

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciência de Alimentos

200206236

Isolamento e Sistemática de Actinomicetos Degradadores de Herbicidas

Lara Durães Sette

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Lara Durães Sette**, aprovada pela Comissão Julgadora em 17 de dezembro de 2001.

Campinas, 17 de dezembro de 2001

Orientador: Dr. Gilson Paulo Manfio


Dr. Gilson Paulo Manfio
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos,
da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de
Doutor em Ciência de Alimentos

2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	Se78i
V.º	47487
T.º	
P.º	
C	☐
D	☒
PREC.º	R\$ 11,00
DATA	05-02-02
N.º CPD	

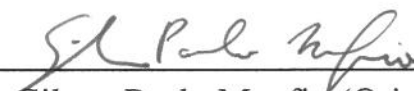
CM00163760-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

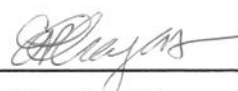
Se78i Sette, Lara Durães
Isolamento e sistemática de actinomicetos degradadores de
herbicidas / Lara Durães Sette. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Gilson Paulo Manfio
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

I. Actinomicetos. 2. Herbicidas. I. Manfio, Gilson Paulo.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

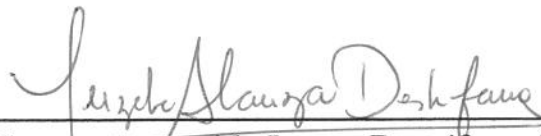
Dr. Gilson Paulo Manfio (Orientador)



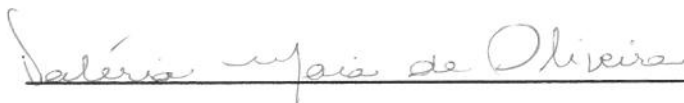
Dra. Eliana Pereira Chaga (Titular)



Dr. Itamar Soares de Melo (Titular)



Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano (Titular)



Dra. Valéria Maia de Oliveira (Titular)

Dra. Lúcia Regina Durant (Suplente)

Dra. Fabiana Fantinatti (Suplente)

DEDICATÓRIAS

Ao meu pai (*in memoriam*)

Grande Mestre, grande Luz, grande Ser.

Agradeço por ser parte de ti.

Ao meu filho Pedro

Razão do meu viver.

Em ti nos eternizamos.

Dedico e agradeço,

à minha mãe Neide, aos meus irmãos Jan e Fabiana e

ao meu grande amigo e companheiro Caco,

pelo incentivo e carinho.

AGRADECIMENTOS

Sem dúvida, todos aqueles que conviveram comigo durante a minha trajetória até aqui fazem parte da minha história. E são, portanto, responsáveis pelo meu desenvolvimento pessoal e profissional. Agradeço a todos por fazerem parte dessa história.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP e à Fundação André Tosello pela infra-estrutura cedida. Ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro. À Dra. Anita Marsaioli e ao Luiz Antônio, do Instituto de Química da UNICAMP, pela parceria de trabalho. Ao Dr. Itamar Soares de Melo e à Rosely dos Santos, do Centro Nacional de Pesquisas do Meio Ambiente da EMBRAPA, pela colaboração e belas fotos de microscopia eletrônica. Aos Membros da Banca, pelas correções e sugestões.

Um agradecimento especial:

Ao Gilson por partilhar do seu saber e pela orientação do trabalho.

À Valéria pela grande ajuda e parceria de trabalho.

Aos amigos da Fundação André Tosello e do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana (FEA/UNICAMP) pelo convívio e trocas diárias.

Eu adoro todos vocês.

ÍNDICE

ÍNDICE	ix
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	x
RESUMO	xv
SUMMARY	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Pesticidas	2
2.1.1. Gramocil	4
2.1.2. Scepter.....	5
2.1.3. Alachlor.....	5
2.2. Biodegradação de pesticidas	6
2.3. Metabolismo do alachlor por microrganismos	7
2.3.1. Rotas de biodegradação do alachlor	7
2.4. Actinomicetos: diversidade e sistemática	9
2.4.1. Sistemática bacteriana.....	10
3. OBJETIVOS	15
3.1. Objetivos Específicos.....	15
3.2. Organograma Geral do Desenvolvimento do Trabalho	16
4. CAPÍTULO 1. ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE ACTINOMICETOS DE SOLOS TRATADOS COM OS HERBICIDAS ALACHLOR, GRAMOCIL E SCEPTER	17
5. CAPÍTULO 2. ARTIGO 1. SELECTIVE ISOLATION, SCREENING AND CHARACTERIZATION OF ALACHLOR-DEGRADING STREPTOMYCETES	29
6. CAPÍTULO 3. ARTIGO 2. METABOLISM OF ALACHLOR BY SOIL STREPTOMYCETES	63
7. DISCUSSÃO GERAL.....	87
8. CONCLUSÕES GERAIS.....	91
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
APÊNDICE	103

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TABELA 1.	Classificação de herbicidas inicialmente selecionados para o estudo.....	3
FIGURA 1.	Estruturas químicas dos herbicidas paraquat (a) e diuron (b).	4
FIGURA 2.	Estrutura química do herbicida sceptor.	5
FIGURA 3.	Estrutura química do herbicida alachlor.....	6
TABELA 2.	Produtos de transformação do alachlor por ação do metabolismo microbiano.....	8
FIGURA 4.	Produtos de transformação do alachlor.....	9

CAPÍTULO 1

FIGURA 1.	Ensaio de resistência microbiológica ao herbicida alachlor. Crescimento de linhagens isoladas de solo tratado com alachlor, em meio de cultivo suplementado com concentrações crescentes do herbicida.....	23
TABELA 1.	Crescimento dos isolados de solo tratado com gramocil após incubação por 7 dias a 30° C em meio de Bennett suplementado com herbicida.....	25
TABELA 2.	Crescimento dos isolados de solo tratado com gramocil após incubação por 7 dias a 30° C em meio de Bennett suplementado com herbicida.....	26
TABELA 3.	Crescimento dos isolados de solo tratado com alachlor após incubação por 7 dias a 30° C em meio de Bennett suplementado com herbicida.....	27
TABELA 4.	Crescimento dos isolados de solo tratado com sceptor após incubação por 7 dias a 30° C em meio de Bennett suplementado com herbicida.....	28

CAPÍTULO 2

TABLE 1.	Growth of isolated strains Bennett's medium supplemented with different concentrations of alachlor.....	45
TABLE 2.	Phenotypic characteristics determined for selected actinomycete strains....	47

FIGURE 1.	<i>In vitro</i> degradation of alachlor by selected actinomycete strains after 7 day incubation (30° C and 150 rpm) of liquid cultures containing 150 µL/L of alachlor and hydrolyzed alachlor components as sole carbon source	49
FIGURE 2.	Aerial hyphae and spore chain morphology of strains LS143 (A), LS151 (B), LS153 (C), LS166 (D), LS177 (E) and LS182 (F) determined by direct optical microscopy	51
FIGURE 3.	Spore ornamentation of strains LS143 (A), LS166 (B), LS177 (C) and LS182 (D) determined by scan electron microscopy (SEM)	53
FIGURE 4.	Spore ornamentation and aerial hyphae of strains LS151 (E-F) and LS153 (G-H) determined by scan electron microscopy (SEM)	55
FIGURE 5.	Dendogram and pattern representation of <i>rep</i> -PCR fingerprints of strains LS166, LS177 and LS182.....	57
FIGURE 6.	Phylogentic analysis of 16S rDNA sequences from selected soil isolates and references strains..	59
FIGURE 7.	Phylogentic analysis of 16S rDNA sequences from isolate LS151 and references strains..	61

CAPÍTULO 3

FIGURE 1.	Degradation of alachlor by pure cultures after incubation for 14 days in medium containing 150 and 300 µL/L of alachlor and hydrolysis products as the sole carbon source	77
FIGURE 2.	Degradation of alachlor by microbial consortia after incubation for 7 and 14 days (150 rpm/30° C) in medium containing 300 µL/L of alachlor and hydrolysis products as the sole carbon source.....	79
FIGURE 3.	Chromatograms of <i>in vitro</i> degradation tests after growth of strain LS182 for 14 days	81
FIGURE 4.	GC-MS chromatograms of the control (A and B) and the fractions referent to the broth of strains LS143 (C), LS151 (D), LS153 (E), LS166 (F), LS177 (G) and LS182 (H), respectively	83
FIGURE 5.	Alachlor natural hydrolysis products detected in the control experiments.	85
FIGURE 6.	Alachlor and degradations products of <i>Streptomyces</i> strains LS143, LS151, LS153, LS166, LS177 and LS182.....	85

APÊNDICE

TABELA 1.	Tempo de retenção (tR) e área dos picos obtidos por CLAE relativos à curva padrão do alachlor	103
FIGURA 1.	Curva de calibração do alachlor	103
TABELA 2.	Tempo de retenção (tR) e área dos picos obtidos por CLAE referentes aos ensaios de degradação <i>in vitro</i> do alachlor por culturas puras após 7 dias de cultivo em meio acrescido de 150 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor	104
TABELA 3.	Tempo de retenção (tR) e área dos picos obtidos por CLAE referentes aos ensaios de degradação <i>in vitro</i> do alachlor por culturas puras após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 150 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor	105
TABELA 4.	Tempo de retenção (tR) e área dos picos obtidos por CLAE referentes aos ensaios de degradação <i>in vitro</i> do alachlor por culturas puras após 7 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor	106
TABELA 5.	Tempo de retenção (tR) e área dos picos obtidos por CLAE referentes aos ensaios de degradação <i>in vitro</i> do alachlor por consórcios microbianos após 7 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor.....	107
TABELA 6.	Tempo de retenção e área dos picos obtidos por CLAE referentes aos ensaios de degradação <i>in vitro</i> do alachlor por consórcios microbianos após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor	108
FIGURA 2.	Cromatogramas das amostras contendo diferentes concentrações de alachlor. (A) 62,5 µL/L; (B) 125 µL/L; (C) 250 µL/L; (D) 500 µL/L e (E) 1.000 µL/L.....	109
FIGURA 3.	Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação <i>in vitro</i> do alachlor por culturas puras após 7 dias de cultivo em meio acrescido de 150 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor. (A e B) controles das amostras LS143, LS151 e LS153; (C e D) controle das amostras LS166, LS177 e LS182.....	110
FIGURA 4.	Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação <i>in vitro</i> do alachlor por culturas puras após 7 dias de cultivo em meio acrescido de 150 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor. (A e B) amostras LS143; (C e D) amostras LS151	111

FIGURA 5.	Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação <i>in vitro</i> doalachlor por culturas puras após 7 dias de cultivo em meio acrescido de 150 µL/L dealachlor e produtos de hidrólise doalachlor. (A e B) amostras LS153; (C e D) amostras LS166	112
FIGURA 6.	Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação <i>in vitro</i> doalachlor por culturas puras após 7 dias de cultivo em meio acrescido de 150 µL/L dealachlor e produtos de hidrólise doalachlor. (A e B) amostras LS177; (C e D) amostras LS182	113
FIGURA 7.	Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação <i>in vitro</i> doalachlor por culturas puras após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 150 µL/L dealachlor e produtos de hidrólise doalachlor. (A e B) controles; (C e D) amostras LS143	114
FIGURA 8.	Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação <i>in vitro</i> doalachlor por culturas puras após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 150 µL/L dealachlor e produtos de hidrólise doalachlor. (A e B) amostras LS151; (C e D) amostras LS153	115
FIGURA 9.	Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação <i>in vitro</i> doalachlor por culturas puras após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 150 µL/L dealachlor e produtos de hidrólise doalachlor. (A e B) amostras LS166; (C e D) amostras LS177	116
FIGURA 10.	Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação <i>in vitro</i> doalachlor por culturas puras após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 150 µL/L dealachlor e produtos de hidrólise doalachlor. (A e B) amostras LS182	117
FIGURA 11.	Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação <i>in vitro</i> doalachlor por culturas puras após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L dealachlor e produtos de hidrólise doalachlor. (A e B) controle das amostras LS143, LS151, LS153 e LS166; (C e D) controle das amostras LS177 e LS182	118
FIGURA 12.	Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação <i>in vitro</i> doalachlor por culturas puras após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L dealachlor e produtos de hidrólise doalachlor. (A e B) amostras LS143; (C e D) amostras LS151	119
FIGURA 13.	Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação <i>in vitro</i> doalachlor por culturas puras após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L dealachlor e produtos de hidrólise doalachlor. (A e B) amostras LS153; (C e D) amostras LS166	120

- FIGURA 14. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por culturas puras após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor. (A e B) amostras LS177; (C e D) amostras LS182..... 121
- FIGURA 15. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por consórcios microbianos após 7 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor. (A e B) controles; (C e D) amostras LS143/LS151/LS153..... 122
- FIGURA 16. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por consórcios microbianos após 7 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor. (A e B) amostras LS151/LS153/LS182; (C e D) amostras LS143/LS151/LS182..... 123
- FIGURA 17. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por consórcios microbianos após 7 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor. (A e B) amostras LS143/LS153/LS182; (C e D) amostras LS166/LS177/LS182..... 124
- FIGURA 18. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por consórcios microbianos após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor. (A e B) controles; (C e D) amostras LS143/LS151/LS153..... 125
- FIGURA 19. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por consórcios microbianos após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor. (A e B) amostras LS151/LS153/LS182; (C e D) amostras LS143/LS151/LS182..... 126
- FIGURA 20. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por consórcios microbianos após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor. (A e B) amostras LS143/LS153/LS182; (C e D) amostras LS166/LS177/LS182..... 127

RESUMO

Diversas linhagens de actinomicetos foram isoladas seletivamente a partir de amostras de solos previamente tratados com os herbicidas alachlor, gramocil e scepter 70DG. Ensaios de seleção e triagem de linhagens resistentes a concentrações elevadas dos herbicidas foram realizados com as culturas puras utilizando meio sólido suplementado com concentrações crescentes dos herbicidas especificados. Dentre as diversas linhagens testadas, 9 isolados demonstraram ser tolerantes à altas concentrações de gramocil, 11 à de scepter e 16 à alachlor.

As 16 linhagens isoladas de amostras de solo enriquecido com alachlor foram avaliadas quanto à capacidade de degradação *in vitro* deste herbicida em ensaios utilizando meio mineral líquido contendo como única fonte de carbono o alachlor e seus produtos de hidrólise nas concentrações de 150 e 300 µL/L. Seis linhagens LS143, LS151, LS153, LS166, LS177 e LS182 foram capazes de transformar entre 50 e 80% do herbicida nas concentrações testadas, formando principalmente compostos indólicos e quinolínicos desclorinados, sem a geração de 2,6-dietilanilina (DEA), um intermediário carcinogênico relatado como um dos principais produtos de degradação/transformação do alachlor. Os melhores resultados foram obtidos com os isolados LS166, LS177 e LS182.

A caracterização taxonômica dos isolados degradadores de alachlor, realizada empregando-se metodologias de caracterização fenotípica, genotípica e análise filogenética, resultou na alocação destes no gênero *Streptomyces*. A linhagem LS151 foi putativamente identificada como *S. galbus* e os isolados LS143 e LS153 como *S. bikiniensis*. As linhagens LS166, LS177 e LS182 mostraram-se similares entre si fenotipicamente e genotipicamente, e filogeneticamente distantes das espécies descritas na literatura, podendo potencialmente representar espécies novas de estreptomicetos.

SUMMARY

Several actinomycete strains were selectively isolated from soil samples previously treated with the herbicides alachlor, sceptor 70DG and gramocil. Screening of highly-resistant strains were performed by growing the pure cultures on solid media supplemented with increasing concentrations of the selected herbicides. From all strains tested, 9, 11 and 16 isolates were resistant to high concentrations of gramocil, sceptor and alachlor, respectively.

The 16 strains isolated from soil samples enriched with alachlor were evaluated regarding their ability to degrade this herbicide *in vitro*. Assays were performed by using a liquid mineral medium supplemented with 150 or 300 $\mu\text{L/L}$ of alachlor and its natural hydrolysis products as the sole carbon sources. Strains LS143, LS151, LS153, LS166, LS177 and LS182 were capable of transforming between 50 and 80% of the herbicide on the concentrations tested, yielding mainly indolic and dechlorinated quinolinic compounds, without the generation of 2,6-diethylaniline (DEA), a carcinogenic intermediate cited as one of the main degradation/transformation products. The best results were obtained with strains LS166, LS177 and LS182.

The taxonomic characterization of the alachlor-degrading strains was performed by using a combination of phenotypic, genotypic, and phylogenetic methods. All strains were assigned to genus *Streptomyces*. Strain LS151 was putatively identified as *S. galbus* and strains LS143 and LS153 as *S. bikiniensis*. Strains LS166, LS177 and LS182 were highly related and could not be identified to any of the species listed in the 16S RNAr sequence databases consulted. These isolates could represent novel streptomycete species.

1. INTRODUÇÃO

Algumas classes de pesticidas amplamente utilizados na agricultura para o controle de pragas possuem toxicidade elevada, efeito residual de longa duração, podendo apresentar, muitas vezes, propriedades carcinogênicas e/ou teratogênicas. Geralmente estes compostos são de difícil degradação, persistindo no meio ambiente por longos períodos de tempo.

O isolamento de microrganismos potencialmente degradadores de compostos xenobióticos tem sido realizado no intuito de se descobrir e elucidar as vias metabólicas, enzimas e produtos intermediários envolvidos no processo de biodegradação.

A maioria dos microrganismos degrada moléculas complexas de pesticidas via cometabolismo, ou seja, utilizam outras fontes de carbono e energia para o crescimento e sobrevivência e, neste processo, degradam enzimaticamente o pesticida. Entretanto, algumas espécies de microrganismos conseguem utilizar estas moléculas como fonte de carbono e energia, o que pode ser considerado uma vantagem para a degradação destes compostos em ambientes com baixas concentrações de carbono.

Os actinomicetos, importantes componentes da microbiota do solo, apresentam atividade degradativa de amplo espectro, podendo secretar uma grande diversidade de enzimas extracelulares, o que os torna capazes de metabolizar moléculas recalcitrantes, incluindo os herbicidas.

Devido aos graves problemas relacionados com a utilização de herbicidas no meio ambiente e baseando-se no fato de que os actinomicetos são potenciais agentes de biodegradação/biotransformação, decidiu-se isolar actinomicetos de amostras de solos previamente tratados com os herbicidas gramocil, sceptor e alachlor, os quais são amplamente utilizados para o controle de ervas daninhas em culturas de grande importância econômica para o Brasil.

Estudos foram realizados com isolados de solo contendo alachlor, sendo as linhagens selecionadas avaliadas quanto à capacidade de metabolizar *in vitro* o herbicida alachlor quando utilizado como fonte de carbono. Seis espécies de actinomicetos apresentaram capacidade de transformação do alachlor próxima ou superior a 50%, as quais foram caracterizadas taxonomicamente e avaliadas filogeneticamente. Também foram realizados estudos envolvendo o metabolismo do alachlor por essas linhagens.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Pesticidas

Os pesticidas, popularmente conhecidos como agrotóxicos, são compostos químicos orgânicos, na sua maioria sintéticos, formulados para controlar ou erradicar, de maneira geralmente seletiva, plantas e animais considerados daninhos em uma cultura agrícola ou criação animal (Frighetto, 1997). Estes compostos possuem toxicidade seletiva para grupos de organismos específicos, mas também podem ser tóxicos para espécies não-alvo e apresentar efeito acumulativo ao longo da cadeia alimentar (Timbrell, 1989). A diversidade de estruturas químicas e propriedades físico-químicas e biológicas dos pesticidas propiciam uma gama extensa de interações com os diferentes componentes do ambiente, resultando em padrões de comportamento únicos para cada tipo de molécula (Lavorenti, 1996).

A utilização de pesticidas no controle de pragas tornou-se uma ferramenta indispensável na agricultura moderna, sendo cerca de quatro milhões de toneladas destes produtos aplicadas por ano nas culturas mundiais (Kumar *et al.*, 1999). A ressurgência rápida de pragas nas práticas de plantio modernas é a razão pela qual a utilização de pesticidas não pode ser descontinuada de imediato ou em curto prazo.

Freqüentemente, aplicações maciças em vastas áreas de monoculturas agrícolas estão associadas a contaminações ambientais e problemas para a saúde humana (Kumar *et al.*, 1996). O acúmulo de agrotóxicos poluentes na biosfera pode criar um “stress” ecológico, resultando na contaminação de recursos naturais e acumulação nos diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, sendo extremamente prejudicial aos seres vivos nos níveis mais altos, incluindo o homem (Golovlela *et al.*, 1992). Além disso, diversos pesticidas apresentam persistência no solo e podem alcançar facilmente os lençóis freáticos, devido à grande mobilidade das moléculas.

O Brasil representa o quinto mercado consumidor mundial de pesticidas, com cerca de 250 ingredientes ativos registrados no IBAMA (Monteiro, 1997). Considerando a grande extensão territorial do País, a dispersão e diversificação da nossa agricultura, variações geoclimáticas e, principalmente, o nível de capacitação do agricultor brasileiro, em grande parte

ainda não-alfabetizado (Arruda, 1996), o grande problema dos defensivos agrícolas está na sua utilização incorreta.

No Brasil, diversos pesticidas utilizados no controle de pragas em cultivos agrícolas apresentam problemas de toxicidade elevada, recalcitrância à degradação biológica ou abiótica e efeito residual de longa duração em solo. Alguns destes são listados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Classificação de herbicidas inicialmente selecionados para o estudo.

Nome	Tipo	Toxicidade ^a	Residual ^b	Classe química	Aplicação
Lorsban 480BR	inseticida	classe II	alto	organofosforado	café, citros, soja, milho, trigo, feijão
Scepter 70DG	herbicida	classe III	alto	imidazol	soja
Alachlor Nortox	herbicida	classe I	moderado	cloro-acetamida	soja, milho, café, cana de açúcar, algodão
Carbaryl Fersol 480SC	inseticida	classe II	moderado	carbamato	cana de açúcar, citros, soja, trigo, milho, feijão
Ethion 500	inseticida	classe I	alto	organofosforado	café, tomate citros
Gramocil	herbicida	classe I		dipiridilio-uréia	café, cana de açúcar, citros, soja

a: classe I, extremamente tóxico; classe II, altamente tóxico; classe III, moderadamente tóxico; classe IV, pouco tóxico; **b:** alto, meia vida maior do que 100 dias; moderado, meia vida de 30 a 100 dias; e, baixo, meia vida de até 30 dias.

Dentre os pesticidas, os herbicidas são os mais utilizados, tanto em volume como em área de aplicação. Produtos para uso em culturas de cereais e pequenos grãos, soja e arroz, beterraba e cana-de-açúcar correspondem a 78% do total de herbicidas comercializados no mundo (Frighetto, 1997). Estes compostos são, em sua maioria, aplicados no solo, razão pela qual têm sido foco de atenção devido à contaminação de águas (Monteiro, 1997).

Os herbicidas alachlor, gramocil e sceptor foram selecionados para estudo no presente projeto devido à combinação de suas características de toxicidade, efeito residual no solo e, principalmente, a ampla aplicação em diversas culturas agrícolas de importância econômica, incluindo: algodão, amendoim, café, cana-de-açúcar, citros, milho e soja.

2.1.1. Gramocil

O gramocil é um herbicida do grupo das dipiridílios-uréias, utilizado em culturas de café e cana-de-açúcar. Este composto é classificado como “extremamente tóxico” e constituído por uma mistura dos herbicidas paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-dipiridílio; **Figura 1A**) e diuron (*N*-(3,4-diclorofenil)-*N,N*-dimetil uréia; **Figura 1B**). O paraquat, amplamente utilizado para o controle de ervas-daninhas de folhas largas, destrói tecidos de plantas verdes através do contato e por translocação dentro da planta, enquanto que o diuron age através da inibição da fotossíntese (Arruda, 1996; EXTOTOXNET, 1996).

Devido à capacidade de adsorção do paraquat nas partículas do solo e matéria orgânica, o composto possui longo efeito residual no solo (meia vida superior a 100 dias), com biodisponibilidade limitada para degradação por microrganismos. A molécula pode também sofrer degradação por fotólise (luz ultravioleta e luz solar), gerando produtos menos tóxicos (EXTOTOXNET, 1996).

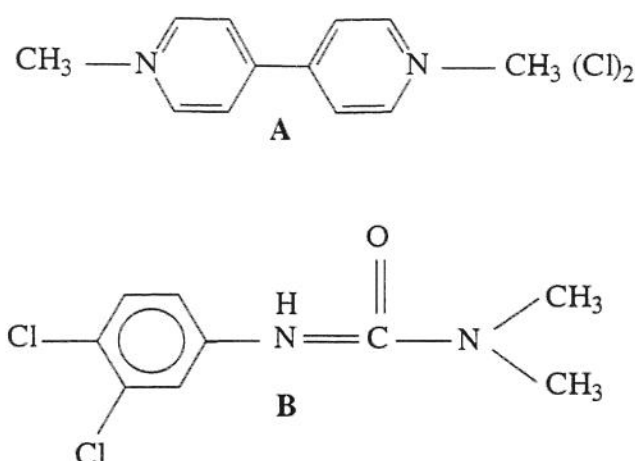


Figura 1. Estruturas químicas dos herbicidas paraquat (**A**) e diuron (**B**).

2.1.2. Scepter

O herbicida scepter, ou imazaquin (2-[4,5-dihidro-4-metil-4-(1-metiletil)-5-oxo-1H-imidazol-2-yl]-3-quinolinacarboxílico; **Figura 2**), pertence à classe dos imidazóis. Este composto é utilizado como controle seletivo pré- e pós-emergência em culturas de soja. O scepter é classificado como “moderadamente tóxico” e possui efeito residual elevado no solo (meia vida superior a 100 dias). O controle de gramíneas e ervas-daninhas ocorre através da inibição da síntese de aminoácidos, como valina, leucina e isoleucina (EXTOXNET, 1996).

O scepter é um composto não-volátil, com movimento limitado no solo. A fotodegradação é mínima, sendo a microbiota do solo a grande responsável pela sua metabolização.

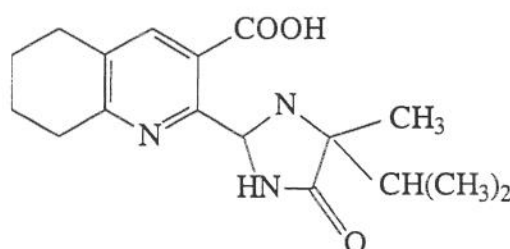


Figura 2. Estrutura química do herbicida scepter.

2.1.3. Alachlor

O alachlor (2-cloro-N-(metoximetil)-N-(2,6-dietilfenil)-acetamida; **Figura 3**) é um herbicida amplamente utilizado como controle pré-emergência de gramíneas em importantes culturas comerciais do Brasil, incluindo: algodão, café, cana-de-açúcar, milho, e soja. Sua atuação é sistêmica e seletiva, inibindo o crescimento da raiz através da interferência na síntese protéica na planta e na elongação da raiz (EXTOXNET, 1996).

Quimicamente, este herbicida pertence à classe das acetamidas sendo considerado um composto “extremamente tóxico”. Nos Estados Unidos da América, seu uso é restrito devido ao efeito carcinogênico em animais de laboratório (Heydens *et al.*, 1999; Coleman *et al.*, 1999; Coleman *et al.*, 2000). No solo, apresenta efeito residual moderado (meia-vida em torno de 30

a 100 dias) e mobilidade moderada, podendo atingir o lençol freático. Este composto é degradado principalmente pela ação da microbiota do solo.

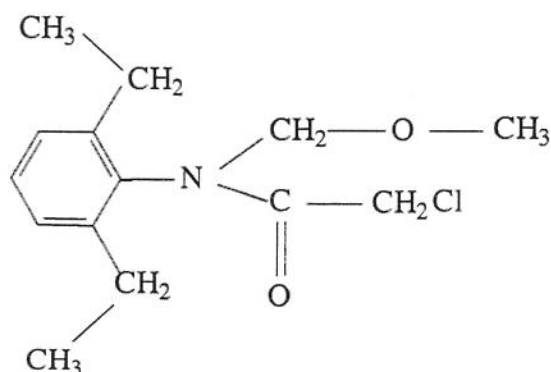


Figura 3. Estrutura química do herbicida alachlor.

2.2. Biodegradação de pesticidas

Por muitas décadas, os produtos químicos industriais vêm sendo despejados no meio ambiente em grande escala. Muitos destes são rapidamente degradados por microrganismos presentes no solo e na água. Contudo, um número significativo de moléculas persiste e se acumula no meio ambiente, sendo degradadas de forma mais lenta (Higson, 1991).

Já está bem estabelecido o fato de que os microrganismos são os principais, ou, freqüentemente, os únicos agentes que apresentam significativa capacidade de degradação e destoxificação dos pesticidas no meio ambiente. A degradação microbiana apresenta-se vantajosa em relação aos processos de tratamento físico-químicos (*e.g.*, remoção do solo contaminado e incineração), pois uma grande variedade de pesticidas pode ser degradada completamente a custos baixos e sem a co-geração de poluentes ambientais (Singh *et al.*, 1999).

Os compostos sintéticos freqüentemente apresentam estruturas complexas, resistentes à degradação. A biodegradação destes compostos muitas vezes requer a ação conjunta de diferentes microrganismos, devido principalmente ao fato da diversidade metabólica de uma comunidade microbiana ser maior que a de uma única espécie de microrganismo (Bartha, 1990).

Um grande número de reações e vias bioquímicas utilizadas na biodegradação de pesticidas tem sido reportado (Karns & Tomasek, 1991; Ahmad *et al.*, 1991, Chapaumadugu & Chaudhry, 1993, Nandean *et al.*, 1994). As duas principais classes de enzimas envolvidas nestes processos são as hidrolases e as oxigenases. As hidrolases não requerem cofatores e são relativamente estáveis em uma faixa ampla de pH e temperatura. As oxigenases são enzimas mais complexas e relativamente menos estáveis que as hidrolases; requerem o oxigênio molecular como substrato e podem ser divididas em dois grupos principais, as monoxigenases e as dioxigenases (Singh *et al.*, 1999).

2.3. Metabolismo do alachlor por microrganismos

Estudos anteriores demonstraram que a principal via de degradação do alachlor é realizada por microrganismos do solo (Pothuluri *et al.*, 1993; Felsot & Dzantor, 1994; Ferrey *et al.*, 1994; Shelton *et al.*, 1996; Stamper & Tuovinen, 1998).

Sob condições aeróbicas, o alachlor é metabolizado primeiramente por fungos e bactérias. Sugere-se que a sua biodegradação seja, inicialmente, porém não exclusivamente, via co-metabolismo (Stamper & Tuovinen, 1998). A grande maioria dos estudos foi realizada utilizando microrganismos ou consórcios em solo enriquecido com fontes de carbono e/ou nitrogênio ou em cultivo *in vitro* (Pothuluri *et al.*, 1993; Ferrey, *et al.*, 1994; Shelton *et al.*, 1996). Apenas um relato (Tiedje & Hagedorn, 1975) cita a degradação da molécula pelo fungo *Chaetomium globosum* em ensaios onde o alachlor foi utilizado como única fonte de carbono e energia, mas não houve evidências da degradação do anel aromático.

2.3.1. Rotas de biodegradação do alachlor

O alachlor apresenta em sua estrutura ligações químicas estáveis do tipo C-C (alifáticas), C-H e C-Cl (Silva & Fay, 1997). Segundo Reineke e Knackmuss (1988), a descloração é usualmente o primeiro passo na destoxificação de compostos aromáticos. Estudos de biotransformação do herbicida metalachlor, o qual pertence ao mesmo grupo químico do alachlor (acetanilida), sugerem que a habilidade de desclorar este composto pode ser um pré-requisito para a completa degradação do herbicida por microrganismos (Bollag, 1990).

A mineralização do alachlor com quebra do anel aromático foi observada em alguns estudos utilizando-se ^{14}C -alachlor. Três fungos lignocelulolíticos (decomposição branca)

apresentaram resultados de mineralização em torno de 6 a 14% após 122 dias de crescimento na presença de outras fontes de carbono (Ferrey *et al.*, 1994).

A mineralização do alachlor em águas de lago e de esgoto foi avaliada por Novick e Alexander (1985) na região de Ithaca (NY, EUA). A produção de $^{14}\text{CO}_2$ obtida a partir do anel aromático marcado foi em torno de 20% para água de esgoto e 10% para água do lago, após 6 semanas de incubação. Estes resultados de degradação do alachlor, juntamente com os resultados de estudos semelhantes na literatura (Smith & Phillips, 1975; Sun *et al.*, 1990), indicam que o anel aromático da molécula deste herbicida apresenta baixa porcentagem de degradação, mesmo após longos períodos de incubação. Estes resultados sugerem que a mineralização ocorre apenas na presença de outras fontes de carbono, necessárias para a manutenção do crescimento do microrganismo no meio de cultivo.

Segundo de Schrijver & Mot (1999), não existe relato na literatura sobre a mineralização completa desse herbicida por culturas puras ou mistas de bactérias e fungos. Os principais produtos de transformação do alachlor por microrganismos citados na literatura são apresentados na **Tabela 2** e **Figura 4**.

A carcinogenicidade do alachlor é resultante de um processo complexo, envolvendo a formação do composto dialquilbenzoquinona-imina (DEBQI), o qual é capaz de interagir com moléculas de DNA (Coleman, *et al.*, 1999; Coleman, *et al.*, 2000).

No metabolismo celular do alachlor, é gerado o composto DEA (2,6-dietilanilina; **Figura 4 B**), o qual é um importante intermediário na formação do DEBQI. Reações de hidroxilação e subsequente oxidação do DEA podem produzir o composto carcinogênico DEBQI (Coleman, *et al.*, 1999; Coleman, *et al.*, 2000).

Tabela 2. Produtos de transformação do alachlor por ação do metabolismo microbiano.

Estruturas químicas (Figura 4)	Nome químico
A	2-cloro-2',6'-dietilacetoanilida
B	2,6-dietilanilina (DEA)
C	2,6-dietil-N-(metoximetil)anilina
D	1-cloroacetil-2,3-dihidro-7etil-indol
E	2',6'-dietil-N-(metoximetil)acetoanilida
F	bis-2-tio-2',6'-dietil-N-(metoximetil)acetanilida

Fonte: Stamper & Tuovinen, 1998.

