP com KH₂PO₄ 50 µM + glifosato 1 mM (Figura 22A); 2) TG sem adição de fosfato + glifosato 500 µM (Figura 22B); 3) TG sem adição de fosfato + glifosato 1 mM + aminoácidos aromáticos 40 µg.mL⁻¹ (Figura 22C). A cada 48 horas, alíquotas de 1 ml de cada cultivo foram diluídas nos respectivos meios frescos. A partir do 11º dia de incubação não foram mais realizadas transferências para meios de cultivo fresco. Diariamente, ao longo do período de incubação, foi medida a DO_{600nm} de cada cultivo. Apenas um cultivo-teste e um cultivo controle foram mantidos para cada condição estabelecida.

Novamente, foi possível observar que os valores de DO_{600nm} se mantiveram estáveis até o fim do período de incubação, sem quedas acentuadas. Na Figura 22A, a curva de rendimento do cultivo-teste acompanhou a curva do controle e as oscilações dos valores de DO podem ser atribuídas à transferência para meio de cultivo fresco, porém, mantendo sempre a mesma ordem de grandeza (10^8 células.mL⁻¹), semelhante ao que se observou no

experimento de cultivo fechado na mesma condição. A Figura 22B também se assemelha ao experimento anterior, sob a mesma condição, mantendo DO da ordem de 10^7 células.mL⁻¹, sem elevações acentuadas dos valores de DO, indicando que, possivelmente, não surgiram mutantes com capacidade metabólica para usar glifosato como fonte de fósforo. Por fim, a Figura 22C demonstra mais uma vez que a adição de aminoácidos aromáticos ao cultivo-teste não alterou a incapacidade da cepa MG1655 *phnCDE*⁺ em utilizar o herbicida como substrato para o crescimento.

Figura 22 - Ensaio de evolução dirigida em resposta ao glifosato com a cepa MG1655 *phnCDE*⁺.

Fonte: Autoria própria.

Nota: **A.** Ensaio em cultivo fechado em meio mínimo TGP com KH₂PO₄ 50 µM e adição de glifosato 1 mM. Controle: meio mínimo TGP com KH₂PO₄ 50 µM.

B. Ensaio de evolução em cultivo fechado em meio mínimo TG com adição de glifosato 500 µM. Controle: meio mínimo TGP com KH₂PO₄ 1 mM.

C. Ensaio de evolução em cultivo fechado em meio mínimo TG com adição de glifosato 1 mM e aminoácidos aromáticos na concentração final de 40 µg.mL⁻¹.

Controle: meio mínimo TG (sem KH₂PO₄) e adição de aminoácidos aromáticos na concentração final de 40 µg.mL⁻¹.

As linhas azuis representam os cultivos controle e as linhas vermelhas representam os cultivos teste.

Um terceiro ensaio de evolução foi conduzido com a cepa MG1655 *phnCDE*⁺ utilizando glifosato como fonte suplementar (adição de glicose 0,02%) ou fonte única de

carbono (glifosato 5 mM), com e sem adição de aminoácidos aromáticos ao meio de cultivo, mas os resultados foram desencorajadores. Após 10 dias de incubação, nenhum dos cultivos apresentou elevação do rendimento, a partir do inoculo inicial de DO 0,1, a centrifugação do conteúdo total de cada cultivo não apresentou formação de pellet de células ao fundo do tubo e o plaqueamento em ágar LB de cerca de 100 µl do material centrifugado (fundo do tubo) também não revelou aparecimento de UFCs, indicando que de fato as células inoculadas morreram.

Aparentemente, a cepa MG1655 *phnCDE*⁺ mesmo expressando constitutivamente o transportador de fosfonatos e sendo capaz de levar glifosato para o meio intracelular, não dispõe de habilidade para clivar a molécula do herbicida e metabolizá-la como um substrato para crescimento, seja como fonte de carbono ou de fósforo.

5.6.1 Seleção de mutantes em placa

Plaqueamentos são ferramentas muito úteis em ensaios de obtenção de mutantes. O isolamento de colônias com as características de interesse permite a obtenção de mutantes variados, uma vez que, dadas as distâncias entre as colônias, estas não competem entre si evitando a eliminação de mutantes menos aptos (*genetic sweep*). Se a pressão seletiva ocorre em meio líquido, em algum momento a população que apresenta este novo fenótipo irá sobrepor-se àquela que apresenta o genótipo inicial; se o processo seletivo ocorre em placa, os variantes formarão colônias sobre o restante da população (CAIRNS; OVERBAUGH; MILLER, 1988), surgindo possíveis mutantes em resposta às pressões seletivas impostas.

Neste sentido, foram realizados experimentos de evolução através de plaqueamentos das cepas em meio seletivo contendo glifosato como única fonte de fósforo. Cultivos *overnight* de MG1655 e MG1655 *phnCDE*⁺ em meio mínimo TGP foram centrifugados, lavados e ressuspensos em 1 ml de salina 0,9% e 10⁹ células de cada cepa foram plaqueadas em meio mínimo TG contendo 5 ou 10 mM de glifosato (TGG), além de ágar TGP como controle. As placas envoltas com *parafilm* foram incubadas em estufa a 37 °C por 14 dias e diariamente verificou-se o surgimento de colônias.

A partir do sexto dia até o 14º dia de incubação foram visualizadas colônias nas duas concentrações de glifosato, mas somente nas placas semeadas com MG1655. Ao todo, foram obtidas 15 colônias de tamanho pequeno, as quais foram repicadas em ágar TGP e ágar TG suplementado com concentrações crescentes de glifosato, de 100 µM a 10mM;

apenas duas das colônias isoladas não repetiram seu crescimento em glifosato 10 mM. Os 13 isolados restantes foram repetidamente testados na presença de glifosato, tanto em placa quanto em meio líquido e, por fim, foi delimitado um conjunto de 8 isolados que demonstraram crescimento maior e contínuo na presença do herbicida, os quais foram utilizados nos ensaios descritos na seção 5.7.

5.7 Isolados dos ensaios de evolução dirigida

Os experimentos de evolução dirigida em meio líquido usando a cepa mãe MG1655 *phnCDE*⁺ descritos na seção 5.6, resultaram em um conjunto de 18 culturas mistas (alíquotas dos cultivos no último dia dos ensaios de evolução dirigida), preservadas em glicerol 20% e mantidas a -80°C. O ensaio de evolução realizado em placa (vide seção 5.6.1) resultou em 10 colônias isoladas, as quais foram cultivadas em meio LB para preservação a -80°C em glicerol 20%. As culturas congeladas foram repicadas em ágar LB de onde foram obtidas colônias isoladas utilizadas como pré-inóculo nos ensaios abaixo descritos. Dessa forma, tanto as colônias obtidas por repique das culturas mistas, quanto as colônias puras originadas no ensaio de evolução dirigida em placa, serão aqui denominadas **isolados**, no intuito de facilitar a descrição dos resultados obtidos. Cabe acrescentar que, apesar dos ensaios de evolução dirigida em meio líquido resultarem em culturas mistas, todos foram iniciados a partir de colônias puras da cepa MG1655 *phnCDE*⁺ e, no repique em ágar LB após o congelamento, as colônias obtidas eram morfologicamente muito semelhantes.

Inicialmente, os isolados foram estriados e repicados em placas de ágar TGP suplementado com glifosato e TGG (glifosato como única fonte de fósforo) repetidas vezes, além de cultivos em concentrações crescentes de glifosato adicionado ao meio, a fim de selecionarmos aqueles que demonstrassem tolerância ao herbicida de forma mais consistente. De forma geral, os isolados do ensaio de evolução em placa apresentaram os maiores rendimentos em todas as condições, com exceção de alguns isolados dos ensaios realizados em meio líquido, por vezes atingindo DO_{600nm} em torno de 2.10⁹ células.ml⁻¹, rendimento superior àqueles da cepa ancestral nas mesmas condições.

Posteriormente, foram realizados ensaios de tolerância com cultivos em microplaca em períodos de incubação de 72 horas, usando glifosato como suplemento ao meio (5 e 10 mM) ou como fonte de fósforo (10 mM), em paralelo com a cepa selvagem MG1655 (Figura 23). Os isolados identificados como 241 a 246, 291 a 296, 381 a 386 resultam dos ensaios

de evolução dirigida em meio líquido e os isolados 1, 2, 3, 10, 15, 16, 17 e 42 resultam dos ensaios em placa.

Figura 23 - Efeito de glifosato sobre o rendimento dos cultivos de 26 isolados obtidos nos experimentos de evolução dirigida.

Continua

Fonte: Autoria própria.

Nota: Bactérias foram cultivadas por 72 horas em meio mínimo TGP (controle), suplementado com glifosato nas concentrações finais de 5 ou 10 mM e meio mínimo TG com adição de glifosato como única fonte de fósforo (TGG) na concentração final 10 mM.

As barras representam a média $\pm$ DPM de 2 culturas de cada categoria, em triplicata.

Os resultados mostram que os maiores rendimentos, na presença de glifosato ou no uso do mesmo como fonte de fósforo, foram apresentados pelos isolados nos ensaios de evolução em placa (1, 2, 3, 10, 15, 16, 17 e 42), além dos isolados 292, 293, 296 e 382, obtidos a partir dos ensaios de evolução dirigida em meio líquido, com destaque para o isolado 293.

Apesar de vários isolados apresentarem resultados promissores em sua capacidade de sobreviver na presença do herbicida, optamos por selecionar cinco isolados (1, 3, 16, 17 e 293) para realização de ensaios posteriores. Os isolados 1, 3, 16, 17 e 293 foram testados em curvas de crescimento em meio mínimo TGP suplementado com glifosato 10 mM, com e sem adição de aminoácidos aromáticos (Figura 24).

Os resultados demonstram que os rendimentos dos cultivos nas duas condições estabelecidas foram bastante semelhantes. Avaliando separadamente cada isolado, pode-se observar que a adição de glifosato, e mesmo de aminoácidos aromáticos, não afetaram o crescimento das culturas, sendo os valores de DO_{600nm} muito próximos entre as duas condições testadas.

Figura 24 - Curva de crescimento na presença de glifosato com os isolados dos ensaios de evolução dirigida.

Fonte: Autoria própria.

Nota: **A.** Bactérias foram cultivadas em meio mínimo TGP com adição de glifosato 10 mM (após 4 horas de incubação).

B. Bactérias foram cultivadas em meio mínimo TGP com adição de glifosato 10 mM (após 4 horas de incubação) e adição de aminoácidos aromáticos na concentração final de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (após 5 horas de incubação – seta cheia).

Os controles foram omitidos para facilitar a visualização das curvas.

