

TOXIDADE DE HERBICIDAS PARA A BACTÉRIA *Escherichia Coli*

BOTELHO, R.G. ^{1*}; MAGALHÃES C.F. ²; SANTOS, J.B. ³

¹Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP; (33) 8832-7114; e-mail: rafaelgrossib@hotmail.com; ²Vale do Rio Doce – Univale; e-mail: chaianafroes@hotmail.com;

³Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri; tel.: (38) 3531-2042; e-mail: jbarbosa@ufvjm.edu.br.

Resumo

A agricultura faz uso de uma enorme diversidade e quantidade de produtos químicos, e se por um lado o objetivo é aumentar a produtividade, por outro, estes produtos acabam contaminando ambientes aquáticos. Dentre esses produtos, os herbicidas devem receber maior atenção em relação à contaminação de ambientes aquáticos em função da ampla utilização para o controle de plantas daninhas. Os efeitos dessas moléculas sobre microorganismos como a bactéria *Escherichia coli*, que são membros dos ambientes aquáticos ainda é pouco conhecido. Usando placas de microdiluição *E. coli* foi exposta a várias formulações comerciais de herbicidas amplamente utilizados no Brasil: 2,4-D (DMA), atrazine (Atranex, Herbitrin e Siptran), alachlor (Agimix), fluazifop-p-butil (Fusilade), glyphosate (Gliz e Roundup Original), metolachlor (Dual), MSMA, diuron (Fortex), picloram (Padron) e paraquat (Gramoxone). Após 300 minutos de exposição, o herbicida paraquat foi o único capaz de impedir a multiplicação de *E. coli*, caracterizado como bacteriostático. Ao final do período de incubação, 600 minutos, foi possível estabelecer, com base no número de UFC, a seguinte escala decrescente de intoxicação dos herbicidas sobre *E. coli*: Gramoxone > Gliz > Roundup = Fusilade = MSMA = Fortex = Padron = Atranex = Combine = herbitrin = Dual > Siptran = Agimix > DMA > Tordon = Trifluralina.

Palavras-chave: paraquat, ecossistema aquáticos, crescimento bacteriano

Abstract

Agriculture uses a huge diversity of chemical products. The objective is to increase productivity, but sometimes these products contaminate aquatic environment. Herbicide should be hardly observed in relation to aquatic environment contamination because of its high use to control weed. The effects of these molecules on *Escherichia coli* microorganisms, which are members of aquatic environment, are almost unknown. *Escherichia coli* was exposed, by using microdilution plaques, to some commercial formulation of herbicide that are used in Brazil: 2,4-D (DMA), atrazine (Atranex, Herbitrin and Siptran), alachlor (Agimix), fluazifop-p-butil (Fusilade), glyphosate (Gliz and Roundup Original), metolachlor (Dual), MSMA, diuron (Fortex), picloram (Padron) and paraquat (Gramoxone). After 300 minutes of exposure, paraquat was the only herbicide able to stop *Escherichia coli* multiplication, characterized as bacteriostatic. After 600 minutes of incubation, it was possible to establish, according to UFC numbers, the following decreasing intoxication scale of herbicide on *Escherichia coli*: Gramoxone > Gliz > Roundup = Fusilade = MSMA = Fortex = Padron = Atranex = Combine = herbitrin = Dual > Siptran = Agimix > DMA > Tordon = Trifluralina.

Key Words: paraquat, aquatic ecosystem, bacterial growth

Introdução

Em várias regiões do planeta, observa-se que os ambientes aquáticos vêm sofrendo alterações na maioria das vezes associadas às atividades industriais, urbanas e agrícolas (Hartmann, 2004). Dentre essas atividades, a última tem sido responsável pela maior contaminação desses ambientes em função da ampla disseminação desta no planeta, juntamente com a diversidade e quantidade de agrotóxicos utilizados anualmente (Mozeto e Zagatto, 2006). Desse modo, os agrotóxicos, além de cumprirem o papel de proteger as culturas agrícolas das pragas, doenças e plantas daninhas, aumentando a produtividade, oferecem riscos ao ambiente aquático (Rand e Petrocelli, 1985). Os organismos de ambientes

aquáticos são expostos a essas moléculas simplesmente pelo contato com a água ou sedimento, e os efeitos tóxicos podem incluir tanto a mortalidade e efeitos sub-letais, como alterações no crescimento, desenvolvimento, na reprodução, fisiologia, comportamento e aparecimento de patologias (Rand e Petrocelli, 1985). Estudos sobre efeitos de produtos químicos em organismos aquáticos têm focado principalmente organismos macroscópicos (Botelho, *et al.*, 2009; Poleksic e Karan, 1999; Sarikaya e Yilmaz, 2003). No entanto, as bactérias são importantes membros desses ambientes e podem ser vulneráveis a alteração no crescimento e reprodução devido a exposição de agentes químicos (Higgins e Hohn, 2008).