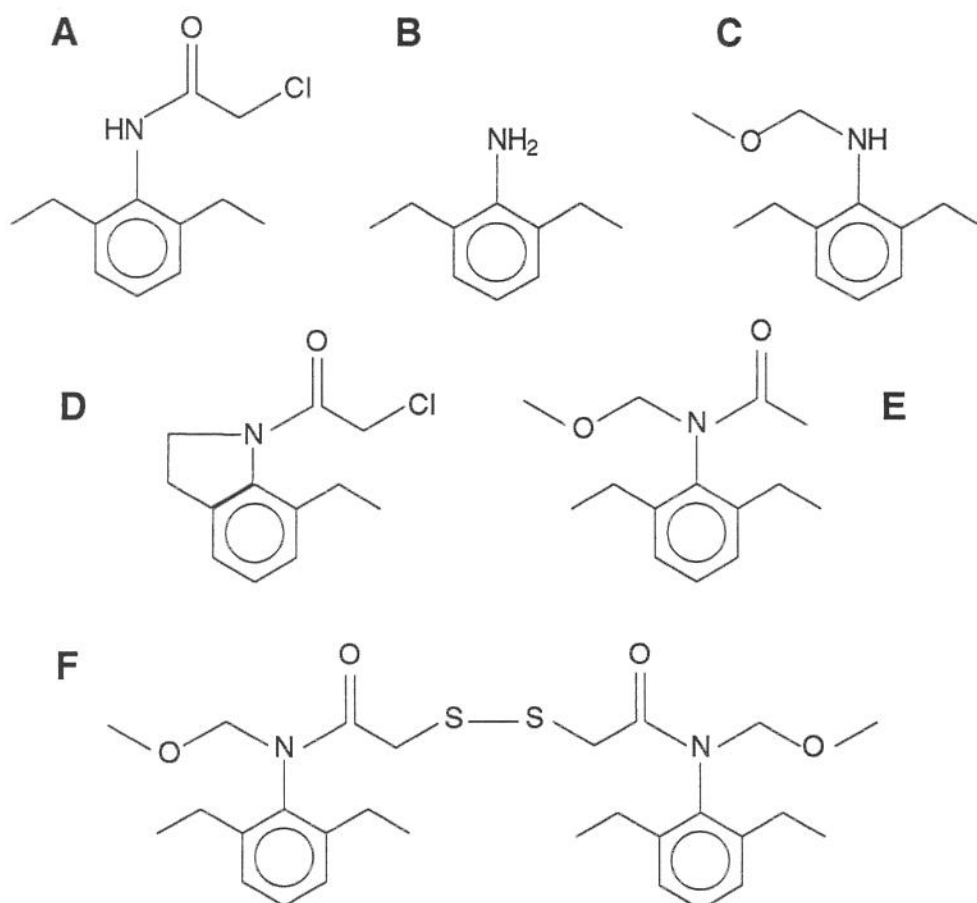


Figura 4. Produtos de transformação do alachlor (nomes dos compostos, vide Tabela 2).

2.4. Actinomicetos: diversidade e sistemática

Os actinomicetos são bactérias Gram-positivas, Divisão Actinobacteria, cujos organismos têm conteúdo de guanina e citosina (G+C) elevado. Os actinomicetos comumente apresentam diferenciação celular e podem formar filamentos ramificados denominados micélios. Esta característica está presente, nos organismos do grupo em graus diversos (Pelczar *et al.*, 1980). São exemplos de actinomicetos *Arthrobacter* spp., *Brevibacterium* spp., *Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Rhodococcus* spp. e *Streptomyces* spp.

Muitos dos actinomicetos formam esporos, sendo esta característica utilizada para a separação em subgrupos (Madigan *et al.*, 1997). A grande diversidade de morfologia e ornamentação dos esporos fornecem informações para a classificação em gêneros e espécies (Goodfellow, 1989).

Devido à morfologia e ao ciclo de vida peculiar, os actinomicetos são reconhecidos como um grupo de microrganismos distinto entre as bactérias, podendo ser encontrados em habitats diversos, sendo o solo o maior reservatório desses organismos (Labeda & Shearer, 1990). Cerca de 90% dos representantes de actinomicetos foram isolados de solo (McCarthy & Williams, 1990).

Apesar da grande variedade morfológica, filogeneticamente os actinomicetos formam um grupo coerente. Contudo, é difícil a diferenciação entre alguns gêneros da classe (Madigan *et al.*, 1997). A taxonomia molecular dos actinomicetos foi examinada por Embley & Stackebrandt (1994), Stackebrandt *et al.* (1997) e mais recentemente por Anderson e Wellington (2001), e constitui-se em uma alternativa consistente para a classificação destes organismos.

De modo geral, há grande interesse da indústria no isolamento e caracterização destes organismos, uma vez que vários grupos são produtores de antibióticos, metabólitos farmacologicamente ativos (anti-inflamatórios, imunomoduladores) (Arai, 1997), enzimas extracelulares de aplicação industrial (*e.g.*, celulasas, esterases) (Labeda, 1990) e biodegradadores de diversos compostos recalcitrantes, incluindo os agrotóxicos e poluentes ambientais (McCarthy & Williams, 1992).

Os principais gêneros ou famílias de actinomicetos degradadores de pesticidas pertencem aos seguintes grupos: *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Clavibacter*, *Corynebacterium*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Rhodococcus* e *Streptomyces* (de Schrijver & de Mot, 1999).

2.4.1. Sistemática bacteriana

A identificação e classificação dos organismos vivos são essenciais em vários ramos da ciência biológica (Pelczar *et al.*, 1980). Um bom sistema de identificação deve possuir como características fundamentais a confiabilidade, conveniência, rapidez, um menor número de testes possível, versatilidade, e custo acessível (Logan, 1991).

Existem várias maneiras pelas quais a classificação microbiana pode ser efetuada, dependendo do grupo de microrganismos a ser estudado e das facilidades disponíveis, como por exemplo: a taxonomia clássica, assim denominada por ser a maneira pela qual a taxonomia microbiana tem sido praticada por mais de 100 anos, e a taxonomia molecular, a qual envolve

estudos do DNA ou RNA dos organismos, estabelecendo o grau de relação filogenética entre eles (Ludwig & Schleifer, 1994).

Na taxonomia bacteriana clássica ou convencional, uma variedade de características de diferentes linhagens ou espécies é determinada e essas particularidades são então utilizadas para agrupar os organismos. A taxonomia convencional está baseada principalmente em caracteres que envolvem a morfologia, reação de Gram, presença de inclusão celular ou produtos de estoque, produção de pigmentos, requerimentos de cultivo específicos, habilidade para utilizar fontes de carbono, enxofre e nitrogênio, produtos de fermentação, necessidades gasosas, requerimento de temperatura e pH (e tolerância), e sensibilidade a antibióticos, entre outros (Madigan *et al.*, 1997).

A micromorfologia, determinada através da microscopia óptica convencional ou eletrônica, representa uma importante ferramenta para estudos taxonômicos de actinomicetos. A aplicação de técnicas de microscopia eletrônica é, em muitos aspectos, superior à microscopia óptica, principalmente pelo maior poder de resolução na elucidação de estruturas celulares e detalhes da ornamentação de esporos (Pelczar *et al.*, 1980).

Apesar da eficiência de aplicação para a caracterização de organismos de diversos grupos de bactérias, os métodos tradicionais e morfologia muitas vezes são insuficientes para a caracterização de actinomicetos, sendo necessária a aplicação de métodos quimiotaxonômicos e moleculares (Goodfellow, 1989).

A quimiotaxonomia, ou quimiosistemática, é o estudo da distribuição e composição de componentes químicos, como aminoácidos, lipídeos, proteínas, quinonas isoprenóides, e açúcares da parede celular, dentre os membros de taxa microbianas e a utilização destas informações para classificação e identificação (Goodfellow & O'Donnell, 1994). Os dados químicos derivados de análises dos componentes celulares podem ser utilizados para classificar as bactérias em diferentes graus taxonômicos de acordo com os padrões de distribuição dos vários marcadores químicos dentro e entre os membros de diferentes taxa (Chun, 1995).

A taxonomia molecular envolve o estudo dos ácidos nucleicos microbianos, principalmente o DNA cromossômico, o RNA e DNA ribossomal (RNAr ou DNAr), para a obtenção de informações taxonômicas. As informações derivadas de ácidos nucleicos podem ser empregadas na classificação de linhagens microbianas em diversos níveis taxonômicos

hierárquicos, desde o estabelecimento de relações infra-específicas até supra-genéricas (Stackebrandt & Liesack, 1993).

As metodologias mais utilizadas em taxonomia molecular microbiana são a homologia de DNA-DNA e a análise de seqüências do gene que codifica para o RNAr 16S. A técnica de análise de seqüências do gene RNAr envolve a amplificação e o sequenciamento dos genes RNAr 16S dos diferentes microrganismos, onde as seqüências obtidas podem ser comparadas com seqüências já existentes depositadas em bancos de dados, como o Genbank ou Ribosomal Database Project (RDP).

O sequenciamento dos genes RNAr 16S (DNAr) através da reação da polimerase em cadeia (PCR) é uma técnica amplamente utilizada, possuindo diversas vantagens, como o menor requerimento de material celular, rapidez e conveniência, quando comparada com outros métodos convencionais e moleculares (Madigan *et al.*, 1997). A análise da seqüência permite a realização de inferências filogenéticas por meio da construção de árvores genealógicas, as quais representam as linhas de descendência dos microrganismos (Woese, 1992).

A filogenia é definida como o estudo da história evolutiva dos organismos. As relações filogenéticas entre os organismos são representadas por árvores (filogramas ou cladogramas) e inferidas principalmente através da análise de seqüências de genes conservados (Chun, 1995).

Atualmente, a sistemática bacteriana está basicamente fundamentada em informações filogenéticas derivadas de macromoléculas de ácidos nucleicos e proteínas conservados funcional e evolutivamente, tais como DNAr e RNAr 16S e 23S, ATPases, chaperoninas (groEL), DNA e RNA polimerases e histonas (Woese, 1987; Stackebrandt, 1992; Ludwig *et al.*, 1993; Ludwig & Schleifer, 1994; Olsen *et al.*, 1994).

Para se inferir a relação evolucionária entre organismos é essencial que marcadores adequados sejam escolhidos. A molécula deve ser igualmente distribuída no grupo de interesse e homóloga em cada organismo, pois as comparações filogenéticas devem ser efetuadas com base em moléculas que apresentam a mesma relação genealógica. Nas comparações de seqüências é crucial que as moléculas possam ser alinhadas, para que sejam identificadas as regiões de homologia (Madigan *et al.*, 1997).

Os genes RNAs ribossomais estão entre os genes mais extensivamente estudados em bactérias (Woese, 1987; Stackebrandt, 1992; Woese, 1992; Ludwig & Schleifer, 1994). Nos membros da maioria das espécies bacterianas, os genes que codificam os três tipos de RNAs (16S, 23S e 5S) estão intimamente ligados em um operon (Chun, 1995).

As informações contidas nas moléculas do RNAr 16S têm sido extensivamente utilizadas para o estabelecimento de relações filogenéticas em actinomicetos (Goodfellow, 1989; Embley & Stackebrandt, 1994; Stackebrandt *et al.*, 1997; Anderson & Wellington, 2001).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos gerais o isolamento e seleção de actinomicetos para estudos de degradação dos herbicidas alachlor, gramocil e sceptor, comumente utilizados para o controle de plantas daninhas em cultivos agrícolas no país. Estudos detalhados de degradação *in vitro*, envolvendo a caracterização dos produtos de degradação e caracterização taxonômica dos organismos degradadores, foram realizados com o alachlor devido ao elevado grau de toxicidade e potencial carcinogênico deste composto.

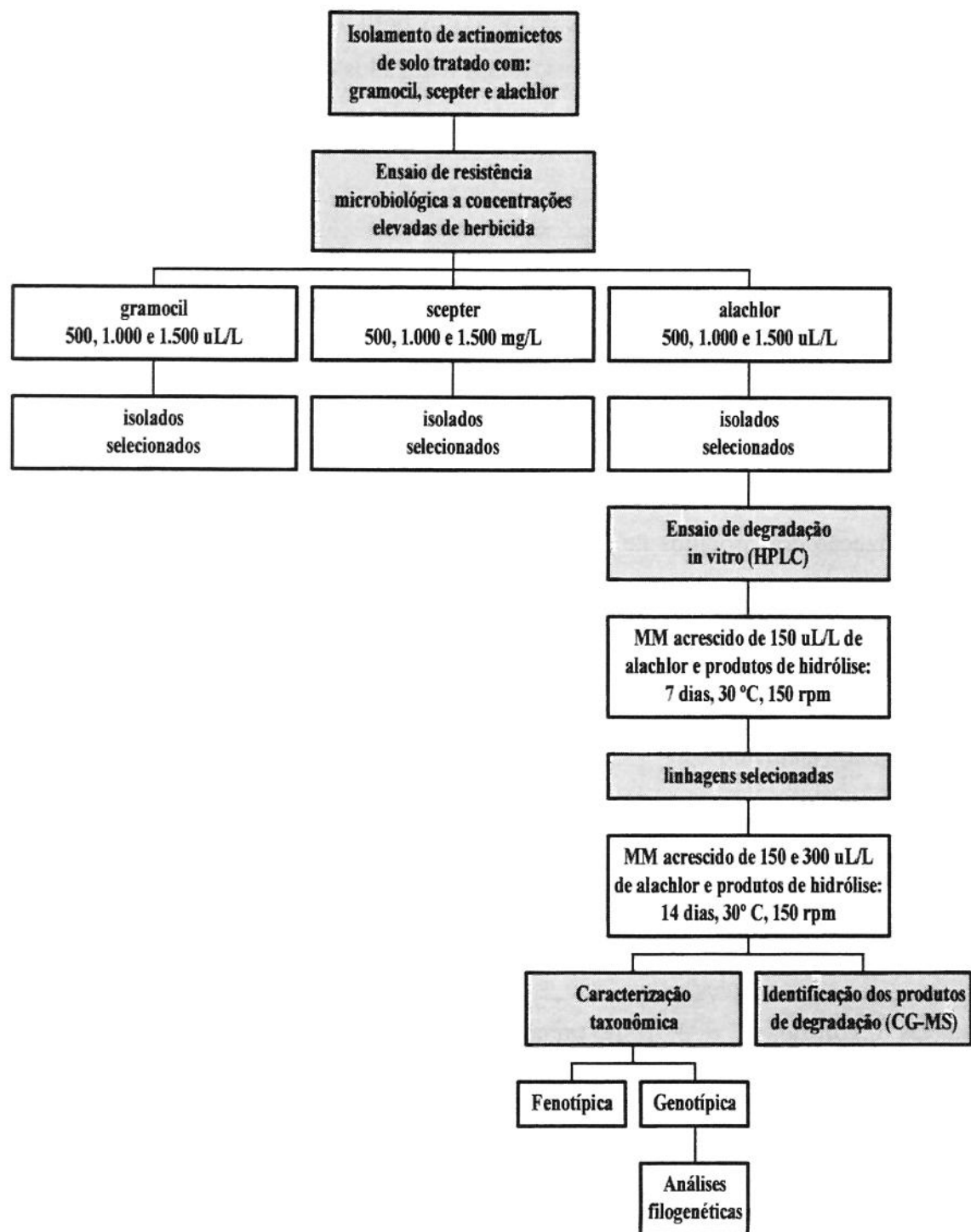
3.1. Objetivos Específicos

- Isolamento e seleção de actinomicetos de solos previamente enriquecidos com os herbicidas alachlor, gramocil e sceptor (**Capítulo 1**).
- Estudos de degradação do herbicida alachlor por culturas puras e consórcios microbianos (**Capítulo 2**).
- Caracterização dos produtos de degradação formados a partir do metabolismo do alachlor pelos microrganismos degradadores (**Capítulo 3**).
- Caracterização taxonômica de microrganismos degradadores de alachlor utilizando taxonomia clássica (caracterização fenotípica) e molecular (caracterização genotípica e filogenética) (**Capítulo 2**).

Obs.: Os **Capítulos 2 e 3** deste trabalho são apresentados na foma de “artigos para publicação”. As referências bibliográficas citadas nestes capítulos foram também incluídas na seção pertinente no final da Tese.

3.2. Organograma Geral do Desenvolvimento do Trabalho

O esquema geral da estratégia utilizada para o desenvolvimento do presente trabalho está ilustrado no fluxograma abaixo. As etapas apresentadas encontram-se detalhadas nos Capítulos 1, 2 e 3.



4. CAPÍTULO 1. ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE ACTINOMICETOS DE SOLOS TRATADOS COM OS HERBICIDAS ALACHLOR, GRAMOCIL E SCEPTER

1. INTRODUÇÃO

O uso de pesticidas para o controle de plantas e animais considerados daninhos tornou-se parte integral dos sistemas agrícolas modernos. Inúmeros problemas estão relacionados com sua utilização, incluindo toxicidade a organismos não-alvo, efeito residual longo após aplicação em solo, poluição ambiental, bioacumulação e carcinogenicidade/teratogenicidade. Dentre os pesticidas, os herbicidas são os produtos mais utilizados, tanto em volume quanto em área tratada (Frighetto, 1997). Estes compostos são, em geral, aplicados diretamente no solo, razão pela qual têm sido foco de atenção em relação à contaminação do lençol freático e rios (Monteiro, 1997).

Os microrganismos são os principais ou, freqüentemente, os únicos agentes que atuam na degradação e/ou destoxificação significativa de pesticidas no meio ambiente. A degradação microbiana pode ser extremamente vantajosa em relação a outros métodos (físico-químicos), pois um grande número de compostos pode ser degradado sem a co-geração de poluentes ambientais e com baixo custo. O isolamento de microrganismos capazes de metabolizar compostos poluentes ambientais recalcitrantes permite, também, o conhecimento dos sistemas enzimáticos e vias metabólicas envolvidas no processo biodegradativo, além de tornar estes organismos disponíveis para aplicação futura em processos diversos. A aplicação de microrganismos degradadores de compostos poluentes na recuperação de áreas contaminadas é chamada de biorremediação (Bartha, 1990).

As bactérias têm um importante papel na transformação de pesticidas e diversos estudos foram conduzidos com este grupo de microrganismos, por outro lado, fungos e actinomicetos, são ainda pouco estudados (de Schrijver & de Mot, 1999; Kumar *et al.*, 1996). Os actinomicetos são organismos considerados como degradadores primários. Este

grupo de bactérias apresenta atividade degradativa extensa, sendo capaz de produzir uma grande variedade de enzimas extracelulares (McCarthy & Williams, 1992). Membros do grupo dos actinomicetos têm sido reportados como degradadores de pesticidas, incluindo organismos dos gêneros *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Clavibacter*, *Corynebacterium*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Rhodococcus* e *Streptomyces* (de Schrijver & de Mot, 1999).

No presente estudo, foram utilizados três tipos de solo previamente tratados com os herbicidas alachlor, gramocil e sceptor visando o isolamento de linhagens de actinomicetos e seleção dos isolados resistentes a altas concentrações destes compostos. Os herbicidas foram selecionados levando-se em consideração o grau de toxicidade, o efeito residual em solo e a sua aplicação em diversas culturas de importância econômica para o país.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Herbicidas. O alachlor foi cedido pela empresa Monsanto (Jacareí, SP, Brasil) na formulação de concentrado emulsificável. O gramocil foi cedido pela empresa Zeneca Brasil Ltda. (Paulínia, SP, Brasil) na formulação de concentrado emulsificável. O sceptor foi cedido pela empresa Cyanamid Company (Paulínia, SP, Brasil) na formulação granular.

Amostras de solo. As amostras de solo tratadas com os herbicidas alachlor, gramocil e sceptor foram coletadas de áreas experimentais da Fundação André Tosello (Campinas, SP, Brasil), da Indústria Química Cyanamid (Iracemápolis, SP, Brasil) e da Universidade de Engenharia Química de Lorena (Lorena, SP, Brasil), respectivamente. Os tratamentos consistiram na aplicação dos herbicidas nas concentrações recomendadas de 6 L/ha para alachlor 2 L/ha para gramocil e 200 g/ha para sceptor (Arruda, 1996). As coletas de amostras de solo foram realizadas após 10 e 20 dias da aplicação, coletando-se sub-amostras com até 5,0 cm de profundidade de diferentes partes da área tratada. As sub-amostras foram agregadas e homogeneizadas em uma amostra composta para realização dos experimentos de isolamento seletivo, posteriores.

Isolamento de actinomicetos de solo. Para cada 1 g de amostra dos solos previamente tratados com os herbicidas alachlor, gramocil e sceptor, foi adicionado 9 mL de água destilada. A suspensão de solo foi submetida a agitação de 200 rpm e após 1 hora foram realizadas diluições seriadas (10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) em água esterilizada, das quais foram tomadas alíquotas de 100 μ L para inoculação nos meios de cultivo apropriados. As placas foram incubadas na posição invertida a 30° C por 10 dias.

Foram utilizados para o isolamento os meios ágar mineral (Labeda & Shearer, 1990; 1 g KNO₃; 0,5 g K₂HPO₄; 0,5 g MgSO₄; 0,5g NaCl; 10 mg FeSO₄; 20 g ágar, Difco, em 1 L água destilada, pH 7,3), acrescido de 1 mL de solução de microelementos (1 g CuSO₄ . 5 H₂O; 1,25 g MnCl₂ . 2 H₂O; 240 mg ZnSO₄ . 7 H₂O em 1 litro de água destilada), e meio amido caseína (Küster & Williams, 1964; 10 g amido solúvel; 0,3 g caseína livre de vitaminas, Difco; 2 g KNO₃; 2 g NaCl; 0,05 g MgSO₄ . 7 H₂O; 0,02 g CaCO₃; 0,01 g FeSO₄ . 7 H₂O; 12 g ágar, Difco, em 1 L de água destilada, pH 7,0-7,2, acrescido de 10 mL de solução estoque K₂HPO₄ 20%, adicionado ao meio após autoclavagem. Os meios de cultivo foram acrescidos do antifúngico actidiona (50 μ L/L) e dos herbicidas em concentrações diversas (alachlor: 3, 30 e 300 μ L/L, gramocil: 1, 10 e 100 μ L/L e sceptor: 0,1, 1 e 10 mg/L). As linhagens com aspecto de morfologia de colônia típica de actinomicetos foram repicadas em novas placas e preservadas em glicerol 20% a -20° C.

Seleção de linhagens. Os microrganismos isolados foram selecionados de acordo com o nível de resistência a concentrações crescentes dos herbicidas utilizados. Foi utilizado o meio de Bennett (1 g extrato de levedura, 0,8 g Lab-Lemco, 2 g Bacto-casitone, 10 g glicose e 15 g ágar em 1 L de água destilada, pH 7,2) acrescido de alachlor (500, 1000 ou 1500 μ L/L), gramocil (500, 1000 ou 1500 μ L/L) ou sceptor (500, 1000 ou 1500 mg/L). Os resultados de crescimento foram comparados com o crescimento em placas-controle sem a adição do herbicida.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Compostos químicos complexos podem apresentar uma resistência à degradação biológica e físico-química no ambiente natural, tornando-se, assim, poluentes ambientais. Microrganismos capazes de degradar esses tipos de moléculas em ambientes não-poluídos podem representar frações raras da comunidade microbiana, sendo necessário o enriquecimento seletivo destes componentes para sua recuperação em experimentos de isolamento em laboratório (Bartha, 1990).

Baseando-se no princípio de que solos, sedimentos e águas contaminadas com compostos poluentes são substratos adequados para o isolamento de microrganismos adaptados à presença destes compostos no meio, foram utilizadas amostras de solo previamente tratadas com os pesticidas de interesse. Assim, amostras de solos tratados com os herbicidas gramocil, sceptor e alachlor foram utilizadas como inóculo em meios de cultivo seletivos apropriados para o crescimento de actinomicetos, suplementados com os herbicidas estudados.

A adição dos herbicidas como fonte alternativa de carbono nos meios de isolamento seletivo foi realizada no intuito de se promover um favorecimento do crescimento de organismos adaptados ao metabolismo de tais compostos, através da seleção de populações nativas de microrganismos capazes de degradar os compostos-alvo. Desta forma, foram isolados 53 linhagens de actinomicetos a partir de amostra de solo tratado com alachlor e 67 linhagens de actinomicetos a partir de amostras de solo tratados com gramocil e sceptor.

Os isolados obtidos foram submetidos ao ensaio de resistência microbiológica a concentrações crescentes dos herbicidas (**Figura 1**), visando a seleção de linhagens capazes de sobreviver a concentrações elevadas destes compostos para utilização posterior nos ensaios de degradação. As concentrações utilizadas nos ensaios de resistência microbiológica (500, 1000 e 1500 $\mu\text{L/L}$ ou 500, 1000 e 1500 mg/L) foram entre 500 e 1500 vezes superiores às concentrações recomendadas para aplicação em solo (3 $\mu\text{L/L}$ para alachlor, 1 $\mu\text{L/L}$ para gramocil e 1 mg/L para sceptor).

Os microrganismos isolados a partir da amostra de solo tratada com gramocil foram inicialmente cultivados em placas contendo 100, 250 e 500 $\mu\text{L/L}$ de gramocil. Os resultados, apresentados na **Tabela 1**, demonstram que 34 dos 67 actinomicetos foram capazes de atingir crescimento bom e regular até a concentração mais elevada utilizada no experimento (500 $\mu\text{L/L}$). Portanto, as 34 linhagens selecionadas foram novamente incubadas, nas mesmas condições, utilizando-se concentrações mais elevadas de gramocil (500, 1000 e 1500 $\mu\text{L/L}$). Neste caso, foram selecionadas 9 linhagens (**Tabela 2**), as quais na sua maioria, apresentaram crescimento micelial entre regular e bom na presença de 1000 e 1500 $\mu\text{L/L}$ do herbicida.

Com relação aos isolados de solo tratado com alachlor, os resultados dos ensaios de resistência microbiológica apresentados na **Tabela 2**, demonstram que 16 dos 53 isolados cresceram bem em 500 $\mu\text{L/L}$ de alachlor e apresentaram crescimento entre regular e bom na presença de altas concentrações do herbicida (1000 e 1500 $\mu\text{L/L}$). Quanto aos organismos isolados de solo tratado com scepter, 11 dos 67 actinomicetos foram selecionados através do ensaio de resistência ao herbicida por apresentarem crescimento micelial de muito bom a regular quando cultivados na presença de até 1000 mg/L do herbicida em questão (**Tabela 4**).

A utilização de microrganismos em ensaios de degradação de compostos poluentes *in vitro* ou *in situ* requer que os mesmos apresentem tolerância a concentrações elevadas dos compostos a serem degradados. Os ensaios de resistência aos herbicidas possibilitaram a seleção de 36 linhagens capazes de crescer na presença de altas concentrações de alachlor (16 linhagens), gramocil (9 linhagens) e scepter (11 linhagens) *in vitro*.

O crescimento obtido nos cultivos em meio de Bennett na presença de alachlor, gramocil e scepter em concentrações elevadas pode ou não estar relacionado à capacidade dos isolados em utilizar as moléculas destes herbicidas como fonte de carbono para crescimento. Para que a capacidade degradativa dos isolados selecionados seja verificada, visando a utilização de microrganismos em biorremediação, é necessária a realização de estudos adicionais de degradação *in vitro* dos herbicidas e caracterização dos sub-produtos

de degradação gerados, uma vez que estes últimos podem ser mais tóxicos que o composto original.

Todos os isolados selecionados no presente estudo foram depositados na Coleção de Culturas Tropical, Fundação André Tosello e na Divisão de Recursos Microbianos do CPQBA/UNICAMP. As linhagens tolerantes a gramocil e sceptor encontram-se disponíveis para realização de estudos futuros de caracterização do potencial de biodegradação destes compostos. Os ensaios de degradação *in vitro* e caracterização taxonômica das linhagens tolerantes ao alachlor são apresentados nos **Capítulos 2 e 3**.

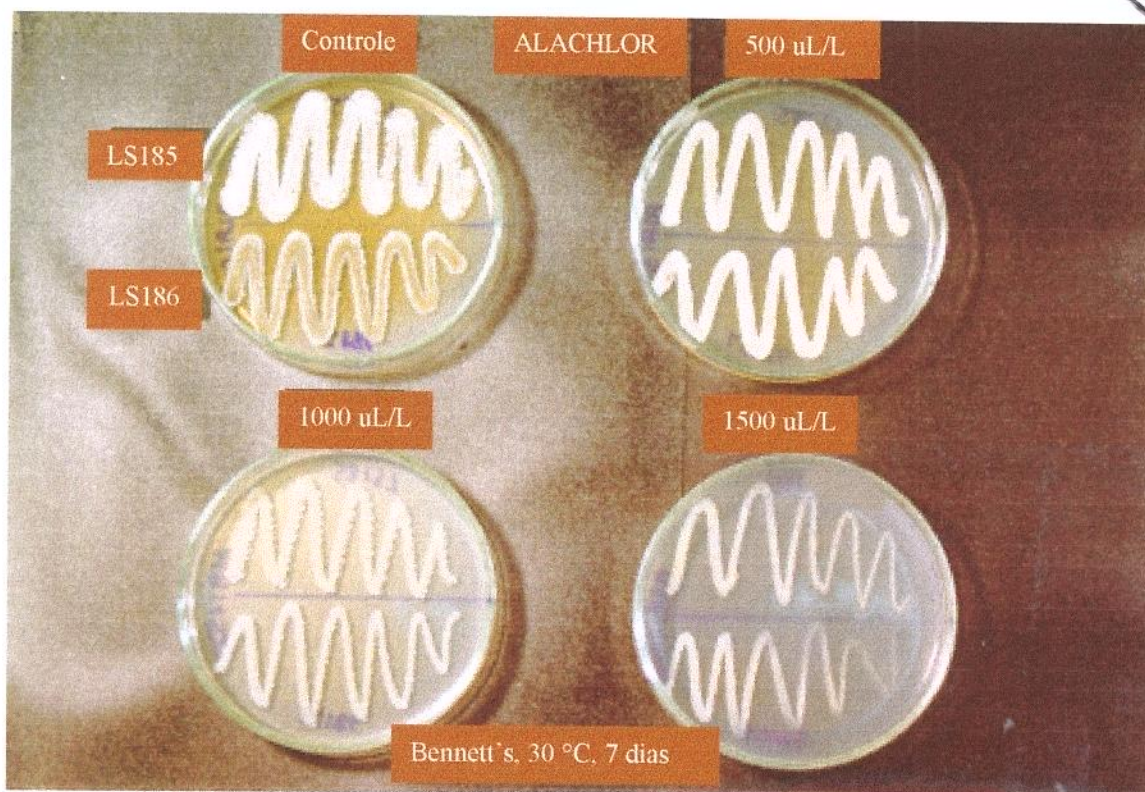


Figura 1. Ensaio de resistência microbiológica ao herbicida alachlor. Crescimento de linhagens isoladas de solo tratado com alachlor, em meio de cultivo suplementado com concentrações crescentes do herbicida.

Tabela 1. Crescimento dos isolados de solo tratado com gramocil após incubação por 7 dias a 30° C em meio de Bennett suplementado com o herbicida.

Linhagens	Gramocil (µL/L)			
	Controle	100	250	500
LS001	+++++	+++++	++++	+++
LS002	+++++	+++++	++++	++
LS008	+++++	+++++	++++	++
LS009	+++++	++++	+++	++
LS014	+++++	+++++	++++	+++
LS015	+++++	+++++	+++++	+++++
LS017	+++++	+++++	++++	+++
LS020	+++++	+++++	++++	+++
LS021	+++++	++++	++++	+++
LS024	+++++	+++++	++++	++
LS028	+++++	++	+++++	++
LS029	+++++	+++++	++++	+++
LS032	+++++	++++	+/-	++
LS034	+++++	++++	++++	++
LS035	+++++	++++	+++	++
LS036	+++++	++++	++++	+++
LS037	+++++	++++	+++	++
LS038	+++++	+++	++	++
LS039	+++++	+++++	++++	++
LS040	+++++	++++	++++	+++++
LS041	+++++	++++	++++	++
LS044	+++++	++++	++++	++
LS045	+++++	++++	+++	+++
LS049	+++++	+++++	+++++	++
LS052	+++++	++++	++++	+++++
LS053	+++++	+++++	+++++	+++++
LS054	+++++	+++++	+++++	+++++
LS056	+++++	+++	+++	+++
LS058	+++++	++++	++++	+++
LS060	+++++	+++++	+++++	+++
LS061	+++++	+++++	+++++	+++
LS062	+++++	+++++	+++++	++
LS066	+++++	+++++	+++++	++++
LS067	+++++	++++	++++	++++

Crescimento relativo: abundante (+++++); muito bom (++++); bom (+++); regular (++); pobre (+); muito pobre (+/-).

Tabela 2. Crescimento dos isolados de solo tratado com gramocil após incubação por 7 dias a 30° C em meio de Bennett suplementado com herbicida.

Linhagens	Gramocil (µL/L)			
	Controle	500	1000	1500
LS001	+++++	++	+++	++
LS015	+++++	+++	++	++
LS040	+++++	++++	+++	++
LS044	+++++	++++	++	++
LS045	+++++	++++	++	+
LS049	+++++	++++	++	+
LS054	+++++	++++	+++	+++
LS061	+++++	++++	+++	+
LS066	+++++	++++	+++	+++

Crescimento relativo: abundante (+++++); muito bom (++++); bom (+++); regular (++); pobre (+); muito pobre (+/-).

Tabela 3. Crescimento dos isolados de solo tratado com alachlor após incubação por 7 dias a 30° C em meio de Bennett suplementado com herbicida.