Adicionalmente, foram realizados ensaios de (p)ppGpp com os isolados selecionados (1, 3, 16, 17, 293) (Figura 25). Observando a placa de TLC, nota-se que nenhum dos isolados sintetiza pppGpp assim como a cepa selvagem MG1655 e que apenas o isolado 293 se destaca pela intensidade de cor dos *spots* de ppGpp, cujo acúmulo progressivo expresso na curva foi em torno de 4 vezes em relação ao nível basal (semelhante a MG1655). O gráfico também mostra que os isolados 1, 16 e 17 apresentam o mesmo aumento progressivo dos níveis de ppGpp, porém menos intenso (em média, 2,3 vezes acima do nível basal), diferentemente do que ocorre na cepa selvagem, cuja concentração do alarmônio atinge o

máximo em 15 minutos de exposição ao herbicida. Cabe ainda destacar em relação ao isolado 1, um nível basal de ppGpp superior aos demais isolados.

Figura 25 - Ensaio de ppGpp em presença de glifosato com os isolados 1, 3, 16, 17 e 293 obtidos nos ensaios de evolução dirigida.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Bactérias foram cultivadas por 1 hora em meio mínimo TGP (Pi 0,2 mM) com adição de glifosato na concentração final de 10 mM desde o tempo zero.

A. Gráfico mostrando os níveis de ppGpp de cada isolado exposto ao glifosato. As barras representam a média $\pm$ DPM de 3 culturas de cada categoria.

B. TLC representativa de um dos ensaios realizados: isolados 1, 3, 16, 17 e 293, em sequência, nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos.

5.8 Isolados das amostras de água fluvial

Estudos de degradação bacteriana de glifosato envolvem isolamento e seleção de linhagens bacterianas puras com novas ou maiores capacidades de detoxificação para uso biotecnológico industrial e biorremediação de solos e águas poluídas (SZÉKÁCS; DARVAS, 2012; STUDNIK *et al.*, 2015). Um dos objetivos deste trabalho foi isolar espécies

bacterianas a partir de amostras de água bruta do rio Piaguí, localizado em Guaratinguetá/SP. Para tanto, foram realizados cultivos de enriquecimento tanto em meio rico LB suplementado com glifosato 25 mM quanto em meio mínimo TG usando glifosato 25 mM como fonte de fósforo. Um frasco de cultivo contendo apenas meio LB foi mantido apenas como um “estoque” da microbiota da amostra de água fluvial coletada.

Após sete dias de incubação na presença de glifosato, alíquotas dos cultivos foram plaqueadas diretamente em ágar LB, a partir das quais repetidos repiques e reisolamentos foram feitos, pois, especialmente no meio LB acrescido de glifosato, observou-se o crescimento de fungos, formando um micélio consistente, que dificultou, inclusive, a obtenção de alíquotas a partir desse material e nas placas de ágar LB semeadas com estes cultivos houve crescimento majoritário de fungos. Ao todo foram recuperados 18 isolados bacterianos, sendo 10 a partir do cultivo em meio LB acrescido de glifosato 25 mM (identificados como ALG 1 a 10) e 8 isolados a partir de meio mínimo TG acrescido de glifosato 25 mM (identificados como ATG 1 a 8), os quais foram preservados em glicerol 20% a -80°C.

Os isolados passaram a ser repetidamente testados em condições semelhantes ao enriquecimento e outras, em menores concentrações de glifosato, e alguns deles não foram capazes de repetir seu crescimento inicial; a presença massiva de fungos filamentosos nos cultivos de enriquecimento pode explicar esse fato, pois, provavelmente, estes organismos degradaram o herbicida do meio, protegendo as células bacterianas (Figura 26).

Figura 26 - Efeito de glifosato sobre o rendimento dos cultivos dos 18 isolados ambientais obtidos a partir de amostras de água fluvial.

Continua

Fonte: Autoria própria.

Nota: Bactérias foram cultivadas por 24 horas em meio mínimo TGP (controle), suplementado com glifosato na concentração final de 10 mM e meio mínimo TG com adição de glifosato como única fonte de fósforo (TGG) na concentração final de 10 mM.

O gráfico superior contém os rendimentos dos cultivos dos isolados ATG 1 a 8 e o gráfico inferior contém os rendimentos dos cultivos dos isolados ALG 1 a 10.

As barras representam a média $\pm$ DPM de 2 culturas de cada categoria, com 5 réplicas cada.

A partir destes e de outros resultados obtidos com os cultivos, os isolados ATG 2, 5, 6, 8 e ALG 9 foram selecionados para serem submetidos aos ensaios curva de crescimento e extração de (p)ppGpp.

As curvas de crescimento foram conduzidas de forma a acompanhar a resposta destes isolados à adição de glifosato no meio de cultivo e a possível reversão do efeito causado sobre o rendimento das culturas pela adição de aminoácidos aromáticos (Figura 27).

Todos os isolados ambientais aqui testados apresentaram rendimento superior à MG1655 nas duas condições, destacando-se o isolado ATG 5. Em contrapartida, este isolado foi aquele que menos se beneficiou pela adição de aminoácidos aromáticos. O isolado ATG 2 e ALG 9 foram os menos afetados.

Figura 27 - Curva de crescimento na presença de glifosato com os isolados de água fluvial e a cepa MG1655.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Bactérias foram cultivadas em meio mínimo TGP com adição de glifosato na concentração final de 10 mM (após 4 horas de incubação) e adição de aminoácidos aromáticos na concentração final de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (após 6 horas de incubação – seta cheia).

A. Adição de glifosato 10 mM.

B. Adição de glifosato 10 mM e aminoácidos aromáticos.

Os controles foram omitidos para facilitar a visualização das curvas.

Foram realizadas 3 culturas de cada categoria.

Os ensaios de extração de (p)ppGpp apresentaram resultados interessantes (Figura 28). O isolado ALG 9 não sintetiza os nucleotídeos (p)ppGpp, ao menos não em níveis detectáveis pelo método utilizado; o isolado ATG 5 apresentou *spots* de ppGpp e pppGpp muito claros. Estes *spots* foram quantificados, mas não indicaram um aumento em relação ao nível basal; o isolado ATG 6 foi o único a demonstrar inequívoco aumento dos dois nucleotídeos em presença de glifosato, com o nível de pppGpp sendo, em média, 1,6 vezes maior do que ppGpp; os isolados ATG 2 e ATG 8 também sintetizaram ppGpp, mas não

pppGpp, quando expostos a glifosato, sugerindo uma possível variação entre as espécies bacterianas em relação à resposta severa induzida pelo herbicida.

Figura 28 - Ensaio de (p)ppGpp na presença de glifosato com os isolados de água fluvial ATG 2, 5, 6, 8 e ALG 9.

Continua

Conclusão

Fonte: Autoria própria.

Nota: Bactérias foram cultivadas por 1 hora em meio mínimo TGP (Pi 0,2 mM) com adição de glifosato na concentração final de 10 mM desde o tempo zero.

A. Gráfico mostrando os níveis de ppGpp de cada isolado exposto ao glifosato.

B. Gráfico mostrando os níveis de pppGpp dos isolados ATG 5 e 6 expostos ao glifosato. As barras representam a média $\pm$ DPM de 3 culturas de cada categoria.

C. TLC representativa de um dos ensaios realizados: isolados ATG 2, 5, 6, 8 e ALG 9, em sequência, nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos.

Em paralelo à execução dos ensaios descritos acima, foi conduzido o sequenciamento dos genes 16S rDNA dos isolados ATG 2, ATG 5, ATG 6, ATG 8 e ALG 9. O quadro 3 mostra os gêneros prováveis de cada isolado. Todos os isolados pertencem à classe Gammaproteobacteria, os gêneros *Enterobacter*, *Serratia* e *Pantoea* fazem parte da família **Enterobacteriaceae**, enquanto *Aeromonas* e *Acinetobacter* pertencem às famílias **Aeromonadaceae** e **Moraxellaceae**, respectivamente.

Quadro 3 - Identificação em nível de gênero, por sequenciamento dos genes 16S rDNA, de cinco isolados obtidos a partir de amostra de água do rio Piaguí, Guaratinguetá/SP.

	Gênero	Query cover
ATG 2	<i>Aeromonas</i> sp.	97%
ATG 5	<i>Enterobacter</i> sp.	97%
ATG 6	<i>Serratia</i> sp.	94%
ATG 8	<i>Acinetobacter</i> sp.	92%
ALG 9	<i>Pantoea</i> sp.	86%

Fonte: Autoria própria.

5.9 Ensaio de biodegradação

Este ensaio teve como objetivo avaliar a resposta em conjunto dos isolados selecionados, como um consórcio bacteriano, quando expostos a uma alta concentração de glifosato (25 mM) em meio de cultivo rico LB, de forma a simular uma situação ambiental possível (como em solos ou corpos hídricos que recebem alta carga do herbicida). Glifosato 25 mM é comparável à concentração do herbicida aplicada em cultivos agrícolas a qual varia de 21 a 42 mM (THONGPRAKAISANG *et al.*, 2013). Cada conjunto de isolados, ambiental e laboratorial, foi cultivado em triplicata a partir de três pré-inóculos independentes. Paralelamente, foram mantidos frascos controle contendo apenas meio LB e glifosato, sem inóculo bacteriano, em triplicata, para acompanhar o processo de degradação espontânea do pesticida.

Alíquotas obtidas de cada um dos frascos, no início e no final do período de incubação, foram analisadas para quantificação e cálculo do percentual de remoção de glifosato nas três condições propostas. Os resultados desta análise revelaram que não houve redução significativa na concentração de glifosato nas amostras, seja por ação bacteriana ou espontânea, e, em média, 3300 ppm do herbicida foram encontrados nas amostras iniciais e finais. Os controles (cultivos sem inóculo do consórcio bacteriano) apresentaram um aumento de 51 ppm (1,54%); houve uma pequena remoção de glifosato de 27 ppm (0,82%) e 15 ppm (0,45%) para os isolados ambientais e laboratoriais, respectivamente.