Para acrescentar na compreensão dos efeitos de agentes químicos sobre bactérias aquáticas, realizou-se um experimento *in vitro* onde a toxicidade de vários herbicidas comumente utilizados na agricultura foi avaliada sobre o crescimento de *E. coli*.

Material e métodos

Para avaliar o efeito de herbicidas sobre o crescimento de *E. coli* foi utilizada a estirpe ATCC 25922 obtida do Laboratório de Microbiologia da Universidade Vale do Rio Doce – Univale. Abaixo segue informações sobre os herbicidas utilizados nesse estudo.

Tabela 1 - Informações técnicas sobre os herbicidas propostos para avaliação de toxicidade sobre *E. coli*.

Produto Comercial*	Produto técnico*	Grupo químico*	Concentração produto técnico (g/L)*	Concentração utilizada (mg/L)	Mecanismo de ação*
DMA	2,4- D	ácido fenoxiacético	670	0,23	Mimetizador de auxina
Agimix	alachlor + atrazine	cloroacetanilida + triazina	260 + 260	0,10	Inibe a divisão celular
Siptran, Atranex e Herbitrim	atrazine	triazina	500	0,10	Inibe o fotossistema II
Fusilade	fluazifop p-butyl	aryl oxifenoxipropinato	125	0,23	Inibe a enzima ACCase
Gliz e Roundup original	glyphosate	derivado da glicina	480	0,09	Inibe a enzima EPSPs
Dual	s-metalachlor	acetanilidas		0,06	Inibe a divisão celular
Fortex	MSMA + diuron	organoarsênico + uréia	360 + 140	0,232	Inibe o fotossistema II
MSMA	MSMA	organoarsênico		0,12	Não bem conhecido
Gramoxone	paraquat	bipiridílios	200	0,08	Produção de íon superóxido
Padron	picloran	ácido piridinocarboxílico	388	0,03	Mimetizadores de auxinas
Tordon	picloram + 2,4 D	ácido picolinico e fenoxiacético	64 + 240	0,10	Mimetizador de auxina
Combine	tebuthiuron	derivados da uréia	500	0,11	Inibe o fotossistema II
Trifluralina	trifluralin	dinitroanilina	445	0,045	Inibe a formação de microtúbulos

*Fonte: Rodrigues e Almeida (2005).

Todas as soluções herbicidas foram preparadas antes do seu uso, sendo posteriormente esterilizadas por filtração (filtro Millipore, 0,22 µm) numa capela de fluxo laminar. Para a padronização da densidade do inóculo foi utilizada escala de McFarland 0,5 (1,5 x 10⁸ UFC). Para isso, foram adicionados 200 µL da concentração de 1,5 x 10⁸ UFC em 19,8

μL de caldo BHI obtendo uma concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC. Posteriormente, $100 \mu\text{L}$ dessa concentração foram adicionados a $29,9 \mu\text{L}$ de BHI, obtendo uma concentração final de $1,5 \times 10^5$ UFC. Para inoculação e avaliação foram utilizadas placas de microdiluição, onde se adicionou $180 \mu\text{L}$ de BHI + inóculo e posteriormente $20 \mu\text{L}$ de cada herbicida. Foi utilizado um controle negativo ($200 \mu\text{L}$ meio BHI) e controle positivo ($200 \mu\text{L}$ de bactéria + meio BHI).

Após a confecção das placas, elas foram incubadas a 37°C e a densidade bacteriana foi avaliada pela absorbância a 655 nm em espectrofotômetro. Foram confeccionadas curvas de crescimentos a partir da relação UFC x tempo em cada herbicida testado. Dados obtidos em 600 minutos de leitura das placas no espectrofotômetro foram submetidos a análise de variância e médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5%

Resultados e discussão

Foi possível observar crescimento de *E. coli* no intervalo de 100 a 300 minutos de incubação quando exposta aos herbicidas Agimix, Atranex, Herbitrin e Siptran. Independentemente do herbicida, o crescimento de *E. coli* foi maior no tratamento testemunha (isento de herbicidas) (Figura 1).