Linhagens	Alachlor (µL/L)			
	Controle	500	1000	1500
LS143	+++++	++++	+++	+++
LS151	+++++	+++++	++++	+++
LS153	+++++	++++	++	+++
LS166	+++++	+++++	+++++	+++
LS168	+++++	+++++	++++	+++
LS169	+++++	++++	++++	+++
LS170	+++++	+++++	++++	+++
LS171	+++++	++++	++++	+++
LS175	+++++	++++	+++	+++
LS177	+++++	+++++	+++++	+++
LS179	+++++	+++++	++++	+++
LS180	+++++	++++	++++	+++
LS182	+++++	+++++	+++++	++
LS184	+++++	++++	++++	+++
LS185	+++++	++++	++++	+++
LS186	+++++	++++	++++	+++

Crescimento relativo: abundante (+++++); muito bom (++++); bom (+++); regular (++); pobre (+); muito pobre (+/-).

Tabela 4. Crescimento dos isolados de solo tratado com sceptor após incubação por 7 dias a 30° C em meio de Bennett suplementado com herbicida.

Linhagens	Sceptor (mg/L)			
	Controle	500	1000	1500
LS076	+++++	+++++	++++	+++
LS086	+++++	+++++	++++	+++
LS100	+++++	++++	++	++
LS103	+++++	++++	+++	++
LS121	+++++	++++	+++	+
LS125	+++++	+++++	+++	+++
LS126	+++++	+++++	+++	+++
LS127	+++++	+++++	+++	++
LS131	+++++	+++++	++	+
LS132	+++++	+++++	++	++
LS134	+++++	+++++	+++	+++

Crescimento relativo: abundante (+++++); muito bom (++++); bom (+++); regular (++); pobre (+); muito pobre (+/-).

5. CAPÍTULO 2. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO 1. SELECTIVE ISOLATION, SCREENING AND CHARACTERIZATION OF ALACHLOR-DEGRADING STREPTOMYCETES

L.D. Sette^{1*}, V.M. de Oliveira² & G.P. Manfio³

¹Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana; Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), UNICAMP, CEP 13083-970, Campinas (SP) Brazil; ²Fundação André Tosello, Rua Latino Coelho, 1301, CEP 13087-010, Campinas (SP) Brazil; ³Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP, CP 6171 CEP 13081-970, Campinas (SP) Brazil.

To be submitted to: Actinomycetologica

Corresponding author: Lara Durães Sette. E-mail: larasette@hotmail.com

ABSTRACT

Fifty-three actinomycete strains were selectively isolated from soil treated with the herbicide alachlor. These were subjected to screening aiming at the selection of strains tolerant to high herbicide concentrations and able to degrade alachlor *in vitro*. Six alachlor-degrading isolates were further characterized by using a combination of phenotypic, genotypic and 16S rDNA sequence analyses. All 6 strains were assigned to the genus *Streptomyces*. Strains LS143 and LS153 clustered with the type strain of *Streptomyces bikiniensis*, whereas strain LS151 was putatively identified as *Streptomyces galbus* on the basis of 16S rDNA phylogenetic sequence analysis. Phylogenetic identification was corroborated by phenotypic data. Strains LS166, LS177 and LS182 were shown to be highly related on the basis of ERIC-, REP- and BOX-PCR analysis. These strains were recovered in a distinct cluster on the 16S rDNA-based phylogenetic tree, and could not be identified to any known *Streptomyces* species.

INTRODUCTION

Alachlor (2-cloro-*N*-(metoximethyl)-*N*-(2,6-diethylphenyl)-acetamide) is a widely used acetanilide-derived herbicide for pre-emergence control of grasses and weeds in a wide range of commercially important crops in Brazil, including coffee, corn, cotton, peanuts, soybean, and sugar cane. Although this herbicide is classified as moderately toxic, there has been great concern about its carcinogenic properties (Pothuluri *et al.*, 1993; Coleman *et al.*, 1999; Coleman *et al.*, 2000). Biodegradation in aerobic and anaerobic environments was reported as the main form of degradation of this compound (Stamper & Tuovinen, 1998). Although complete mineralization of alachlor has not yet been described, bacteria and fungi can metabolize this herbicide via several catabolic routes, including cometabolic pathways, yielding a series of alachlor-derived compounds (Stamper & Tuovinen, 1998).

Isolation and characterization of pure cultures has been the main approach in the study of microbial-related metabolic activities. Pure culture work fostered the discovery of novel metabolic pathways, enzymes and intermediate products related to a range of the complex biodegradative systems (Bartha, 1990; Melo & Azevedo, 1997). Actinomycetes represent a group of diverse and relatively abundant bacteria in soils (Labeda & Shearer, 1990). These organisms are capable of degrading a wide range of complex molecules given their rich physiological and metabolic diversity and the production of several classes of extracellular enzymes (McCarthy & Williams, 1992). Pesticide-degrading actinomycetes belonging to the genera *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Clavibacter*, *Corynebacterium*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Rhodococcus*, and *Streptomyces* have been described (de Schrijver & de Mot, 1999).

In the current study, we described the selective isolation and selection of actinomycete strains from soil treated with the herbicide alachlor and the taxonomic characterization of the herbicide tolerant strains by using a combination of phenotypic, genotypic and 16S rDNA sequence analyses.

MATERIAL AND METHODS

Herbicide and soil samples. Alachlor was obtained in emusifiable concentrated formulation from Monsanto (Jacareí, SP, Brazil). The herbicide was also maintained as diluted suspensions in sterilized distilled water for 6 months in order to generate naturally-forming hydrolysis by-products. This diluted hydrolyzed preparation was used in the degradation experiments in order to minimize the influence of natural hydrolysis products on the chromatographic analyses.

Soil treatment consisted of applying alachlor (6 L/ha) over a delimited experimental plot of garden soil at the Fundação André Tosello (Campinas, SP, Brazil). Samples were collected from the top 5 cm soil, 10 and 20 days after the application.

Selective isolation of actinomycetes. Sterilized distilled water (9 mL) was added to 1 g of soil and the suspension was shaken at 200 rpm for 1 hour. Serial dilutions (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) were prepared using sterilized distilled water and 0.1 mL aliquots were inoculated onto Petri dishes plates containing either mineral agar (Labeda & Shearer, 1990) or starch-casein media (Küster & Williams, 1964), supplemented with alachlor (3, 30 or 300 $\mu\text{L/L}$) and cycloheximide (50 $\mu\text{g/mL}$). The plates were incubated at 30° C for 10 days. Selected colonies were transferred to modified Bennett's agar (1 g yeast extract, 0.8 g Lab-Lemco, 2.0 g Bacto-casitone, 10 g glucose and 15 g agar per liter of distilled water, pH 7.2) and suspensions of mycelia and spores were preserved by storage in 20% glycerol at -20° C.

Screening of herbicide-resistant strains. Isolated strains were screened for the selection of herbicide-resistant strains. Strains were inoculated onto Bennett's plates supplemented with alachlor (500, 1000 and 1500 $\mu\text{L/L}$) and incubated at 30° C for 7 days. Mycelial growth was compared with that of control plates without herbicide and scored.

In vitro degradation experiments. Starter cultures of spores and mycelia were cultivated in 125 mL erlenmeyer flasks containing 10 mL of liquid mineral salts medium (2 g Na_2SO_4 ; 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0.65 g K_2HPO_4 ; 1 g NH_4Cl ; 1 g KNO_3 ; 0.01g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ and 0.1% yeast extract in 1 liter of distilled water, pH 7.3) with 0.5% glucose. The flasks were incubated under stationary condition for 24 h at 30° C followed by 48 h

incubation under shaking (150 rpm). Starter cultures (10 mL) were inoculated into 125 mL Erlenmeyer flasks, each flask containing 30 mL of liquid mineral salt medium supplemented with 150 µL/L of alachlor and natural hydrolysis products as the only carbon source. Flasks were incubated for 7 days at 30° C on a rotary shaker at 150 rpm.

The broths of *in vitro* alachlor degrading experiments were centrifuged (15,000 X g/10 min), filtered (0.22 µm Millipore filter) and analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC).

HPLC analysis. Analysis of percent of alachlor degradation were made by using a LC-6A Shimadzu HPLC, equipped with an UV-visible absorbance detector set at 220 nm. The HPLC was fitted with a C18 column (25 cm x 4.6 mm diam., Varian) and a mobile phase of acetonitrile/water (50:50) at a flow rate of 1 mL/min eluted the metabolites at ambient temperature. 20 µL aliquots were injected on HPLC equipment.

Taxonomic characterization of strains. All tests were performed according to protocols recommended by Shirling & Gottlieb (1966). Actinomycete strains were cultivated for 7 and 14 days at 30° C in different growth media appropriated to determine: (1) morphological characteristics of the spore-bearing hyphae and spore chain morphology and surface ornamentation (ISP 3: Oatmeal agar); (2) color of sporulating aerial surface growth, color of substrate mycelium and diffusible soluble pigments (ISP 4: inorganic salts-starch agar, and ISP 5: glycerol-asparagine agar); and (3) physiological characteristics of melanin production (ISP 6: peptone iron agar supplemented with 0.1% yeast extract, and ISP 7: tryptone-yeast extract broth).

Electron microscopy. The spore-bearing hyphae and spore chain morphology were determined by direct optical microscopic (OM) examination of the culture surface, using a 400x magnification. Scanning electron microscopy (SEM) was performed using a model LEO 982 machine (Carl Zeiss/Leica, Germany). The specimens were prepared to be visualized by field emission in a SEM according to standard microscopy protocols (EMBRAPA-CNPMA, Jaguariúna, SP). Slices of solid media with mycelial growth (7-14 days) were cut into thin pieces (4 x 0.5 cm) and submitted to a first fixation with 0.1 M phosphate buffer containing 2% glutaraldehyde for 1 h at 16° C. Samples were then washed

3 times (10 min each) with 0.1 M phosphate buffer and subjected to a second fixation by using a 1% osmium tetroxide solution in 0.1 M phosphate buffer for 1 h at 16° C. The samples were washed again, as previously described, and subjected to dehydration in an ethanol solution series (15%, 30%, 50%, 70%, 95% and 100%, 20 min each) carried out at 16° C. Samples were kept in 100% ethanol at room temperature, and then dried in a K850 Critical Point Drier equipment (Emitech Ltda., Ashford, England). The dried samples were assembled in carried stubs and subsequently coated with gold (150 nm thickness) in a K550 Sputter Coater equipment (Emitech Ltda., Ashford, England), by using 20 mA for 2 min.

DNA isolation. For genomic DNA extraction, biomass was produced in 125 mL Erlenmeyer flasks containing 10 mL of Bennett's liquid medium, agitated at 150 rpm at 28° C for 3 days in an orbital shaker. Biomass was harvested by centrifugation, washed once with 0.1 M NaCl/0.1 M EDTA pH 8.0, and stored at -20° C. Total DNA was obtained as described by Picher *et al.* (1989), with minor modifications. Aliquots from liquid cultures (1.5 mL) were centrifuged (12,000 rpm for 3 min) and washed 2 times with 1 mL of ultrapure (Milli-Q) water. The pellet was gently macerated against the wall of the microtube by adding an equal amount of glassbeads with the help of small plastic mortar. The cells were then resuspended in 100 µL TE buffer pH 8.0 (Sambrook *et al.*, 1989) containing lysozyme (2 mg/mL) and incubated for 1 h at 37° C. Lysis and DNA purification were carried out as described previously Picher *et al.* (1989).

Genetic fingerprinting. Genomic DNA (100 ng) was added to 25 µL PCR reactions containing 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech), 1X *Taq* buffer, 0.75 mM dNTP mix, 2.0 µM each primer and 1.5 mM MgCl₂. PCR amplifications were carried out in a Gene Amp 2400 PCR System (Perkin Elmer). The amplification programs varied according to the primer sets used. For the ERIC-PCR reactions the primers set used was ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'; Versalovic *et al.*, 1991) and ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'; Versalovic *et al.*, 1991) and an initial denaturation step at 95° C for 7 min, followed by 30 cycles of 1 min at 94° C, 1 min at 52° C and 8 min at 65° C, and a final extension at 65° C for 16 min. For the REP-PCR reactions the primers were REP2-I (5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'; Versalovic *et al.*, 1991) and REP1R-I (5'-IIICGICGICATCIGGC-3', Versalovic *et al.*, 1991), and amplification program

consisted of a denaturation cycle at 95° C for 6 min, followed by 30 cycles of 1 min at 94° C, 1 min at 40° C and 8 min at 65° C, and a final extension at 65° C for 16 min. For the BOX-PCR reactions the primer used was BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'; de Bruijn, 1992) and 95° C for 7 min as an initial denaturation step, 30 cycles of 1 min at 94° C, 1 min at 53° C and 8 min at 56° C, and a final extension at 65° C for 16 min. Amplifications products (8 µL) were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gels containing 0.1 µg/mL ethidium bromide in 1X TAE buffer (Tris acetate-EDTA; Sambrook *et al.*, 1989). The fingerprint patterns obtained were analyzed by using the GelCompar software package v.4.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

16S rDNA amplification. The 16S rRNA genes were amplified from genomic DNA by PCR amplification using one of the bacterial conserved sets of primers p27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'; Lane, 1991) and p1525r (5'-AAGGAGGTGWTGCARCC-3'; Lane, 1991) or p27f and p1401r (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAAGG-3'; Heuer *et al.*, 1997). 50-100 ng of genomic DNA were used in 50 µL reactions containing 2 U *Taq* polymerase (Amersham Pharmacia Biotech.), 1X *Taq* buffer, 0.2 mM dNTP mix, and 0.2 µM each primer. PCR amplifications were carried out using an initial denaturation step at 95° C for 2 min, followed by 30 cycles of 1 min at 94° C, 1 min at 55° C and 3 min at 72° C, and a final extension at 72° C for 5 min, in a Gene Amp 2400 PCR System (Perkin Elmer). Amplifications products were checked by electrophoresis on 1.2% agarose gels stained with ethidium bromide (0.1 µg/mL) and visualized under UV light (Sambrook *et al.*, 1989). PCR products were stored at -20° C for subsequent sequencing.

Direct sequencing of the 16S rDNA PCR products. For direct sequencing of PCR products, three replicate 50 µL amplification reactions were performed, subsequently purified with the GFXTM PCR-DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech.) and eluted in 30 µL sterilized ultrapure (Milli Q) water. The samples were cycle sequenced with the automated sequencer ALF Express II (Amersham Pharmacia Biotech) by using Thermo Sequenase fluorescent-labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP (Amersham Pharmacia Biotech), according to manufacturer's protocols. The primers

used for sequencing, internal to the 16S rRNA genes, were fluorescently-labelled with Cy-5. For 16S rDNA sequencing of strains LS143, LS151 and LS153 the primers used were p10f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; Lane, 1985) and p1100r (5'-AGGGTTGCGCTCGTTG-3'; Lane, 1991), for strains LS166 and LS182 the primers were p782r (5'-ACCAGGGTATCTAATCCTGT-3'; Lane, 1991) and p1390r (5'-CGGTGTGTRCAAGGCC-3', Lane, 1991) and for strain LS177 the primers used were p10f, p782r and p1390r.

Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences. Sequences of 16S rRNA genes obtained in this study (about 1,000 bases in length) were compared with 16S rRNA sequences of organisms represented in the public databases RDP (Ribosomal Database Project, Wiscosin, USA, <http://www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html>) and Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), and subsequently, aligned with those 16S rRNA sequences showing the highest similarity values and with additional sequences from outgroup organisms recovered from GenBank (accession numbers are listed in **Figures 6 and 7**) using the Clustal W program. The aligned sequences were analyzed using the GDE software package (Genetic Data Environment, v.2.2, [gopher://megasun.dch.umontreal.ca:70/11/GDE](http://megasun.dch.umontreal.ca:70/11/GDE)). Distance matrices were calculated using DNADIST and Jukes-Cantor model (Jukes & Cantor, 1969) as implemented in PHYLIP V. 3.5 (Felsenstein, 1989). Phylogenetic trees were constructed by using the Neighbor-Joining method (Saitou & Nei, 1987), with bootstrap values calculated from 1,000 replicate runs, using the software routines included in the PHYLIP V. 3.5 package.

RESULTS AND DISCUSSION

Complex chemical compounds may be resistant to physico-chemical and biological degradation, and thus accumulate in the environment and become pollutants. Microorganisms capable of degrading these recalcitrant molecules are relatively rare in pristine environmental samples, whereas in samples exposed to pollutants their numbers may be selectively enriched over other groups in the community (Bartha, 1990). In this study, selective conditions were applied to the isolation of actinomycetes from soil samples

previously treated with the herbicide alachlor. A total of 53 actinomycete strains were recovered.

Purified isolated strains were submitted to a screening to determine the microbiological resistance of each isolate to increasing concentrations of alachlor prior to selecting the strains for the degradation assays. The results of the resistance tests on solid medium containing alachlor (500, 1,000 and 1,500 $\mu\text{L/L}$) demonstrated that 16 out of the 53 strains could grow in the presence of high concentrations of the herbicide (**Table 1**). These isolates were then submitted to *in vitro* alachlor degradation experiments. Data from HPLC analysis showed that 6 strains (LS143, LS151, LS153, LS166, LS177 and LS182) were able to degrade between 50 to 75% of alachlor added as single carbon source (**Figure 1**). Strains LS166 and LS182 showed the better alachlor degradation results.

The alachlor-degrading actinomycete strains were taxonomically characterized by using a combination of tests. Based on the phenotypic characteristics used to delimit actinomycete species, according to the Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Pridham & Tresner, 1974), all strains showed predominant features similar to those found in the streptomycetes (**Table 2**). Strains LS166, LS177 and LS182 were shown to have identical phenotypic profile considering spore chain morphology, spore surface ornamentation, spore color, diffusible pigments and melanin production. Strains LS143 and LS153, although have demonstrated high phenotypic similarity, they differ in melanin production on tryptone–yeast extract broth (ISP7) (**Table 2**). The 5 isolates cited above have *rectiflexibles* spore chains (**Figure 2**) and spore surface without ornamentation (smooth) (**Figures 3 and 4**). Strain LS151 was phenotypically very different from the other strains, mainly due to the *spirales* spore chain morphology and spiny spore surface production (**Figures 2B and 4E and F**).

The introduction of molecular biological characteristics into classification systems enabled a considerable advance in genus delimitation within the Actinobacteria (Stackebrandt *et al.*, 1997), and, as a consequence, the reclassification of many genera (Anderson & Wellington, 2001). Molecular taxonomy encompasses different techniques offering high sensitivity in detecting and/or characterizing microbial nucleic acids, mainly chromosomal DNA and ribosomal DNA or RNA. Information derived from nucleic acids

molecules may be useful for classifying microorganisms at several taxonomic levels, from the infra specific to the supra-generic relationships (Stackebrandt & Liesack, 1993). Molecular taxonomy studies of actinomycetes involve mainly DNA-DNA homology analysis and 16S rRNA gene sequencing and phylogenetic analysis.

At present, a vast number of molecular techniques can be employed in classification systems to differentiate and identify microbial strains. DNA-based typing methods encompass techniques which allow us to subdivide species into a number of distinct types. DNA amplification technique based on the analysis of the interspersed repetitive elements common in bacteria (Versalovic *et al.*, 1991; Lupski & Weinstock, 1992; de Bruijn, 1992; Versalovic *et al.*, 1994; de Bruijn, *et al.*, 1996) was used to fingerprint strains LS166, LS177 and LS182. Three families of repetitive sequences (rep-PCR), which have been studied in most detail elsewhere (de Bruijn *et al.*, 1997), were used in this study: (a) enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequence; (b) repetitive extragenic palindromic (REP) sequence and (c) BOX element, comprised of three subunits (boxA, boxB and boxC). Conserved regions of these repetitive elements can serve as primer binding sites.

Fingerprinting patterns obtained from the phenotypically identical strains LS166, LS177 and LS182, by PCR amplification using primers to ERIC, REP and BOX regions, were found to be different. Band profiles corresponding to the strains LS166 and LS177 showed high level of similarity (about 94%), whereas the profile of strain LS182 showed greater differences in relation to the first two ones, with 89% similarity (**Figure 5**). These relationships were confirmed in the phylogenetic analysis (**Figure 7**). Thus, although these three isolates have been observed to be phenotypically identical, molecular data demonstrated that they are distinct organisms.

Phylogenetic analysis was performed by using the rRNA gene as a target, since it has been described by many authors as an excellent molecular marker for this purpose (Woese, 1987; Schleifer & Ludwig, 1989; Stackebrandt, 1992). Yet, the 16S rRNA has been the most world-widely used molecule for establishing bacterial evolutionary relationships, yielding vast public domain databases for sequence comparisons. For this reason, the 16S rDNA sequences from the 6 alachlor-degrading strains were PCR amplified using a set of

primers targeting bacterial conserved flanking 16S rDNA regions, and subsequently submitted to direct automated sequencing using 16S rDNA internal primers. Sequence information derived from the 16S rRNA sequence analysis was used to infer phylogenetic relationships.

16S rDNA partial sequences (about 1,000 bases) of alachlor-degrading strains were compared to 16S rRNA sequences of organisms represented in the databases Genbank and RDP. The highest score sequences ($\geq 94\%$ sequence similarity), all corresponding to strains belonging to the *Streptomyces* genus, were recovered from the databases and aligned with the 16S rDNA sequences of the alachlor-degraders. The alignments were used to calculate distance matrices and generate phylogenetic trees (**Figures 6 and 7**), as described previously. *Kitasatosporia azaticus* was used as outgroup.

The phylogenetic tree constructed using 16S rDNA sequence data demonstrated that the isolates LS166, LS177, and LS182 were phenotypically and genotypically closely related, and formed a separate cluster supported by a 95% bootstrap value with *Streptomyces argenteolus*, *S. caviscabies*, *S. cyaneus*, *S. ornatus* and *S. setonii* recovered as the closest related taxa (**Figure 6**). Comparison of predominant features (**Table 2**) showed that the isolates LS166, LS177, and LS182 are phenotypically very similar to *Streptomyces setonii*, except for the spore color, since the isolates may produce a green spore mass. Phenotypic data combined with the evolutionary distance observed in the phylogenetic tree, suggest that the alachlor-degrading strains LS166, LS177 and LS182 might represent new species. However, further taxonomic research of polyphasic nature is necessary to properly classify these isolates.

A 96% bootstrap value supported the close relationship between strains LS143 and LS153 (**Figure 6**), which were also phenotypically related (**Table 2**). These alachlor-degrading strains grouped with *Streptomyces bikiniensis* type strain in the phylogenetic tree. However, the bootstrap analysis did not support this clustering ($< 70\%$). Morphological characteristics of strains LS143, LS153 and *S. bikiniensis* are similar (**Table 2**), except for spore color and diffusible pigment production.

Strain LS151 showed different physiological and morphological characteristics when compared to the other alachlor-degrading actinomycetes analyzed in this study (**Table 2**). The phylogenetic analysis grouped the isolate LS151 with *Streptomyces galbus* (**Figure 7**), with a support value of 82%. Additionally, *S. galbus* and strain LS151 were similar in all predominant features analyzed in this study, which were recommended in the literature for actinomycete species delimitation (Shirling & Gottlieb, 1966; Pridham & Tresner, 1974). Data of mass spore color and pigment production analyzed after growth in specific media are in accordance with the description of *S. galbus*, as well as the *spirales* spore chain morphology (**Figures 2B** and **4E**) and spiny spore surface (**Figure 4F**) observed by microscopy. Therefore, based on phenotypic and phylogenetic analyses, the strain LS151 was identified as *Streptomyces galbus*. The morphological and physiological traits observed (**Table 2**) are in agreement with the molecular characterization by 16S rRNA sequence analysis and phylogenetic affiliation of strains.

CONCLUSIONS

The methodology used to recover actinomycetes from soil samples previously treated with alachlor was successful in isolating 16 highly tolerant strains from a total of 53 strains. Tolerance to high herbicide concentration was investigated to select strains capable of using the herbicide as the single carbon source. Data from *in vitro* alachlor biodegradation experiments showed that 6 strains out of the 16 tested were able to grow and utilize between 50 to 75% of the herbicide. Taxonomic characterization data suggested that strain LS151 is *Streptomyces galbus*. The closely related strains LS143 and LS153 clustered with *Streptomyces bikiniensis*, but stronger phylogenetic evidence is necessary to confirm this putative relationship. Isolates LS166, LS177 and LS182 formed a separate group suggested to be representative of new *Streptomyces* species.

Considering that actinomycetes are able to degrade a wide range of complex molecules due their physiological and metabolic diversity (McCarthy & Williams, 1992) and that the ability of *Streptomyces* spp to transform pesticides has not been widely

investigated (Shelton *et al.*, 1996), the strains characterized in the present study are attractive targets for further studies considering *in vitro* and *in situ* alachlor degradation.

ACKNOWLEDGMENTS

L.D. Sette was supported by a grant from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil).

REFERENCES

- Anderson A.S. & Wellington E.M.H. (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **51**, 797-814
- Bartha R. (1990). Isolation of microorganism that metabolize xenobiotic compounds. In: *Isolation of Biotechnological Organisms from Nature*. Cp. 11, Ed. D. P. Labeda. McGraw-Hill Publishing Company, New York.
- de Bruijn F.J. (1992). Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**: 2180-2187.
- de Bruijn F.J., Rademaker J. & Schneider M. (1996). Rep-PCR genomic fingerprinting of plant-associated bacteria and computer-assisted phylogenetic analysis. In: *Biology of plant-microbe interaction; Proceedings of the 8th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions*. (G. Stacey, B. Mullin and P. Gresshoff, Eds.) APS Press, 497-502.
- de Bruijn F.J., Schneider M., Rossbach U. & Louws F.J. (1997). Automated fluorescent and conventional Rep-PCR genomic fingerprinting and multiplex PCR to classify

bacteria and track genes. *Progres in Microbial Ecology*. (Martins, M.T. *et al.*, Eds). Brazilian Society for Microbiology.

Coleman S., Liu S., Linderman R. Hodgson E. & Rose R.L. (1999). *In vitro* metabolism of alachlor by human liver microsomes and human cytochrome P450 isoforms. *Chemico-Biological Interactions*. **122**, 27-39.

Coleman S., Linderman R. Hodgson E. & Rose R.L. (2000). Comparative metabolism of chloroacetamide herbicides and selected metabolites in human and rat liver microsomes. *Environmental Health Perspective*. **108**, 1151-1157.

Felsenstein J. (1989). Phylip-phylogeny inference package. *Cladistics*. **5**, 164-166

Heuer H., Krsek M., Baker P., Smalla K. & Wellington E.M. (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**: 3233-3241.

Jukes T.H. & Cantor R.R. (1969). Evolution of protein molecules. *In*: H.N. Munro (ed.), Mammalian protein metabolism. Academic Press, New York. p.21-132.

Kumar S., Mukerji K.G. & Lal R. (1996). Molecular aspects of pesticide degradation by microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*. **22**, 1-26.

Küster, E. & Williams, S. T. (1964). Selection of media for isolation of streptomycetes. *Nature*, **202**, 928-929.

Labeda, D. P. & Shearer, M.C. (1990). Isolation of actinomycetes for biotechnological applications. *In: Isolation of Biotechnological Organisms from Nature*. Ed. D. P. Labeda. McGraw-Hill Publishing Company, New York.

Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *In* Nucleic acid techniques in bacterial systematics (Stackebrandt, E. & Goodfellow, M., Eds.) John Wiley & Sons, New York, pp. 115-175.

- Lane D.J., Pace B., Olsen G.J., Stahl D.A., Sogin M.L. & Pace N.R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America*. **82**: 6955-6959.
- Lupski J.R. & Weinstock G.M. (1992). Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotes genomes. *Journal of Bacteriology*. **174**, 4325-4529.
- McCarthy A.J. & Williams S.T. (1992). Actinomycetes as agent of biodegradation in the environment – a review. *Gene*, **115**, 189-192.
- Melo I.S. & Azevedo J.L. (1997). Como isolar microrganismos degradadores de moléculas xenobióticas. In: *Microbiologia Ambiental*. Ed. I. S. Melo e J. L. Azevedo. EMBRAPA-CNPMA, Jaguariúna (SP). Cp 7.
- Picher, D.G., Saunders, N.A. & Owen, R.J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, **8**, 151-156.
- Pothuluri J.V., Freeman J.P., Evans F.E., Moorman T.B. & Cerniglia C.E. (1993). Metabolism of alachlor by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **41**, 483-488.
- Pridham T.G. & Tresner H.D. (1974). Genus I. *Streptomyces* Waksman and Henrici. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan and Gibbons, Ed.), 8th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 747-748.
- Saitou N. & Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. **4**, 406-425.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniats T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Schleifer K.H. & Ludwig W. (1989). Phylogenetic relationship of bacteria. In: The hierarchy of life (B. Fernholm, K. Bremer & H. Jörnvall, Ed.). Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, pp. 103-117.

- de Schrijver A. & de Mot R. (1999).** Degradation of pesticides by actinomycetes. *Critical Reviews in Microbiology*, **25**, 85-119.
- Shirling E.B. & Gottlieb D. (1966).** Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **16**, 313-340.
- Stackebrandt E. (1992).** Unifying phylogeny and phenotypic diversity. In: *The Prokaryotes*. 2 ed, pp. 19-47, (A. Ballows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.H. Schleifer, Eds.), Springer-Verlag, New York.
- Stackebrandt E. & Liesack W. (1993).** Nucleic acids and classification. In: *Handbook of New Bacterial Systematics* (M. Goodfellow & A. G. O'Donnell, Ed.), Academic Press, London. pp. 152-194
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A. and Ward-Rainey, N.L. (1997).** Proposal for a new hierarchic classification system *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **47**: 479-491.
- Stamper D.M. & Tuovinen O.H. (1998).** Biodegradation of the acetanilide herbicides Alachlor, Metolachlor, and Propachlor. *Critical Reviews in Microbiology*, **24**, 1-22.
- Versalovic J., Koeuth, T. & Lupski, J. (1991).** Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, **24**, 6823-6831.
- Versalovic J., Schneider M., Bruijn F.J. & Lupski J. (1994).** Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and Celular Biology*. **5**, 25-40.
- Woese C.R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbial Review*, **51**: 221-272.

Table 1. Growth of isolated strains in Bennett's medium supplemented with different concentrations of alachlor (incubation at 30°C for 7 days).

Strains	Alachlor concentration (µL/L)			
	Control	500	1,000	1,500
LS143	+++++	++++	+++	+++
LS151	+++++	+++++	++++	+++
LS153	+++++	++++	++	+++
LS166	+++++	+++++	+++++	+++
LS168	+++++	+++++	++++	+++
LS169	+++++	++++	++++	+++
LS170	+++++	+++++	++++	+++
LS171	+++++	++++	++++	+++
LS175	+++++	++++	+++	+++
LS177	+++++	+++++	+++++	+++
LS179	+++++	+++++	++++	+++
LS180	+++++	++++	++++	+++
LS182	+++++	+++++	+++++	++
LS184	+++++	++++	++++	+++
LS185	+++++	++++	++++	+++
LS186	+++++	++++	++++	+++

Relative growth: abundant (+++++); very good (++++); good (+++); regular (++); poor (+); very poor (+/-).

Table 2. Phenotypic characteristics determined for selected actinomycete strains.

Organism	Predominant features					
	Spore chain morphology	Spore surface ornamentation	Spore color	Diffusible pigment	Melanin on ISP6 ISP7	
<i>S. setonii</i>	<i>Rectilflexibles</i>	Smooth	Yellow-white	Absent/yel-br	-	+
<i>S. cyaneus</i>	<i>Spirales</i>	Spiny/Sm	Blue-gray-red	Yel-br/red/viol	+	-
<i>S. bikiniensis</i>	<i>Rectilflexibles</i>	Smooth	Gray	Absent	+	-
<i>S. galbus</i>	<i>Spirales/Rect</i>	Sm/spn/hairy	Gray-yellow-white	Rare	+/-	+/-
LS143	<i>Rectilflexibles</i>	Smooth	Gray-white-green	Yel-brown	+	+
LS151	<i>Spirales</i>	Spiny	Gray-yellow-white	Absent	+	-
LS153	<i>Rectilflexibles</i>	Smooth	Gray-white-green	Yel-brown	+	-
LS166	<i>Rectilflexibles</i>	Smooth	Yellow-white-green	Yel-br/viol	-	+
LS177	<i>Rectilflexibles</i>	Smooth	Yellow-white-green	Yel-br/viol	-	+
LS182	<i>Rectilflexibles</i>	Smooth	Yellow-white-green	Yel-br/viol	-	+

Data from *S. bikiniensis*, *S. cyaneus*, *S. galbus* and *S. setonii* obtained from descriptions in the Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Pridham & Tresner, 1974).

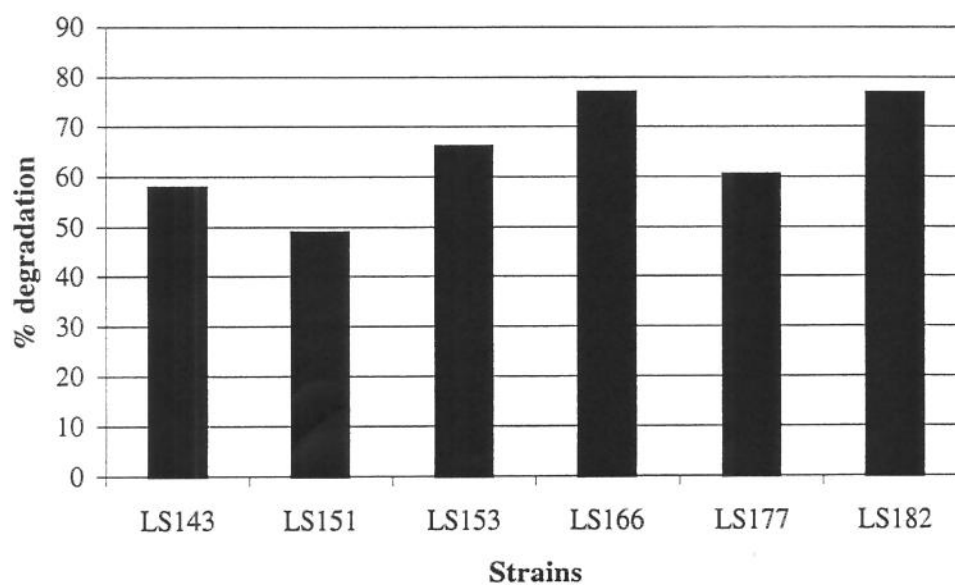


Figure 1. *In vitro* degradation of alachlor by selected actinomycete strains after 7 days incubation (30°C and 150 rpm) of liquid cultures containing 150 $\mu\text{L/L}$ of alachlor and hydrolyzed alachlor components as sole carbon source.