Todavia, nota-se que não houve aumento do rendimento de ambos os isolados ao longo do período de incubação (Quadro 4). Pela observação do quadro 4, nota-se que para a réplica 3 do consórcio de bactérias obtidas nos ensaios de evolução dirigida houve um aumento significativo na contagem de UFC, variando entre 0 no 5º dia de incubação a 18.10^3 células.ml⁻¹ no sexto dia do experimento, e visualização de micélio fúngico no último dia de incubação. Tal fato pode ser explicado por uma possível contaminação do cultivo ao longo do experimento, tanto por bactérias quanto por fungos, estes últimos possibilitando a sobrevivência das primeiras, assim como ocorreu nos cultivos de enriquecimento para isolamento de cepas presentes nas amostras de água do rio Piaguí. Na réplica 3 do consórcio de bactérias ambientais, observou-se uma contagem inicial de células elevada, seguida pela completa ausência de UFCs no dia seguinte (entre os dias 1 e 2 de incubação) e também no 5º dia de incubação, e reaparecimento de colônias nos dias 3, 4, 6 e 7 do ensaio. Tais resultados podem ser um reflexo da dificuldade em realizar a contagem de UFC obtendo-se

alíquotas de pequeno volume (100 µl) dos cultivos, as quais podem não conter células viáveis para o plaqueamento ou mesmo em número suficiente.

Os cultivos em separado de cada um dos isolados, após 7 dias de incubação, atingiram DO_{600nm} de 0,2 – 0,3 para os isolados laboratoriais e entre 0,2 – 0,65 para os isolados ambientais.

O baixo rendimento observado nos cultivos indica que as bactérias não foram capazes de sobreviver na presença de glifosato, mesmo em meio rico que pode prover o aporte de aminoácidos aromáticos cuja carência é promovida pelo herbicida. É possível ainda argumentar que 25 mM de glifosato seja uma concentração muito elevada para a sobrevivência das células, mas esta foi a mesma concentração adicionada ao meio nos cultivos de enriquecimento que nos permitiram isolar bactérias de amostras de água do rio que drena parte da água utilizada nos campos de arroz irrigado. Considerando o percentual do ingrediente ativo contido nos produtos comercializados e as diluições recomendadas pelo fabricante, calculamos que, aproximadamente, 20 a 25 mM de glifosato são aspergidos sobre as plantas-alvo.

Todo o conjunto de resultados e dificuldades verificados nos ensaios realizados com as várias cepas e isolados utilizados, em presença de glifosato, nos permitem sugerir que ocorra um efeito secundário de toxicidade do herbicida, além da interrupção da biossíntese de aminoácidos aromáticos, possivelmente, interferindo em outros processos metabólicos que inviabilizem a sobrevivência da célula bacteriana após a exposição ao glifosato. Tal efeito reduziria consideravelmente as possibilidades de degradação bacteriana do pesticida, tornando-o persistente no ambiente em que é utilizado e afetando negativamente a composição e atividade da microbiota presente no solo e corpos hídricos.

Quadro 4 - Ensaio de biodegradação.

		CONS. LAB 1	CONS. LAB 2	CONS. LAB 3	CONS. ÁGUA 1	CONS. ÁGUA 2	CONS. ÁGUA 3
<i>Dia 1</i>	DO600nm	0,03	0	0,001	0,03	0,03	0,03
	UFC	118.10 ⁶	876.10 ⁶	816.10 ⁶	3.10 ⁷	32.10 ⁶	17.10 ⁶
<i>Dia 2</i>	DO600nm	0,17	0,16	0,13	0,16	0,14	0,13
	UFC	14.10 ⁶	13.10 ⁶	4.10 ⁶	1.10 ⁶	0	0
<i>Dia 3</i>	DO600nm	0,18	0,2	0,16*	0,21	0,2	0,2
	UFC	4.10 ⁵	4.10 ⁵	8.10 ⁵	2.10 ⁵	0	10 ⁵
<i>Dia 4</i>	DO600nm	0,19	0,17	0,13*	0,18	0,21	0,19
	UFC	11.10 ⁴	10 ⁵	12.10 ⁴	8.10 ⁴	0	14.10 ⁴
<i>Dia 5</i>	DO600nm	0,14	0,14	0,08*	0,18	0,14	0,14
	UFC	4.10 ⁵	0	0	0	0	0
<i>Dia 6</i>	DO600nm	0,16	0,14	0,11*	0,15	0,14	0,15
	UFC	0	0	18.10 ³	400	400	1,1.10 ³
<i>Dia 7</i>	DO600nm	0,04	0,08	1,57**	0,08	0,09	0,04
	UFC	0	20	incontável*	50	1	2180

Fonte: Autoria própria.

Nota: Medida de DO_{600nm} e contagem de UFC de consórcios bacterianos, em triplicata, dos isolados de água fluvial (CONS. ÁGUA 1, 2, 3) e dos isolados dos ensaios de evolução dirigida (CONS. LAB 1, 2, 3) em meio LB.

Os valores de UFC são contabilizados em número de células.ml⁻¹.

*Observado crescimento de fungos filamentosos.

**Observado grande micélio de fungos filamentosos o qual dificultou a retirada de alíquota para medida de DO.

5.10 Parâmetros físico-químicos das amostras de água do rio

As amostras de água bruta foram coletadas no rio Piaguí, em ponto sob a ponte da Estrada da Colônia, localizada no município de Guaratinguetá, pertencente à Região Metropolitana do Vale do Paraíba e Litoral Norte, nordeste do Estado de São Paulo.

No dia da primeira coleta de amostras de água do rio, a temperatura variou entre 14 e 31 °C ao longo do dia (entre 6 e 20 horas), atingindo a temperatura máxima às 15 horas, coincidindo com o horário da coleta. A pressão atmosférica média para o dia foi 720 mmHg e a umidade relativa do ar era de 33% no momento da coleta; o céu estava parcialmente nublado. Em virtude da contaminação do meio de cultivo utilizado para o ensaio de enriquecimento fez-se necessária uma segunda coleta de amostras de água bruta, realizada uma semana após a primeira coleta. Neste segundo dia, em Guaratinguetá/SP, entre 6 e 20 horas, a pressão atmosférica média foi de 716 mmHg, a temperatura variou entre 14 e 32

°C, atingindo a temperatura máxima do dia às 14 horas, coincidindo com o horário da coleta, quando a umidade relativa do ar era de 26%; o céu estava parcialmente nublado.

O Quadro 5 apresenta os resultados obtidos na caracterização físico-química das amostras de água bruta do rio Piaguí, coletadas em duplicata, sequencialmente, no mesmo ponto, dia e horário, durante a primavera, em período seco. Cada amostra de água foi analisada em triplicata para todos os parâmetros, gerando o valor médio para as amostras 1 e 2, aqui apresentado.

Analisando isoladamente os resultados médios obtidos para cada parâmetro, segundo os padrões de qualidade de água da legislação brasileira para as classes 1 e 2, verificamos que as amostras de água do rio Piaguí, em geral, apresentam características que permitem classificá-las como de boa qualidade, à exceção dos índices de DBO e fósforo total.

Quadro 5 - Caracterização físico-química das amostras de água coletadas do rio Piaguí, localizado em Guaratinguetá/SP.

	Amostra 1	Amostra 2	Média	Unidade	Padrão Classe 2
pH	5,9	6,3	6,1	-	6,0 – 9,0
Turbidez	12	12,1	12,05	UNT	Até 100 UNT
OD	8,73	8,9	8,82	mg O ₂ .L ⁻¹	≥ 5 mg O ₂ .L ⁻¹
DBO	6,6	7,8	7,2	mg O ₂ .L ⁻¹	≤ 5 mg O ₂ .L ⁻¹
% redução de DBO	25,3	29,2	27,25	%	-
Fósforo total	8,7	10	9,35	mg P.L ⁻¹	0,1 mg P.L ⁻¹
Sólidos totais	0,009	0,011	0,010	mg.L ⁻¹	500 mg.L ⁻¹
Sólidos fixos	0,005	0,007	0,006	mg.L ⁻¹	-
Sólidos voláteis	0,003	0,004	0,004	mg.L ⁻¹	-
População bacteriana	652	811	732	UFC/ml	-
Fluoreto	-0,108	-0,122	-0,115	ppm	1,4 mg F.L ⁻¹
Cloreto	1,63	1,534	1,582	ppm	250 mg Cl.L ⁻¹
Brometo	0,385	0,72	0,553	ppm	-
Nitrato	0,264	0,249	0,257	ppm	10 mg N.L ⁻¹
Fosfato	-	-0,45	-0,45	ppm	-
Sulfato	0,272	0,658	0,465	ppm	250 mg SO ₄ .L ⁻¹
Concentração de glifosato	-	<0,01	<0,01	ppm	65 µg.L ⁻¹

Fonte: Autoria própria.

Nota: Padrões de qualidade das águas doces de Classe 2 (valores máximos) estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005).

Os parâmetros físico-químicos do conteúdo de oxigênio dissolvido e temperatura nas amostras de água não influenciam o comportamento dos pesticidas, mas são essenciais à

atividade metabólica dos microrganismos que degradam estes compostos no ambiente aquático, podendo, assim, definir a persistência destas moléculas nos corpos hídricos (DE ARMAS *et al.*, 2007). Verificamos que os parâmetros físico-químicos analisados para as amostras de água do rio Piaguí, seguem os mesmos padrões de qualidade observados para os corpos hídricos da bacia como um todo, de acordo com os monitoramentos realizados pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB.

6 DISCUSSÃO

O herbicida glifosato possui a propriedade de gerar resposta severa em células bacterianas por induzir carência de aminoácidos aromáticos. Entretanto, diferente de outros indutores de carência de aminoácidos, tal resposta ligada ao pesticida não provocou o acúmulo de pppGpp sendo este, até onde temos conhecimento, o único exemplo já demonstrado deste fenômeno (CRUVINEL; NEVES; SPIRA, 2018). Certas mutações ou condições de carência nutricional afetam significativamente a razão ppGpp/pppGpp, como, por exemplo, a carência de aminoácidos, na qual algumas linhagens bacterianas acumulam somente ppGpp, enquanto a cepa selvagem acumula ppGpp e pppGpp (CASHEL; GALLANT, 1969). Todavia, em nosso trabalho, também na cepa selvagem de *E. coli* e em alguns isolados ambientais não foi observado acúmulo de pppGpp sob a carência de aminoácidos aromáticos induzida por glifosato. O acúmulo de ppGpp na ausência de pppGpp é característico de bactérias submetidas à restrição de carbono, fosfato, ácidos graxos, nitrogênio e outros estresses ambientais (LAZZARINI; CASHEL; GALLANT, 1971; SPIRA; SILBERSTEIN; YAGIL, 1995; MECHOLD *et al.*, 2013), porém, ainda não havia sido relatada na carência de aminoácidos.