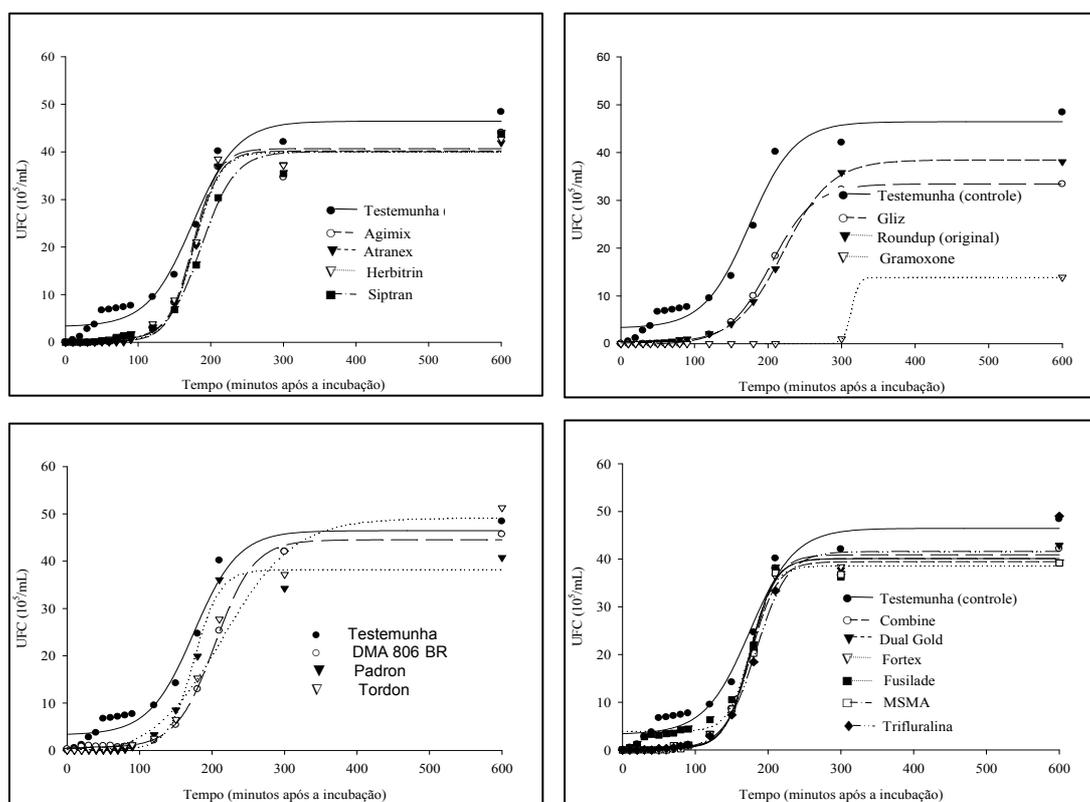


Figura 1 – Padrão de crescimento de *E. coli* em meio de cultura BHI contendo diferentes formulações de herbicidas, incubada por 600 minutos. Regressões não lineares testadas por “t” a 5% de probabilidade, com coeficiente de determinação superior a 90%.

Comparando a toxicidade dos herbicidas mimetizadores de auxinas, *E. coli* foi mais sensível ao herbicida Padron que DMA e Tordon (Figura 1). Comparando com a testemunha o herbicida Tordon promoveu maior crescimento, diferentemente dos herbicidas DMA e Padron. Em relação aos herbicidas não seletivos, observa-se crescimento de *E. coli* entre 100 a aproximadamente 320 minutos de incubação quando exposta ao Gliz e Roundup. No entanto, o herbicida Gramoxone foi mais tóxico para *E. coli* quando comparados com os outros dois (Figura 1).

Entre os herbicidas Dual, Fortex, Combine, Fusilade, MSMA e Trifluralina nota-se que *E. coli* tem sensibilidade semelhante para todos esses produtos, apresentando número superior de colônias formadas na testemunha (Figura 1). Considerando-se a fase exponencial de crescimento de *E. coli* (neste trabalho observada entre, aproximadamente, 120 a 210 minutos) nota-se uma escala decrescente de intoxicação dos herbicidas sobre *Escherichia coli*:

Gramoxone > Roundup = Gliz > DMA = Tordon = Siptran > Trifluralina = Fusilade = Padron = Fortex > MSMA = Agimix = Atranex = Dual = Herbitrin = Combine (Tabela 1). Após 600 minutos da incubação foi possível estabelecer, com base no número de UFC, a seguinte escala decrescente de intoxicação dos herbicidas sobre *E. coli*: Gramoxone > Gliz > Roundup = Fusilade = MSMA = Fortex = Padron = Atranex = Combine = herbitrin = Dual > Siptran = Agimix > DMA > Tordon =. Trifluralina (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores observados para a taxa de crescimento exponencial de *E. coli* (estimados entre 120 e 210 e em 600 minutos de incubação) em função linear com o respectivo coeficiente de determinação (r^2) e número total de unidades formadoras de colônia (UFC) ao final do período de incubação.