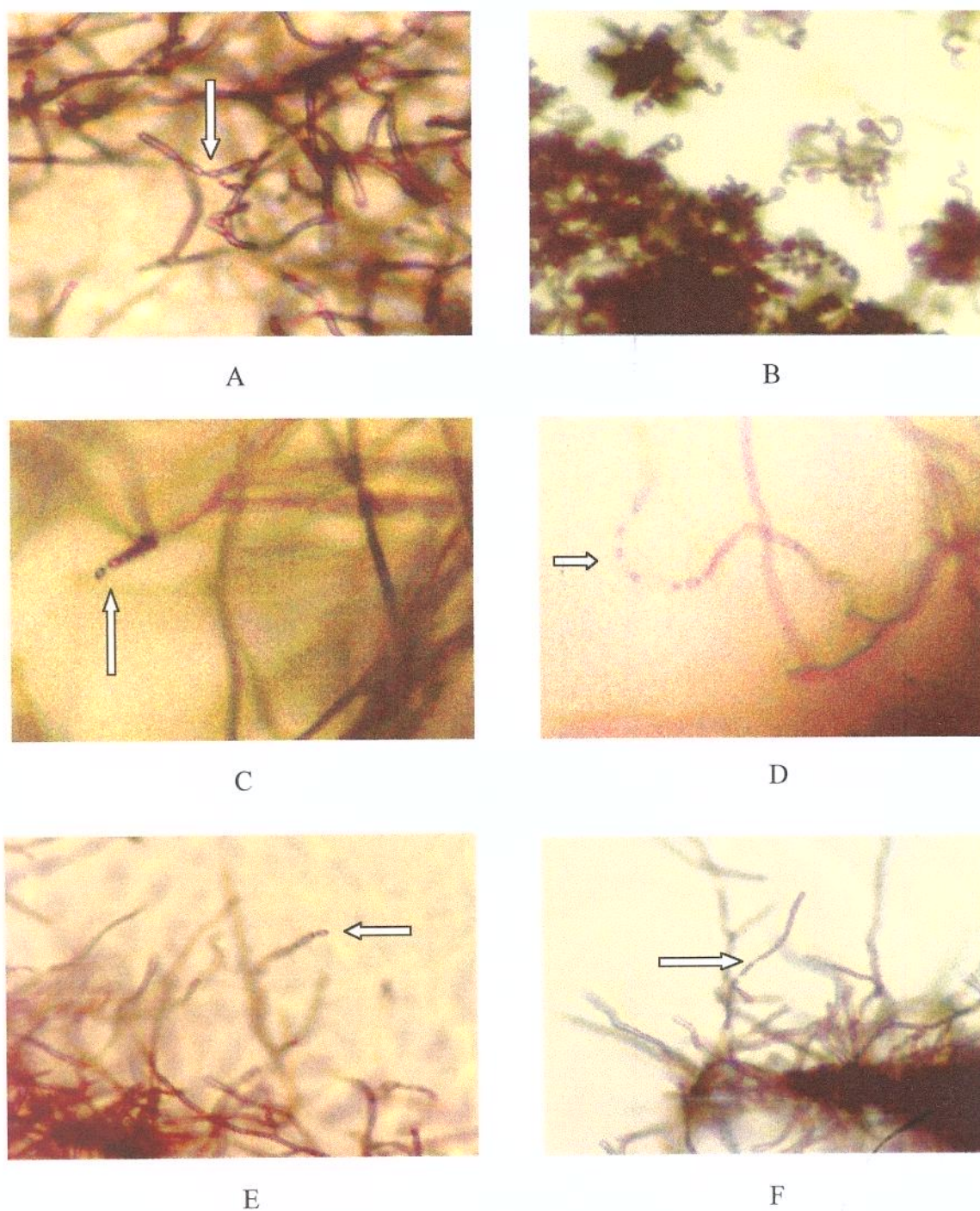


Figure 2. Aerial hyphae and spore chain morphology of strains LS143 (A), LS151 (B), LS153 (C), LS166 (D), LS177 (E) and LS182 (F) determined by direct optical microscopy.

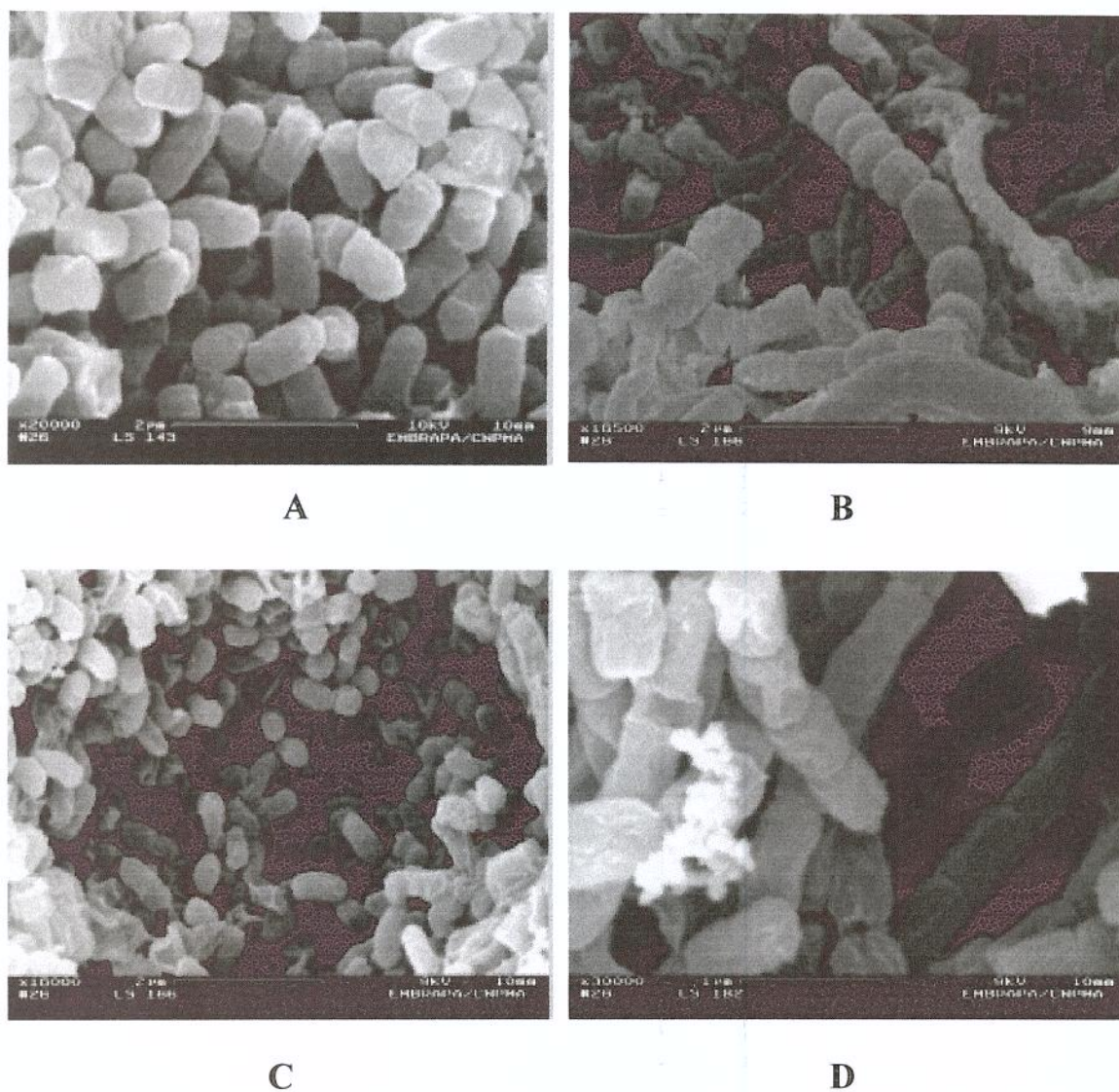


Figure 3. Spore ornamentation of strains LS143 (A), LS166 (B), LS177 (C) and LS182 (D) determined by scan electron microscopy (10.000-20.000X).

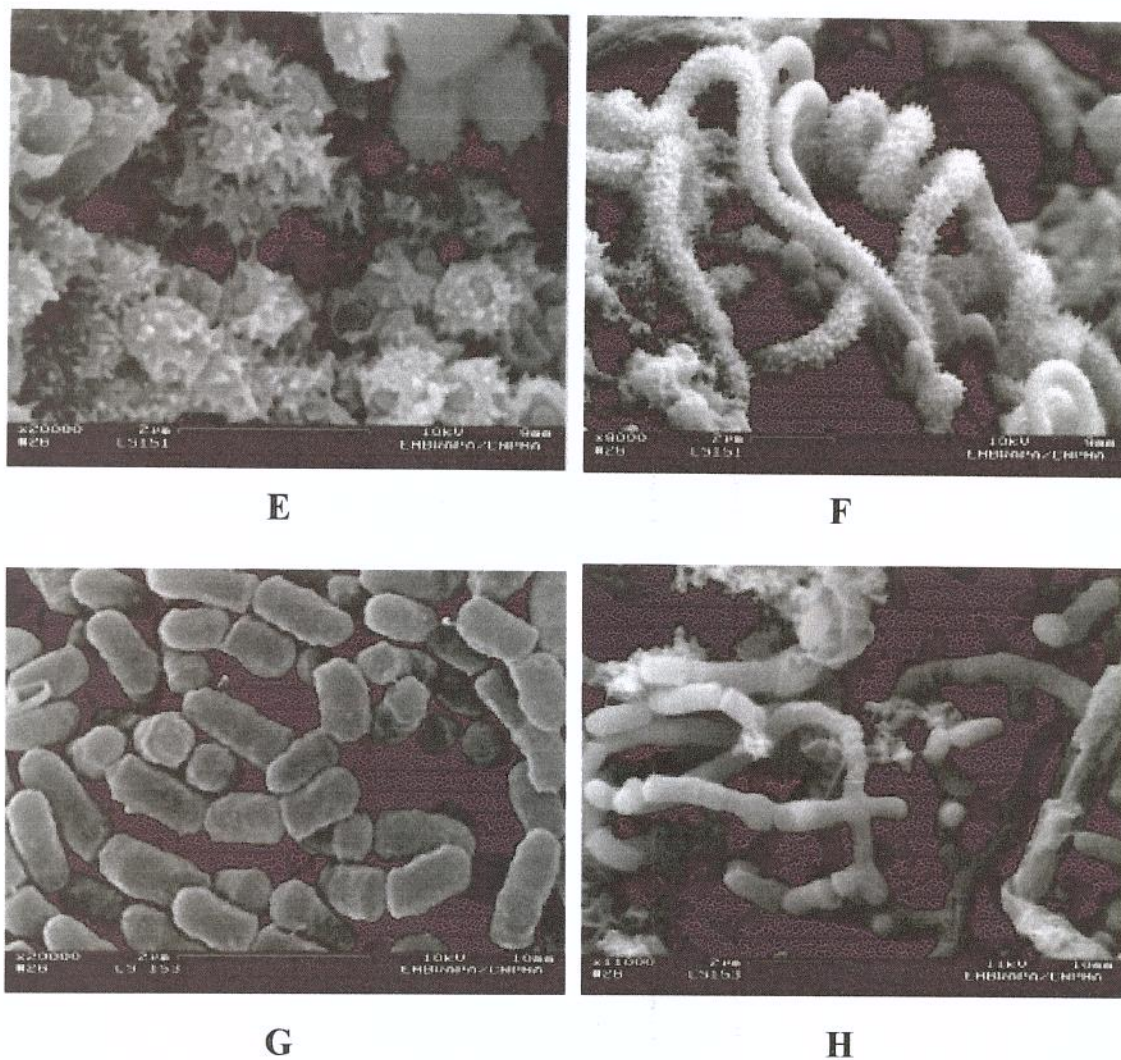


Figure 4. Spore ornamentation and aerial hyphae of strains LS151 (E-F) and LS153 (G-H) determined by scan electron microscopy (10.000-20.000X).

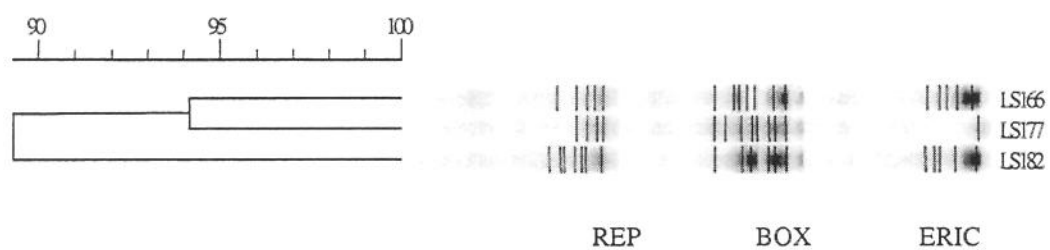


Figure 5. Dendrogram and pattern representation of *rep*-PCR fingerprints of strains LS166, LS177 and LS182.

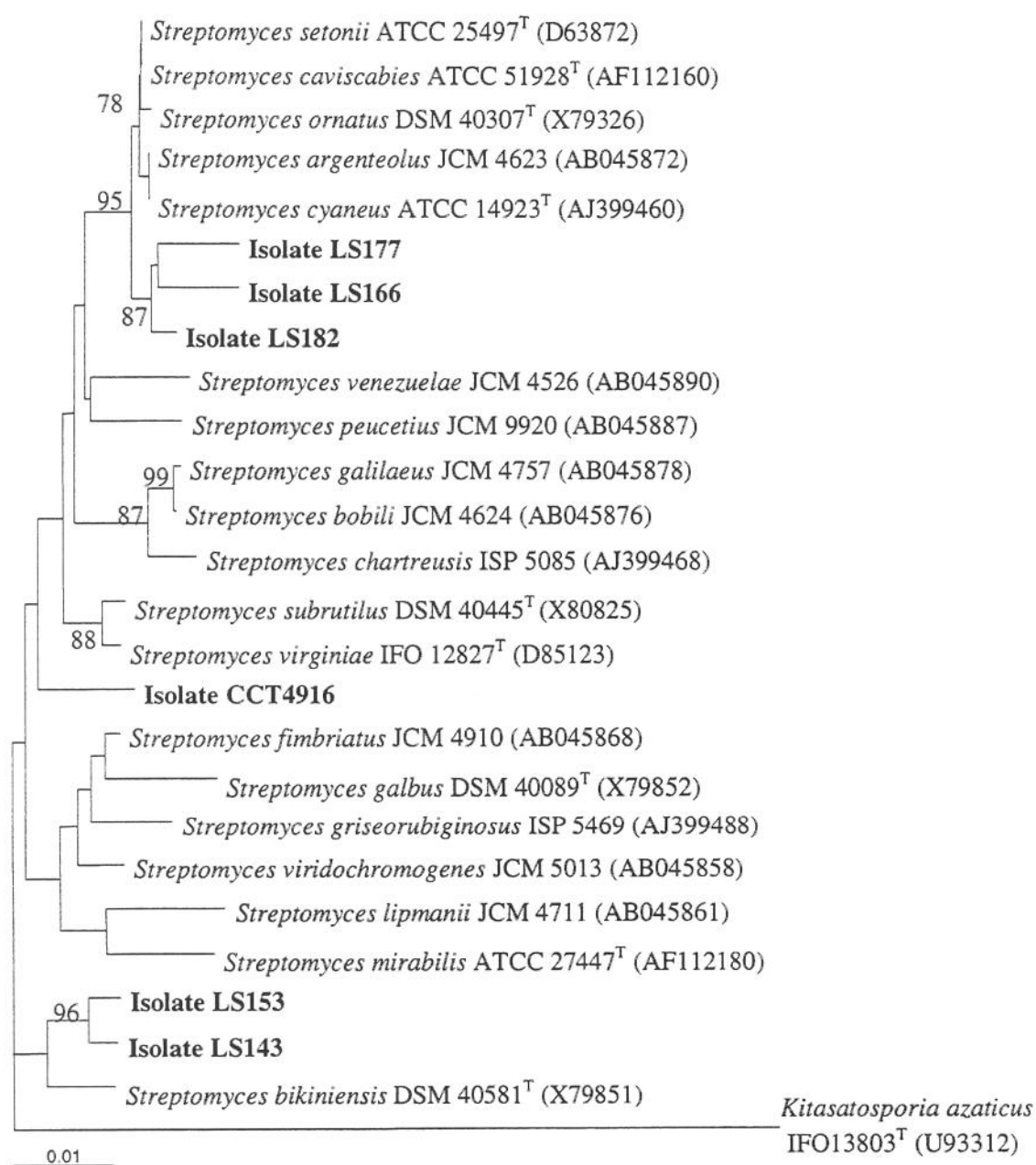


Figure 6. Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences from selected soil isolates LS143, LS153, LS166, LS177 and LS182 and reference strains. Based on Jukes-Cantor/Neighbor-joining method. Bootstrap values above 70% are listed (1,000 replicate runs). GenBank accession numbers are listed after species names.

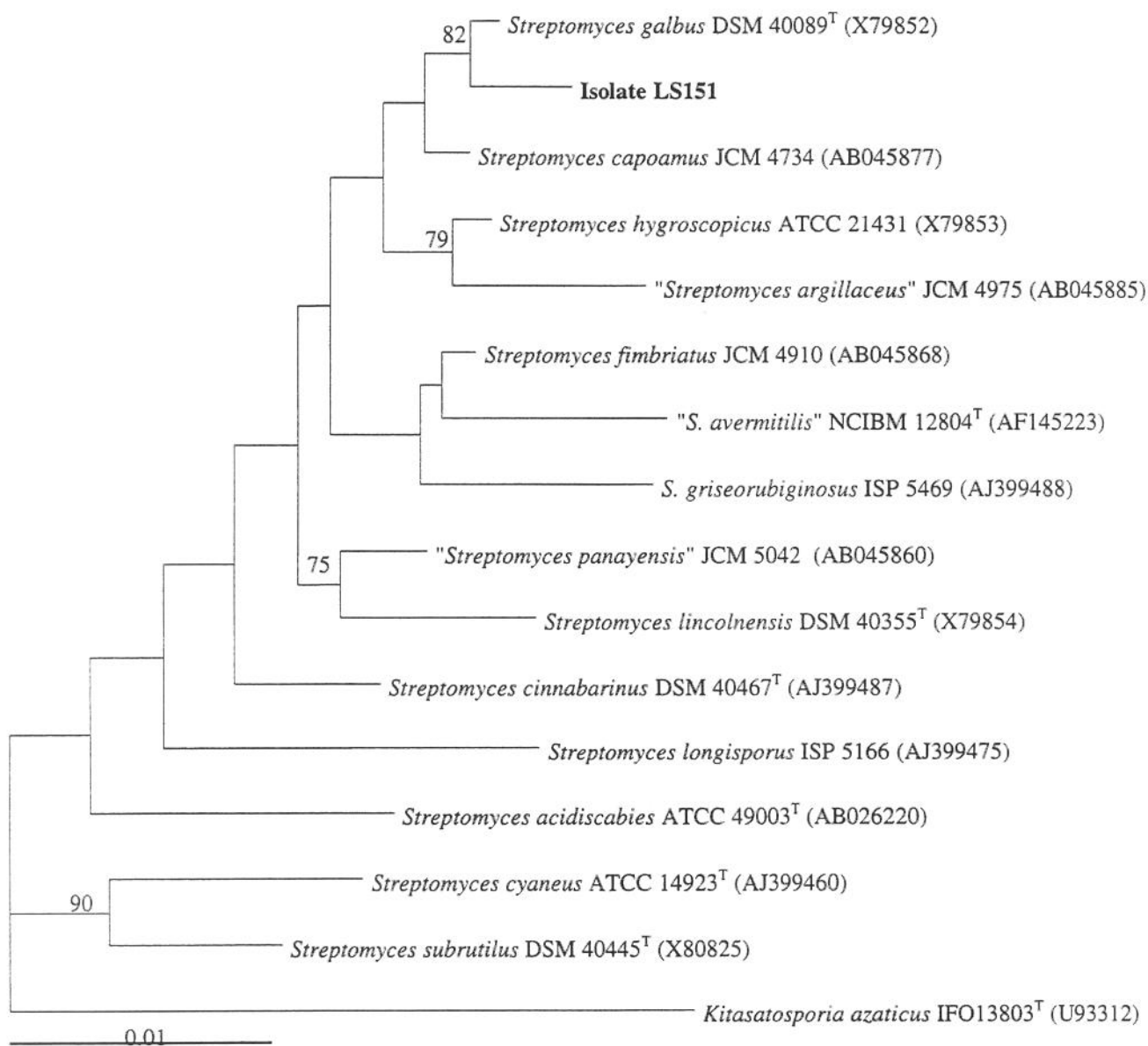


Figure 7. Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences from isolate LS151 and reference strains. Based on Jukes-Cantor/Neighbor-joining method. Bootstrap values above 70% are listed (1,000 replicate runs). GenBank accession numbers are listed after species names.

5. CAPÍTULO 3. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO 2. METABOLISM OF ALACHLOR BY SOIL STREPTOMYCETES

Lara Durães Sette^{1*}, Luiz Antônio M.A. da Costa², Anita J. Marsaioli² and Gilson Paulo Manfio³

¹Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbianas; Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), UNICAMP, CEP 13083-970, Campinas (SP) Brazil; ²Laboratório de Química Orgânica, Instituto de Química (IQ), UNICAMP, CP 6154 CEP 13083-970, Campinas (SP) Brazil; ³Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP, CP 6171 CEP 13081-970, Campinas (SP), Brazil.

Corresponding author: Lara Durães Sette. E-mail: larasette@hotmail.com

To be submitted to: Biodegradation

Appropriate section: biochemistry of biodegradative pathways or enhancement of naturally-occurring biodegradative properties and activities.

Editor-in-Chief : Bruce E. Rittmann, *Northwestern University, Evanston, IL, USA.*

Managing editors:

Ronald L. Crawford, *Depto of Bacteriology, University of Idaho, Moscow, USA.*

Willy Verstraete, *Laboratory of Microbial Ecology, University of Ghent, Belgium.*

ABSTRACT

Streptomyces spp. isolated from soil enriched with alachlor and able to grow under high concentrations of this herbicide and to degrade the alachlor molecule, when it was used as carbon source, were utilized in this study. Six from 16 strains were submitted to *in vitro* degradation tests, where they were grown in pure and mixed cultures using alachlor as the sole carbon source. *Streptomyces* strains LS166, LS177 and LS182 were able to achieve good growth when high alachlor concentration (300 $\mu\text{L/L}$) was used and they transformed about 60-70% of the herbicide molecule. Alachlor metabolism generated the same product fragmentation patterns for all strains tested. The GC-MS analysis identified the main metabolic products, in general, as dechlorinated indoles and quinoline compounds. DEA compound, an intermediate in the carcinogenic system, was not generated by the *Streptomyces* ssp. metabolism, suggesting that the streptomycetes strains used in this study could play an important role toward alachlor degradation/detoxification.

INTRODUCTION

Alachlor [2-chloro-*N*-(methoxymethyl)-*N*-(2,6-diethylphenyl) acetamide], an important acetanilide herbicide, is widely used for pre-emergent weed control in corn, soybeans and other commercial important Brazilian crops, such as, coffee, sugar cane and cotton. This herbicide is classified as slightly toxic and it has moderate residual effect in soil, however it is a potential carcinogenic compound. The U.S. Environmental Protection Agency (EPA) has classified alachlor as a probably human carcinogen on the basis of oncogenic effects in rats and mice (Pothuluri *et al.*, 1993). Carcinogenicity of alachlor is associated with production of 2,6-diethylaniline (DEA) compound, an intermediated metabolic product, which is bioactivated through hydroxylation and oxidation reactions to the dialquilbenzoquinoneimine (DEBQI) compound that could interact with the DNA molecule (Coleman *et al.*, 1999; Coleman *et al.*, 2000).

Alachlor is mainly degraded by soil microorganisms. No pure or mixed cultures that are able to extensive alachlor degradation or mineralization have been reported in the literature. Bacteria and fungi can degrade this herbicide under cometabolic conditions (Smith & Phillips, 1975; Novick & Alexander, 1985; Sun *et al.*, 1990; Ferrey *et al.*, 1994; Shelton *et al.*, 1996), and the mainly alachlor transformation products from microbial metabolism are: 2-chloro-2',6'-diethylacetanilide; 2,6-diethylaniline; 2,6-diethyl-*N*-(methoxymethyl) aniline; 1-chloroacetyl-2,3-dihydro-7-ethylindole; 2,6-diethyl-*N*-(methoxymethyl)acetanilide and *bis*-2-thio-2',6'-diethyl-*N*-(methoxymethyl)acetanilide (Stamper & Tuovinen, 1998).

Actinomycetes form the major group of Gram-positive bacteria and are considered as primary degrading organisms, which have important role in degradation of xenobiotic compounds. The genus *Streptomyces* have been found to degrade pesticides with widely different chemical structures, such as organochlorines, *s*-triazines, sulfonylureas and acetanilides (de Schrijver & de Mot, 1999).

In a previous study, 6 actinomycetes strains isolated from alachlor enriched soil samples and identified as *Streptomyces* spp., were selected by their high tolerance to the alachlor compound and their ability to degrade about 50-75% of the alachlor molecule

(Sette *et al.*, 2001). These results triggered the interest of studying the metabolism of these alachlor-degrading *Streptomyces* strains.

In this study we analyzed the transformation of the herbicide alachlor by selected streptomycete strains in experiments where alachlor and hydrolysis products were used as the sole carbon source for growth. Alachlor degradation was assayed by high performance liquid chromatography (HPLC) and the fragmentation patterns of products generated were determined by gas chromatography-mass spectrometry analyses (GC-MS).

MATERIALS AND METHODS

Herbicide, microorganisms and culture conditions. Alachlor was obtained in emulsifiable concentrate formulation from Monsanto Co. (Jacareí, SP, Brazil). *Streptomyces* sp. strains used in this study were isolated, selected and characterized as described previously (Sette *et al.*, 2001). Starter cultures of spores and mycelia were grown in 150 mL Erlenmeyer flasks containing 10 mL of liquid mineral salt medium (2 g Na₂SO₄; 0.2 g MgSO₄·7H₂O; 0.65 g K₂HPO₄; 1 g NH₄Cl; 1 g KNO₃; 0.01g FeSO₄·7H₂O and 0.1% yeast extract in 1 liter of distilled water, pH 7.3), added of 0.5% glucose. Flasks were incubated under stationary condition for 24 h at 30° C followed by 48 h with shaking (150 rpm).

Pure culture experiments were conducted using 150 mL Erlenmeyer flasks, each flask containing 30 mL of liquid mineral salt medium supplemented with alachlor and its natural hydrolysis compounds (150 µL/L and 300 µL/L). Flasks were inoculated with starter cultures (10 mL), prepared as described before. The herbicide used as carbon source was maintained in sterilized distilled water for 6 months to generate alachlor-hydrolyzed compounds, and was added to the medium after autoclaving for 15 min at 121° C. The flasks were incubated for 14 days at 30° C on a rotary shaker at 150 rpm.

Mixed culture experiments (5 sets) were conducted by mixing inocula from 3 different starter cultures in a consortium: 1) LS143/LS151/LS182; 2) LS143/LS153/LS182; 3) LS151/LS153/LS182; 4) LS143/LS151/LS153 and 5) LS166/LS177/LS182. Starter cultures (10 mL) were mixed and added to mineral salt liquid medium (30 mL) containing 300 µL/L of alachlor and hydrolyzed alachlor compounds as the sole carbon source. The

consortia were incubated for 7 and 14 days at 30° C under shaking (150 rpm). Each experiment was performed in duplicate and non-inoculated flasks were run as control.

Analytical methods. The broths of the pure and mixed cultures containing 300 µL/L of alachlor and alachlor-hydrolyzed compounds were centrifuged (15,000 X g/10 min), filtered (0.22µm Millipore filter) and analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). Analyses of percent of alachlor degradation were made by using a LC-6A Shimadzu HPLC, equipped with an UV-visible absorbance detector set at 220 nm. The HPLC was fitted with a C18 column (25 cm x 4.6 mm diam., Varian) and a mobile phase of acetonitrile/water (50:50 v/v) at a flow rate of 1 mL/min eluted the metabolites at ambient temperature. 20 µL aliquots were injected on HPLC equipment.

Metabolism of alachlor and hydrolysis compounds (300 µL/L) by pure cultures was determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) methods. Prior to mass spectral (MS) analyses, culture broths were centrifuged and concentrated by using C18 micro columns (Waters, SEP-PAK cartridge), previously treated with ethylic ether and activated with methanol. Aliquots of 40 µL/L were submitted to treatment with the micro column and then eluted with ethylic ether (6 mL). The fractions collected were evaporated under nitrogen and 1 µL aliquots were injected on GC-MS (splitless). Alachlor and its hydrolysis products were analyzed using a Hewlett-Packard 5890 gas chromatograph, equipped with a DB-5 fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm diam. x 0.25 µm, J&W Scientific), attached to a HP 5970 DMS mass spectrometer. Analysis was made under electron energy of 70 eV with a detector and injector temperature of 260° C and 220° C, respectively. The pressure of the carrier gas (helium) was 10 psi. The oven temperature after sample injection was 80° C increasing to 290° C at 15° C/min.

RESULTS AND DISCUSSION

Alachlor transformation by pure and mixed cultures of *Streptomyces* spp.

Streptomyces strains used in this study were recovered from soil treated with alachlor and previously selected by their tolerance to high concentrations of alachlor and

ability to degrade about 50% of the herbicide in 7 days cultures using alachlor (150 $\mu\text{L/L}$) as the sole carbon source (Sette *et al.*, 2001).

Six alachlor-degrading streptomycetes were submitted to *in vitro* degradation tests using alachlor and its derived compounds as carbon sources in order to determine the metabolic products generated. Results from degradation assays using 150 and 300 $\mu\text{L/L}$ alachlor added to the culture medium, incubated for 14 days at 30° C under shaking at 150 rpm, are shown in **Figure 1**. Degradation rates obtained after 14 days incubation (150 $\mu\text{L/L}$ alachlor) were, in general, better than results obtained after 7 days incubation in previous studies (Sette *et al.*, 2001). About 80% of the herbicide was degraded by strains LS177 and LS182 and about 70% by strains LS151, LS153 and LS166.

Assays conducted using 300 $\mu\text{L/L}$ (300 ppm) of hydrolyzed and non-hydrolyzed herbicide resulted in 60-70% degradation by strains LS166, LS177 and LS182 (**Figure 1**). These results were considered very interesting, since soil application rates of alachlor are usually in the range of 1 to 3 ppm (assuming an equal distribution of the herbicide in the top 15-cm soil) and since residues in agricultural soils tend to persist throughout the annual cycle. Residual concentrations (after spray) of approximately 400 mg/kg (or 400 ppm) have been reported (Stamper & Tuovinen, 1998). Most of the previous alachlor degradation studies reported in literature used concentrations of the herbicide up to 100 ppm (or 100 $\mu\text{L/L}$) (Novick & Alexander, 1985; Capri & Walker, 1993; Konopka, 1994; Ferrey *et al.*, 1994; Shelton *et al.*, 1996). In a single broad range study, application of alachlor at 250, 500, 750 and 1,000 ppm to non-amended soil yielded no significant transformation of the herbicide molecule after 21 days (Felsot & Dzantor, 1995).

Chromatograms presented in **Figure 3** show the rate of herbicide degradation by *Streptomyces* strain LS182 after growth under shaking conditions for 14 days. More than 80% degradation was observed in media with 150 $\mu\text{L/L}$ alachlor and hydrolyzed compounds and close to 75% degradation at the concentration of 300 $\mu\text{L/L}$.

Alachlor has been shown to be co-metabolically transformed in soil and water (Novick & Alexander, 1985; Pothuluri *et al.*, 1990; Stamper & Tuovinen, 1998; de Schrijver & de Mot, 1999). Only one study revealed the ability of one organism, the fungi *Chaetomium globosum*, to grow with alachlor as the single carbon source (Tiedje & Hagedorn, 1975). The ability of *Streptomyces* spp to transform pesticides has not been

widely investigated. In the only report found, Shelton *et al.* (1996) showed that *Streptomyces* strain PS1/5 was able to transform a variety of structurally different herbicides by cometabolism. Alachlor at 50 ppm (or 50 $\mu\text{L/L}$) was 95% degraded by this organism in medium containing dextrin as the carbon source.

Additional degradation studies were conducted using microbial consortia in order to evaluate the potential improvement of the degradation capacity of mixed culture conditions. It has been cited that the breakdown of some pollutants and recalcitrant compounds may require synergistic action of a group of microorganism, since the metabolic diversity of a microbial community is greater than that of a single microbial species (Bartha, 1990). Strain LS182, which showed the highest percentage of alachlor degradation in pure culture experiments (**Figure 1**), was thus used in 4 out of the 5 consortia experiments.

Degradation results of microbial consortia are presented in **Figure 2**. These data showed that only the consortium formed by the strains LS166, LS177 and LS182 presented herbicide degradation rate (about 70%) similar to that obtained with strain LS182 in pure culture experiments (approximately 60% after 7 days and 80% after 14 days). Degradation rates obtained for the other consortia were approximately 28 to 55%. Reduced degradation rates of the herbicide could be associated to interference of strains LS151 in the performance of the consortia, since consortia in which this strain was included showed poor performance in relation to assays with pure cultures (**Figure 1**) and the other consortia.

Pattern of alachlor fragmentation by *Streptomyces* spp.

Analysis of metabolites formed by the 6 *Streptomyces* strains when using 300 $\mu\text{L/L}$ of alachlor and alachlor-hydrolyzed compounds, showed that the pattern of herbicide fragmentation was similar for all strains (**Figure 4**). Thus, rates of microbial consortia degradation (**Figure 2**) that were, in general, lower or equivalent to that obtained by pure cultures (**Figure 1**), could be explained by the utilization of one unique alachlor transformation pathway for the strains.