Uma das possíveis explicações para a ausência de pppGpp é que glifosato induz a síntese de (p)ppGpp diretamente a partir de GDP resultando em ppGpp principalmente ou até exclusivamente (CRUVINEL; NEVES; SPIRA, 2018). Porém, a relativamente baixa concentração de GDP no meio intracelular pode não ser suficiente para o rápido aumento do nível de (p)ppGpp durante a resposta severa (CRUVINEL; NEVES; SPIRA, 2018). Dessa forma, a hipótese mais provável é que glifosato cause nas células bacterianas uma carência de aminoácidos aromáticos mediana, mas que induza a atividade de RelA, a qual sintetiza lentamente pppGpp, a partir de GTP, e a atividade de GppA hidrolise rapidamente pppGpp a ppGpp, resultando em acúmulo de níveis moderados de ppGpp, mas não de pppGpp (CRUVINEL; NEVES; SPIRA, 2018).

Quando o gene *gppA* é deletado, a conversão de pppGpp a ppGpp é limitada, resultando em um aumento na concentração de pppGpp (MECHOLD *et al.*, 2013). Nos ensaios de extração de (p)ppGpp, o mutante MG1655 $\Delta gppA$ acumulou pppGpp, porém, em menor concentração do que ppGpp, corroborando a hipótese de que na carência de aminoácidos induzida por glifosato, ppGpp seja rapidamente sintetizado a partir de pppGpp por ação de GppA.

A proteína GppA não é encontrada em todas as bactérias e mesmo quando se encontram homólogos, apresentam diferentes propriedades catalíticas (MECHOLD *et al.*, 2013). Os ensaios de extração de (p)ppGpp conduzidos com os isolados ambientais demonstraram a presença de ppGpp e pppGpp em dois deles, sugerindo a possível ação da enzima GppA nestas cepas, promovendo a conversão de pppGpp e ppGpp, assim como observamos em *E. coli*. Contudo, cabe ressaltar obtivemos nenhum indício de que essa seja, de fato, a via de síntese de ppGpp nestes isolados.

De forma geral, os ensaios de extração de (p)ppGpp revelaram que hidroxamato de L-serina (HS) induziu níveis dos nucleotídeos 3 a 4 vezes maiores do que quando a resposta severa foi induzida por glifosato. Se as diferentes concentrações de HS e glifosato utilizadas nos ensaios demonstraram que o acúmulo de ppGpp e pppGpp independe da severidade da resposta severa gerada, é plausível supor que a ausência de pppGpp em células expostas a glifosato não pode ser atribuída à menor severidade da resposta induzida.

O acúmulo de ppGpp em células bacterianas expostas a glifosato pode ter muitas consequências além da manutenção do balanço intracelular do *pool* de aminoácidos, ajustes na fisiologia ou sobrevivência da bactéria. O aumento do nível de (p)ppGpp em bactérias está ligado a diversos processos, incluindo persistência, virulência e resistência a antibióticos. O trabalho de Kurenbach *et al.* (2015) demonstrou que glifosato pode aumentar a resistência a antibióticos, elevando sua concentração inibitória mínima para bactérias patogênicas e este efeito, possivelmente, foi gerado pelo acúmulo de (p)ppGpp induzido pelo herbicida. Em nossos ensaios de biodegradação e de utilização de glifosato como única fonte de fósforo, é possível sugerir que o acúmulo de (p)ppGpp induzido pelo herbicida tenha afetado negativamente a expressão do regulon PHO, especialmente o operon *phn*, tornando inviável o catabolismo de glifosato, sua remoção do meio de cultivo e a sobrevivência de células que pudessem colonizar as culturas.

O nucleotídeo (p)ppGpp também interfere na capacidade celular de utilizar fosfonatos por regular a expressão dos genes PHO. O nível basal de (p)ppGpp é suficiente para a expressão normal do regulon PHO e o acúmulo de (p)ppGpp depois de iniciado o período de carência de Pi, não é essencial para a apropriada expressão destes genes, e não há inibição da transcrição de genes PHO na ausência do alarmônio, sugerindo que exista uma concentração ótima de (p)ppGpp necessária para obter a máxima expressão do regulon e que maiores níveis do alarmônio têm um efeito adverso sobre a expressão destes genes (SPIRA; YAGIL, 1998).

Na maioria dos compartimentos ambientais são encontradas concentrações de fosfato suficientes para suprir as necessidades dos microrganismos presentes (FORLANI *et al.*, 1999). O suprimento de ortofosfato no meio afeta significativamente a captação e catabolismo de glifosato, uma vez que a abundância de outras fontes de fosfato reprime a expressão do complexo da C-P liase (SVIRIDOV *et al.*, 2015) e o fosfato inorgânico eventualmente presente no meio é usado preferencialmente, parecendo eliminar a possibilidade de biodegradação bacteriana de glifosato no ambiente natural (STUDNIK *et al.*, 2015) ou *in vitro*. Todavia, os cístrons *phnCDE* parecem ser expressos em meio mínimo independentemente do suprimento de ortofosfato (HOVE-JENSEN; ZECHEL; JOCHIMSEN, 2014), sugerindo que os isolados e cepas avaliados em nossos experimentos possam ter captado glifosato presente no meio de cultivo, mas não foram capazes de metabolizá-lo de forma a eliminar sua ação tóxica e/ou extrair da molécula do herbicida o fosfato necessário às funções celulares. Dick; Quinn (1995b) relataram ausência de degradação ou modificação de glifosato na presença de fosfato no meio de cultivo. Em nossos ensaios, a presença do fosfato contaminante do produto técnico ou o conteúdo de fosfato do meio LB provavelmente impediram ou dificultaram o catabolismo ou mesmo a captação de glifosato adicionado ao meio, uma vez que tal fosfato deve ter sido utilizado como fonte preferencial de fósforo pelas células, em detrimento do herbicida.

Alguns de nossos resultados nos levaram a sugerir que existam efeitos secundários de glifosato sobre células bacterianas, além da inibição da via de biossíntese de aminoácidos aromáticos. Não nos debruçamos sobre esta questão em nossos ensaios, mas alguns trabalhos publicados apresentam resultados que podem corroborar nossa hipótese, ainda que de maneira não definitiva.

Aristilde *et al.* (2017) em ensaios com espécies de *Pseudomonas* de solo expostas a glifosato, analisaram o perfil metabolômico da cepa mais sensível ao herbicida o qual demonstrou que a suplementação com aminoácidos aromáticos restaurou os níveis intracelulares de muitos metabólitos, além daqueles associados à via do shikimato, sugerindo que os níveis de aminoácidos aromáticos estão conectados ao balanço metabólico de outros aminoácidos e de metabólitos contendo aminoácidos. Em relação aos aminoácidos aromáticos, a maior inibição observada pelos autores foi de triptofano, um importante precursor de metabólitos secundários. Em nossos experimentos, a interferência de glifosato em outras vias metabólicas, além da via do shikimato, parece ser uma hipótese plausível, haja vista o fato de que algumas cepas foram incapazes de crescer em presença de glifosato, mesmo com a adição de aminoácidos aromáticos. Também nos ensaios de (p)ppGpp, foi

possível observar que mesmo 60 minutos após a adição dos aminoácidos aromáticos, as concentrações de ppGpp se mantiveram acima do nível basal para a cepa selvagem e que a adição de solução contendo os 20 aminoácidos foi capaz de reduzir a concentração do alarmônio em maior grau do que o fez a solução de aminoácidos aromáticos. É possível que o fornecimento extra de fontes de carbono e outros macronutrientes, assim como os próprios aminoácidos, possa contribuir para o reequilíbrio metabólico característico da fase de crescimento celular.

Hove-Jensen; Zechel; Jochimsen (2014) relataram a análise do efeito de glifosato sobre a transcrição do genoma de *E. coli*, nos quais foram realizados cultivos na presença de 0,2 M de glifosato resultando em alteração da atividade transcricional de mais de 1000 genes, em geral, um aumento de 2 vezes, incluindo os cistrons *phnD*, *phnE*, *phnG*, *phnH*, *phnI* e *phnJ*, pertencentes ao operon *phn*. O operon *proVWX*, relacionado a respostas a choque osmótico, apresentou um aumento da atividade transcricional em mais de 10 vezes, sugerindo que a adição de glifosato ao meio pode expor as células a um choque osmótico (HOVE-JENSEN; ZECHEL; JOCHIMSEN, 2014). A concentração do herbicida usada no trabalho acima foi 8 vezes maior do que aquela usada em nossos cultivos de enriquecimento e de biodegradação, mas é possível sugerir que choque osmótico tenha ocorrido em nossos cultivos, prejudicando a sobrevivência das cepas. Além disso, em relação aos resultados dos autores, cabe considerar que a alteração da atividade transcricional verificada, provavelmente, está relacionada ao acúmulo de (p)ppGpp induzido por glifosato tanto pela carência de aminoácidos aromáticos quanto pelo choque osmótico provocado por altas concentrações do herbicida; apesar de Hove-Jensen; Zechel; Jochimsen (2014) não apresentarem uma descrição mais detalhada dos genes cuja expressão foi alterada, não seria errôneo supor que uma parcela da reorientação da atividade transcricional seja conduzida pelo alarmônio em direção à expressão de genes de fase estacionária e biossíntese de aminoácidos.

Tanto o produto técnico de glifosato quanto as formulações comerciais, tais como Roundup® Concentrado, são compostos ácidos, aumentando a concentração de íons hidrogênio no meio (TINCHER *et al.*, 2017). Tsui; Chu (2003) atribuíram a toxicidade de glifosato à sua acidez. Em meio de cultivo, a presença de tampões pode amenizar o efeito da acidez gerada pela adição de solução de glifosato, o que não descarta a possibilidade de que tal característica afete negativamente a resposta da população bacteriana ao herbicida, seja em termos de sobrevivência, crescimento ou biodegradação.

Múltiplos fatores podem influenciar a degradação de glifosato por uma cepa bacteriana, incluindo temperatura, velocidade de rotação, valor de pH inicial, percentual de inóculo, concentração inicial do herbicida, sais inorgânicos, fontes de carbono e nitrogênio, e a otimização de tais fatores exógenos pode aumentar a taxa de degradação de glifosato (YU *et al.*, 2015).

Shushkova *et al.* (2012) relataram que células das linhagens *Ochrobactrum anthropi* GPK 3 e *Achromobacter* sp. Kg 16 adaptadas a glifosato degradaram duas vezes mais o herbicida do que aquelas não adaptadas, capacidade mantida em cultivos posteriores. Tal adaptação foi realizada pela adição de glifosato como única fonte de fósforo ao meio de pré-cultivo. Os autores sugeriram que este efeito provavelmente se deveu à indução de sistemas enzimáticos específicos para o metabolismo do herbicida, indicando a necessidade de adaptação preliminar das bactérias degradadoras de glifosato. A adaptação anterior a glifosato é um ponto que favorece muito bons resultados nos estudos de biodegradação, seja ao natural (em ambientes contaminados) ou por repetidos cultivos na presença do herbicida (ERMAKOVA *et al.*, 2010). Em nosso trabalho, foram conduzidos ensaios no sentido de selecionar mutantes tolerantes ao glifosato, seja como fonte de fósforo ou apenas como contaminante do meio, sem, no entanto, ter sido realizado um período de adaptação das cepas ao herbicida. A opção pela exposição das bactérias ao glifosato sem prévia adaptação ao composto pode ter nos impossibilitado de obter melhores resultados nos ensaios de tolerância e de biodegradação.