Herbicida (produto comercial®)	Taxa de crescimento (120-210 minutos após incubação)	Coeficiente de determinação	UFC ($\times 10^5$) ao final do período de incubação (600 minutos)
Testemunha (sem herbicida)	0,3415 b	0,98	48,41a
Agimix	0,3786 a	0,97	44,07 b
Atranex	0,3825 a	0,95	41,94 bc
Combine	0,3928 a	0,96	42,16 bc
DMA	0,2572 c	0,93	45,68 ab
Dual	0,3830 a	0,95	42,88 bc
Fortex	0,3680 ab	0,96	39,35 c
Fusilade	0,3560 b	0,94	39,18 c
Gliz	0,1823 d	0,95	33,40 d
Gramoxone	0,0000 e	0,00	13,90 e
Herbitrin	0,3867 a	0,95	42,67 bc
MSMA	0,3778 a	0,95	39,22 c
Padron	0,3655 ab	0,95	40,75 bc
Roundup	0,1517 d	0,95	38,08 c
Siptran	0,3054 c	0,94	43,86 b
Tordon	0,2810 c	0,95	51,29 a
Trifluralina	0,3412 b	0,95	49,00 a
C.V. (%)	6,75	5,24	9,68

Médias seguidas por letras iguais em cada coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

No trabalho de Koutsotoli *et al.* (2005), o crescimento de *E. coli* NCTC 9001 não foi influenciado por concentrações de até 0,1 mg/L do herbicida atrazine. Higgins e Hohn (2008) expuseram *E. coli* sob concentrações de atrazine e constataram também que não houve inibição do crescimento bacteriano. No presente trabalho, nos primeiros 300 minutos, o herbicida paraquat não permitiu crescimento bacteriano, sendo que o número de UFC no período final de incubação foi menor quando comparada aos outros herbicidas. Em *E. coli* o paraquat tem sido relatado como agente bacteriostático (Davison e Papirmeister, 1971), informação que foi confirmada neste estudo devido ao início do crescimento tardio de *E. coli*. Sobre os mecanismos de toxicidade do paraquat, Farrington *et al.* (1973), demonstraram que esse produto reage com o oxigênio molecular gerando o radical tóxico O_2^- . Desse modo as defesas antioxidantes são fundamentais para reverter tal toxicidade e dessa forma a enzima

superóxido dismutase age sobre o O_2^- dismutando-o em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e água (H_2O). Como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também é tóxico para sistemas biológicos, a catalase, promove a dissociação desse composto em $H_2O + O_2$ (Halliwell e Gutteridge, 2007), e assim a toxicidade do paraquat deixa de existir.

Conclui-se que o herbicida paraquat foi o mais tóxico para a bactéria *Escherichia coli*, com potencial ação bacteriostática e bactericida. Entre os demais herbicidas, a escala decrescente de intoxicação foi a seguinte: Gliz > Roundup = Fusilade = MSMA = Fortex = Padron = Atranex = Combine = herbitrin = Dual > Siptran = Agimix. As formulações DMA, Tordon e Trifluralina, nas concentrações testadas não afetaram o crescimento final da bactéria.

Agradecimentos

Ao CNPq e à FAPEMIG pelo auxílio financeiro à realização desse trabalho.

Literatura citada

BOTELHO, R.G., SANTOS, J.B., OLIVEIRA, T.A., BRAGA, R.R., BYRRO, E.C.M. Toxicidade aguda de herbicidas a Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Planta Daninha.**, v.27, p.621-626, 2009.

DAVISON, C.L., PAPIRMEISTER, B. Bacteriostasis of *Escherichia coli* by the herbicide paraquat. **Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.**, v.136, p. 359-364, 1971.

FARRINGTON, J.A., EBERT, M., LAND, E.J., FLETCHER, K. Bipyridylum quaternary salts and related compounds. V. pulses radiolysis studies of the reaction of paraquat radical with oxygen. Implications for the mode of action of bipyridyl herbicides. **Biochim Biophys Acta**, v. 314, p.372-381, 1973.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. Free Radicals in Biology and Medicine. Nova York: Oxford University Press, 2007.

HARTMANN, C.C. **Avaliação de efluente industrial através de ensaios ecotoxicológicos e análises físicas e químicas**. 2004.101 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2004.

HIGGINS, J., HOHN, C. Effects of prevalent freshwater chemical contaminants on in vitro growth of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Environ Pollut**, v.152, p. 259-266, 2008.

KOUTSOTOLI, A.D., DIMOU, D.S., ALAMANOS, Y.P., MAIPA, V.E. Inductive effects of environmental concentration of atrazine on *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*. **Folia Microbiol**, v. 50, p. 283-287, 2005.

MOZETO, A, A., ZAGATTO, P.A.. In ZAGATO, P.A., BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática - Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima Editora, 2006, Cap. 2, p.15-38.

POLEKSIC, V., KARAN, V. Effects of Trifluralin on Carp: Biochemical and Histological Evaluation. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 45, p.213-221,1999.

RAND, GM., PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology**. Washington. 665p, 1985.

SARIKAYA, R., YILMAZ, M. Investigation of acute toxicity and the effect of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae). **Chemosphere**, v. 52, p.195-201, 2003.