On the basis of the mass spectral data obtained (**Figure 4**), no evidence of ring cleavage was shown. Mineralization of alachlor has been shown in low rates, extremely slowly and under cometabolic conditions (Novick *et al.*, 1986; Ferrey *et al.*, 1994; Yen *et*

al., 1994). In agricultural soils, less than 4% of alachlor aromatic carbon was mineralized in 30 days (Novick *et al.*, 1986) or 120 days (Yen *et al.*, 1994). In another study, mineralization of alachlor (18 ppm) by white-fungi was about 6 to 14% over 122 days of incubation in malt extract medium supplemented with wood chips (Ferrey *et al.*, 1994).

In the GC-MS analyses, compounds found in the control samples (medium + alachlor) were considered hydrolysis products. These were also detected in the assays with the test strains (**Figures 4 and 5, 1 to 7**). Compound (**5**) was detected only when pure alachlor samples was analyzed by GC-MS (data not shown), and it was considered as and chemical contaminant of the herbicide by Mangiapan *et al.* (1997).

Five compounds were identified as the main biodegradation products of alachlor under the conditions tested, as schematized in **Figure 6**. These we identified on the basis of fragmentation patterns of indolic and quinolinic compounds cited in the literature (Porter & Baldas, 1971 and Porter, 1985). The chemical structures of the alachlor biodegradation products were quite different from that of compounds generated by natural hydrolysis of the herbicide (**Figure 5**). The latter included molecules with closed rings derived from cyclizing, whereas the former comprised mainly indolic and quinolinic compounds. Only compound (**17**) retained the chlorine associated to the molecule, indicating that strains tested could dechlorinate the herbicide and its derived compounds. Quinoline (**15**) was the main molecule obtained from hydrolyzed and non-hydrolyzed alachlor transformations. This was the first time that 8-ethyl-quinoline compound (**15**) and methylindole molecule (**16**) were reported as alachlor transformation products. The 3 other main compounds formed (**13, 14 and 17**) were identified as indolic derived compounds (Mangiapan *et al.*, 1997).

Indole and quinoline are relatively water-soluble *N*-heteroaromatic compounds, and show weak adsorption to soil particles and aquifer organic material (Fetzner, 1998). These characteristics are directly related to the bioavailability of these compounds, since compounds with high solubility in water are degraded more easily than less water-soluble molecules (Pothuluri *et al.*, 1993), such as alachlor, with solubility of 242 mg/L in water at 25° C (Zagorc-Koncan, 1996).

Quinoline has been shown to be toxic, mutagenic and carcinogenic to animal and microorganisms, although it can be rapidly degraded in aerobic and anaerobic conditions by microorganisms (Shukla, 1986; Aislabie *et al.*, 1990; Kaiser *et al.*, 1996; Licht *et al.*, 1997). The majority of quinoline-degrading microorganisms have been identified as *Pseudomonas* spp., though degradation by strains of *Desulfobacterium*, *Moraxella*, *Nocardia* and *Rhodococcus* sp. has also been reported (Aislabie *et al.*, 1990). Complete microbial degradation of indole has frequently been observed under nitrate- and sulfate-reducing conditions, and under methanogenic conditions (Fetzner, 1998).

One of the main alachlor metabolites is 2,6-diethylaniline (DEA) (Stamper & Tuovinen, 1998), a precursor of carcinogenic compounds in mammal and in soil microorganism metabolic pathways (Galassi *et al.*, 1996). GC-MS data obtained from both control and *in vitro* hydrolyzed and non-hydrolyzed alachlor degradation assays showed the production of DEA (2) (**Figures 4 and 5**). The presence of this compound in control samples indicates that it was possibly formed by hydrolysis. However, it was also identified in broths from the degradation assays (**Figure 4**).

Thus, an additional *in vitro* degradation experiment was carried out using only non-hydrolyzed alachlor as the carbon source to investigate the generation of DEA as by-product of the microbial metabolism. Strain LS182 was grown for 14 days at 30 °C under shaking conditions (150 rpm) in liquid medium containing alachlor 250 µL/L. In this case, GC-MS analysis showed that DEA was not detected in control and experimental broths (data not shown), confirming the route of formation via hydrolysis. These results confirm that *Streptomyces* strain LS182 transform alachlor without the formation of DEA.

Assays conducted using *Streptomyces* strain LS182 in medium with 250 µL/L alachlor showed that the main metabolic products formed were also indole and quinoline derivatives (data not shown). Chlorinated compounds were not detected, confirming the ability of this strain to remove chlorine from the alachlor molecule. Strain LS182 may also play an important role in the degradation of other halogenated compounds, which will be further investigated.

CONCLUSIONS

The ability of microbial strains to survive and grow in heavily contaminated environments is fundamental to their successful application in bioremediation processes. In the present study, we demonstrated that alachlor-resistant *Streptomyces* spp. strains were capable of degrading the herbicide and naturally occurring alachlor-hydrolysis compounds *in vitro*. Isolates were also able to grow and transform high concentrations of hydrolyzed and non-hydrolyzed herbicide (300 µL/L) when these were used as sole carbon sources. Ability to use alachlor and derived hydrolysis compounds as carbon sources could be considered a competitive advantage for these organisms in carbon-depleted contaminated environments. The main metabolic products formed in the degradation experiments comprised dechlorinated compounds that could be used as substrates by other microorganisms. The biodegradation metabolic pathway did not generate DEA. It can be suggested that *Streptomyces* sp. strains may play an important role in the initial steps of alachlor degradation/detoxification in the soil environment.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present work was supported by a grant from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil).

REFERENCES

- Aislabie J., Bej A.K., Hurst H., Rothenburger S. & Atlas R.M (1990). Microbial degradation of quinoline and methylquinolines. *Applied and Environmental Microbiology*. **56**, 345-351.
- Bartha R. (1990). Isolation of microorganism that metabolize xenobiotic compounds. In: *Isolation of Biotechnological Organisms from Nature*. Cp. 11, Ed. D. P. Labeda. McGraw-Hill Publishing Company, New York.

- Capri E. & Walker A. (1993). Biodgradation of liquid and microencapsulated formulations of Alachlor in Clay Loam soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **50**, 506-513.
- Coleman S., Liu S., Linderman R. Hodgson E. & Rose R.L. (1999). *In vitro* metabolism of alachlor by human liver microsomes and human cytochrome P450 isoforms. *Chemico-Biological Interactions*. **122**, 27-39.
- Coleman S., Linderman R., Hodgson E. & Rose R.L. (2000). Comparative metabolism of chloroacetamide herbicides and selected metabolites in human and rat liver microsomes. *Environmental Health Perspective*. **108**, 1151-1157.
- Felsot A.L. & Dzantor E.K. (1995). Effect of alachlor concentration and organic amendment on soil dehydrogenase activity and pesticide degradation rate. *Environmental Toxicologic and Chemistry*. **14**, 23-28.
- Ferrey M.L., Koskinen W.C., Blanchette R.A. & Burnes T.A. (1994). Mineralization of Alachlor by lignin-degrading fungi. *Canadian Journal of Microbiology*. **40**, 795-798.
- Fetzner S. (1998). Bacterial degradation of pyridine, indole, quinoline, and their derivatives under different redox conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **49**, 237-250.
- Galassi S., Provini A., Mangiapan S. & Benfenati E. (1996). Alachlor and its metabolites in surface water. *Chemosphere*. **32**: 229-237.
- Kaiser J.P., Frng Y. & Bollag J.M. (1996). Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiological Reviews*. **60**, 483-498.
- Konopka A. (1994). Anaerobic degradation of chloroacetanilide herbicides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **42**, 440-445.
- Licht D., Johansen S.S., Arvin E. & Ahring B.K. (1997). Transformation of indol and quinoline by *Desulfobacterium indolicum* (DSM 3383). *Applied Microbiology and Biotechnology*. **47**, 167-172.

- Mangiapan S., Benfenati E., Grasso P., Terreni M., Pregnolato M., Pagani G. & Barcelo D. (1997).** Metabolites of alachlor in water: identification by mass spectrometry and chemical synthesis. *Environmental Science and Technology*. **31**, 3637-3646.
- Novick N.J. & Alexander M. (1985).** Cometabolism of low concentrations of Propachlor, Alachlor, and Cycloate in sewage and lake water. *Applied and Environmental Microbiology*. **49**, 737-743.
- Novick N.J., Mukherjee R. & Alexander M. (1986)** Metabolism of alachlor and propachlor in suspensions of pretreated soils and in samples from ground water aquifers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **34**: 721-725.
- Porter Q. & Baldas, J. (1971).** In: *Mass Spectrometry of Heterocyclic Compounds*, John Wiley & Sons Inc., New York.
- Porter, Q. (1985).** In: *Mass Spectrometry of Heterocyclic Compounds*, John Wiley & Sons Inc., 2^a ed., New York.
- Pothuluri J.V., Moorman T.B., Obenhuber D.C. & Wauchop R.D. (1990).** Aerobic and anaerobic degradation of alachlor in samples from a surface-to-groundwater profile. *Journal of Environmental Quality*. **19**: 525-530.
- Pothuluri J.V., Freeman J.P., Evans F.E., Moorman T.B. & Cerniglia C.E. (1993).** Metabolism of alachlor by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **41**, 483-488.
- de Schrijver A. & de Mot, R. (1999).** Degradation of pesticides by actinomycetes. *Critical Reviews in Microbiology*. **25**, 85-119
- Sette L.D., de Oliveira, V.M. & Manfio G.P. (2001).** Selective isolation, screening and characterization of alachlor-degrading streptomycetes. (*in press*)
- Shelton D.R., Khader S., Karns J.S. & Pogell B.M. (1996).** Metabolism of twelve herbicides by *Streptomyces*. *Biodegradation*. **7**, 129-136

- Shukla O.P. (1986).** Microbial transformation of quinoline by a *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. **51**, 1332-1342.
- Smith A.E. & Phillips D.V. (1975).** Degradation of Alachlor by *Rhizoctonia solani*. *Agronomy Journal*, **67**, 347
- Stamper D.M. & Tuovinen O.H. (1998).** Biodegradation of the acetanilide herbicides Alachlor, Metolachlor, and Propachlor. *Critical Reviews of Microbiology*, **24**, 1-22.
- Sun H.L., Sheets T.S. & Corbin F.T. (1990).** Transformation of Alachlor by soil microbial communities. *Weed Science*. **38**, 416.
- Tiedje J.M. & Hagedorn M.L. (1975).** Degradation of alachlor by a soil fungus, *Chaetomium globosum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **23**, 77-81.
- Yen P.Y., Koskinen W.C. & Schweizer E.E. (1994).** Dissipation of alachlor in four soils as influenced by degradation and sorption process. *Weed Science*. **42**: 233-240.
- Zagorc-Koncan J. (1996).** Effects of atrazine and alachlor on self-purification processes in receiving streams. *Water Science and Technology*. **6**: 181-187.

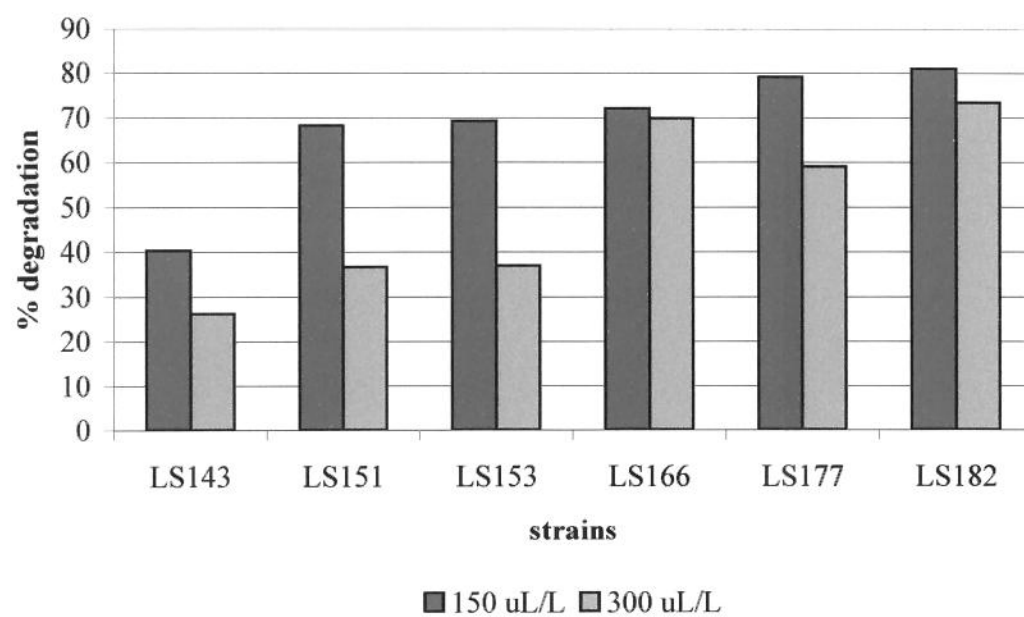


Figure 1. Degradation of alachlor by pure cultures after incubation for 14 days in medium containing 150 and 300 µL/L of alachlor and hydrolysis products as the sole carbon source.

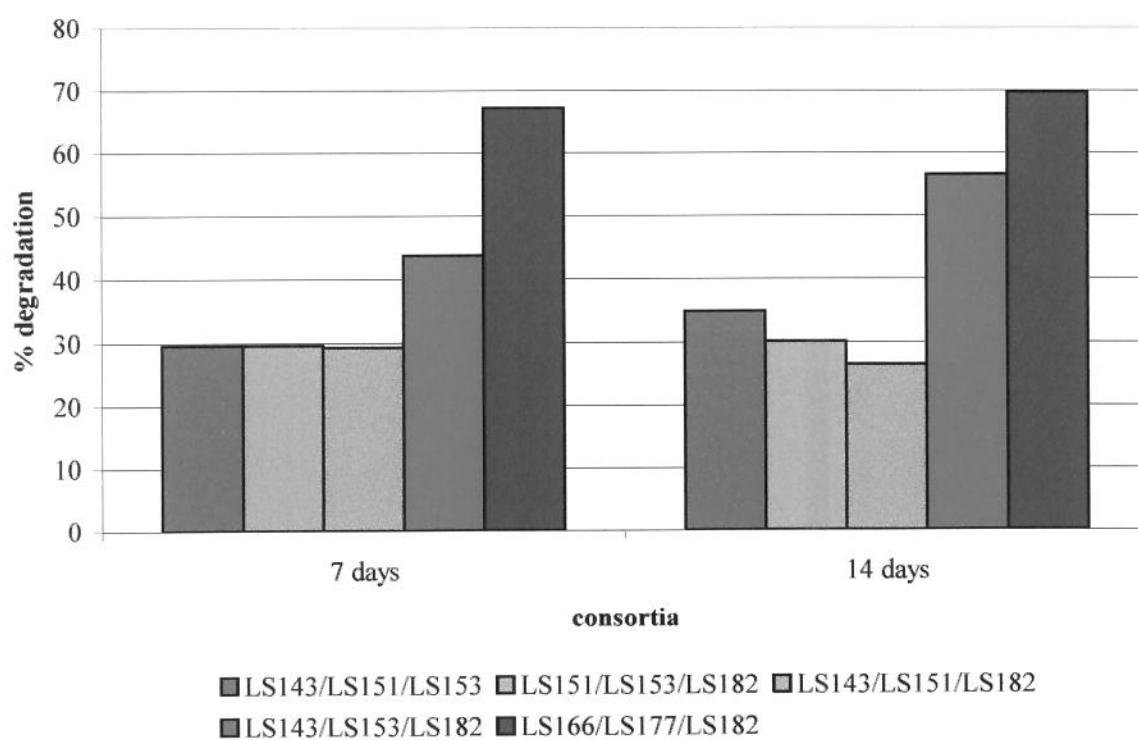


Figure 2. Degradation of alachlor by microbial consortia after incubation for 7 and 14 days (150 rpm/30° C) in medium containing 300 $\mu\text{L/L}$ of alachlor and hydrolysis products as the sole carbon source.

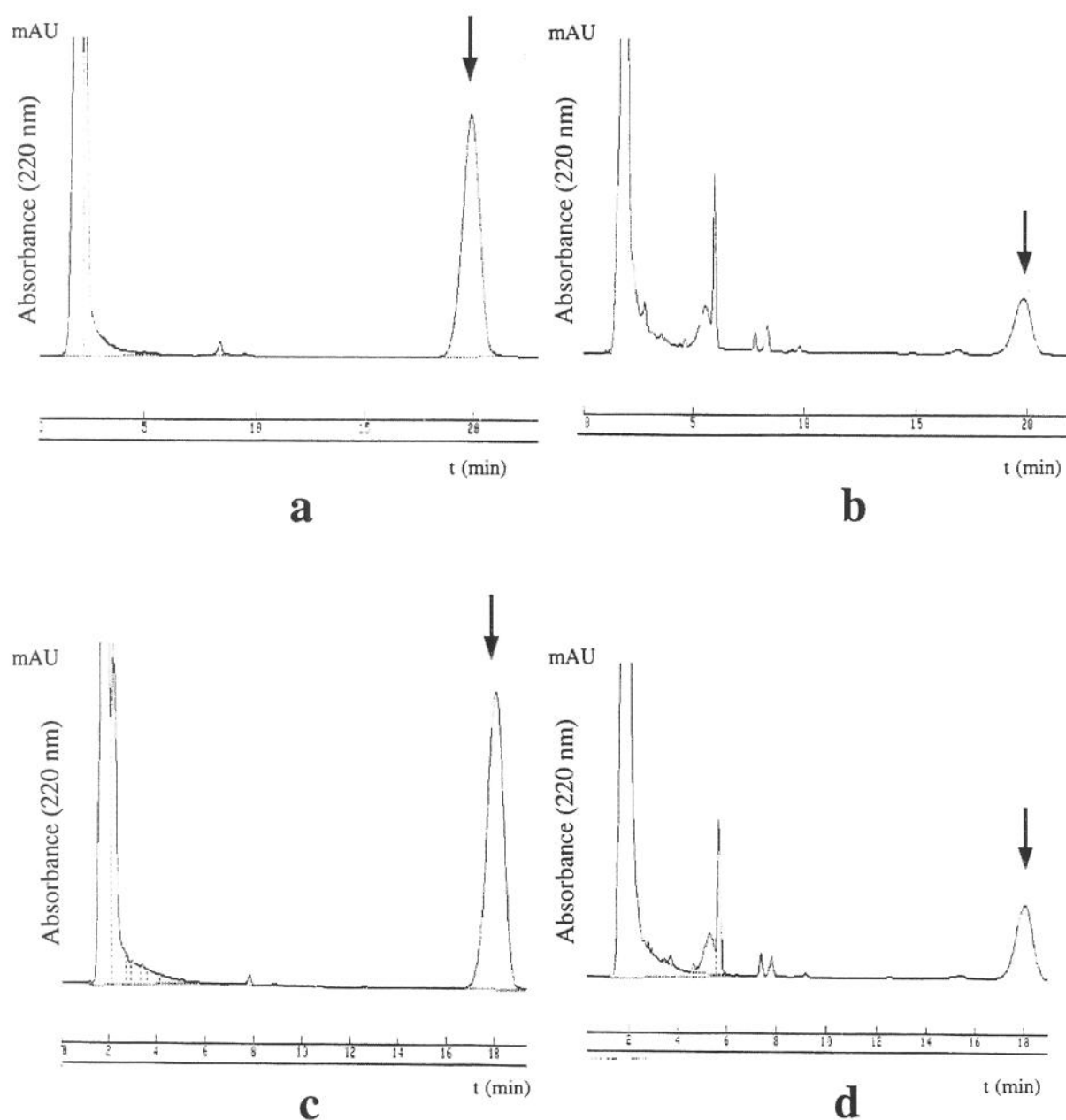


Figure 3. Chromatograms of *in vitro* degradation tests of strain LS182 after 14 days.

Controls (a and c) and assays (b and c) samples for 150 and 300 $\mu\text{L/L}$ alachlor, respectively. Chromatographic conditions: column C18; mobile phase acetonitrile/water 50:50 (v/v), 1.0 mL/min flow, ambient temperature, 220 nm detection. The arrows indicate the alachlor peaks.

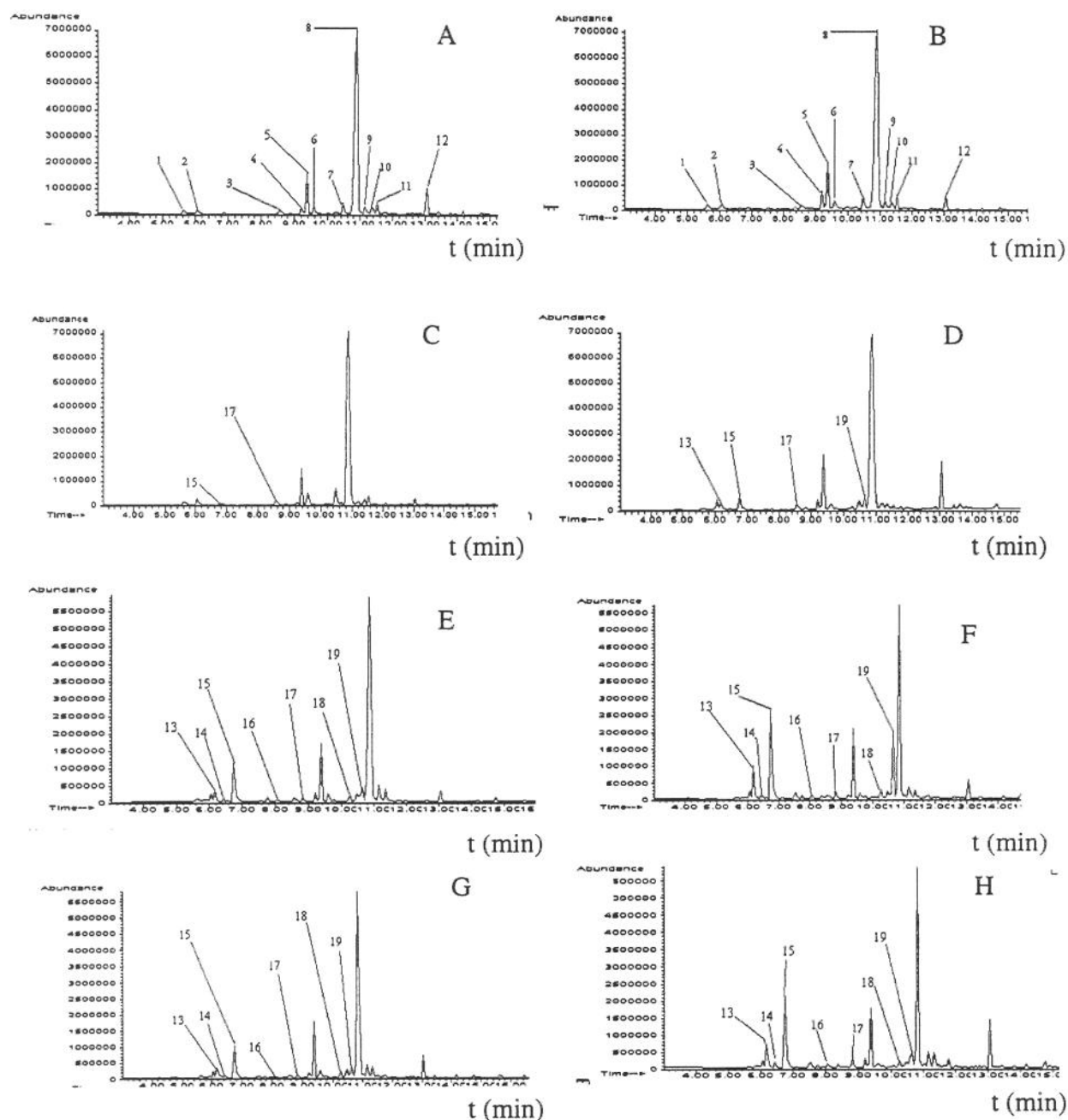


Figure 4. GC-MS profiles of control (A and B) and metabolites of strains LS143 (C), LS151 (D), LS153 (E), LS166 (F), LS177 (G) and LS182 (H), respectively. Numbers: 1 to 7 (alachlor natural hydrolysis compounds); 8 (alachlor); 13 to 17 (degradation products from alachlor). Chromatographic conditions: silica capillary column, electron energy 70 eV, detector 260° C, injector 220° C, carrier gas 10 psi.

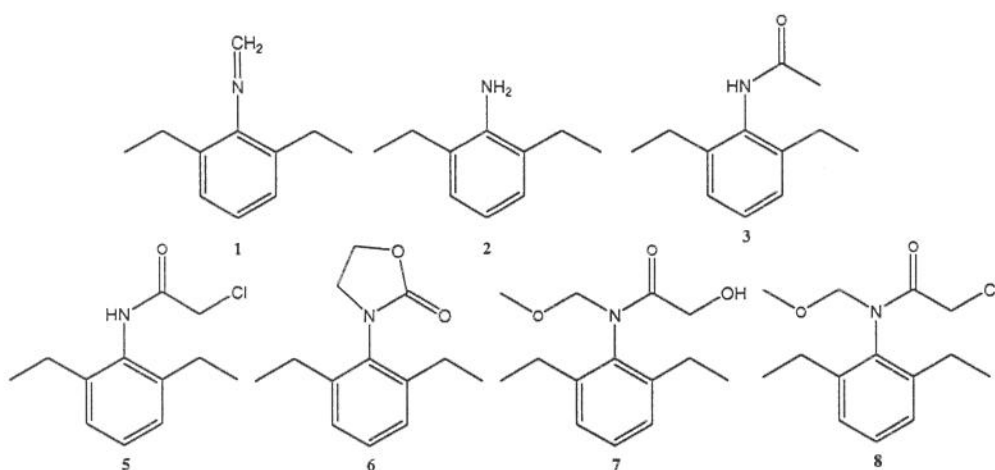


Figure 5. Alachlor natural hydrolysis products detected in the control experiments. (1 to 7) aniline derivatives compounds. (8) alachlor herbicide compound. Numbers are in accordance with GC-MS chromatograms (see **Figure 4**).

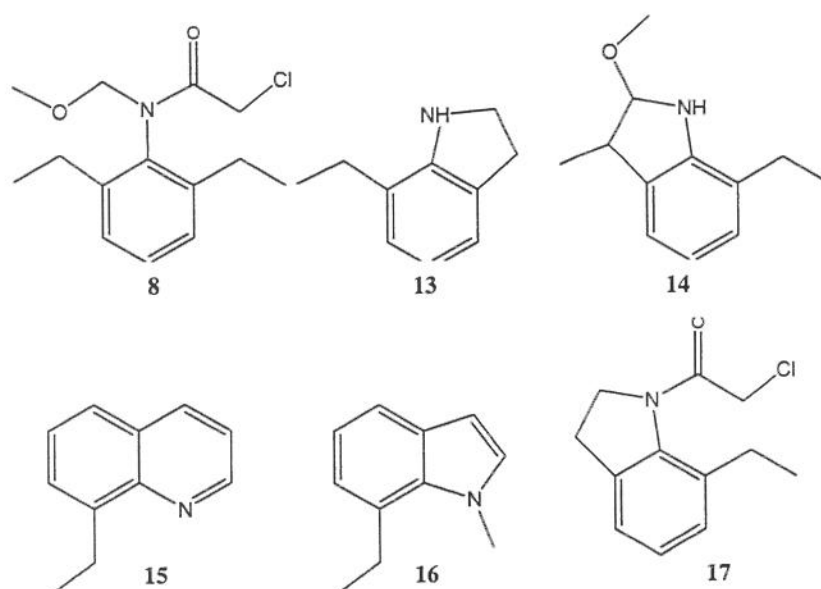


Figure 6. Alachlor and degradation products of *Streptomyces* strains LS143, LS151, LS153, LS166, LS177 and LS182. (8) alachlor; (13, 14, 16 and 17) indolic compounds; (15) quinoline compound. Numbers are in accordance with GC-MS chromatograms (see **Figure 4**).

7. DISCUSSÃO GERAL

A contaminação do ar, águas, lençóis freáticos, sedimentos e solos por compostos químicos tóxicos e poluentes é atualmente um dos principais problemas relacionados com a industrialização mundial. A necessidade urgente de se remediar sítios contaminados tem conduzido ao desenvolvimento de novas tecnologias visando, preferencialmente, a destruição dos compostos poluentes no próprio ambiente contaminado (Boopathy, 2000).

A biorremediação é um processo tecnológico onde sistemas biológicos são empregados para efetuar a limpeza dos poluentes no meio ambiente (Head, 1998). Os microrganismos, principalmente as bactérias e fungos, possuem grande versatilidade metabólica e fisiológica e são, portanto, os agentes biológicos mais utilizados em biorremediação (Atlas & Pramer, 1990; Garbisu & Alkorta, 1999).

O sucesso de um programa de biorremediação de áreas contaminadas depende de diversos fatores, incluindo a investigação da possibilidade de seleção e isolamento de microrganismos autóctones para degradação dos compostos de interesse (Melo & Azevedo, 1997).

A estratégia empregada para o isolamento e triagem de actinomicetos potencialmente degradadores dos herbicidas utilizados neste estudo foi bem sucedida, permitindo o isolamento de 53 linhagens de actinomicetos a partir de amostras de solo previamente tratado com alachlor e 67 a partir de amostras de solos tratados com gramocil e scepter.

Dentre os microrganismos isolados, 9, 11 e 16 linhagens, originárias das amostras contendo gramocil, scepter e alachlor, respectivamente, apresentaram resistência a concentrações elevadas destes herbicidas (**Capítulo 1**).

Estudos mais detalhados foram realizados com isolados do solo tratado com o alachlor, devido ao alto grau de toxicidade deste herbicida, ao efeito carcinogênico em animais e à capacidade da molécula em alcançar o lençol freático. Seis linhagens que apresentaram capacidade de degradação de até 50% do alachlor em ensaios *in vitro* (**Capítulo 2**), sendo o alachlor e produtos naturais de hidrólise as únicas fontes de carbono no meio. Até aonde vai o nosso conhecimento, apenas um trabalho publicado relata a capacidade de utilização do alachlor por microrganismos (*Chaetomonium globosum*) como única fonte de carbono e energia (Tiedje & Hagedorn, 1975).

Os isolados foram caracterizadas taxonomicamente (**Capítulo 2**) e submetidas a ensaios adicionais de degradação *in vitro*, utilizando culturas puras e consórcios, e identificação dos metabólitos formados durante o processo degradativo (**Capítulo 3**).

A caracterização taxonômica foi realizada baseando-se em métodos fenotípicos, genotípicos e estudos filogenéticos. Os dados derivados destas análises foram corroborativos e permitiram a classificação dos 6 isolados como pertencentes ao gênero *Streptomyces*. A linhagem LS151 foi identificada como *S. galbus* e os isolados LS143 e LS153 agrupados com o *S. bikiniensis*. As linhagens LS166, LS177 e LS182 foram similares entre si em todas as análises e não foram identificadas com nenhuma das espécies disponíveis nas bases de dados consultadas, podendo potencialmente representar espécies novas de estreptomicetos (**Capítulo 2**). Entretanto, estudos mais detalhados, envolvendo taxonomia polifásica, precisam ser realizados para complementar e confirmar a identificação destes isolados.

Em geral, as linhagens LS166, LS177 e LS182 apresentaram os melhores resultados de degradação *in vitro* do alachlor nas condições utilizadas (**Capítulo 3**). Os resultados de degradação/transformação do alachlor na concentração de 300 µL/L (300 ppm) mostraram-se bastante interessantes, visto que as concentrações de alachlor usualmente aplicadas no solo são em torno de 1 a 3 ppm, e que resíduos de alachlor em solo podem ser encontrados na concentração de 400 ppm. As concentrações de alachlor utilizadas na maioria dos estudos anteriores de degradação deste herbicida foram de até 100 ppm (Novick & Alexander, 1985; Capri & Walker, 1993; Konopka, 1994; Ferrey *et al.*, 1994; Shelton *et al.*, 1996). Um estudo realizado utilizando concentrações iguais ou superiores a 250 ppm em solo sem adição de nutrientes não demonstrou degradação significativa da molécula de alachlor (Felsot & Dzanter, 1995).

O padrão de transformação do alachlor obtido por CG-EM foi bastante semelhante para os 6 isolados (**Capítulo 3, Figura 4**). Este fato talvez possa explicar as baixas porcentagens de degradação do alachlor obtidas após os experimentos realizados com os consórcios microbianos (**Capítulo 3, Figura 2**), pois todos os isolados provavelmente utilizam a mesma via metabólica para realizar as transformações na molécula do herbicida e nos compostos gerados pela hidrólise do alachlor.

Os principais compostos formados a partir do metabolismo do alachlor e de seus produtos de hidrólise (**Capítulo 3, Figura 5**) foram identificados como quatro indólicos e um quinolínico, em geral, não clorados (**Capítulo 3, Figura 6**), sugerindo que os isolados apresentam capacidade de descloração do herbicida, um importante passo inicial do processo degradativo de compostos xenobióticos (Reineke & Knackmuss, 1988).

Indóis e quinolinas são compostos *N*-heteroaromáticos que apresentam solubilidade em água relativamente alta e são fracamente adsorvidos no solo e em material orgânico aquático (Fetzner, 1998). Portanto, estes compostos podem apresentar biodisponibilidade para o metabolismo microbiano maior do que o alachlor, o qual é pouco solúvel em água (Novick & Alexander, 1985). Os compostos *N*-heteroaromáticos podem ser degradados por organismos presentes no solo, principalmente por bactérias (Grant & Al-Najjar, 1976; Shukla, 1986; Madsen e Bollag, 1989; Aislabie *et al.*, 1990; Kaiser *et al.*, 1996; Licht *et al.*, 1997; Johansen *et al.*, 1997; Fetzner, 1998).

Para que o processo de biorremediação seja efetivo, os microrganismos devem atacar enzimaticamente os poluentes e convertê-los a produtos inofensivos. Além disso, é necessário que os produtos de biodegradação não sejam tóxicos ou indesejáveis para o meio ambiente e para a saúde humana (Atlas & Pramer, 1990).