Além disso, a carga específica da cultura bacteriana, a qual é calculada como a razão da concentração inicial do substrato no meio de cultivo e a quantidade de biomassa no momento do inóculo, especificamente, massa de glifosato por massa de células inoculadas (SHUSHKOVA *et al.*, 2012), pode ter contribuído para ausência de resultados positivos em relação à biodegradação do herbicida ou mesmo pobre crescimento das cepas em presença de glifosato. Shushkova *et al.* (2012) avaliaram a carga específica ideal para as cepas *Ochrobactrum anthropi* GPK 3 e *Achromobacter* sp. Kg 16, verificando que em alta carga de células houve uma extensão da fase *lag* e uma redução na taxa de crescimento específico, prolongando o tempo de cultivo, assim como queda na eficiência de degradação de glifosato. Os autores sugeriram ter havido menor acesso das células ao substrato (glifosato) e oxigenação insuficiente do meio devido à alta densidade celular, pois a eficiência de degradação foi significativamente aumentada quando as células cresceram sob condições ideais de temperatura, pH e aeração. Em nosso ensaio de biodegradação, é possível que tenhamos usado um inóculo de baixa densidade celular, dada a relativamente alta

concentração de glifosato usada no experimento, tornando a dose do herbicida a que cada célula foi exposta muito elevada e irreversivelmente tóxica para as células do consórcio bacteriano.

Segundo Mbanaso *et al.* (2014) glifosato pode afetar a estrutura das comunidades microbianas dos ambientes, diminuindo sua diversidade, exercer efeitos sobre organismos superiores, além de afetar sistemas de drenagem em sua capacidade de retenção e sistemas de tratamento de água e esgoto. Todavia, ainda de acordo com os autores não é possível saber se a mudança na comunidade microbiana exposta a glifosato é uma resposta de curta duração, permitindo que a estrutura populacional e a atividade metabólica sejam retomadas após a biodegradação e dissipação do herbicida. De acordo com alguns dos estudos apresentados aqui, nos vários compartimentos ambientais, observa-se a multiplicação de algumas espécies ou grupos microbianos, mas a diversidade é o principal componente adversamente afetado por glifosato. Forlani *et al.* (1999) conseguiram bons resultados de degradação de glifosato nos cultivos com microbiota edáfica “completa”, com provável participação de fungos, mas espécies isoladas foram incapazes de utilizar o herbicida. Os autores afirmam que todos os componentes da microbiota são importantes e interagem sinergicamente na mineralização de glifosato e outros compostos xenobióticos lançados no ambiente.

Antes de serem usados no ensaio de biodegradação, nossos isolados de água fluvial haviam sido expostos a concentrações muito baixas de glifosato no ambiente (segundo a análise de quantificação, inferior a 0,01 ppm ou 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de água) e a uma alta concentração do herbicida nos cultivos de enriquecimento, no qual foram capazes de sobreviver. Acreditamos ser plausível supor que a estrutura da comunidade microbiana inoculada nos cultivos de enriquecimento seja o fator fundamental para o sucesso do processo de utilização do herbicida neste microambiente. Os fungos filamentosos presentes no cultivo de enriquecimento ao longo do período de incubação, possivelmente, foram os organismos responsáveis por degradar glifosato, disponibilizando seus produtos, eventualmente AMPA, para uso como substrato de crescimento pelas espécies bacterianas ou por outros grupos que, assim como *E. coli*, metabolizam apenas o metabólito originada pela quebra inicial do herbicida, permitindo a expressiva colonização do meio. Alguns organismos podem não necessariamente crescer em presença de micropoluentes específicos, mas produzir enzimas que transformam co-metabolicamente micropoluentes em compostos que podem ser utilizados como substrato para crescimento de outros membros da comunidade (BENNER *et al.*, 2013). Araújo; Monteiro; Abarkeli (2003) sugerem que o aumento no número de

fungos em solo após a aplicação de glifosato ocorre pela capacidade destes organismos em usar o herbicida como uma fonte de nutrientes e energia.

No trabalho de Mbanaso *et al.* (2014), o meio contendo a concentração de glifosato 100 vezes maior do que aquela aplicada nos cultivos agrícolas demonstrou as condições mais favoráveis para a multiplicação bacteriana (em relação a 10 e 1000 vezes), sugerindo que esses microrganismos podem tolerar altas concentrações do herbicida, mas é provável que haja uma dose na qual a população atinja crescimento e taxa de biodegradação máximos. Em nossos cultivos de enriquecimento é possível que o grande número de células presentes no inóculo inicial tenham causado algum efeito de “diluição”, no sentido de reduzir a dose do herbicida por célula, e que os microrganismos presentes nos cultivos tenham apenas sobrevivido, mas não, de fato, degradado as moléculas de glifosato.

Considerando que foram aplicadas as mesmas condições experimentais nos cultivos de enriquecimento e no ensaio de biodegradação, causou-nos surpresa a incapacidade do consórcio bacteriano em sequer sobreviver no meio de cultivo, haja vista o grande crescimento observado nos cultivos de enriquecimento.

Em geral, nos ambientes naturais (solo e água), o catabolismo de glifosato parece depender fortemente de interações entre os diferentes grupos componentes da comunidade microbiana, pois a maioria das espécies bacterianas isoladas de tais ambientes são incapazes de usar glifosato como única fonte de fósforo em culturas puras (SVIRIDOV *et al.*, 2015). No trabalho conduzido por Derbalah; Ismail; Shaheen (2013), a composição múltipla e simbiótica do consórcio, com microrganismos aeróbios e anaeróbios, pode ter sido a responsável pelo sucesso do processo, tornando-o mais rápido e efetivo do que em condições em que apenas uma espécie realiza a degradação.

Em oposição a tais afirmações e resultados, nossos consórcios bacterianos não funcionaram em conjunto e várias podem ser as causas deste resultado. Contudo, a considerar a importância das interações interespecíficas para a eficiente remoção de poluentes dos ambientes, podemos sugerir que as espécies selecionadas para compor este consórcio não tenham estabelecido relações eficientes ou ainda tenham prejudicado uma a outra. Quanto a glifosato, podemos supor que as espécies presentes no cultivo de enriquecimento capazes de degradar o herbicida não tenham apresentado bons resultados em cultivos isolados e, assim, não foram incorporadas ao consórcio estabelecido neste trabalho.

Gresshoff (1979) afirmou que, *in vitro*, o crescimento bacteriano em meio de cultivo rico não é afetado por glifosato, mesmo em concentrações acima de 25 mM e que células

próximas à fase estacionária parecem ser mais tolerantes à inibição do crescimento causada pelo herbicida do que aquelas em fase exponencial. Nossos resultados do ensaio de biodegradação contradizem tal afirmação, pois nosso inóculo inicial foi composto por células oriundas de cultivo *overnight* já em fase estacionária, e os nutrientes presentes no meio LB pareceram não ser suficientes para reprimir o efeito inibitório de glifosato sobre o crescimento bacteriano.

Muitos estudos de biodegradação e biorremediação utilizam glifosato na forma de solução aquosa em baixa concentração, mas altas doses são ambientalmente revelantes e devem ser exploradas nos estudos sobre o herbicida (YU *et al.*, 2015). Hebling *et al.* (2014) demonstraram que os parâmetros cinéticos de utilização do substrato estimados em experimentos com alta concentração do composto podem ser usados para prever tal utilização em baixa concentração, o que corrobora nossa escolha por uma alta concentração de glifosato.

A sobrevivência das espécies remediadoras é um fator decisivo no sucesso do processo de descontaminação de um ambiente (ZHAO *et al.*, 2015). Se sob condições controladas de laboratório, com abundância de nutrientes e ausência de competição com as muitas espécies presentes nas comunidades microbianas dos compartimentos ambientais, nossos consórcios bacterianos foram incapazes de metabolizar e mesmo sobreviver em presença de glifosato, admitimos que houve uma falha na composição destes consórcios e as cepas e isolados que em cultura pura demonstraram resultados animadores em relação a nosso objetivo, em conjunto, demonstraram inabilidade em remover glifosato do meio.

A análise das amostras de água do rio Piaguí revelou concentrações muito baixas de glifosato. No ambiente, o herbicida sofre imediata degradação associada aos microrganismos da fase aquosa, fato que pode explicar os baixos níveis do herbicida detectados nas amostras coletadas. Todavia, mesmo em concentrações muito baixas, glifosato (e outros micropoluentes) podem exercer efeitos deletérios sobre populações microbianas e até organismos superiores como, por exemplo, reduzindo a diversidade de espécies no meio.

Efeitos tóxicos e mutagênicos podem ocorrer em baixas doses de glifosato sobre células envolvidas na reprodução de espécies animais (GASNIER *et al.*, 2009). Além disso, o herbicida pode atuar indiretamente sobre seres vivos não-alvo, pois ambientes contaminados com concentrações subletais de pesticidas e antibióticos, como rios que drenam áreas agrícolas e recebem descargas sanitárias, podem promover a seleção de linhagens bacterianas resistentes (KURENBACH *et al.*, 2015), produzindo cepas patógenas

aos seres humanos com resistência aumentada aos tratamento antimicrobianos convencionais. Cabe também considerar que o efeito a longo prazo, cumulativo, da exposição constante a glifosato pode ter um resultado imprevisto, mas possivelmente negativo, sobre ampla gama de espécies.

7 CONCLUSÕES

Muitos fatores podem ter influenciado os resultados obtidos nos ensaios de utilização de glifosato como única fonte de fósforo e de biodegradação, mas a toxicidade do herbicida é, sem dúvida, um fator que não pode ser negligenciado. O amplamente reconhecido efeito de glifosato sobre a biossíntese de aminoácidos aromáticos parece não ser o único a causar danos às células, paralisando o crescimento ou mesmo provocando a morte das bactérias expostas. A adição de solução de aminoácidos aromáticos ou mesmo o cultivo em meio rico não se mostraram capazes de reverter a toxicidade exercida pelo herbicida.