Um dos principais compostos descritos na literatura como sendo produto de degradação do alachlor é o DEA (Stamper & Tuovinen, 1998), um intermediário carcinogênico produzido a partir do metabolismo deste herbicida por mamíferos e microrganismos do solo (Galassi *et al.*, 1996). A presença deste composto nos experimentos de degradação *in vitro* do alachlor, foi associada à hidrólise natural do herbicida, portanto, os 6 isolados foram capazes de transformar a molécula de alachlor através de um sistema enzimático não gerador de DEA.

Os resultados obtidos com os estreptomicetos utilizados neste estudo, principalmente as linhagens LS166, LS177 e LS182, sugerem que estes organismos podem representar um papel importante nas etapas iniciais de degradação/destoxificação do herbicida alachlor.

O presente trabalho abre novos caminhos para estudos bioquímicos, fisiológicos e ecológicos, permitindo um melhor entendimento do complexo processo envolvido na degradação de compostos poluentes, além de oferecer a perspectiva de aplicação destes organismos para biorremediação de ambientes contaminados com alachlor.

8. CONCLUSÕES GERAIS

- A estratégia empregada para o isolamento de culturas puras de actinomicetos potencialmente degradadoras de herbicidas, baseada na utilização de amostras de solos previamente tratados com gramocil, sceptor e alachlor e na utilização de meios de cultivo apropriados enriquecidos com os herbicidas em questão, foi bem sucedida. A partir das amostras de solo contendo gramocil e das amostras de solo contendo sceptor, 67 linhagens de actinomicetos foram isoladas, e a partir de amostras de solo tratado com alachlor, foram obtidas 53 linhagens de actinomicetos.
- O ensaio de resistência (ou tolerância) aos herbicidas, baseado no crescimento dos isolados em meio nutritivo contendo elevadas concentrações de gramocil, sceptor e alachlor, resultou na seleção de 9, 11 e 16 linhagens, respectivamente. A tolerância a altas concentrações dos herbicidas pode ser um indício de que estes microrganismos possam utilizar tais compostos como fonte de carbono para o seu crescimento e sobrevivência.
- Com relação aos estudos de degradação *in vitro* do alachlor por culturas puras, 6 das 16 linhagens selecionadas foram capazes de crescer e transformar pelo menos 50% da molécula de alachlor adicionada ao meio de cultivo, juntamente com compostos derivados de sua hidrólise natural, como únicas fontes de carbono, sendo os melhores resultados obtidos com os isolados LS166, LS177 e LS182.
- A capacidade de crescimento e transformação do alachlor em meio contendo altas concentrações do herbicida hidrolisado e produtos de hidrólise, pode representar uma vantagem para esses microrganismos em ambientes contaminados e com deficiência em carbono.
- O uso de consórcios microbianos na degradação do alachlor não favoreceu o processo degradativo. As porcentagens de degradação obtidas com os consórcios foram, em geral, iguais ou inferiores quando comparadas com as porcentagens de degradação obtidas nos ensaios utilizando-se culturas puras. Os resultados observados sugerem que pode ter havido inibição do crescimento das linhagens com melhores perfis de degradação, através do favorecimento do crescimento das linhagens com potenciais de utilização do herbicida inferiores. Além de que, o padrão de transformação do alachlor

analisado por CG-EM foi semelhante para todos os isolados, o que sugere que a utilização deste composto pelas linhagens estudadas provavelmente ocorre através do mesmo sistema enzimático.

- A fragmentação do alachlor pelas linhagens isoladas neste estudo resultou na formação de compostos, em geral, indólicos e quinolínicos não clorados, produzidos por um sistema metabólico não gerador de carcinogenicidade. Estes resultados sugerem que os isolados estudados podem representar um papel de relevância nas etapas iniciais envolvidas nos processos de degradação e destoxificação do alachlor.
- A caracterização das 6 linhagens de actinomicetos degradadoras de alachlor possibilitou a classificação das mesmas dentro do gênero *Streptomyces*. Os dados obtidos com as análises fenotípicas, genotípicas e filogenéticas foram corroborativos e permitiram a identificação da linhagem LS151 como *Streptomyces galbus*; o agrupamento dos isolados LS143 e LS153 com *Streptomyces bikiniensis*; e foram indicativos de que as linhagens LS166, LS177 e LS182, as quais estão intimamente relacionadas entre si, possam representar novas espécies de actinomicetos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aislabie J., Bej A.K., Hurst H., Rothenburger S. & Atlas R.M. (1990). Microbial degradation of quinoline and methylquinolines. *Applied and Environmental Microbiology*. **56**: 345-351.
- Ahmed D., Sylvester M. & Sondossi (1991). Subcloning of *bph* genes from *Pseudomonas testosterone* B-335 in *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*: evidence from dehalogenation during on initial attack on chlorobiphenyl. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**: 2880-2887.
- Anderson A.S. & Wellington E.M.H. (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **51**, 797-814
- Arai T. (1997). What are actinomycetes? In: *Atlas of Actinomycetes*. (Miyadoh, S. et al., Eds). The Society for Actinomycetes Japan. 180-191.
- Arruda H.P. (1996). Receituário agrônômico. In: *Compêndio de Defensivos Agrícolas*, 5^oed, Andrei Editora Ltda.
- Atlas R.M. & Pramer D. (1990). Focus on bioremediation. *ASM News* **56**: 352-353.
- Bartha R. (1990). Isolation of microorganism that metabolize xenobiotic compounds. In: *Isolation of Biotechnological Organisms from Nature*. Cp. 11, Ed. D. P. Labeda. McGraw-Hill Publishing Company, New York.
- Bollag J.M. (1990). Biotransformation of the herbicide metolachlor. *Developments in Industrial Microbiology*. **31**, 75-80.
- Boopathy R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*. **74**: 63-67.
- de Bruijn F.J. (1992). Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain

reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**, 2180-2187.

de Bruijn F.J., Rademaker J. & Schneider M. (1996). Rep-PCR genomic fingerprinting of plant-associated bacteria and computer-assisted phylogenetic analysis. *In: Biology of plant-microbe interaction; Proceedings of the 8th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions*. (G. Stacey, B. Mullin and P. Gresshoff, Eds.) APS Press, 497-502.

de Bruijn F.J., Scheider M., Rossbach U. & Louws F.J. (1997). Automated fluorescent and conventional Rep-PCR genomic fingerprinting and multiplex PCR to classify bacteria and track genes. *Progres in Microbial Ecology*. (Martins, M.T. *et al.*, Eds). Brazilian Society for Microbiology.

Capri E. & Walker A. (1993). Biodgradation of liquid and microencapsulated formulations of Alachlor in Clay Loam soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **50**, 506-513.

Chapalmadugu S. & Chaudhry G.R. (1991). Isolation of constitutively expressed enzyme for hydrolysis of carbaryl in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. **157**: 6711-6716.

Chun J. (1995) Computer Assisted Classification and Identification of Actinomycetes. PhD (Theses), Department of Microbiology, The Medical School, Newcastle, England.

Coleman S., Liu S., Linderman R. Hodgson E. & Rose R.L. (1999). *In vitro* metabolism of alachlor by human liver microsomes and human cytochrome P450 isoforms. *Chemico-Biological Interactions*. **122**, 27-39.

Coleman S., Linderman R. Hodgson E. & Rose R.L. (2000). Comparative metabolism of chloroacetamide herbicides and selected metabolites in human and rat liver microsomes. *Environmental Health Perspective*. **108**, 1151-1157.

Extention Toxicology Network (EXTOXNET) (1996). Pesticide Information Profile, <http://ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/ghindex.html>, Oregon State University.

- Embley T.M. & Stackebrandt E. (1994).** The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*. **48**, 257-289.
- Felsenstein J. (1989).** Phylip-phylogeny inference package. *Cladistics*. **5**, 164-166
- Felsot A.L. & Dzantor E.K. (1994).** Effect of alachlor concentration and organic amendment on soil dehydrogenase activity and pesticide degradation rate. *Environmental Toxicologic and Chemistry*. **14**, 23-28.
- Ferrey M.L., Koskinen W.C., Blanchette R.A. & Burnes T.A. (1994).** Mineralization of Alachlor by lignin-degrading fungi. *Canadian Journal of Microbiology*. **40**, 795-798.
- Fetzner S. (1998).** Bacterial degradation of pyridine, indole, quinoline, and their derivatives under different redox conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **49**, 237-250.
- Frighetto R.T.S. (1997).** Impacto ambiental decorrente do uso de pesticidas agrícolas. In: *Microbiologia Ambiental*. Cp 17, Ed. I. S. Melo e J. L. Azevedo. EMBRAPA-CNPMA, Jaguariúna (SP).
- Galassi S., Provini A., Mangiapan S. & Benfenati E. (1996).** Alachlor and its metabolites in surface water. *Chemosphere*. **32**: 229-237.
- Garbisu C. & Alkorta I. (1999).** Utilization of genetically engineered microorganisms (GEMs) for bioremediation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **74**: 599-606.
- Golovleva L.A., Aliyeva R.M., Naumova R.P. & Gvozdyak P.I. (1992).** Microbial bioconversion of pollutants. *Review of Environmental Contamination and Toxicology*, **124**, 41-78.
- Goodfellow M. (1989).** The Actinomycetes I. Supragenetic classification of actinomycetes. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (Williams, S.T., Sharpe, M.E. and Holt, J.G., Eds) **Vol 4**, 2333-2339.

- Goodfellow, M. & O'Donnell, A.G. (1994).** Chemosystematics: current state and future prospects. In: *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*. (M. Goodfellow & A.G. O'Donnell, John Wiley & Sons, Chichester, Eds). pp. 1-20.
- Grant D.J.W. & Al-Najjar T.R. (1976).** Degradation of quinoline by a soil bacterium. *Microbios*. **15**, 177-189.
- Head I.M. (1998).** Bioremediation: towards a credible technology. *Microbiology*. **144**: 599-608.
- Heuer H., Krsek M., Baker P., Smalla K. & Wellington E.M. (1997).** Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**: 3233-3241.
- Heydens W.F., Wilson A.G.E., Kier L.D., Lau H., Thake D.C. & Martens M.A. (1999).** An evaluation of the carcinogenic potential of the herbicide alachlor (4) to man. *Human & Experimental Toxicology*. **18**, 363-391.
- Higson F.K. (1991).** Degradation of xenobiotics by white rot fungi. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. **122**, 111-153.
- Johansen S.S, Licht D., Arvin E., Mosbaek H. & Hansen A.B. (1997).** Metabolic pathways of quinoline, indole and their methylated analogs by *Desulfobacterium indolicum* (DSM 3383). *Applied Microbiology and Biotechnology*. **47**: 292-300.
- Jukes T.H. & Cantor R.R. (1969).** Evolution of protein molecules p.21-132. In: H.N. Munro (ed.), Mammalian protein metabolism. Academic Press, New York.
- Kaiser J.P., Frng Y. & Bollag J.M. (1996).** Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiological Reviews*. **60**, 483-498.
- Karns J.S. & Tomasek P.H. (1993).** Carbofuran hydrolases purification and properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **39**: 1004.

- Konopka A. (1994).** Anaerobic degradation of chloroacetanilide herbicides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **42**, 440-445.
- Kumar S., Mukerji K.G. & Lal R. (1996).** Molecular aspects of pesticide degradation by microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*. **22**, 1-26.
- Küster, E. & Williams, S. T. (1964).** Selection of media for isolation of streptomycetes. *Nature*, **202**, 928-929.
- Labeda D. P. & Shearer, M.C. (1990).** Isolation of actinomycetes for biotechnological applications. In: *Isolation of Biotechnological Organisms from Nature*. Cp. 1, Ed. D. P. Labeda. McGraw-Hill Publishing Company, New York.
- Lane, D. J. (1991).** 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (Stackebrandt, E. & Goodfellow, M., Eds.) John Wiley & Sons, New York, pp. 115-175.
- Lane D.J, Pace B., Olsen G.J., Stahl D.A., Sogin M.L. & Pace N.R. (1985).** Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America*. **82**: 6955-6959.
- Lavorenti A. (1996)** Comportamento dos herbicidas no meio ambiente. *Anais do Workshop Sobre Biodegradação*. Campinas, SP. ISSN 1413-0084: 81-115.
- Licht D., Johansen S.S., Arvin E. & Ahring B.K. (1997).** Transformation of indol and quinoline by *Idesulfobacterium indolicum* (DSM 3383). *Applied Microbiology and Biotechnology*. **47**, 167-172.
- Logan N.A. (1991).** Identification In: *Bacterial Systematics*. Blackwell Scientific Publications. Chapter 5, 62-78.
- Ludwig W., Kirchhof G., Klugbauer N., Brockmann E., Roller C., Jilg S., Reetz K., Schachtner I., Ludvigsen A., Bachleitner M., Fischer U. & Schleifer K.H. (1993).** Phylogenetic relationships of *bacteria* based on comparative sequence analysis of elongation factor tu and atp-synthase β -subunit genes. *Antonie van Leeuwenhoek*, **64**: 285-305.

- Ludwig W. & Schleifer K.H. (1994). Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews*. **15**, 155-173.
- Lupski J.R. & Weinstock G.M. (1992). Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotes genomes. *Journal of Bacteriology*. **174**, 4325-4529.
- McCarthy A. J. & Williams S.T. (1990). Methods for studying the ecology of actinomycetes. *Methods in Microbiology*, **22**: 533-563.
- McCarthy, A. J. & Williams, S.T. (1992). Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment - a review. *Gene*. **115**, 189-192.
- Mangiapan S., Benfenati E., Grasso P., Terreni M., Pregnolato M., Pagani G. & Barcelo D. (1997). Metabolites of alachlor in water: identification by mass spectrometry and chemical synthesis. *Environmental Science and Technology*. **31**, 3637-3646.
- Madsen E.L. & Bollag J-M (1989). Pathway of indole metabolism by a denitrifying microbial community. *Archives of Microbiology*. **151**, 71-76.
- Mangiapan S., Benfenati E., Grasso P., Terreni M., Pregnolato M., Pagani G. & Barcelo D. (1997). Metabolites of alachlor in water: identification by mass spectrometry and chemical synthesis. *Environmental Science and Technology*. **31**, 3637-3646.
- Melo I.S. & Azevedo J.L. (1997). Como isolar microrganismos degradadores de moléculas xenobióticas. In: *Microbiologia Ambiental*. Cp 7, Ed. I. S. Melo e J. L. Azevedo. EMBRAPA-CNPMA, Jaguariúna (SP).
- Monteiro R.T. (1997). Degradação de pesticidas. In: *Microbiologia Ambiental*. Cp 4, Ed. I. S. Melo e J. L. Azevedo. EMBRAPA-CNPMA, Jaguariúna (SP).
- Nandau L.J., Fu-Min M., Breem A. & Sayler G.S. (1994). Aerobic degradation of (1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl ethane)-DDT by *Alcalygens eutrophus* A5. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**: 51-55.

- Novick N.J. & Alexander M. (1985).** Cometabolism of low concentrations of Propachlor, Alachlor, and Cycloate in sewage and lake water. *Applied and Environmental Microbiology*. **49**, 737-743.
- Novick N.J., Mukherjee R. & Alexander M. (1986)** Metabolism of alachlor and propachlor in suspensions of pretreated soils and in samples from ground water aquifers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **34**: 721-725.
- Pothuluri J.V., Moorman T.B., Obenhuber D.C. & Wauchop R.D. (1990).** Aerobic and anaerobic degradation of alachlor in samples from a surface-to-groundwater profile. *Journal of Environmental Quality*. **19**: 525-530.
- Olsen G.J., Woese C.R. & Overbeek R. (1994).** The winds of evolutionary change: breathing new life into microbiology. *Journal of Bacteriology*, **176**: 1-6.
- Pelczar M.J., Reid R. & Chan E.C.S. (1980).** In: Microbiologia. Vol.1, Ed. McGraw, Brasil.
- Picher, D.G., Saunders, N.A. & Owen, R.J. (1989).** Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, **8**, 151-156.
- Porter, Q. (1985).** In: *Mass Spectrometry of Heterocyclic Compounds*, John Wiley & Sons Inc., 2^a ed., New York.
- Porter Q. & Baldas, J. (1971).** In: *Mass Spectrometry of Heterocyclic Compounds*, John Wiley & Sons Inc., New York.
- Pothuluri J.V., Moorman T.B., Obenhuber D.C. & Wauchop R.D. (1990).** Aerobic and anaerobic degradation of alachlor in samples from a surface-to-groundwater profile. *Journal of Environmental Quality*. **19**: 525-530.
- Pothuluri J.V., Freeman J.P., Evans F.E., Moorman T.B. & Cerniglia C.E. (1993).** Metabolism of alachlor by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **41**, 483-488.

- Pridham T.G. & Tresner H.D. (1974).** Genus I. *Streptomyces* Waksman and Henrici. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan and Gibbons, Ed.) 8th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 747-748.
- Reineke W. & Knackmuss H.J. (1988).** Microbial degradation of haloaromatics. *Annual Review of Microbiology* **42**, 263-287.
- Saitou N. & Nei M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniats T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Scheifer K.H. & Ludwig W. (1989).** Phylogenetic relationship of bacteria. In: The hierarchy of life (B. Fernholm, K. Bremer & H. Jönrvall, Eds.). Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, pp. 103-117.
- de Schrijver A. & de Mot R. (1999).** Degradation of pesticides by actinomycetes. *Critical Reviews in Microbiology*, **25**, 85-119.
- Shelton D.R., Khader S., Karns J.S. & Pogell B.M. (1996).** Metabolism of twelve herbicides by *Streptomyces*. *Biodegradation*. **7**, 129-136
- Shirling E.B. & Gottlieb D. (1966).** Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **16**, 313-340.
- Shukla O.P. (1986).** Microbial transformation of quinoline by a *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. **51**, 1332-1342.
- Silva C.M.M.S & Fay E.F. (1997).** Persistência e biomagnificação de moléculas xenobióticas. In: *Microbiologia Ambiental*. Cp 3, Ed. I. S. Melo e J. L. Azevedo. EMBRAPA-CNPMA, Jaguariúna (SP).
- Singh B.K., Kuhad R.C., Singh A., Lal R. & Triphathi K.K. (1999).** Biochemical and molecular basis of pesticides degradation by microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*. **19**, 197-225.

- Smith A.E. & Phillips D.V. (1975).** Degradation of Alachlor by *Rhizoctonia solani*. *Agronomy Journal.*, **67**, 347
- Stackebrandt E. (1992).** Unifying phylogeny and phenotypic diversity. In *The Prokaryotes*. 2 ed, pp. 19-47,(A. Ballows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.H. Schleifer, Eds.), Springer-Verlag, New York.
- Stackebrandt E. & Liesack W. (1993).** Nucleic acids and classification. In *Handbook of New Bacterial Systematics*, pp. 152-194. (M. Goodfellow & A. G. O'Donnell, Ed.), Academic Press, London.
- Stackebrandt E., Rainey, F.A. and Ward-Rainey, N.L. (1997).** Proposal for a new hierarchic classification system *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **47**: 479-491.
- Stamper D.M. & Tuovinen O.H. (1998).** Biodegradation of the acetanilide herbicides Alachlor, Metolachlor, and Propachlor. *Critical Reviews in Microbiology*. **24**, 1-22.
- Sun H.L., Sheets T.S. & Corbin F.T. (1990).** Transformation of Alachlor by soil microbial communities. *Weed Science*. **38**, 416.
- Tiedje J.M. & Hagedorn M.L. (1975).** Degradation of alachlor by a soil fungus, *Chaetomium globosum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **23**, 77-81.
- Timbrell J.A. (1989).** In: Introduction to Toxicology. **Cap. 7**, (Taylor & Francis, Ed.), London.
- Versalovic J., Koeuth, T. & Lupski, J. (1991).** Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, **24**, 6823-6831.
- Versalovic J., Schneider M., Bruijn F.J. & Lupski J. (1994).** Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and Cellular Biology*. **5**, 25-40.

- Vobis G. (1997).** Morphology of actinomycetes. *In: Atlas of Actinomycetes.* (Miyadoh, S. *et al.*, Eds). The Society for Actinomycetes Japan. 180-191.
- Woese C.R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbial Review*, **51**: 221-272.
- Woese C.R. (1992).** Prokaryote systematics: the evolution of a science. *In: The Prokaryotes.* 2° ed, pp. 3-18. (A. Ballows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.H. Schleifer, Eds.), Springer-Verlag, New York.
- Yen P.Y., Koskinen W.C. & Schweizer E.E. (1994).** Dissipation of alachlor in four soils as influenced by degradation and sorption process. *Weed Science.* **42**: 233-240.
- Zagorc-Koncan J. (1996).** Effects of atrazine and alachlor on self-purification processes in receiving streams. *Water Science and Technology.* **6**: 181-187.

Apêndice. Dados derivados das análises por CLAE referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor

Tabela 1. Tempo de retenção (tR) e área dos picos obtidos por CLAE relativos à curva padrão do alachlor.

Alachlor (µL/L)	tR (min)	Área dos picos (mAU)
62,5	20,584	319265
125	20,561	651429
250	20,529	1374802
500	20,644	1700426
1.000	20,305	3711460

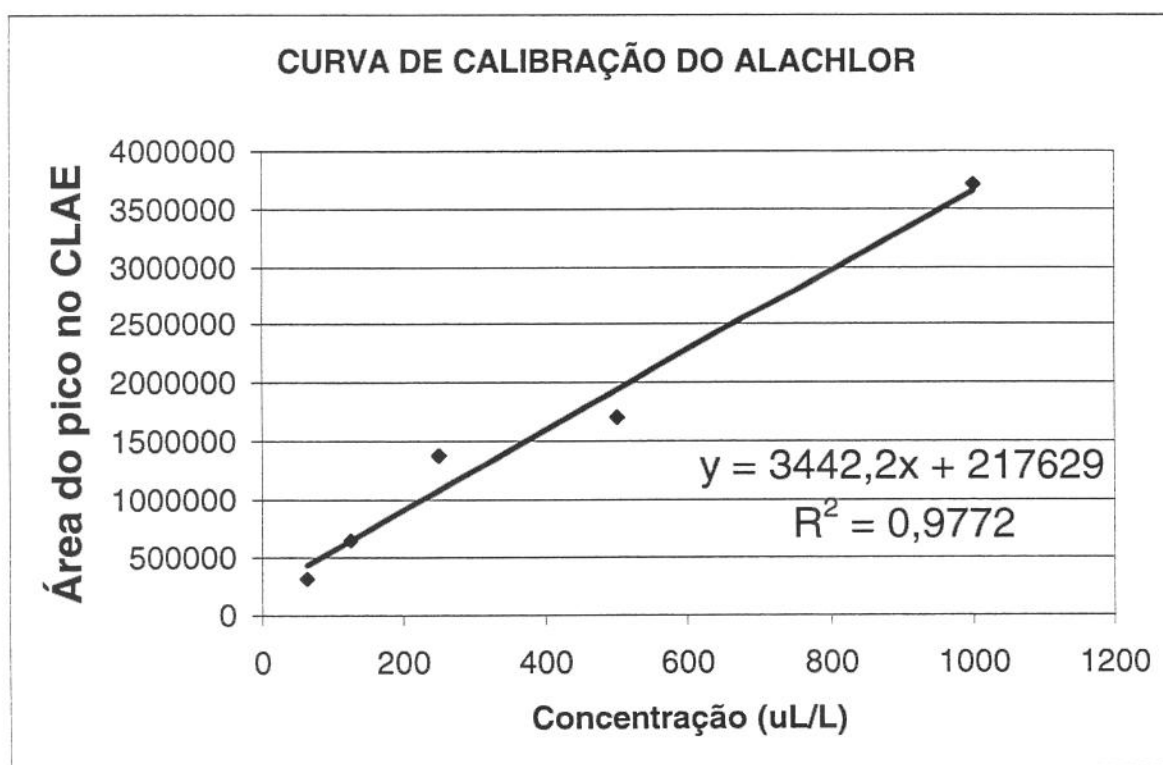


Figura 1. Curva de calibração do alachlor em CLAE.

Tabela 2. Tempo de retenção (tR) e área dos picos obtidos por CLAE referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por culturas puras após 7 dias de cultivo em meio acrescido de 150 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor.

Amostras	tR (min.)	Área pico (mAU)	Média das áreas	% degradação
Controle A	20,964	763946	775087,5	-----
Controle B	21,201	786229		
LS143A	21,186	387153	325547,5	57,90
LS143B	21,233	263942		
LS151A	21,226	378999	395319,0	48,90
LS151B	21,230	411639		
LS153A	21,208	305463	331368,5	66,10
LS153B	21,194	357274		
LS166A	21,177	194976	178988,5	76,91
LS166B	21,197	163000		
Controle A	21,521	917415	830447,5	-----
Controle B	21,477	743480		
LS177A	21,511	408532	328232,0	60,47
LS177B	21,502	247932		
LS182A	21,494	209245	192378,5	76,84
LS182B	21,459	175512		

Tabela 3. Tempo de retenção (tR) e área dos picos obtidos por CLAE referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por culturas puras após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 150 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor.

Amostras	tR (min.)	Área pico (mAU)	Média das áreas	% degradação
Controle A	21,502	818633	868591,5	-----
Controle B	21,437	918550		
LS143A	21,305	435706	518190,5	40,35
LS143B	21,268	600675		
LS151A	21,246	352166	275862,5	68,25
LS151B	21,200	199559		
LS153A	21,129	253600	266990,5	69,27
LS153B	21,080	280380		
LS166A	21,008	159471	243444,0	71,98
LS166B	20,918	333417		
LS177A	20,603	129423	180256,5	79,25
LS177B	20,479	231090		
LS182A	20,344	150394	164367,5	81,08
LS182B	20,209	178341		

Tabela 4. Tempo de retenção (tR) e área dos picos obtidos por CLAE referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por culturas puras após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor.

Amostras	tR (min.)	Área pico (mAU)	Média das áreas	% degradação
Controle A	19,900	1489824	1490674,0	-----
Controle B	19,933	1491524		
LS143A	19,942	1051510	1100250,5	26,19
LS143B	19,962	1148991		
LS151A	19,971	855039	942297,5	36,7
LS151B	19,981	1029556		
LS153A	19,971	907807	939812,0	36,90
LS153B	19,967	971817		
Controle A	19,928	1739514	1697803,0	-----
Controle B	19,892	1656092		
LS166A	19,890	577462	511833,5	69,85
LS166B	19,883	446205		
LS177A	19,871	679585	695530,5	59,00
LS177B	19,875	711476		
LS182A	19,853	409831	451407,5	73,41
LS182B	19,841	492984		

Tabela 5. Tempo de retenção (tR) e área dos picos obtidos por CLAE referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por consórcios microbianos após 7 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor.

Amostras	tR (min.)	Área pico (mAU)	Média das áreas	% degradação
Controle A	18,777	1519770	1684027,5	-----
Controle B	17,644	1848285		
LS143/LS151/LS153A	17,610	1119352	1187118,0	29,5
LS143/LS151/LS153B	17,617	1254884		
LS151/LS153/LS181A	17,621	1354453	1187149,5	29,5
LS151/LS153/LS181B	17,612	1019846		
LS143/LS151/LS182A	17,639	1221287	1191584	29,24
LS143/LS151/LS182B	17,631	1161881		
LS143/LS153/LS182A	17,628	903641	947694	43,72
LS143/LS153/LS182B	17,639	991747		
LS166/LS177/LS182A	17,617	387823	553832,5	67,11
LS166/LS177/LS182B	17,614	719842		

Tabela 6. Tempo de retenção (tR) e área dos picos obtidos por CLAE referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por consórcios microbianos após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor.

Amostras	tR (min.)	Área pico (mAU)	Média das áreas	% degradação
Controle A	17,853	1910880	1910880	
Controle B	-----	-----		
LS143/LS151/LS153A	17,782	1300437	1244546,0	34,8
LS143/LS151/LS153B	17,772	1188655		
LS151/LS153/LS181A	17,767	1415258	1336424,0	30,06
LS151/LS153/LS181B	17,786	1257590		
LS143/LS151/LS182A	17,786	1361991	1404882,0	26,47
LS143/LS151/LS182B	17,778	1447773		
LS143/LS153/LS182A	17,857	885119	830966,0	56,51
LS143/LS153/LS182B	17,803	776813		
LS166/LS177/LS182A	17,771	402151	579783,5	69,65
LS166/LS177/LS182B	17,754	757416		

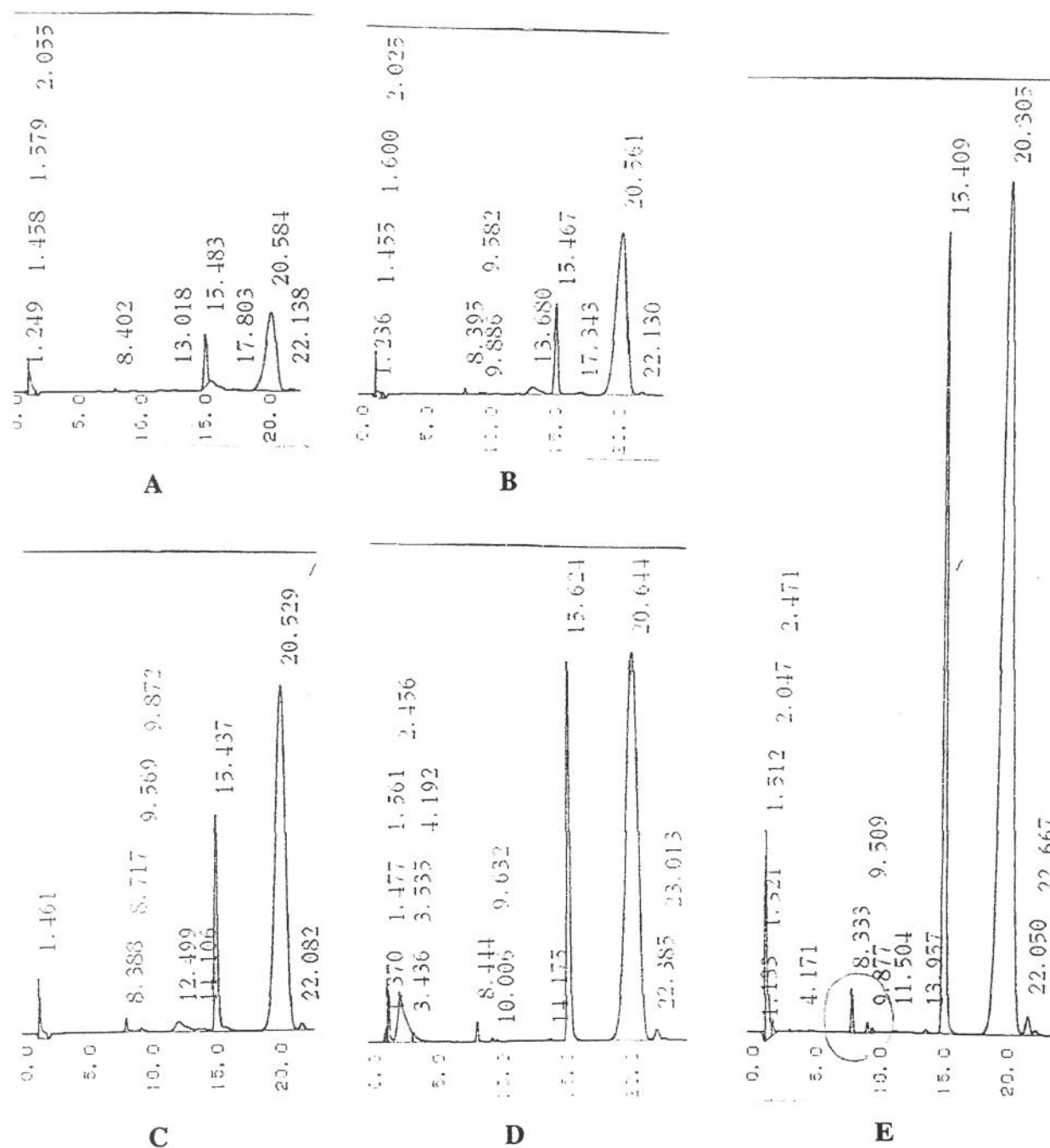


Figura 2. Cromatogramas referentes às análises por CLAE das amostras contendo diferentes concentrações de alachlor (curva padrão). (A) 62,5 $\mu\text{L/L}$, (B) 125 $\mu\text{L/L}$, (C) 250 $\mu\text{L/L}$, (D) 500 $\mu\text{L/L}$ e (E) 1.000 $\mu\text{L/L}$. Eixo x: tempo (min), eixo y: absorbância a 220nm (mAU).

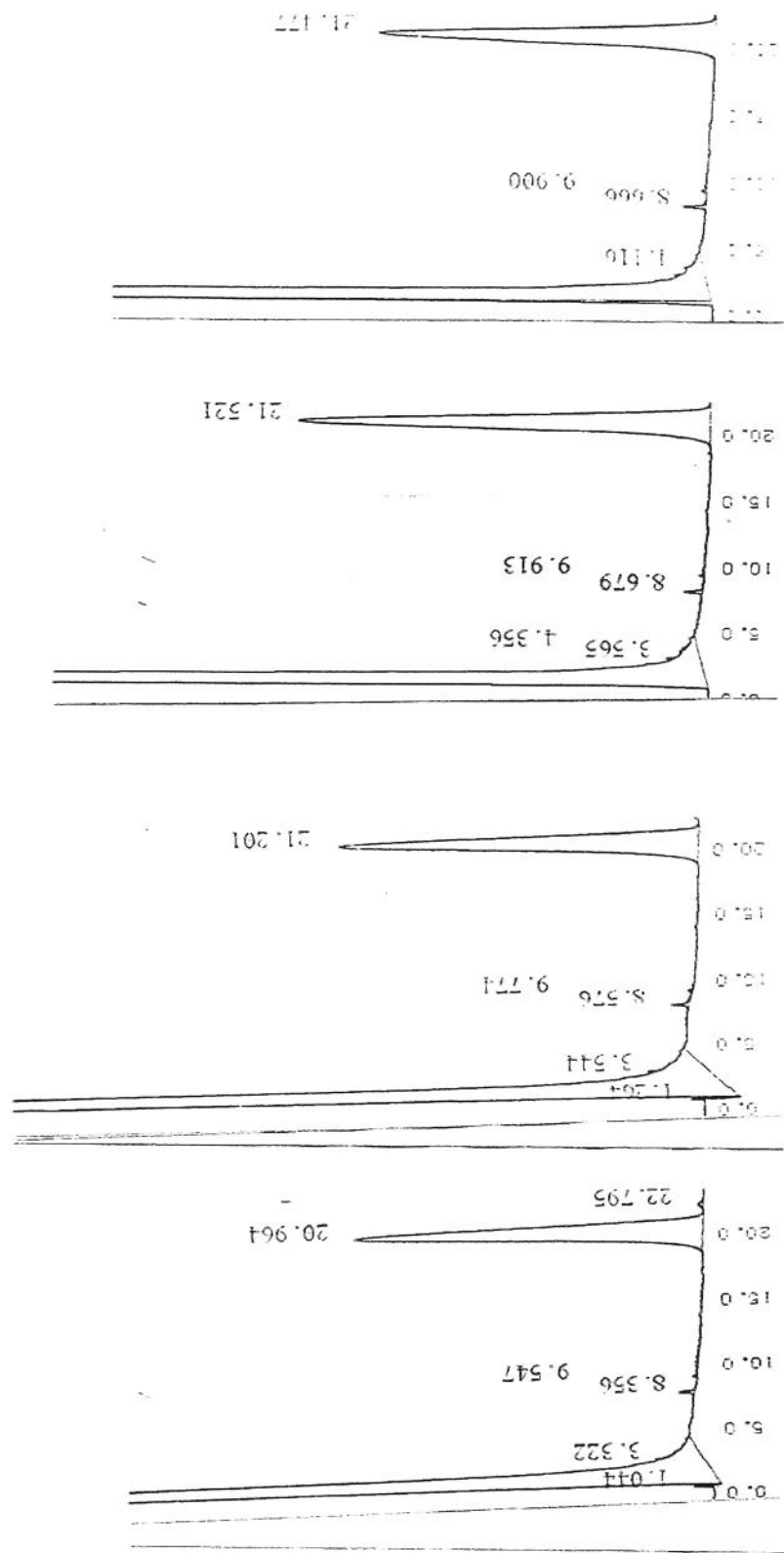


Figura 3. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por culturas puras após 7 dias de cultivo em meio acrescido de 150 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor: (A e B) controles (meio de cultivo + alachlor) das amostras LS143, LS151 e LS153 e (C e D) controles das amostras LS166, LS177 e LS182. Eixo x: tempo (min), eixo y: absorbância a 220nm (mAU).

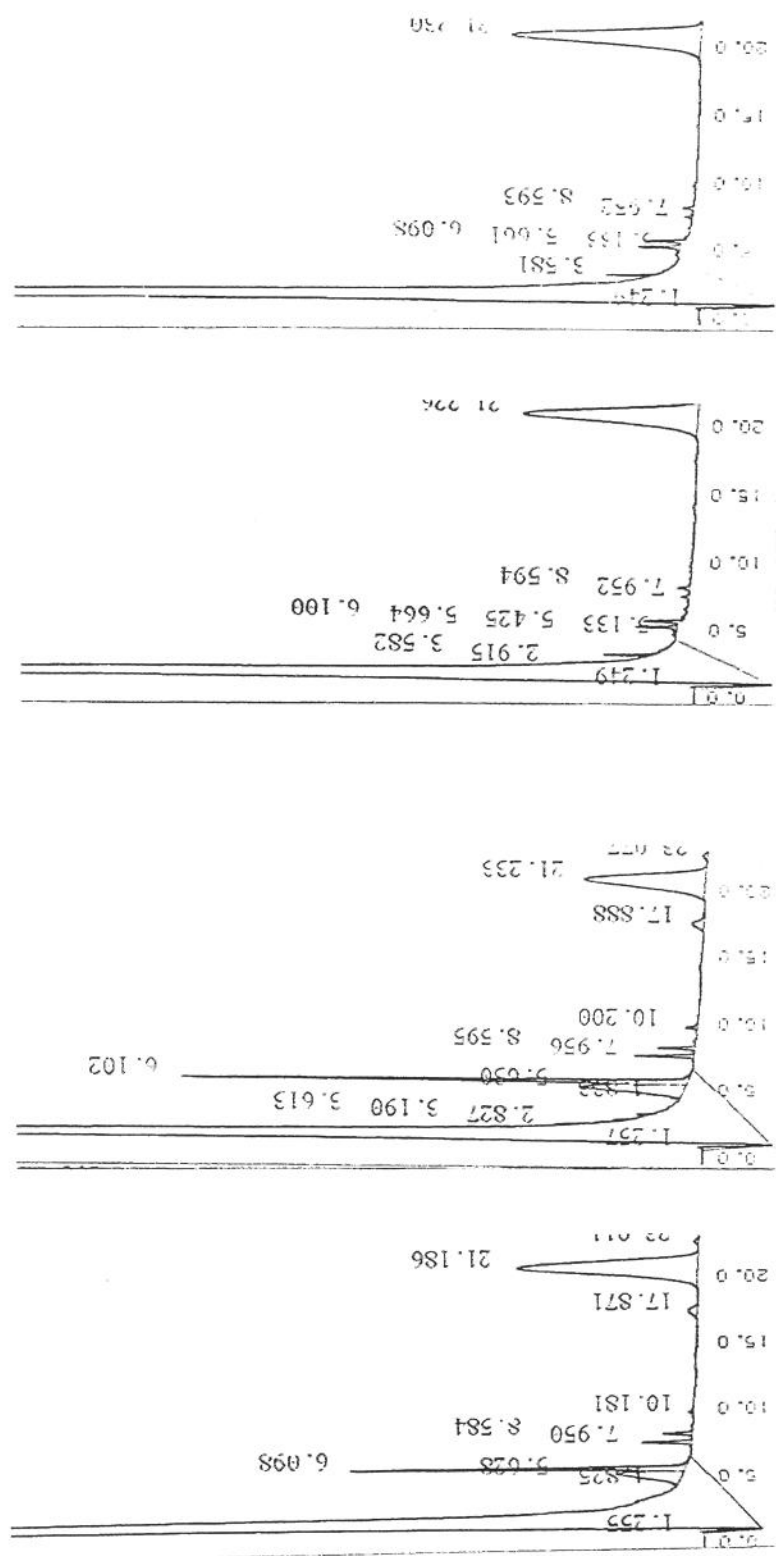


Figura 4. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por culturas puras após 7 dias de cultivo em meio acrescido de 150 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor: (A e B) amostras LS143 e (C e D) amostras LS151. Eixo x: tempo (min), eixo y: absorbância a 220nm (mAU).

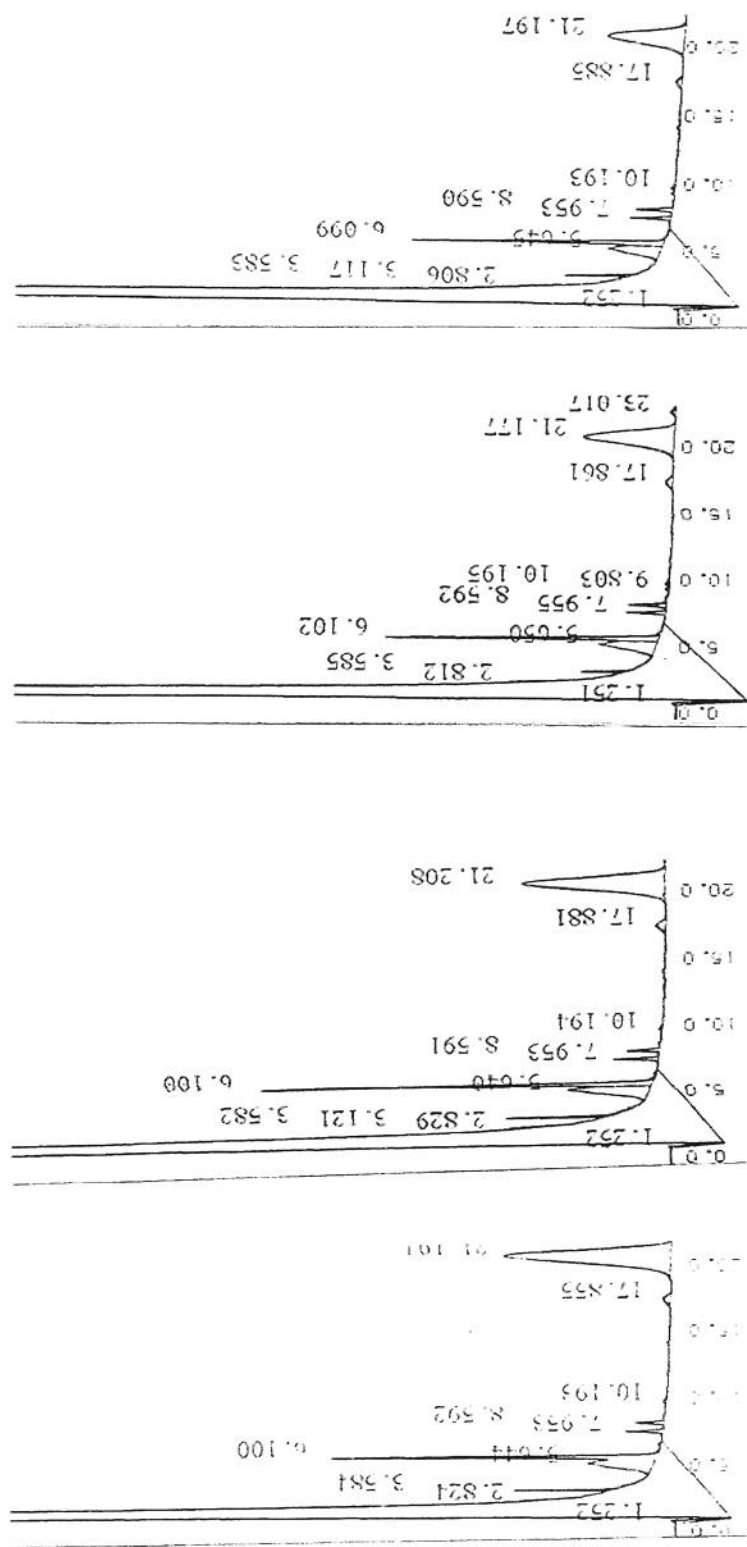


Figura 5. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por culturas puras após 7 dias de cultivo em meio acrescido de 150 $\mu\text{L/L}$ de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor: (A e B) amostras LS153 e (C e D) amostras LS166. Eixo x: tempo (min), eixo y: absorbância a 220nm (mAU).

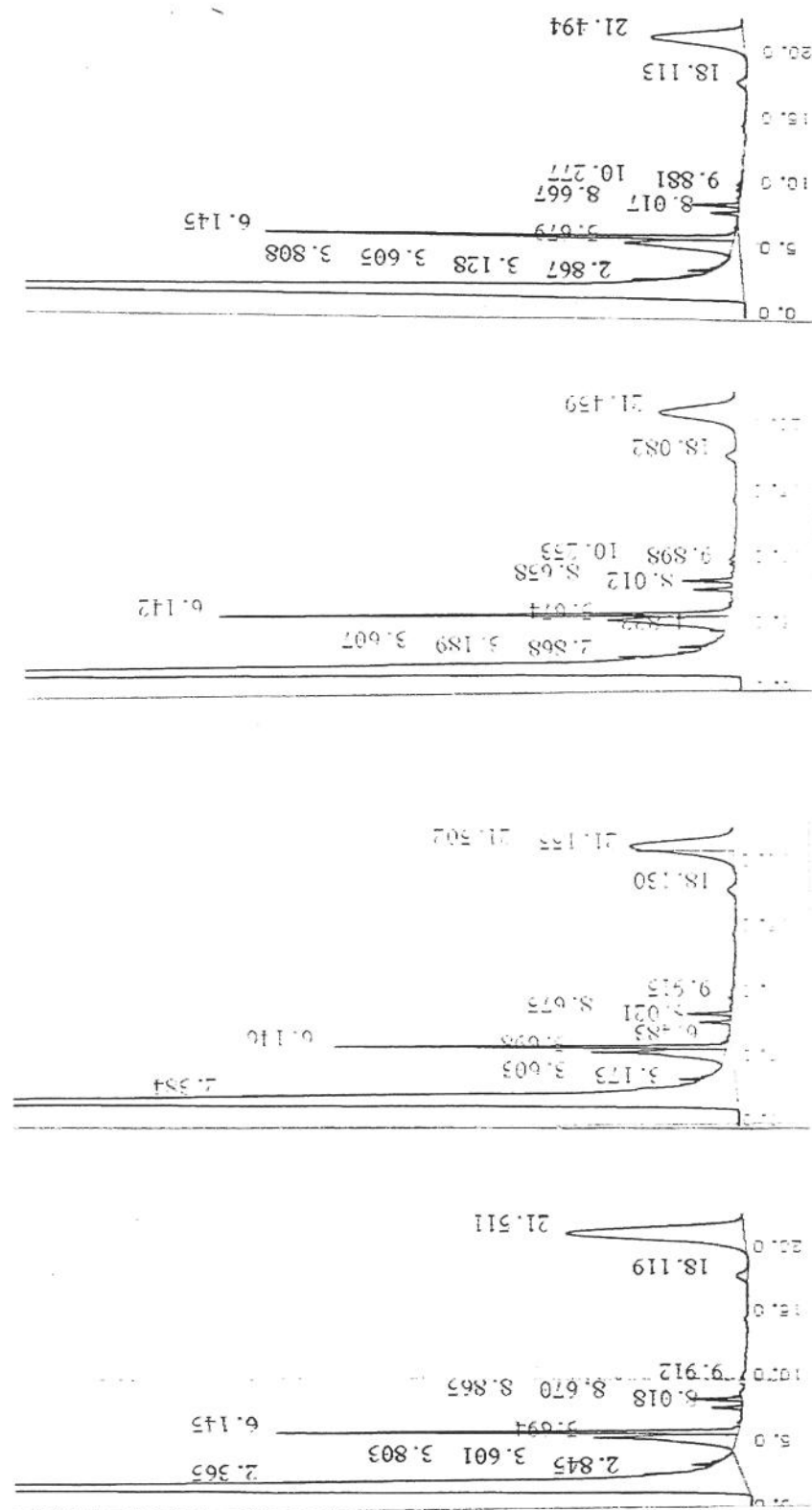


Figura 6. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por culturas puras após 7 dias de cultivo em meio acrescido de 150 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor: (A e B) amostras L77 e (C e D) amostras LS182. Eixo x: tempo (min), eixo y: absorbância a 220nm (mAU).

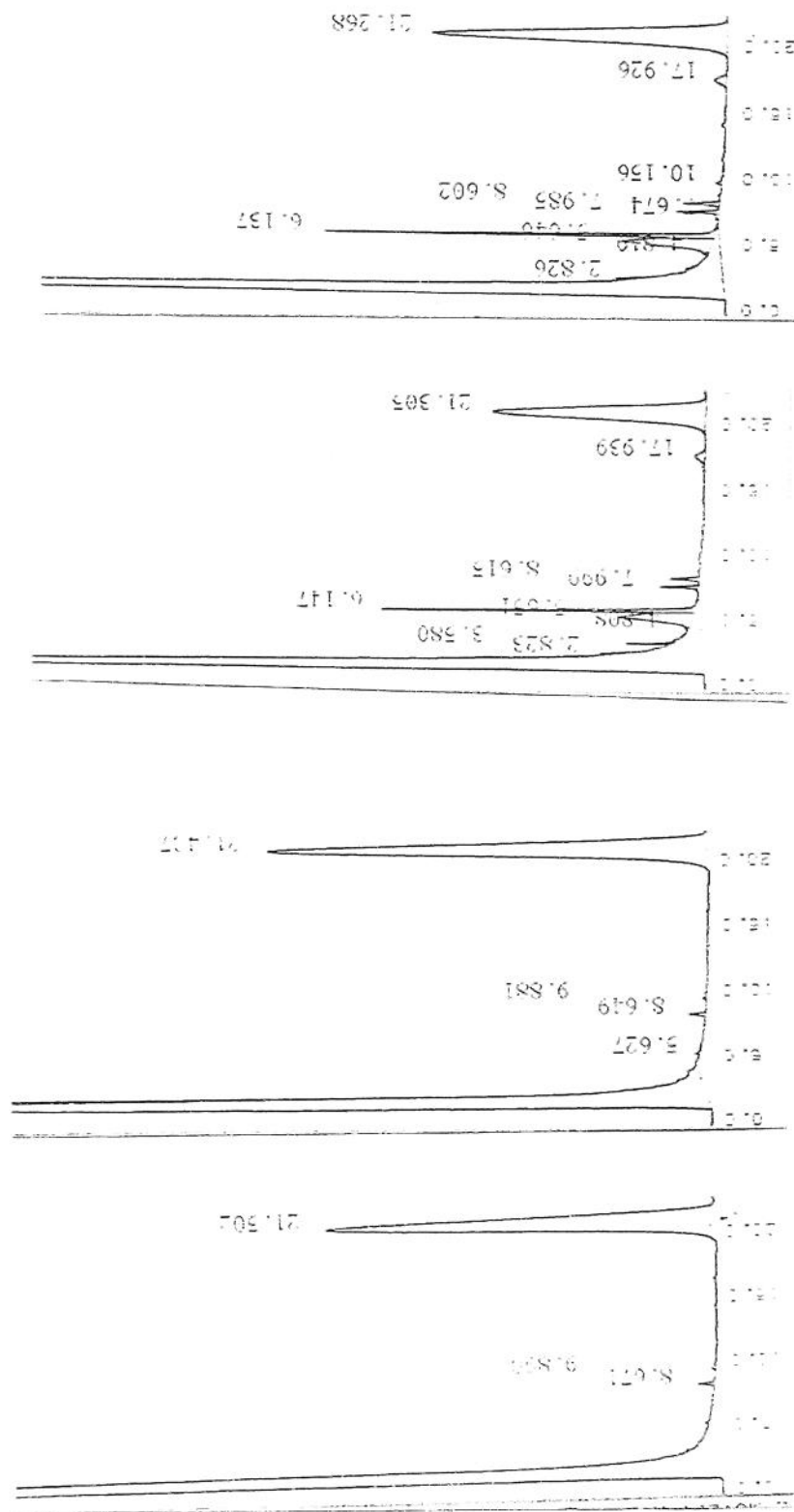


Figura 7. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por culturas puras após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 150 $\mu\text{L/L}$ de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor: (A e B) controles e (C e D) amostras LS143. Eixo x: tempo (min), eixo y: absorbância a 220nm (mAU).

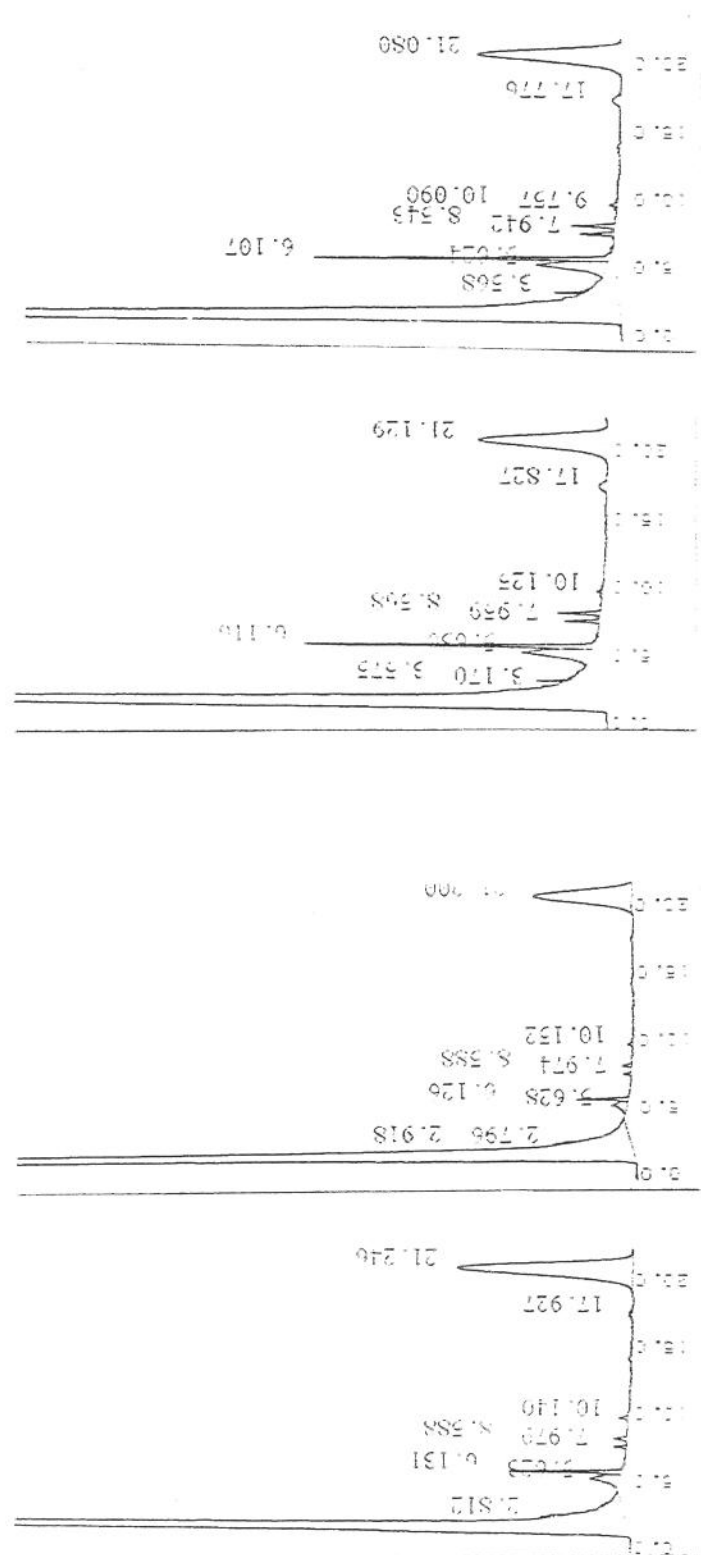


Figura 8. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por culturas puras após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 150 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor: (A e B) amostras LS151 e (C e D) amostras LS153. Eixo x: tempo (min), eixo y: absorbância a 220nm (mAU).

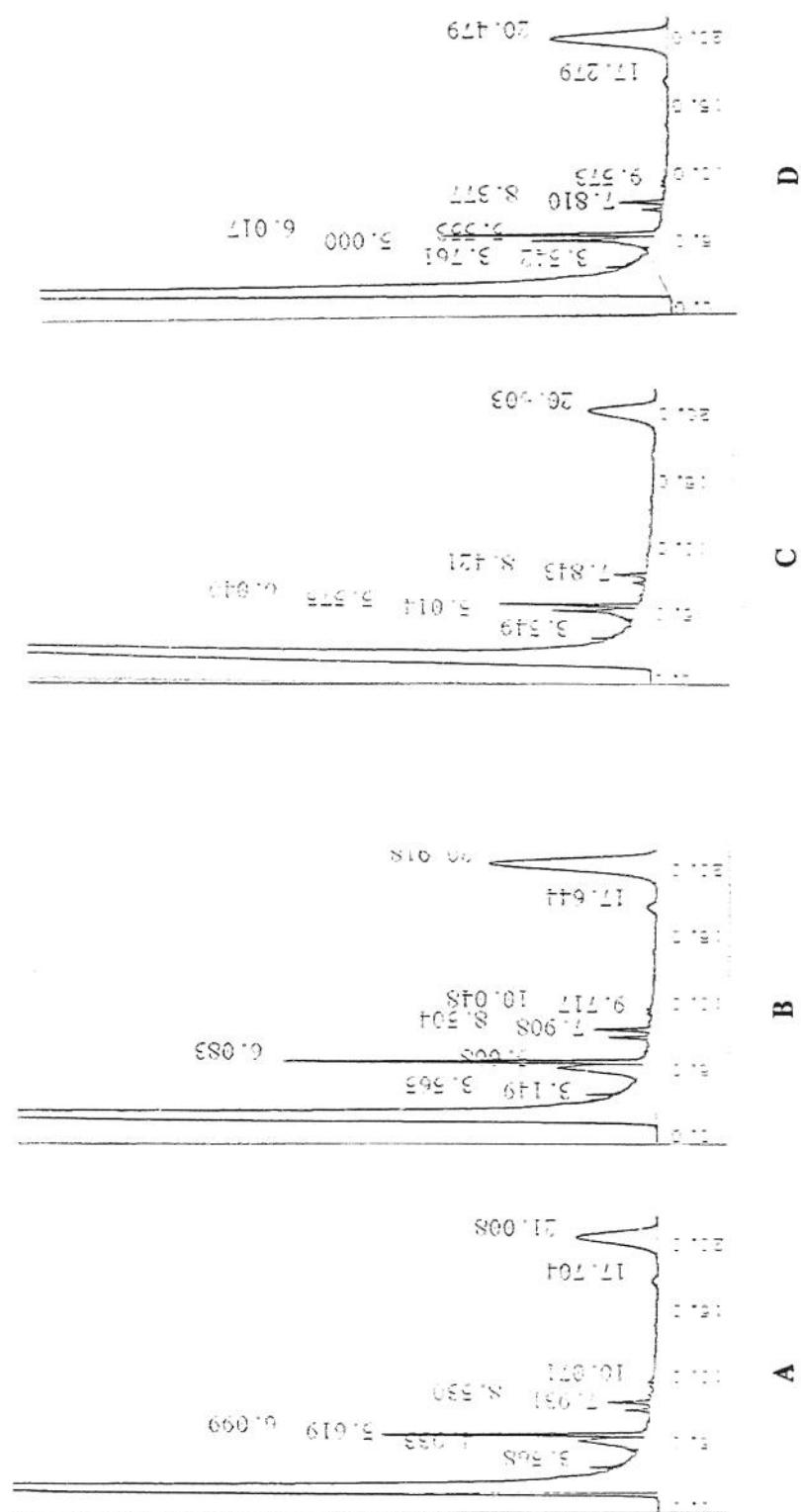
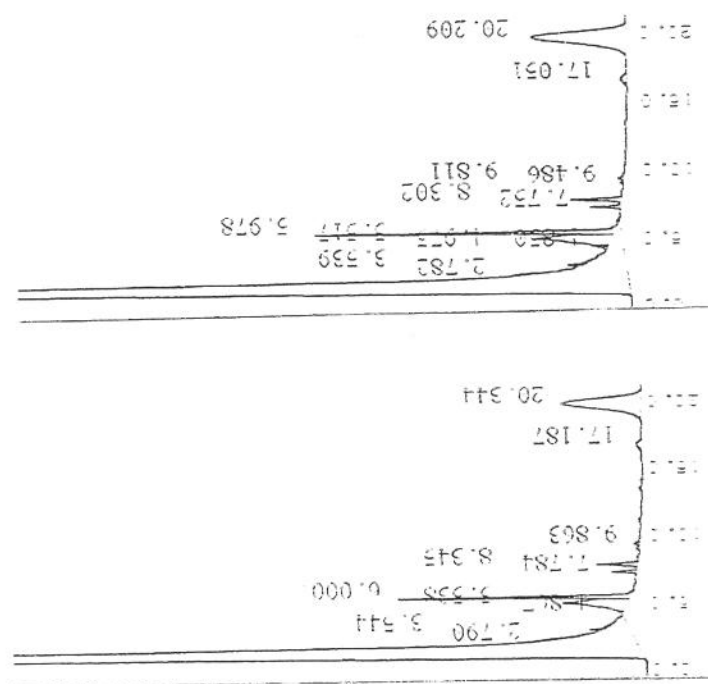


Figura 9. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por culturas puras após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 150 $\mu\text{L/L}$ de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor: (A e B) amostras LS166 e (C e D) amostras LS177. Eixo x: tempo (min), eixo y: absorbância a 220nm (mAU).



B

A

Figura 10. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por culturas puras após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 150 $\mu\text{L/L}$ de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor: (A e B) amostras LS182.
Eixo x: tempo (min), eixo y: absorbância a 220nm (mAU).

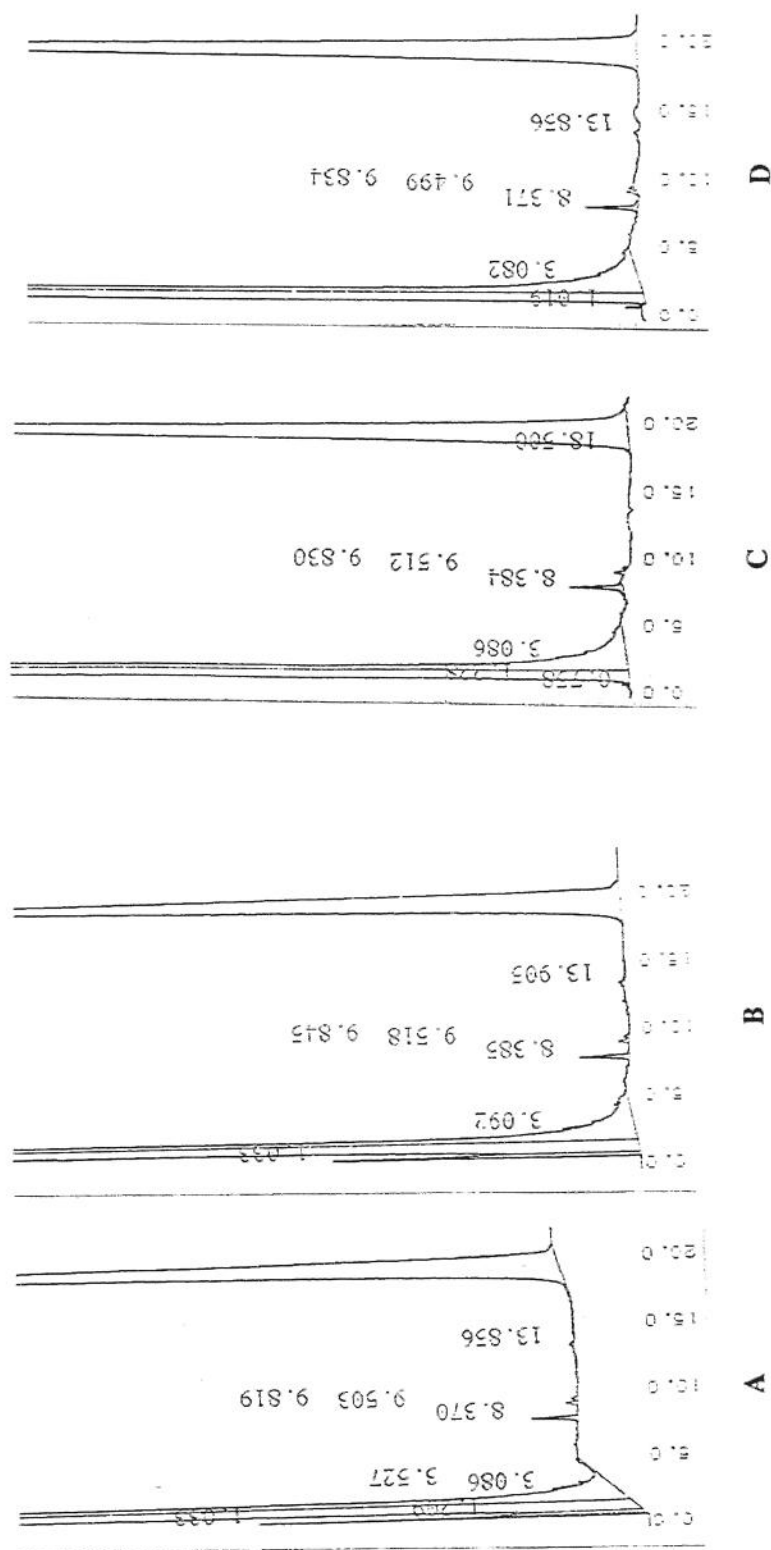


Figura 11 Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por culturas puras após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor: (A e B) controles das amostras LS143, LS151, LS153 e LS166 (C e D) controles das amostras LS177 e LS182. Eixo x: tempo (min), eixo y: absorbância a 220nm (mAU).