O acúmulo de ppGpp que evidenciamos em nosso trabalho nos fornece uma excelente explicação para os efeitos celulares observados em bactérias expostas a glifosato nos ensaios *in vitro*. Entretanto, se a carência de aminoácidos aromáticos é cessada por adição dos mesmos ao meio ou sequer induzida pela abundância de nutrientes no meio de cultivo rico, podemos supor que seriam retomados os níveis basais do alarmônio e os efeitos da resposta severa seriam interrompidos, porém, não foram essas nossas observações, especialmente no ensaio de biodegradação. A reversão do acúmulo de ppGpp mais expressiva no ensaio com adição de casaminoácidos e também a menor reversão resultante da adição de solução de aminoácidos não aromáticos, os quais constituem fonte excedente de carbono no meio, além de aminoácidos que podem estar envolvidos em vias metabólicas afora a via do shikimato, nos fornecem indícios de que efeitos secundários de glifosato realmente possam existir.

Se a exposição de células bacterianas ao herbicida induz o acúmulo de ppGpp e este nucleotídeo redireciona o metabolismo celular para um estado de resposta ao estresse, podemos concluir que glifosato interfere negativamente na capacidade de degradação de compostos xenobióticos das bactérias, incluindo-o e também a outros micropoluentes.

Nas formulações comerciais aplicadas em campo, a presença de surfactantes e/ou adjuvantes ao produto pode ser a principal responsável pela toxicidade aguda verificada por diversos estudos envolvendo o herbicida. Em nossos ensaios, porém, não utilizados tais formulações e o pequeno número de ensaios conduzidos com glifosato puro P.A. (não mostrados) nos permitiram observar que houve impedimento total do crescimento das cepas, dado o rendimento nulo dos cultivos, sugerindo que o ingrediente ativo glifosato exerce forte efeito negativo sobre células bacterianas.

A interferência adversa de glifosato sobre comunidades microbianas ambientais é um efeito de grande relevância, pois o volumoso uso do herbicida em todo o mundo, nos

ambientes urbano e rural, lança cargas excessivas do produto nos compartimentos ambientais e a necessária biodegradação esperada pode não ocorrer em velocidade e quantidade suficientes para removê-lo do meio, dado o prejuízo causado às populações bacterianas pelo próprio composto. Sendo a biodegradação a principal via de destoxificação dos ambientes contaminados por glifosato, a perturbação deste processo pode levar ao seu acúmulo adsorvido a partículas do solo e sedimentos, cuja liberação gradual perpetua seus efeitos negativos sobre os organismos vivos. Micropoluentes podem causar efeitos deletérios, agudos e crônicos, a uma ou mais espécies que compõem a comunidade, em um processo cíclico danoso aos ecossistemas.

Infelizmente, não atingimos nosso objetivo de biodegradação de glifosato por cepas bacterianas, mas este trabalho teve o mérito de identificar, até onde sabemos, pela primeira vez, um efeito intracelular do herbicida muito relevante para compreender como este composto afeta as espécies bacterianas expostas, a indução de resposta severa pelo acúmulo de ppGpp. Pudemos contribuir ao conhecimento já estabelecido para o alarmônio demonstrando que esta indução possui a característica peculiar entre as respostas por carência de aminoácidos de não promover o acúmulo observável de pppGpp, evento este que nos permitiu inferir a forma pela qual a resposta severa induzida por glifosato se processa em células bacterianas.

Como observações finais, identificamos a necessidade de análises moleculares futuras em relação aos isolados dos ensaios de evolução e também os isolados ambientais, de forma a verificar a existência de mutações ou expressão de genes que produzam maior tolerância ao herbicida. Avaliamos também que caberia investigar detalhadamente as interações entre as espécies componentes do consórcio bacteriano proposto, a fim de entendermos sua dinâmica e configuração, buscando uma explicação para a falha destas cepas em sobreviverem no ensaio de biodegradação. Estudos futuros são necessários para compreender, em maior profundidade, as consequências dessa exposição em nível intracelular. Um possível efeito secundário de glifosato sobre o metabolismo bacteriano é um objeto que merece mais intensa investigação em virtude da ubíqua presença do herbicida em várias partes do mundo.

REFERÊNCIAS

- Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades (ABIFINA). **Defensivos agrícolas**. Disponível em: <<http://www.abifina.org.br/segmentos.php?sc=3&ssc=4>>. Acesso em: 09 jul. 2015.
- ACQUAVELLA, J. F.; ALEXANDER, B. H.; MANDEL, J. S.; GUSTIN, C.; BAKER, B.; CHAPMAN, P.; BLEEKE, M. Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the Farm Family Exposure Study. **Environ Health Perspect.**, v. 112, n. 3, p. 321-326, mar. 2004.
- AMARANTE JR., O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.
- ANDRIGHETTI, M. S.; NACHTIGALL, G. R.; QUEIROZ, S. C. N.; FERRACINI, V. L.; AYUB, M. A. Z. Biodegradação de glifosato pela microbiota de solos cultivados com macieira. **R. Bras. Ci. Solo**, 38, p. 1643-1653, 2014.
- ANGELIM, A. L.; COSTA, S. P.; FARIAS, B. C. S.; AQUINO, L. F.; MELO, V. M. M. An innovative bioremediation strategy using a bacterial consortium entrapped in chitosan beads. **Journal of Environmental Management**, n. 127, p. 10-17, 2013.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Regulamento Técnico**. Consulta pública nº 84, 31 de outubro de 2003. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B5780-1-0%5D.PDF>>. Acesso em: 10 jul. 2018.
- American Public Health Association (APHA). RICE, E.W.; BAIRD, R.B.; EATON, A.D.; CLESCERI, L.S. (eds.). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22th Edition. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2012, 11496 p.
- ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R.; ABARKELI, R. B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. **Chemosphere**, 52, p. 799–804, 2003.
- ARFARITA, N.; IMAI, T.; KANNO, A.; YARIMIZU, T.; XIAOFENG, S.; JIE, W.; HIGUCHI, T.; AKADA, R. The Potential use of *Trichoderma Viride* Strain FRP3 in Biodegradation of the Herbicide Glyphosate. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 27, n. 1, p. 3518-3521, 2013.
- ARISTILDE, L.; REED, M. L.; WILKES, R. A.; YOUNGSTER, T.; KUKURUGYA, M. A.; KATZ, V.; SASAKI, C. R. S. Glyphosate-Induced Specific and Widespread Perturbations in the Metabolome of Soil *Pseudomonas* Species. **Frontiers in Environmental Science**, v. 5, article 34, jun 2017.
- BARRIGOSSI, J. A. F.; LANNA, A. C.; FERREIRA, E. **Agrotóxicos no Cultivo do Arroz no Brasil: análise do consumo e medidas para reduzir o impacto ambiental negativo**. Dezembro, 2004. Santo Antônio de Goiás, GO. Circular Técnica 67, EMBRAPA Arroz e Feijão, 2004.

BATTAGLIN, W.A.; MEYER, M.T.; KUIVILA, K.; DIETZE, J.E. Glyphosate and AMPA in U.S. streams, groundwater, precipitation and soils. **Journal of the American Water Resources Association**, v. 50, n. 2, 2014.

BENNER, J.; HELBLING, D. E.; KOHLER, H-P. E.; WITTEBOL, J.; KAISER, E.; PRASSE, C.; TERNES, T. A.; ALBERS, C. N.; AAMAND, J.; HOREMANS, B.; SPRINGAEL, D.; WALRAVENS, E.; BOON, N. Is biological treatment a viable alternative for micropollutant removal in drinking water treatment processes? **Water Research**, 47, p. 5955-5976, 2013.

BOOCOCK, M. R.; COGGINS, J. R. Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. **FEBS Letters**, v. 154, n. 1, p.127-133, abr 1983.

BORGGAARD, O. K.; GIMSING, A. L. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. **Pest Manag Sci**, 64, p. 441–456, 2008.

BRAEKEN, K.; MORIS, M.; DANIELS, R.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. New horizons for (p)ppGpp in bacterial and plant physiology. **TRENDS in Microbiology**, v. 14, n. 1, jan. 2006.

BRASIL. **Lei Federal nº 7.802**, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/Ccivil_03/Leis/L7802.htm>. Acesso em: 23 jun. 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente - CONAMA. **Resolução Nº 357**, de 17 de março de 2005. Disponível em: <>. Acesso em: 06 ago. 2018.

BRITO, N. M.; AMARANTE JR., O. P. ABAKERLI, R.; SANTOS, T. C. R.; RIBEIRO, M. L. Risco de contaminação de águas por pesticidas aplicados em plantações de eucaliptos e coqueiros: análise preliminar. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 11, p. 93-104, jan.-dez. 2001.

BRITTO, F. B.; DO VASCO, A. N.; PEREIRA, A. P. S.; MÉLLO JR., A. V.; NOGUEIRA, L. C. Herbicidas no alto Rio Poxim, Sergipe e os riscos de contaminação dos recursos hídricos. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 390-398, abr.-jun. 2012.

CAIRNS, J.; OVERBAUGH, J.; MILLER, S. The origin of mutants. **Nature**, v. 335, p. 142-145, 8 set. 1988.

CAO, G. [et al]. A Novel 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase Shows High Glyphosate Tolerance in *Escherichia coli* and Tobacco Plants. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 38718, 2012.

CARVALHO, F. P. Agriculture, pesticides, food security and food safety. **Environmental Science & Policy**, 9, p. 685–692, 2006.

CASHEL, M.; GALLANT, J. Two compounds implicated in the function of the RC gene in *Escherichia coli*. **Nature**, v. 221, 1 mar. 1969.

CASHEL, M.; GENTRY, D.; HERNANDEZ, V. J.; VINELLA, D. The stringent response. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. Washington, DC. **American Society for Microbiology**, p. 1458–1496, 1996.

Centro de Pesquisa sobre Genoma Humano e Células-tronco (CPGHCT). Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. Disponível em: <>. Acesso em: 15 jan. 2019.

Comitê para Integração da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul (CEIVAP). Associação Pró-Gestão das Águas da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul (AGEVAP). **Plano de Recursos Hídricos da Bacia do Rio Paraíba do Sul** – Resumo. Diagnóstico dos Recursos Hídricos. Relatório Final. Elaboração: Fundação COPPETEC – Laboratório de Hidrologia e Estudos de Meio Ambiente. Nov. 2006.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). Norma Técnica. **Tratamento Biológico de Efluentes Industriais** – coleta e preservação de amostras para determinação de oxigênio dissolvido (OD) em água: procedimento. Fev. 1984.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). **Proposta para derivação de critérios para contaminantes ambientais da agricultura** – Relatório Final. São Paulo, 2010.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). **Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras**: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. BRANDÃO, C.J. [et al.] (Org.). São Paulo: CETESB; Brasília:ANA, 2011.

CHANG, F. C.; SIMCIK, M. F.; CAPEL, P. D. Occurrence and fate of the herbicide glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 30, n. 3, p. 548–555, 2011.

CHARLESWORTH, S. M.; MBANASO, F. U.; COUPE, S. J.; NNADI, E. O. Utilization of Glyphosate-Containing Herbicides on Pervious Paving Systems: Laboratory-Based Experiments to Determine Impacts on Effluent Water Quality. **Clean – Soil, Air, Water**, v. 42, n. 2, p. 133–138, 2014.

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

CHEN, P.; TORIBARA, T.; WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. **Analytical chemistry**, v. 28, p. 1756–1758, 1956.

CLAIR, E.; MESNAGE, R.; TRAVERT, C.; SÉRALINI, G-E. A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells *in vitro*, and testosterone decrease at lower levels. **Toxicology in Vitro**, 26, p. 269–279, 2012.

COMPERNOLLE, T.; VAN PASSEL, S.; LEBBE, L. Bioremediation: How to deal with removal efficiency uncertainty? An economic application. **Journal of Environmental Management**, 127, p. 77-85, 2013.

CONRAD, A.; SCHRÖTER-KERMANI, C.; HOPPE, H-W.; RÜTHER, M.; PIEPER, S.; KOLOSSA-GEHRING, M. Glyphosate in German adults – Time trend (2001 to 2015) of human exposure to a widely used herbicide. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 220, p. 8–16, 2017.

CRUVINEL, G. T.; NEVES, H. I.; SPIRA, B. Glyphosate induces the synthesis of ppGpp. **Molecular Genetics and Genomics**, 2018.

DALEBROUX, Z. D.; SWANSON, M. S. ppGpp: magic beyond RNA polymerase. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 203-212, mar. 2012.

DE ANDRÉA, M. M.; PERES, T. B.; LUCHINI, L. C.; BAZARIN, S.; PAPINI, S.; MATALLO, M. B.; SAVOY, V. L. T. Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 38, n. 11, p. 1329-1335, nov. 2003.

DE ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R.; ANTUNES, P. M.; DOS SANTOS, M. A. F.; DE CAMARGO, P. B.; ABAKERLI, R. B. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1119-1127, 2007.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. **R. Bras. Eng. Agric. Ambiental**, v. 18, n. 12, p. 1296-1301, 2014.

DERBALAH, A.; ISMAIL, A.; SHAHEEN, S. Monitoring of organophosphorus pesticides and remediation technologies of the frequently detected compound (chlorpyrifos) in drinking water. **Pol. J. Chem. Tech.**, v. 15, n. 3, 2013.

DICK, R. E.; QUINN, J. P. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. **Appl Microbiol Biotechnol**, 43, p. 545-550, 1995a.

DICK, R. E.; QUINN, J. P. Control of glyphosate uptake and metabolism in *Pseudomonas* sp. 4ASW. **FEMS Microbiology Letters**, 134, p. 177-182, 1995b.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Avaliação do Potencial de Transporte de Agrotóxicos usados no Brasil por Modelos Screening e Planilha Eletrônica**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 44. Jaguariúna/SP. Jun. 2007.

ENGLISH, B. P.; HAURYLIUK, V.; SANAMRAD, A.; TANKOV, S.; DEKKER, N. H.; ELF, J. Single-molecule investigations of the stringent response machinery in living bacterial cells. **PNAS**, v. 108, n. 31, p. 365-373, 2 ago. 2011.

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

FAN, J.; YANG, G.; ZHAO, H.; SHI, G.; GENG, Y.; HOU, T.; TAO, K. Isolation, identification and characterization of a glyphosate-degrading bacterium, *Bacillus cereus* CB4, from soil. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 58, p. 263-271, 2012.

FENNER, K.; CANONICA, S.; WACKETT, L. P.; ELSNER, M. Evaluating Pesticide Degradation in the Environment: Blind Spots and Emerging Opportunities. **Science**, v. 134, 16 ago. 2013.

FIGUEIRÓ, R. (org.). **Saúde & Ambiente: da Educação Ambiental à Ecologia de Doenças**. 1 ed., Volta Redonda: FOA, 2012. Cap. 2,7.

FORLANI, G.; MANGIAGALLI, A.; NIELSEN, E.; SUARDI, C. M. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. **Soil Biology and Biochemistry**, 31, p. 991-997, 1999.

GASNIER, C.; DUMONT, C.; BENACHOUR, N.; CLAIR, E.; CHAGNON, M-C.; SÉRALINI, G-E. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, 262, p. 184–191, 2009.

GILLESPIE, I. M. M.; PHILP, J. C. Bioremediation, an environmental remediation technology for the bioeconomy. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 329-332, jun. 2013.

GOMES, M. A. F.; BARIZON, R. R. M. **Panorama da Contaminação Ambiental por Agrotóxicos e Nitrato de origem Agrícola no Brasil: Cenário 1992/2011**. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, SP, 2014.

GOSS, D. W. Screening procedure for soils and pesticides for potential water quality impacts. **Weed Technology**, Champaign, v. 6, n. 4, p. 701-708, 1992.

GRESSHOFF, P. M. Growth inhibition by glyphosate and reversal of its action by phenylalanine and tyrosine. **Aust. J. Plant Physiol.**, 6, p. 177-185, 1979.

GUSTAFSON, D. I. Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Elmsford, v. 8, n. 4, p. 339-357, 1989.

HAURYLIUK, V.; ATKINSON, G. C.; MURAKAMI, K. S.; TENSION, T.; GERDES, K. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 298-309, may. 2015.

HELBLING, D.; HAMMES, F.; EGLI, T.; KOHLER, H-P.E. Kinetics and Yields of Pesticide Biodegradation at Low Substrate Concentrations and under Conditions Restricting Assimilable Organic Carbon. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1306-1313, fev. 2014.

HELBLING, D. E. Bioremediation of pesticide-contaminated water resources: the challenge of concentrations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 33, p. 142-148, 2015.

HOVE-JENSEN, B.; ZECHEL, D. L.; JOCHIMSEN, B. Utilization of glyphosate as phosphate source: biochemistry and genetics of bacteria carbon-phosphorus lyase. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 1, p. 176-197, mar. 2014.

International Agency for Research on Cancer (IARC). World Health Organization. IARC Monographs Volume 112: **Evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides**. Lion, France, 20 mar. 2015.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental**. REBELO, R. M. [et al]. Brasília: IBAMA, 2010. 84 p.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Censo Demográfico 2010**. Ano de publicação: 2011. Disponível em: <<https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/default.shtm>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

KOLPIN, D. W.; THURMAN, E. M.; LEE, E. A.; MEYER, M. T.; FURLONG, E. T.; GLASSMEYER, S. T. Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. **Science of the Total Environment**, 354, p. 191-197, 2006.

KOLVENBACH, B. A.; HELBLING, D. E.; KOHLER, H-P. E.; CORVINI, P. F-X. Emerging chemicals and the evolution of biodegradation capacities and pathways in bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, 27, p. 8-14, 2014.

KRYUCHKOVA, Y. V.; BURYGIN, G. L.; GOGOLEVA, N. E.; GOGOLEV, Y. V.; CHERNYSHOVA, M. P.; MAKAROV, O. E.; FEDOROV, E. E.; TURKOVSKAYA, A. Isolation and characterization of a glyphosate-degrading rhizosphere strain, *Enterobacter cloacae* K7. **Microbiological Research**, 169, p. 99-105, 2014.

KURENBACH, B.; MARJOSHI, D.; AMÁBILE-CUEVAS, C. F.; FERGUSON, G. C.; GODSOE, W.; GIBSON, P.; HEINEMANN, J. A. Sublethal Exposure to Commercial Formulations of the Herbicides Dicamba, 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid, and Glyphosate Cause Changes in Antibiotic Susceptibility in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. **Mbio**, v. 6, n. 2, mar.-abr. 2015.

LANCASTER, S. H.; HOLLISTER, E. B.; SENSEMAN, S. A.; GENTRY, T. J. Effects of repeated glyphosate applications on soil microbial community composition and the mineralization of glyphosate. **Pest Manag Sci**, 66, p. 59-64, 2010.

LAZZARINI, R. A.; CASHEL, M.; GALLANT, J. On the regulation of guanosine tetraphosphate levels in stringent and relaxed strains of *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 14, p. 4381-4385, 25 jul. 1971.

LIU, K.; BITTNER, A. N.; WANG, J. D. Diversity in (p)ppGpp metabolism and effectors. **Current Opinion in Microbiology**, 24, p. 72-79, 2015.

LONDRES, F. Glifosato (o famoso Roundup): “veneno fraquinho”? In: __. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011. cap. 5, p. 73-76.

LUPI, L.; MIGLIORANZA, K. S. B.; APARICIO, V. C.; MARINO, D.; BEDMAR, F.; WUNDERLIN, D. A. Occurrence of glyphosate and AMPA in an agricultural watershed from the southeastern region of Argentina. **Science of the Total Environment**, 536, p. 687–694, 2015.

MAGNUSSON, L. U.; FAREWELL, A.; NYSTRÖM, T. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. **TRENDS in Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 236-242, may. 2005.

MARQUES, P. R. B. O.; AMARANTE JR., O. P.; BRITO, N. M.; NUNES, G. S.; SANTOS, T. C. R. Avaliação preliminar do risco de contaminação ambiental por pesticidas aplicados na área da represa de Boa Esperança. **Cad. Pesq.**, São Luis, v. 14, n. 2, p. 9-23, jul.-dez. 2003.

MBANASO, F. U.; COUPE, S. J.; CHARLESWORTH, S. M.; NNADI, E. O. Laboratory-based experiments to investigate the impact of glyphosate-containing herbicide on pollution attenuation and biodegradation in a model pervious paving system. **Chemosphere**, 90, p. 737–746, 2013.

MBANASO, F. U.; COUPE, S. J.; CHARLESWORTH, S. M.; NNADI, E. O.; IFELEBUEGU, A. O. Potential microbial toxicity and non-target impact of different concentrations of glyphosate-containing herbicide (GCH) in a model pervious paving system. **Chemosphere**, 100, p. 34–41, 2014.

MECHOLD, U.; POTRYKUS, K.; MURPHY, H.; MURAKAMI, K. S.; CASHEL, M. Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 12, p. 6175–6189, 2013.