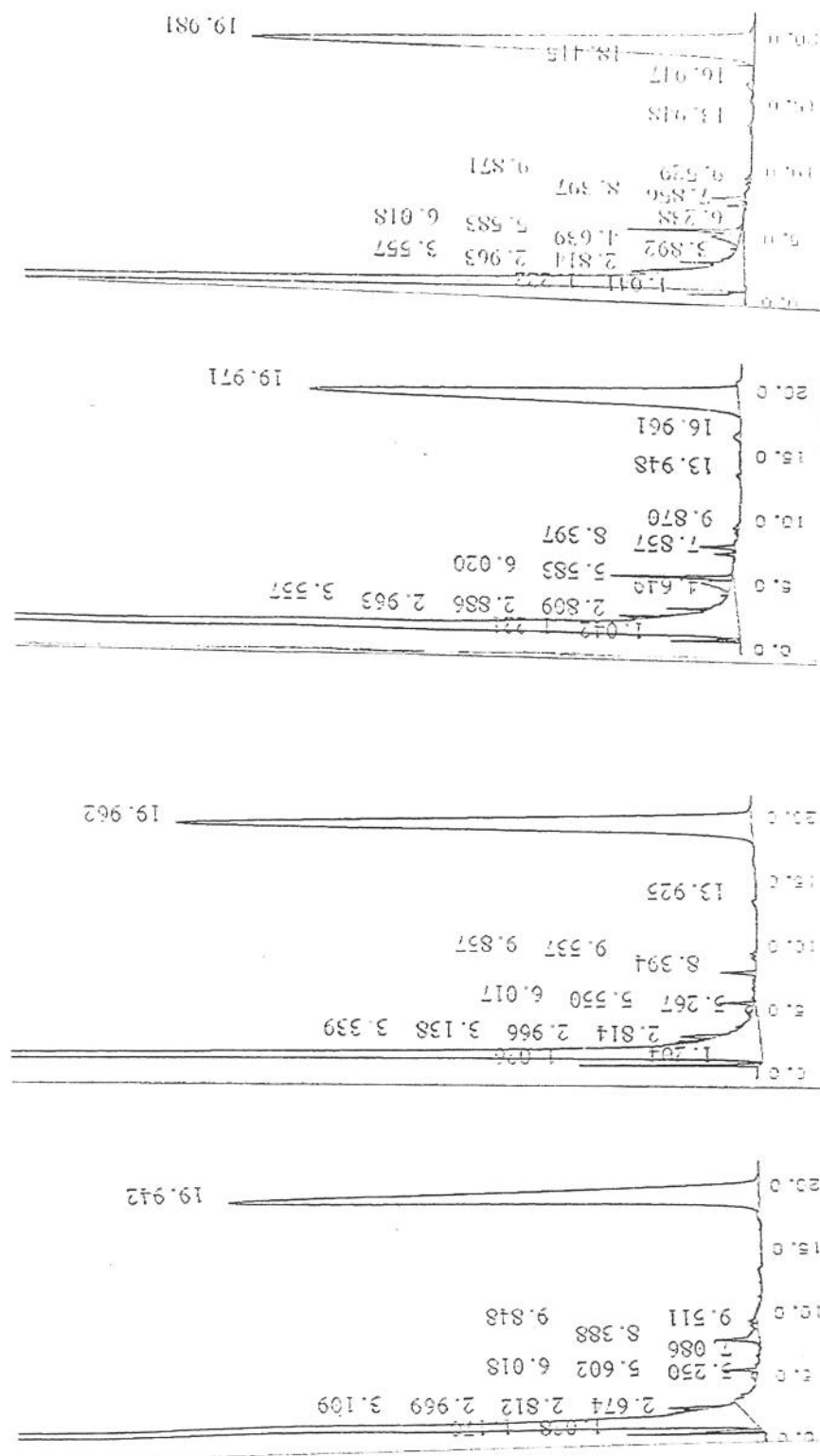


Figura 12. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por culturas puras após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor: (A e B) amostras LS143 e (C e D) amostras LS151. Eixo x: tempo (min), eixo y: absorbância a 220nm (mAU).

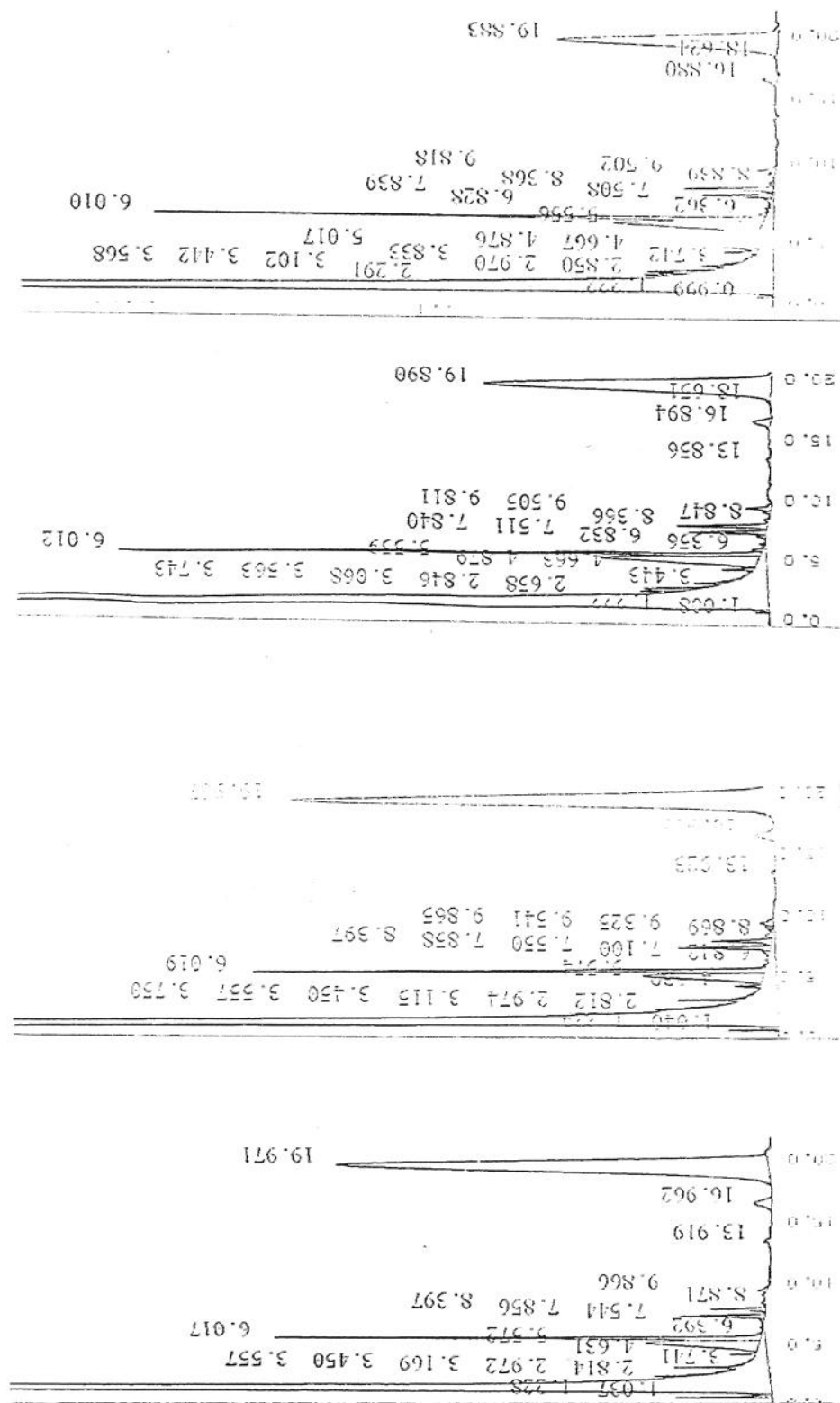


Figura 13. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por culturas puras após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor: (A e B) amostras LS153 e (C e D) amostras LS166. Eixo x: tempo (min), eixo y: absorbância a 220nm (mAU).

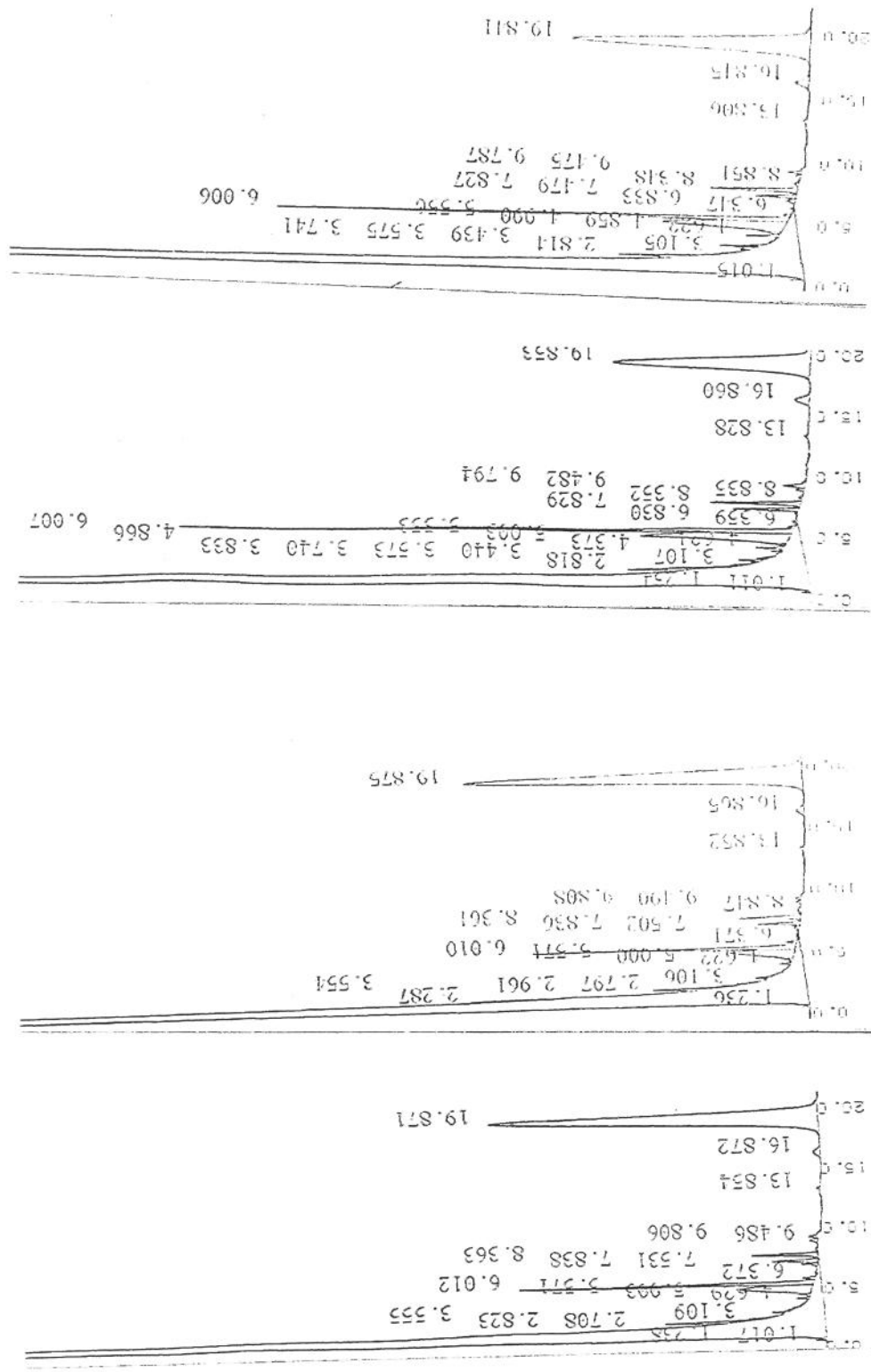


Figura 14. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por culturas puras após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor: (A e B) amostras LS177 e (C e D) amostras LS182. Eixo x: tempo (min), eixo y: absorbância a 220nm (mAU).

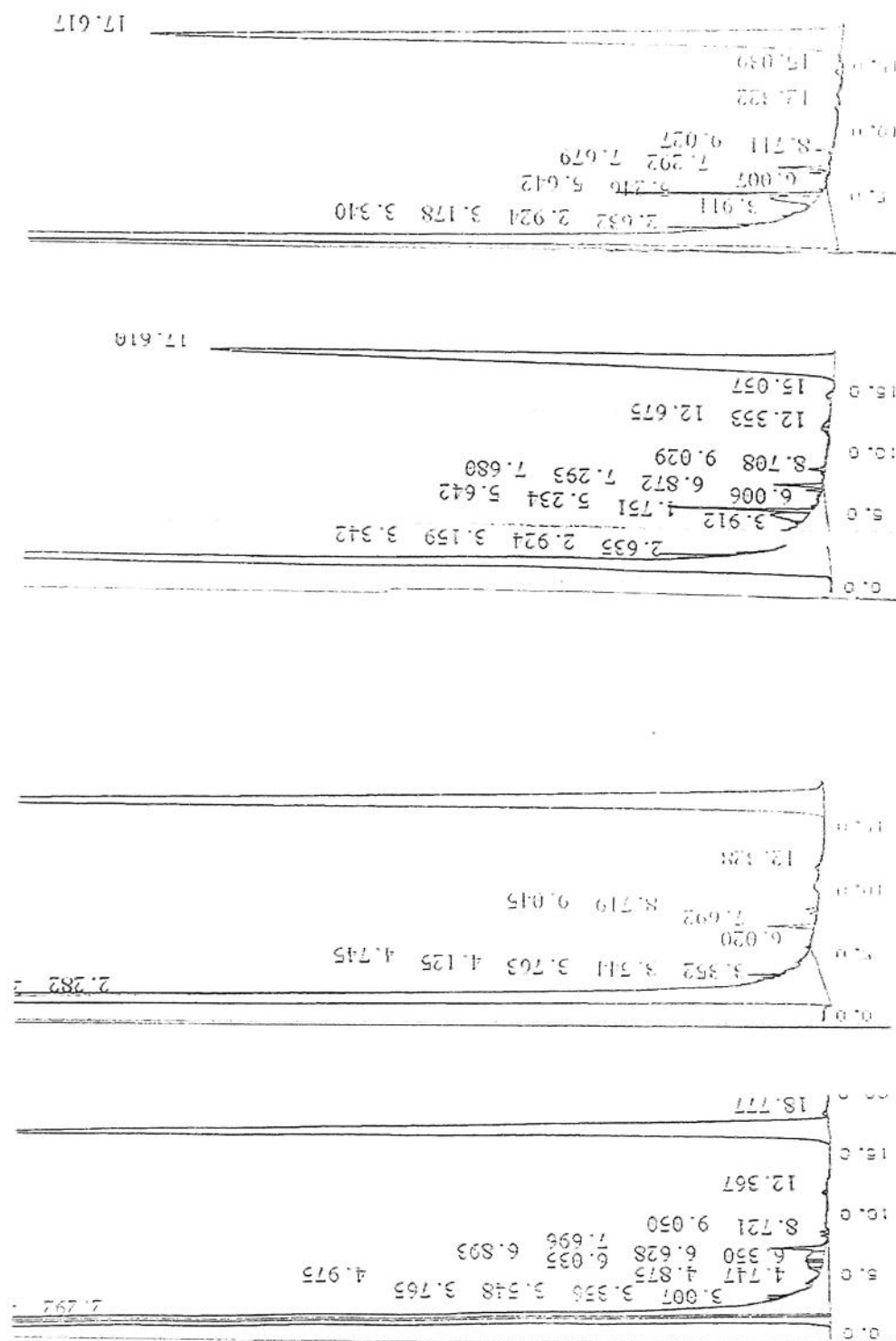


Figura 15. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por consórcios microbianos após 7 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor: (A e B) controles e (C e D) amostras LS143/LS151/LS153. Eixo x: tempo (min), eixo y: absorbância a 220nm (mAU).

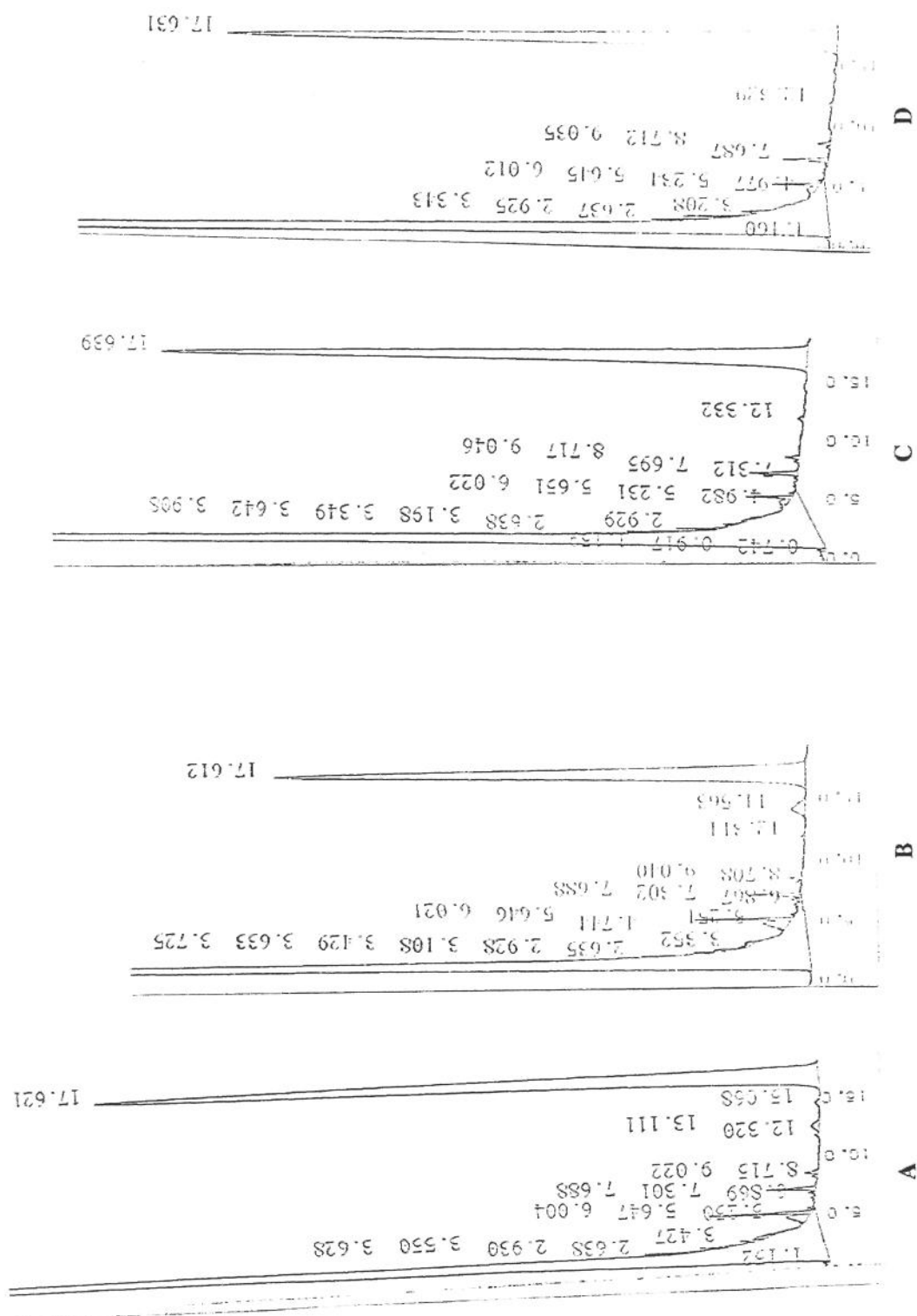


Figura 16. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por consórcios microbianos após 7 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor: (A e B) amostras LS151/LS153/LS182e (C e D) amostras LS143/LS151/LS182. Eixo x: tempo (min), eixo y: absorbância a 220nm (mAU).

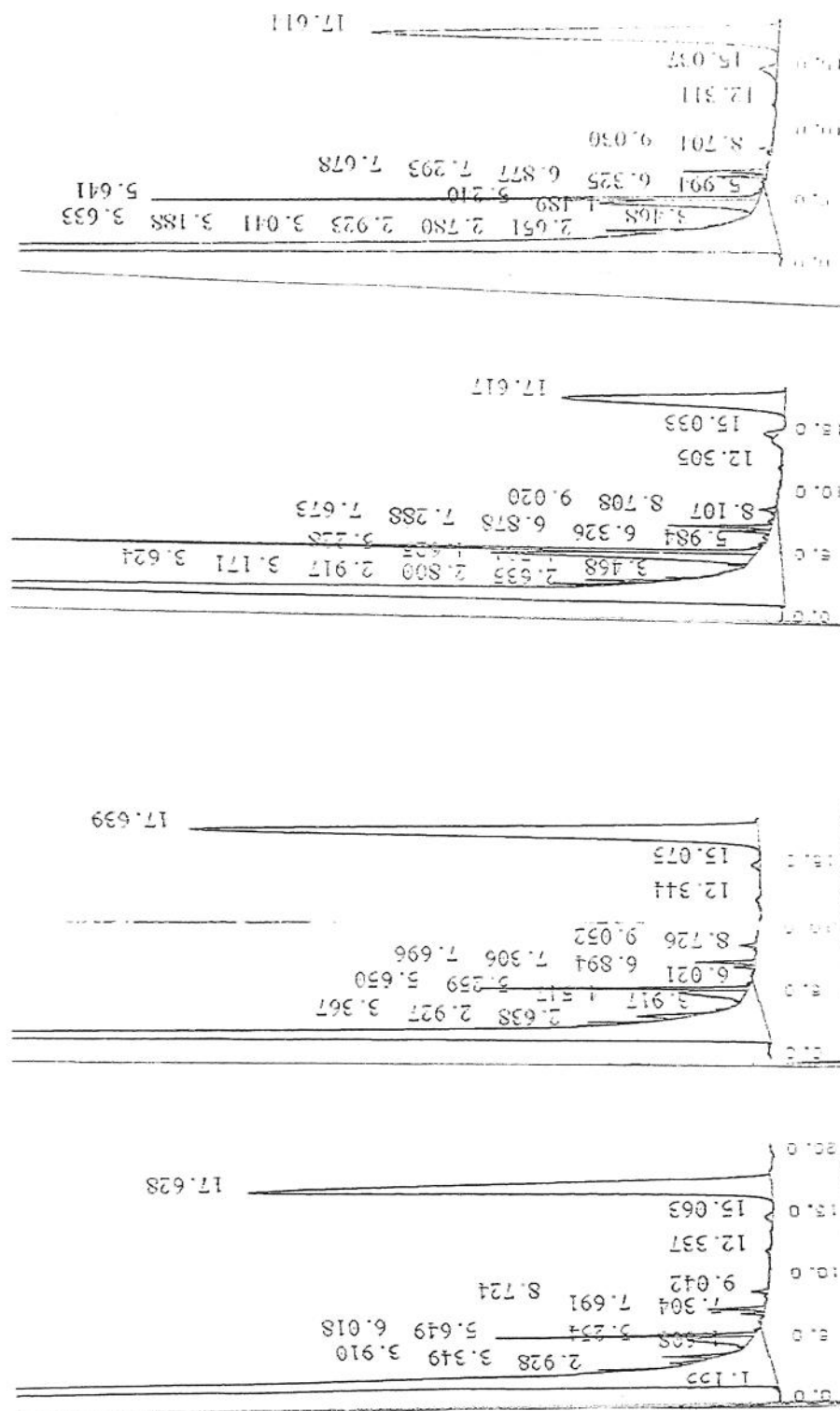


Figura 17. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por consórcios microbianos após 7 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor: (A e B) LS143/LS153/LS182 e (C e D) amostras LS166/LS177/LS182. Eixo x: tempo (min), eixo y: absorbância a 220nm (mAU).

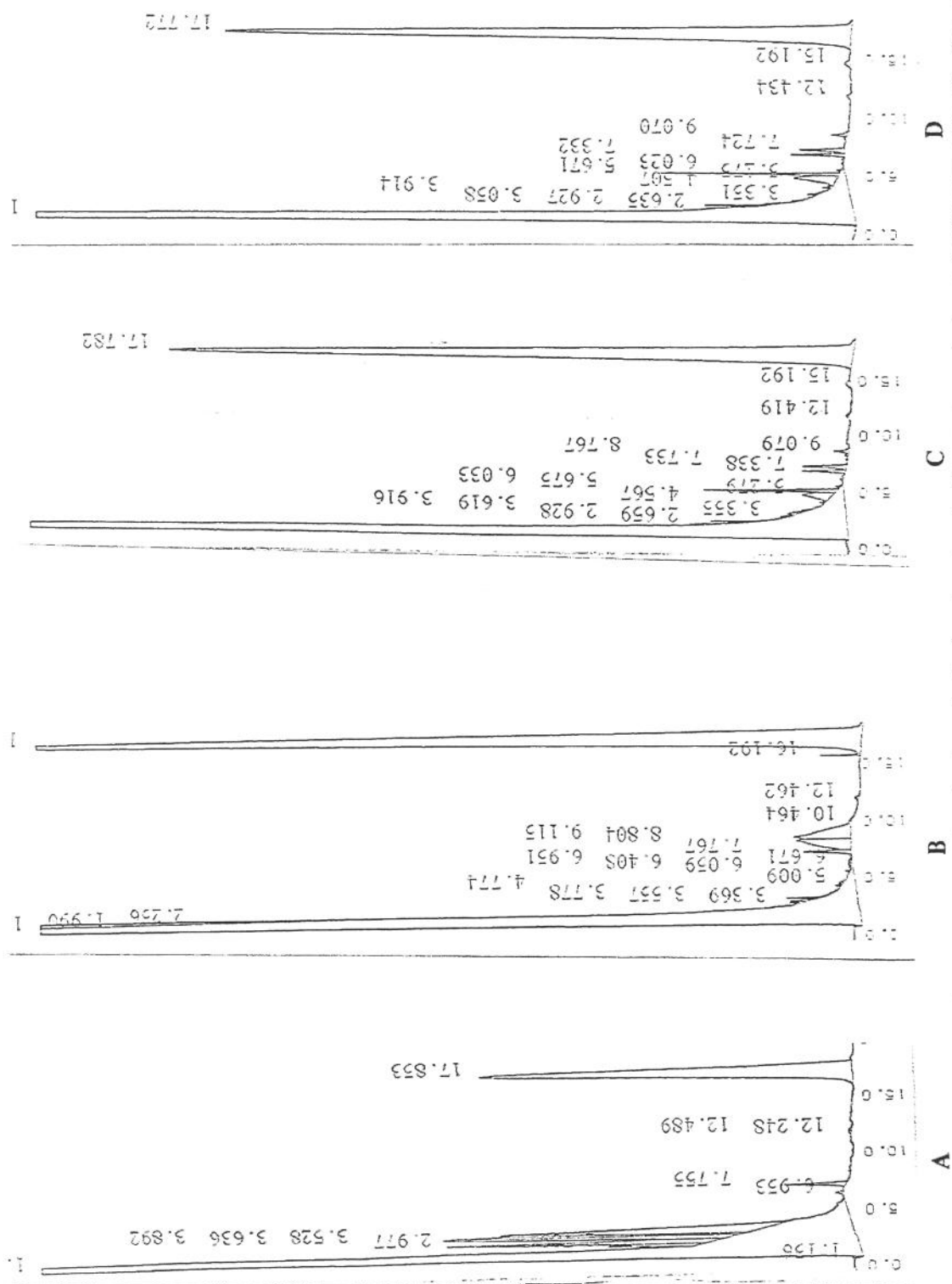


Figura 18. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por consórcios microbianos após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor: (A e B) controles e (C e D) amostras LS143/LS151/LS153. Eixo x: tempo (min), eixo y: absorbância a 220nm (mAU).

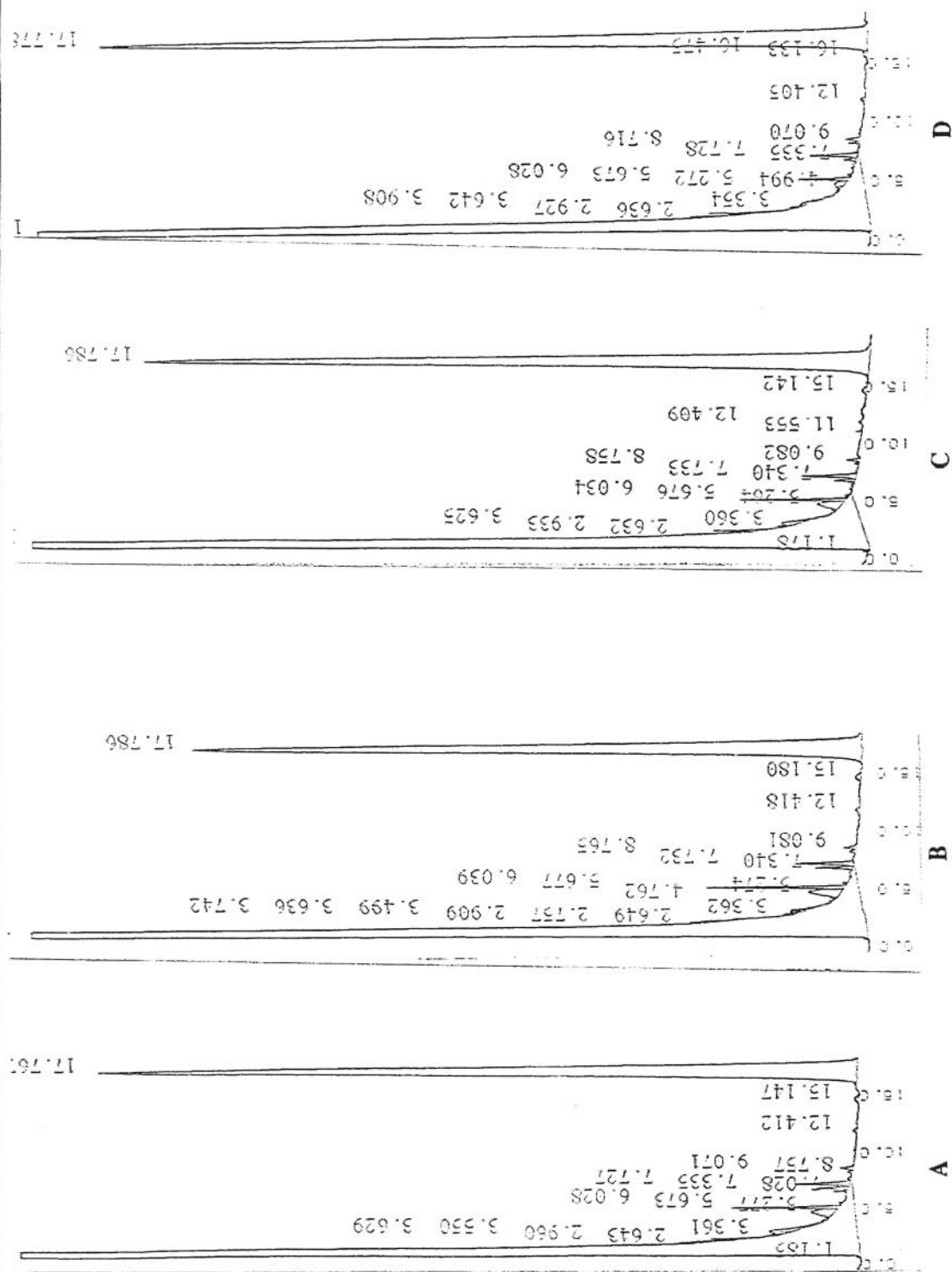


Figura 19. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por consórcios microbianos após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor: (A e B) amostras LS151/LS153/LS182e (C e D) amostras LS143/LS151/LS182. Eixo x: tempo (min), eixo y: absorbância a 220nm (mAU).

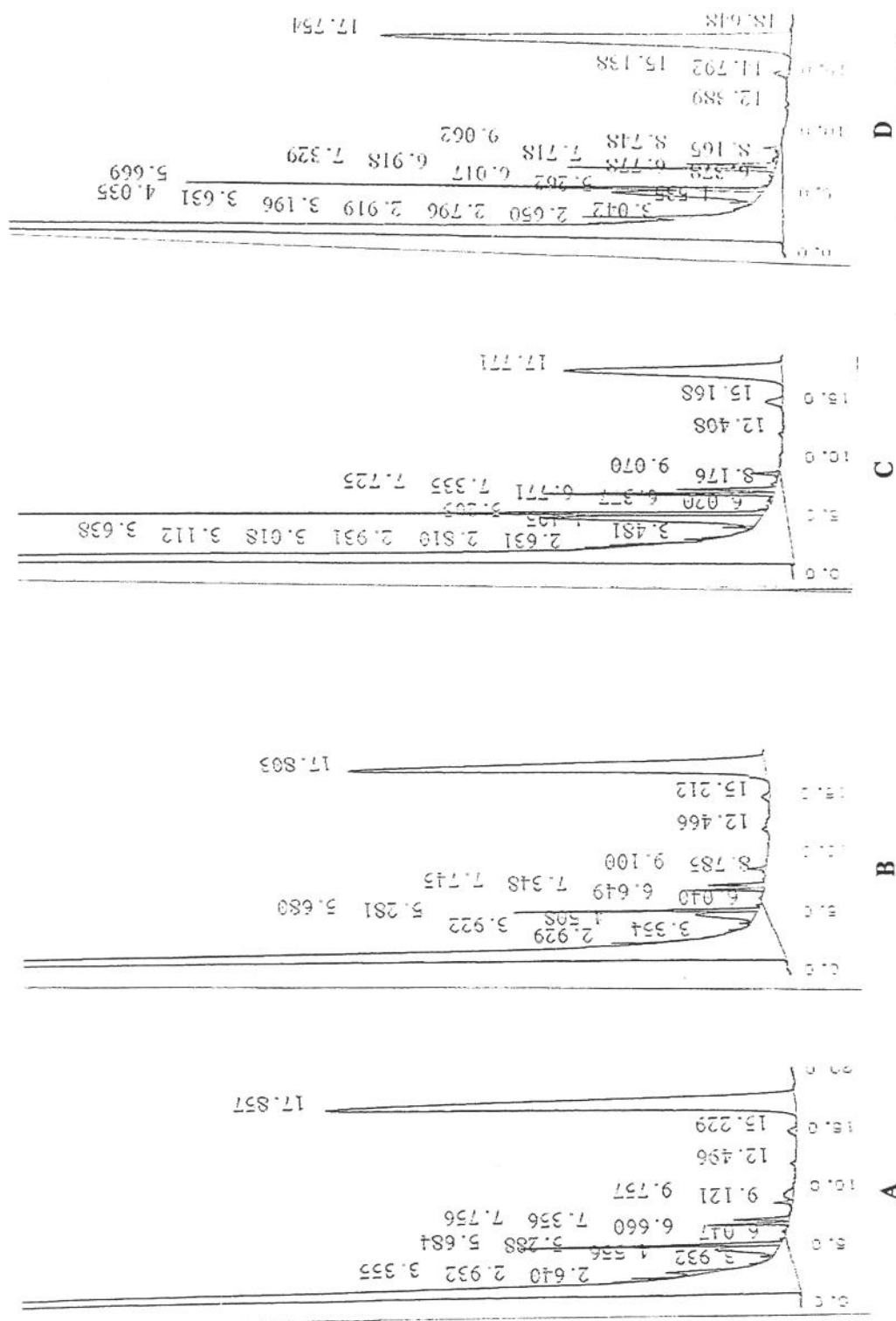


Figura 20. Cromatogramas referentes aos ensaios de degradação *in vitro* do alachlor por consórcios microbianos após 14 dias de cultivo em meio acrescido de 300 µL/L de alachlor e produtos de hidrólise do alachlor: (A e B) LS143/LS153/LS182 e (C e D) amostras LS166/LS177/LS182. Eixo x: tempo (min), eixo y: absorbância a 220nm (mAU).