MERCURIO, P.; FLORES, F.; MUELLER, J. F.; CARTER, S.; NEGRI, A. P. Glyphosate persistence in seawater. **Marine Pollution Bulletin**, 85, p. 385-390, 2014.

METCALF, W. W.; WANNER, B. L. Involvement of the *Escherichia coli* *phn* (*psiD*) gene cluster in assimilation of phosphorus in the form of phosphonates, phosphite, Pi esters, and Pi. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 587-600, jan. 1991.

MILHOME, M. A. L.; SOUZA, D. O. B.; LIMA, F. A. F.; NASCIMENTO, R. F. Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. **Eng Sanit Ambient**, v. 14, n. 3, p. 363-372 jul.-set. 2009.

MINK, P. J.; MANDEL, J. S.; SCEURMAN, B. K.; LUNDIN, J. L. Epidemiologic studies of glyphosate and cancer: A review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 63, p. 440–452, 2012.

MONEKE, A. N.; OKPALA, G. N.; ANYANWU, C. U. Biodegradation of glyphosate herbicide *in vitro* using bacterial isolates from four rice fields. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 26, p. 4067-4074, 28 jun. 2010.

MOSCHET, C.; WITTMER, I.; SIMOVIC, J.; JUNGHANS, M.; PIAZZOLI, A.; SINGER, H.; STAMM, C.; LEU, C.; HOLLENDER, J. How a Complete Pesticide Screening Changes the Assessment of Surface Water Quality. **Environ. Sci. Technol.**, 48, p. 5423–5432, 2014.

NOUROUZI, M. M.; CHUAH, T. G.; CHOONG, T. S. Y.; LIM, C. J. Glyphosate Utilization as the Source of Carbon: Isolation and Identification of new Bacteria. **E-Journal of Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 1582-1587, 2011.

NYSTRÖM, T. Role of guanosine tetraphosphate in gene expression and the survival of glucose or seryl-tRNA starved cells of *Escherichia coli* K12. **Mol Gen Genet**, 245, p. 355-362, 1994.

PIPKE, R.; AMRHEIN, N.; JACOB, G. S.; SCHAEFER, J.; KISHORE, G. M. Metabolism of glyphosate in an *Arthrobacter* sp. GLP-1. **Eur. J. Biochem.**, 165, p. 267-273, 1987.

PIVELI, R.P.; KATO, M.T. **Qualidade das águas e poluição: aspectos físico-químicos**. São Paulo: ABES, 2005. 285 p.

POTRYKUS, K.; CASHEL, M. (p)ppGpp: Still Magical? **Annu. Rev. Microbiol.**, 62, p. 35-51, 2008.

QUAGHEBEUR, D.; DE SMET, B.; DE WULF, E.; STEURBAUT, W. Pesticides in Rainwater in Flandres, Belgium: results from the monitoring program 1997-2001. **Journal of Environmental Monitoring**, 3, 2004.

RAHME, L.G.; STEVENS, E.J.; WOLFORT, J.; SHAO, J.; TOMPKINS, R.G.; AUSUBEL, F.M. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. **Science**, 268, p. 1899-1902, 1995.

RATCLIFF, A. W.; BUSSE, M. D.; SHESTAK, C. J. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. **Applied Soil Ecology**, 34, p. 114–124, 2006.

REBOUÇAS, A.C. Água doce no mundo e no Brasil. In: _____. **Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação**. 3 ed. São Paulo: Escrituras, 2006.

ROSA, F. C.; PINHEIRO, A.; SILVA, M. R. **Avaliação do potencial de lixiviação de agroquímicos na Bacia do Itajaí**. In: Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos, 22, 2007, São Paulo. Associação Brasileira de Recursos Hídricos, 2007.

SARUBBI, E.; RUDD, K.E.; CASHEL, M. Basal ppGpp level adjustment shown by new *spoT* mutants affect steady state growth rates and rRNA ribosomal promoter regulation in *Escherichia coli*. **Mol Gen Genet.**, 213, p. 214-222, 1988.

SHUSHKOVA, T. V.; ERMAKOVA, I. T.; LEONTIEVSKY, A. Glyphosate bioavailability in soil. **Biodegradation**, v. 21, n. 3, p. 403-410, jun. 2010.

- SHUSHKOVA, T. V.; ERMAKOVA, I. T.; SVIRIDOV, A. V.; LEONTIEVSKY, V. Biodegradation of Glyphosate by Soil Bacteria: Optimization of Cultivation and the Method for Active Biomass Storage. **Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 44–50, 2012.
- SILVA, V.; MONTANARELLA, L.; JONES, A.; FERNANDÉZ-UGALDE, O.; MOL, H. G. J.; RITSEMA, C. J.; GEISSEN V. Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural topsoils of the European Union. **Sci Total Environ**, 621, p. 1352-1359, 2018.
- SINGH, B.; SINGH, K. Microbial degradation of herbicides. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 245-261, 2016.
- SOMERVILLE, C. R.; AHMED, A. Mutants of *Escherichia coli* Defective in the Degradation of Guanosine 5'-Triphosphate, 3'-Diphosphate (pppGpp). **Molec. Gen. Genet.**, 169, p. 315-323, 1979.
- SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; DE ANDRÉA, M. M. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29 p.
- SPIRA, B.; SILBERSTEIN, N.; YAGIL, E. Guanosine 3'-5'-Bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for Pi. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 14, p. 4053-4058, jul. 1995.
- SPIRA, B.; YAGIL, E. The relation between ppGpp and the PHO regulon in *Escherichia coli*. **Mol Gen Genet**, 257, p. 469-477, 1998.
- SPIRA, B.; HU, X.; FERENCI, T. Strain variation in ppGpp concentration and RpoS levels in laboratory strains of *Escherichia coli* K-12. **Microbiology**, 154, p. 2887–2895, 2008.
- SRIVATSAN, A.; WANG, J. D. Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. **Current Opinion in Microbiology**, 11, p. 100-105, 2008.
- STRUGER, J.; VAN STEMPTVOORT, D. R.; BROWN, S. J. Sources of aminomethylphosphonic acid (AMPA) in urban and rural catchments in Ontario, Canada: Glyphosate or phosphonates in wastewater? **Environmental Pollution**, 204, p. 289-297, 2015.
- STUDNIK, H.; LIEBSCH, S.; FORLANI, G.; WIECZOREK, D.; KAFARSKI, P.; LIPOK, J. Amino polyphosphonates – chemical features and practical uses, environmental durability and biodegradation. **New Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 1-6. jan. 2015.
- SVIRIDOV, A.V.; SHUSHKOVA, T. V.; ZELENKOVA, N. F.; VINOKUROVA, N. G.; MORGUNOV, I. G.; ERMAKOVA, I. T.; LEONTIEVSKY, A. A. Distribution of glyphosate and methylphosphonate catabolism systems in soil bacteria *Ochrobactrum anthropi* and *Achromobacter* sp. **Appl Microbiol Biotechnol**, 93, p. 787–796, 2012.
- SVIRIDOV, A.V.; SHUSHKOVA, T. V.; ERMAKOVA, I. T.; IVANOVA, E.V.; EPIKTETOV, D.O.; LEONTIEVSKY, A. A. Microbial degradation of glyphosate

herbicides (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 188-195, mar. 2015.

SZÉKÁCS, A.; DARVAS, B. Forty years with glyphosate. In: HASANEEN, M. N. A. E.-G. (ed.). **Herbicides – Properties, Synthesis and Control of Weeds**. InTech: Rijeka, Croatia, 2012, cap.14, p. 247-284. Disponível em: <>. Acesso em: 8 fev. 2017.

THONGPRAKASANG, S.; THIANANAWAT, A.; RANGKADILOK, N.; SURIYO, T.; SATAYAVIVAD, J. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. **Food and Chemical Toxicology**, 59, p. 129–136, 2013.

TINCHER, C.; LONG, H.; BEHRINGER, M.; WALKER, N.; LYNCH, M. The glyphosate-based herbicide Roundup® does not elevate genome-wide mutagenesis of *E. coli*. **Genes, Genomes and Genetics**, Early Online, 9 ago. 2017.

TIWARI, B.; SINGH, S.; KAUSHIK, M. S.; MISHRA, A. K. Regulation of Organophosphate Metabolism in Cyanobacteria. A Review. **Microbiology**, v. 84, n. 3, p. 291–302, 2015.

TRAXLER, M. F.; SUMMERS, S. M.; NGUYEN, H.-T.; ZACHARIA, V. M.; HIGHTOWER, G. A.; SMITH, J. T.; CONWAY, T. The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 1128–1148, 2008.

UETA, J.; SHUHAMA, N. L.; CERDEIRA, A. L. Biodegradação de herbicidas e biorremediação: microrganismos degradadores de atrazina provenientes de solos da Região do Aquífero Guarani. **Plantio Direto**, v. 4, p. 25-30, 2001. Disponível em: <>. Acesso em: 10 dez. 2009.

VERSHININA, O. A.; ZNAMENSKAYA, L. V. The Pho Regulons of Bacteria. **Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 497–511, 2002.

VILLARREAL-CHIU, J. F.; ACOSTA-CORTÉS, A. G.; KUMAR, S.; KAUSHIK, G. Biological Limitations on Glyphosate Biodegradation. In: SINGH, R.; KUMAR, S. (eds.). **Green Technologies and Environmental Sustainability**, 2007, cap.8, p. 179-201.

WANNER, B. L. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. **Journal of Cellular Biochemistry**, 51, p. 47-54, 1993.

WANNER, B. L. Molecular genetics of carbon-phosphorus bond cleavage in bacteria. **Biodegradation**, 5, p. 175-184, 1994.

YAMADA, T.; CASTRO, P. R. C. Glifosato, herbicida com singular modo de ação: efeitos secundários e implicações fisiológicas agrônomicas. **Anais...São Pedro: POTAFOS**, 2004.

YU, X. M.; YU, T.; YIN, G. H.; DONG, Q. L.; AN, M.; WANG, H. R.; AI, C. X. Glyphosate biodegradation and potential soil bioremediation by *Bacillus subtilis* strain Bs-15. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 14717-14730, 2015.

XIAO, H.; KALMAN, M.; IKEHARA, K.; ZEMEL, S.; GLASER, G.; CASHEL, M. Residual guanosine 39,59-bispyrophosphate synthetic activity of relA null mutants can be estimated by spoT null mutations. **J. Biol. Chem.**, 266, p. 5980– 5990, 1991.

ZHAO, H.; TAO, K.; ZHU, J.; LIU, S.; GAO, H.; ZHOU, X. Bioremediation potential of glyphosate-degrading *Pseudomonas* spp. strains isolated from contaminated soil. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, 61, p. 165–170, 2015.